

酶和酶工程

罗九甫 编

MEI HE MEIGONGCHENG

上海交通大学出版社

255

LJF

Yx112/22

酶 和 酶 工 程

罗九甫 编

上海交通大学出版社

内 容 简 介

本书围绕酶与酶工程领域的基本内容、基本理论和基本技术,从概念、原理和方法上阐述酶和酶工程的基本面貌与进展情况。全书共分八章,分别介绍了酶的概况、酶的作用原理、酶的生产、酶的分离纯化、酶的作用动力学、酶分析法、酶与细胞的固定化和酶与固定化酶的应用等。本书可作为高等院校生物技术及相关专业的教材,也可供有关专业的教学科研工作者参考。

酶 和 酶 工 程

罗九甫 编

上海交通大学出版社·出版

(上海市华山路 1954 号 邮政编码: 200030)

新华书店上海发行所·发行

上虞市科技外文印刷厂·印刷

开本: 850×1168 (毫米) 1/32 印张: 10.75 字数: 277000

版次: 1996 年 11 月 第 1 版 印次: 1996 年 11 月 第 1 次

印数: 1—1300

ISBN 7-313-01669-7/Q·03

定价: 14.80 元

前 言

生物技术已在工业、农业、医药、食品等方面得到广泛应用,并在解决当代资源、能源、环保等多种问题方面起着举足轻重的作用,一个新兴的生物技术产业已成为当前优先发展的高科技领域之一。

酶是高效、专一的生物催化剂,它和关系人们衣食住行的各行各业休戚相关,在生产实践和基础理论研究中起着非常重要的作用。作为生物工程的一个重要组成部分,酶和酶工程不但受到生化工作者的重视,也日益为广大工农业、医药保健工作者所关注,一本能全面介绍酶与酶工程内容的教材或读物成为许多科技工作者之所需。

在多年试用的教学讲义的基础上,编者整理编写成此书。本书在较全面叙述了酶和酶工程基本内容、基本理论的基础上,着重阐明酶分子结构与性质、功能的关系以及酶的作用特点和规律,并力求兼顾基本理论和实际应用知识。它既可作为专业教材使用,也可作为有关教学、科研人员的参考用书。

编者虽较长时间从事本专业的教学和科研工作,但自感水平有限,在具体内容和阐述上谬误难免,敬请同行专家和广大读者不吝指正。

编 者

1996.1

目 录

第一章 绪论	1
1.1 酶与酶工程研究概况	1
1.1.1 酶与酶工程研究的重要意义	1
1.1.2 酶研究的历史与现状	3
1.1.3 酶工程简介	6
1.2 酶是生物催化剂	7
1.2.1 酶在生物体内的功能	8
1.2.2 酶在生物体内的分布	12
1.2.3 酶的作用特点	15
1.3 酶的分类命名	25
1.3.1 酶的分类命名原则	25
1.3.2 各类酶的主要特点	26
1.3.3 各类酶的分类和编号的简单说明	32
主要参考文献	40
第二章 酶的作用原理	41
2.1 酶催化功能的结构基础	41
2.1.1 酶蛋白结构	41
2.1.2 酶的活性部位	54
2.2 酶催化作用的方式和机制	73
2.2.1 酶的作用方式	73
2.2.2 酶催化作用专一性的学说	76
2.2.3 酶的催化机理	77
2.3 酶活性调节机制	83
2.3.1 共价调节	83
2.3.2 通过聚合(结合)解离进行的调节	87

2.3.3 别构调节	91
主要参考文献	99
第三章 酶的生产	100
3.1 酶的发酵生产	100
3.1.1 酶的来源	100
3.1.2 酶的生产菌	102
3.1.3 酶的发酵生产	104
3.2 酶的生物合成	109
3.2.1 酶基因表达的中心法则	110
3.2.2 操纵子模型	111
3.3 微生物酶产量的提高	115
3.3.1 诱导与阻遏	115
3.3.2 诱变育种	117
3.3.3 限制性内切酶	120
3.3.4 基因工程	128
3.4 酶分子的修饰(改造)与模拟	134
3.4.1 酶分子的修饰	134
3.4.2 酶分子的模拟	136
主要参考文献	139
第四章 酶的分离纯化	141
4.1 酶分离纯化前的预处理	142
4.1.1 酶的抽提	142
4.1.2 细胞破碎	143
4.1.3 酶液的浓缩	144
4.2 沉淀分离法	145
4.2.1 盐析法	146
4.2.2 有机溶剂沉淀法	147
4.2.3 其他沉淀法	151

4.3 层析分离法	152
4.3.1 离子交换层析	152
4.3.2 凝胶排阻层析	156
4.3.3 亲和层析	162
4.3.4 高压液相层析	164
4.4 电泳分离	167
4.4.1 凝胶电泳	168
4.4.2 等电聚焦电泳	169
4.5 酶的结晶	170
4.6 酶的纯度与回收率	172
主要参考文献	175
第五章 酶作用动力学	176
5.1 单底物酶促反应动力学	176
5.1.1 Michaelis-Menten 快速平衡学说	177
5.1.2 Briggs-Haldane 稳态学说	178
5.1.3 米氏方程的讨论	180
5.1.4 米氏方程的表达形式——作图法求 K_m 、 V_m	185
5.2 双底物酶促反应动力学	188
5.2.1 顺序机制	188
5.2.2 乒乓机制	190
5.3 各种因素对酶促反应动力学的影响	191
5.3.1 pH 对酶促反应速度的影响	191
5.3.2 温度对酶促反应速度的影响	194
5.3.3 抑制剂对酶促反应动力学的影响	196
5.3.4 底物与产物对酶反应的抑制	201
5.3.5 金属离子的影响	202
5.3.6 酶的变性因素	202
主要参考文献	203
第六章 酶分析法	205

6.1 酶活力测定	205
6.1.1 测定原理	206
6.1.2 反应条件	206
6.1.3 测定方法	209
6.1.4 测定	213
6.2 酶法分析	215
6.2.1 酶法分析的基本方法	215
6.2.2 酶法分析的几个问题	216
6.2.3 酶标免疫分析	218
6.3 酶电极	225
6.3.1 酶电极的结构与原理	225
6.3.2 酶电极的制备和性能	229
6.3.3 酶电极的应用	237
主要参考文献	237

第七章 酶与细胞的固定化239

7.1 酶应用的重要突破	240
7.1.1 固定化酶(细胞)的由来与发展	240
7.1.2 固定化酶的定义	241
7.2 固定化酶(细胞)的制备方法	243
7.2.1 固定化酶的制备	243
7.2.2 固定化细胞的制备	258
7.3. 固定化酶(细胞)的性质	260
7.3.1 影响固定化酶(细胞)性质的因素	262
7.3.2 固定化酶(细胞)的性质	265
7.3.3 评价固定化酶(细胞)的指标	269
7.4 固定化对酶促反应动力学的影响	271
7.4.1 外扩散限制	271
7.4.2 内扩散限制	276
7.4.3 外扩散与内扩散的联合作用	278

7.5 固定化酶反应器.....	280
7.5.1 各种酶反应器的特点.....	281
7.5.2 固定化酶反应器的选择.....	285
主要参考文献	287

第八章 酶与固定化酶的应用288

8.1 酶在生产实践中的应用.....	288
8.1.1 酶在食品工业中的应用.....	288
8.1.2 酶在轻化工业中的应用.....	292
8.1.3 酶在氨基酸、有机酸生产方面的应用	295
8.1.4 酶在医学方面的应用.....	300
8.2 固定化酶(细胞)的应用.....	303
8.2.1 工业应用.....	303
8.2.2 医疗方面的应用.....	308
8.2.3 诊断、分析方面的应用	310
8.2.4 环境保护方面的应用.....	312
8.3 几种工业常用酶.....	313
8.3.1 蛋白酶.....	314
8.3.2 淀粉酶.....	319
8.3.3 纤维素酶.....	325
8.3.4 葡萄糖氧化酶.....	328
8.3.5 青霉素酰化酶.....	330
主要参考文献	333

第一章 绪 论

生物技术产业已成为当前优先发展的高新技术领域之一，作为生物技术的一个重要组成部分，酶与酶工程也日益受到广大科研、医疗工作者及产业界的重视。

酶是生物催化剂，它具有作用专一性强、催化效率高和反应条件温和的显著特点。一切生物的生命活动都是由代谢的正常运转来维持，代谢中的各种化学反应在生物体内都可以在常温、常压、中性条件下极其迅速地进行。所以，酶是促进一切代谢反应的物质，没有酶代谢就停止，生命活动也就停止。

酶工程的研究涉及到与人们衣食住行休戚相关的各行各业，在基础理论研究和生产实践中都起着非常重要的作用。其主要内容包括酶的发酵生产和分离纯化，酶分子修饰、改造和模拟，酶的应用性开发，酶与细胞的固定化及酶反应器研制等。

1.1 酶与酶工程研究概况

1.1.1 酶与酶工程研究的重要意义

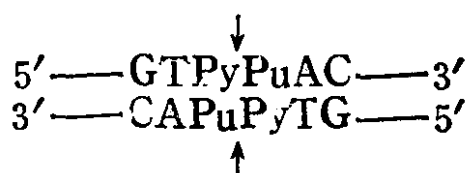
新陈代谢是生命活动的最重要特征，一切生物的生命活动都是由代谢的正常运转来维持的，而代谢中的各种化学反应在生物体内都可以在常温、常压、中性条件下极其迅速地进行。如：绿色植物只需要几秒钟到几分钟时间就可以从环境中吸收二氧化碳和水等合成复杂的糖、蛋白质、脂肪，把光能转变成化学能而贮藏起来。动物吃下的肉食在消化道内只需几小时便被完全消化吸收，然后在细胞内进一步分解成 CO_2 、 H_2O ，同时释放能量，供生命活动之需。有些细菌在适合条件下20min就能增殖一代。在这20min内合成了新细胞内的全部物质。在生物体内，虽然条件非常温

和,但许多复杂的化学变化都按一定途径,根据生命活动需要进行得极为顺利,相互联系又相互制约,迅速而又有条不紊。这种使化学变化变得容易发生和迅速进行的根本原因,就是因为生物体内普遍存在着生物催化剂——酶。酶是促进一切代谢反应的物质,没有酶,代谢就会停止,生命也即停止。个别酶缺陷或酶活性被抑制都会因代谢受阻或紊乱而引起疾病。典型的例子是苯酮尿症:在10000人中常发现有一个人缺乏苯丙氨酸4-单加氧酶(苯丙氨酸羟化酶),如缺乏这种酶,苯丙氨酸降解之途径就改变为正常情况下很少起作用的第二条途径,即苯丙氨酸与 α -酮戊二酸转氨形成苯丙酮酸,蓄积在血液中最后由尿排出体外。儿童期血液中有过量苯丙酮酸,就会妨碍脑的正常发育,造成严重智力迟钝,这种情况称为苯酮尿症,简称PKU症。又如:缺乏酪氨酸酶便会引起白化病;缺乏6-磷酸葡萄糖脱氢酶便会罹致蚕豆病;几乎许多中毒性疾病如有机磷中毒、氰化物中毒、重金属中毒都是由于某些酶的活性被抑制所引起的。在第一次世界大战中,帝国主义使用的化学毒剂路易士气就是一种含砷的化合物,它能抑制体内含巯基的酶类的活性,从而阻止代谢进行。所以可以说离开了酶在生物体内的催化作用,生命也就停止了。

研究酶的理化性质及其作用机理,对于阐明生命现象的本质也具有十分重要的意义。特别是现代生物科学发展已经日益深入到分子水平,日益深入到以生物大分子结构与功能的关系来说明生命现象的本质和规律,从酶分子水平去探讨酶与生命活动、与代谢调节、与疾病、生长发育等等的关系,对阐明生命活动的本质和规律,无疑是十分有意义的。

另外,由于酶的独特催化功能,它的高效率、专一性及不需要高温高压或强酸强碱的作用条件,对于普通的化学催化反应产生了决定性的飞跃。它丰富充实了现代化学中的催化理论(多元催化、催化调节机制等)。所以对于酶的研究成果必将给催化理论、催化剂设计、药物设计、疾病诊断治疗、遗传变异研究等各个方面提供理论依据和新思想、新概念。

酶又是分子生物学研究的重要工具。如核酸一级结构测定由于某些专一性工具酶的出现而有了重要突破。1970年,美国约翰·霍普金斯大学医学院施密斯(Smith)等从流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) d株中分离纯化出能识别特定核苷酸序列并且切点专一的限制性内切酶,被命名为Hind II,其识别序列及切点为:



内森斯(Nathans)用该酶降解猕猴肿瘤病毒SV40DNA,排列了酶切图谱。从此,引起广大生化学家注意,成为分子克隆技术中不可缺少的工具酶。Smith等为此荣获1979年诺贝尔生理·医学奖。因为限制性内切酶的发现提供了特异剪切DNA的工具,促进了DNA重组技术诞生,推动了基因工程发展,同时也是基因结构表达调控与分子生物学、分子遗传学不可缺少的工具。

由于酶的独特催化功能,所以它在工、农、医各方面都应用已久,尤其是近百年来已成为自觉应用。可以说,从与人们生活休戚相关的衣食住行到各行各业的新技术革命几乎都与酶有关。

综上所述,对于生物科学及有关学科的工作者来说都或多或少地需要对酶、酶学、酶工程的基础知识的了解和掌握。

1.1.2 酶研究的历史与现状

要准确地说出酶是什么时候、由谁首先发现,那是件很困难的事。很早,人们就感觉到它的存在。但是真正认识它、利用它还只是近百年的事。我国从有记载的资料得知,4千多年前的夏禹时代酿酒已为盛行。周朝时民间就有用风干的、磨碎的麦芽粉来制饴,也就是说那个时候人们就利用了酶。

国外知道酶的存在是和发酵联系在一起的。

1833年,佩延(Payen)、珀索茨(Persoz)从麦芽的水抽提物中用酒精沉淀得到了一种对热不稳定的物质,它可促进淀粉水解成

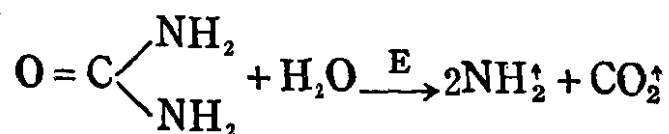
可溶性糖,他们把这种物质称为淀粉糖化酶 (diastase), 其意为“分离”,表示可从淀粉中分离出可溶性糖来。虽然现在已知,他们当时得到的是一个很粗的淀粉酶制剂,但是由于他们采用了最简单的抽提、沉淀等提纯方法,得到了一个无细胞制剂,并指出了它的催化特性和不稳定性,至少开始触及了酶的一些本质问题,所以有人认为Payen、Persoz首先发现了酶。

1878年德国人库尼(Kuhne)首先把这类物质称为Enzyme。Enzyme 这词来自希腊文,其意为“在酵母中”。中文译为酶,说明我国古代对酶的性质、作用已有相当认识。

1896年德国学者巴克纳(Buchner)兄弟发现了用石英砂磨碎的酵母细胞或无细胞滤液和酵母细胞一样能将1分子葡萄糖转化成2分子乙醇和2分子CO₂,他把这种能发酵的蛋白质成分称为酒化酶(Eymase),表明了酶能以溶解状态、有活性状态从破碎细胞中分离出来而非细胞本身,从而说明了上述化学变化是由溶解于细胞液中的酶引起的。此项发现促进了酶的分离和对其理化性质的探讨,也促进了对有关各种生命过程中酶系统的研究。一般认为酶学研究始于1896年Buchner的发现。

20世纪初,酶学得到了迅速发展。一方面发现了更多的酶,并注意到某些酶的作用需要有低分子物质(辅酶)参加;另一方面在物理、化学的影响下,Michaelis·Menten总结了前人工作,根据中间产物学说于1913年提出了酶促反应动力学原理——米氏学说。这一学说的提出,对酶反应机理的研究是一个重要突破。

1926年,Sumner 从刀豆中得到脲酶结晶(这是第一个酶结晶),并证实这种结晶催化脲素分解:



并提出酶本身就是一种蛋白质,但是直到1930—1933年, Northrop等得到了胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶的结晶,并证实了酶是一种蛋白质后,Sumner 的观点才被普遍接受,并获

1947年诺贝尔奖。现已发现生物体内存在的酶有近3千种,而且每年都有新酶发现。迄今,数百种酶已纯化达到了均一纯度,大约有200多种以上的酶得到了结晶。

由于蛋白质分析分离技术的飞速发展,特别是在运用 X-衍射分析等方法后,人们相继弄清了溶菌酶(129个氨基酸残基)、胰凝乳蛋白酶(245个氨基酸残基)、羧肽酶(307个氨基酸残基)、多元淀粉酶 A(460个氨基酸残基)等的结构及作用原理。现在对于细胞基本代谢过程中各种酶,很多已有比较清楚的认识,但有关遗传过程中的酶(如涉及DNA复制转录的酶等)尚待进一步揭示。

由以上讨论可知,自酶学建立起来的近百年来,对酶的研究一直是沿着两个方向发展的:

理论研究方向,包括酶理化性质及催化性质的研究。如酶作用的锁钥学说及诱导契合学说的提出,使人们对酶有了更深入的了解;米氏方程的建立开拓了对酶由定性到定量,以及作用机制的探讨,奠定了酶学发展的里程碑;脲酶结晶的获得,不仅弄清了酶的蛋白质本质,而且奠定了现代酶学、蛋白质化学的基础。

Senger 等建立的蛋白质一级结构测定方法,有力地推动了酶学的发展,也为酶的分子生物学建立奠定了基础。当今,酶学研究的任务是要从分子水平更深入地揭示酶和生命活动的关系;阐明酶的催化机制和调节机制,探索作为生物大分子的酶蛋白的结构与性质、功能间关系。

应用研究促进了酶工程的形成。酶的应用研究始于1894年: Takamine 等将酶的合成调节理论应用于酶的生产获得明显成果;1808年,罗门等利用胰酶制皮革;1917年,法国人博伊丁·埃劳特用枯草杆菌产生的淀粉酶用作纺织工业上的退浆剂;1949年,日本采用深层培养法生产 α -淀粉酶获得成功,使酶制剂生产应用进入工业化阶段;1959年,由于采用了葡萄糖淀粉酶催化淀粉生产葡萄糖新工艺研究成功,彻底革除了原来葡萄糖生产中需要高温高压的酸水解工艺,并使淀粉得糖率从80%上升为100%,致使日本在1960年葡萄糖产量猛增10倍。这项新工艺改革成功,大大地

促进了酶在工业上应用的前景。1969年,日本千畑一郎首先在工业上应用固定化氨基酰化酶拆分DL-氨基酸(世界首例)获得成功。70年代大规模开展了固定化细胞、辅酶共固定、增殖细胞固定、动植物细胞固定等研究。同时根据酶反应动力学理论,运用化学工程成果建立了多种类型的酶反应器,在这一基础上逐渐形成了酶工程。

当然酶学研究和酶工程研究不是孤立的,而是相互关联、相互渗透、相互促进的。

1.1.3 酶工程简介

生物工程学(Biotechnology)也称生物技术或生物工艺学,是70年代初在分子生物学和细胞生物学基础上发展起来的一个新兴技术领域。由于基因重组、杂交瘤、固定化细胞(酶)、动植物细胞大规模培养技术等出现,人们运用生命科学的新成就,定向地设计组建具有特定性状的新物种或新品系,结合发酵与生化工程原理加工生物材料,在医药、食品、化工、能源、农业、环保等领域中为社会提供商品和服务,形成了现代生物工程学。

1983年在英国伦敦召开的世界首次生物工程学会议对生物工程下了一个简明的定义:即生物工程是达到特殊目的的生物过程的控制性过程,它是将生物体内进行的精巧的生物化学反应工业化,在人们控制下制造出有用产品的技术体系。

酶工程(Enzyme Engineering)是生物工程的主要内容之一,是随着酶学研究迅速发展、特别是酶的应用推广,使酶学和工程学相互渗透结合,发展而成的一门新的技术科学。它是从应用的目的出发研究酶,是在一定生物反应装置中利用酶的催化性质,将相应原料转化成有用物质的技术,是生物工程的重要组成部分。

第一届国际酶工程会议于1971年美国召开。当时提出的酶工程的内容主要是:酶的生产、分离纯化,酶的固定化,酶及固定化酶的反应器,酶与固定化酶的应用。

随着科学发展,酶工程所涉及的面越来越广。从现代观点来

看,酶工程主要有以下几个方面的研究成果:

- ①酶制剂的分离、提纯、大批量生产及新酶的开发;
- ②酶生产中基因工程技术的应用;
- ③酶与细胞固定化;
- ④酶分子改造与化学修饰,以及酶结构与功能的研究;
- ⑤酶的应用性开发;
- ⑥酶反应器的研究(包括反应检测);
- ⑦酶抑制剂、激活剂开发及应用研究;
- ⑧模拟酶、合成酶及酶分子的人工设计、合成的研究。

1.2 酶是生物催化剂

对于化学反应 $A \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} B$, 其方向和反应程度是热力学问题, 其速度属动力学范畴。从热力学角度看, 催化剂具有降低反应活化能的特性, 但完全不能改变反应的平衡常数, 催化剂只是促进反应达到平衡, 只能催化本来能发生的反应。即

$$K = \frac{[B]}{[A]} = \frac{k_1}{k_{-1}} \text{ 不变}$$

也就是说自由能降低的化学反应并不等于实际已自发进行, 还必须供给反应分子以活化能或用催化剂降低反应所需的活化能, 反应才能进行。如淀粉分解为葡萄糖, 核酸降解为核苷酸, 从热力学角度可完全进行, 但进行得极为缓慢, 只有在催化剂存在时才能快速进行。

酶作为催化剂, 它具备一般催化剂的特性, 即参与化学反应过程时能加快反应速度; 它的参与并不改变反应性质, 即不改变反应的方向和平衡点; 反应结束时酶本身并不消耗, 恢复原状。

酶又是不同于一般催化剂的生物催化剂。因为所有的酶都是由生物体合成; 反之, 几乎所有的生物都能合成产生酶。许多病毒也能合成酶, 主要有降解膜、壁的酶和核酸合成酶, 如反转录酶、

RNA聚合酶、转甲基酶。有些病毒本身不合成酶，但有编码某些酶的基因，利用基因表达产生酶。只有少数病毒至今未发现酶与酶基因。酶与生命活动休戚相关，几乎参加了所有生命活动，其在生物体的分布、含量、活性水平随生物生长、发育、外界条件改变而改变。本节仅就酶作为生物催化剂的特点作一介绍。

1.2.1 酶在生物体内的功能

在生物体内酶所催化的形形色色化学反应按生物功能可归纳为四大类。

1. 直接参与某种具体的生理功能

这类酶根据生命活动需要执行一定的生理功能。例如神经传导是由神经末梢中的乙酰胆碱酯酶来传导神经冲动的；肌纤-ATP酶和肌肉收缩有关； Na^+ 、 K^+ -ATP酶在细胞膜的主动运输中起“钠泵作用”。

细胞膜将细胞与外界环境隔开，细胞和它的周围环境发生的一切联系和反应都必须通过质膜完成，质膜的功能之一主动运输——逆浓度梯度方向的运输就是通过 Na^+ 、 K^+ -ATP酶作用的。已知细胞内 Na^+ 浓度低而 K^+ 浓度高；而细胞外则 Na^+ 浓度高而 K^+ 浓度低。要不断将 Na^+ 由细胞内输出，而将 K^+ 输入，质膜必有动力器官功能，这就是所谓的钠泵假说，目前认为钠泵是一种分解ATP的酶—— Na^+ 、 K^+ -ATP酶，它镶嵌在细胞膜脂质双分子层上。

酶蛋白是由两个HL二聚体组成的一个 H_2L_2 四聚体（如图1.1所示）。它须在有 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 的存在才有活性，并可进行一系列构象变化，这种变化造成了离子转位。而构象变化开始于磷酸化-脱磷酸化过程。当ATP与ATP酶接触时，ATP分解为ADP与磷酸，释放能量。当钠泵蛋白质ATP酶内侧单体与ATP分解下来的带高能的磷酸根磷酸化结合时就引起它的构象变化，与它相接的外侧单体随之而引起连锁的构象变化，伴随而来的是对 Na^+ 、 K^+ 亲和力的变化。一般设想 Na^+ 、 K^+ -ATP酶位于细胞膜上， Na^+ 及