

酶工程

ENZYME ENGINEERING

主编 郭立泉 王红宇

副主编 韩丹 曹伟东



NORTHEAST NORMAL UNIVERSITY PRESS
WWW.NENUP.COM

东北师范大学出版社

“新世纪优秀人才支持计划资助”(项目号 NECT-10-0153)

酶 工 程

主 编：郭立泉 王红宇

副主编：韩 丹 曹伟东

编 者：张 昕 李 贺 (吉林大学)；

王 平 麻 莹 (东北师范大学)；

王红宇 (长春教育学院)；

曹伟东 (长春职业技术学院)；

陈建欣·郭立泉 韩 丹 韩 颖 王海修 魏贞伟 张浩东

邓凤香 吴 铭 朱梅梦 (吉林工商学院)

东北师范大学出版社
长 春

图书在版编目 (CIP) 数据

酶工程 / 郭立泉, 王红宇主编. —长春: 东北师范大学出版社, 2011.5
ISBN 978 - 7 - 5602 - 6935 - 1

I. ①酶… II. ①郭… ②王… III. ①酶工程
IV. ①Q814

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 087419 号

☐责任编辑: 李唤民 ☐封面设计: “燃”设计工作室
☐责任校对: 邓江英 ☐责任印制: 张允豪

东北师范大学出版社出版发行
长春净月经济开发区金宝街 118 号 (邮政编码: 130117)
销售热线: 0431—85687213
传真: 0431—85691969
网址: <http://www.nenup.com>
奇乐排版制作中心制版
2011 年 5 月第 1 版 2011 年 5 月第 1 次印刷
幅面尺寸: 185 mm×260 mm 印张: 20.75 字数: 480 千

定价: 38.00 元

前 言

该教材是根据我国高等教育快速发展的需要和人才培养的要求，作者在多年教学以及科研的基础上，参考国内外最新教科书及科技参考资料编写而成。该教材涉及面较广，深度适宜，注重基础与实践相结合，围绕酶特有的催化特性，重点阐述酶的生产工艺技术以及酶在工业、医药、环保及其他各方面的应用。本书正文共十一章，分为上下两篇，上篇为酶的生产部分，下篇为酶的应用部分。主要内容包括酶与酶工程简介、酶的生物合成生产、酶的提取与分离纯化、淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶及其他主要酶类的性质特点和工业化生产、固定化酶和固定化细胞产酶，以及酶在医药、食品、环保等方面的应用。

本书绪论及第 1、4、5 章由郭立泉（吉林工商学院）编写；第 2、3 章由王红宇（长春教育学院）编写，第 6—8 章由曹伟东（长春职业技术学院）编写，第 9—11 章由韩丹（吉林工商学院）编写。在全书的编写过程中，得到了吉林大学张昕老师、李贺同学，东北师范大学环境科学

学院的王平老师和麻莹同学以及吉林工商学院生物工程分院的陈建欣、魏贞伟、韩颖、张浩东、王海修、邓凤香、朱梅梦等多位老师的协助，对本书提出了许多宝贵建议。他们为本书的出版付出了辛勤劳动，在此表示感谢。由于编者水平有限，加之时间仓促，错误疏漏之处在所难免，希望使用本教材的师生和读者给予批评指正。

本书适用于生物工程专业、食品工程专业及医药化工等专业的本、专科教学工作。

编 者

目 录

上篇 酶的生产部分

绪 论	1
第一章 酶与酶工程	3
第一节 酶学概述	3
第二节 酶工程概述	5
第三节 酶的命名、分类、组成、结构和作用机制	8
一、酶的命名	8
二、酶的系统分类	8
三、酶的组成和结构	9
四、酶的作用机制	10
第四节 酶催化反应的特点	11
一、酶催化反应的能力	11
二、酶催化反应的专一性	11
三、酶活性的调节	13
第五节 影响酶促反应的因素	14
一、底物浓度	14
二、酶浓度	15
三、温度	15
四、pH	16
五、酶的激活剂	17
六、抑制剂	17
本章小结	19
本章思考题	20
第二章 酶的生物合成生产	21
第一节 酶生物合成的调节	21

一、酶合成的诱导	22
二、酶的阻遏作用	22
第二节 产酶微生物及其选育	23
一、菌种的分离与筛选	23
二、酶制剂高产菌种的选育	25
三、菌种保藏	30
第三节 酶发酵工艺条件及控制	32
一、酶的生产培养基	32
二、培养基的灭菌	35
三、酶发酵工艺条件	37
第四节 植物细胞发酵产酶	42
一、动物、植物、微生物细胞的特性	42
二、植物细胞发酵的特点	43
三、植物细胞发酵产酶的工艺条件控制	44
第五节 动物细胞发酵产酶	45
一、动物细胞的大规模培养	46
二、动物细胞发酵的工艺条件	47
第六节 酶的发酵染菌及控制	48
一、无菌检查	48
二、发酵染菌的分析	50
三、染菌(包括染噬菌体)处理	50
四、制服染菌的要点	51
本章小结	52
本章思考题	53
第三章 酶的提取、分离与纯化	54
第一节 发酵液的预处理	55
一、出发酶的获得	55
二、发酵液的澄清	61
三、酶液的脱色	62
四、杂蛋白的去除	63
五、去除高价无机离子	63
第二节 发酵液的过滤	64
一、加压过滤	64
二、真空过滤	65
第三节 酶液的分离	65
一、盐析法	65
二、有机溶剂沉淀法	68
三、复合沉淀法	71

第四节 酶液的浓缩	71
一、离子交换浓缩法	71
二、凝胶吸水浓缩法	72
三、蒸发浓缩法	72
第五节 酶液的干燥	73
一、冷冻干燥法	73
二、喷雾干燥法	74
三、干燥实例	75
第六节 酶的精制	76
一、离心分离	76
二、膜分离	78
三、层析分离	81
四、亲和层析	86
五、电泳分离	96
六、酶的结晶	100
本章小结	108
本章思考题	108
第四章 淀粉酶	110
第一节 α -淀粉酶	112
一、 α -淀粉酶的性质	112
二、 α -淀粉酶的氨基酸组成	115
三、 α -淀粉酶的水解方式与专一性	116
四、 α -淀粉酶的工业生产	117
第二节 β -淀粉酶	131
一、 β -淀粉酶的性质	131
二、 β -淀粉酶的水解方式	132
三、 β -淀粉酶的生产	133
第三节 葡萄糖淀粉酶	138
一、葡萄糖淀粉酶的性质	138
二、葡萄糖淀粉酶的类型与作用方式	139
三、葡萄糖淀粉酶的作用方式	141
四、葡萄糖淀粉酶的生产	143
本章小结	149
本章思考题	150
第五章 蛋白酶	151
第一节 蛋白酶的分类	151
一、按蛋白酶水解蛋白质的方式	151

二、按酶的来源	152
三、按蛋白酶作用的最适 pH	152
四、按蛋白酶的活性中心	152
第二节 蛋白酶的专一性	153
第三节 微生物蛋白酶的酶系组成	155
一、细菌蛋白酶	155
二、霉菌蛋白酶	155
三、酵母蛋白酶	156
四、放线菌蛋白酶	157
第四节 微生物蛋白酶的工业生产	157
一、生产菌种的筛选和选育	159
二、环境因子对蛋白酶生产的影响	161
三、培养基组成对蛋白酶生产的影响	162
四、生长期与产酶的关系	165
五、蛋白酶制剂提取和酶制剂的稳定	166
第五节 酸性蛋白酶	169
一、生产菌种	169
二、分类与命名	171
三、物理化学性质	171
四、酸性羧肽酶	174
五、培养条件与酶的生产	174
六、实例	178
第六节 中性蛋白酶	181
一、生产菌种	181
二、物理化学性质	183
三、生产工艺	184
四、栖土曲霉 3.942 蛋白酶	184
五、枯草杆菌中性蛋白酶	188
第七节 碱性蛋白酶	191
一、生产菌种及其蛋白酶的类型	191
二、物理化学性质	193
三、酶的生产	194
四、短小芽孢杆菌 289 与 209 碱性蛋白酶	195
五、地衣形芽孢杆菌 2709 碱性蛋白酶	196
第八节 蛋白酶的用途	197
一、用于制革生产	197
二、用于裘皮生产	198
三、制造明胶和可溶性胶原纤维	198
四、预处理羊毛低温染色	199

五、丝绸脱胶	199
六、用于洗涤剂 and 牙膏、牙粉、化妆品	199
七、酶法治疗	200
八、制造水解蛋白输液、要素膳食和生化蛋白肽	201
九、制造动物器官水解物类药品	201
十、用于酒类酿造	201
十一、用于发酵工业原料处理	201
十二、加工可溶性鱼蛋白质和水产	201
十三、其他	202
本章小结	202
本章思考题	202
第六章 纤维素酶	204
第一节 纤维素酶的性质和作用方式	204
一、纤维素酶的组分和性质	205
二、天然纤维素的结构与酶作用的关系	208
三、纤维素酶的作用方式	212
第二节 纤维素酶的生产菌种	214
一、生产纤维素酶的菌种	214
二、诱变育种	215
第三节 纤维素酶的生产	216
一、纤维素酶的固体和液体深层发酵法	217
二、绿色木霉 QM9414 的培养	218
三、影响纤维素酶产量的因素	219
四、纤维素酶的提取	223
本章小结	224
本章思考题	224
第七章 其他主要酶类	225
第一节 葡萄糖异构酶	225
一、葡萄糖异构酶的一般性质	226
二、葡萄糖异构酶的工业生产	231
三、葡萄糖异构酶的培养条件控制	234
第二节 脂肪酶	235
一、脂肪酶的一般性质	235
二、脂肪酶的工业生产	236
第三节 果胶酶	237
一、果胶酶的分类	238
二、果胶酶的工业生产	239

第四节 其他工业酶	239
一、葡萄糖氧化酶	239
二、半乳糖苷酶	240
三、酰化氨基酸水解酶	240
本章小结	241
本章思考题	241
第八章 酶的固定化和固定化细胞	242
第一节 固定化酶	242
一、固定化酶简介	242
二、固定化酶制备的原则	243
三、酶的固定化方法	244
第二节 固定化细胞	258
一、包埋法	259
二、热处理	260
三、吸附法	260
四、共价法	260
五、交联法	260
本章小结	260
本章思考题	261

下篇 酶的应用部分

第九章 酶在医药方面的应用	262
第一节 酶在疾病诊断方面的应用	262
一、根据体内酶活力的变化诊断疾病	262
二、用酶测定体液中某些物质的变化诊断疾病	270
第二节 酶在疾病治疗方面的应用	273
一、蛋白酶	274
二、 α -淀粉酶	274
三、脂肪酶	275
四、溶菌酶	275
五、超氧化物歧化酶 (SOD)	275
六、L-天冬酰胺酶	275
七、尿激酶	276
八、纳豆激酶	276
九、降纤酶	276
十、凝血酶	277

十一、激肽释放酶·····	277
十二、组织纤溶酶原激活剂·····	277
十三、弹性蛋白酶·····	278
十四、乳糖酶·····	278
十五、核酸类酶·····	278
第三节 酶在药物制造方面的应用 ·····	278
一、青霉素酰化酶制造半合成抗生素·····	279
二、 β -酪氨酸酶制造多巴·····	281
三、核苷磷酸化酶制造阿糖腺苷·····	282
四、无色杆菌蛋白酶制造人胰岛素·····	283
五、多核苷酸磷酸化酶生产聚肌胞·····	283
六、 β -D-葡萄糖苷酶制造抗肿瘤人参皂苷·····	283
本章小结 ·····	284
本章思考题·····	284
第十章 酶在食品方面的应用·····	286
第一节 酶在食品保鲜方面的应用·····	287
一、食品除氧保鲜·····	287
二、蛋类制品脱糖保鲜·····	287
三、食品灭菌保鲜·····	288
第二节 酶在淀粉类食品生产方面的应用 ·····	288
一、葡萄糖的生产·····	289
二、果葡糖浆的生产·····	289
三、饴糖、麦芽糖的生产·····	290
四、糊精、麦芽糊精的生产·····	290
五、环状糊精的生产·····	290
第三节 酶在蛋白质类食品生产方面的应用 ·····	291
一、水解蛋白的生产·····	291
二、氨基酸的生产·····	292
三、明胶的生产·····	292
四、干酪的生产·····	292
五、肉类的嫩化·····	292
六、低乳糖奶的生产·····	292
第四节 酶在果蔬类食品生产方面的应用·····	293
一、柑橘制品去除苦味·····	293
二、柑橘罐头防止白色浑浊·····	293
三、果蔬制品的脱色·····	293
四、酶在果汁生产中的应用·····	293
五、酶在果酒生产中的应用·····	294

第五节 酶在食品添加剂生产方面的应用	294
一、酶在酸味剂生产中的应用	295
二、酶在增味剂生产中的应用	296
三、酶在甜味剂生产中的应用	298
四、酶在乳化剂生产中的应用	300
五、酶在改善食品的品质与风味方面的应用	300
本章小结	301
本章思考题	301
第十一章 酶在其他领域的应用	303
第一节 酶在轻工、化工方面的应用	303
一、用酶进行原料处理	303
二、酶在轻工、化工产品制造方面的应用	305
三、加酶增强产品的使用效果	308
第二节 酶在环保、能源方面的应用	309
一、酶在环境监测方面的应用	309
二、酶在废水处理方面的应用	310
三、酶在可生物降解材料开发方面的应用	310
四、酶在乙醇生产方面的应用	310
五、酶在生物柴油制造方面的应用	310
六、多酶偶联反应检测	311
七、酶标记免疫反应检测	312
第三节 酶在生物技术方面的应用	312
一、酶在除去细胞壁方面的应用	312
二、酶在大分子切割方面的应用	313
三、酶在分子拼接方面的应用	315
本章小结	317
本章思考题	318
主要参考文献	319

绪 论

酶是由细胞产生的具有专一性催化功能的生物大分子（包括蛋白质和RNA）。酶不仅在生物体内起到重要的生物催化作用，而且在生物体外催化各种生物反应。

近年来，工业用酶广泛地应用于化学、医药、纺织、农业、化工、食品、能源及环保等行业。据统计：美国、欧洲工业用酶和专用酶的市场酶需求量每年以11%的速率增长，2004年美国为17亿美元，欧洲也超过了10亿美元。由于蛋白质工程、基因工程和计算机信息等技术的发展，使酶工程技术得到了迅速的发展和应用。各种新成果、新技术、新发明不断涌现，对社会的影响越来越大。就酶在各领域的应用来说，食品、饲料用量最大，占销售总额的45%，洗涤剂占32%，纺织工业占11%，造纸工业占7%，化学工业占5%左右。

酶的生产和应用技术应运而生，并且形成了一门专门的学科——酶工程。酶工程是围绕酶所特有的生物特点和催化性能，在工业、农业、医药、保健、环保及其他各方面发挥作用的应用技术。如今，酶工程已经成为了现代工业生物技术发展的核心内容之一。

酶的研发主要通过以下步骤完成：一、研究自然界生物体内的生物催化过程（微生物、动物、植物体内的酶反应），获得关键酶；二、获得调控关键酶的基因片段或质粒，通过分子生物学手段构建工程菌或工程细胞；三、利用生化反应器系统，进行工程酶制剂的催化反应；四、经过提取、分离和纯化手段，从反应器中得到精致酶制剂，形成酶制剂产品。

酶工程是研究生物催化剂——酶的性质、生产、应用的学科。酶作为生物催化剂参与反应，使生物反应过程具有一些自身的特性。例如：与化学反

应相比，生物反应是在比较温和（常温、常压、pH 接近中性等）的条件下进行的。这说明，虽然生物催化与化学催化有所不同，但其本质也有相同之处。

从广义上讲，自然界中的生物现象是千变万化的。例如：动植物的生长和代谢，微生物的快速扩增。这些生命活动中，酶促反应都起到关键的作用，或者说生物的生长、繁殖和代谢等过程中都是生物催化剂反应的结果。通过酶分子在生物催化反应中的诱导或抑制，调节着整个生物反应过程，复杂的生物反应过程有时需要几种或数十种酶的参与。狭义上讲，酶催化反应可以选取特定的酶，将某种物质专一性催化生成所需要的产物，实现工业化生产过程的高效率转化。通过酶催化反应定向改造物质的性能，如：生物降解、改性、聚合等，以满足人们的生活需求。我们就是要通过了解酶的基本特性获取制备酶制剂的方法，合理地设计和应用酶，从而造福社会，造福人类。

因此，酶工程从认识酶的本质和性质开始，主要研究的内容有以下几个方面：探讨酶的定向改造技术、酶的稳定性与化学修饰及固定化技术；介绍酶的生产、提取、分离、纯化方法及酶制剂的应用；分析和研究酶的最前沿领域内容，如酶反应器、酶化工等；总结酶工程的研究手段和方法。

酶工程，作为生物工程的重要组成部分，它不是孤立的一门学科，它不但与酶学研究相互关联，而且，它与许多学科，例如化学、物理、微生物、信息学等学科都有密切的联系。同时，酶工程也是一门技术应用性很强的学科。因此，既要注重学科的知识性、系统性，还要了解其在实践中的适应性。

现代酶工程还利用基因工程手段定向表达特定的基因，通过工程菌、细胞、种来获得高效率的酶制剂。通过大规模地进行工程化催化反应来实现生物物质的专一性。

第一章 酶与酶工程

第一节 酶学概述

酶是一切生命活动的序幕，生物体代谢中的各种化学反应都是在酶的作用下进行的。没有酶，生物代谢反应就会停止，生命也即停止。因此，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具有十分重要的意义。

酶是由细胞产生的具有专一性催化功能的生物大分子（包括蛋白质和 RNA）。它是由生物体产生的，有的位于细胞体内，有的分泌到体外，更有的酶位于细胞器或细胞膜上。因此，从酶分子水平去探讨酶与生命活动、代谢调节、疾病、生长发育等的关系，从生物大分子的结构与功能关系来说明生命现象的本质和规律无疑具有重大科学意义。

虽然人类对酶的利用已经有上百年的历史，然而，很难准确地说出来对酶认识的具体时间。在我国，资料记载显示在 4000 多年前的夏禹时代酿酒已盛行，利用酵母菌体内的酶系进行酒精发酵，酒成为酵母体内酶系催化反应的产物。大约 3000 年前，我国已能用豆类做酱。豆酱是在霉菌体内的蛋白酶作用下，豆类蛋白质水解所得的产品。饴糖的制造同样离不开酶的使用，利用麦曲中含有的淀粉酶将淀粉降解为麦芽糖，制造出了饴糖。我国人民很早就学会利用曲治疗消化障碍症，因为曲中有丰富的酶类和维生素，至今仍是常用的健胃药。春秋战国时代，漆已被广为利用，那时所用的漆是漆树的树脂被漆酶作用的氧化产物。

在国外，约 6000 年前，古巴比伦人已经用麦芽酿造啤酒类的饮料。近代对酶的研究极大推动了酶学的发展。1833 年 Payen 和 Person 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活性物质，它可促进淀粉水解成可溶性糖。他们把这种物质称为淀粉酶制剂（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种很粗的淀粉酶制剂，但是由于他们采用了最简单的抽提、沉淀等提纯方法，得到了一种无细胞制剂，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 和 Person 首先发现了酶。

1878 年德国的 Kuhne 首先把这类物质称为 Enzyme。Enzyme 源自希腊文，原意为“in yeast”（在酵母中）的意思，中文翻译为“酶”或“酵素”。1896 年德国学者 Buchner 兄弟发现了用石英砂磨碎的酵母细胞或无细胞滤液能和酵母细胞一样将 1 分子葡萄糖转化

成 2 分子乙醇和 2 分子 CO_2 ，他把这种能发酵的蛋白质成分称为酒化酶 (zymase)，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，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。1913 年，Michaelis Menten 总结了前人的工作，根据中间产物学说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 从刀豆中得到了脲酶结晶，这是人类得到的第一个酶结晶，同时他用实验证实了这种结晶催化尿素水解，产生 CO_2 和氨。他还提出酶本身就是一种蛋白质的观点，这个观点直到若干年后获得了胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶的结晶才被普遍接受，并获得 1947 年的诺贝尔奖。

如今，人类已经发现生物体内存在的酶有近 8 000 种，而且每年都有新酶被发现。迄今为止，已经大约有 200 多种酶得到了结晶，数百种酶已纯化达到了均一纯度。很多酶已有比较清楚的认识，例如溶菌酶具有 129 个氨基酸残基、胰凝乳蛋白酶具有 245 个氨基酸残基、羧肽酶具有 307 个氨基酸残基等。当然，随着生物学的进一步发展，对于这些酶的结构和作用机理，我们将会进行更加深入的研究。

20 世纪 50 年代后期，Koshland 提出了“诱导契合”学说 (induced-fit hypothesis)，以解释酶的催化理论和专一性，同时也搞清了某些酶的催化活性与生理条件变化有关。1961 年 Monod 及其同事提出了“变构模型”，用以定量解释有些酶的活性可以通过结合小分子（效应物）进行调节，从而提供了认识细胞中许多酶调控作用的基础。1969 年首次报道由氨基酸单体化学合成牛胰核糖核酸酶，虽然这是一个很大的进展，但其纯度和活性很低，化学合成只是定性证明了酶和非生物催化剂没有区别。

随着生物学的发展，DNA 重组技术用于酶学研究领域。利用定点突变法在指定位点突变，改变了酶的催化活性与专一性。例如乳酸脱氢酶的专一性可以通过在活性部位引入 3 个特定的氨基酸侧链突变成为苹果酸脱氢酶。

1982 年 Cech 小组发现，四膜虫的 rRNA（核糖体核糖核酸）前体能在完全没有蛋白质的情况下完成自我加工过程，催化得到成熟的 rRNA 产物。就是说，RNA 本身是生物催化剂，作者称其为“ribozyme”，这对酶的传统概念是个严重挑战，提出了酶并不一定是蛋白质的问题。1983 年，Sidney 等发现了核糖核酸酶 P 的 RNA 部分 M1RNA 具有核糖核酸酶 P 的催化活性，可以在高浓度镁离子存在的条件下，单独催化 tRNA 前体从 5'-末端切除某些核苷酸片段而成为成熟的 tRNA，而该酶的蛋白质部分 C5 蛋白却没有活性。RNA 具有催化活性这一发现，改变了有关酶的概念，因此，Cech 和 Altman 共同获得了 1989 年的诺贝尔科学奖。

1986 年，Schultz 和 Learner 两个小组同时报道了用事先设过渡态类似物作半抗原，按标准单克隆抗体制备法获得了具有催化活性的抗体，即抗体酶 (abzyme)。这一重要突破为酶的结构功能研究和抗体与酶的应用开辟了新的研究领域。

上述酶的研究进程不难看出，对酶的研究一直是沿着理论研究方向和应用研究方向两个方向发展。理论研究促进了人们对酶的催化性质、酶的特点和本质的认识。例如：酶作用的锁钥学说及诱导契合学说的提出；米氏方程的建立以及对酶作用机制的探讨；脲酶结晶的获得，弄清了酶的蛋白质本质；Sanger 等建立的蛋白质一级结构测定方法，为酶的