

孙君社 主编 江正强 刘萍 副主编

# 酶与酶工程及其应用



CHEMICAL INDUSTRY PRESS

 化学工业出版社

# 酶与酶工程及其应用

孙君社 主编  
江正强 刘 萍 副主编



化学工业出版社

·北京·

图书在版编目 (CIP) 数据

酶与酶工程及其应用/孙君社主编. —北京: 化学工业出版社, 2006. 4  
ISBN 7-5025-8595-8

I. 酶… II. 孙… III. ①酶学②酶-生物工程  
IV. ①Q55②Q814

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 040784 号

---

酶与酶工程及其应用

孙君社 主编

江正强 刘 萍 副主编

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 周 侗

责任校对: 宋 玮

封面设计: 潘 峰

\*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

\*

新华书店北京发行所经销

北京市振南印刷有限责任公司印刷

三河市宇新装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 19 字数 497 千字

2006 年 7 月第 1 版 2006 年 7 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8595-8

定 价: 46.00 元

---

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

# 前 言

酶与酶工程在理论上属于生物化学范畴，但又是一门广泛地涉及生物学领域及生物工程领域的理论与实际密切联系的应用科学。酶是有催化功能的蛋白质，也叫生物催化剂，生物体内的一切化学反应几乎都是在酶的催化下进行的。酶工程又称酶技术，它是围绕着酶所特有的催化性能使其在工业、农业、医药保健事业、环保及其他各方面发挥作用的应用技术。

为保持本书内容的系统性、完整性和先进性，内容编排上有以下特点。

① 按本学科自身内容的规律性、系统性，编排章节内容，注重学科的传统性。但对一般普及性内容，采取总结、简化等方式表述，如酶的概念、动力学、结构和功能等与酶工程有关的酶学部分。重点放在深度、广度及新的内容方面。

② 注重充实新的内容，从经典、分子、工程三个水平逐步完善酶工程内容。随着科学技术的发展，分子生物学在酶工程中所占地位越来越重要，优良的产酶工程菌都可运用现代分子生物学手段来构建，所分泌出的酶有着非常优越的性能，耐高温、低温、极端酸碱环境，抗氧化，稳定性能好等特点，在工业化生产中能发挥独特优势。在此方面，采用了“保留经典、充实分子”的做法，根据酶工程技术内容多的特点，在介绍传统工程技术的基础上，突出讲解创新的工程科技。另外，对于热点研究也做了介绍，特别单列一章介绍酶工程的研究方法。

③ 酶技术和酶制剂分别成章列入本书内容。同时又单独列章介绍酶工程在传统化工行业中的应用。酶化工正在越来越深远地影响着传统化工行业的发展。酶工程既是一门理论性很强的学科，也是一门应用性很强的学科，了解利用酶工程原理指导实践并应用于实践，既可以强调学习的实践性又可激发读者的学习和创新动力。

本书是在作者多年教学及科研的基础上，参考国内外最新教科书及科技资料编写而成的，涉及面较广，深度适宜。全书共分10章。第二章、第八章由王昌禄执笔，第三章、第五章、第十章由江正强执笔，第四章由张秀清执笔，第六章、第七章由刘萍执笔，第九章及附录由张中义执笔，其他章节由孙君社执笔并负责全书的统稿和定稿。在编写过程中，还得到了中国农业大学食品科学与营养工程学院酶与发酵工程研究室的老师和同学的大力支持，在此一并表示感谢。

由于编者学识和水平有限，书中不妥之处恳请读者批评指正。

孙君社  
2006年3月

# 目 录

绪论 .....	1	第四节 非水介质中的酶学及酶催化 .....	47
一、酶与酶工程研究的目的 .....	1	一、非水介质中酶的催化反应及其特征 .....	47
二、酶与酶工程的研究内容与方法 .....	1	二、微水有机溶剂体系 .....	49
第一章 酶学 .....	3	三、酶的选择性 .....	49
第一节 酶学概念 .....	3	四、“pH记忆”与“分子印迹”技术 .....	50
一、酶学的基本概念 .....	3	五、反向胶团的酶学研究 .....	50
二、酶学研究的重要性 .....	5	六、水-有机溶剂两相体系 .....	52
三、酶的分类和命名 .....	6	七、非水介质酶催化反应在有机合成 中的应用 .....	52
第二节 酶学性质及催化机理 .....	9	参考文献 .....	52
一、酶的催化特性 .....	9	第三章 酶的分离纯化 .....	54
二、酶的活性部位 .....	10	第一节 酶的分离纯化策略 .....	54
三、酶催化作用机理 .....	11	一、基本原则 .....	54
第三节 酶催化反应动力学 .....	15	二、纯化方法的选择 .....	55
一、单底物酶反应动力学 .....	15	三、纯化策略 .....	56
二、有抑制的酶催化反应动力学 .....	18	四、纯度的检定 .....	58
三、复杂的酶催化反应动力学 .....	23	第二节 酶液的制备和初分离 .....	59
四、酶的失活动力学 .....	25	一、发酵液的固液分离 .....	59
第四节 酶学研究的新进展 .....	27	二、细胞破碎 .....	60
一、酶与生物催化剂 .....	27	三、抽提 .....	61
二、非水相中的生物催化 .....	28	四、脱盐 .....	62
三、极端微生物研究进展 .....	29	五、浓缩 .....	62
四、分子定向进化 .....	33	六、初分离 .....	63
参考文献 .....	33	第三节 酶的分离纯化方法 .....	63
第二章 酶技术 .....	34	一、根据溶解度不同建立的纯化方法 .....	64
第一节 酶技术的相关概念 .....	34	二、按照分子大小不同建立的纯化方法 .....	68
一、酶学及酶技术 .....	34	三、依据电学解离性质不同建立的纯化 方法 .....	73
二、酶技术发展概况 .....	34	四、利用亲和作用进行纯化的方法 .....	78
第二节 酶分子的定向进化 .....	34	五、根据稳定性差别建立的纯化方法 .....	82
一、酶分子定向进化概述 .....	34	第四节 酶的结晶 .....	83
二、酶分子定向进化的历史 .....	36	参考文献 .....	84
三、定向进化的策略 .....	38	第四章 酶的固定化 .....	85
四、定向进化的优势、现状和未来 .....	41	第一节 固定化酶概述 .....	85
第三节 人工模拟酶 .....	42	一、固定化酶的定义 .....	85
一、模拟酶的理论基础和策略 .....	42	二、固定化酶的优缺点 .....	85
二、模拟酶的分类 .....	43	三、固定化酶的重要性 .....	86
三、抗体酶 .....	44	第二节 酶的固定化方法 .....	87
四、印迹酶 .....	45		
五、模拟酶的研究进展 .....	47		

一、吸附法 .....	87	第二节 酶的保存与酶制剂的生产技术 .....	131
二、包埋法 .....	88	一、酶的失活机理及稳定化技术 .....	131
三、共价结合法 .....	89	二、酶制剂的生产技术 .....	133
四、交联法 .....	92	第三节 液体酶制剂 .....	136
五、各种固定化酶的特点比较 .....	93	一、液体酶生产工艺流程 .....	136
第三节 固定化酶的形态与性质 .....	94	二、液体酶生产工艺 .....	136
一、固定化酶的形状 .....	94	第四节 固体酶制剂 .....	139
二、固定化酶的活力 .....	94	一、固体酶生产工艺流程 .....	139
三、固定化酶的稳定性 .....	95	二、酶在制粒过程中的稳定性 .....	140
四、固定化酶的催化特征 .....	95	三、填料及载体的选择 .....	140
第四节 固定化酶的反应动力学 .....	96	四、固体酶制剂的干燥方法 .....	141
一、影响固定化酶促反应的主要因素 .....	96	参考文献 .....	141
二、固定化酶促反应的过程分析 .....	97	<b>第七章 酶的应用</b> .....	143
参考文献 .....	99	第一节 酶在轻工方面的应用 .....	143
<b>第五章 酶的生产</b> .....	100	一、酶在纺织品加工中的应用 .....	143
第一节 天然植物酶和动物酶的生产 .....	100	二、酶在造纸工业中的应用 .....	144
一、植物细胞培养产酶 .....	100	三、酶制剂在制革中的应用 .....	147
二、动物细胞培养产酶 .....	101	四、酶在洗涤剂工业中的应用 .....	148
第二节 微生物酶的生产 .....	101	第二节 酶在食品方面的应用 .....	150
一、产酶菌的获取 .....	103	一、在食品原料生产中的应用 .....	150
二、产酶菌的培养 .....	104	二、直接参与食品的生产过程 .....	151
三、微生物酶的生产流程 .....	110	三、用酶制剂改善食品风味、品质和产量 .....	158
第三节 提高酶发酵产量的方法 .....	111	四、在食品保鲜和贮藏中的应用 .....	160
一、酶的合成调控机制 .....	111	五、用于制备生物活性成分 .....	162
二、通过条件控制提高酶产量 .....	114	第三节 酶在饲料方面的应用 .....	165
三、通过基因突变提高酶产量 .....	115	一、饲料的组成 .....	166
四、通过体内基因重组提高酶产量 .....	117	二、饲料中酶制剂的种类及主要作用 .....	167
五、通过体外基因重组提高酶产量 .....	119	三、适当选择和合理使用饲用酶制剂 .....	169
六、其他提高酶产量的方法 .....	122	第四节 酶在医药方面的应用 .....	170
第四节 酶制剂生产设备 .....	122	一、酶制剂按其临床应用分类 .....	171
一、微生物选育设备 .....	122	二、主要治疗酶的种类介绍 .....	172
二、无菌空气制备设备 .....	122	第五节 酶在环保与能源开发方面的应用 .....	176
三、发酵设备 .....	123	一、酶在环保方面的应用 .....	176
四、提取设备 .....	124	二、酶在能源方面的应用 .....	178
第五节 酶生产车间的设计与要求 .....	125	第六节 酶在分析检测方面的应用 .....	179
一、工艺设备平面布置设计 .....	125	一、酶在食品检测中的应用 .....	179
二、发酵罐设计 .....	125	二、酶在医药诊断方面的应用 .....	179
三、培养基灭菌 .....	126	参考文献 .....	180
四、无菌空气制备 .....	127	<b>第八章 酶反应器</b> .....	182
五、发酵过程的自动化控制 .....	128	第一节 酶的应用形式 .....	182
参考文献 .....	129	一、概述 .....	182
<b>第六章 酶制剂</b> .....	130	二、应用形式 .....	182
第一节 酶制剂概述 .....	130	第二节 酶反应器的分类与特点 .....	184
一、酶制剂的定义 .....	130		
二、酶制剂的分类 .....	130		

一、酶反应器简介	184
二、酶反应器的分类及特点	184
第三节 酶反应器的设计与选型	187
一、酶反应器的设计	187
二、酶反应器的性能评价	187
三、与设计有关的参数	187
四、选择反应器时应考虑的因素	188
第四节 酶反应器的操作	189
一、酶反应器中流动状态的控制	189
二、酶反应器恒定生产能力的控制	190
三、酶反应器的稳定性	190
四、酶反应器的微生物污染	191
第五节 酶反应器的应用与发展	191
一、酶反应器的应用	191
二、酶反应器的发展	195
参考文献	197

## 第九章 酶化工

第一节 酶与化学工业	198
一、生物酶可催化生产的化学品	198
二、生物酶催化合成手性化合物	199
三、为化学合成新产品提供原料	199
四、酶法生产生物柴油	199
第二节 化学工业中酶催化的反应过程及特点	200
一、酶催化氨基酸合成	200
二、酶催化有机酸合成	200
三、酶催化抗生素生产	200
四、酶催化肽类药物的合成	200
五、酶催化芳香酯合成	201
六、酶催化人造奶油的生产	201
七、酶催化酯交换	201
第三节 非水介质中的酶催化反应	201
一、酶在非水介质催化反应中的优点	202
二、多液相体系酶催化反应	202
三、反胶束体系酶催化反应	204
四、非水相酶催化反应	205
第四节 超临界介质中的酶催化	206
一、超临界流体的选择	206
二、载体的选择	207
三、工艺参数的影响	208
四、超临界流体中酶催化的应用前景	209
第五节 油脂工业中的酶催化	209
一、油脂酶催化水解	210
二、植物油脱臭馏分中提取维生素E	210
三、酶促菜子油选择性水解制取芥酸	210
四、酶促酯交换	210

五、生物精炼——酶促酯化	211
六、脂肪酶的选择及固定化	212
七、固定化脂肪酶生物反应器	213
第六节 酶催化合成表面活性剂	214
一、酶法合成甘油单酯类生物表面活性剂	215
二、酶法合成糖脂类生物表面活性剂	215
三、酶法合成氨基酸类生物表面活性剂	218
四、酶法合成和修饰磷脂类生物表面活性剂	218
五、酶法合成异头碳上构成单一的烷基糖苷类生物表面活性剂	218
第七节 石油工业中的酶催化反应	219
一、石油的生物催化脱硫	219
二、生物柴油的合成	221
第八节 酶催化的有机合成	224
一、酶催化的水解及合成反应	225
二、酶催化的氧化-还原反应	233
三、酶催化的取代反应	234
四、酶催化的加成与消除反应	234
五、酶聚合反应	235
参考文献	235

## 第十章 酶工程的研究方法

第一节 酶活力测定	236
一、影响酶活力的因素	236
二、酶活力的测定原理	237
三、酶活力的测定方法	239
四、酶活力的单位	241
第二节 电泳检测和分子量测定	241
一、电泳检测	241
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	243
三、酶的相对分子质量测定	245
第三节 酶蛋白的定量、组成和氨基酸分析	247
一、蛋白质的定量	247
二、酶的氨基酸组成测定	250
三、酶蛋白的一级结构测定	251
四、酶的二级结构、三级结构测定	255
五、酶的四级结构测定	256
六、活性中心的测定	257
第四节 酶的免疫学方法	257
一、非均相酶免疫测定法	258
二、均相酶免疫测定法	260
三、双抗体酶免疫测定法	261
四、其他类型和方法	262

五、免疫分析中几个主要的操作步骤 .....	262	<b>附录 2 工业化酶制剂的标准</b> .....	283
六、测定实例 .....	263	一、工业用 $\alpha$ -淀粉酶制剂 .....	283
参考文献 .....	265	二、耐高温 $\alpha$ -淀粉酶制剂 .....	284
<b>附录 1 常用酶的检测方法</b> .....	266	三、工业用糖化酶制剂 .....	284
一、 $\alpha$ -淀粉酶活力测定 .....	266	四、工业用蛋白酶制剂 .....	286
二、糖化酶活力测定 .....	269	五、洗涤剂用碱性蛋白酶制剂 .....	288
三、蛋白酶活力测定 .....	271	六、工业用脂肪酶制剂 .....	289
四、脂肪酶活力测定 .....	275	七、食品添加剂固定化葡萄糖异构酶 制剂 .....	290
五、葡萄糖异构酶活力测定 .....	276	八、工业酶制剂通用试验方法 .....	290
六、果胶酶活力测定 .....	278	九、工业酶制剂通用检验规则和标志、 包装、运输、贮运 .....	295
七、碱性磷酸酶活力测定 .....	280		
八、葡萄糖氧化酶活力测定 .....	281		



# 绪 论

近年来，工业用酶广泛地应用于化学、医药、纺织、农业、日化、食品、能源、化妆品及环保等行业，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 10% 的速率增长，2004 年美国为 17 亿美元，欧洲也超过 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。

酶学是探讨酶的发展与本质问题的，是酶工程的基础。酶工程又称酶技术，它是围绕着酶所特有的催化性能使其在工业、农业、医药保健事业、环保及其他各方面发挥作用的应用技术。从学科分类看，酶工程是工业生物技术的核心之一。

## 一、酶与酶工程研究的目的

酶与酶工程是研究生物催化剂——酶的概念、性质、生产、应用等的学科。酶作为生物催化剂参与反应，使生物反应过程具有了一些自身的特性。例如，与化学反应相比，生物反应是在比较温和的（常温、常压、pH 接近中性等）条件下进行的。虽然生物催化与化学催化有所不同，但其本质是相同的。

广义地讲，自然界中的生物现象可以说是千变万化，例如植物的生长，微生物的无处不在，酶促反应起着关键的作用，或者说生物的生长、繁殖、形成产物、某种物质的减少或增加的过程都是生物催化反应的结果。通过酶分子在生物催化反应中诱导或抑制调节整个生物反应过程，复杂的生物反应过程有时需要数十种酶参与。

狭义地讲，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。

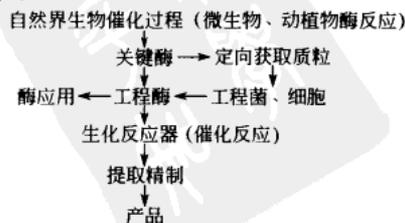
酶与酶工程就是要通过了解酶的基本特性、获取的方法以及如何应用，开创性地高效利用酶，造福社会。

## 二、酶与酶工程的研究内容与方法

酶工程不是孤立的一门学科，它不但与酶学研究相互关联，而且，它与许多学科都有密切的联系。同时，酶工程学也是一门技术应用性很强的学科，因此，既要注重知识性、系统性，又要了解其在实践中的适应性。

现代酶工程利用基因工程手段定向表达特定的基因，通过工程菌、细胞、种来获取高效率的工程酶，可以大规模地进行工程化催化反应来实现生物物质的专一性转化。

一般酶开发过程示意如下：



针对这一过程，制定研讨路线，开发实用方法，开辟适用途径。

酶与酶工程从认识酶的性质开始，主要有以下几方面：一是探讨酶的定向改造技术、酶的稳定性与修饰及固定化；二是介绍酶的生产、分离、纯化方法以及酶制剂与应用；三是分析最热门的酶领域——酶反应器、酶化工；四是总结酶工程的研究方法。



# 第一章 酶 学

## 第一节 酶学概念

生物体是一个十分复杂的生产机器，它生产有机物质的能力令最现代化的有机化工厂也望尘莫及。而生物体内维持复杂化学反应高效进行的原因，就在于生物细胞内具有一系列能催化生物反应的特殊蛋白质——酶。生物体内有许多酶，每种酶各尽其职，催化专一的化学反应，如脂肪酶只管分解脂肪，淀粉酶只管分解淀粉等。

### 一、酶学的基本概念

#### (一) 酶学的历史

早在几千年以前，人类已经开始利用微生物来制造食品和饮料。中国在 4000 多年前，就已经在酿酒、制酱、制饴等的过程中利用了酶的催化作用。例如，公元前 12 世纪，《周礼》上即有制酱、制饴的记载。酱是发酵产品，饴是大麦芽经酶作用生成的麦芽糖。再例如，2000 多年前的春秋战国时期，已采用曲治疗消化不良的疾病。当然，那个时代对酶还缺乏认识。

真正开始对酶的认识是从科学家发现生物材料具有催化作用开始的。1684 年，范·赫尔蒙特 (Van Helment) 发现，在酿酒过程中有一种气体产生，并把发酵中引起物质发生变化的因素称为酵素。他还进一步指出，在食物消化中也有酵素参加，不同器官中存在着不同的酵素。但当时对酵素的性质一无所知。直到 1772~1810 年研究了一系列的化学催化反应，逐步阐明了化学催化剂的特征之后，才为研究酶的催化本质创造了条件。如 1781 年知道了淀粉和无机酸一起加热，淀粉分解为糖，而酸没有变化；1810 年证明，钨和铂能催化氨分解为氮和氢的反应，但钨和铂都没有变化。在这里，无机酸、钨和铂是化学催化剂。由此可见，催化剂的最基本的特征是能加速化学反应，但在反应过程中本身不发生变化，数量既不增加也不减少。

1815 年制出无水过氧化氢，后来发现动物和植物组织有分解过氧化氢的能力，这就发现了过氧化氢酶。特别是 1814 年俄国肯尔考夫 (K. C. Kirchoff) 以极少量的麦芽提取液就能在室温下使淀粉转变为糊精和糖。这是第一次比较详细地研究生物材料的催化作用，从而发现了淀粉酶。1833 年佩恩 (Payen) 和帕索兹 (Persoz) 从麦芽的水抽提物中，用酒精沉淀得到一种可使淀粉水解成可溶性糖的物质，称为淀粉酶 (diastase)。尽管当时它还只是一个很粗的酶制剂。但由于他们采用了最简单的提纯方法，得到了一个无细胞酶制剂，并指出了它的催化特性和热不稳定性，因而开始涉及酶的一些本质性问题，故一般认为是他们首先发现了酶。

19 世纪中叶，在酶的研究史上是一个重要的时期，不仅又新发现了一批来源于动物和植物的酶，如胰蛋白酶，并且开始将酶应用于工业生产，同时开展了关于酶的性质研究。当时有两种观点：一种认为酶的作用和生命活动有关；另一种是把酶看作与化学催化剂完全相同的物质，二者之间没有明显界限。持第一种观点的是胃蛋白酶的发现者施旺 (Schwann) 提出来的，得到法国化学家、微生物学家巴斯德 (L. Pasteur) 的拥护。

巴斯德把有机物的溶液，例如葡萄糖溶液，封闭在无菌容器内，则它们不发生任何变化。但是当敞开器皿，让空气进入后，发酵就开始。巴斯德认为，这是微生物和空气一起进入溶液而引起的。于是他把发酵和某些特殊微生物的活动联系起来，将发酵中引起物质变化的酵素称为“有组织的酵素”；同时，把存在于肠、胃液中的酵素称为“无组织的酵素”；并指出酵母中存在一种使葡萄糖转化为酒精的物质，这对发酵工业的发展有重大贡献。但巴斯德对发酵过程的认识有错误的地方，他认为只有活的酵母细胞才能进行发酵。1897年，布赫涅尔（Bckner）兄弟将酵母和砂一起研磨，然后压榨出汁液来，这种汁液完全不含活细胞，但仍能使糖发酵，生成酒精和二氧化碳。这就表明酶不仅在细胞内，而且在细胞外也可在一定条件下进行催化作用。其后，对酶的催化作用理论和酶的本质进行了广泛的研究。

1878年库尼（Künne）首先把这种酵素称为酶（enzyme），这个词来自希腊文，其意思是“在酵母中”。1890年德国化学家 E. Fisher 发展了酶的特异性（即专一性）概念，他提出了著名的酶和底物相互作用类似于锁和钥匙的观点。这个观点影响到后人对于酶-底物配合物本质的研究。彻底研究酶的特异性需要有纯酶和已知结构的底物。Bergman 等在1930~1940年期间合成许多肽用来研究蛋白酶的作用。他们证明了一种蛋白酶仅能水解肽链中一些特定的氨基酸残基之间的键。他们进一步将蛋白酶分成肽链内切酶和肽链端解酶，前者从肽链的中间水解肽键，后者从肽链的末端水解肽键。

早期对于酶的研究，使 Berzelius 在 1835~1837 年提出了催化作用的概念，该概念的产生对酶学和化学的发展都非常重要。今天催化化学已经成了化学这门学科的一个独立的分支。Berzelius 当时在描述催化作用这种未知力时说，由于“它的存在，可以发挥它的影响，引起其他复杂物质亲和力与反应能力，从而引起这个复杂物质组成的重排”。可见，对于酶的认识一开始就是和它具有催化作用的能力联系在一起的。

然而，人类对酶化学本质的认识亦经历过一场曲折。20世纪20年代初，德国著名化学家 Willstätter 认为酶不一定是蛋白质。他将过氧化物酶纯化达 12000 倍，酶制剂活性很高，但却检测不到蛋白质，其实这是受当时蛋白质检测水平的限制。他认为酶由活动中心与胶质载体组成，活动中心决定酶的催化能力及专一性，胶质载体的作用在于保护活动中心，蛋白质只是保护胶质载体的物质，以此来解释酶纯度越高越不稳定的实验事实。由于他的权威地位，这种观点较流行。1926年美国化学家 J. D. Sumner 首次从刀豆提取液中分离得到脲酶结晶，证明它具有蛋白质的性质，提出酶的化学本质是蛋白质的观点。但是一直到 1930~1936 年 Northrop 等得到了胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的结晶，并用相似的方法证实了酶是一种蛋白质以后，Sumner 的上述观点才普遍地被接受。现在已经发现生物体内存在的酶有上千种，而且每年都有新的酶发现，数百种已经纯化达到了均一的纯度，大约有 150 种以上的酶得到了结晶。后来还发现除了蛋白质以外，核糖核酸（RNA）也具有催化活性。例如，1982 年切克（Cech）等人在四膜虫（*Tetrahynena*）的 RNA 分子中发现的具有催化活性的 RNA，称为核酶（ribozyme）。1983 年阿特曼（Atman）和佩斯（Pace）等人研究表明，核糖核酸酶（由 RNA 和蛋白质组成）中的 RNA 组分，能单独催化前体 tRNA 从 5'-末端切除某些核苷酸片段，而成为成熟的 tRNA，显示出该 RNA 组分具有核糖核酸酶的催化活性。

## （二）酶的定义

酶（enzyme）是生物体活细胞产生的具有催化活性的蛋白质，是一类生物催化剂。酶具有蛋白质的属性主要表现在如下几点。

① 酶的化学组成中，氮元素的含量在 16% 左右。

② 酶是两性电解质，酶在水溶液中，可以进行两性解离，有确定的等电点 (pI)。

③ 酶的分子量很大，其水溶液具有亲水胶体的性质，不能透析。

④ 酶分子具有一级结构、二级结构、三级结构、四级结构。

⑤ 酶受某些物理因素（如加热、紫外线照射等）及化学因素（如酸、碱、有机溶剂等）的作用而变性或沉淀，丧失酶的活性。

⑥ 酶水解后，生成的最终产物也为氨基酸。

酶具有催化剂的共性。只要有少量酶存在即可大大加快反应的速率。它能使反应迅速达到平衡，但不改变反应的平衡点。有时它也参与反应，但在反应前后本身无变化，因此可重复使用。

在酶的概念中，强调了酶是生物体活细胞产生的，但在许多情况下，细胞内生成的酶可以分泌到细胞外或转移到其他组织器官中发挥作用。通常把由细胞内产生并在细胞内部起作用的酶称为胞内酶 (endoenzyme)；而把由细胞内产生后分泌到细胞外起作用的酶称为胞外酶 (extroenzyme)。一般主要是水解酶类，如淀粉酶、脂肪酶、人体消化道中的各种蛋白酶 (proteinase) 都属胞外酶。而水解酶类以外的其他酶类都属胞内酶。

在生物化学中，常把由酶催化进行的反应称为酶促反应 (enzymatic reaction)。在酶的催化下，发生化学变化的物质称为底物 (substrate)，反应后生成的物质称为产物 (product)。

## 二、酶学研究的重要性

### (一) 酶与生命活动密切相关

1. 酶参与了生物体内所有的生命活动和生命过程

酶在生物体内主要有以下几种功能。

① 执行具体的生理功能，如乙酰胆碱酯酶与神经冲动传导有关。

② 清除有害物质，起保卫作用，如限制性核酸内切酶能识别性地水解外源 DNA，防止异种生物物质的侵入。

③ 协同激素等生理活性物质在体内发挥信号转换、传递与放大作用，调节生理功能，如激素受体细胞膜上的腺苷酸环化酶、cAMP、蛋白激酶、糖原磷酸化酶和糖原合成酶等构成的酶级联系统能将微量的肾上腺素等激素信号转化并放大，使糖代谢活性增强。

④ 催化代谢反应，在生物体内建立各种各样代谢体系与代谢途径，形成相应的代谢体系，其中最基本的是生命物质的复制系统和能量的转换生成系统。

酶和生命活动的这种密切关系是以酶的高催化效率和高度专一性为基础。如果代谢系统中某一环节上酶出现了异常或者缺失，也会造成许多先天性遗传病。例如，“苯丙酮尿症”就是由于苯丙氨酸羟化酶先天性缺失，使正常的苯丙氨酸代谢受阻，导致该氨基酸在血液中积累，从而使大脑的智力发育受到影响；同时由于酪氨酸生成被切断，因此皮肤中黑色素不能形成，伴随着出现“白化”症状。

2. 酶的组成和分布是生物进化与组织功能分化的基础

由于生命物质的复制与能量转换是一切生物所必需的，因此不论动植物还是微生物都具有与此相关的酶系和辅酶。但是，不同生物又有各自特殊的代谢途径和代谢产物，它们还有各自相应的特征酶系、酶谱。即使是同类生物，酶的组成与分布也有明显的种属差异。例如精氨酸酶只存在于排尿动物的肝脏内，而排尿酸的动物则没有。其次，在同种生物各种组织中酶的分布也有所不同，例如，由于肝脏是氨基酸代谢与尿素形成的主要场所，因此精氨酸酶几乎全部集中在肝脏内。而且，在同一类组织中，由于功能需要与所处的环境不同，酶的

含量也可能有显著差异。

综上所述，可以概括地说，酶是一种高效、高度专一而且与生命活动密切相关的生物催化剂。

## （二）酶在生产生活中发挥巨大作用

酶的应用已有几千年的历史，但是人们真正有目的地利用酶是从 19 世纪末开始的，至今还不过 100 多年。特别是近几十年来，随着酶生产的不断发展，酶已广泛地用于食品、轻工、医药、环保以及科研等领域。

在酶的应用过程中，要根据应用目的选择酶的种类和纯度。有时可以采用粗酶，有时则要求用纯化的酶。有的酶可在不同的领域广泛使用，例如， $\alpha$ -淀粉酶，就可用于葡萄糖、果葡糖、饴糖的制造，淀粉原料液化，可在纺织工业用于退浆，也可在医药方面用于诊断疾病，治疗消化不良、食欲不振等。有的应用过程不仅涉及一种酶，而需要多种酶的联合作用。例如，由淀粉原料制造果葡糖的过程，就需要  $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶以及葡萄糖异构酶等 3 种酶的联合作用。

由于酶具有专一性强、催化效率高和作用条件温和的特点，所以酶在工业上的应用，可以增加产量，提高质量，降低原材料和能源的消耗，改善劳动条件，降低成本，甚至可以生产出用其他方法难以得到的产品，促进新产品、新技术、新工艺的兴起和发展。酶在医药方面的应用，可以快速、简便、准确地诊断出疾病，并可作为药物使用，在疾病的治疗方面达到其他药物难以达到的良好效果。酶在分析检测方面的应用，既快速简便，又灵敏准确，并使某些原来难以检测的物质及其变化情况的检测变得简单快捷。特别是在基因工程、细胞工程和蛋白质工程等新技术领域，酶是必不可少的工具。

目前已经发现的酶约有 2200 余种，但得以应用的酶不足 1/10，而已达到工业化生产和应用的酶不过几十种。因此，酶的应用大有潜力可挖。加上固定化酶技术和酶分子修饰技术的发展，可使酶的各种特性变得更加符合人们的愿望，使酶的广泛应用更显示出其优越性。人们预言在 21 世纪，生物工程面临的任务将是为人类解决能源，提供食物资源，解决环境污染，提供医疗保健药物，而酶工程将发挥重要作用。到 21 世纪后期，化学工业的大部分反应将用酶反应来完成，许多有用物质将由小巧、高效节能、没有公害的生物反应器来生产。酶反应将为人类生产氢、甲烷等燃料，提供电力，固定氮气等。酶反应器将用于治理三废，用酶反应转化纤维素作为再生资源，为人类提供糖类、油脂、蛋白质及其他食物原料等。总之，酶的应用前景非常广阔。

正因为酶应用的广泛性和深入性，对酶学性质的研究就显得十分重要，使酶在人类的生产和生活中发挥更大的作用。

## 三、酶的分类和命名

酶是生物为提高其生物反应效率而产生的生物催化剂，其化学本质为蛋白质，少数酶同时含有少量的糖和脂肪。在生物体内，所有的反应均在酶的催化作用下完成，几乎所有生物的生理现象都与酶的作用紧密相联系。

目前已知的酶已经多达 2200 种以上。如果由其发现人的意见给酶定名，就会引起混乱。有时，同一种酶有两个甚至多个不同名称。例如，催化淀粉水解生成糊精的酶，就有淀粉酶 (diastase)、液化淀粉酶 (liquefacient amylase) 和  $\alpha$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -amylase) 等多个名称。而有时同一个名称却用以表示两种或多种不同的酶。例如，琥珀酸氧化酶 (succinate oxidase) 这一名称，曾用于琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase)、琥珀酸半醛脱氢酶 (succinate-semialdehyde dehydrogenase) 和  $\text{NAD(P)}^+$  琥珀酸半醛脱氢酶 (succinate-semialdehyde

dehydrogenase [NAD(P)<sup>+</sup>]) 等几种酶。为了避免这种一个酶有多个名字或者多个酶重名的情况, 国际生物化学协会 (International Union Biochemistry, IUB) 在 1961 年提出了酶的系统命名法和分类法。

### (一) 国际系统命名法

国际系统命名法规定, 每一种酶有一个系统名称 (systematic name), 其命名原则大致如下。

① 名称由两部分构成: 前面为底物名, 如有两个底物则都写上, 并用“:”分开, 若底物之一是水时, 可将水略去不写; 后面为所催化的反应名称。例如, ATP: 己糖磷酸基转移酶。

② 不管酶催化正反应还是逆反应, 都用同一名称。当只有一个方向的反应能够被证实, 或只有一个方向的反应有生化重要性时, 就以此方向来命名。有时也带有一定的习惯性, 例如在包含有 NAD<sup>+</sup> 和 NADH 相互转化的所有反应中 ( $\text{DH}_2 + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{D} + \text{NADH} + \text{H}^+$ ), 命名为 DH<sub>2</sub>: NAD<sup>+</sup> 氧化还原酶, 而不采用其反方向命名。

各大类酶有时还有其特殊的命名规则, 如氧化还原酶往往为供体: 受体氧化还原酶; 转移酶为供体: 受体被转移基团转移酶等。

### (二) 国际系统分类法

根据国际生物化学协会规定的分类方法, 不管酶的结构和性质如何, 仅根据它所能催化反应的类型, 可将酶分为六大类, 即氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、连接酶。

具体来说每个酶都有一个编号, 前面冠以 EC (Enzyme Commission, 酶学委员会)。编号由 4 个阿拉伯数字组成, 每个数字之间用“·”分开。第一个数字代表酶所属的大类; 第二个数字表示大类下的亚类 (表 1-1); 第三个数字表示亚类下的亚类, 它更精确地表明底物或反应物的性质。通过这 3 个数字可以表明酶的特性, 如反应的种类、反应的性质等。第四个数字表示亚亚类下具体的个别的酶的顺序号, 一般按酶发现时间的先后顺序排列。按此分类法, 任何一个酶都可以得到一个适当的编号。

表 1-1 酶的国际系统分类 (大类及部分亚类)

1. 氧化还原酶类 (亚类表示底物中发生反应的供体基团的性质)	2. 转移酶类 (亚类表示底物中被转移基团的性质)
1.1 作用于供体的 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-OH} \\ \diagdown \end{array}$	2.1 转移碳基团
1.2 作用于供体的醛基或酮基	2.2 转移醛基或酮基
1.3 作用于供体的 $\begin{array}{c}   \\ \text{C=CH} \\   \end{array}$	2.3 转移酰基
1.4 作用于供体的 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-NH}_2 \\ \diagdown \end{array}$	2.4 转移糖苷基
1.5 作用于供体的 $\begin{array}{c}   \\ \text{CH-NH} \\   \end{array}$	2.5 转移甲基以外的烷基或芳基
1.6 作用 NADH 或 NADPH	2.6 转移含氮基团
1.7 作用于其他含氮氧化物供体	2.7 转移磷酸基
1.8 作用于供体的含硫基团	2.8 转移含硫基团
3. 水解酶类 (亚类表示被水解的键的类型)	4. 裂合酶类 (亚类表示分裂下来的基团与残余分子间的键的类型)
3.1 水解酯键	4.1 C-C
3.2 水解糖苷键	4.2 C-O
3.3 水解醚键	4.3 C-N
3.4 水解肽键	4.4 C-S
3.5 水解其他 C-N 键	4.5 C-卤
3.6 水解酸酐键	4.6 P-O
3.11 水解 C-P 键	

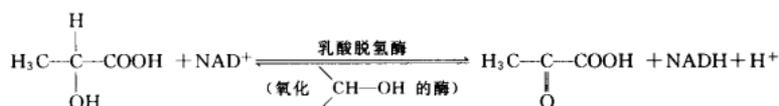
5. 异构酶类 (亚类表示异构的类型)	6. 连接酶类 (亚类表示新形成的键的类型)
5.1 消旋及差向异构酶	6.1 C—O
5.2 顺反异构酶	6.2 C—S
5.3 分子内氧化还原酶	6.3 C—N
5.4 分子内转移酶	6.4 C—C
5.5 分子内裂合酶	6.5 磷酸酯键

酶的六大类简介如下。

### 1. 氧化还原酶类 (oxido-reductases)

它催化氧化反应： $A \cdot 2H + B \rightleftharpoons A + B \cdot 2H$

例如乳酸脱氢酶：

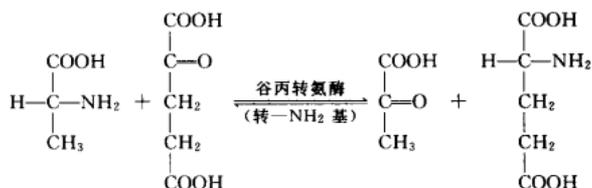


这类酶不仅包括脱氢酶、氧化酶，还包括氧化物酶、加氢酶等。

### 2. 转移酶类 (transferases)

它催化基团的转移反应： $AB + C \rightleftharpoons A + BC$

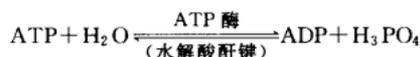
例如谷丙转氨酶：



### 3. 水解酶类 (hydrolases)

它催化水解反应： $AB + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{AOH} + \text{BH}$

例如 ATP 酶：



这类酶可以水解的键有酯键、硫酸酯键、糖苷键、肽键、酸酐键等。它们包括淀粉酶、酯酶、蛋白酶、核酸酶等。

### 4. 裂合酶类 (lyases)

它也被称为裂解酶类，催化通过消去反应裂解 C—C、C—O、C—N 等键而产生双键的反应及其逆反应。

例如柠檬酸合成酶：

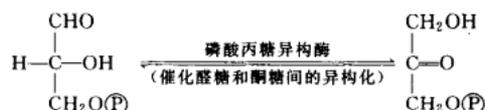


这类酶包括醛缩酶、水化酶、脱氨酶等。

### 5. 异构酶类 (isomerases)

它催化各种同分异构体相互转变： $A \rightleftharpoons B$

例如磷酸丙糖异构酶:

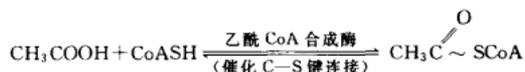


这类酶包括催化 D、L 互变,  $\alpha$ 、 $\beta$  互变等的酶。

#### 6. 连接酶类 (ligases)

它也被称为合成酶类, 催化利用 ATP 或其他 NTP 供能而使两个分子连接的反应。

例如乙酰 CoA 合成酶:



### (三) 需要注意的问题

#### 1. 习惯名或常用名

采用国际系统命名法所得酶的名称往往很长, 使用起来十分不便。时至今日, 日常使用最多的还是酶的习惯名称。因此, 每一种酶除有一个系统名称外, 还有一个常用的习惯名称, 即推荐名称 (recommended name)。习惯命名的原则如下。

① 大多数酶依其底物命名, 如淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶等。

② 有些酶根据其催化反应的性质命名, 如转氨酶、脱氢酶等。

③ 有些酶结合上述两方面来命名, 如乳酸脱氢酶、谷丙转氨酶等。

④ 在上述命名基础上有时还加上酶的来源或酶的其他特点, 如胰蛋白酶、碱性磷酸酯酶等。

#### 2. 酶的物种和组织的差异

来自不同物种或同一物种不同组织或不同细胞的同一种酶, 虽然它们催化同一个生化反应, 但它们本身的一级结构可能并不相同, 有时反应机制也可能不尽一样。可是, 无论是酶的系统命名法或习惯命名法, 对这些均不加以区别, 而定为相同的名称。原因是命名的根据是酶所催化的反应。所以, 当讨论一个酶时, 应把它的来源与名称一并加以说明。

## 第二节 酶学性质及催化机理

### 一、酶的催化特性

酶作为生物催化剂, 具有一般催化剂的特征, 但酶作为一种生物大分子其特殊之处, 主要体现在如下几点。

#### 1. 催化效率极高

酶催化反应的速率比无机催化剂或有机催化剂高  $10^7 \sim 10^{13}$  倍。例如, 过氧化氢分解反应中, 若用铁离子作为催化剂, 反应速率为  $6 \times 10^{-4}$  mol/s, 而用过氧化氢酶催化, 反应速率为  $6 \times 10^6$  mol/s;  $20^\circ\text{C}$  下脲酶水解脲的速率比微酸水溶液中的反应速率增大  $10^{18}$  倍, 可见酶作为一种生物催化剂其催化效率极高。

#### 2. 酶具有高度专一性

酶对底物及催化的反应有严格的选择性, 一种酶仅能作用于一种物质或一类结构相似的物质, 发生一定的化学反应, 而对其他物质不具有活性, 这种对底物的选择性称为酶的专一性。如蛋白酶只能水解蛋白质, 而对脂肪、淀粉不起任何作用; 脲酶只作用于尿素。酶的专一性主要取决于酶的活性中心的构象和性质, 其专一性可分为结构专一性和立体异构专

一性。

在结构专一性中，有的酶只作用于一定的键，对键两端的基团没有一定的要求，例如二肽酶只催化二肽键，而与肽键连接的氨基酸没有关系；酯酶既能催化甘油酯，也能催化丙酰胆碱、丁酰胆碱中的酯键，这种单一性称为“键专一性”。有的酶对底物要求较高，不但要求一定的化学键，而且对键的一端的基团也有一定的要求，如糖脂化合物的水解，这种单一性称为“基团专一性”。

立体异构专一性也可分为旋光异构专一和几何异构专一。前者指对于底物的旋光性质要求严格，如乳酸脱氢酶（EC 1.1.1.27）催化丙酮酸生成 L-乳酸，而 D-乳酸脱氢酶（EC 1.1.1.28）催化丙酮酸却只能生成 D-乳酸；后者则对底物的顺反异构具有高度的选择性。

### 3. 酶的催化活性可被调节控制

酶作为细胞蛋白质的组成成分，随生长发育不断地进行自我更新和组分变化，其催化活性又极易受到环境条件的影响而发生变化，因此通过多种机制和形式对酶的活性进行调节和控制，使极其复杂的代谢活动有条不紊地进行。这也是酶区别于一般催化剂的一个重要特性。生物体内酶的调节和控制主要有以下几种方式。

(1) 酶浓度的调节 酶浓度的调节主要有两种方式：一种是诱导或抑制酶的合成；另一种是调节酶的降解速率。例如，在分解代谢中， $\beta$ -半乳糖苷键的合成，平时是处于被阻遏状态，当乳糖存在时，抵消了阻遏作用，于是酶受乳糖的诱导而合成。

(2) 激素调节 这种调节也和生物合成有关，但调节方式不同。如乳糖合成酶有两个亚基：催化亚基和修饰亚基。催化亚基本身不能合成乳糖，但可以催化半乳糖以共价键的方式连接到蛋白质上形成糖蛋白。修饰亚基和催化亚基结合后，改变了催化亚基的专一性，可以催化半乳糖和葡萄糖反应生成乳糖。修饰亚基的水平是由激素控制的，妊娠时修饰亚基在乳腺中生成，分娩时，由于激素水平急剧变化，修饰亚基大量合成，它和催化亚基结合，大量合成乳糖。

(3) 共价修饰调节 酶分子中的一些基团，在其他酶的催化下，可以共价结合或脱去，有磷酸化/去磷酸化、乙酰化/去乙酰化、甲基化/去甲基化、腺苷酰化/去腺苷酰化等几种调节。

此外，酶原激活、反馈调节、抑制剂的调节、金属离子和其他小分子化合物的调节、解聚与聚合等机制在酶的催化反应中都得到应用。

### 4. 酶易失活

酶的本质是蛋白质，是由生物细胞产生的，它对环境的变化非常敏感，高温、强酸、强碱、重金属等引起蛋白质变性的条件，都能使酶丧失活性。同时酶也常因温度、pH 值的轻微改变或抑制剂的存在而使其活性发生改变。因此，酶能在温和的条件下进行催化反应，而化学催化反应往往只有在剧烈的条件下才能进行。

## 二、酶的活性部位

### 1. 活性部位的概念

酶是大分子蛋白质，而反应物是小分子物质。因此酶与底物的结合不是整个酶分子，催化反应的也不是整个酶分子，而是只局限在它的大分子的一定区域，一般把这一区域称为酶的活性部位。

活性部位（或称活性中心，active center）是指酶分子中直接和底物结合，并与酶的催化作用有直接关系的部位。对于单纯酶来说，它是由一些氨基酸残基的侧链基团（R 侧基）组成的。对于结合酶来说，除了上述氨基酸残基的侧链基团外，辅酶或辅基上的某一部分结

构往往也是活性部位的结合部分。构成酶活性部位的这些基团，在一级结构上可能相距很远，甚至可能不在一条肽链上，但在蛋白质空间结构上彼此靠近，形成具有一定空间结构的区域。这个区域在已知结构的酶中都是位于酶分子的表面呈裂缝状。

## 2. 必需基团

酶分子中呈现酶活性不可缺少的化学基团，称为必需基团。必需基团有两类：直接参与结合底物和催化底物化学反应的化学基团，称为活性中心内的必需基团；不直接与底物作用，但能维持酶分子构象，保证活性中心各有关基团处于最适的空间位置，对酶的催化活性发挥间接作用的一类必需基团，称为活性中心外的必需基团。

## 3. 结合部位与催化部位

由于整个催化过程包括两步：酶与底物结合、催化底物转化。所以，活性部位又可以分为结合部位 (binding site) 和催化部位 (catalytic site)。从功能上讲，前者结合底物，后者催化底物进行化学反应。

(1) 结合部位 与底物分子直接结合，并且使底物分子处于被催化的最优位置，使底物分子中的敏感键接近催化基团，有利于催化反应。如羧肽酶 A 与底物相遇后，至少有 5 个结合点。有的基团以静电方式相结合，有的基团以疏水键或配位键相结合，这些结合有利于对底物的催化。

结合部位往往由几个氨基酸残基组成（包括一些残基的侧链基团或主链骨架的羰基或亚氨基），有些酶的结合部位还包含金属离子，金属离子一般是通过配位键与底物相结合的。结合部位有特定的空间排布和一定的柔性，这就决定了酶对底物的专一性和底物对酶的可诱导性。

例如，溶菌酶分子是由 129 个氨基酸残基组成的一条肽链，其分子表面有一个裂隙，能容纳底物分子中的 6 个葡萄糖环。酶与底物结合有 11 个结合位点。大部分残基的侧链基团通过氢键与细菌细胞壁多糖中 6 个糖环上的相应基团相结合。由此可知，酶与底物的结合是多位点的。

(2) 催化部位 是指酶分子上直接催化底物化学反应的部位。催化部位一般由几个催化基团组成。这些催化基团包括特定的氨基酸侧链基团（一般为极性基团）、辅酶和金属离子。辅酶和金属离子并非所有酶都具有，只是部分酶的催化作用需要辅酶和金属离子的参与。

溶菌酶的催化部位有 2 个催化基团，羧肽酶 A 的催化部位有 3 个催化基团。催化基团对底物分子有下列几种催化作用：使底物分子中的敏感键变形；易于断键；对底物分子进行酸碱催化。

(3) 结合部位与催化部位的关系 从功能上讲，可以将活性部位分成结合部位和催化部位两部分。但这两者的划分，也并非绝对的，有时两者并非各自独立存在。例如，羧肽酶 A 催化过程中，Tyr248 的酚羟基既能与人工底物 Gly-Tyr 的肽键的 -NH 基以氢键结合，又能在催化过程中提供一个质子对底物的 Tyr，使之形成胺。所以说，Tyr248 既是结合基团，又是催化基团。

## 4. 酶活性部位的研究方法

研究酶活性部位结构中化学基团的种类、数目以及它们在多肽链的一级结构和空间结构中的位置，对于阐明酶催化机理具有重要的意义。研究的方法很多，如 X 射线衍射法、比较生化分析法、动力学参数法、化学修饰法、基因定位突变法等。

# 三、酶催化作用机理

## (一) 作用专一性机理

关于酶的作用专一性机制有各种学说，这些学说也有一些共同点，即认为：①酶的活性

中心是酶作用专一性的基础，不仅要求结合基团与催化基团的存在，而且要求它们有特定的构象分布；②酶要表现其作用专一性必须通过和底物结合。

### 1. 酶的刚性与“锁和钥匙”学说

早在 1890 年 E. Fisher 就提出了“锁和钥匙”的学说来解释酶的作用专一性。他认为酶和底物间必定存在着互补的结构特征，只有那些符合这种特征要求的物质才是底物，才能和酶结合，并被酶催化转化，酶和底物的这种专一关系类似一把钥匙开一把锁。锁和钥匙学说的前提是酶分子具有确定的结构与构象，并具有一定的刚性。

这一学说有相当多的事实支持，例如，乙酰胆碱酯酶催化乙酰胆碱化合物生成乙酸和胆碱，并要求底物中胆碱部分的氮带正电，根据这种特点，可推测在该酶分子中至少有一个阴离子部位与酯解部位。事实也的确如此，这两个部位间有严格的距离，胆碱和酰基间多一个或少一个  $-CH_2-$  的衍生物都不适于做底物或竞争性抑制剂，而符合这种键长、键角要求的化合物都能和酶发生作用，或者被酶催化水解，或者抑制酶。实际上强有力的有机磷杀虫剂以及与此相应酶解毒剂也就是根据这一思想设计出来的。

### 2. 酶的柔顺性与诱导契合学说

酶究竟是刚体还是有一定的柔顺性？X 衍射分析、各种光谱分析以及核磁共振分析等都表明，游离酶和酶底物配合物在结构上往往不同，即伴随底物与酶的结合，酶的构象可能发生某些变化。如 D-氨基酸氧化酶能在某种条件下和底物或类底物形成较稳定的配合物，有人在研究了这种酶从酶蛋白到全酶以致到酶-底物配合物的流体力学性状变化后指出，酶的这三种形式虽然在分子量上的差别相对很小（相对分子质量约 115000），但沉降常数、扩散系数却都按上述顺序明显增大，黏度则依次降低，体积逐渐变小。这说明从酶蛋白到全酶到酶-底物配合物，分子形状在逐步改变，分子的结构逐步变得更为致密。根据光散射计算了分子的轴比，表明分子形状可能发生了从棒状到椭圆到球状的变化；这就是说，底物和酶的结合引起了活性中心构象改变，使  $\alpha$  螺旋度升高，从而酶分子形状也发生了变化。根据两分子具有一定柔顺性的事实，Koshland 在解释酶的作用专一性机制时提出了诱导契合学说，认为酶和底物在接触以前，二者并不是完全契合的，只有在底物和酶的结合部位结合以后，产生了相互诱导，酶的构象发生了微妙的变化，催化基团转入有效的作用位置，酶与底物完全契合，酶才能高速地催化反应。

有许多实例支持诱导契合学说，例如，胰蛋白酶可以苯甲酰-L-Arg-乙酯（BAEE）、苯甲酰-L-Lys-乙酯（BLEE）为底物，底物的酯键和酶的催化部位、碱性侧链和酶的结合部位各各对应。由于酶的催化部位和结合部位在酶的立体构造上有一定的距离，因此要求底物的酯键与碱性基团间要有一定长度的链距，其间多一个或少一个  $-CH_2-$  都不宜作为底物。同时也由于酶的专一性结合部位要求底物的氨基带正电，因此短链烷基铵离子能竞争性地抑制 BAEE 水解。另外，乙酰-Gly-乙酯（AGEE）由于没有碱性氨基酸侧链，因而胰蛋白酶只能缓慢地催化其水解；有趣的是，这种情况下，短链烷基铵离子对它的水解不仅不产生竞争性抑制作用，相反地还表现激活作用，而且短链烷基铵离子对 BAEE 产生的抑制与对 AGEE 产生的激活，其  $K_1 = K_a$ 。后一事实说明，烷基铵离子能与酶活性中心中的结合基团结合，并诱导酶构象发生变化，使催化基团获得正确取位进行催化。

诱导契合学说认为：①酶分子具有一定的柔顺性；②酶作用专一性不仅取决于酶和底物的结合，也取决于酶的催化基团有正确的取位。正因为如此，诱导契合学说认为催化部位要诱导才能形成，而不是“现成的”，因此可以排除那些不适合物质偶然“落入”现成的催化部位而被催化的可能。诱导契合学说也能很好地解释所谓“无效”结合，因为这种物质不能诱导催化部位形成。

### 3. 扭曲和过渡态学说

这种学说认为，酶的作用专一性既寓于酶与底物的结合，也寓于酶对底物的催化，酶与底物的结合不仅促成催化基团的正确取位，同时也为下一步酶对底物的催化做了准备。

早在1930年 Haldane 就指出，在酶与底物结合过程中有部分结合能使底物扭曲，降低反应活化能，推动底物反应。这种学说与锁和钥匙学说有相通之处，因为按照锁和钥匙学说，酶是刚性分子，底物和酶的活性中心具有高度互补性。当这种互补性不甚精确时，在底物与酶的结合过程中，必然会导致底物发生某种程度的扭曲、张拉，从而导致反应键的削弱，促进反应进行。这就是说，酶在与底物专一结合时就包含有进一步催化的意义。例如，已知溶菌酶的适宜底物是 *N*-乙酰胞壁酸 (NAM) 与 *N*-乙酰氨基- $\alpha$ -脱氧-D-葡萄糖 (NAG) 通过  $\beta$ -1,4-连接交替组成的六聚糖。与此相对应，在该酶分子的活性中心也有6个亚位点，可专一地和六聚糖各个结合，其中自非还原端算起第1糖、第2糖、第3糖、第5糖、第6糖（分别称为A糖环、B糖环、C糖环、E糖环、F糖环）与活性中心相应的5个亚位点十分吻合，结合自由能为负值，但是D糖环则不足，它只有发生一定的扭曲，即从稳定的椅型变为半椅型后才能和酶结合，正是由于这种构象的转变，就导致了糖苷键削弱，反应加速。

以后 Paueing 发展了上述观点，引进了过渡态学说。即认为：①任何一个化学反应的进行都必须经过活性中间配合物阶段或者说过渡态阶段，反应速率与过渡态底物的浓度成比例；②酶的活性中心对过渡态底物比基态底物有更好的互补性，这就是说，酶和过渡态底物有更强的结合力。

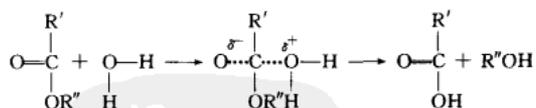
这种学说的特点是，酶的高度作用专一性不仅寓于底物的静态结构之中，也寓于底物的动态变化之中。这和诱导契合学说有相通之处，按照后一学说，酶分子具有一定的柔顺性，酶和底物结合时，除了底物诱导优化部位的形成外，在契合的同时也引起底物分子的扭曲，导致底物向过渡态转变，即诱导契合导致了过渡态的生成与稳定，从而导致了反应加速，而且也只有能形成过渡态的底物才能被酶作用。

过渡态学说近年来获得了大量的过渡态类似物而得到支持。这些类似物的特点是它们和酶的结合能力远大于天然底物和酶的结合能力，因而常可作为酶的强力抑制剂，例如，溶菌酶，如果说D糖环处于半椅型构象是该底物的过渡态，那么人工合成 (NAG)<sub>2</sub>-NAM 内酯衍生物因具有半椅型结构应可能成为过渡态类似物抑制剂，事实也的确如此。

## (二) 催化机理

### 1. 张变扭曲效应

过渡态的形成是反应进行的关键，以酯水解为例。



只有当水分子加到酯上，形成具有正电区与负电区的过渡态配合物后（配合物具有较高的自由能，极易分解形成较稳定的产物），反应才能进行。因此任何有助于促进过渡态的形成与稳定的因素都是催化机制的一个重要组成部分。

如前所述，酶反应进行时首先必须形成酶-底物配合物，使底物产生张变扭曲，使基态底物转变为过渡态构象，降低活化能，加速反应，这就是“张变扭曲”机制的中心思想。

### 2. 酸碱催化

酸碱催化是通过瞬时地向反应物提供质子或从反应物接受质子以稳定过渡态，加速反应的一类催化机制。酸碱催化在酶的催化过程中占有很重要的地位，酶具有各种酸性或碱性氨基酸侧链，如 Glu、Asp、His、Lys、Cys、Tyr 等，它们可能在特定条件下发挥催化作用。

一般酶反应中涉及的都是广义的酸碱催化，因为尚未发现酶具有浓缩  $H^+$  或  $OH^-$  的机构。

### 3. 共价催化

共价催化又称亲核催化或亲电子催化。在催化时，亲核催化剂或亲电催化剂能分别放出电子或汲取电子并作用底物的缺电子中心或负中心，迅速形成不稳定的共价中间配合物降低反应活化自由能，以达到加速反应的目的。

### 4. 静电催化

过渡态也可通过底物的荷电基与催化剂的荷电基加以稳定，正碳离子可通过负电荷的羧基稳定；同样含氧阴离子的负电荷，也可通过金属离子加以稳定。

值得提到的是，在已知的 1/4 左右的需要金属的酶中，金属所起的作用可能很不相同：有的参与酶和底物的结合，并起稳定催化构象的作用，如某些碱土金属  $Ca^{2+}$  与  $Mg^{2+}$  等；有的和酶的结合力很弱，起活化作用，如某些碱土金属  $K^+$  等是某些与磷酸基转移有关酶的活化剂；至于过渡态金属，它们或者通过静电结合导致底物扭曲张变，或者作为亲核亲电子试剂进行共价催化。

### 5. 多元催化与协同效应

以上讨论的是酶通过使底物转变、稳定于过渡态、降低活化自由能以达到加速反应目的的几种可能的机制。它的结构基础是酶分子拥有一个由多种侧链基团组成的活性中心。事实上，酶的催化作用也正是通过这些侧链基团的协同作用共同完成的，例如，胰凝乳蛋白酶是通过 Asp102、His57、Ser195 组成电力接续系统催化肽键水解。这种多元催化、协同作用的效果远胜于单元催化的效果。

以四甲基葡萄糖在苯中的变旋反应为例，在没有催化剂存在时，反应进行得极为缓慢，酚和吡啶都具有催化作用，但是酚与吡啶同时存在时，催化效率可大大提高。如果将酚羟基与吡啶再结合于同一分子（即  $\alpha$ -羟吡啶），则催化效率升高更为显著，在它的浓度为 0.001mol/L 时，其催化效率比酚与吡啶混合浓度的大 7000 倍。

### 6. 微环境效应

许多有机化学反应实验证明，溶剂的性质对反应速率的影响很大，例如  $N_3^-$  与对硝基氟苯中氟的取代反应，在二甲基亚砷（DMSO）中进行的速率比在水中大 12000 倍以上。

X 射线衍射分析表明，在酶分子上活性中心区是一个特殊的微环境。例如溶菌酶的活性中心凹穴是由多个非极性氨基酸侧链基包围的、与外界水溶液显著不同的微环境。最近的计算表明，这种低介电常数的微环境可能使 Asp52 对正碳离子的静电稳定作用显著增强，从而使催化速率得以增大  $3 \times 10^6$  倍。

### 7. 邻近效应与定向效应

以上在酶结构水平讨论了降低反应活化自由能，使底物由基态转变为过渡态的各种可能机制。但是另一方面从热力学角度有： $\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S$ ， $\Delta H$  与  $\Delta S$  分别为活化焓与熵，因此任何减少负熵的办法也能使反应加速。

熵是衡量系统中有序度的量的概念。对于  $A + B \rightarrow C$  的反应系统来说，A、B 每一种分子都有 3 个平移度、3 个旋转自由度，但当它们反应变为 C 以后，就要减少 3 个平移度与 3 个旋转自由度，也就是说，当反应物从自由的基态变为结合的过渡态时，就可能引起熵的损失，负熵增大， $-T \times \Delta S$  变为较大的正值。

在酶促反应系统中，负熵的减少主要寓于酶-底物配合物的形成。如前所述，酶-底物配合物的形成过程既是专一性识别过程，更重要的还是变分子间反应为分子内反应的过程。概括地说，这是一个负熵减少的过程，在这一过程中包含两种效应：邻近效应和定向效应。

邻近效应是指酶与底物结合形成配合物以后，使底物和底物（如双分子反应）之间、酶

的催化基团与底物之间结合于同一分子而使有效浓度得以极大地升高，从而反应速率大大地增加的一种效应。

定向效应是指反应物的反应基之间和酶的催化基团与底物的反应基之间的正确取位产生的效应。正确定向取位问题在游离的反应物体系中很难解决，但当反应体系由分子间反应变为分子内反应后，这个问题就有了解决的基础。

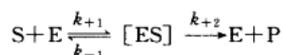
以上讨论的是人们现阶段对酶的结构、酶的作用原理的一些基本认识。概括地说，酶的蛋白质本质不仅为酶提供了多种功能基团，更为酶建立特定的活性构象——活性中心奠定了基础。酶和底物结合形成活性中间配合物的过程既是一个专一性识别的过程，也是一个变分子间反应为分子内反应，实现酶发挥各种催化功能的过程，通过这种选择和协同作用，从而酶反应得以高度专一、高效地加速。

### 第三节 酶催化反应动力学

#### 一、单底物酶反应动力学

简单的单底物酶催化反应动力学是指由一种反应物（底物）参与的不可逆反应。用于此类反应的有酶催化的水解反应和异构化反应。

对酶催化反应过程的机理，得到大量实验结果支持的是活性中间复合物学说。该学说认为酶催化反应至少包括两步，首先是底物 S 和酶 E 相结合形成中间复合物 [ES]，然后该复合物分解成产物 P，并释放出 E。



式中，E 为游离酶；[ES] 为酶底物复合物；S 为底物；P 为产物； $k_{-1}$ 、 $k_{+1}$ 、 $k_{+2}$  为相应各步的反应速率常数。

根据化学反应动力学，反应速率通常以单位时间、单位反应体系中某一组分的变化量来表示。对均相酶反应，单位反应体系常用单位体积表示。因此，上述反应的速率可表示为

$$r_S = -\frac{1}{V} \times \frac{dn_S}{dt}, \quad r_P = \frac{1}{V} \times \frac{dn_P}{dt} \quad (1-1)$$

式中， $r_S$  为底物 S 的消耗速率， $\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ ； $r_P$  为产物 P 的生成速率， $\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ ；V 为反应体系的体积，L； $n_S$  为底物 S 的物质的量，mol； $n_P$  为产物 P 的物质的量，mol；t 为时间，s。

对于底物 S，随着反应的进行，其量由于消耗而逐渐减少，即时间导数  $dn_S/dt < 0$ ，因此用 S 来计算反应速率时，需加一负号，以使反应速率恒为正值。而 P 为产物，情况相反， $dn_P/dt > 0$ ，故用 P 来计算反应速率时，则不需加负号。

根据质量作用定律，P 的生成速率可表示为

$$r_P = k_{+2} c_{[ES]} \quad (1-2)$$

式中， $c_{[ES]}$  为中间复合物 [ES] 的浓度，它为一难测定的未知量，因而不能用它来表示最终的速率方程。

L. Michaelis 和 M. L. Menten 在推导该方程时，曾提出下述三点假设。

① 与底物浓度  $c_S$  相比，酶的浓度  $c_E$  是很小的，因而可忽略由于生成中间复合物 [ES] 而消耗的底物。

② 不考虑  $P + E \longrightarrow [ES]$  这个逆反应的存在，若要忽略该反应的存在，则必须是产

物 P 为零, 换言之, 该方程适用于反应的初始状态。

③ 认为基元反应  $[ES] \rightarrow E + P$  的反应速率最慢, 为该反应速率的控制步骤; 而  $S + E \rightleftharpoons [ES]$  这一步反应速率最快, 并达到了平衡状态。因此该假设又称为“平衡假设”。

速率控制步骤在反应动力学中是一个重要概念。在一多步骤的反应体系中, 其中反应速率最慢的一步称为速率的控制步骤, 并且控制步骤的速率决定了该反应的速率。

根据上述假设③, 可列出

$$k_{+1}c_Ec_S = k_{-1}c_{[ES]}$$

或表示为

$$c_E = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \times \frac{c_{[ES]}}{c_S} = K_S \frac{c_{[ES]}}{c_S} \quad (1-3)$$

式中,  $c_E$  为游离酶的浓度, mol/L;  $c_S$  为底物的浓度, mol/L;  $K_S$  为解离常数, mol/L。

反应体系中酶的总浓度  $c_{E0}$  为

$$c_{E0} = c_E + c_{[ES]}$$

所以

$$c_{E0} = K_S \frac{c_{[ES]}}{c_S} + c_{[ES]} = c_{[ES]} \left( 1 + \frac{K_S}{c_S} \right) \quad (1-4)$$

即

$$c_{[ES]} = \frac{c_{E0}c_S}{c_S + K_S} \quad (1-5)$$

将式 (1-5) 代入式 (1-2)

得

$$r_P = \frac{k_{+2}c_{E0}c_S}{K_S + c_S} = \frac{r_{P,\max}c_S}{K_S + c_S} \quad (1-6)$$

式中,  $r_{P,\max}$  为 P 的最大生成速率, mol/(L·s);  $c_{E0}$  为酶的总浓度, 亦为酶的初始浓度, mol/L。

式 (1-6) 即为米氏方程, 或称 M-M 方程。该式中有两个动力学参数, 即  $K_S$  和  $r_{P,\max}$ 。

后来, G. E. Briggs 和 J. B. S. Haldane 对上述假设③进行了修正, 提出了“拟稳态”假设。他们认为由于反应体系中底物浓度要比酶的浓度高得多, 中间复合物分解时所得到的酶又立即与底物相结合, 从而使反应体系中复合物浓度维持不变, 即中间复合物的浓度不再随时间而变化, 这就是“拟稳态”假设。这是从反应机理推导动力学方程又一重要假设。因此

$$\frac{dc_{[ES]}}{dt} = 0$$

据此可有

$$k_{+1}c_Ec_S - k_{-1}c_{[ES]} - k_{+2}c_{[ES]} = 0 \quad (1-7)$$

消去  $c_{[ES]}$  而得到

$$r_P = \frac{k_{+2}c_{E0}c_S}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + c_S} = \frac{r_{P,\max}c_S}{K_m + c_S} \quad (1-8)$$

式中,  $K_m$  为米氏常数, mol/L。

$K_m$  与  $K_S$  的关系为

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \quad (1-9)$$

表 1-2 总结了平衡法与拟稳态法的主要异同点。

表 1-2 平衡法与拟稳态法的比较

项目	平衡法	拟稳态法
假设	①酶和底物生成不稳定复合物[ES], 酶催化反应是经该中间复合物完成的 即 $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} [ES] \xrightarrow{k_{+2}} E + P$	②[ES]的生成速率与其解离速率相等, 其浓度不随时间而变化 $\frac{dc_{[ES]}}{dt} = 0$
	②[ES]在反应开始后与 E 及 S 迅速达到动态平衡 $K_S = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	
	③底物浓度远高于酶的浓度, $c_S \gg c_E$	
质量守恒	$c_{E0} = c_E + c_{[ES]}$	
产物生成速率	$r_P = k_{+2}c_{[ES]}$	
动力学方程	$r_P = \frac{r_{P,max}c_S}{K_S + c_S}$	$r_P = \frac{r_{P,max}c_S}{K_m + c_S}$
$K_S$ 与 $K_m$	$K_S = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}$

式 (1-9) 中  $k_{-1}$  和  $k_{+2}$  表示的是中间复合物 [ES] 解离的速率常数;  $k_{+1}$  则表示的是生成中间复合物 [ES] 的速率常数。因此当  $K_m$  值大时, 表示复合物 [ES] 的结合力弱, 易解离; 当  $K_m$  值小时, [ES] 不易解离。 $K_m$  值的大小与酶、反应物系的特性以及反应条件有关。因此它是表示某一特定的酶催化反应性质的一个特征参数。表 1-3 列出了某些酶反应的  $K_m$  值。

表 1-3 某些酶反应的  $K_m$  值

酶	底物	$K_m$ /(mmol/L)	酶	底物	$K_m$ /(mmol/L)
葡萄糖氧化酶	D-葡萄糖	7.7	尿素酶	尿素	4.0
L-氨基酸氧化酶	L-亮氨酸	1.0	蔗糖酶	蔗糖	50
乳糖酶	乳糖	7.5	醇脱氢酶	乙醇	13
天冬酰胺酶	L-天冬酰胺	0.018	葡萄糖淀粉酶	麦芽糖	1.2

在式 (1-8) 中, 有两个重要的动力学参数, 即  $K_m$  和  $r_{P,max}$ 。

根据式 (1-8), 当  $r_P = \frac{1}{2}r_{P,max}$  时,  $K_m = c_S$ 。这表明, 从数值上来看,  $K_m$  表示了当反应速率为最大反应速率一半时的底物浓度。

另一个动力学参数为最大反应速率  $r_{P,max}$ 。根据定义,  $r_{P,max} = k_{+2}c_{E0}$ , 表示当全部的酶都呈复合物状态时的反应速率。 $k_{+2}$  表示单位时间内一个酶分子所能催化底物发生反应的分子数, 因此它表示了酶催化反应能力的大小, 不同的酶催化反应, 其值不同。

上述 M-M 方程所描述的反应是最简单的单底物无抑制的不可逆反应  $S \rightarrow P$ , 因此应存有下列关系。

$$r_S = r_P \quad (1-10)$$

$$r_{S,max} = r_{P,max} = r_{max} \quad (1-11)$$

为了表述方便, 最大反应速率一般用  $r_{max}$  表示。

M-M 方程所表示的动力学关系为反应速率与底物浓度的关系, 即  $r_S - c_S$  的关系, 见图 1-1。

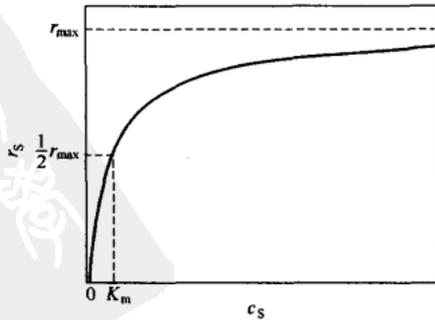


图 1-1 当  $c_{E0}$  一定时,  $r_S$  与  $c_S$  的关系曲线

曲线表示了三个不同动力学特点的区域。

① 当  $c_S \ll K_m$ ，即底物浓度比  $K_m$  值小得很多时，该曲线近似为一直线。这表示反应速率与底物浓度近似成正比的关系，此时酶催化反应可近似看作为一级反应。

$$r_S = \frac{r_{\max} c_S}{K_m} = K c_S \quad (1-12)$$

这是因为当  $K_m$  值很大时，大部分酶为游离态的酶，而  $c_{[ES]}$  的量很少。要想提高反应速率，只有通过提高  $c_S$  值，进而提高  $c_{[ES]}$ ，才能使反应速率加快。因而此时反应速率主要取决于底物浓度的变化。

根据式 (1-12)，可以推出

$$r_{\max} t = K_m \ln \frac{c_{S0}}{c_S} \quad (1-13)$$

或 
$$c_S = c_{S0} \exp\left[-\frac{r_{\max} t}{K_m}\right] \quad (1-14)$$

式中， $c_{S0}$  为底物的初始浓度，mol/L。

② 当  $c_S \gg K_m$  时，该曲线近似为一水平线，表示当底物浓度继续增加时，反应速率变化不大。此时酶反应可视为零级反应，反应速率将不随底物浓度的变化而变化。这是因为当  $K_m$  值很小时，绝大多数酶呈复合物状态，反应体系内游离的酶很少，因而即使提高底物的浓度，也不能提高其反应速率。

根据式 (1-8)，同样可以推出

$$r_S \approx r_{\max} \quad (1-15)$$

即 
$$r_{\max} t = c_{S0} - c_S$$

或 
$$c_S = c_{S0} - r_{\max} t \quad (1-16)$$

③ 当  $c_S$  与  $K_m$  的数量关系处于上述两者之间的范围时，则符合 M-M 方程所表示的关系式。

根据式 (1-8)，结合  $t=0$ ， $c_S = c_{S0}$  的初值积分得到

$$r_{\max} t = (c_{S0} - c_S) + K_m \ln \frac{c_{S0}}{c_S} \quad (1-17)$$

或 
$$r_{\max} t = c_{S0} X_S + K_m \ln \frac{1}{1 - X_S} \quad (1-18)$$

式中， $X_S$  为底物转化率， $X_S = \frac{c_{S0} - c_S}{c_{S0}}$ 。

上述 M-M 方程的表示形式一般称为双曲线形。

## 二、有抑制的酶催化反应动力学

前面讨论的单底物酶反应动力学有一个显著的特点，即反应速率与底物浓度的关系是一种单调增加的函数关系。而实际上有些酶的催化反应，由于底物浓度过高，其反应速率反而会下降，此种效应称为底物的抑制作用。更为重要的是，在酶催化反应中，由于某些外源化合物的存在而使反应速率下降，这种物质称为抑制剂。

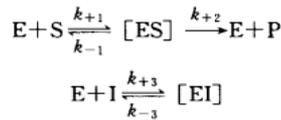
抑制作用分为可逆抑制与不可逆抑制两大类。如果某种抑制可用诸如透析等物理方法把抑制剂去掉而恢复酶的活性，则此类抑制称为可逆抑制，此时酶与抑制剂的结合存在着解离平衡的关系。如果抑制剂与酶的基团成共价结合，则此时不能用物理方法去掉抑制剂，此类抑制可使酶永久性地失活，例如重金属离子  $Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  等对木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶的抑制都是不可逆抑制。

根据产生抑制的机理不同，可逆抑制又分为竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制和混合型抑制。

### (一) 竞争性抑制动力学

若在反应体系中存在有与底物结构相类似的物质，该物质也能在酶的活性部位上结合，从而阻碍了酶与底物的结合，使酶催化底物的反应速率下降。这种抑制称为竞争性抑制，该物质称为竞争性抑制剂。其主要特点是，抑制剂与底物竞争酶的活性部位，当抑制剂与酶的活性部位结合之后，底物就不能再与酶结合，反之亦然。在琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸为延胡索酸时，丙二酸是其竞争性抑制剂。

竞争性抑制的机理式为



式中，I 为抑制剂；[EI] 为非活性复合物。

上述反应中底物的反应速率方程应为

$$r_{SI} = k_{+2} c_{[ES]} \quad (1-19)$$

根据拟稳态假设，可列出下述方程

$$\frac{dc_{[ES]}}{dt} = k_{+1} c_E c_S - (k_{-1} + k_{+2}) c_{[ES]} = 0 \quad (1-20)$$

$$\frac{dc_{[EI]}}{dt} = k_{+3} c_E c_I - k_{-3} c_{[EI]} = 0 \quad (1-21)$$

又

$$c_{E0} = c_E + c_{[ES]} + c_{[EI]} \quad (1-22)$$

式中， $c_I$  为抑制剂浓度； $c_{[EI]}$  为非活性复合物浓度。

上述公式经整理可得式 (1-23)，即

$$r_{SI} = \frac{r_{max} c_S}{K_m \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) + c_S} = \frac{r_{max} c_S}{K_{mI} + c_S} \quad (1-23)$$

式中， $r_{SI}$  为有抑制时的反应速率， $\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ ； $K_{mI}$  为有竞争性抑制时的米氏常数， $\text{mol}/\text{L}$ ； $K_I$  为抑制剂的解离常数， $\text{mol}/\text{L}$ 。

从式 (1-23) 可以看出，竞争性抑制动力学的主要特点是米氏常数值的变化。当  $c_I$  增加，或  $K_I$  减小，都将使  $K_{mI}$  值增大，使酶与底物的结合能力下降，活性复合物减少，因而使底物反应速率下降。无抑制与竞争性抑制的反应速率与底物浓度的关系曲线如图 1-2 所示。

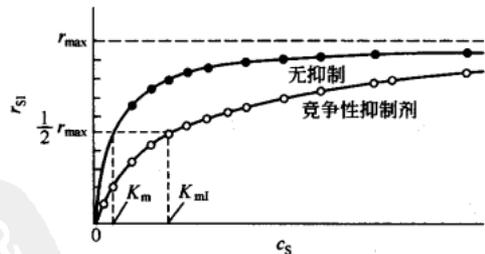


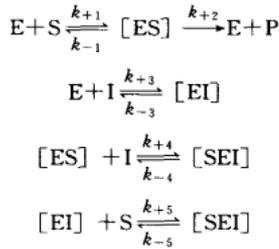
图 1-2 竞争性抑制的  $r_s$  与  $c_s$  关系

### (二) 非竞争性抑制动力学

若抑制剂可以在酶的活性部位以外与酶相结合，并且这种结合与底物的结合没有竞争关系，这种抑制称为非竞争性抑制。此时抑制剂既可与游离的酶相结合，也可以与复合物 [ES] 相结合，生成了底物-酶-抑制剂的复合物 [SEI]。绝大多数的情况是复合物 [SEI] 为一无催化活性的端点复合物，不能分解为产物，即使增大底物的浓度也不能解除抑制剂的影响。还有一种是三元复合物 [SEI] 也能分解为产物，但对酶的催化反应速率仍然产生了抑制作用。核苷对霉菌酸性磷酸酯酶的抑制属于非

竞争性抑制。

非竞争性抑制的普遍机理式可表示为



对上述机理同样存在下述关系

$$c_{E0} = c_E + c_{[ES]} + c_{[EI]} + c_{[SEI]} \quad (1-24)$$

式中,  $c_{[SEI]}$  为底物-酶-抑制剂三元复合物浓度。

$$\frac{dc_{[ES]}}{dt} = \frac{dc_{[EI]}}{dt} = \frac{dc_{[SEI]}}{dt} = 0 \quad (1-25)$$

$$r_{SI} = k_{+2}c_{[ES]} = \frac{r_{\max}c_S}{\left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right)(K_m + c_S)} = \frac{r_{1,\max}c_S}{K_m + c_S} \quad (1-26)$$

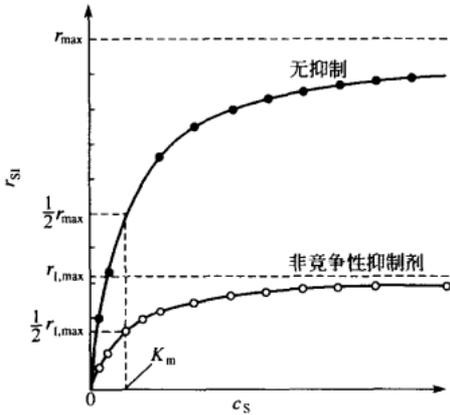


图 1-3 非竞争性抑制的  $r_{SI}$  与  $c_S$  关系

式中,  $r_{1,\max}$  为存在非竞争性抑制时的最大反应速率。

这表明, 对非竞争性抑制, 由于抑制剂的作用使最大反应速率降低了  $1 + \frac{c_I}{K_I}$ , 并且  $c_I$  增加、 $K_I$  减小都使其抑制程度增加。此时  $r_{SI}$  对  $c_S$  的关系如图 1-3 所示。

又根据

$$\frac{1}{r_{1,\max}} = \frac{1 + \frac{c_I}{K_I}}{r_{\max}} = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{1}{r_{\max}K_I}c_I \quad (1-27)$$

通过实验测得不同  $c_I$  下的  $r_{1,\max}$  值, 进而决定  $K_I$  值。

如果三元复合物  $[SEI]$  也能分解为产物,

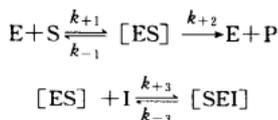
则在机理式中增加了一步:  $[SEI] \xrightarrow{k_{+6}} [EI] + P$ , 同样可整理成形式上与式 (1-26) 类似的速率方程式, 所不同的仅是  $r_{1,\max}$  所包含的参数。如何判断复合物  $[SEI]$  是否分解为产物, 可通过改变抑制剂用量并测定底物的反应速率来判断。当  $c_I$  增加到某一程度,  $r_{SI}$  减小直至趋于零, 则  $[SEI]$  不能分解为产物; 如果随着  $c_I$  的增加,  $r_{SI}$  趋近一定值, 则  $[SEI]$  能分解为产物。

非竞争性抑制与竞争性抑制的主要不同点是: 对竞争性抑制, 随着底物浓度的增大, 抑制剂的影响可减弱; 而对非竞争性抑制, 即使增大底物浓度也不能减弱抑制剂的影响。从这个意义上讲, 竞争性抑制作用是可逆的, 非竞争性抑制作用是不可逆的。

### (三) 反竞争性抑制动力学

反竞争性抑制的特点是抑制剂不能直接与游离酶相结合, 而只能与复合物  $[ES]$  相结合生成  $[SEI]$  复合物。如胍对芳香基硫酸酯酶的抑制作用就属于此类。其抑制的反应机理

可表示为下式



根据拟稳态假设和物料平衡，经整理后得到其速率方程为

$$r_{SI} = \frac{r_{\max} c_S}{K_m + c_S \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right)} \quad (1-28)$$

或 
$$r_{SI} = \frac{r_{I,\max} c_S}{K'_{mI} + c_S} \quad (1-29)$$

$$r_{I,\max} = \frac{r_{\max}}{1 + \frac{c_I}{K_I}} \quad (1-30)$$

$$K'_{mI} = \frac{K_m}{1 + \frac{c_I}{K_I}} \quad (1-31)$$

根据上述各定义式，可以推出

$$\frac{r_{I,\max}}{K'_{mI}} = \frac{r_{\max}}{K_m} \quad (1-32)$$

以  $r_{SI}$  对  $c_S$  作图，得到如图 1-4 所示曲线。

表 1-4 列出了某些酶抑制剂的解离常数。

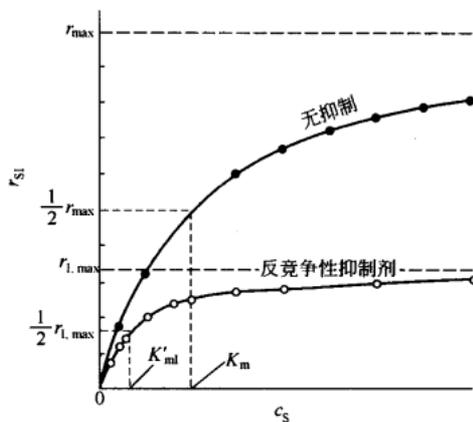


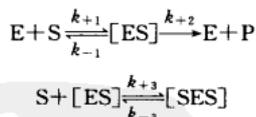
图 1-4 反竞争性抑制的  $r_{SI}$  与  $c_S$  关系

表 1-4 某些酶抑制剂的解离常数

酶	底物	抑制剂	解离常数 $K_I$ /(mmol/L)	酶	底物	抑制剂	解离常数 $K_I$ /(mmol/L)
醇脱氢酶	乙醇	乙醛	0.67	富马酸酶	富马酸盐	丙二酸盐	40.0
$\beta$ 淀粉酶	淀粉	环己淀粉	0.2	葡萄糖异构酶	D-葡萄糖	木糖醇	4.5
天冬氨酸酶	L-天冬氨酸	羟胺	30.0	乳酸脱氢酶	乳酸盐	丙酮酸盐	0.18

#### (四) 底物的抑制动力学

有些酶反应，在底物浓度增加时，反应速率反而会下降，这种由底物浓度增大而引起反应速率下降的作用称为底物抑制作用。此时的反应机理式为



式中， $[SES]$  为不具有催化反应活性，不能分解为产物的三元复合物。

应用稳态法处理，可得到底物抑制的酶反应动力学方程为

$$r_{SS} = \frac{r_{\max} c_S}{K_m + c_S + \frac{c_S^2}{K_{SI}}} \quad (1-33)$$

或 
$$r_{SS} = \frac{r_{\max}}{1 + \frac{K_m}{c_S} + \frac{c_S}{K_{SI}}} \quad (1-34)$$

式中， $r_{SS}$  为底物抑制的反应速率， $\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ ； $K_{SI}$  为底物抑制的解离常数， $\text{mol}/\text{L}$ 。

当底物抑制时， $r_{SS}$ 与 $c_S$ 的关系表示在图 1-5 中。

根据图 1-5，速率曲线有一最大值，即  $r_{S,max}$  为最大底物消耗速率。相对应的底物浓度值  $c_{S,opt}$  可通过下式求出。

$$\left. \frac{dr_{S,max}}{dc_S} \right|_{c_{S,opt}} = 0$$

$$c_{S,opt} = \sqrt{K_m K_{SI}}$$

式中， $c_{S,opt}$  为最佳底物浓度。

### (五) 各种抑制的比较

这里主要对竞争性抑制、非竞争性抑制和反竞争性抑制等三种有代表性的抑制动力学特点进行比较。表 1-5 列出了上述三种抑制时的动力学参数的表示。

表 1-5 有抑制时酶催化反应的动力学参数

抑制形式	最大速率	米氏常数
竞争性抑制	$r_{max}$	$K_m \left(1 + \frac{c_1}{K_1}\right)$
非竞争性抑制	$r_{max} / \left(1 + \frac{c_1}{K_1}\right)$	$K_m$
反竞争性抑制	$r_{max} / \left(1 + \frac{c_1}{K_1}\right)$	$K_m / \left(1 + \frac{c_1}{K_1}\right)$

若用 E-H 作图法将无抑制与上述三种抑制表示在同一图上，则如图 1-6 所示。

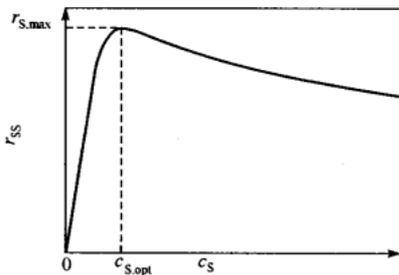


图 1-5 底物抑制的  $r_{SS}$  与  $c_S$  的关系

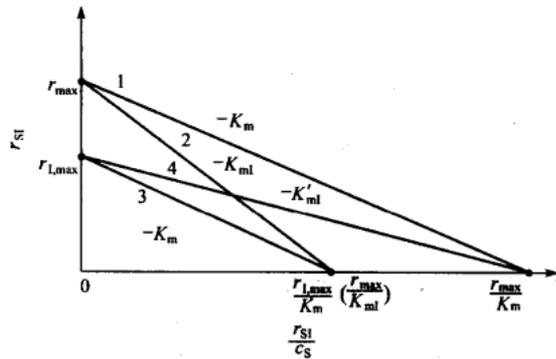


图 1-6 无抑制与三种抑制的 E-H 图

1—无抑制；2—竞争性抑制；3—非竞争性抑制；4—反竞争性抑制

根据 E-H 作图法的公式，可求得在有抑制时，其表示为

$$r_{SI} = r_{1,max} - K_{m1} \frac{r_{SI}}{c_S} \quad (1-35)$$

以  $r_{SI}$  为纵坐标， $r_{SI}/c_S$  为横坐标，得到了不同抑制时的直线与纵轴、横轴的交点与斜率，分别表述如下。

无抑制时，直线斜率为  $-K_m$ ，与纵轴交点为  $r_{max}$ ，与横轴交点为  $r_{max}/K_m$ 。

竞争性抑制，直线斜率为  $-K_m \left(1 + \frac{c_1}{K_1}\right)$ ，与纵轴交点为  $r_{max}$ ，与横轴交点

为  $\frac{r_{max}}{K_m \left(1 + \frac{c_1}{K_1}\right)}$ 。

非竞争性抑制，直线斜率为  $-K_m$ ，与纵轴交点为  $\frac{r_{\max}}{1 + \frac{c_1}{K_1}}$ ，与横轴交点为  $\frac{r_{\max}}{K_m \left(1 + \frac{c_1}{K_1}\right)}$ 。

反竞争性抑制，直线斜率为  $-\frac{K_m}{1 + \frac{c_1}{K_1}}$ ，与纵轴交点为  $\frac{r_{\max}}{1 + \frac{c_1}{K_1}}$ ，与横轴交点为  $\frac{r_{\max}}{K_m}$ 。

为了表示抑制剂对酶反应的抑制程度，可定义一抑制百分数  $i$  来表示。其定义式为

$$i = \frac{r_S - r_{SI}}{r_S} = 1 - \frac{r_{SI}}{r_S} \quad (1-36)$$

式中， $r_S$  为无抑制时的酶反应速率， $\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ ； $r_{SI}$  为有抑制时的酶反应速率， $\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ ； $i$  为抑制百分数。

根据式 (1-36) 可看出， $i$  值愈大，表示抑制的程度愈大； $i$  值愈小，抑制程度愈小。显然存在  $0 \leq i \leq 1$ 。

对竞争性抑制

$$i = 1 - \frac{r_{SI}}{r_S} = 1 - \frac{\frac{r_{\max} c_S}{K_m + c_S}}{\frac{r_{\max} c_S}{K_m \left(1 + \frac{c_S}{K_m}\right) + c_S}} \quad (1-37)$$

根据式 (1-37) 可看出，当  $c_S$  增加，抑制百分数减小，即抑制程度下降。

对非竞争性抑制，可推出

$$i = \frac{c_1}{K_1 + c_1} \quad (1-38)$$

这表示对非竞争性抑制，抑制程度与  $c_S$  的大小无关。

对反竞争性抑制，可以求出

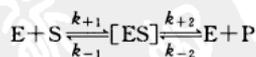
$$i = \frac{c_1}{K_1 \left(1 + \frac{K_m}{c_S}\right) + c_1} \quad (1-39)$$

这表示当  $c_S$  增加，抑制程度  $i$  反而增加。可通过上述方法来判断抑制的类型。

### 三、复杂的酶催化反应动力学

#### (一) 可逆的酶催化反应动力学

有些酶催化反应的逆反应相当明显，反应进行到一定程度即达到平衡状态。如木糖异构酶催化葡萄糖为果糖的反应。以最简单的单底物可逆的酶催化反应  $S \rightarrow P$  为例，其反应机理可表示为



若将生成 P 的反应视为正反应，其速率为

$$r_P = k_{+2} c[ES] \quad (1-40)$$

若将生成 S 的反应视为逆反应，其速率为

$$r_S = k_{-1} c[ES] \quad (1-41)$$

反应的净速率则为

$$r = r_P - r_S = (k_{+2} - k_{-1}) c[ES] \quad (1-42)$$

根据拟稳态假设和物料平衡关系，并令

$$K_{mP} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}, \quad K_{mS} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-2}}$$

$$r_{P,\max} = k_{+2}c_{E0}, \quad r_{S,\max} = k_{-2}c_{E0} \quad (1-43)$$

式中,  $K_{mP}$  为正反应米氏常数;  $K_{mS}$  为逆反应米氏常数;  $r_{P,\max}$  为正反应的最大反应速率;  $r_{S,\max}$  为逆反应的最大反应速率。

反应的净速率为

$$r = \frac{r_{P,\max}c_S - r_{S,\max}\frac{K_{mP}}{K_{mS}}c_P}{K_{mP} + c_S + \frac{K_{mP}}{K_{mS}}c_P} \quad (1-44)$$

若令

$$K_c = \frac{r_{P,\max}K_{mS}}{r_{S,\max}K_{mP}} \quad (1-45)$$

则

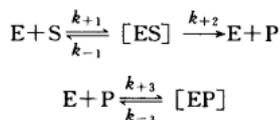
$$r = \frac{r_{P,\max}\left(c_S - \frac{c_P}{K_c}\right)}{K_{mP}\left(1 + \frac{c_P}{k_{mS}}\right) + c_S} \quad (1-46)$$

式中,  $K_c$  为反应平衡常数。

由式 (1-46) 可看出, 当存在有逆反应时, 反应的净速率下降。木糖异构酶催化葡萄糖为果糖反应的  $K_c$  值为 0.92~1.15, 得到的最终产品中葡萄糖和果糖大致各占一半, 该混合物称为果葡糖浆或异构糖, 现已实现工业化生产。

## (二) 产物抑制的酶催化反应动力学

与上述可逆反应不同, 产物抑制是指当产物与酶形成复合物 [EP] 后, 就停止继续进行反应的情况, 特别是当产物浓度较高时有可能出现这种抑制。其反应机理如下



所生成 [EP] 为无活性的端点复合物。

应用稳态法推导得出如下反应速率方程式。

$$r_S = \frac{r_{\max}c_S}{K_m\left(1 + \frac{c_P}{K_P}\right) + c_S} \quad (1-47)$$

式中,  $K_P$  为产物抑制解离常数,  $K_P = \frac{k_{-3}}{k_{+3}}$ 。

与无抑制相比较, 最大反应速率  $r_{\max}$  值不变, 米氏常数增大了  $\left(1 + \frac{c_P}{K_P}\right)$  倍, 因而使反应速率下降。

## (三) 多底物反应的酶催化反应动力学

前面讨论的都是指单底物的酶催化反应, 而实际的酶催化反应是很复杂的。对于一般的酶催化反应可用下列通式表示。



在这种情况下, 动力学方程中包含 A、B、C……及 P、Q、R……的浓度项, 因而非常复杂, 动力学参数也很多。属于这类多底物的酶有氧化酶、转移酶、连接酶等。这里仅讨论双底物酶催化反应的动力学。

对双底物酶催化反应的机理，一般认为要让两个底物同时与酶活性部位相结合形成复合物似乎不太可能，而是认为双底物酶催化反应系统中复合物的形成有三种最简单的情况，即随机机制、顺序机制和乒乓机制。

#### (四) 变构酶催化反应动力学

变构酶又称为调节酶，它是一种寡聚酶。这类酶具有变构部位和活性部位。当底物分子与这类酶结合时，能诱导酶的结构改变，增加酶与底物的结合能力，表现出底物对酶的激活效应。已知属于此类型的酶有磷酸果糖激酶、天冬氨酸转氨甲酰酶、苏氨酸脱氨酶、己糖激酶等。

变构酶的作用机理十分复杂。已提出的模型有渐变模型、同构模型等。对变构酶催化反应动力学的描述通常采用的是 Hill 方程，可表示为

$$r_s = \frac{r_{\max} c_s^n}{K_H + c_s^n} \quad (1-48)$$

式中， $n$  为 Hill 指数。

$n$  表示了每个酶分子与底物结合部位的数目，通常为 1~3.2 之间。当  $n=1$  时，Hill 方程与 M-M 方程相同。 $K_H$  为一常数，它由米氏常数  $K_m$  和所结合底物相互作用的因子组成，也可表示为  $K_m^n$ 。用 Hill 方程的对数式可估计其模型参数  $n$  和  $K_H$  值。

### 四、酶的失活动力学

酶是一种不稳定的物质，常因温度、pH 等因素的影响而产生不可逆的活性下降。一般是胞外酶较为稳定，而胞内酶在外部环境中容易失活。酶在保存和参与反应时均可能失活，前者的失活又称为稳定性。在使用时酶的失活规律对于酶催化反应过程的设计和控制都是十分重要的。其中酶的热失活，或称为热变性是最重要的一种酶失活形式，下面主要讨论此种失活的动力学。

#### (一) 未反应时酶的热失活动力学

了解未反应时酶的热稳定性关系到酶的保存。测定酶在未反应时的热稳定的方法，是在一定条件下，使酶溶液恒温保持一定的时间，然后再在最适宜的 pH 和温度下测定残存的酶活力，即残存酶活。在不同温度下反复测定，即可得到图 1-7 中所表示的一条曲线。该曲线所表示的酶失活特性，称为酶的热稳定性。若改变保温时间，则会得到不同的稳定曲线。如要了解酶在未反应时的失活速率，可将残存的酶活性对其失活时间作图，则又可得到如图 1-8 所示的曲线，该曲线称为失活曲线。这些曲线反映了酶的真正热稳定性。

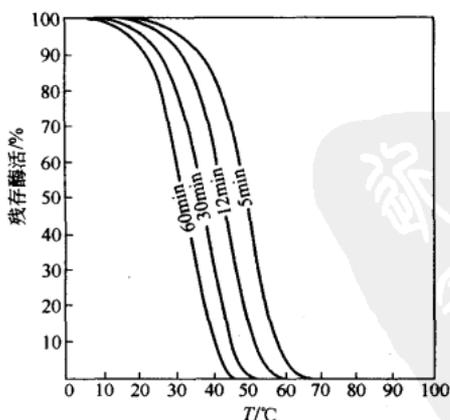


图 1-7 酶的热稳定性曲线  
(图中数字为恒温失活时间)

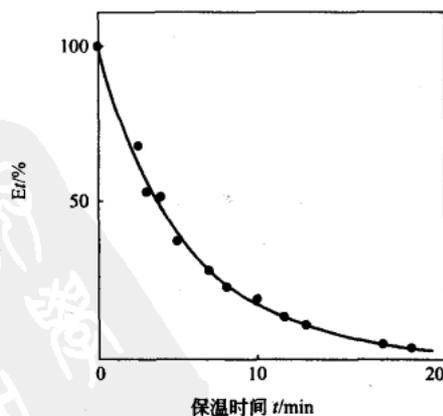


图 1-8 葡萄糖淀粉酶的失活曲线

酶的热变性失活很复杂。一般将其分为可逆失活与不可逆失活两大类，并提出了多种失活动力学模型。下面主要介绍一步失活模型与多步失活模型。

### 1. 一步失活模型

该模型又称为一级失活模型。以 E 和 D 分别表示活性酶与失活酶，则失活反应方程式可以表示为



式中， $k_d$ 、 $k_r$  为正反应、逆反应的速率常数。

时间为  $t$  时，活性酶 E 的浓度为  $c_{E_t}$ ，则活性酶的浓度随时间的净减少速率为

$$-\frac{dc_{E_t}}{dt} = k_d c_{E_t} - k_r c_D \quad (1-49)$$

系统中酶的总浓度若以  $c_{E_0}$  表示，则存在下述关系式

$$c_{E_0} = c_{E_t} + c_D \quad (1-50)$$

式中， $c_D$  为失活酶的浓度。

将式 (1-50) 代入式 (1-49) 中，并利用初始条件  $t=0$ ， $c_{E_t} = c_{E_0}$ ，解方程 (1-49)，经整理可得

$$c_{E_t} = \frac{c_{E_0}}{k_d + k_r} \{k_r + k_d \exp[-(k_d + k_r)t]\} \quad (1-51)$$

对不可逆失活反应， $k_r = 0$ ，因此

$$c_{E_t} = c_{E_0} \exp(-k_d t) \quad (1-52)$$

多数酶的热失活服从式 (1-52)。 $k_d$  可称为衰变常数、一级失活速率常数，单位为 (时间) $^{-1}$ 。 $k_d$  的倒数称为时间常数  $t_d$ 。当  $c_{E_t}$  为  $c_{E_0}$  的一半时的时间称为半衰期，用  $t_{1/2}$  表示。 $k_d$ 、 $t_d$  和  $t_{1/2}$  之间的关系可表示为

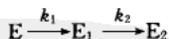
$$k_d = \frac{1}{t_d} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad (1-53)$$

### 2. 多步失活模型

多步失活模型包括同时失活模型和连串失活模型。

① 同时失活模型 假设全部酶分子可划分为若干个热稳定性不同的组分，而每个组分又均符合一级失活模型。

② 连串失活模型 该模型认为失活过程不是一步完成，而是经过中间状态失活的。最简单的情况是



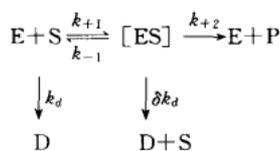
式中， $k_1$  和  $k_2$  为失活速率常数。

#### (二) 反应时酶的热失活动力学

反应时酶的稳定性将直接关系到酶的使用寿命，因而特别重要。酶在反应中的稳定性称为操作稳定性。它的测定方法有下述几种。

- ① 分批反应测定法，适合于评价在高温下短时间内酶的热失活特性。
- ② 连续反应测定法，适合于测定固定化酶的热失活特性。
- ③ 直接利用圆二色性分析来跟踪失活酶的结构变化。

在酶催化反应时，由于有底物和产物的存在，使酶的稳定性得到了加强或减弱。对于底物浓度的变化对酶稳定性的影响，提出了下述模型。



## 第四节 酶学研究的新进展

### 一、酶与生物催化剂

通常的酶即指具有催化活性的蛋白质，但随着生物技术的发展，人们发现了许多具有催化活性的非蛋白质物质，如核酶、抗体酶、模拟酶、人工酶、探针酶、杂交酶、克隆酶和突变酶等。核糖酶即酶性 RNA (ribozyme)，有自我剪接核糖酶、自我剪切核糖酶、反应核糖酶；脱氧核糖酶即酶性 DNA (deoxyribozyme)；抗体酶即通过诱导法、引入法、拷贝法制备的进行酯、羧酸、酰胺键的水解与合成、光诱导裂解与聚合等的催化反应性抗体；模拟酶即有类似酶活性的简单配合物、酶活性中心模拟（环糊精、卟啉等）、整体模拟的稳定的简单分子；人工酶指人工合成的具催化活性的蛋白质或多肽（如溶菌酶）；生物工程酶即指基因工程酶、突变酶、设计合成的新酶等。工业生物催化剂又叫工业酶，即指具有催化功能的生物物质。

表 1-6 可以看出生物催化剂能高效和高选择性地催化生化反应，并在一些化学合成领域有着传统的催化剂不可比拟的优势。生物催化技术极大地促进了生产力的发展，它既是一种可以持续发展的技术，又是一种环境友好技术。社会对新技术、新产品的需求，如医药产品（尤其是生产手性药物）、医疗诊断仪器设备、新兴生活用品、低脂肪食品等，也要求生物催化技术更快更好地发展。随着公众环保意识、健康意识的加强，人们在商品取向上也会更倾向使用生物制品和新型环保产品。现在许多国家正致力于酶工程的研究，逐步实现酶的工业化应用，生物技术与医药、农业结合极大地推动了这两个领域的发展。

表 1-6 生物催化过程和化学催化过程的特点

项 目	生物催化过程	化学催化过程
催化底物	大分子量复杂化合物	纯净物、简单的化合物
反应模式	多种催化剂同时催化多种偶合在一起的反应或单一酶催化	催化剂催化单一化学反应
适用范围	催化温和条件下反应	可在苛刻的条件下实现催化
本质	降低反应所需的活化能	
动力学	可以用活化配合物理论来解释	

历经 20 多年的发展，酶的工业应用已取得了令人瞩目的成就。采用高效、高选择的酶作为工业催化剂，开发环境友好的工艺来生产医药化工产品、精细化工产品、传统化工产品等也逐步地发展起来，并在有些领域替代了传统的工艺。

根据生物催化剂的制备和生物催化反应的关系，工业生物催化过程可分为两类：催化过程和菌体生长耦联型，催化过程和菌体生长非耦联型。

随着科研工作的进一步开展，以及各方面的努力，工业生物催化将在 21 世纪得到迅速的发展，预期在 20 年内，工业生物催化研究将有望实现以下突破。

- ① 在与生物生长代谢相关的有机化学品生产上，取代化学法成为主流生产工艺。
- ② 开发出利用生物法生产的安全、环保、节能新产品，引导消费取向和潮流。

③ 降低化学工业的原料消耗、水资源消耗、能量消耗 30%，减少污染物的排放和污染扩散 30%。

④ 对于生物催化剂体系，可以达到：研制出可以比现在应用的化学催化剂更好、更快，价格更低廉的生物催化剂；提高生物催化剂的稳定性、活性和对溶剂的兼容能力；提高酶以及固定化细胞的机械强度；对于转换时间比较长的酶，提高其转化的速率，使之可以和现在的化学催化剂相比。

⑤ 尽管生物催化技术的前景非常广阔，但它的发展还受到现有生物技术发展水平和研究水平的制约。目前已经定性的商品酶有 200 种左右，而工业上应用的酶仅有 50 多种，至于大量工业生产的酶只有 10 多种，这说明酶工程有着广阔的发展前景，需要加强基础研究。

工业生物催化已经崭露头角，一方面，一些工业生物催化的典型产品和工艺已经得到推广应用；另一方面，世界知名化工公司 Dupont、BASF、DSM、Lonza 等，都已经致力于工业生物催化的研究，并在一些脂类化合物、医药中间体、DL-氨基酸等方面实现了工业规模生产。生物技术是一种没有污染、清洁的技术，是一种使用新原料、新能源的技术。它的高速发展，将带来技术上的创新，也将推动生产力的高速发展。工业生物催化技术的应用，将对生命科学研究产业化提供有力的例证，并将会对生物技术的大规模应用打下更为坚实的基础，实现环境友好的、清洁的、可再生的生产。生物催化技术的发展也将会带来丰厚的经济效益。并通过高生物的兼容性、手性产品等新材料、新产品的开发和广泛应用，逐渐改变现有高能耗、高污染的生产结构和消费结构。

正如 20 世纪中期石油化工的飞速发展改变了人们的生产、生活方式一样，生物催化的广泛应用，将会给人们提供性能更佳的材料和能源。以可再生的生物原料为基础的生物生产过程，将逐步取代化石原料生产过程，成为 21 世纪化工生产的主体，从而实现绿色化工、绿色生产的目标。

## 二、非水相中的生物催化

20 世纪 80 年代中期 Klibanov 等人开创性的研究表明，许多酶在非水相中不仅不失活，而且在某些情况下其活力与水相中相当，从而奠定了非水相酶学的基础。一些酶在不同的溶剂中催化活力、选择性有较大的变化。这是因为在非水介质中，酶的空间结构会发生一定的变化，而且酶与底物之间成键自由能也会发生变化。这就会使一些本来在水中不能和不容易进行的反应可以在有机相中较容易发生。

在酶催化合成的体系中，选择不同的反应介质，可以影响聚合反应中生成的聚合物的分子量、聚合度分布、产量和构造。非水相酶促反应对一些传统化学催化困难的过程具有重要的意义，另外，通过改变溶剂和相条件，可以得到不同空间结构和光学特性的聚合物。

例如，在含有 0.3mol/L 丁酸和 0.3mol/L 庚醇的己烷中，可以进行脂肪酶催化的酯化反应，2h 后，酯化率达 90% 以上，如果在水中进行酯化反应，酯化率在 0.1% 以下。又如非水相和多相体系中酶催化聚合反应不同的相，得到不同结构的产物：辣根过氧化物酶 (HRP) 在非水相中合成芳烃聚合物，在不同的聚合介质中，这一过程将得到不同的结构和性质的聚合分子。

非水相酶的典型应用是酶促氨解反应。酶促氨解反应是 20 世纪 90 年代中期发现的一种新型反应，在脂肪酸酰胺的合成、手性药物（手性酸及手性醇等）的拆分中显示出巨大的应用潜力。例如，油酰胺已被确认为是脑脊髓液的一种天然成分，可诱导鼠的生理睡眠，因此有望被开发成一种天然镇静剂。用假丝酵母 (*Candida antarctica*) 脂肪酶催化甘油三酯

的胺解反应，60℃反应 72h，油酰胺的产率可达 90%。

利用辣根过氧化酶（HRP）在非水相中合成芳烃聚合物是研究得比较广泛的一个过程。研究表明，在不同的介质中反应，这一过程将得到不同的结构和性质的聚合分子（图 1-9）。在单一和两相溶剂体系中，以 HRP 为催化剂，得到的芳烃的聚合物不具有特定的几何形状、顺序和方向。但是，上述过程在反胶团体系中进行时，则可以得到微球颗粒，这种微球状的聚合物颗粒，其粒径分布单一，大小依赖于水和表面活性剂的比例，一般为微米级或者更低，这种微球可以用于酶、药物等的包封，也可作为半导体材料使用。如果催化过程在水和空气的界面上进行，例如在朗缪尔（Langmuir）槽中进行，则可以获得二维的单层网状膜结构，这种网状结构的膜材料可以直接使用，而无须溶剂化。

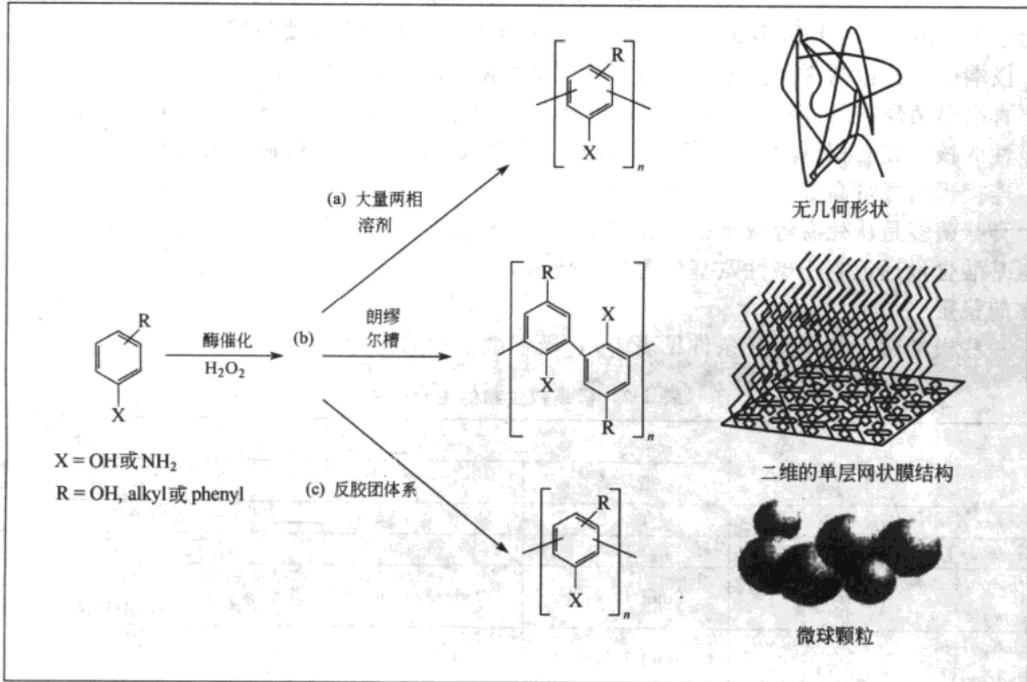


图 1-9 非水相和多相体系中酶催化聚合反应

对脂肪酶的一些研究，反应溶剂不仅影响反应速率，而且也影响产物的光学异构性。SvirKin 等利用脂肪酶催化开环聚合外消旋甲基丙内酯，得到了具有光学活性 S 富集的甲基丙内酯聚合物。他们研究了不同有机溶剂的影响，在甲苯和庚烷中的聚合速率，明显地大于其在二氧杂环己烷中的聚合速率，而在甲苯和二氧杂环己烷中可以获得较高的光学异构比，从这两方面看，甲苯是首选的溶剂。

尽管非水相体系有诸多优点，但是酶在有机相中由于分子间键能的变化，容易发生结构重排而降解失活。为了提高酶活和使用寿命，可以采用化学修饰、表面改性、固定化等多种方法。

### 三、极端微生物研究进展

极端微生物（extremophiles）是依赖于一种或多种极端物化因子的极端生命形式，生存在 100℃ 以上或 0℃ 以下、近饱和的盐度、pH > 10 或 pH < 2 等极端环境下，是极端的生命世界，已发现的极端生命形式包括嗜热菌（thermophiles）、嗜冷菌（psychrophiles）、嗜碱

菌 (alkaliphiles)、嗜酸菌 (acidophiles)、嗜盐菌 (halophiles)、嗜压菌 (barophiles) 等, 它们构成了地球生命形式的独特风景线, 其存在的原理与意义为更好地认知生命现象、发展生物技术提供了宝贵的知识源泉。极端微生物的研究将有助于揭示生命起源、生命极限、生命本质甚至其他生命形式等生命科学的悬念。极端微生物的利用更是突破当前生物技术领域中的一些局限, 建立新的生物技术手段, 提高生物技术能力的重要途径。极端微生物具有独特的代谢途径、特殊的基因类型, 其细胞及活性物质可在苛刻条件下行使功能, 达到一般生物技术难以达到的目的。极端微生物功能与新产品的开发应用, 将创造全新的生物技术生产体系, 获得全新的生物技术产品, 建立新的生物技术工艺。极端微生物的开发不仅可创造新的产业, 实现自然资源的高附加值开发, 提高产业竞争力, 并对提高人类生活质量、促进农业发展、“绿化”化学工业、整治环境、保持生态平衡、产生新能源具有重要作用。极端微生物技术 (extremophilic biotechnology) 正逐步成为生物技术重要发展方向之一。

极端微生物包括喜高温菌、喜低温菌、喜盐菌、耐 pH 菌。

喜高温菌现在已经筛选出 30 多属 70 多种; 菌体在很多方面表现出共价特性: 具有高度非极性的核, 表面积/体积的比值小, 甘氨酸含量低, DNA 高度螺旋, 链接单元——组织蛋白、连接蛋白含量高。

喜盐菌多是从死海等咸水湖中分离出来; 一些盐杆菌的细胞浆液中积累  $K^+$ , 菌体中酸性氨基酸含量远远高于碱性氨基酸含量, 高阳离子浓度使得负离子远离蛋白质表面, 有利于菌体的稳定。

一些极端微生物的生长条件见表 1-7, 极端微生物的应用见表 1-8。

表 1-7 极端微生物的生长条件

种 属	生 长 条 件		
	最 低	最 佳	最 高
<i>Aquifex pyrophilus</i>	67℃	85℃	95℃
<i>Pyrolobus fumarii</i>	90℃	106℃	113℃
<i>Actinopolyspora halophila</i>	2mol/L NaCl	2.6~3.4 mol/L NaCl	饱和 5.2mol/L NaCl
<i>Halobacterium salinarum</i>	3mol/L NaCl	4~5mol/L NaCl	饱和 5.2mol/L NaCl

表 1-8 极端微生物的应用

极端微生物	应 用 领 域
喜高温菌	利用菌体发酵; 为基因工程菌提供特异性基因; 高热稳定性淀粉酶、蛋白酶、木糖酶
喜低温菌	乳制品工业中蛋白酶的应用以及洗涤剂生产中淀粉酶和酯酶的应用
喜盐菌	如生产胞外核酸酶、胞外淀粉酶、胞外木糖酶等; 可用来除去工业废水中的磷酸盐, 开发盐碱地, 开发能源
喜酸菌	冶金提取矿物; 煤和石油脱硫; 生产肥料, 改良土壤
喜碱菌	用耐碱蛋白酶和碱性纤维素酶做洗涤剂的添加成分; 将碱性淀粉酶用于纺织品退浆及淀粉做黏结剂时的黏度调节剂

来自极端微生物的极端酶 (extremozymes), 可在苛刻条件下行使功能, 将极大地拓展酶的应用空间, 并是建立高效率、低成本生物技术加工过程的新基础, PCR 技术中的高温 Taq DNA 聚合酶、洗涤剂中的碱性酶等都具代表意义。美国科学家 W. W. Adams 预言, 极端酶的应用将改变整个生物催化剂的面貌。

微生物代谢产物的产生受环境条件的调节。极端微生物已经适应了各种各样的极端环

境,因而提供了一个特有的遗传信息来源,从中发掘新型产物极具潜力。由于在低盐条件下其细胞自溶的特点,用极端嗜盐菌生产对羟基苯甲醛(PHB)、核苷酸,将大大简化后处理工艺,降低生产成本,开发出一批有价值和有市场竞争力的生物工程产品。

油田的油层多为极端环境(高温、高压、高盐、厌氧),一般微生物难以发挥作用,极端微生物在采油中的应用,将会给采油技术带来一场革命。在含硫的低品位矿床中,硫杆菌可产生大量硫酸,使pH降得很低,溶出很多重金属。对这类极端嗜酸菌特别是嗜酸嗜热菌的深入研究,已使湿法冶金工艺实现了工业化。

一般污染环境中,盐碱度高、毒物浓度高、环境温度低,普通的生物技术治理难有作为,而极端微生物可在高盐碱、低温条件下行使最佳功能,在环境整治中将大有作为。同时,极端微生物的应用可使造纸工艺、有机化学合成等过程的生物技术改造。

极端微生物具有多样的代谢类型,通过对代谢途径的认识与改造,极端微生物可过量积累有机酸、氨基酸等,实现超级生产。嗜热微生物可实现酒精的真正高温发酵,实现酒精在发酵过程中的分离蒸馏,引发酒精生产工艺的划时代变革。农产品加工中,一般生物过程无法实现对纤维素、半纤维素的有效转化。在极端条件下行使功能的极端微生物及其极端酶可在高温、酸、碱等条件下对秸秆、废渣等进行处理,为解决资源的有效转化利用提供新途径。

由于极端微生物的科学价值及应用价值,极端微生物的研究与应用已经受到广泛关注,并被认为是取得现代生物技术优势的重要途径。

美国近年来非常注重极端微生物的研究,不仅在基础研究方面开展了系统的工作,在极端微生物的生物技术利用方面已经开始实用化,高温DNA聚合酶、碱性酶及极端采油菌已在产业上产生了重要影响,为推动整个生物技术领域的发展、协调环境与可持续发展等方面做出了重要贡献。在基因芯片、新材料、新药等方面,对极端微生物的作用也有很高的期望。

欧洲是开展极端微生物研究较早的地区,英国、德国、西班牙等工作突出。他们主要研究极端微生物生命机理的分子基础及新酶、新产物的开发。欧盟于1997年启动耗资1200万美元的计划——“极端细胞工厂(extremophiles as cell factory)”,探索极端微生物在不同工业中的可能用途,已于1999年11月结束。作为欧盟的整体策略,极端微生物项目的目的是“利用生物技术改造现在的化学工业过程”,项目协调人Antrinikan教授认为,极端微生物工业的时代已经到来。在2000年启动的欧盟第五框架计划中,极端细胞工厂仍是重要的内容。

日本对极端微生物研究起始于1968年,K.Horikoshi教授有极端微生物研究之父之称,正是他的工作使人们认识到了极端微生物的价值。他们开发了大量的嗜碱菌及其碱性酶,获得了20多种碱性酶的专利,碱性纤维素酶、环糊精酶、蛋白酶等都在工业中得到了实际应用。在他的领导下,1991年开始实施了著名的深海之星(deep-star)计划,耗资50亿日元进行为期5年深海极端微生物的研究,现在每年仍维持300万美元的资助,从深海中获得了1000多株嗜压、嗜冷、嗜热、嗜碱及耐有机溶剂的多类型的极端微生物,最引人注目的是耐有机溶剂菌,可耐受的溶剂含量可达50%。这些极端微生物在新酶、新药开发及环境整治等方面的应用潜力极大。

极端微生物在商业上应用的巨大潜力已吸引了许多生物技术公司的关注。1997年Genecor公司推出了碱性纤维素酶103作为洗涤剂的添加剂。美国Diversa公司自1994年底成立以来,已获得340多种新型极端克隆酶,这些酶具有在某些极端条件下(高温、低温、极端pH、高盐、有机溶剂等)稳定的特性,因而可以满足某些工业应用的特殊需要。

由于极端微生物生理上的特殊性，其筛选、保藏、培养等过程都需要开发和采用新的方法和技术，人们对极端微生物的生理、代谢的物质基础以及遗传背景了解还不多，所能利用的基础与手段还有限，极端生物技术的发展仍要有强有力的推动。从历史上看，极端微生物研究兴起于 20 世纪 60 年代，主要是极端环境微生物生态、新菌种的分离鉴定、理化特性及酶的筛选应用，代表人物是 Larsen、Kushner、Horikoshi、Truper 等。90 年代后期，极端微生物的研究蓬勃发展，*extremophiles* 一词被广泛使用，对极端微生物的系统分类、生态、生理、生化、遗传以及生物技术利用开展了系统的研究，研究的主要类群包括温度相关的低温菌、高温菌，盐度相关的嗜盐菌，pH 相关的嗜碱菌、嗜酸菌，压力相关的嗜压菌，以及有机溶剂、辐射等因素相关的其他极端菌。

温度是与包括人类在内的生命活动关系密切的物理因子，对极端温度条件下的极端微生物的研究也非常活跃，至今被描述的嗜热菌已有 20 多个属，包括古菌及细菌，细胞最适生长温度的上限已到 113℃，在系统进化、蛋白质结构与功能及热稳定酶的应用等方面的贡献突出，目前，普遍接受的观点是地球生命的祖先是嗜热类群，尽管已有嗜冷古菌的报道。当今人们期望嗜热菌在生命进化过程、生命物质温度极限及原理、生物技术新工艺新材料等方面提供知识与资源。嗜冷菌的研究远不如嗜热菌那样广泛，主要成就来自南极及深海微生物的研究，尽管在生命低温极限、冷适应机制等方面有相当的诱惑，但人们似乎更期望嗜冷菌在生物技术利用方面闯出新路。

盐、碱是另一大类化学因子，嗜盐菌、嗜碱菌的研究较多，在系统分类上，嗜盐菌、嗜碱菌分散到了各个分类类群，极大丰富了微生物多样性，仅嗜盐古菌已有 9 个属。在区系生态方面，死海、非洲盐碱湖的研究当属典型，不仅获得了大量资源，在环境演化、气候变迁分析中提供了大量生物学知识。嗜盐菌的生理、生化及遗传是极端微生物学科中的传统内容，至今最令人们困惑的是如何在 4mol/L 盐浓度中进行翻译中 RNA 与蛋白质的接触。由于嗜盐菌的产物不易在普通受体系统中表达活性，嗜盐菌的遗传系统也是人们热心的内容，对极端嗜盐菌 *Haloferax*、*Halobacterium* spp.，中度嗜盐菌 *Halomonas*、*Chromohalobacter* 已成功地进行了研究工作。嗜盐菌的应用潜力表现在相似性溶质、酶、多聚物、脂质体、医药以及环境整治等方面。

嗜碱菌虽然有大量的报道，但“遗留问题”多。开始人们关心的是其碱性酶的应用，后来意识到其膜运输机制、呼吸链的特殊性，对已被广泛接收的 Mitchell 化学渗透理论等提出了挑战，而至今所知甚少，对嗜碱菌的生理学知识仅建立在兼性嗜碱芽孢杆菌 OF4 及 C125 研究的基础上，该领域的权威 Krulwich 教授认为，嗜碱菌真正的生理机制还是个谜。随着一些新物种的发现，嗜碱菌的生物多样性又成为一个新的生长点。极端微生物蛋白质结构与功能的研究，对热、冷、盐等已有一些研究工作，而 pH 与生物大分子行为的关系还没有任何线索。嗜热菌、嗜冷菌的酶大多可在 *E. coli* 受体中表达，而嗜盐菌、嗜碱菌就不那么幸运，许多嗜碱菌的蛋白质不能在普通受体中表达或正确折叠，对嗜碱菌的受体系统还没有研究。另外，嗜碱菌及其酶在生物造纸、食品、医药、环境整治及其他化学工业中的应用潜力极大，商业期望值最高。

许多嗜酸菌、嗜压菌具有嗜热或嗜冷的特性，关于嗜酸、嗜压特性的研究常被嗜热菌、嗜冷菌的研究所掩盖，实际上了解不多，而其价值与潜力已被人们所注意。

已被研究的其他极端微生物类群，包括寡营养菌、高渗菌、毒物耐受菌、高辐射菌、深海深地高压菌等，同时人们也在寻找其他更奇怪的类群，并向空间及其他星系发展。

随着极端微生物研究的升温，极端微生物多样性、生态、生理、生化、遗传与利用的研究，必将有越来越丰富的内容，基因组学及后基因组的发展，将极大地推动极端微生物的研

究。在极端微生物生物技术利用方面，除了在基因芯片、新材料、新药等方面努力之外，利用生物技术改造化学工业过程以及环境的生物整治，将是人们关注的热点。

#### 四、分子定向进化

酶的改进方法中两个方法值得注意，即合理设计与定向进化。在合理设计中，基于对蛋白质结构、功能和机制的详细了解，可以预先思考出氨基酸序列精确的改变，然后通过定点突变的方法引入这些改变；其优点是能够优化所需的性质以及极大地提高对于酶的结合与催化机制的认识。在已经成功的合理设计的例子中，通过单个的氨基酸的替换或者是二级结构设计产生了具有所需性质的酶。然而，由于对于提高所需的酶性质的内在机制不够完全了解等原因，更多的实验都是失败的。而定向进化不需要关于酶结构与功能关系的知识，这种技术采用一种随机的过程产生一个巨大的变异基因库，然后通过基因选择或者高产量的筛选方法确定出具有性质改善的变异型，它在某种程度上仿真了自然进化的过程。

总之合理设计是自上而下的方法，而定向进化是自下而上的方法，二者的比较如表1-9。通过表 1-9 可以看到在目前对于蛋白质结构知识尚不足，尤其对二级结构了解较少的情况下，合理设计有相当的困难；相比之下，定向进化虽然在选择方案的制定方面略显麻烦，但还是有许多优点的。

表 1-9 合理设计与定向进化的比较

项 目	合 理 设 计	定 向 进 化
蛋白质结构的知识	需要	不需要
对于机理的了解	需要	不需要
点突变倾向	没有	偏向转变
二级结构设计	可实行	不可实行
功能区设计	可实行	不可实行
灵敏的酶的检定	需要	不需要
选择方案	不需要	需要

定向进化技术的应用在改进酶制剂方面取得了令人瞩目的成就。K. Miyazaki、P. L. Wintrode 对喜寒菌的枯草杆菌蛋白酶进行 3 轮的定向进化，得到菌株 3-2G7，它的蛋白酶在 60℃ 的稳定性比野生型菌体中的提高了 500 倍，甚至超过同源的喜高温菌的枯草杆菌的蛋白酶。Wintrode、L. Patrick 等从菌株 3-2G7 出发，再经过 5 轮的定向进化，使得稳定性提高到原野生型的 1200 倍，而且比同源的喜高温菌高 20 倍。

H. Joo、Z. Lin 等对 *Pseudomonas putida* 的 P450 酶进行了定向进化，得到了一个突变株，它可以在缺少电子供体辅助因子的条件下使萘羟基化，比原始酶的活性提高了 20 倍。并且此突变株还可以表达辣根过氧化酶，能把 P450 酶转化的产物转变成可发荧光的物质，从而实现了筛选最佳突变株。

#### 参 考 文 献

- 1 陈石根，周润琦编. 酶学 M. 上海：复旦大学出版社，2001
- 2 郭勇主编. 酶工程 M. 北京：中国轻工业出版社，1994
- 3 徐凤彩主编. 酶工程 M. 北京：中国农业出版社，2001
- 4 贾士儒. 生物反应工程原理. 北京：科学出版社，2003
- 5 戚以政，夏杰. 生物反应工程. 北京：化学工业出版社，2004
- 6 刘仲敏，林兴兵，杨生玉主编. 现代应用生物技术. 北京：化学工业出版社，2004

## 第二章 酶 技 术

传统意义上的酶技术包括酶、酶催化动力学、固定化酶与固定化细胞、酶蛋白的化学修饰、酶的稳定性、酶的催化体系、酶制剂的应用等理论和知识。现代酶技术主要包括定向酶催化、酶选择性的增加以及在大规模生物反应条件下酶稳定性等内容。近年来酶技术的研究热点包括酶分子的定向进化、人工模拟酶、非水介质酶学及其酶催化。

### 第一节 酶技术的相关概念

#### 一、酶学及酶技术

酶技术是一个重要的研究领域，它对工业过程中酶的应用有重要影响。酶技术主要通过改进生化过程中酶的应用方式对生物工程产生影响。酶的拆分和在有机溶剂中的应用是酶技术的重要部分，可为石化工业的可持续发展带来新的曙光。

生物技术中酶工程的研究领域已从工业生物催化剂的改进发展到工业酶的实际应用。在这个原则下，开展酶技术的研究，对于工业过程中酶的应用有重要作用。酶技术的内容涉及许多方面，如定向酶催化、增加酶的选择性以及在大规模合成反应条件下使酶更加稳定等。酶技术完善了酶工程，确定了酶在分子水平的性质。

酶在催化过程的成功应用要求酶具有功能稳定性和特殊的选择性。这些酶可以从天然植物、动物组织中分离或通过微生物培养获得。为了得到这些酶，必须把筛选条件和实际应用结合起来。因此，当研究一种新酶的性质时，有必要对酶技术的改进和工业化生产等方面进行考虑。同时，改变酶性质时不能影响其热力学稳定性；进行酶的定向催化时，应从酶技术出发选择溶剂。

#### 二、酶技术发展概况

酶作为生物催化剂，是生物技术通向产业化的重要组成部分，它广泛应用于轻工、化工、医药卫生、食品、环保等行业，酶制剂生产已成为 21 世纪的新兴产业之一。中国从 20 世纪 60 年代开始注意酶工程的研究和酶制剂的开发。近年来，国际上酶制剂行业发展迅速，这与广泛采用基因工程、蛋白质工程及其他新技术有关。国内酶制剂工业的现状是投入少，缺乏核心技术，产品结构不合理，品种单一，工艺技术与装备水平落后，绝大多数工厂沿用硫酸铵（硫酸钠）盐析工艺或发酵液直接喷雾干燥工艺，影响了产品质量的提高。因此，加快产品结构调整，努力提高产品质量，已成为酶制剂行业发展在实践中应解决的技术关键。

### 第二节 酶分子的定向进化

#### 一、酶分子定向进化概述

酶分子的定向进化，简单地讲就是在实验室试管中模拟达尔文的生物进化过程，让目标蛋白质分子在事先设计的道路上快速“进化”，从而产生具备多种有用特性的蛋白质分子。

例如，在酶的稳定性大大提高的同时又能对新底物产生催化作用或者可在极端条件下实现催化反应。定向进化既有能力定制个体蛋白质，也可为生物技术过程设计完全的生物合成及生物降解途径。利用定向进化手段可以获得自然进化无法得到的功能酶。

通过研究蛋白质的进化历史可知，酶在进化学范畴中是一群具有高度“适者生存”的活性分子。通过研究酶群的分子概貌便知，目前催化不同生化反应的酶类均由同一远古蛋白质经过长期进化而成，它们具有几乎相同的基本结构，在漫长的自然选择、随机突变过程中逐渐获得不同的催化能力。人们还发现，一些酶类在一个代谢途径中承担着同一功能，如都催化某一特定步骤，但决定蛋白质的不同性质如稳定性、可溶性和对 pH 值的耐受性等三维结构的因素则取决于蛋白质所处的环境。实际上，酶是在分子水平上进行着进化和适应的功能，如底物特异性、热稳定性可以改变。尽管蛋白质的基础结构是保守的，但是这种基础结构本身可被改组而产生新的多功能蛋白质。事实证明，进化是改变酶功能特别是控制酶性质的有力工具，可用在实验室进行定向设计蛋白质，关键是如何将漫长的进化时间缩短到几星期甚至几个月。

### 1. 理论来源

19 世纪科学家们宣扬的“存在即合理”的思想，在一定程度上反映了生命科学的研究状况，近代生物学家们的目光总是在自然界中不断地发掘生命物质。酶学研究也是这样，不断地发现新的酶，并对其结构与性质加以表征。虽然也有不少的酶学研究者尝试对天然酶分子进行改造，或创造一种非天然的反应环境，希望获得比天然酶更高的活力或不同的催化活性的酶，但是，当时所有的工作结果都在不同程度上验证了“存在即合理”的思想。

随着电子科学技术的迅猛发展及计算机的广泛应用，人们对生命体系有了更加深入的认识，酶学研究也跨入了新的阶段。基因工程的出现与发展，被首先用于酶学领域的研究。睿智的研究者看到利用基因工程的原理，可以在实验室中模拟几十亿年来发生在自然界中漫长的进化过程，这种思想很快得到了实验的支持，并由此建立了酶分子的定向进化方法，用于构建新的非天然酶或改造天然酶分子。

### 2. 基本原理

近几十年来，对酶分子的改造工作主要着眼于两个方面：一是基于序列的合理化设计方案 (sequential rational design)，如化学修饰、定点突变 (site-directed mutagenesis) 等；二是利用基因的可操作性，通过模拟自然界的演化进程进行非合理设计方案 (irrational design)，如定向进化 (directed evolution)、杂合进化 (hybrid evolution) 等。

对酶分子的研究可以分为认识和改造两个方面，前者是利用各种生物化学、晶体学、光谱学等方法对天然酶或其修饰物进行研究，获得酶分子特征、空间结构、结构和功能之间的关系以及氨基酸残基功能等方面的信息，并以此为依据对酶分子进行改造，称为酶分子的合理设计；与此相对应，不需要准确的酶分子结构信息，而通过随机突变、基因重组、定向筛选等方法对其进行改造，则称为酶分子的非合理设计。非合理设计的实用性较强，可以随机产生突变来改变酶的特性。对酶分子的设计与改造方法，是基于基因工程、蛋白质工程和计算机技术互补发展和渗透的结果，它标志着人类可以按照自己的意愿和需要来改造酶分子，甚至设计出自然界中原来并不存在的全新的酶分子。目前，在酶分子人为改造还不成熟的情况下，通过定点突变技术改造了大量的酶分子，获得了比天然酶活力更高、稳定性更好的工业用酶。但总体来说，人们的能力并未达到对复杂的生物体系进行有效的人为改造的水平。近年来，易错 PCR、DNA 重组和高突变菌株等技术的应用，在对目的基因表型有高效检测筛选系统的条件下，建立了酶分子的定向进化策略，虽然不清楚酶分子的结构，仍能获得具

有预期特性的新酶，基本上实现了酶分子的人为快速进化。

酶分子的定向进化 (directed evolution) 属于蛋白质的非合理设计，它不需要事先了解酶的空间结构和催化机制，人为地创造特殊的进化条件，模拟自然进化机制 (随机突变、基因重组和自然选择)，在体外改造酶基因并定向选择 (或筛选) 出所需性质的突变酶。

### 3. 发展方向

酶催化的精确性和有效性并不能满足工业化要求，天然酶通常缺乏有商业价值的催化功能及其他性质。因此，对天然酶分子水平上的改造显得十分重要。天然酶在自然条件下已经进化了千百万年，但酶分子仍然蕴藏着巨大的进化潜力，这是酶体外定向进化的基本条件。酶分子存在进化潜力的主要原因如下。

① 天然酶在生物体内存在的环境与酶的实际应用环境不同。例如，把枯草芽孢杆菌蛋白酶 E 应用于非水相 (二甲基甲酰胺, DMF) 中来催化合成反应，自然生理条件下进化得到比较完善的枯草芽孢杆菌蛋白酶 E，由于其没有接触过非水环境，因此，其活力和稳定性不适合在有机相中完成催化反应，这就为该酶在新的筛选条件下 (有机相中) 提供了适合该条件的进化空间。

② 实际应用中，总是期待酶的活力和稳定性越高越好，这样可以加快反应速度、提高酶的利用率、降低反应成本，但在生物体内更重要的是各种生物分子之间的协同作用，作为一个整体去适应环境。生物对环境适应的进化主要不是表现为某个酶分子的活力和稳定性的不断提高，而在于整体的适应能力和调控能力的增强。在自然选择的筛选压力下，更主要是这个系统中的瓶颈部分的进化。对于某个酶分子来说，其活力可以受调节部位的调节，含量可以受基因表达的调控，而酶活力和稳定性已经超过了满足整个体系在环境中的生存需要时，就失去了进化的筛选压力。因而，进化的机会很有限，这也为体外定向进化留下了很大空间。如超氧化物歧化酶 (SOD) 在体内的活力已经足以完成歧化生命体系产生的超氧离子，在自然氧压下，体外进化基本不会取得进展。

③ 某些酶或蛋白质待进化的性质不是其在生物体内所涉及，如对蛋白质药物进行改造来消除其副作用，这部分性质的改善有很大的进化潜力。酶分子定向进化是从一个或多个已经存在的酶出发，经过基因突变和重组，构建一个人工突变酶库，通过筛选最终获得期望的具有某些特性的进化酶。以对单一酶分子基因进行定向进化可说明酶分子定向进化的基本实验路线。在待进化酶基因的 PCR 扩增反应中，利用 Taq DNA 聚合酶不具有校对功能，并控制突变库的大小使其与特定的筛选容量相适合，选择适当条件，以较低的比率向目的基因中随机引入突变。进行正向突变间的随机组合以构建突变酶库，凭借定向选择 (或筛选) 方法，选出所需性质的优化酶，从而排除其他突变体 (见图 2-1)。简言之，定向进化 = 随机突变 + 正向重组 + 选择 (或筛选)。

## 二、酶分子定向进化的历史

理论上，蛋白质分子蕴藏着很大的进化潜力，许多功能有待于开发，这是酶体外定向进化的先决条件。所谓酶的体外定向进化 (directed evolution of enzyme in vitro)，又称实验分子进化 (experimentally molecular evolution)，属于蛋白质的非合理设计 (irrational design)，它不需要事先了解酶的空间结构和催化机制，通过人为地创造特殊条件，模拟自然进化机制 (随机突变、重组和自然选择)，在体外改造酶基因，并定向选择所需性质的突变酶。酶的体外定向进化技术极大地拓展了蛋白质工程学的研究和应用范围，特别是能够解决合理设计所不能解决的问题，为酶结构与功能的研究开辟了崭新的途径，并在工业、农业和医药等领域逐渐显示了其生命力。

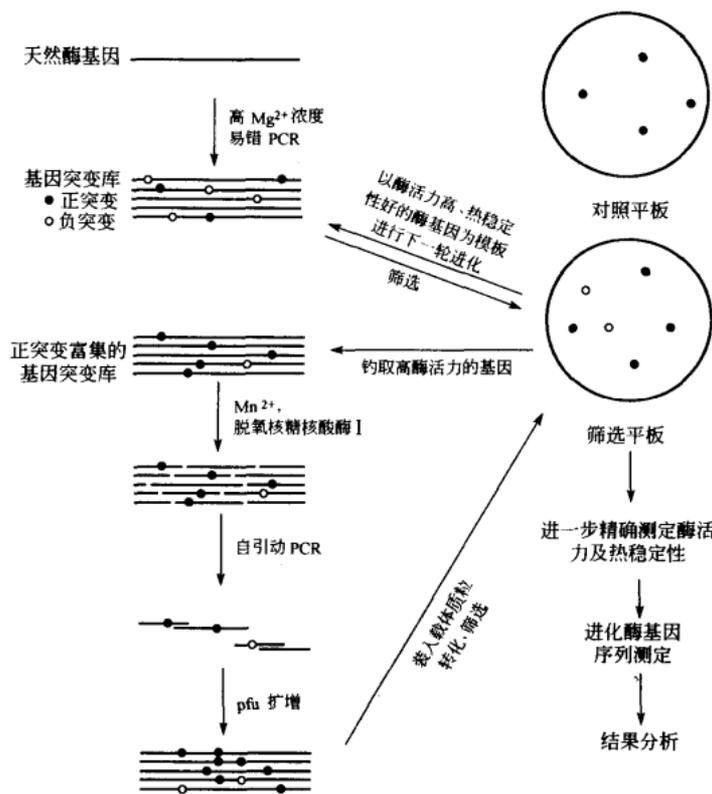


图 2-1 酶分子的体外定向进化原理

### 1. 萌芽阶段

众所周知，生命现象十分复杂，所以，在生命科学中，往往不能详细了解研究对象的内在本质而进行合理设计。酶分子定向进化设计所包含的随机突变、定向筛选的思想在改造生命物质的研究领域由来已久，例如，传统的诱变育种就是通过突变和筛选来改良物种。20 世纪 60 年代，Sol Spiegelman 第一次在分子水平上定向改造单一分子。利用 RNA 噬菌体 Q 进行实验，目的是为了证明达尔文的自然选择也可以发生在非细胞体。这种病毒的基因组可以在体外被 Q 复制酶扩增，反应体系经过一系列稀释，能以很快的速度复制出几百代基因组。Q 复制酶在基因组的指数扩增过程中以一定的频率向基因组中引入突变，导致了不同基因组个体分子之间存在着一些差异，形成了一个突变库。这种情况对基因组个体的选择压力就是其复制速度，即表现型为自身被复制时速度快的基因组，以更大的比例出现在反应体系的最终产物中。体外筛选实验显示，Q 基因组在这样的选择压力下的进化结果，是不断地删除基因组中那些与 Q 复制酶的识别序列无关的顺序，从而加快复制速度。

### 2. 奠基阶段

1981 年，B. G. Hall 等报道了通过定向改变大肠杆菌 K12 中的第二  $\beta$ -半乳糖苷酶 (the second beta-galactosidase) 的底物专一性，开发出对几种糖苷键有水解能力的酶。B. G. Hall 等利用 *lacZ* 缺陷型菌株作为宿主菌，分别在含有某种碳源的培养基上进行培养。从 *ebg* 酶的自发突变库中筛选出可分别水解半乳糖、乳果糖、乳糖酸的突变酶，而野生型的

ebg 酶不能水解这些底物。1986 年 R. Hageman 等进行了有效提高常温生物中酶分子热稳定性实验，他们把对卡那霉素有抗性的卡那霉素核苷酸转移酶基因，先转化进入大肠杆菌中获得基因的突变库，再将突变库转入可以在高温下生长的耐热菌——嗜热脂肪芽孢杆菌中。携带有天然卡那霉素核苷酸转移酶基因的嗜热脂肪芽孢杆菌，可以在 47℃ 表现出对卡那霉素的抗性，而在 55℃ 以上则对卡那霉素没有抗性，这说明天然酶在这个温度以上失去活力。通过的高温下在含有卡那霉素的培养基中对携带卡那霉素核苷酸转移酶基因的突变库进行筛选，得到了一个在 63℃ 下稳定的突变酶和一个在 70℃ 稳定的突变酶。另一个早期的定向进化研究是张今等为解决空间结构未知酶的蛋白质工程问题，以天冬氨酸酶为模型，探索了一种称为酶法体外随机诱变改造酶分子的途径。该法通过控制 DNA 合成的底物种类和浓度比例，实现碱基对的错配，向目的基因引入突变。同时又让其突变受到一定限制，以减少筛选突变体的工作量，提高了 L-天冬氨酸酶的活力。

### 3. 发展阶段

由于随机引入突变的技术还不成熟，也没有基因重组这样的有性进化的概念，所以这些实验技术并没有被广泛用于进行酶分子的改造。直到易错 PCR 和 DNA 改组方法被成功开发，酶分子定向进化技术才趋于成熟。1992 年 H. Gram 等用噬菌体呈现技术体外筛选抗体时，用易错 PCR 向抗体的重链可变区和轻链可变区引入突变。1988 年，P. P. Jones 研究来自小鼠 H-2 同类株 B10. CAS2 的 w17 型的 E beta (Ew17beta) 类组织相容性抗原基因，在 L 细胞中不能表达分子机理时，将 Ew17beta 基因与可以正常表达的 E beta 基因，利用 DNA 重组 (DNA shuffling) 方法在第一内含子处突变互换，在分子水平上证明该突变是造成 Ew17beta 基因不表达的原因。随后 Stemmer 将这种方法引用到酶分子的定向进化中，他

以内酰胺酶作为模型分子，对其正向突变库进行 DNA 改组，以逐渐增加内酰胺酶浓度为筛选压力，经过三轮 DNA 改组获得菌活力增加 32000 倍的突变体。从此在酶分子的定向进化改造中，易错 PCR 和 DNA 改组技术配合使用，通过随机突变和优势重组来构建酶分子的基因突变库。

### 三、定向进化的策略

在待进化酶基因的 PCR 扩增反应中，利用 Taq DNA 聚合酶不具有 3'→5' 校对功能的性质，配合适当条件，以很低的比率向目的基因中随机引入突变，构建突变库，凭借定向筛选方法，选出所需性质的优化酶（或蛋白质），排除其他突变体。与自然进化不同，前者是人为引发的，后者虽相当于环境，但只作用于突变后的分子群，起着选择某一方向的进化而排除其他方向突变的作用，整个进化过程完全是在人为控制下进行的。自然进化取决于对环境变化的适应。原始酶的自然进化既无特定方向，也无既定目标。进化以机体的最佳生存方式和繁殖方式自然进行着。相反，定向分子进化实验有既定的目标，其关键过程如突变、重组和选择均受实验者控制。典型的定向进化主要步骤见图 2-2。

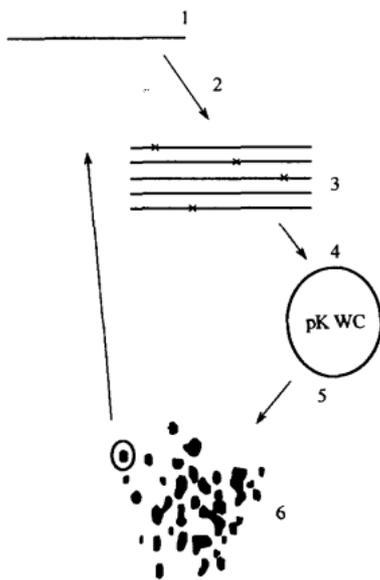


图 2-2 酶定向进化步骤

- 1—选择基因；2—突变/重组、创建变异株文库；3—在选择载体中插入基因库；
- 4—将基因文库/载体插入变异酶的细菌中；5—筛选有益特性克隆；6—分离改良基因并重复同一过程

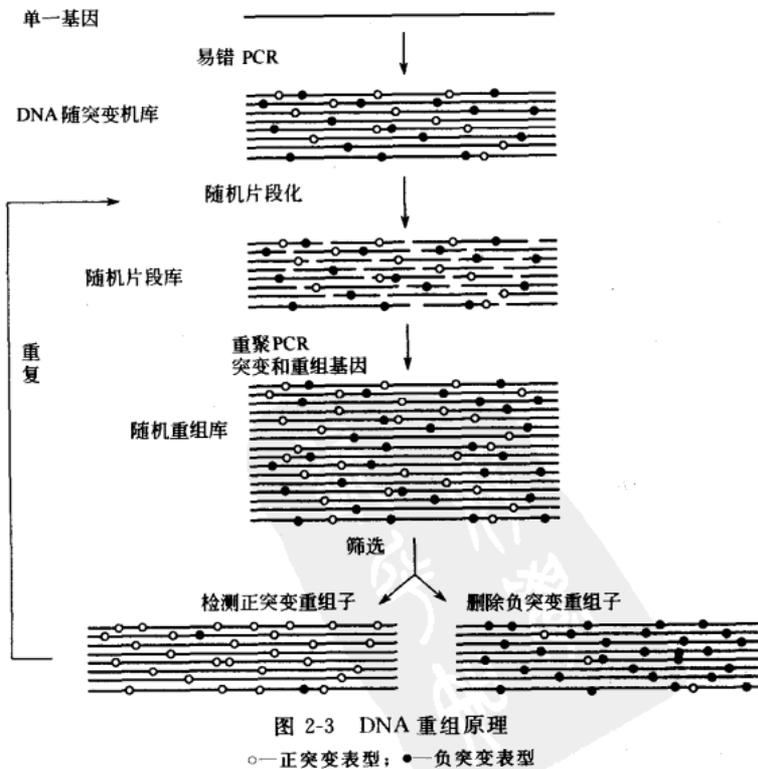
### 1. 易错 PCR 技术为代表的无性进化

无性突变是向单一酶分子基因内随机引入突变，制造突变酶库以便筛选。主要手段包括易错 PCR、盒式诱变、随机定位诱变等，其中易错 PCR 技术因其操作方便以及引入突变的频率可控制性等特点最为重要。

易错 PCR (error-prone PCR) 是指在扩增目的基因的同时引入碱基错配，导致目的基因随机突变，在采用 Taq 酶进行 PCR 扩增目的基因时，通过调整反应条件，如提高镁离子浓度、加入锰离子等来改变体系中 4 种 dNTP 的浓度，改变 Taq 酶的突变频率，从而向目的基因以一定的频率随机引入突变来构建突变库，再筛选需要的突变体。其关键之处在于对突变率的调控，理论上每个靶基因导入的取代残基的适宜个数在 1.5~5 之间。然而，经一次突变的基因很难获得满意的结果。由此发展出连续易错 PCR (sequential error-prone PCR) 策略，即以一次 PCR 扩增得到的有用突变基因作为下一次 PCR 扩增的模板，连续反复地进行随机诱变，使每一次获得的小突变累积而产生重要的有益突变。Chen 和 Arnold 用此策略在非水相 DMF 中，定向进化枯草芽孢杆菌蛋白酶 E 的活力获得成功。所得突变体 PC3 在 60% 和 85% 的 DMF 中，催化效率  $K_{cat}/K_m$  分别是野生酶的 256 倍和 131 倍，比活性提高了 157 倍。将 PC3 再进行两个循环的定向进化，产生的突变体 13M 的  $K_{cat}/K_m$  比 PC3 的高 3 倍 (在 60% DMF 中)，比野生酶的高 471 倍。在该方法中，遗传变化只发生在单一分子内部，故属于无性进化。它较为费力、耗时，一般适用于较小的基因片段 (<800bp)。此外，使用该方法易出现同型碱基转换。

### 2. DNA 重组技术为代表的有性进化

DNA 重组 (DNA shuffling) 又称有性 PCR，原理如图 2-3 所示。其目的是创造将亲本基因群中的突变尽可能进行组合的机会，导致更大的变异，最终获取最佳突变组合的



酶。在理论和实践上，它都优于“重复寡核苷酸引导的诱变”和“连续易错 PCR”。通过 DNA 重组，不仅可以加速积累有益突变，而且可使酶的 2 个或更多的已优化性质合为一体。

### 3. 外显子改组

外显子重组 (exon shuffling) 类似于 DNA 重组，两者都是在各自含突变的片段间进行交换，前者尤其适用于真核生物。在自然界中，不同分子的内含子间发生同源重组，导致不同外显子的结合，是产生新蛋白质的有效途径之一。与 DNA 重组不同，外显子重组是由同一种分子间内含子的同源性带动，而 DNA 重组不受任何限制，发生在整个基因片段上。外显子重组可用于获得各种大小的随机肽库。

### 4. 杂合酶

杂合酶 (hybrid enzyme) 是把来自不同酶分子中的结构单元 (二级结构、三级结构、功能域) 或整个酶分子进行组合或交换，以产生具有所需性质的优化酶杂合体。有许多途径可以产生杂合酶，如定位诱变、DNA 重组、不同分子间交换功能域，甚至整个分子融合。杂合酶可用于改变酶学或非酶学性质，是了解酶的结构与功能之间的关系以及相关酶的结构特征的有力工具，不仅如此，它还可以扩大天然酶的潜在应用，甚至可以产生催化自然界不存在反应的新酶分子。

### 5. 体外随机引发重组

体外随机引发重组 (random-priming in vitro recombination, RPR) 以单链 DNA 为模板，配合一套随机序列引物，先产生大量互补于模板不同位点的短 DNA 片段，由于碱基的错配和错误引发，这些短 DNA 片段中也会有少量的点突变，在随后的 PCR 反应中，它们互为引物进行合成，伴随组合，再组装成完整的基因长度。如果需要，可反复进行上述过程，直到获得满意的进化酶性质。该法优于 DNA 改组法的特点在于：① RPR 可以利用单链 DNA 为模板，可以 10~20 倍地降低亲本 DNA 量；② 在 DNA 重组中，片段重新组装前必须彻底除去 DNase，故 RPR 方法更简单；③ 合成的随机引物具有同样长度，无顺序倾向性，在理论上，PCR 扩增时模板上每个碱基都应被复制或以相似的频率发生突变；④ 随机引发的 DNA 合成不受 DNA 模板长度的限制。

### 6. 交错延伸

交错延伸 (stagger extension process, STEP) 原理的核心是，在 PCR 反应中把常规的退火和延伸合并为一步，可大大缩短其反应时间 (55℃, 5s)，从而只能合成出非常短的新生链，经变性的新生链再作为引物与体系内同时存在的不同模板退火而继续延伸。此过程反复进行，直到满足完整的基因长度，产生间隔的含不同模板序列的新生 DNA 分子。STEP 法重组发生在单一试管中，不需分离亲本 DNA 和产生的重组 DNA。它采用的是变换模板机制，这正是逆转录病毒所采用的进化过程。该法简便且有效，为酶的体外定向进化提供了又一强有力的工具。

为解决空间结构未知酶的蛋白质工程问题，人们曾以类胰岛素人参与肽基因和天冬氨酸酶基因为模型，探索了一种酶体外诱变的新途径，即酶法体外随机-定位诱变 (random-site-directed mutagenesis)。该方法的内涵与酶的体外定向进化类似，对目的基因既采用随机突变增加突变位点，以快速产生优质酶，又让其突变受到一定限制，以减少筛选突变体的工作量。实际上，该法也属于体外模拟自然进化。不同点在于，通过控制 DNA 合成的底物种类和浓度比例实现碱基对的错配。

从上述策略不难看出，随着分子生物学技术的发展，可以更灵活、快速和简便地改造目的基因。从功能出发，先获得某优化的突变体，一方面可快速将其推向应用，另一方面将对

蛋白质的理论研究起到更大的推动作用。

#### 7. 定向进化的选择策略

尽管用上述方法可向人类提供新的有价值酶，但酶的功能突变常被埋设在众多的中性突变和不利突变群中。采用回交 (back-crossing) 法，将已进化的子代突变酶基因与野生酶基因重组，可排除这种干扰。这样，出现中性突变的频率只是 50%，可全部去除不利突变。在定向进化中，尽管突变具有随机性，但通过选择特定方向的突变限定了进化趋势，加之控制实验条件，限定突变种类，降低突变率，缩小突变库的容量，这不仅减少了工作量，更重要的是加快了酶在某一方向的进化速度。

筛选方法必须灵敏，至少与研究的目的性质相关。Venekei 等报道了快速、有效地筛选蛋白水解酶突变体的方法和最佳筛选条件。主要是利用蛋白酶选择平板初选，再配合活性染色 (activity staining) 和 X 射线片消化分析 (X-ray film digestion assay) 加以验证，并检测其活力，快速筛选突变株。

Robens 等采用嗜菌体表面呈现技术筛选与嗜中性酯酶结合力更强的抑制剂。从含有 4900 个突变体的基因库中，获得与该酶结合能力高于野生蛋白质  $3.6 \times 10^{-6}$  倍的突变体，比已报道的任何一种相应的抑制剂高 50 倍。其他一些筛选方法，如加入能产生可见光信号的底物，利用绿色荧光蛋白质的性质等。

### 四、定向进化的优势、现状和未来

酶的体外定向进化属于非合理设计 (irrational design)，其突出的优点是，不需事先了解酶的空间结构和催化机制，适于任何蛋白质分子，大大地拓宽了蛋白质工程学的研究和应用范围。特别是它能够解决合理设计所不能解决的问题，使人们能较快地了解蛋白质结构与功能之间的关系，为指导应用 (如药物设计等) 奠定理论基础。此外，该技术简便、快速、耗资低且有实效。总之，酶的体外定向进化是非常有效的更接近于自然进化的蛋白质工程研究的新策略。它不仅能使酶进化出非天然特性，还能定向进化某一代谢途径；不仅能进化出具有单一优良特性的酶，还可能使已分别优化的酶的两个或多个特性叠加，产生具有多项优化功能的酶，进而发展和丰富酶类资源；完全在试管中进行的酶 (或蛋白质) 的体外定向进化使在自然界需要几百万年的进化过程缩短至几年，这无疑是蛋白质工程技术发展的一大飞跃。目前，对一些酶 (或蛋白质)、磷酸盐解毒途径、抗辐射性、生物合成途径、对映体选择性、抗体库以及 DNA 结合位点定向进化的可喜成果令众多的相关科学家为之振奋。可见，进化能发生在自然界，也能发生在试管中，它与合理设计互补，将会使分子生物学家更加得心应手地设计和剪裁酶 (或蛋白质) 分子，将使蛋白质工程学更加显示出强大的威力和诱人的前景。

为了提高酶体外定向进化的成功率，需注意以下几个关键问题：①确定目的酶在所需功能方面的进化程度和潜力；②选择一个最接近人们需要的酶分子作为起点 (包括用作下一循环的起始突变体)，将涉及将酶引入单一的进化途径；③若用于理论研究，应控制较低的突变率，只有选择最佳进化策略，保证库中所有克隆只含有单一氨基酸取代 (每代只有一个氨基酸变化)，从一代到另一代的功能变化便能与突变表型一一对应起来；④建立有效且灵敏的选择方法，确保检测出由单一氨基酸取代而引起的功能变化。

目前，已建立了一些酶 (或蛋白质) 的体外定向进化的有效方法，但还应探索扩展定向进化潜力的最佳途径和提高对突变的控制能力。选择方法尚待开发与完善，有必要发展小型化分析和高度自动化的大规模选择模式，特别是对那些无明显可借鉴表型的突变体的选择，应是今后该领域科学家切实努力的目标。

### 第三节 人工模拟酶

酶是一种在生物体内具有新陈代谢催化剂作用的蛋白质，可特定地催化某个反应，而它们本身却不参与反应，且具有反应效率高、反应条件温和、反应产物污染小、能耗低和反应易控制等特点。早期的酶工程技术主要是从动植物、微生物中制备各种酶制剂，用于化工、食品和医药等工业领域。20世纪70年代后，生物反应器、生物传感器等工程技术迅速应用。随着第三代酶制剂的诞生，酶工程技术在制造精细化工产品和医药产品等各个领域的广泛应用逐渐展示了其广阔的前景。据统计，目前世界上已开发出3000多种酶，但其中大约只有20种酶可以实现工业化，酶的开发应用潜力仍很大。

#### 一、模拟酶的理论基础和策略

##### 1. 模拟酶的概念

早在20世纪中叶，人们就已认识到研究和模拟生物体系是开辟新技术的途径之一，并自觉地把生物界作为各种技术思想、设计原理和发明创造的源泉，通过对生物体系的结构与功能的研究，为设计和建造新的技术提供新思想、新原理、新方法和新途径。设计一种像酶那样的高效催化剂是科学家们一直追求的目标，而对酶功能的模拟是当今自然科学领域中的前沿课题之一。

酶是高效催化剂，其应用日趋广泛。但是，对热敏感、稳定性差和来源有限等缺点限制了其规模开发和利用。于是，新的催化剂——模拟酶逐渐被研制和开发。20世纪80年代以来，化学家对利用简单的分子模型构建酶的特征进行了深入研究。除了其应用前景之外，另一个主要原因是化学模型可以帮助人们认识酶的作用机制，即酶为什么具有如此高的催化效率。事实上，在生物体内，模拟酶的研究使酶催化的许多反应得到了解释。

模拟酶又称人工酶或酶模型，它是生物有机化学的一个分支。由于天然酶种类繁多，模拟的途径、方法、原理和目的不同，对模拟酶至今没有一个公认的定义。一般来说，它的研究就是吸收酶中那些起主导作用的因素，利用有机化学、生物化学等方法设计和合成一些较天然酶简单的非蛋白质分子或蛋白质分子，以这些分子作为模型来模拟酶对其作用底物的结合和催化过程，也就是说，模拟酶是在分子水平上模拟两活性部位的形状、大小及其微环境等结构特征，以及酶的作用机理和立体化学等特性的一门科学。可见，模拟酶是从分子水平上模拟生物功能的一门边缘科学。

20世纪70年代以来，由于蛋白质结晶学、X射线衍射技术及光谱技术的发展，人们对许多酶的结构有了较深入的了解，对酶的结构及其作用机理在分子水平上进行了解释。动力学方法的发展以及对酶活性中心、酶抑制剂复合物等结构的描述促进了酶作用机制的研究，为人工模拟酶的发展注入了新的活力。此外，科学家们利用化学修饰、基因突变等手段改造天然酶，产生了具有新的催化活性的半合成人工酶。而抗体酶的出现和快速发展为酶的人工模拟又开辟了一条新的道路。

##### 2. 模拟酶的理论基础

人们曾对酶的催化机制等问题提出了很多理论，都试图从不同角度阐述酶发挥高效率的原因。在众多假说中，Pauling的稳定过渡态理论得到了广泛的承认。酶先与底物进行结合，选择稳定某一特定反应的过渡态(TS)，降低了反应的活化能，从而加快了反应速度。

设计模拟酶一方面要基于酶的作用机制，另一方面则基于对简化的人工体系中识别、结合和催化的研究。要想得到一个真正有效的模拟酶，这两方面就必须统一，催化基团的定向

引入对催化效率的提高至关重要。

在设计模拟酶时除具备催化基团之外，还要考虑到与底物定向结合的能力。模拟酶要和酶一样，能够在与底物的结合中，通过底物的定向化、扭曲及变形来降低反应的活化能。此外，酶模型的催化基团和底物之间必须具有相互匹配的立体化学特征，这对形成良好的反应特异性和催化效力相当重要。

## 二、模拟酶的分类

根据 Kirby 分类法，模拟酶可分为：①单纯酶模型 (enzyme-based mimics)，即以化学方法通过天然酶活性的模拟来重建和改造酶活性；②机理酶模型 (mechanism-based mimics)，即通过对酶作用机制诸如识别、结合和过渡态稳定化的认识，来指导酶模型的设计和合成；③单纯合成的酶样化合物 (synzyme)，即一些化学合成的具有酶样催化活性的简单分子。

### 1. 环糊精酶模型

环糊精 (cyclodextrin, CD) 是由多个 D-葡萄糖以 1,4-糖苷键结合而成的一类环状低聚糖 (图 2-4)。根据葡萄糖单元的数量不同可分为 6 个、7 个及 8 个环糊精 3 种，它们均是略呈锥形的圆筒，其伯羟基和仲羟基分别位于圆筒较小和较大开口端。这样，CD 分子外侧是亲水的，其羟基可与多种客体形成氢键，其内侧是 C2、C5 上的氢原子和糖苷氧原子组成的空腔，故具有疏水性，因而能包结多种客体分子，类似酶对底物的识别。作为人工酶模型的主体分子虽有若干种，但迄今被广泛采用且较为优越的当属环糊精。

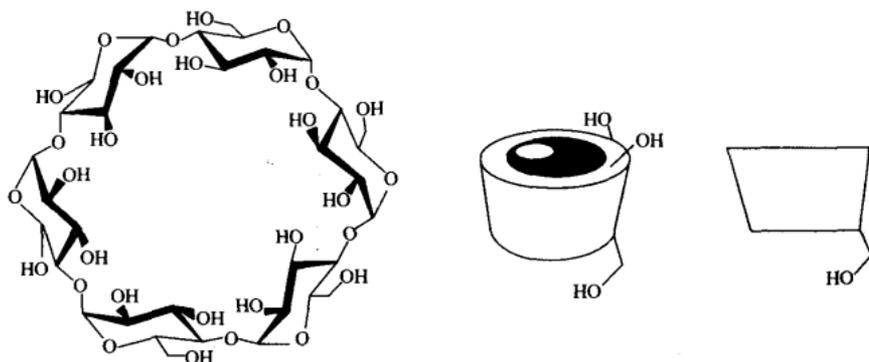


图 2-4 环糊精结构示意图

### 2. 胶束模拟酶

在模拟生物体系的研究中，胶束模拟酶是近年来比较活跃的研究领域之一。它不仅涉及简单的胶束体系，而且对功能化胶束、混合胶束、聚合物胶束等体系也进行了深入的研究。胶束在水溶液中提供了疏水微环境（类似于酶的结合部位），可对底物束缚。如果将催化基团如咪唑、硫醇、羟基和一些辅酶共价或非共价地连接或吸附在胶束上，就有可能提供“活性中心”部位，使胶束成为具有酶活力或部分酶活力的胶束模拟酶。

### 3. 肽酶

肽酶 (pepzyme) 是模拟天然酶活性部位而通过人工合成的具有催化活性的多肽，这是多肽合成的一大热点。Johnson 等为克服苯丙氨酸合成的关键步骤——草酰乙酸脱羧反应所用酶中需金属辅酶的问题，探寻与此不同反应机理的不需要金属辅酶的脱羧酶。可借鉴的认识只有胺可以催化草酰乙酸脱羧，其历程是先形成烯胺，进而脱去  $\text{CO}_2$ 。然而尚未发现

采用烯胺历程的天然羧酶，全新合理设计就成了唯一可行的方法。他们基于胺催化脱羧的 6 大特征和  $\alpha$  螺旋在催化活性中重要性的认识，以烯胺机理设计出两个多肽。结果发现，其催化效率比丁胺高 3~4 个数量级，但比天然的活性低得多。

#### 4. 半合成酶

半合成酶是近年来模拟酶领域中的又一突出进展。它是天然蛋白质或酶为母体，用化学或生物学方法引进适当的活性部位或催化基团或改变其结构，形成一种新的“人工酶”。

通过选择性修饰氨基酸侧链，将一种氨基酸侧链转化为另一种新的氨基酸侧链称为化学诱变法。Bender 等首次成功地将枯草杆菌蛋白酶活性部位的丝氨酸 (Ser) 残基，经苯甲基磺酰胺特异性活化后，再用巯基化合物取代，将丝氨酸转化为半胱氨酸。虽然产生的巯基化枯草杆菌蛋白酶对肽或酯没有水解活力，但能水解高度活化的底物，如硝基苯酯等。

Hi Lvert 等利用类似的方法，将枯草杆菌蛋白酶结合部位的特异性 Ser 突变为硒代半胱氨酸，该硒化枯草杆菌蛋白酶既表现出转氨酶的活性又表现出含硒谷胱甘肽过氧化物酶的活性。化学诱变的方法为：首先用苯甲基磺酰氟特异性活化结合部位的 Ser，然后用  $H_2Se$  或  $NaHSe$  亲核取代，则将 Ser 转化为硒代半胱氨酸。

将辅酶引入结构已明了的蛋白质中是制备半合成酶的又一策略。这一领域中最好的例子是 Kaiser 等的黄素木瓜蛋白酶。黄素的溴酰衍生物可与木瓜蛋白酶的 Cys25 共价结合成黄素木瓜蛋白酶。该半合成酶的活力可与原黄素酶相比拟。其他辅酶（如维生素  $B_1$ 、吡哆醛、卟啉等）都可以共价偶联到某些酶的结合部位，从而产生新的实用催化剂。另外，人们将血红蛋白和白蛋白修饰后产生了酶活力，而将细胞色素 C 水解后产生了微过氧化物活性。

利用半合成方法不但可以制造新酶，还可获得关于蛋白质结构和催化活性关系的详细信息，为构建高效人工酶奠定了基础。

### 三、抗体酶

#### 1. 抗体酶概述

酶是自然界经过数百万年的进化而发展起来的生物催化剂，它能在极温和的条件下高效专一地催化某些化学反应，抗体酶的出现使科学家设计高效催化剂的梦想变为现实。

酶和抗体的本质差别在于，酶是能与反应过渡态选择结合的催化性物质，而抗体是和基态分子结合的催化性物质，机体的免疫系统可以产生许多不同的抗体分子，抗体分子的多样性赋予它几乎无限的识别能力，这正是抗体得以与靶分子精确匹配产生高度特异性和亲和性的分子基础。抗体的精细识别性使其能结合几乎任何天然或合成的分子。利用免疫系统这一特性将抗体开发成适合特定用途的酶具有重要意义。

早在 1969 年，Jencks 根据 Pauling 的化学反应过渡态理论预言：如果找到针对某个反应过渡态的抗体，将其加入到该反应体系中，就可观察到这个抗体对相应化学反应的催化效应。针对过渡态的抗体可以紧密结合反应的过渡态配合物，使其活化能降低，从而帮助大量反应物分子跨越能垒，达到加速反应的目的。由于实践中很难获得反应的过渡态，所以设计和制备稳定的过渡态类似物，以此代替反应的过渡态作为半抗原，这样产生的抗体就能识别反应过程的真正过渡态，该抗体具有酶催化反应的基本特征，可成为一种具有酶活力的抗体。

#### 2. 抗体酶的制备方法

1986 年发表的两篇有关抗体酶的文章具有重要意义，标志着抗体酶的研究进入一个崭新的阶段。起初的设计思想是以 Pauling 的稳定过渡态理论为指导，即利用反应的过渡态类似物作为半抗原产生抗体酶。随着抗体酶研究的深入，人们利用酶催化确立的催化机理——

稳定过渡态 (transition state stabilization)、酸碱催化、亲电和亲核催化、邻近效应 (strain and proximity effect), 使抗体酶的制备方法不断扩展, 目前已研究出数种产生抗体酶的方法, 大多数抗体酶是通过理论设计, 以与反应过渡态类似的小分子作为半抗原, 然后让动物免疫系统产生针对半抗原的抗体来获得的。由于以反应的过渡态类似物为半抗原诱导的抗体在几何形状和电学性质上与反应过渡态可以互补, 稳定了过渡态, 可加速反应。抗体与其配体的相互作用是相当精确的, 抗体常含有与配体功能互补的特殊功能。已经发现, 带正电的配体常能诱导出结合部位带负电残基的配体, 反之亦然。抗体与半抗原之间的电荷互补对抗体所具有的高亲和力以及选择性识别能力起关键作用。在开发诱导抗体酶产生的各种方法时, 一个重要的目标是建立一个通用的规则, 使产生的抗体结合部位的催化基团和半抗原的结合直接相关。

在抗体结合部位上产生带负电的羧基, 可作为一般碱基催化  $\beta$ -消除反应。为了解抗体酶的催化机制并与天然酶的催化作用进行比较, 有必要制备抗体酶晶体, 用 X 射线衍射技术分析其结构, 对进一步设计过渡态类似物和抗体酶具有重要意义, 迄今已有数个抗体酶的晶体结构得以阐明。

### 3. 抗体酶的应用

(1) 抗体酶在有机合成中的应用 任何分子几乎都可通过免疫系统产生相应的抗体, 而且专一性很强, 抗体的这种多样性标志着抗体酶具有巨大的应用潜力。各类精细化工产品 and 合成材料的工业生产需要具有精确底物专一性和立体专一性的催化剂, 而这正是催化抗体的突出特点。特别是那些天然酶不能催化的反应, 可通过设计抗体酶来弥补天然酶的不足。

抗体酶能催化立体专一性反应, 区分动力学上的外消旋混合物, 催化内消旋底物合成相同手性产物。利用对映体专一性脂肪酶已能拆分外消旋混合物。

近年来, 抗体催化的不同类型的反应越来越多。已经证明, 抗体酶可以反相胶束和固定化的形式在有机溶剂中起作用。这为抗体酶的商业应用开辟了前景, 抗体酶将在有机合成中发挥越来越大的作用。

(2) 用于阐明化学反应机制 *N*-甲基原卟啉由于内部甲基取代而呈扭曲结构, 但由它作为半抗原诱导产生的抗体可催化原卟啉的金属螯合反应, 亚铁螯合酶催化亚铁离子插入原卟啉的反应过渡态, 形成一个原卟啉的扭曲结构, 平面结构的原卟啉经扭曲后, 螯合金属离子。

(3) 抗体酶在医疗上的应用 抗体酶既能标记抗原靶目标, 又能执行一定的催化功能。这两种性质的结合使抗体酶在体内的应用范围得到扩大。例如, 可以设计抗体酶来杀死特殊的病原体, 也可以用抗体酶活化处于靶部位的药物前体, 以降低药物毒性, 增加其在体内的稳定性。抗体酶制备技术的开发预示着可以人为生产适应各种用途, 特别是自然界不存在的高效生物催化剂, 在生物学、医学、化学和生物工程学上会有广泛的应用前景。

### 4. 抗体酶的研究进展

近年的主要进展表现在如下三个方面: 半抗原设计方法有创新; 抗体酶催化的化学转化范围有所扩大; 一些催化抗体的结构得到表征, 进行反应性免疫、抗体面的化学筛选、抗体酶催化的化学转化的反应。

## 四、印迹酶

### 1. 分子印迹技术概述

模拟生物分子的分子识别和功能是当今最富挑战的课题之一，而在分子水平上模拟酶对底物的识别与催化功能已引起各国科学工作者的广泛关注。

自然界中，分子识别在生物体如酶、受体和抗体的生物活性方面发挥着重要作用，这种高选择性来源于与底物相匹配的结合部位的存在。为获得这样的结合部位，科学家们应用环状小分子或冠状化合物如冠醚、环糊精、环芳烃等来模拟生物体系。这种类似于抗体和酶的结合部位能否在聚合物中产生呢？如果以一种分子充当模板，其周围用聚合物交联，当模板分子除去后，此聚合物就留下了与此分子相匹配的空穴。如果构建合适，这种聚合物就像“锁”一样对钥匙具有选择性识别作用，这种技术被称为分子印迹。早期，科学家对分子印迹进行过各种尝试，但直到 20 世纪 70~80 年代，这一技术才真正有所突破。

Wulff 研究小组在 1972 年首次报道成功地制备出分子印迹聚合物。后来经过近 30 年的努力，分子印迹技术趋于成熟，并在分离提纯、免疫分析、生物传感器，特别是人工模拟等方面显示出广泛的应用前景。

## 2. 分子印迹酶

分子印迹技术一出现，人们就意识到可以应用此技术来制备人工模拟酶。通过分子印迹技术可以产生类似于酶的活性中心的空穴，对底物产生有效的结合作用，更重要的是利用此技术可以在结合部位的空穴内诱导产生催化基团，并与底物定向排列。

在人工模拟酶研究领域，分子印迹面临的最大挑战之一是如何利用此技术来模拟复杂的酶活性部位，使其最大程度地与天然酶相似。要想制备出具有酶活性的分子印迹酶，选择合适的印迹分子相当重要。目前，所选择的印迹分子主要有底物、底物类似物、酶抑制剂、过渡态类似物以及产物等。分子印迹酶同天然酶一样，一般遵循米-曼氏动力学，其催化活力依赖于  $K_{cat}/K_m$ ，这里  $K_{cat}$  是催化反应速率常数，而  $K_m$  通常代表米氏常数，它可用于描述底物与酶的亲和性。产生底物的结合部位并使催化基团与底物定向排列对于产生高效人工模拟酶来说是相当重要的两个方面。

## 3. 生物印迹酶

生物印迹是指在天然生物材料上进行分子印迹，从而产生对印迹分子具有特异性识别的空腔的过程。不难看出，如果在天然蛋白质分子上可以产生谷胱甘肽（GSH）结合部位，那么再在结合部位引入催化基团就能够产生具有 GSH 活力的人工酶。生物印迹是分子印迹中非常重要的内容之一，其优势在于酶的人工模拟。利用该技术，人们首先获得了有机相催化印迹酶，并进行了系统研究，近年来，人们利用此技术制备出水相生物印迹酶、酯水解生物印迹酶、HF 水解生物印迹酶、具有谷胱甘肽过氧化物酶活性的生物印迹酶等。因此，人们以卵清蛋白为原料，以 GSH 修饰物 GSH-2DNP 为模板分子，利用生物印迹技术，制造出了对 GSH 具有特异性结合能力的印迹蛋白质，然后利用二步化学诱变法将催化基团引入印迹蛋白质 GSH 结合部位，从而产生了具有谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）活力的人工模拟酶。印迹酶为卵清蛋白的一聚体或二聚体，其中二聚体表现出较高的活力，其最高的 MP1 可达 817U/mol。

印迹分子的设计尤为重要，在设计时应考虑此印迹分子既能诱导产生 GSH 结合部位，又可尽量诱导出疏水环境。结合含硒抗体酶半抗原的设计思路，以 GSH 分子为基础，将它进行适当修饰后作为印迹分子。对于此印迹分子的要求：①印迹分子应体现 GSH 的结构特征，使其诱导出对 GSH 具有较好结合的酶结合部位；②稳定性好；③不与交联剂发生化学反应；④考虑到修饰基团能诱导出疏水结合部位。将 GSH 的巯基和氨基用疏水基团 2,4-二硝基苯修饰产生的 GSH 修饰物满足了上述要求，以它为印迹分子印迹卵清蛋白产生了 GSH

的特异性结合部位。

## 五、模拟酶的研究进展

酶的模拟工作可分为3个层次：①合成有类似酶活性的简单配合物；②酶活性中心模拟；③整体模拟，即包括微环境在内的整个酶活性部位的化学模拟。目前模拟酶的工作主要集中在第二层次，例如，可以通过对某些天然或人工合成的化合物引入某些活性基因，使其具有酶的行为。目前用于构建模拟酶这类酶模型分子有环糊精、冠醚、穴醚、笼醚、卟啉等。利用环糊精已成功地模拟了胰凝乳蛋白酶、核糖核酸酶、转氨酶、碳酸酐酶等。例如，1985年，本德（Ben-der）等人利用 $\beta$ -环糊精的空穴作为底物的结合部位，连接在环糊精侧链上的羧基、咪唑基及环糊精自身的一个羟基共同构成催化中心，制成了胰凝乳蛋白酶的模拟酶，其催化能力和天然胰凝乳蛋白酶相近。

人工模拟酶的研究是生物有机化学的重要研究领域之一。人工酶的分子设计在很大程度上反映了对酶的结构以及反应机制的认识。研究人工酶模型可以较直观地观察与酶的催化作用相关的各种因素，如催化基团的组成、活性中心的空间结构特征、酶催化反应动力学等。人工模拟酶的研究，是实现人工合成具有高性能模拟酶的基础，在理论和实际应用上具有重要意义。由于对酶的结构及其作用机制的研究取得了重大进展，对许多酶的结构及其作用机理都能在分子水平上得到解释，大大促进了人工模拟酶的发展。人工模拟酶这一研究领域已引起各国科学家的极大关注。发达国家都把模拟酶作为重点课题列入未来的研究计划，中国也把模拟酶的研究列入国家自然科学基金重点资助的高新技术、新概念、新构思探索性课题。

## 第四节 非水介质中的酶学及酶催化

### 一、非水介质中酶的催化反应及其特征

传统理论认为，生物催化剂，包括酶、微生物细胞、动物细胞、植物细胞及一些细胞器均是在水溶液环境中催化水溶性底物的转化。然而，随着生物技术的发展，生物催化剂需要向更为广泛的应用领域发展。酶作为生物催化剂，在体外只能在水溶液环境才保持活性，而在有机溶剂中则往往变性或失活。然而人们发现事实并非如此。如向酶溶液中加入能与水互溶的酒精、丙酮等，或制作乳化的水-有机溶剂两相系统，甚至在几乎无水的有机介质中，酶仍能够具有催化活性，证明了非水有机介质中酶仍能进行催化反应，并且还具有与水溶液系统不同的一些奇异特性。1984年，美国麻省理工学院的科学家 Klihanov 成功地实现了猪胰脂肪酶在99%的有机溶剂中催化三丁酸甘油酯与醇之间的转酯反应，并证实了酶在100℃高温下，不仅能够有机溶剂中保持稳定，而且还显示出很高的催化转酯活力。这一发现为酶学研究的应用又带来了一次革命性飞跃，并成为生物化学和有机合成研究中一个迅速发展的领域。

#### 1. 水的作用

所谓非水介质并不是绝对无水，一般指水含量低于0.01%以下。酶维持活性有赖于其活性构象的维持，而酶的活性构象的形成是依赖于各种氢键、疏水键等非共价的相互作用。水参与了氢键的形成，而疏水相互作用也只有在水参与时才能形成。因此水分子与酶分子的活性构象形成有关。其实与酶分子起作用的只是与酶分子紧密接触的一层束缚水，只要保证这些基本必需的水分子固定在酶分子表面，而水溶液中其他大部分的自由水尽可以被有机溶剂所代替。有研究表明，在不同极性有机溶剂的低水反应介质中，随着溶剂的亲水性增

大，保持在糜蛋白酶表面的束缚水下降 1.0%~2.5%，而酶活性随之下降为原来的  $\frac{1}{10000}$ 。

酶在完全干燥的溶剂中通常没有活性。所以体系中有足够的水分对酶的催化起着重要的作用。有人认为，酶的活性取决于被酶分子吸附的水分，而与溶剂中的总净水含量无关。表现活性所需的水量因酶而不同，脂肪酶似乎只需几个水分子，糜蛋白酶吸附了 50 个水分子后就能够显示活性。枯草杆菌蛋白酶也大致如此，对这些酶分子来说，要在其表面形成分子层水膜，则需大约 500 个水分子。水与酶蛋白分子表面的带电部位和部分极性基因的水合可能是酶催化的先决条件。设想在无水条件下，酶分子的带电基团和极性基团相互作用，产生了一种非活性的封闭结构，加入的水能使酶分子的柔性增大，并通过非共价作用力来维持其催化的活性结构。实验表明，水合作用能促进酶反应，而过量的水会导致酶活性下降。

## 2. 有机介质的选择

选择什么样的有机介质对酶的催化活性影响很大。此外，有机溶剂还能够改变酶的底物专一性，原因是有机溶剂可以与酶分子表面的水相互作用，或影响底物与产物在有机相和水相的分配，以及对酶的抑制和失活作用。一般认为，疏水性的有机溶剂是最好的反应介质。溶剂的疏水性越大，溶剂与酶分子争夺水分子的能力越小，保留在酶分子表面的水分越多，酶活性也就越大。通常以  $\lg P$ ，即一种溶剂在辛醇/水两相之间的分配系数的常用对数值，来表示溶剂的疏水性。实验表明，在加入等量水的情况下，溶剂的  $\lg P$  值越高，酶的活性越大。要达到一定的酶活性，不同溶剂所需的水量也不一样。

有机溶剂的选择必须考虑 3 个因素：①溶剂对酶反应的影响（包括对底物的溶解能力，对反应平衡点、动力学及酶专一性的影响）；②溶剂的毒性（对食品工业和药物生产特别重要）；③对酶稳定性的影响。可供试验选用的有：辛烷、甲苯、异丙基醚、甲基异丁酮、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇、四氢呋喃和乙腈等。

## 3. 非水介质中酶特性的改变

(1) 提高稳定性 试验表明，许多酶在有机溶剂中比在水中稳定。有人发现，糜蛋白酶在 100℃ 的辛烷中半衰期达数小时，而在水溶液中温度升至 60℃ 时酶即在数分钟内不可逆失活。枯草杆菌蛋白酶和猪胰腺脂肪酶在非水有机介质中可忍受 100℃ 以上的高温。酶的热稳定性随含水量升高而降低。酶变性失活有较大的构象改变，在酶构象改变中需要有自由水的存在，因此酶的构象改变和热诱导变性应为脱水所抑制。结构分析表明，酶在有机介质中确实具有刚性结构。酶的贮藏稳定性在有机溶剂中亦明显提高，如糜蛋白酶在 20℃ 辛烷中半年仍保持全部活性，而在水中其半衰期只有几天。

(2) 改变底物的专一性 在水溶液中，水分子与酶分子对底物分子的竞争性结合决定酶的底物专一性。当用有机溶剂代替水时，酶的底物专一性就会发生改变。如酶对极性底物和非极性底物的专一性发生逆转，对映体的专一性降低。

(3) 产生新的酶促反应 在非水有机溶剂中酶可催化一些在水溶液中本不可以进行的反应，如酯酶可催化一系列反应，包括酯化反应、转酯反应、胺解反应、转硫酯反应等，而在水中这些反应均为水解反应所代替。枯草杆菌蛋白酶可催化糖类的酰化。酪氨酸酶所催化的酚类物质氧化，在水溶液中由于产物醌类的聚合并引起酶的失活，产率很低，在三氯甲烷中反应可以持续进行。

(4) 酶促动力学变化 酶在非水介质中的反应符合 Michaelis-Menten 公式，影响有机介质中酶促反应动力学变化的因素涉及底物和溶剂的性质。酶和溶剂竞争底物，如果底物与溶剂的亲合性高，则底物与酶的亲合力低， $K_m$  大；如果底物与溶剂的亲合力低，则酶与底物

的亲合力相应增高,  $K_m$  变小。根据相似相溶的原则, 极性溶剂中, 非极性底物比极性底物有更低的  $K_m$  和更高的反应速率。在极性溶剂中则相反。

## 二、微水有机溶剂体系

### 1. 水对酶活力的影响

虽然水含量在一个典型的非水酶体系中通常只占 0.01%, 但水含量微小的差别会导致酶催化活力的较大改变。酶需要少量的水保持其活性的三维构象状态, 即使是以共价键结合到底物上的酶也不例外。水影响蛋白质结构的完整性、活性位点的极性和稳定性。酶周围水的存在, 能降低酶分子的极性氨基酸的相互作用, 防止产生不正确的构象结构。有证据表明, 酶分子周围的水化层作为酶表面和反应介质之间的缓冲剂, 它是酶微环境的主要成分。

有机溶剂与酶结合水之间的相互作用影响酶的活力, 当加入许多极性添加剂时, 因剥夺了酶的水化层而使非水介质中的酶失活。在一个完全“干”的体系中, 酶基本是无活力的, 随着酶水合程度的增加。酶的活力也不断提高。

### 2. 有机溶剂的作用

在有机相酶学研究中, 存在一种共识: 在非水或低水环境中, 只要酶分子的“必需水”层不被剥除, 酶就可以有效地发挥其催化作用。因而, 提出了非水相酶学的一个具有普遍意义的定律: 作为反应介质, 非极性溶剂优于极性溶剂。由于极性溶剂, 特别是与水互溶的有机溶剂会争夺, 甚至剥除蛋白质分子的“必需水”层, 扰乱了酶分子天然构象的形成。这一说法确实可以作为 Zaks 定律的一个合理解释。

### 3. 热力学稳定性

有机溶剂中酶的热稳定性和贮存稳定性都比水溶液中高。猪胰脂肪酶 (PPL) 在苯中催化酯交换反应时, 酶活性随温度升高 (20~70℃) 而增加, 而且在 70℃ 连续反应 7 次 (每次 96h) 后酶活力仍保持 60%; PPL 在有机溶剂中 100℃ 时的半衰期可达数十小时, 而在水中 100℃ 几乎马上失活; 而且 PPL 的稳定性取决于有机溶剂中水的浓度, 1% 的水浓度会使 PPL 的稳定性降低到和水溶液中相同的水平。胰凝乳蛋白酶在无水辛烷中 20℃ 放置 6 个月后酶活力没有降低, 而在同样温度下酶在水溶液中的半衰期仅有几天。Klibanov 和 Volkin 认为, 有机溶剂中酶的热稳定性比水溶液中高的原因是由于有机溶剂中缺少使酶热失活的水分子, 使由水而引起的酶分子中天冬酰胺的脱氨基作用、天冬氨酸肽键的水解、二硫键的破坏、半胱氨酸的氧化及脯氨酸和甘氨酸的异构化等蛋白质热失活的全过程难以进行。

## 三、酶的选择性

### 1. 酶的制备与前处理

非经特殊处理, 在大多数有机溶剂中, 蛋白质是高度不溶的。因此, 酶在有机溶剂中以两种形式存在。这有利于酶和产物的回收和酶的重复使用, 但底物和产物的扩散会受到限制。通常制备能在有机介质中反应的酶有以下几种方法。①冻干法, 最常用。通过改变温度和压力, 能调节酶的水合度; 通过调节制备缓冲液的离子组成、离子强度和 pH 值, 能够调节酶干粉的离子吸附和 pH 值。酶分子能“记忆”住制备的 pH 值, 并在有机溶剂中保持不变。②沉淀法, 常用经典的丙酮沉淀法。③固定化酶, 常用吸附法。在非水反应介质中, 固定化酶可以减少扩散限制。固定化酶载体的疏水性对酶活性和反应速率有影响。一般采用疏水性大的材料作载体。

### 2. 有机介质中酶催化的应用

已有研究表明, 酶在有机介质中能起催化作用, 且催化活性与水溶液中相当甚至超

出, 并且能够表现出与水溶液中不同的性质和优越性: 有利于疏水物质的反应; 催化在水中不能进行的反应; 减少由水引起的副反应(如水解反应), 使反应平衡向所需方向移动; 控制底物的专一性, 酶的稳定性可以得到提高; 减少微生物的污染; 有利于产物的回收, 提高产率等。

(1) 肽合成 蛋白水解酶催化的正常反应是蛋白质的水解, 在非水有机介质中其反应平衡趋向逆过程即肽的合成。该技术已用于合成甜味二肽及脑啡肽, 非水介质不但改变了平衡点, 而且不需要通常多肽合成时必需的基团保护。

(2) 脂肪酶的多功能催化 在有机介质中脂肪酶具有多种功能, 其中包括水解、转酯、酯化、胺解等。在工业化应用中可通过脂肪酶催化一种较便宜的食用油向可可油的转化以生产可可脂。利用脂肪酶的多功能催化作用还可进行外消旋体的光学拆分, 二元醇、甾体和糖类的区域选择性酰化, 酚类的聚合等。

(3) 非天然物质的合成与转化 酶在有机溶剂中的催化性能不仅表现在天然底物上, 对一些非天然有机物质也可进行酶促合成与转化, 如酶法聚合酚醛树脂, D-氨基酸的酶促合成。

#### 四、“pH 记忆”与“分子印迹”技术

在微水有机溶剂酶催化体系中, 控制反应介质的 pH 值似乎是不可能的。虽然体系的宏观 pH 值及酶分子必需水层内的微观 pH 值均无法直测, 但微水环境 pH 值确实存在, 而且对酶活力和选择性均有显著影响。那么, 酶分子微环境中的 pH 值究竟由什么来决定呢? Zaks 和 Klivanov 将猪胰脂肪酶溶解于不同 pH 值的缓冲液中, 在冷丙酮中进行沉淀、真空干燥, 使酶有不同的初始微环境 pH 值, 用于催化三丁酸甘油酯的水解, 结果发现, 酶的水解活力与溶解酶的缓冲液 pH 值有很大关系, 两者之间呈钟罩形曲线, 从而验证了酶具有“记忆” pH 值的能力, 即酶的离子化基团在缓冲液中所获得的离子化状态可以在有机溶剂中得以保持。

与“pH 记忆”特性相似, 蛋白质分子还具有对配体的“记忆”功能。当蛋白质溶于高浓度配体溶液时, 即使两者之间仅有弱结合能力, 但借助质量作用定律, 仍会形成大量的弱结合复合物。冻干后用无水溶剂洗去配体, 获得的蛋白质分子中会有许多由配体结合时留下的“印迹”, 由于蛋白质分子在无水有机溶剂中具有结构刚性, 这些“印迹”得以保持, 用此方法制备的蛋白质称为“印迹蛋白分子”。“印迹蛋白分子”在水介质中会呈现出对原始配体极大的结合容量。这种高度选择性结合能力, 可用于专一性催化、分离纯化和生物传感器。

Marrienne Stahal 利用分子“印迹”技术将新的立体专一性引入酶分子中。他将胰凝乳蛋白酶与 N-乙酰-D-色氨酸共沉淀, 在环己烷中该沉淀可催化 N-乙酰-D-色氨酸乙酯的合成, 酯化速率达到  $7.5 \text{ mol}/(\text{mg 酶} \cdot \text{h})$ 。该酶在水溶液中并不具有合成 D-色氨酸乙酯的能力, 当酶在 D-配体溶液中进行沉淀时为酶引入了新的特性, 这种特性在多次重复使用过程中保持不变。“印迹”胰凝乳蛋白酶催化合成的 N-乙酰-D-色氨酸乙酯的光学纯度达到 98% 以上, 这一技术为新型人工催化剂的设计提供了有力手段。

#### 五、反向胶团的酶学研究

所谓反向胶团酶催化体系是指非极性有机溶剂中, 酶分子溶解在由表面活性剂形成的含水反向胶团内进行催化底物的转化。在适宜条件下, 反向胶团溶液是均相、热力学稳定的透明液体。

### 1. 反向胶团的形成与酶的包埋

当体系中水和有机溶剂同时存在时，两性表面活性剂分子会形成球状或椭球状胶束，其大小与蛋白质分子邻近（在同一数量级上）。当体系中水浓度高于有机溶剂时，形成常规胶团，反之，则形成反向胶团。

胶团的大小一般不超过几个纳米。由阴离子表面活性剂所形成的反向胶团的大小均匀，且与表面活性剂浓度无关。而阳离子表面活性剂则不同，所形成的胶团大小分布范围宽，表面活性剂浓度越高，所形成的大胶团所占比例越高。在有机溶剂中，反向胶团以动态存在，表面活性剂分子可以在胶团与主体溶剂中快速地进行互换，其在胶团分子上的停留时间约为7~10s。此外，处于胶团上的表面活性剂分子并非静止存在，而是连续地颤动。类似“漂浮在劲风中的羽毛”。然而，尽管表面活性剂分子有很高的流动性，但反向胶团的界面却能保持完好，并不被周围溶剂分子所穿透。由于该动态特性，在有机溶剂中反向胶团体系很容易达到平衡。例如，AOT在烷烃中只需简单摇动就可自发地形成反向胶团，所形成的胶团溶液保存数周乃至数月不会发生任何变化。建立包覆于反向胶团中的酶反应体系只需将冻干的酶或酶的水溶液加到含有表面活性剂的有机溶剂中，搅拌或振荡，酶分子便自发包覆到反向胶团之中。

### 2. 反向胶团包覆酶的催化特性

包覆在反向胶团中的酶催化反应动力学符合典型的 Michaelis-Menten 方程，但在微观非均相体系中所进行的酶反应动力学还涉及底物、抑制剂、激活剂及其他组分在有机溶剂和胶团相之间的扩散与分配。此外，当使用无机表面活性剂时，电荷层（双电层）的形成会引起胶团内局部 pH 值的改变（通常为 1~2 个 pH 值单位），改变程度由电荷的符号及表面活性剂结合的水量来决定。这是反向胶团酶催化中 pH 曲线与水溶液中有所偏离的根本原因，这种效应与固定化酶催化体系中 pH 值的变化情况相似。

在有机溶剂中的反向胶团可以溶解并包覆大量的水和其他极性底物。通常 1 分子表面活性剂可以包覆几十个化合物分子。水的存在导致产生水结合反向胶团，其形状和大小均与在低水含量体系中所形成的反向胶团不同。例如，在异辛烷/AOT 反向胶团中，随着  $[H_2O]/[AOT]$  从 0 提高到 50，胶团半径从 1.7nm 增大至 12nm。随着水化程度的提高，胶团的不对称性逐渐降低（由椭球形变成近似球形）。

胶团中水的理化性质与主体相有很大差异，包括酸度、黏度、极性等。当结合水程度较低时，由 AOT 形成的胶团中水的黏度约为主体相中水的 200 倍，其极性与三氯甲烷相当。随着水化程度的提高，这种差异越来越不明显。结合于反向胶团中的水的独特性质可能会对酶催化特性及活力产生较大影响。

### 3. 反向胶团酶学的应用

利用反向胶团包覆，可使酶“溶解”在非极性的有机溶剂中，从而使一些水不溶性化合物，如胆固醇、前列腺素、生物碱、脂肪等都可以作为酶催化的底物进行转化，同时也大大拓展了酶在有机合成方面的应用。例如，Veeger 及其合作者成功地利用反向胶团包覆三酶体系实现了孕酮的酶促还原。

在水溶液体系中，由于大部分底物处于离子化状态或高度水化状态，因而水解反应占据优势。对生成水的聚合反应（如糖和氨基酸聚合分别生成寡聚糖和肽）、脱氢和酯化反应，通过降低介质中的水含量，可使反应平衡点发生转移，提高反应产物的得率。反向胶团酶催化体系可以有效地实现这一目的。利用醇脱氢酶在反向胶团中催化异丁醇氧化成相应的醛，反应平衡常数比水溶液中提高  $10^6$  倍。反向胶团体系的出现，使酶分析方法在理论和应用上得到了发展。首先，酶法检测非水溶性化合物得以实现；其次，由于包覆在反向胶团中的酶

具有更高的催化活力和稳定性,使分析方法更加可靠和灵敏。

反向胶团在医药领域同样引起人们的极大兴趣。例如,在胶团体系中可将蛋白质药物分子用不溶于水的化合物进行化学修饰,制备与生物膜有较强相互作用的疏水性蛋白质,产生新药;将药物包覆在胶团内,可以建立药物体内运输的新方式。此外,含酶的纤微米颗粒或纤微米胶团通常具有良好的热稳定性,如已经制备出半径小于几十纤微米的反向胶团,包括其中的胰凝乳蛋白酶可在 80~90℃ 保持催化活力。

著名的膜研究专家 E. Maddy 曾指出:“蛋白质研究必须在水溶液介质中进行的观念并不是来源于蛋白质本身固有的特性,而是由于技术的限制,人为地将其局限在水溶液之中。”反向胶团酶学在过去无论在基础研究还是应用研究上都已取得了引人瞩目的进展。

## 六、水-有机溶剂两相体系

### 1. 两相体系的特点与构成

Antonini Lilly 工作小组分别于 1973 年和 1975 年将两相体系应用到生物催化反应中,从而对精细有机合成的发展起到了积极的推动作用。最初使用两相体系的目的在于提高水不溶性底物的浓度,如胆固醇的生物转化,后来以 Klibanov 为首的莫斯科小组利用两相体系作为反应介质成功地进行了有机合成反应,如酯和肽的合成。

### 2. 固定化催化剂在两相体系中的应用

在水/有机溶剂/固定化酶体系中,固定化过程可通过保护酶不受有机溶剂的变性作用而提高其稳定性,载体的类型和特性对酶活力和稳定性极其重要,当催化剂包埋在天然或合成的凝胶中时,胶的亲水-疏水平衡便是一个重要的影响因素。此外,载体性质和溶剂极性对底物和产物在固定化酶与溶液之间的分配起着决定性作用。

### 3. 两相体系的应用

两相体系作为有机溶剂酶催化的一种形式广泛应用于非水溶性底物的转化。例如, Fumhasin 等利用固定化或游离细胞在两相体系中实现了烷烃的环氧化反应。烷烃环氧化物的制备主要有两条途径,即氯乙酸法和过氧化氢法,这两种方法成本高、能耗大,存在副产物处理、污染、腐蚀和安全等方面的问题,研究人员一直致力于开发新的方法来进行取代。利用生物工程方法实现烷烃环氧化被认为是一个可能的取代途径。烷烃在适宜有机溶剂中的溶解度比水中高得多,从而在溶剂相中可达到较高的底物浓度,降低水相中底物和产物的抑制作用。

## 七、非水介质酶催化反应在有机合成中的应用

酶在有机介质中的催化研究为酶工程开辟了一个崭新的领域,其应用方兴未艾,前途广阔。在水溶液中,酶分子中的疏水氨基酸避开水而隐藏于分子内部,从而引起分子折叠。当周围环境中的水为非极性溶剂所替代时,酶分子内的疏水基团分散,导致三级结构的重排,这意味着酶分子构象在极端条件下会发生剧烈改变。近年来的研究结果越来越证明了人们所预期的结果,即非水介质中酶常会有高度的选择性,包括立体选择性、对映体选择性、区域选择性和化学选择性。这为非水介质酶催化在有机合成领域开辟了极有意义的新天地。

### 参 考 文 献

- 1 罗贵民主编. 酶工程. 北京: 化学工业出版社, 2002
- 2 袁勤生, 赵健, 王维育. 应用酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 1994
- 3 吴庆余编著. 基础生命科学. 北京: 高等教育出版社, 2002

- 4 周晓云主编. 酶技术. 北京: 石油工业出版社, 1995
- 5 袁勤生主编. 现代酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 2001
- 6 Tobin M B, Gustafsson C, Huisman G W. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10: 422
- 7 Kchner O, Arnoid F H. *Trends*, 1997~1998, 93: 95
- 8 张今, 李正强, 张红缨. *中国科学*, 1992, 8: 115
- 9 Coco W M, Levinson W E, Crist M J, et al. *Nat Biotechnol*, 2001, 19 (4): 354
- 10 Wood K V. *Promega Notes*, 1998, 65: 14~20
- 11 Hawkins E H, Butler B, Beck M, O'Grady M, Orr L, Wood K V. *Promega Notes*, 2002, 81: 22~26
- 12 Hannah R, Jennens-Clough M, Wood K V. *Promega Notes*, 1998, 65: 9~14
- 13 Faridi J, et al. *Clin Can Res*, 2003, 9: 2933~2939
- 14 余孝其, 游劲松, 谢如刚. 金属胶束——一类新的金属酶模型. *化学研究与应用*, 1997 (9): 219
- 15 杨日芳, 胡文祥, 恽榴红. 模拟酶研究新进展. *科学*, 1995 (11): 219



## 第三章 酶的分离纯化

酶分离纯化的最终目的就是要获得高纯度的酶，包括两个基本环节：分离和纯化。分离就是要将酶从原料中抽提出来，并尽可能少地引入杂质，得到粗酶溶液；纯化则是要将酶和杂质分离开来，或者有选择地将酶从包含杂质的溶液中分离出来，得到一定纯度的酶。酶的分离纯化总体步骤见图 3-1。

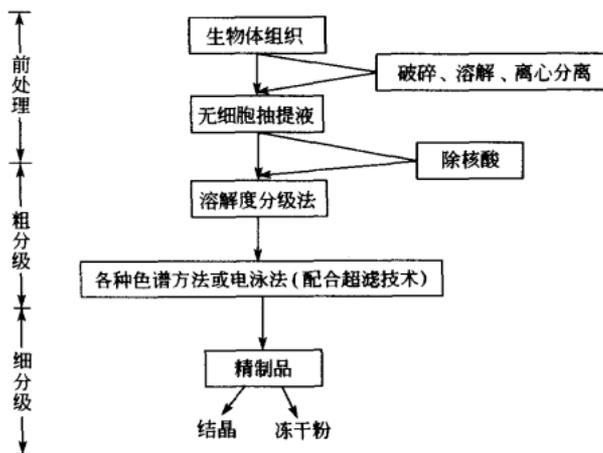


图 3-1 酶的分离纯化总体步骤

酶的分离纯化工作在研究和实际应用中都有重要意义。研究酶学性质必须使用纯酶才更有指导意义；而工业上，经过一定纯化的酶应用更加可靠，性能更加稳定，同时可以减少副反应。

### 第一节 酶的分离纯化策略

#### 一、基本原则

酶是一类有生物活性的蛋白质，其催化作用不仅依赖于它的一级结构，同时需要维持二级结构、三级结构乃至四级结构，才可以维持其活性，而整个分离纯化过程不免会使酶所处的温度、pH 值、压力等发生变化，或接触有机溶剂，这些操作都可能引起酶结构的变化，而导致酶发生变性失活，这将使纯化工作失去意义。因此要成功地将酶分离纯化，首要原则就是防止酶的变性失活，这一原则应该贯穿纯化工作的始终，在后期尤为突出，因为随着目标酶逐渐纯净、杂蛋白逐渐移除、溶液中的蛋白质浓度逐渐下降，蛋白质间的相互保护作用减弱，酶的稳定性也随之降低。

一般来说，凡是有助于预防蛋白质变性的方法与措施都可以考虑用于酶的分离纯化工作，涉及如下几个方面。

① 酶液的贮存以及所有操作都必须在低温条件下进行，尽管有些酶不耐低温，如线粒体 ATP 酶在低温下易失活，但多数酶是稳定的。一般选择 4℃ 左右，特别是在有机溶剂存

在的情况下更应小心。当温度超过 40℃ 时，蛋白质极不稳定，大多数蛋白质失活，但有些蛋白质甚至在煮沸下仍有活性（如极端嗜热酶），后面介绍的选择热变性就是利用了目标酶耐热性强的特点。

② 酶蛋白作为两性电解质，其结构受 pH 值的影响。大多数酶在  $\text{pH} < 4$  或  $\text{pH} > 10$  的情况下不稳定，应控制整个系统不要过酸、过碱，也要避免在调整 pH 值时产生局部酸碱过量。实际上最好让酶处于合适的缓冲体系中，这样可以避免操作过程中 pH 值的剧烈变化。

③ 酶和其他蛋白质一样，常易在溶液表面或界面处形成薄膜而变性，故操作时要尽量减少泡沫形成，如需搅拌则必须缓慢。

④ 重金属离子可能引起酶失效，加入适量的金属螯合剂有利于保护酶蛋白，避免因重金属离子导致的变性。

⑤ 酶与它作用的底物及其类似物、抑制剂等具有高的亲和性，根据这一特性发展了各种亲和分离法。同时，在纯化过程中添加这些物质，也往往会使酶的理化性质和稳定性发生一些有利的变化。

⑥ 微生物污染以及蛋白酶的存在都能使酶被降解破坏，可以通过无菌过滤除去其中的微生物，也可在酶液中加入防腐剂，如叠氮化钠等。在蛋白质提取过程中需要加入蛋白酶抑制剂防止蛋白质水解。常用的蛋白酶抑制剂有：PMSF，抑制丝氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶；乙二胺四乙酸（EDTA），抑制金属蛋白水解酶；胃蛋白酶抑制剂，抑制酸性蛋白酶；蛋白酶肽，抑制丝氨酸和巯基蛋白酶；胰蛋白酶抑制剂，抑制丝氨酸蛋白酶；还可将蛋白酶抑制剂混合使用。一般未经纯化的酶不适合长期保存。

⑦ 酶蛋白质溶液浓度低，酶经常迅速地失活，可能是玻璃容器等的表面效应使蛋白质变性。可在溶液中加入高浓度的其他蛋白质如牛血清白蛋白（BSA）来防止这种作用。在理想情况下，为了避免加入“污染”蛋白质，应立刻将稀释的蛋白质溶液浓缩。然而酶的反应通常是在较低的浓度（ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ）下进行，因而加入 BSA 是十分必要的。另外，由于玻璃表面的非特异性吸附可损失大量的纯化蛋白质（ $5\text{m}^2$  的玻璃表面可吸附  $1\mu\text{g}$  蛋白质），在溶液中加入 BSA 可大大降低这一作用。通常在酶活性测定中可加入  $0.1\text{mg}/\text{mL}$  BSA，而蛋白质贮存液中则可加入  $10\text{mg}/\text{mL}$  BSA。

## 二、纯化方法的选择

可供纯化的方法很多，传统的沉淀法、吸附法、离子交换法和选择性变性法仍然应用很普遍。而近年来，胶过滤法、亲和色谱法和聚焦色谱法等也得到了很快的发展，应用日益广泛。每种纯化方法都有各自的优点和缺点，总体上来讲，评价其好坏的标准有 3 点，即纯化倍数、酶活回收率和重现性。为了计算纯化倍数和酶活回收率，纯化过程的每一步都应进行酶活力和蛋白质含量的测定。

① 纯化倍数是纯化后样品的酶比活力与纯化前样品的酶比活力的比值，较大的纯化倍数表明比活力明显提高，说明操作的有效性，即纯度得到有效提高。

② 酶活回收率是纯化后样品的总酶活占纯化前样品的总酶活的百分比，这一比值越高表明该操作步骤对酶活的保存率越高，导致酶活的损失越少。纯化操作的每一步都不可避免地造成酶活损失，原因可能有两种：一是由于酶的部分变性；二是由于各种纯化方法的分辨率有限，部分酶同杂蛋白一起被除去。

③ 较好的重现性是一切方法可行性的必要条件，这就要求操作材料有较好的稳定性，操作条件易于控制。

有时较高的纯化倍数与较高的酶活回收率之间存在矛盾，如盐析操作时，沉淀范围越宽，酶活回收率越高，而纯化倍数越低。所以，应根据该操作步骤在整个纯化过程中所处的位置和作用，平衡考虑这两个因素，从而确定合适的操作条件。

酶具有催化活性，通过检测酶活性可以跟踪酶的来龙去脉，为酶的纯化过程选择适当的方法与条件提供直接的依据。而且，一旦酶蛋白发生变性失效，也可以通过酶活的监测及时发现。鉴于纯化过程中的酶活力测定的特殊性还应考虑3个问题。

① 由于测定工作量较大且要求迅速、简便，故常用分光光度法、电学测定法等测定；也可不采用酶活力的标准单位，而采用自行规定的单位，如直接以光密度值表示。

② 由于酶在分离纯化过程中可能丢失辅助因子，辅助因子的丢失会造成酶活力检测不到，因此有时需要在反应系统中加入相应的物质，如煮沸过的抽提液、辅酶、盐或半胱氨酸。

③ 由于纯化过程中引入的某些物质可能对酶的反应和测定有影响或干扰，故有时还应在测定前进行透析或加入螯合剂等。

比活力为单位质量的蛋白质中含有的酶活的单位数，即样品的总酶活除以总蛋白质量，单位为 U/mg。一般地，对于同一种酶在确定的测定条件下比活力也是确定的，而没有活力的杂蛋白的引入导致了表观比活力低于酶蛋白的真实比活力，所以，比活力越高，表明该酶的纯度越高。比活力也是反应酶催化性能的一个重要参数。

### 三、纯化策略

在开始纯化以前，要始终记住两点：第一，纯化策略是一个系统化的途径和方法。整个

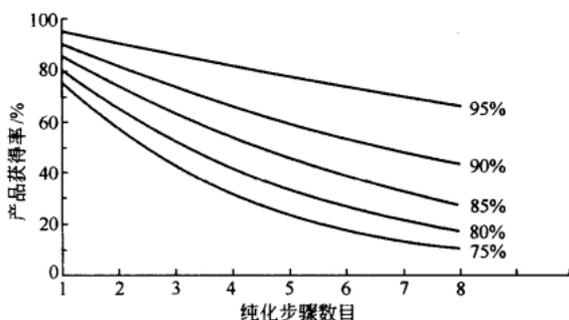


图 3-2 产品获得率与纯化步骤的关系

策略要考虑的因素很多，包括纯化过程中的应用条件、限制因素以及产物的最终用途等，最终要实现高效、经济的生产；第二，尽量缩减纯化的步骤，力求简单。一般而言步骤越多，最终产品获得率越低。图 3-2 表示产品获得率与纯化步骤的关系。

#### 1. 设定目标

在纯化酶蛋白的过程中，要想高效、经济地获得产品，首要的一点便是设定目标，包括设定纯度要求、蛋白质量、

生物活性保留度以及可支配的时间与成本。纯度的要求必须考虑到原料的性质、终产物的预期用途和特殊的安全性问题。其他因素同样会影响目标的优先顺序。例如，高获得率通常被定为最主要的目的，但如果产量只要求很少，它就显得不那么必要了。下面是设定目标的具体内容。

① 根据产物的最终用途设定其纯度要求，见表 3-1。

表 3-1 纯度要求的设定

纯度要求	用途
极高纯度(>99%)	医疗用途、活体研究等
高纯度(95%~99%)	X射线结晶、物理化学性质研究等
一般纯度(<95%)	N末端测序、生产抗原等

② 确认最关键的杂质。

③ 尽早确认可能残留杂质的性质。

④ 虽然纯化的步骤可以越少越好，但必须保证终产品的质量。如果产物未达到纯度要求且混有未知性质的杂质，则后续的任何实验结果都是不可靠的。

⑤ 应尽早除去可引起目标蛋白降解、失活或干扰分析的杂质。在每个纯化步骤中应考虑维持酶蛋白的生物活性。第一步就应当除去蛋白酶，并把目标蛋白转移至一个更“友好”的环境中。

⑥ 在一定的经济条件下，下游的酶蛋白生产加工应达到规定的纯度并得到安全可靠的产品。经济是一个复杂的问题。在商业生产中，诸如获得率、生产力及速率等因素都必须服从于“市场时机”这个指挥棒。当然可信度也很重要。

⑦ 如果产品将应用于生物制药方面，纯化过程要考虑特殊的安全性要求。如检测或除去传染因子、产生免疫性的污染物、产生肿瘤的危害物等。

## 2. 明确目标酶蛋白与主要杂质的性质

检查在什么条件下目标酶蛋白比较稳定，至少检测 pH 值和离子强度两个条件。

所有关于目标酶蛋白及关键杂质的性质的信息都有助于指导人们在纯化过程中选择分离技术和操作条件。目标酶蛋白的相关信息包括分子大小、等电点、溶解度等。单向、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (1D, 2D-PAGE) 可以用于指示样品成分、目标酶蛋白与主要杂质的性质。充分认识目标酶蛋白的“稳定平台”可有效避免蛋白质失活变性。专家建议至少检测一下适合的 pH 值和离子强度。表 3-2 显示了目标酶蛋白的不同性质是如何影响选择纯化策略的。

表 3-2 酶蛋白性质及其对纯化策略的影响

样品性质	对纯化策略的影响
温度稳定性	迅速,且在低温下操作
pH 值稳定性	对提取及纯化所用缓冲液的选择,对离子交换、亲和色谱或反相色谱条件的选择
溶解稳定性	对反相色谱条件的选择
离子强度	对沉淀及疏水亲和色谱条件的选择
蛋白酶敏感性	需去除蛋白酶或添加抑制剂
金属离子敏感性	需在缓冲液中添加乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二醇双(2-氨基乙基)醚-N,N',N'',N'-四乙酸(EGTA)
氧化敏感性	需添加还原剂
分子量	对凝胶过滤介质的选择

## 3. 建立分析的方法

选择快速、有效的检测方法要了解每个纯化步骤的效率，实验室应该建立以下分析通道：①一个快速、可靠的分析目标酶蛋白的方法（酶活力测定）；②蛋白质纯度的检测方法，这在下面谈到的“纯度的检定”有详细论述；③总蛋白质量的检测方法，主要有 Lowry 法和 Bradford 法（更适合于含脂质多的蛋白质）；④对必须清除的杂质的分析方法。

## 4. 尽量减少对样品的处理操作步骤

纯化过程中不宜重复相同的步骤和条件，否则只能使酶的总活力下降而并不能进一步提高酶的纯度。

## 5. 尽量减少添加剂的使用

从本质上可以稳定目标酶或改善提取效果时才使用添加剂，只选用容易去除的添加剂。

## 6. 尽早去除有破坏性的杂质

在实验室通常使用预装柱如 Sephadex™ G-25 凝胶过滤以达到简单的净化。适用于相对分子量大于 5000 的蛋白质，这个步骤的作用是使蛋白质脱盐、更换新的缓冲体系、去除

低分子量的蛋白质等。表 3-3 列举了一些常用的预装柱。

表 3-3 常用的预装柱

预装柱	添加样品量	回收样品量/mL	编号
HiPrep™ Desalting 26/10	2.5~15	7.5~20	17-5087-01
HiTrap Desalting	0.25~1.5	1.0~2.0	17-1408-01
Fast Desalting PC 3.2/10	0.05~0.2	0.2~0.3	17-0774-01
PD-10 Desalting	1.5~2.5	2.5~3.5	17-0851-01

## 7. 其他

尽早采用高效分离方法，将最昂贵、最费时的分离方法放在最后阶段。也就是说，通常先运用非特异、低分辨的操作方法，如沉淀、超滤和吸附等，这一阶段的主要目的是尽快缩小样品的体积，提高产物浓度，去除最主要的杂质（包括非蛋白质类杂质），随后是高分辨的纯化方法，如具有高选择性的离子交换色谱和亲和色谱，而将凝胶过滤色谱这类分离规模小、分离速率慢的操作单元放在最后，这样可提高分离效益。

不同的纯化方法有各自的特点和作用，这就决定了它们适用于纯化过程的不同阶段。例如，选择性热变性由于能以很小的代价除去大量的杂蛋白，而且不需要引入其他物质，也不增加液体的体积，所以可以放在最先进行。吸附法操作简便、迅速，且可以处理的样品量较大，吸附前不一定要求脱盐，因此亦可考虑安排在前面的步骤进行，但吸附后常要用盐溶液洗脱，接着用盐析法似乎是有利的。盐析的回收率一般比较高，又能同时达到浓缩样品的目的，但分辨率不高，所以可以放在比较靠前的位置，但大液量的脱盐是件麻烦事。结晶虽然可以达到一定的纯化目的，但它要求酶液已经达到一定的纯度和浓度，无疑应放在较后的环节。有机溶剂沉淀要求低温快速处理，如果酶液体积大，这种方法往往受设备容量的限制，故不宜放在前面的步骤里，但另一方面，随着酶纯度的提高，稳定性也随着降低，此时再用有机溶剂处理即使目标酶不变性，也会导致回收率的下降。其他如凝胶过滤法、聚集色谱法以及亲和分离法等虽然分辨率很高，但应用于大体积操作目前还存在一些问题，因此常放在稍后的步骤。

总之，进行酶的纯化工作之前，不仅要了解目标酶的物理、化学性质，还要对各种纯化分离方法的优缺点以及对样品的要求等有所了解，才能做到心中有数，同时注意前后步骤的衔接，考虑前一步骤对后面操作的影响，才可能机动灵活地加以应用，使纯化工作高效、有效地进行。

## 四、纯度的检定

纯化倍数和回收率是纯化方法和纯化条件的选择依据，用来跟踪酶活力和蛋白质的来龙去脉，而为了了解所获得的样品是否均一纯净，还要通过其他方法进行纯度检定。酶均一纯净性的检定主要有以下几种方法。

### 1. 电泳法

因该方法需要的样品量小而且具有较高的分辨率，是目前最为常用的方法。常采用的有醋酸纤维素薄膜电泳、聚丙烯酰胺不连续胶电泳和聚焦电泳。

样品在凝胶电泳上显示一条区带，可作为纯度的一个指标，但这只能说明，样品在荷质比方面是均一的，达到了“电泳纯”。如果在不同 pH 值下电泳都得到一条带，则提高了结果的可靠性。常用的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）只能说明样品在分子量方面是均一的，而且只适用于含有相同亚基的蛋白质。等电聚焦是根据等电点不同来分辨的，它有很高的灵敏度。

## 2. 色谱性质的考察

用线性梯度离子交换法或分子筛测验样品时，如果制剂是纯的，则各个部分的比活力应当恒定。分析型高效液相色谱法（HPLC）在证明蛋白质纯度方面的分辨率接近于电泳法。

## 3. 化学结构分析法

对于一个纯蛋白质来说，通过 N 末端的定量分析可以发现，每摩尔蛋白质应当有整数摩尔的 N 末端氨基酸。少量其他末端基的存在，常表示存在着杂质。如果只是定性地测定 N 末端，那么此法只适用于仅有一个肽链的蛋白质。

对样品进行总的氨基酸分析，也是检验纯度的一种方法。纯蛋白中所有氨基酸都成整数比。

## 4. 超离心沉降分析法

在高达 65000r/min 的离心力场情况下观测离心谱带，若出现明显的分界线，或者分步取出离心管中的样品，管号对样品浓度作图后，组分的分布是对称的，则表明样品是均一的。此法的优点是时间短、用量少，但灵敏度较差。

## 5. 免疫学法

纯化的酶样品在琼脂胶上与相应的抗体进行免疫反应，根据得到的沉降可以判断样品的纯度。

## 6. 其他方法

纯蛋白的  $A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$  为 1.75，因此，可用分光光度法检查蛋白质中是否有核酸存在。

需要说明的是，所谓“纯”是一个相对的概念，是指在其检验方法情况下检测不到其他杂蛋白，随着检测方法灵敏度的不同，相对纯度也有所不同。例如，进行聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳后，可以进行考马斯亮蓝染色，也可进行银染，后一种的分辨率远远高于前一种，也就是说用考马斯亮蓝染色显示纯净时，银染条件下则可能检测出其他杂蛋白。

按照严格的要求，只用一种方法鉴定蛋白质纯度是不够的，至少应该用两种以上的方法，而且是用两种不同的分离机理的方法来判断纯度才比较可靠。

酶的纯度用百分比来表示，要求 95%、99% 或 99.9%，应用目的不同，对酶的纯度要求也有很大不同，应选择满足实际需要纯度的检测方法。一般用来进行研究用的酶要求达到电泳纯。

# 第二节 酶液的制备和初分离

## 一、发酵液的固液分离

微生物产酶包括胞内酶与胞外酶，两种情况都涉及将微生物细胞与发酵液进行分离，所不同的是，胞内酶应收集细胞，经细胞破碎后得到目标酶，而胞外酶只需去除细胞。常用的分离方法主要是离心和过滤两种。

离心分离具有速率快、效率高、操作时卫生条件好等优点，适合于大规模分离过程，但该法的设备投资费用高，能耗较大。常用的离心分离设备有管式离心机和碟片式离心机等。在出渣方式上，除人工间歇出渣外，还可采用自动除渣离心机，可以连续操作。对于含固体量较多的发酵液还发明了倾析式离心机，依靠离心力和螺旋的推进作用自动排渣。

对于发酵液黏度不大的情况，采用过滤操作可以实现大量连续处理。为了提高过滤速率往往需要加入助滤剂，助滤剂是一种不可压缩的多孔微粒，能使滤饼疏松，工业上常用的助滤剂有硅藻土、纸浆、珠光石（珍珠岩）等。常用的过滤设备包括板框式压滤机、鼓式真空

过滤机。板框式压滤机的过滤面积大，过滤推动力能在较大范围内进行调整，适用于多种特性的发酵液，但存在不能实现连续操作、设备笨重、劳动强度大等缺点，所以较少采用。鼓式真空过滤机能连续操作，并能实现自动化控制，但压差较小，主要适用于霉菌发酵液的过滤。近年来错流过滤得到一定的应用，它的固体悬浮液流动方向与过滤介质平行，而常规过滤则是垂直的，因此能连续清除介质表面的滞留物，不能形成滤饼，所以整个过滤过程能保持较高的滤速。

## 二、细胞破碎

细胞破碎是指通过物理、化学或生物的方法使细胞壁或细胞膜破碎，以使得细胞内的酶得到释放。对于动植物来源的酶和微生物胞内酶的情况，细胞破碎是酶液提取过程中必要的一步。

不同材料破碎细胞的难易情况可能有很大差别，应根据此选择不同的破碎方法，使酶充分释放出来，同时避免条件过于激烈而导致酶蛋白变性失效。目前工业上最常用的仍是机械法。可以用于破碎细胞的方法见表 3-4。

表 3-4 常见的破碎细胞方法

方 法	举 例	原 理
细胞溶解	红细胞	渗透破碎细胞膜
酶降解	溶菌酶处理细菌	消化细胞壁
化学溶解/自溶	甲苯抽提酵母	化学方法使细胞壁渗漏
手动匀浆机	肝细胞	迫使细胞通过窄缝撕开细胞膜
研磨	肌肉等	剪切力破坏细胞壁或细胞膜
压榨机	细菌和植物细胞	迫使细胞在高压下通过小孔，剪切力破坏细胞
超声波	细胞悬浮液	剪切力和空化作用破坏细胞
振动玻璃球研磨机	细胞悬浮液	与玻璃球一起迅速振动，撕开细胞壁

(1) 机械破碎法 机械破碎中细胞所受的机械作用力主要有压缩力和剪切力。常用的设备有球磨机，将细胞与玻璃珠一起高速搅拌（或用超声波），这种方法需要采取冷却措施，以便除去由于消耗机械能而产生的过多热量，防止酶变性失效。高压匀浆器是大规模破碎细胞的常用方法，利用高压迫使细胞悬浮液通过针形阀，由于突然减压和高速冲击撞击环造成细胞破裂。

(2) 化学破碎法 又称化学渗透，是将细胞壁溶解作用和渗透压作用相结合，使细胞膜破裂而释放胞内物质。如酸、碱、表面活性剂（十二烷基磺酸钠，Triton X-100）、螯合剂（EDTA）、有机溶剂等，均可增大细胞壁通透性，降低与胞内产物的相互作用，使之容易释放。

(3) 酶溶法 利用溶解细胞壁的酶处理菌体细胞，使细胞壁受到部分或完全破坏后，利用渗透压冲击等方法破坏细胞膜。溶菌酶（lysozyme）适用于革兰阳性菌细胞壁的分解，辅以 EDTA 时也可用于革兰阴性菌。真核细胞壁的破碎需多种酶的作用，如酵母细胞的酶溶需用 Zymolyase（几种细菌酶的混合物）、葡聚糖酶和甘露聚糖酶等。植物细胞的酶溶则还需要纤维素酶的作用。

(4) 冻结-融化法 将细胞急剧冻结后在室温缓慢融化，反复操作多次达到破坏细胞壁和细胞膜的作用，适用于较脆弱的菌体。冻结的作用是破坏细胞膜的疏水键结构，增加其亲水性和通透性。另一方面，由于胞内水结晶使胞内外产生溶液浓度差，在渗透压作用下细胞膨胀而破裂。

(5) 超声波破碎法 利用发射 15~25kHz 的超声波探头处理细胞悬浮液。一般认为超声波破碎的机理是空化作用,通过空穴的形成、增大和闭合产生极大的冲击波和剪切力,使细胞破碎。这种方法适用于多数微生物细胞的破壁,但是能量利用率极低,产生大量的热,因此操作需在冰水或由外部冷却的容器中进行。所以这种方法不易放大,主要用于实验室规模的细胞破碎。

(6) 自溶 (autolysis) 就是将浓的菌体悬液在适宜的温度与 pH 值条件下直接保温,或加甲苯、乙酸乙酯以及其他溶剂一起保温一定时间,让菌体自溶液化。这种方法往往造成自溶液中成分十分复杂,而且还有破坏目标酶的危险。

随着微生物种类不同,破碎细胞的难易程度也有很大差异。霉菌通常比较容易对付,通过机械剪切、研磨或者加入细胞壁溶解酶就能解决。对于细菌,少量的材料可用超声波破碎和溶菌酶等处理,大量材料可用丙酮干粉法,或用自溶法。至于酵母细胞,由于其壁厚较难对付,常采用的办法有细胞壁溶解酶处理法、稀盐溶液振荡法、冷热破壁法。

### 三、抽提

根据酶的来源不同,抽提的处理方法存在一些差别,对于动物、植物、微生物材料的抽提分述如下。

① 从动物组织或体液中分离酶蛋白时,取到材料后要迅速处理,充分脱血后立即使用或在冷库里冻结保存备用。动物组织和器官要尽可能地除去结缔组织和脂肪,切碎后放入捣碎机,加入 2~3 倍体积的冷的抽提缓冲液,匀浆几次,直至无组织块为止,倾出上清液,即得细胞抽提液。

② 用植物材料分离酶时要注意植物细胞壁比较坚厚,要采取有效的方法使其充分破碎,同时植物中含有大量的多酚物质,在提取过程中会被氧化成褐色物质,干扰后续的纯化,为防止氧化作用,可以加入聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 吸附多酚物质,以减少褐变。另外,植物细胞的液泡内含有可能改变抽提液 pH 值的物质,因此应选择较高浓度的缓冲液作为提取液。

③ 微生物来源的酶分为胞内酶和胞外酶。胞外酶可以通过离心或过滤将菌体从发酵液中分离弃去,所得发酵液通常要浓缩,然后进一步纯化。对于胞内酶则首先进行细胞破碎处理。

在抽提过程中,值得注意的是,为了确保可溶性目标酶抽提出来,而且不致使其变性,应当注意以下问题。

① 缓冲液 使用类似生理条件下的缓冲液,常用 20~50 $\mu\text{mol/L}$  的磷酸缓冲液 (pH 7.0~7.5) 或 0.1 $\mu\text{mol/L}$  Tris-HCl (pH 7.0~7.5),或用含有少量缓冲液的 0.1 $\mu\text{mol/L}$  KCl。必要时,缓冲液可以加入 EDTA (1~5 $\mu\text{mol/L}$ )、巯基乙醇 (3~20 $\mu\text{mol/L}$ ) 或蛋白质稳定剂等来避免酶的变性。焦磷酸钠溶液和柠檬酸钠缓冲液,由于有助于切断酶和其他物质的联系,并有整合某些金属的作用,因此用得也很多。

② pH 值 首先应考虑的是酶的酸碱稳定性,选择的 pH 值不能超出酶的稳定范围。其次,从最佳的抽提效果而言,选择的 pH 值最好远离目标酶的等电点。也就是说,酶如果是酸性蛋白质,则宜用碱性溶液抽提,反之,碱性蛋白质宜用酸性溶液。最后,考虑到有利于切断酶和细胞内其他成分间可能有的联系,通常以选用 pH 4~6 为佳。

③ 温度 通常抽提温度多控制在 0~4 $^{\circ}\text{C}$  之间。如果待纯化的酶比较稳定,则可以例外。例如,胃蛋白酶就可在 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下保温抽提。

④ 其他 在细胞破碎时,某些亚细胞结构也往往受到损伤,这样就可能给抽提系统带

来各种不稳定因素。因此，有时在抽提液中还需要加入某些物质。在细胞壁（膜）破碎以后，溶酶一般不难抽提；至于膜结合酶，其中有的结合不太紧密，在颗粒结构受损时就能释放出来。抽提液的用量通常为原料的1~5倍，有时为了提高抽提效果，要进行反复抽提，这样溶剂量就可能大些。抽提后的残渣或发酵液的固体成分一般可用离心法或压滤法除去，植物原料的抽提液放在冷冻室中放置过夜就会澄清。近年来，为了使分离纯化工作简单化，开发了一种将抽提液的分离和相继的纯化步骤结合在一起的技术，称为“扩展床吸附色谱”。通过这一技术人们可以直接从含有颗粒的物料中截获所需的蛋白质或酶，移去颗粒成分，从而免除了离心、过滤，甚至浓缩等繁复的下游步骤。但是，它需要采用特殊的吸附剂和专门设计的柱装置，商品名为“STREAMLINE”。

#### 四、脱盐

有些情况需要降低离子强度，比如上离子柱之前。常用的除盐方法有透析法、纤维过滤法和分子筛色谱法等。透析法简单，只需玻璃纸或透析袋，但平衡时间较长，而且需特别注意透析袋的清洁。纤维过滤透析法，用泵使蛋白质溶液不断流经超滤膜制成的空心管，管外部与透析缓冲液相连，用另一泵让缓冲液不断在管外流动，这种方法由于透析的有效面积大增，使平衡时间缩短，缺点是纤维膜价格昂贵。分子筛色谱法常用 Sephadex G-25 或 Bio-Gel P30 柱色谱，蛋白质在柱中不被滞留而直接流出，盐等小分子则滞留在载体中。这种方法的缺点是处理样品的量较小。

#### 五、浓缩

抽提得到的提取液中目标酶浓度往往很低，如要得到一定数量的纯酶，需要处理的抽提液的体积比较大，不便操作。通过浓缩（concentration）可以提高浓度，缩小体积，这样一方面可使每一步的回收率升高，同时酶和蛋白质在浓缩溶液中的稳定性也较高。常用的浓缩方法有以下几种。

##### 1. 蒸发

一般的真空蒸发浓缩除了效率低、费时外，有时还要加热，并且可能产生泡沫，易使蛋白质变性失效，因此，不能用于稳定性较差的酶。同时蒸发过程还可能出现增色现象，影响产品的质量。过去实验室中也采用蒸发浓缩，即让暖空气流通过冷的酶液表面，或让暖空气流通过装有酶液的透析袋使其加速蒸发，但此法效率不佳。

工业生产上现在应用较多的是薄膜蒸发浓缩，即将待浓缩的酶溶液在高真空度的条件下变成极薄的液膜，并使之与大面积热空气接触，让其中的水分瞬时蒸发而达到浓缩的目的。薄膜蒸发浓缩器有3种形式：升膜、降膜和刮板。

##### 2. 超滤（ultrafiltration）

这是浓缩蛋白质的重要方法。在加压情况下，将待浓缩液通过一层只容许水分子和小分子选择性透过的微孔超滤膜，而将酶等大分子滞留，从而达到浓缩目的的一种技术。这种装置中膜的空隙易被大分子堵住而影响流速，所以超滤器常附有搅拌装置。近年来国外已经生产各种型号的超滤膜，可以用来浓缩分子质量（250~300000Da）不同的蛋白质。

这种方法的优点是：无热破坏、无相变化、保持原来的离子强度和pH值，如果膜选择适当，浓缩过程还可能同时进行粗分离，成本也不高，故较为常用。超滤可用于少量样品，也可用于工业生产规模，现在已有各种超滤装置可供选择。详见本章第三节。

##### 3. 凝胶过滤（gel filtration）

这是利用葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 或 Sephadex G-50 等能吸水膨润，而酶等大分子被

排阻于胶外的原理进行的一种浓缩。通常采用“静态”方式应用这种方法时，可将干胶直接加入样品溶液，胶吸水膨润一定时间后，再借助过滤或离心等办法分出浓缩的酶溶液。优点是：条件温和，操作简便，也没有 pH 值与离子强度等的改变，但可能导致蛋白质回收率降低。

#### 4. 沉淀法

用盐析法或有机溶剂将蛋白质沉淀，再将沉淀溶解在小体积的样品溶液中。这种方法往往造成酶蛋白的损失，同时应避免酶的变性失效。优点是浓缩的倍数可以很大，同时因为各种蛋白质的沉淀范围不同，也能达到初步纯化的目的。

#### 5. 吸附法

将蛋白质吸附到离子交换剂上，然后用少量盐溶液洗脱下来。这种方法将在本章第三节中详细讲述。

#### 6. 渗透浓缩法

将蛋白质溶液放入透析袋中，然后在密闭容器中缓慢减压，水及无机盐流向膜外，蛋白质即被浓缩；也可用聚乙二醇（PEG）涂于装有蛋白质的透析袋上，置于 4℃ 下，干粉 PEG 吸收水分和盐类，大分子溶液即被浓缩。此方法快速有效，但一般只能用于小量样品，而且成本很高。

#### 7. 反复冻融（freeze-thawing）

此法的原理是溶液相对纯水，会发生熔点升高、冰点降低的现象。实施时可采用两种方式进行：一种是先将溶液冻成冰块，然后使之缓缓融解，这样，几乎不含蛋白质和酶的冰块就将浮于液面，而酶等则融解并集中于下层溶液（至原体积的 1/4 左右）；另一种则是先让酶溶液缓缓冻融，然后再移去形成的冰块。冻融浓缩的主要问题是，浓缩过程可能会发生离子强度与 pH 值的变化，从而导致酶失效，其次是需要大功率的制冷设备。

## 六、初分离

在抽提液中，除了目的酶以外，通常不可避免地杂有其他小分子和大分子物质。其中，小分子杂质在相继的纯化步骤中一般会自然地除去，因此比较容易解决；而大分子物质包括核酸、黏多糖和其他蛋白质比较难对付。核酸和黏多糖往往会干扰以后的纯化，特别是细菌等的抽提液中常含有大量核酸，最好预先除去。核酸可加硫酸链霉素、聚乙烯亚胺、鱼精蛋白或  $MnCl_2$  等使之沉淀移去，必要时也可使用核酸酶。黏多糖则常用乙酸铅、乙醇、单宁酸和离子型表面活性剂等处理，有时也可用酶。这些杂质去除后，剩下的就是杂蛋白。纯化的主要工作，同时也是比较困难的工作，就是酶与杂蛋白的分离，详见本章第三节。

## 第三节 酶的分离纯化方法

按其依据的原理不同可以对各种纯化分离方法进行如下分类。

① 根据溶解度的不同，有盐析法、有机溶剂沉淀法、共沉淀法、双水相萃取及选择性沉淀法等。

② 根据分子大小的差别，有胶过滤（色谱）法、超滤法及超离心法等。

③ 根据电学、解离性质，有吸附（色谱）法、离子交换色谱法、电泳法以及聚焦色谱法等。

④ 基于酶和底物、辅助因子以及抑制剂间具有专一的亲和作用特点而建立的各种亲和分离法等。

⑤ 利用稳定性差异而建立的选择性热变性法、酸碱变性法和表面变性法。

## 一、根据溶解度不同建立的纯化方法

### 1. 盐析法

(1) 原理 向蛋白质的水溶液中加入中性盐,可以产生两种影响。一是盐离子与蛋白质分子中的极性基团作用,降低蛋白质分子的活度系数,使其溶解度增加。在盐浓度较低时以这种影响为主,称为盐溶现象。二是盐离子与水这种偶极分子作用,使水分子的活度降低,导致蛋白质水合度降低,蛋白质溶解度下降,在盐浓度较高时这种影响起决定作用,蛋白质会沉淀,称为盐析现象。

盐析纯化法就是根据酶和杂蛋白在高盐浓度的溶液中溶解度存在差别,而能够依次分别沉淀的原理而建立的一种纯化方法。

在盐析条件下,蛋白质的溶解度与溶液的离子强度间有如下关系。

$$\lg S/S_0 = -K_s I$$

式中,  $S$  为酶或蛋白质在离子强度为  $I$  时的溶解度,  $g/L$ ;  $S_0$  为酶或蛋白质在离子强度为 0 时(即在纯溶剂中)的溶解度,  $g/L$ ;  $K_s$  为盐析系数;  $I$  为离子强度。

在温度和  $pH$  值一定的条件下,  $S_0$  为一常数。所以上式可以改写为:

$$\lg S = \lg S_0 - K_s I = \beta - K_s I$$

式中,  $\beta$  为  $\lg S_0$ , 主要决定于酶或蛋白质的性质,也与温度和  $pH$  值有关,当温度和  $pH$  值一定时,  $\beta$  为一常数;  $K_s$  为盐析系数,主要决定于盐的性质,  $K_s$  的大小与离子价数成正比,与离子半径和溶液的介电常数成反比,也与酶或蛋白质的结构有关。

不同的盐对某种蛋白质具有不同的盐析系数。同一种盐对于不同的蛋白质也有不同的盐析系数。

对于某一种具体的酶或蛋白质,在温度和  $pH$  值等盐析条件确定(即  $\beta$  确定),所使用的盐确定(即  $K_s$  确定)之后,酶或蛋白质在盐溶液中的溶解度决定于溶液中的离子强度  $I$ 。

离子强度  $I$  是指溶液中离子的强弱程度,与离子浓度和离子价数有关。

$$I = \frac{1}{2} \sum m_i Z_i^2$$

式中,  $m_i$  为离子强度,  $mol/L$ ;  $Z_i$  为离子价数。

例如,  $0.2\mu mol/L$  的  $(NH_4)_2SO_4$  溶液,其中,铵离子浓度为  $2 \times 0.2\mu mol/L$ ,价数为 +1;硫酸根离子浓度为  $0.2\mu mol/L$ ,价数为 +2;则离子强度为:

$$I = \frac{1}{2} (2 \times 0.2 \times 1^2 + 0.2 \times 2^2) = \frac{1}{2} (0.4 + 0.8) = 0.6$$

对于含有多种酶或蛋白质的混合溶液,可采用分段盐析的方法进行分离纯化。

在一定温度和  $pH$  值条件下 ( $\beta$  为常数),通过改变离子强度使不同的酶或蛋白质分离的方法称为  $K_s$  分段盐析;而在一定的盐浓度和离子强度的条件下 ( $K_s I$  为常数),通过改变温度和  $pH$  值,使不同的酶或蛋白质分离的方法,称为  $\beta$  分段盐析。

### (2) 盐析的操作步骤

① 加入盐或盐的饱和溶液到适当的饱和度 为了避免局部盐浓度过高导致酶的变性,必须边搅拌边缓慢加入,因此这一步骤需要较长的时间。

② 沉淀与母液分离 为使以后的纯化具有较好的重现性,盐析后沉淀中夹带的母液应尽量除尽。常用的方法包括离心或压滤,这一步操作也要在低温下进行。盐浓度低时,离心比较容易,而过滤较难;浓度较高时,需要高速离心,但过滤较易。盐析如果在碱性条件下

进行，而盐浓度又很高时，盐析物常不易离心沉降，有时还可能出现上浮现象。

③ 沉淀再溶解 将盐析获得的沉淀溶于适当的缓冲液中，并除去不溶蛋白，这样相当于又一次纯化。有时也可用不同盐浓度的溶液对沉淀进行分级溶解。

为了使盐析操作达到较好的纯化效果和比较高的回收率，需要进行预备实验以确定合适的饱和度。也就是加入盐到不同的饱和度，测定各个饱和度下上清液和沉淀中的总酶活，找出目标酶蛋白开始大量沉降对应的饱和度和沉淀基本完全对应的饱和度，这个区间越窄纯化效果越好，而回收率越低，反之，这个区间范围越宽，回收率越高，但纯化效果较差，所以应根据这两个指标综合考虑确定适当的沉淀区间。

### (3) 影响因素

① pH 值 首先应保证酶液所处 pH 值不会导致酶的变性，必要时可以在缓冲液中进行盐析操作；另外某些盐的加入可能导致 pH 值的改变，如强酸弱碱盐硫酸铵可以使 pH 值下降；同时，控制盐析 pH 值可用于提高纯化效果。大多数情况，盐析的 pH 值宜接近目标酶的等电点，因为酶蛋白在其等电点附近溶解度小。有些情况，酶和杂蛋白能形成某种结合，从而干扰盐析分离。此时如控制  $\text{pH} < 5$  或  $\text{pH} > 6$ ，使它们带相同电荷，可以减少配合物形成，这样盐析效果常会有些改善，但应注意在这种条件下酶的稳定性与盐的溶解度。

② 蛋白质浓度 蛋白质浓度能影响盐析效果的重现性，因为蛋白质浓度不同，分级分离范围也往往会发生一些变动，即影响盐析界限。蛋白质浓度高，盐析界限宽，即低浓度的盐便可以使蛋白质沉淀，浓度太高时应该通过稀释调节盐析浓度界限，否则目标酶会与其他蛋白发生共沉淀作用。而另一方面，蛋白质浓度太低 ( $< 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ )，盐析沉淀一般很困难，有时甚至根本不能形成沉淀。在  $200 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$  范围内，沉淀虽能生成，但时间较长，而且回收率往往不高。为了获得较好的盐析效果，蛋白质浓度应控制在 2.5% ~ 3.0% 之间比较合适。

③ 盐 一般来说， $K_s$  越大，效果越好。实践表明，就阳离子而言，一价盐通常比二价盐有效；而阴离子则相反，二价盐比一价盐好。符合这种条件的盐有硫酸铵、硫酸钠等。硫酸铵最常用，它的最大优点是：溶解度大 ( $25^\circ\text{C}$  时达  $4.1 \text{mol}/\text{L}$ )；溶解的温度系数小 ( $0^\circ\text{C}$  为  $706 \text{g}/\text{L}$ ， $25^\circ\text{C}$  为  $767 \text{g}/\text{L}$ )，即使是在低温的溶解度范围内，几乎所有蛋白质都能盐析出来；价格便宜；浓度高时也不易引起蛋白质生物活性的丧失。

用硫酸铵进行盐析时，溶液的盐浓度通常以饱和度表示，即以饱和溶液中盐的浓度为 100%。调整溶液的盐浓度有两种方式，即以固体粉末或饱和溶液的形式加入。

当蛋白质溶液体积不太大，而要达到的盐浓度又不太高时，为防止加盐过程中产生局部浓度过高的现象，最好添加饱和硫酸铵溶液，浓的硫酸铵溶液的 pH 值通常是 4.5 ~ 5.5，调节 pH 值可用硫酸或氨水。测定溶液的 pH 值时，一般应先稀释 10 倍左右，然后再用 pH 试纸或 pH 计测定。

当蛋白质溶液体积很大，而要达到的盐浓度又很高时，则以加固体硫酸铵为宜，加入量可通过计算，也可以直接查表。加固体较为经济，也较方便，但所用的固体在使用前应经过反复的研细和烘干，并在不断搅拌下缓缓加入，以避免局部过浓，同时要防止泡沫大量生成。

④ 温度 就酶的稳定性和溶解度而言，盐析温度以控制在  $4^\circ\text{C}$  左右为宜。因为低温下有利于酶蛋白活性的保持，也可以降低其溶解度，更易盐析沉淀出来。

盐析法的优点是：简便、安全（大多数蛋白质在高浓度盐溶液中相当稳定）、重现性好，适用范围广泛，同时能够达到浓缩蛋白质的目的。

缺点是：分辨率差，纯度倍数低，同时还常有脱盐问题，影响后续操作。

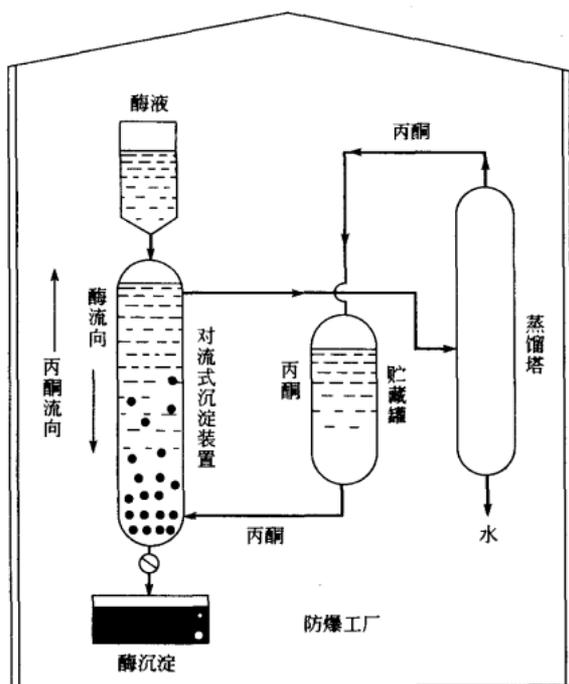


图 3-3 丙酮沉淀

剂蒸气无毒且不易燃烧。用于蛋白质纯化的有机溶剂中，丙酮的分离效果最好，引起的失效情况也较少，所以最为常用。

② 温度 因为大多数蛋白质遇到有机溶剂很不稳定，特别是温度较高（如室温）的情况下，极易变性失效，故操作应在  $0^{\circ}\text{C}$  以下进行。有机溶剂也必须预先冷却到  $-20\sim-15^{\circ}\text{C}$  并在搅拌下缓慢加入。沉淀析出后应尽快地在低温下离心分离，获得的沉淀还应立即用冷的缓冲液溶解，以降低有机溶剂的浓度。

③ pH 值 由于蛋白质处于等电点时溶解度最低，故有机溶剂沉淀也多选在靠近目标酶的等电点的条件下进行。

④ 离子和离子强度 中性盐在多数情况下能增大蛋白质的溶解度，并能减少变性影响。在进行有机溶剂的分级沉淀时，如果适当地添加某些中性盐，往往有助于提高分离效果。但盐的浓度一般不宜超过  $0.05\text{mol/L}$ ，否则会使蛋白质过度析出，不利于沉淀分级，甚至没有沉淀。

⑤ 蛋白质浓度 由于蛋白质本身是多价离子，对溶液的介电常数有相当贡献。当蛋白质浓度太低时，如添加有机溶剂浓度过高会造成变性，这时加入介电常数大的物质（如甘氨酸）可避免蛋白质的变性。蛋白质浓度过高时，溶液介电常数也相应提高，造成共沉现象而影响分离效果。所以合适的蛋白质浓度也是必须加以考虑的。

### 3. 液-液分离法

上面介绍的方法是利用溶解度差别进行的，那么，从广义上说，它们都是以分配系数的不同为基础的纯化方法，属于固-液类型。与此相对应的，近年来也开发了液-液类型的分离法，这种方法又称为双相水溶液分离法（aqueous two-phase separation）或双水相萃取。它实际就是利用酶和杂蛋白在不混溶的两液相系统中分配系数的不同而达到纯化目的的方法。

(1) 原理 将两种不同水溶性聚合物的水溶液混合时，当聚合物达到一定浓度时，体系

## 2. 有机溶剂沉淀法

(1) 原理 同盐析法原理相似，不同的蛋白质需要加入不同量的有机溶剂才能使它们分别从溶液中沉淀析出。有机溶剂在这个过程中主要作用是降低溶液的介电常数，因为分子间的静电引力和溶剂的介电常数成反比，加入有机溶剂，蛋白质分子间的引力增加，从而导致溶解度降低。有机溶剂的另一作用可能是部分地引起蛋白质脱水而沉淀。有机溶剂沉淀法的优点是分辨率高，溶剂容易除去。缺点是酶蛋白在有机溶剂中一般不稳定，易引起变性失效。

有机溶剂沉淀法的操作与盐析法基本相同。以丙酮沉淀为例说明其流程，见图 3-3。

### (2) 影响因素

① 有机溶剂 选择有机溶剂时的原则是：必须能与水完全混合，不与蛋白质发生反应，要有较好的沉淀效应，溶

自然分成互不相溶的两相，从而构成双水相体系。双水相体系的形成是由于聚合物的空间位阻作用，相互间无法渗透，而具有强烈的相分离倾向。近年来发现很多聚合物和盐（如 PEG/葡聚糖体系和 PEG/磷酸盐体系）也能形成双水相。当生物分子进入双水相体系后，由于其表面性质、电荷作用以及各种次级键作用力的存在，使其在上下相之间按其分配系数进行选择分配。在很大的浓度范围内，要分离物质的分配系数与浓度无关，只与其本身的性质和双水相体系的性质有关。

该技术是近年来涌现出来的具有工业开发潜力的各种新型分离技术之一，特别适用于直接从含有菌体等杂质的酶液中提取纯化目的酶。

#### (2) 主要优点

① 所形成的两相中均含有 70% 以上的水，这样的环境对于蛋白质来讲比较温和，而且处理量可大可小。PEG 和葡聚糖这类物质可作为蛋白质的稳定剂，即使在常温下操作酶活力损失也很少，所以多在常温下操作。

② 设备简单，仅需一个使粗提液与两相系统充分混合及放置的贮罐和一个离心力不高的普通离心机或使两相快速分离的分离器。

③ 操作方便、快速。回收率一般可达 80%~90%，而且可使菌体、细胞碎片、多糖、脂等与蛋白迅速分离。

#### 4. 共沉淀法

除了盐和有机溶剂能沉淀蛋白质外，离子型表面活性剂如十二烷基磺酸钠（SDS）或水溶性高聚物等也可以沉淀蛋白质。共沉淀法就是通过这些高分子物质的加入而使蛋白质分级沉淀以达到纯化的目的。

非离子型聚合物如聚乙二醇（PEG），当其分子质量大于 4000Da 时能够非常有效地沉淀蛋白质，与蛋白质共同沉淀下来的 PEG 通过过滤和透析均不能除去，但它的存在对蛋白质无害，并且不影响盐析、离子交换、凝胶过滤等后续操作。

聚丙烯酸可用来沉淀带正电的蛋白质，因为聚丙烯酸上带有大量的羧基，碱性蛋白质带有碱性基团，两者结合形成很大的颗粒沉淀下来。加入钙离子后，聚丙烯酸形成钙盐，使蛋白质游离出来，从而使蛋白质纯化。

#### 5. 等电点沉淀

蛋白质处于等电点时，本身净电荷量为零，分子之间的引力处于等电点状态时最大，而其他状态下，由于带相同电荷而表现出互相排斥的作用。蛋白质的溶解度随分子间引力的增大而变小，因而当其他条件相同时，处于等电点下最容易析出。

由于蛋白质在等电点时仍有一定的溶解度，沉淀往往不完全，故一般很少单独使用，更多的是用于其他沉淀法中的一个组合条件。

但当所需 pH 值与提取缓冲液的 pH 值相差甚远时，等电点沉淀是很成功的。例如，碱性蛋白质可在酸性条件下溶解并在高 pH 值条件下沉淀，而酸性蛋白质可在碱性条件下溶解并在低 pH 值条件下沉淀。具有中性等电点的蛋白质在中性 pH 值附近溶解，这时可用等渗的或略微高渗的缓冲液，有可能仅仅通过把缓冲液稀释到较低的离子强度就能沉淀这种蛋白质。但是有时候不可能用中性等电点来沉淀蛋白质。

#### 6. 反胶团萃取

向水中加入表面活性剂，水溶液的表面张力随表面活性剂浓度的增大而下降。当表面活性剂浓度达到一定值后，将发生表面活性剂分子的缔合形成水溶性胶团。反胶团萃取的研究始于 20 世纪 70 年代末期，历史还很短，技术尚不够成熟，但在一些研究工作中已经得到了很好的应用。

如图 3-4 所示，在有机相内形成分散的亲水微环境，使生物分子在有机相（萃取相）内存在于反胶团的亲水微环境中，消除了蛋白质难溶于与有机相中或在有机相中发生不可逆变性的现象。通过控制 pH 值、离子强度、有机溶剂的种类以及表面活性剂的种类和浓度等条件，可以改变蛋白质在两相中的分配系数，不同蛋白质表面电荷与相对尺寸的不同使得它们在两相中的分配系数不同，从而达到分离的目的。

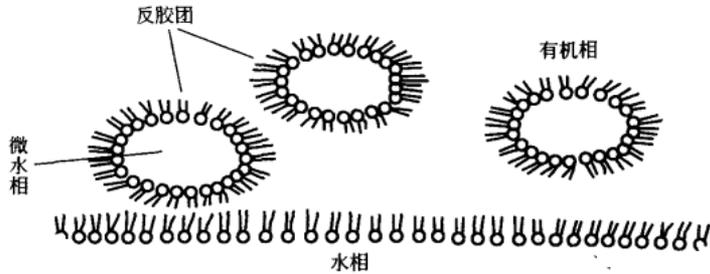


图 3-4 反胶团的形成

## 二、按照分子大小不同建立的纯化方法

### 1. 凝胶过滤（色谱）法（gel filtration chromatography, GFC）

(1) 原理 凝胶过滤通常以柱色谱的方式进行。柱中填充的分子筛介质是具有一定孔径的球状凝胶物质，常用于生物大分子的分离。

凝胶过滤法的原理如图 3-5 所示。色谱柱中装入适当孔径的凝胶物质以后，加入待纯化样品，再用适当的溶剂或缓冲液使样品在柱中自上而下地扩展。这样，样品中的各种分子将按其分子大小表现不同的色谱状态而分离。大于凝胶孔径的分子由于不能进入胶粒内部，只能沿胶粒间隙扩展，因而走的是一条较“短”的“路”，表现出较快的移动速度；反之，小于凝胶孔径的分子，由于它们能自由进出胶粒内外，从而走的是一条“长而曲折”的“路”，表现为较慢的下移速度。所以，待纯化样品通过一定长度的色谱柱后，不同大小的分子都将按先后顺序依次流出，彼此分开，达到纯化目的。由于某些分子被排阻在胶粒外，故这种色谱又称为凝胶排阻色谱（gel exclusion chromatography）。

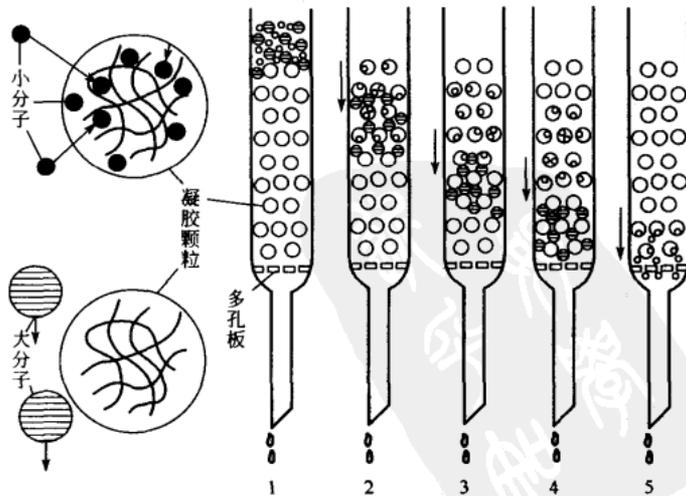


图 3-5 凝胶过滤原理

(2) 操作过程 柱色谱的操作一般包括如下环节：色谱介质的平衡、装柱、加样、扩展（包括洗涤和洗脱）以及与此同时进行的流出液成分（蛋白质或酶活性）的检测和收集。

商品凝胶必须经充分溶胀后才能应用，否则影响分离效果。将干燥凝胶加水或缓冲液在烧杯中搅拌、静置，倾去上层混悬液，去除过细粒子，反复数次，直至上层澄清为止，一般凝胶需浸泡 2 天，加热煮沸能加速溶胀过程。装柱后上样前要用缓冲液充分洗涤，使溶剂和凝胶达到平衡，这一过程往往需要 8h。扩展时需控制合适的流速，商品凝胶一般有各自的推荐流速，基本在 0.1~0.3mL/min 范围内。另外，应保证流速稳定。

目前流出液中蛋白质的检测主要还是依靠核酸蛋白质检测仪，即在线检测流出液在 260~280nm 处的吸光值，对于酶液还可以通过离线检测酶活力，以确定目标酶出峰时间。典型的凝胶过滤洗脱图谱见图 3-6。

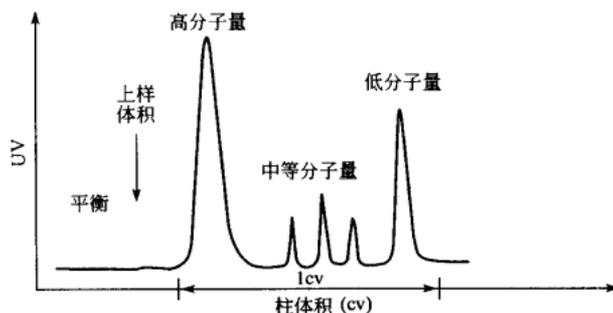


图 3-6 典型的凝胶过滤洗脱图谱

(3) 凝胶的选择 最常用的凝胶有如下几种：葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶排列组成的链状多糖（表 3-5）。上述各类凝胶都有很高的亲水性，能在水中膨润。膨润后的凝胶具有一定的弹性和硬度，并有很高的化学稳定性，在盐和碱溶液中都很稳定，可应用 pH4~9 的范围。但是，如果在 pH2 以下的酸性条件下长时间处理，则有被水解破坏的可能。此外，它们对氧化剂也较敏感。上述胶都没有易于解离的基团，因此很少发生非专一吸附。

表 3-5 常用的商品化凝胶过滤介质

名称	基质	制造商
Sephadex G 10~Sephadex G-200	交联葡聚糖	Pharmacia
Sepharose 2B, Sepharose 4B, Sepharose 6B	琼脂糖	Pharmacia
Sepharose CL 4B, Sepharose CL 6B	交联琼脂糖	Pharmacia
Sephacryl S 系列	聚丙烯酰胺-葡聚糖	Pharmacia
Sephadex 系列	高交联琼脂糖-葡聚糖	Pharmacia
Sepharose 系列	高交联琼脂糖(二次交联)	Pharmacia
Bio-Beads S~Bio-Beads X 系列	苯乙烯-二乙烯苯	Bio-Rad
Bio-Gel P 系列	聚丙烯酰胺	Bio-Rad
Bio-Gel A 系列	琼脂糖	Bio-Rad
TSKgel SW 系列	硅胶	ToyoSoda
TSKgel Toyopearl HW 系列	亲水性聚乙烯醇	ToyoSoda
TSKgel PW 系列	亲水性聚乙烯	ToyoSoda
TSKgel CW-35	纤维素	ToyoSoda
Cellulofine	纤维素	Chisso

表征凝胶特性的参数主要有下列各项。

① 排阻极限 指不能扩散到凝胶网络内部的最小分子的分子量。不同的凝胶过滤介质有不同的排阻界限。

② 分级范围 能被凝胶阻滞并且相互之间可以得到分离的溶质的分子量范围。因为不同孔径大小的凝胶过滤填料适用于分离分子量不同的蛋白质。分离大蛋白质必须用孔径较大的凝胶，反之，分离较小的蛋白质最好选用孔径较小的凝胶。

③ 分辨率 填料颗粒大小均一性越好，分辨率越高，填料颗粒越小，分辨率也越高。因此为获得高分辨率，需要颗粒小而均一的填料。然而这样的填料往往比较昂贵，且需较高的色谱压力。

④ 床体积 即 1g 干燥凝胶溶胀后所占有的体积。Sephadex G-50 的床体积为 9~11cm<sup>3</sup>/g 干胶。凝胶的床体积可用于估算装满一定体积的色谱柱所需的干燥凝胶量。

⑤ 流速 凝胶颗粒对中等强度的压力可能较为敏感。如果颗粒被蛋白质或缓冲液产生的压力压紧或压碎，而后，压碎的颗粒会阻止后来的缓冲液通过色谱柱，使颗粒压得更紧，更多的凝胶被破坏，从而造成蛋白质丢失。因此需要能耐高压的填料。一般来说，用孔径较大的填料时，其流速应低于孔径较小较结实的填料。此外许多填料由交联的复合材料组成，以增加它们的强度。大多数厂商会提供有关流速的资料，但要注意这是针对水质缓冲液而定的，如果缓冲液中有 10% 的甘油，最好把流速降低到推荐流速的 50%，以补充该缓冲液的附加黏度。

⑥ 空隙体积 指色谱柱中胶之间空隙的体积，这一数值可用分子量大于排阻极限的溶质测定，一般使用平均分子质量为 2000kDa 的水溶性蓝色葡聚糖 (blue dextran)。

其中以琼脂糖凝胶和葡聚糖凝胶最为常用。Sephadex G 是利用葡聚糖加交联剂制备而成的凝胶，是最传统的软凝胶之一，这一系列凝胶的具体特性见表 3-6。Sephacryl 是常用的琼脂糖凝胶品牌之一，机械强度低；而 Sepharose CL 是利用环氧丙烷交联制备的，机械强度较普通 Sepharose 高；TSK 凝胶是利用其亲水性合成高分子制备的凝胶过滤介质，有较高的机械强度，其中 HW 系列为半刚性凝胶，适用于中压液相色谱；PW 系列机械强度更高，适用于高压液相色谱；Superdex 凝胶是将葡聚糖共价交联到高度交联的琼脂糖珠体上制备的刚性凝胶。

表 3-6 Sephadex G 系列凝胶特性

类 型	颗粒直径/ $\mu\text{m}$	工作范围( $M_w$ )		床体积 (/mL/g 干胶)	膨胀时间 (20 $^{\circ}\text{C}$ )/h
		球 状	线 状		
Sephadex G-10	40~120	<200	<700	2~3	3
Sephadex G-15	40~120	<150	<1500	2.5~3.5	3
Sephadex G-25	10~300	1000~6000	100~5000	4~6	6
Sephadex G-50	10~300	1500~30000	500~30000	9~11	6
Sephadex G-75	10~120	30000~70000	1000~50000	12~15	24
Sephadex G-100	10~120	4000~150000	1000~100000	15~30	48
Sephadex G-150	10~120	5000~400000	1000~150000	20~30	72
Sephadex G-200	10~120	5000~800000	1000~200000	30~40	72

(4) 凝胶的再生 凝胶在每个分离过程结束后，由于本身没有什么变化，一般不需要特殊的处理，只需蒸馏水、稀盐或缓冲液充分洗涤后又可继续使用。经洗净的凝胶，通常可以膨润状态置入冷冻室中长时间保存，有时为了防止微生物污染，需加入抗菌剂，也可保存于 20% 的乙醇溶液中。

(5) 样品 凝胶过滤 (色谱) 法对样品浓度没有太严格的要求，但浓度高时利于提高分辨率。若样品中含有黏性成分则可能导致分离效果变差。样品的体积对分离效果的影响很

大,应该尽可能地小,一般不超过柱体积的2%。

(6) 洗脱液 洗脱液的组成一般不直接影响过滤效果。通常不带电荷的物质可用蒸馏水洗脱,荷电溶质可用磷酸盐之类的缓冲液,离子强度应控制在0.02mol/L左右,pH值由酶的稳定性和溶解度决定。如果色谱产品接下来要进行冷冻干燥,则可采用挥发性的缓冲液。

(7) 凝胶过滤的其他应用 凝胶过滤除了用于蛋白质分离以外,还有其他用途。

① 脱盐 这一点在本章第二节中已经涉及,而且也可用于溶解目标产物的缓冲液的交换。

② 分子量的测定 在凝胶过滤介质的分级范围内,蛋白质的分配系数与分子量的对数成正比,所以GFC可用于未知物质分子量的测定。

(8) 特点

① 分离机理简单,操作参数少,容易规模放大。

② 溶质与介质不发生任何形式的相互作用,不受pH值、盐和温度等影响,操作条件温和,产品回收率可接近100%。

③ 凝胶无须特殊的再生处理即可重复利用,适宜于各种分子的分离。

2. 超滤 (ultrafiltration)

(1) 膜过滤定义和分类 膜分离法即过滤分离法,是利用微孔超滤膜仅能选择性地透过一定大小的分子而达到分离目的的一类方法。

膜传递机理和推动力是多种多样的,如浓度差、压力差、电位差、温度差等。根据推动力和截留范围的不同,膜过滤主要有以下几种形式:渗透(osmosis)、透析(dialysis)、电渗析(electro-dialysis)、反渗透(reverse osmosis)、微过滤(micro-filtration)、超滤(ultra-filtration)、气体透过(gas permeation)等。

(2) 超滤概念 超滤是利用压力或离心力强行使溶质按分子量、形状、大小的差异进行分离,所需溶质分子阻留在膜的一侧,而小分子溶质则随溶剂透过膜压到另一侧,这样即可使大小溶质分子分开。

在膜分离技术范畴内,超滤的分离精度介于纳滤与微滤之间。超滤的定义域为截留分子质量0.5~500kDa左右,相应膜孔径大小的近似值为0.002~0.1 $\mu\text{m}$ 。

近20年来,超滤已成为膜分离中发展最快的一种,应用范围很广。例如,制水工业中净化水质,食品工业和医药工业中用以除去杂质,乳制品的浓缩以及多种生物制品的浓缩过程。

(3) 超滤膜 超滤膜应满足以下要求:有较大的透过速率和较高的选择性;有一定的机械强度,耐热、耐化学试剂以及不易被细菌侵袭;耐高温灭菌;廉价。

表征超滤膜的分离透过性能的参数主要有以下几个。

① 水通量 在一定工作压力、温度下,单位面积(在研究领域)或单个组件(在工业应用中),在单位时间内所透过的水量。膜的水通量除与温度、压力有关外,还取决于膜材料、膜的形态结构等物化性能,此外与操作条件,包括溶液的性质有密切的关系。商品膜的透水速率是指在一定温度、压力下纯水的透水速率。

② 截留分子质量与截留率 商品超滤膜多用截留分子质量或相近孔径的大小来表明产品的截留性能。截留分子质量是指能被膜截留住的溶质中最小溶质的分子质量。截留率指溶液中被膜截留的特定溶质的量占溶液中该物质总量的比率。

通常超滤膜所标称的截留分子质量,对具有相同分子质量的线形分子物质和球形蛋白质类分子,物质的截留率分别应大于或等于90%和大于或等于95%。目前常用超滤膜的截留分子质量的范围在1~1000kDa之间。

应该指出的是,截留率不仅仅取决于溶质分子的大小,还与下列因素有关:分子形

状，线形分子的截留率低于球形分子；吸附作用，如果溶质分子吸附在孔道壁上，会降低孔道的有效直径，因而使截留率增大；其他高分子物质的存在可能导致浓度极化层的出现，而影响小分子的截留率；温度的升高和浓度的降低也会引起截留率的降低。

制造超滤膜的材料很多，对膜材料的要求是具有良好的成膜性、热稳定性、化学稳定性、耐酸碱性、微生物侵蚀性和抗氧化性，并且具有良好的亲水性，以得到高的水通量和抗污染能力。目前常用的膜材料有如下几种。

① 聚砜、聚醚砜 属于疏水性膜材料，机械强度高，耐热、耐化学性良好，为目前应用较多的膜材料之一。

② 聚丙烯腈 (PAN) 主要采用共聚改性聚丙烯腈，具有良好的亲水性与耐化学性，特别是抗氯和抗溶剂性能好。由于材料的亲水性，其透水速率及耐污染性能优于聚砜类膜材料。

③ 聚偏氟乙烯 (PVDF) 有极优良的机械强度和耐高温、耐化学侵蚀性。使用温度范围为 $-40\sim 200^{\circ}\text{C}$ 以上，可以在强酸、强碱和有机溶剂条件下使用。对于特殊用途可采用该材料制备中空纤维超滤膜。

④ 醋酸纤维素 由纤维素系与乙酸酐、乙酸和硫酸相作用进行乙酰化而制的。优点主要是透过速率大，截留盐的能力强，制造容易且价廉。但这种膜最高使用温度只有 $30^{\circ}\text{C}$ ，而且操作 pH 值范围不能超过 $2\sim 8$ 。

部分超滤膜的特性见表 3-7。此外，聚氯乙烯 (PVC)、聚乙烯醇 (PVA)、聚砜酰胺 (PSA) 等也可制备中空纤维超滤膜，但实际上应用较少。

表 3-7 部分超滤膜的特性

截留分子质量/kDa	厂商	膜型号	膜材料	水通量/[ $\text{m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ ]
3	Amicon	P3	PS	0.018
8	D. D. S.	CA800PP	CA	0.014
10	Amicon	Ioplate	C	0.034
10	Amicon	Ioplate	PS	0.136
10	Diacel	DUY-H	PAN	0.035
20	Diacel	DUY-M	PAN	0.070
20	NITTO	NTU-2120	PO	0.037
20	NITTO	NTU-3250	PS	0.25
50	D. D. S.	GR51PP	PS	0.097
100	Amicon	Y100	C	0.062
200	Amicon	Ioplate	PS	0.085
500	D. D. S.	GR10PP	PS	0.10

注：PS 为聚砜，CA 为醋酸纤维素，C 为纤维素，PAN 为聚丙烯腈，PO 为聚烯烃。

(4) 操作 目前，工业上常用的超滤膜器件主要有下列 5 种类型：板框式、圆管式、螺旋卷式、中空纤维式、毛细管式，其主要特征见表 3-8。

表 3-8 几种超滤操作方式特性比较

项 目	板框式	圆管式	螺旋卷式	中空纤维式	毛细管式
生产成本对比	20~60	10~40	6~25	1~4	2~8
装填密度	低	低	适中	高	适中
抗污染能力	好	很好	适中	差	好
产生压降	低	适中	适中	高	适中
耐压性	可以	可以	适合	适合	可以
限于专门类型膜	非	非	是	是	是

各种操作方式均有不同的适用性，在工业上应用最为广泛的是中空纤维式，特别是在净化、分离中的应用。而在黏度较高的溶液净化、分离、浓缩过程中，则板框式或圆管式有更

大的适用性。

中空纤维超滤膜为超滤技术中的一个重要分支，它是由数百至数百万根中空纤维膜固定在圆筒形容器内构成的，其结构见图 3-7。严格地讲，内径为  $40\sim 80\mu\text{m}$  的膜称为中空纤维膜，耐压能力较高，也可用于反渗透。中空纤维超滤膜分为内压型及外压型两种。外压型原液在中空纤维外侧加压流动，流动容易形成沟流效应，凝胶吸附层的控制比较难；而内压型在中空纤维内腔中加压流动，为防止堵塞，需对料液进行预处理，除去其中的微粒。

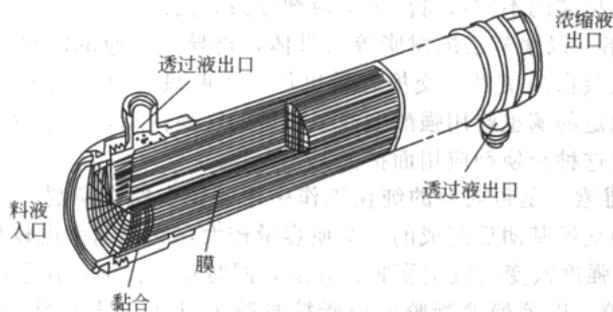


图 3-7 中空纤维超滤膜构造示意

由于中空纤维式超滤膜结构的特殊性，膜无支承体，成型工艺连续性、均一性良好，结构简单，超滤液易于保持纯净等优点，在超滤领域中的应用已占首要地位。

#### (5) 超滤特点

① 超滤过程无相际变化，可以在常温及低压下进行分离，条件温和，引起的酶蛋白变性失效少，因而能耗低。

② 设备体积小，结构简单，故投资费用低，易于实施。

③ 超滤分离过程只是简单的加压输送液体，工艺流程简单，易于操作管理，适合于大量样品的处理。

④ 缺点是只能达到粗分的要求，只能将分子质量相差 10 倍的蛋白质分开。

### 三、依据电学解离性质不同建立的纯化方法

#### 1. 离子交换吸附

(1) 原理 离子交换作用是指在固定相和流动相之间发生的可逆的离子交换反应。离子交换原理如图 3-8 所示。蛋白质的离子交换过程分为两个阶段：吸附和解吸附。吸附在离子

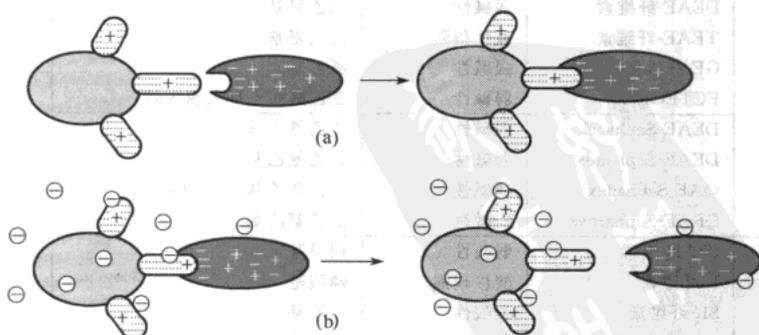


图 3-8 离子交换原理

●—球形支持物；⊕—带电配体；⊕—带电样品分子；⊖—平衡离子

柱上的蛋白质可以通过改变 pH 值或增强离子强度，使加入的离子与蛋白质竞争离子交换剂上的电荷位置，从而使吸附的蛋白质与离子交换剂解离。不同蛋白质与离子交换剂形成的键数不同，即亲和力大小有差异，因此只要选择适当的洗脱条件就可将蛋白质混合物中的组分逐个洗脱下来，达到分离纯化的目的。

(2) 离子交换剂 离子交换剂的母体是一种不溶性高分子化合物，如树脂、纤维素、葡聚糖等，它的分子中引入了可解离的活性基团，这些基团在水溶液中可与其他阳离子或阴离子起交换作用。按照母体的不同可将离子交换剂分为 3 类。

① 离子交换树脂 以聚苯乙烯树脂等为母体，再导入相应的解离基团而成。具有疏水的基本骨架，易导致蛋白质变性，交换容量也低，一般只有以羟基为解离基团的弱酸性树脂，个别对酸碱较稳定的酶也曾用强酸性或强碱型的交换树脂，但很少。近年来大孔型交换树脂出现，有可能使这种交换剂应用面扩大。

② 离子交换纤维素 是目前酶的纯化工作中用的较多的交换剂，它是以亲水的纤维素为母体，引入相应的交换基团后制成的。交换容量较大，交换速率也较高。缺点是易随交换介质的 pH 值、离子强度改变而发生膨胀、收缩，同时粒子较细，柱色谱时流速小。

③ 离子交换凝胶 以葡聚糖凝胶或琼脂糖凝胶为母体，导入相应的交换基团后制成。它的应用日益增多，交换容量较离子交换纤维素还要大，同时具有分子筛的作用。和纤维素一样，缺点也是易随缓冲液 pH 值和离子强度的不同而改变其交换容量、容积和流速。

按照离子交换基的不同又可以分为阳离子交换剂和阴离子交换剂；按照结合力的不同分为强离子交换剂和弱离子交换剂。

能与阳离子发生离子交换的称为阳离子交换剂 (cation exchanger)，其活性基团为酸性；与阴离子发生交换作用的称为阴离子交换剂 (anion exchanger)，其活性基团为碱性。解离基团为强电离基团的称为强离子交换剂，而带有弱解离基团的称为弱离子交换剂。应根据吸附的蛋白质的性质来选择交换剂种类。如羧甲基是弱酸性阳离子交换剂，磺酸基是强阳离子交换剂。因为对于酸性的质子，硫酸盐的 pK 比乙酸盐的低。阳离子蛋白质与两种交换剂均能结合，但要从强离子交换剂上将蛋白质解析下来，通常需要较高浓度的平衡离子。类似地，二乙氨基纤维素 (DEAE) 是弱碱性阴离子交换剂，季铵离子是强阴离子交换剂。蛋白质纯化过程常用的几种离子交换剂及其性质见表 3-9。

表 3-9 蛋白质纯化过程常用的几种离子交换剂及其性质

名 称	种 类	解 离 基 团	交 换 当 量 / (mmol/g)	
阴离子交换剂	氨乙基纤维素	弱碱性	氨乙基	0.1~1.1
	DEAE-纤维素	弱碱性	二乙氨基	
	TEAE-纤维素	碱性稍强	三乙氨基	0.5~1.0
	GE-纤维素	强碱性	胍乙基	0.2~0.5
	ECTEOLA	弱碱性	三乙醇胺+环氧氯丙烷	0.1~0.5
	DEAE-Sephacel	弱碱性	二乙氨基	1.3~1.5
	DEAE-Sephadex	弱碱性	二乙氨基	3.0~4.0
	QAE-Sephadex	弱碱性	二乙氨基-2-羧丙基	2.6~3.4
	DEAE-Sepharose	弱碱性	二乙氨基	0.11~0.15
	阳离子交换剂	CM-纤维素	弱酸性	羧甲基
P-纤维素		酸性较强	磷酸基	—
SE-纤维素		强酸性	磺乙基	—
CM-Sephadex		弱酸性	羧甲基	4.0~5.0
SP-Sephadex		强酸性	磺丙基	2.0~2.6
CM-Sepharose		弱酸性	羧甲基	0.1~0.14

(3) 操作过程 这类分离方法或以静态方式进行,或以色谱方式进行,而以色谱方式操作为多。其装置与前面所属的凝胶色谱装置类似。其操作过程一般包括3个环节:加样吸附、洗涤和洗脱,其中每一个环节都包含着目标蛋白质(或酶)和杂蛋白的分离。

① 加样 用缓冲液将柱料充分平衡后,即可上样,由于吸附过程是靠离子键的作用,所以这一过程能够瞬时完成,加样时流速并没有苛刻要求。

② 洗涤 在与加样条件相同的情况下,使相同的缓冲液继续流过色谱柱,以洗脱一些不是通过离子键作用吸附的滞留在柱中的杂蛋白,以提高分离效果。

③ 洗脱 当洗脱液中加入一定浓度的盐(多采用氯化钠)时,蛋白质即可与离子交换剂发生解离。主要有3种洗脱法,即恒定溶液洗脱、逐次洗脱和梯度洗脱。

恒定溶液洗脱时,样品体积应控制在床体积的1%~5%。色谱柱应细长些,高径比为20左右,这种方法所用的洗脱液体积往往比较大。

批次洗脱指用几个不同浓度梯度的盐溶液逐次洗脱,而梯度洗脱借助梯度混合仪使洗脱液中的盐浓度成线性升高。梯度洗脱的装置如图3-9(a)所示,右面容器装有低浓度盐溶液,左面容器为高浓度盐溶液,开始洗脱时,洗脱液中盐浓度与低浓度相同,并且呈直线上升,至最后一滴洗脱液,其盐浓度与原左面容器中盐浓度相同。如图3-9(b)所示,随着洗脱液中离子强度的增加,蛋白质与树脂上的解离基团之间的作用力逐渐降低,并且不同的蛋白质由于结合力不同,而被分别洗脱下来。

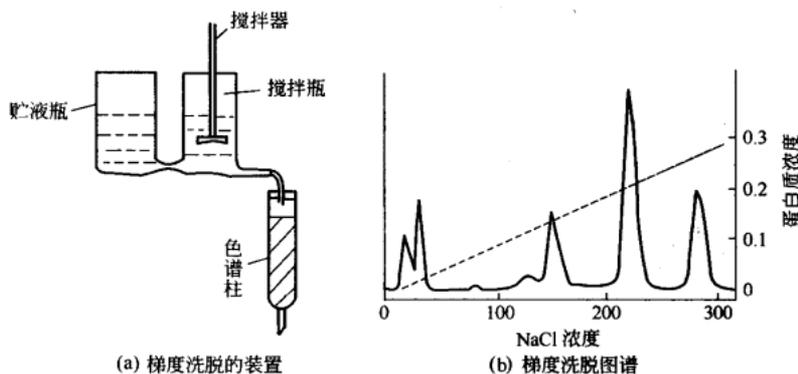


图 3-9 梯度混合仪工作原理

用批次洗脱和梯度洗脱这两种洗脱方式时,柱的长度可以短些(20~40cm),高径比为5左右。一般来说,梯度变化太快,分辨率下降,而变化过慢,洗脱液被稀释,洗脱时间也增加。所以应控制总洗脱体积为床体积的5倍左右。也可找出能使待分离蛋白质不与离子交换树脂相互作用,而大部分杂蛋白质则被吸附的条件。这样就有可能使样品通过离子交换剂得以过滤,并保留未吸附的物料,弃去被吸附的杂蛋白质。这在少数情况下也不失为一个有效的方法。

#### (4) 离子交换剂的选择

① 选择阳离子交换剂还是阴离子交换剂 因为酶蛋白是两性电解质,处于不同的pH值时,它可以带正电,也可以带负电,因此既可选用阳离子交换剂,也可选用阴离子交换剂。所以在这种情况下,一个重要的决定因素就是酶的稳定性,也就是说,如果目的酶在低于其pI(等电点)的pH值条件下更稳定,应选用阳离子交换剂,如果目的酶在高于其pI的pH值条件下更稳定,宜采用阴离子交换剂。

② 选择强型交换剂还是弱型交换剂 如果目标酶既可应用强型交换剂,也可以应用弱

型交换剂,那么应优先考虑选择弱型。但如果目的酶  $pI < 6$  或  $pI > 9$ ,则应考虑强型交换剂,因为只有强型交换基团能在广泛的 pH 值范围内保持完全解离状态,而弱型交换基适用的 pH 值范围较窄,多数弱型的阳离子交换剂在  $pH < 6$  或弱型阴离子交换剂在  $pH > 9$  时不带电荷,已经失去交换能力。DEAE 的 pK 值为 9.5,当  $pH > 9$  时,应改用 QAE 和 TEAE。而 CM 的 pK 约为 4,当  $pH < 3$  时,应改用 SE 或 SP 作为交换剂。

如果要分离的蛋白质需要很高浓度的盐才能洗脱下来,可以改换较弱的离子交换剂,改变 pH 值也可能解决问题,对于阳离子交换,提高 pH 值将会降低洗脱蛋白质所需的盐浓度。对于阴离子交换,则降低 pH 值会产生类似的效果。相反,如果要分离的蛋白质即使在很低的离子强度下也不能被交换剂所保留,那就要用较强的交换剂或调节 pH 值。

③ 流速 不同树脂对流速有不同的要求,应予以考虑。纤维素的流速一般低于凝胶, Sepharose 交换剂兼有高流速和高交换容量的优点。离子交换剂在使用前都必须进行预处理,以除去各种可溶性杂质,并将交换基团变成适当的交换剂。新的交换剂应先在蒸馏水中充分膨润,然后再用酸、碱反复处理。

④ 交换容量 交换容量是单位质量的干燥离子交换剂或单位体积的湿离子交换剂所能吸附的一价离子的毫摩尔数,是表征离子交换能力的主要参数。然而蛋白质与小分子化合物的离子交换特性有很大差别:蛋白质分子量大,树脂孔道对其空间排阻作用大,不能与所有的离子交换活性中心接触;离子交换吸附的蛋白质分子会妨碍其他蛋白质与未吸附蛋白质的离子交换基团作用;蛋白质带多价电荷,在离子交换中一般可与多个离子交换基团发生作用。因此,蛋白质的交换容量远远低于无机离子的交换容量。

(5) 缓冲液的选择 缓冲液的选择原则是不与树脂相互作用,即阳离子交换剂用阴离子缓冲液,阴离子交换剂用阳离子缓冲液,否则缓冲液离子要参与离子交换反应,影响溶液的 pH 值稳定。例如,用阴离子交换剂是选用 Tris 缓冲液,而阳离子交换剂用磷酸缓冲液。而有些缓冲液的官能团有兼性离子特征,如 HEPES 缓冲液,在  $pH 7.4$  时,既可用于阴离子交换色谱,也可用于阳离子交换色谱。

缓冲液还要选择合适的离子强度,为了让杂蛋白“穿过”或不吸附于树脂而获得显著的纯化效果,不一定在无盐的条件下加样,初始离子强度可以通过实验确定,在选定缓冲液及其 pH 值的条件下,在不同的离子强度下,用静态的方法使蛋白质溶液与树脂结合一段时间后,测上清液中的酶活力。一般地,低离子强度利于蛋白质与树脂的结合,当盐浓度提高到一定值时,上清液中开始出现酶活,应选择刚刚低于洗脱该蛋白质所需的离子强度作为初始离子强度。实际上,选比洗脱点低至少  $0.1 \text{ mol/L}$  的盐浓度是合适的。

缓冲液的 pH 值和离子强度的选择原则是开始加样时的条件尽可能接近洗脱条件,对于蛋白质来说,缓冲液的 pH 值选择在与蛋白质等电点相差一个单位,往往可取得较好效果。

(6) 离子交换特点 离子交换吸附法在应用上是目前仅次于盐析的一种纯化方法。它适用面广,几乎所有的蛋白质都可以分离;具有很高的分辨率;可以处理大体积的样品,从而避免浓缩的步骤;用这种方法制备蛋白质可以节省时间,而且一般可得到较高的总得率。

## 2. 电泳 (electrophoresis)

这是根据各种蛋白质在解离、电学性质上的差异,利用它们在电场中的迁移方向与迁移速度的不同进行纯化的一类方法。

根据电泳使用的技术分为显微电泳、免疫电泳、密度梯度电泳、等电聚焦电泳等。根据电泳的方向分为水平电泳和垂直电泳。根据电泳的连续性分为连续性电泳和不连续性电泳。根据有无支持物分为自由界面电泳 (free electrophoresis) 和区带电泳 (zone electrophoresis)。自由界面电泳是利用胶体溶液的溶质颗粒经过电泳以后,在溶液和溶剂之间形成界

面，从而达到分离的目的。区带电泳是样品在惰性支持物上进行电泳的过程，因为支持物的存在减少了界面之间的扩散程度和干扰的发生，而且多数支持物还具有分子筛的作用，提高了电泳的分辨率，区带电泳简单易行，成为目前应用较多的重要电泳技术。而区带电泳根据所用支持物的不同又分为纸电泳、琼脂糖凝胶电泳以及聚丙烯酰胺凝胶电泳等。

(1) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 聚丙烯酰胺凝胶电泳是最常用的电泳方法，这种电泳具有分子筛效应，因而可达到很高的分辨率。常用的聚丙烯酰胺凝胶电泳以不连续方式进行，也就是电泳的胶与缓冲体系都具有不连续性，称为 disc 电泳。由于它的不连续性导致样品在电泳分离过程中被浓缩成圆盘状薄层，从而显示了很高的分辨率。这种电泳由三部分组成：样品胶、成层胶和分离胶。样品胶和成层胶的孔径与缓冲介质都相同，而分离胶的孔径较前两者小。胶中的孔径与缓冲离子由于易解离、迁移率大，故称为先行离子；电极液缓冲离子在样品胶和成层胶的 pH 值条件下，迁移率慢，称为尾随离子。而样品在样品胶与成层胶中的迁移率通常介于先行离子和尾随离子之间。

电泳开始后，先行离子超前流动，并在它的后面留下一低离子浓度的低电导区。这种低电导区导致高电位梯度的产生，迫使尾随离子加速泳动，在高、低电位区间构成迁移快的界面，同时样品离子被压缩于界面中形成圆盘状薄层。由于样品中各组成成分所带的电荷不同，迁移率也不同，所以这种圆盘状薄层实际是样品中各组成成分相对应的亚圆盘薄层按迁移率堆叠而成的。当样品离子和尾随离子进入分离胶后，由于其间的 pH 值有利于尾随离子的解离，故它的迁移率显著增大，并迅速超过样品离子，导致高的电位梯度消失，样品开始在具有均一电场的分离胶中按照解离状况接受电泳分离。由于分离胶孔径较小，样品同时受到分子筛效应的控制，静电荷相同的蛋白质也能得到进一步分离，故而分辨率高。为了进一步提高其分辨率，又发展了 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等，SDS 是一种阴离子去垢剂，它能与蛋白质结合，破坏蛋白质分子内部和分子间以及与其他物质间的次级联系，使蛋白质变性；通常每克蛋白质约能结合 1.4gSDS，从而使蛋白质所带的负电荷远超过蛋白质原有电荷数，消除了不同蛋白质原有的荷电差异；再加上结合了 SDS 的蛋白质都是椭圆状，没有大的形状差异，因此蛋白质电泳迁移率仅取决于蛋白质的分子量。所以，SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳能用于而且主要用于蛋白质的纯度分析和分子量测定。

(2) 等电聚焦电泳 (isoelectric focusing) 这是利用蛋白质两性电解质具有等电点，在等电点的 pH 值下呈电中性，不发生泳动的特点进行的电泳分离。在电泳设备中首先调配连续的 pH 梯度，然后使蛋白质在电场作用下泳动到与各自等电点相等的 pH 值区域而不再继续泳动，从而形成具有不同等电点的蛋白质区带。

这种技术的关键是调配稳定的连续 pH 梯度。一般采用氨基酸混合物或氨基酸聚合羧酸的缓冲液。如已经商业化的载体 Ampholine 为数百种组分的混合物，各组分具有不同的等电点，一般有 3 种 pH 梯度范围供选择 pH 4~6、pH 8~10、pH 9~11。

一般的电泳容易受溶质扩散的影响而影响分离效果，而等电聚焦不存在这个问题，因此它的分离性能极高。但也存在一些缺点，如载体两性电解质对产品产生污染、pH 梯度的稳定性不高、操作过程容易发生凝胶脱水起皱等现象。

(3) 毛细管电泳 (capillary electrophoresis) 毛细管电泳利用毛细管为电泳装置，其内径为 25~200 $\mu\text{m}$ ，长度约为 100cm，壁厚约为 200 $\mu\text{m}$ 。毛细管电泳有如下特点：电泳管道微细，可有效抑制电泳操作过程中对流和混合的发生，分离精度高；毛细管的比表面积大，设备的冷却比较容易；由于毛细管的散热速度快，所以操作电场强度可达 100~300V/cm，电泳速度快，分离时间短；加样量少（不足 1 $\mu\text{L}$ ），样品浓度可以很低， $10^{-4}$  mol/L 即可。毛细管电泳是近年来发展很快的一种分析分离技术。

### 3. 聚焦色谱 (chromatofocusing)

等点聚焦固然分辨率很高,但这种方法操作困难,而且需要特殊的电泳装置,而近年来发展了一种聚焦色谱法,它是将色谱技术的操作方法与等电聚焦的原理相结合,兼有等电聚焦电泳的高分辨率和柱色谱简便的优点。

其原理是:当用特种的缓冲液滴定和淋洗填充在色谱柱中的特种多缓冲交换剂时,随着这种缓冲液的扩展,会在色谱柱中自上而下地建立起连续的 pH 梯度;将待纯化样品加入该色谱柱,其中的蛋白质组分就将随着多缓冲液的扩展按各自的等电点聚焦于相应的 pH 值区段,并随扩展过程中 pH 梯度的逐渐下降,最后分别从色谱柱先后流出,达到分离纯化的目的。因此,这一方法的关键是选用适当的多缓冲交换剂和多缓冲液,以便在色谱柱中形成 pH 梯度。另一方面也要使被分离的各蛋白质组分在多缓冲液扩展时能按各自的等电点分别聚焦到相应的 pH 值区段上。

### 4. 疏水色谱 (hydrophobic interaction chromatography, HIC)

(1) 原理 疏水色谱利用表面偶联弱疏水性基团的疏水性吸附剂为固定相,是根据蛋白质与疏水性吸附剂之间的弱疏水性相互作用的差别进行蛋白质分离纯化的洗脱色谱法。蛋白质通常含有被掩藏于内部的疏水残基,只有当蛋白质部分变性时,这些区域才与本体溶剂接近。但在蛋白质的表面也有一些疏水补丁 (hydrophobic patches),它们能与非极性部分相互作用而无须变性。增加盐的浓度能促进这些表面的疏水作用,即使可溶性很好的亲水蛋白质也能被迫与疏水物质结合从而吸附于固定载体上,只要降低流动相的离子强度就可以逐次洗脱吸附的蛋白质而达到分离的目的。

图 3-10 为典型的疏水色谱梯度洗脱图谱。

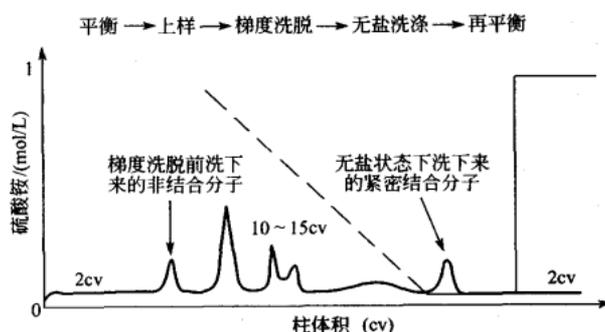


图 3-10 典型的疏水色谱梯度洗脱图谱

(2) 特点 HIC 主要用于蛋白质类生物大分子的分离纯化,由于在高浓度盐溶液中疏水性吸附作用较大,因此 HIC 可直接分离盐析后的蛋白质溶液;可通过调节疏水配基链的长度和密度调节吸附力,因此可根据目标产物的性质选择吸附剂;以依赖于盐的方式利用蛋白质表面的疏水性质,避免了蛋白质在有机溶剂中的变性;疏水性吸附剂种类多,选择余地大,价格与离子交换剂相当。

## 四、利用亲和作用进行纯化的方法

### 1. 吸附色谱

(1) 原理 吸附作用是物体表面的一个重要性质,理论上任何两相都可以形成界面,其中一相的物质或溶解在其中的溶质在另一相表面上发生密集行为称为吸附。溶质从溶液到停留在固体表面上的过程称为吸附现象。溶质的密集行为发生在固体与气体之间称为固-气

吸附，在固体与液体之间称为固-液吸附，在液体与气体之间称为液-气吸附。凡是能够将其他物质聚集到自己表面上的物质称为吸附剂，能聚集于吸附剂表面的物质称为被吸附物。吸附剂一般是固体或者液体，在吸附色谱中通常采用固体吸附剂。

固体物质之所以具有吸附作用，是由于固体表面的分子（原子或离子）与固体内部的分子所受到的作用力不同。固体内部的分子受到的是分子间的作用力，大小方向是对称的；而固体表面的分子所受到的作用力不对称，其向内的一面受固体内部分子的作用，作用力比较大，向外的一面受力较小。当气体或液体中的溶质分子在运动过程中碰到固体表面时，就会被吸附而停留在固体表面上。

吸附剂与被吸附物之间的相互作用力主要是范德华力。其特点是可逆的：在一定条件下，被吸附物被吸附到吸附剂的表面；而在另外某种条件下，被吸附物可以离开吸附剂表面，称之为解吸作用。

(2) 吸附剂的选择 根据同性相吸的原则，极性物质容易被极性表面吸附，非极性物质容易被非极性表面吸附；溶液中溶解度越大的物质越难被吸附。

吸附剂的种类很多，可以分为无机吸附剂和有机吸附剂。吸附剂通常由一些化学性质不活泼的多孔材料制成，比表面积大。常用的吸附剂包括硅胶、活性炭、磷酸钙、碳酸盐、氧化铝、硅藻土、泡沸石、陶土、聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖、琼脂糖、菊糖、纤维素等。此外，还可以在吸附剂上连接亲和基团而制成亲和吸附剂。通常用于酶的分离纯化的吸附剂有硅藻土、氧化铝、磷酸钙、羟基磷灰石和活性炭等。这些吸附剂一般在较低 pH 值、低离子强度的条件下对酶有较强的吸附作用，而在提高 pH 值和增加离子强度的条件下，酶可被解吸而洗脱下来。

(3) 洗脱剂的选择 同理，对于极性组分，用极性大的溶剂洗脱效果较好；而非极性组分则用非极性溶剂洗脱为佳。洗脱剂的种类有：饱和烃、醇、酮、酚、醚、卤代烷、水等。常用的洗脱剂按其极性增大排列如下：石油醚、环己烷、四氯化碳、三氯己烷、甲苯、苯、二氯甲烷、乙醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、正丙醇、甲醇、水、吡啶乙酸等。

吸附色谱是亲和色谱的基础，在吸附剂上挂上专一性的吸附基团就可转化为专一的亲和色谱。

## 2. 亲和色谱

生物物质，特别是酶和抗体等蛋白质，具有识别特定物质并与该物质的分子相结合的能力，这种识别并结合的能力具有专一性、排他性，即生物分子能够区分结构和性质非常接近的其他分子，选择性地与其中某一种分子相结合。这种特异性的相互作用称为生物亲和作用 (bioaffinity)。利用生物分子间的这种特异性结合作用而进行的分离纯化技术称为亲和纯化技术。

亲和色谱是亲和纯化技术中最为典型和常用的一种方法。酶和它的底物、底物类似物或竞争性抑制剂等通常都具有较高的生物亲和力，能专一地形成酶-配基配合物，而且这种结合是可逆性的。亲和色谱就是将这类能与酶发生结合的配基通过偶联反应固定于色谱柱料载体上，当样品流过色谱柱时，目标酶即迅速吸附于色谱柱上，而杂蛋白则在此过程中随缓冲液流出，而后可以通过在洗脱液中加入亲和力更强的配基，通过竞争作用使酶与配基解离，也可通过改变条件促进色谱系统的解吸，选择性地将酶从亲和吸附柱上分离下来。亲和色谱原理示意图 3-11。

亲和色谱法的操作与离子交换相似，包括吸附和洗脱两个主要步骤，但亲和色谱所用的柱料因有较高的专一性，所以往往需要选择和制备，而洗脱的方法也更加灵活，下面就柱料的制备和洗脱方法进行介绍。

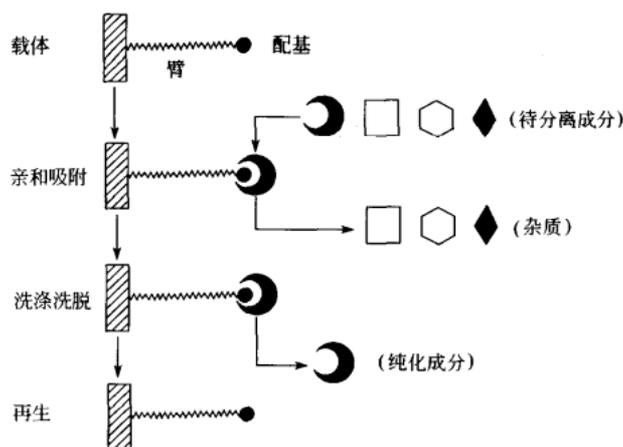


图 3-11 亲和色谱原理示意

(1) 柱料的制备 用于亲和色谱的柱料包括载体和配基两部分。对于载体，首先必须是亲水且结构疏松的，以便于待纯化分子自由地与配基接触；其次必须具有大量可以与配基发生偶联反应的基团，而且尽可能少地与杂蛋白发生非专一性吸附；最后要求载体稳定性好，要经得起操作过程中各种 pH 值、离子强度、温度变化的考验，并满足操作对流速的要求。常见的载体有聚苯乙烯衍生物、纤维素、微孔玻璃、葡聚糖凝胶等。

对于配基的设计应是建立在对酶的结构有一定了解的基础上的，多采用一些“族”专一性的配基。配基和待纯化的酶分子之间的亲和力的强度应适中，作用力太强，结合太紧，解吸就会发生困难，可能需要十分激烈的条件才能洗下；而结合力太弱，很难达到完全专一吸附的目的。除了能与酶蛋白结合的基团外，配基还应具有与载体偶联固定的活泼基团，而且与固相载体的结合不会影响或破坏配基和酶间的相互作用。

选择了合适的载体和配基后，应将配基偶联于载体，而在进行偶联之前，往往需要在配

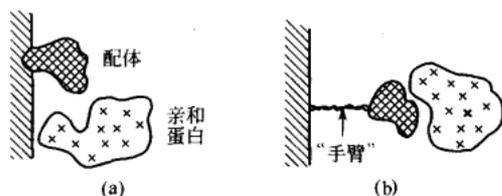


图 3-12 配基与载体间的一段短“臂”

(a) 无法“吻合”；(b) 借助“手臂”完全“吻合”

基与载体间加上一段短“臂”，如图 3-12 所示。这是因为直接偶联方式得到的亲和吸附剂，往往由于配基和载体间距离太近，而酶的活性部位一般又都埋藏在酶分子的深部，因此待纯化酶的结合基团和配基间无法表现亲和作用，通过加“臂”消除了这种空间位阻效应，使配基和待纯化酶的结合基团能较好地接近，以改善亲和吸附效果。

(2) 洗脱 洗脱以能削弱酶和亲和吸附剂间的相互作用为目的，可以采用的方法很多，下面举例说明。

① 改变温度 由于溶质从液相吸附到惰性固相载体的过程是一个放热过程，因此，升高温度能使吸附平衡移向解吸方向。而且，吸附过程愈是放热的，随着温度升高愈易被洗脱。通过线性温度梯度洗脱就可将不同的蛋白质分别洗脱下来。这种洗脱方法的优点是洗脱液中不需要加入盐类等外来因素。

② 改变 pH 值和离子强度 亲和吸附中有一种重要的作用力就是静电键，因此，在洗脱时，改变 pH 值有可能使酶和配基间原有的吸引力转变为排斥力，从而达到选择性解吸洗脱的目的，但是选择的 pH 值应不影响酶的稳定性。另一方面也可通过升高介质的离子强

度，在吸附剂与酶间造成离子屏蔽来削弱静电作用力，同上述改变温度一样，这种洗脱方法也属于非专一性洗脱。

③ 变性、断裂和降解 在常用的洗脱方法无能为力或无法采用时，可以选择较激烈的变性手段，例如，可以在洗脱液中加入变性剂盐酸胍等，在低 pH 值条件下使被吸附的酶构型发生可逆改变而解吸下来。但是，这种洗脱也可能导致酶的不可逆失效，而且即使是可逆变性，随时间延长也可能向不可逆转化，故在洗脱后应立即除去变性剂。

④ 专一性洗脱 利用含有与亲和配基或目标产物具有亲和结合作用的小分子化合物溶液为洗脱剂，通过与亲和配基或目标产物的竞争性结合，洗脱目标酶。进行这种洗脱时，常采用半抗原、底物类似物、竞争性抑制剂、辅助因子或其他能与被吸附的成分有特殊亲和力的物质。洗脱方式或者通过升高亲和洗脱剂浓度进行梯度洗脱，或者用几种解吸附剂进行脉冲洗脱。专一性洗脱选择性高，但洗脱的稀释度也较大，而且即使提高洗脱剂的浓度也不能有大的改善。

典型的亲和分离图谱见图 3-13。

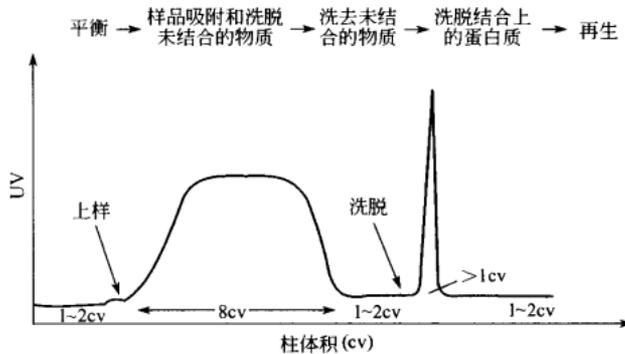


图 3-13 典型的亲和分离图谱

### 3. 亲和膜 (affinity membrane)

亲和膜利用亲和配基修饰的微滤膜为亲和吸附介质，进行亲和纯化目标酶，是固定床亲和色谱的变形。传统的固定床色谱利用多糖凝胶或硅胶等的多孔粒子为固定相，床层压降随流速线性增大，而且易发生压密现象，在较高压力下，流速随压力的升高而下降，所以色谱操作的速度受到很大限制。柱色谱多采用径向放大的方式提高处理量。在柱体积一定的情况下，将柱子做成短粗形有利于提高分离速度，而这个短粗形状的极限就是微孔膜，膜厚就是床层高度。

这种亲和膜在原理和操作上与亲和色谱并无太大差别，但却有自己的优点：传质阻力小，达到吸附平衡的时间短，配基利用率高；压降小，流速快，设备体积小，配基用量低等。但是也存在分辨率低、膜易污染等缺点。

### 4. 亲和沉淀 (affinity precipitation)

亲和沉淀是生物亲和相互作用与沉淀分离相结合的蛋白质分离纯化技术。根据亲和沉淀的机理不同，分为一次作用亲和沉淀和二次作用亲和沉淀。

(1) 一次作用亲和沉淀 水溶性化合物分子上偶联有两个或两个以上的亲和配基，前者称为双配基，后者称为多配基。双配基或多配基可与含有两个以上亲和部位的多价蛋白质产生亲和交联，进而增大为较大的交联网络而沉淀。

(2) 二次作用亲和沉淀 利用一种特殊的载体固定亲和配基来制备亲和沉淀介质，这种

载体是一种在物理场（如 pH 值、离子强度、温度和添加金属离子等）改变时溶解度下降，发生可逆性沉淀的水溶性聚合物。亲和和介质结合目标酶分子后，通过改变物理场使介质与目标蛋白质共同沉淀的方法称为二次作用亲和沉淀。利用上述机理进行亲和和沉淀后，离心或过滤回收沉淀，即可除去未沉淀的杂蛋白，沉淀经过适当清洗或加入洗脱剂即可回收纯化的目标产物。

亲和沉淀具有如下优点：配基与目标酶的亲和结合是在自由溶液中进行的，无扩散传质阻力，结合迅速；亲和配基裸露在溶液中，可以更有效地与酶结合，使配基利用率提高；容易规模放大；适用于高黏度或含有微粒的处理液。

### 5. 反相色谱

反相色谱是基于各蛋白质或小分子肽与色谱介质疏水表面的可逆作用来达到分离效果的。样品被结合在柱子上，随着条件的改变各成分被逐次洗脱而分开。由于反相矩阵的自身性质，样品和介质之间的结合是十分牢固的，洗脱时经常要用到有机溶剂和其他的添加剂（如离子配对剂等）。通常洗脱是靠逐渐增大有机溶剂的浓度来实现的，最常用的有机溶剂是乙腈。样品在结合、洗脱分离的过程中被浓缩、纯化。典型的反相色谱梯度洗脱图谱如图 3-14 所示。

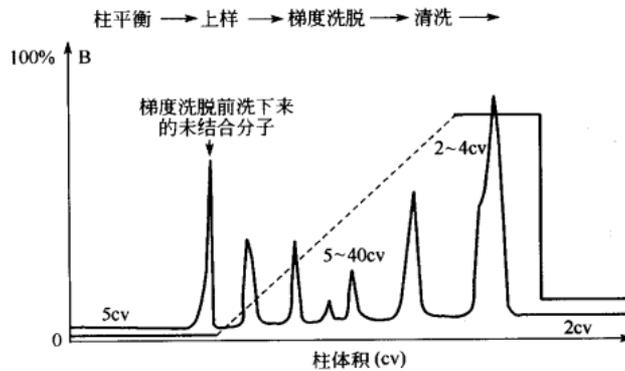


图 3-14 典型的反相色谱梯度洗脱图谱

反相色谱技术通常适用于核苷酸片段或肽段的最后精制阶段。对于蛋白质纯化，如果要求活力的复原和结构区域的正确，不建议使用该技术，因为大部分蛋白质在有机溶剂中都会失活变性，只有少数蛋白质可以幸免，故在此只简略介绍反相色谱。

## 五、根据稳定性差别建立的纯化方法

酶的活性以酶分子具有特定活性构象为基础，因此在分离纯化过程中一般应避免使用过于激烈的方法与条件，以防止酶的变性、失效。而分离纯化是以得到纯的且有生物活性的酶为目的，在不破坏目标酶的前提下可以采用某些激烈的手段，选择性变性法就是根据酶和杂蛋白在某种条件下稳定性的差别，采用激烈的手段使杂蛋白变性而除去的方法。这种方法是建立在对酶的稳定性有一定了解，而且某些情况下酶的稳定性要远远高于杂蛋白的情况下，也就是充分发挥目标酶的“优势”，使之与杂蛋白分离。

### 1. 选择性热变性 (selective heat denaturation)

如果待分离的酶相当耐热，就可采用这一方法，即在严格控制的条件下，将酶溶液迅速升温到某一温度，并保温一定时间，而后迅速冷却，这样，大量不耐热的杂蛋白就将变性析出，通过离心可除去，而酶的总活力损失可很少，同时比活力大大上升。个别酶对热特别稳

定，如胰蛋白酶、胰核糖核酸酶、溶菌酶等在酸性条件下甚至可加热到 90℃ 而不被破坏，利用这一方法则更为有利。

为了使选择性热变性法有更大的适用范围，可在酶溶液进行热处理前，加入该酶的底物、辅酶、竞争性抑制剂、保护巯基的还原剂等，以增大酶和杂蛋白间的耐热性差别。在应用选择性热变性方法时，应在预实验中改变处理温度和处理时间，通过酶活回收率和比活力确定最佳处理条件。另外还应该注意严格控制溶液的 pH 值，因为不同 pH 值条件下酶的热稳定性是有差别的，只有在一定的 pH 值条件下，才可能使操作具有较好的重现性。同时在样品溶液有蛋白酶污染的情况下，应用此法应特别谨慎。

### 2. 选择性酸碱变性法

如果在一定温度下，目标酶表现出了强耐酸性或耐碱性，而这一条件对大多数蛋白质是不稳定的，那么可以将溶液的 pH 值严格控制在一定范围内并处理一定时间，同样可达到一定的纯化效果。

例如，从麦芽中分离  $\beta$ -淀粉酶，在  $\text{pH} > 3$  时，只有  $\alpha$ -淀粉酶失效，但是，在  $\text{pH} 3$  以下，则两种淀粉酶都会失效。

和选择性热变性相比，酸碱变性应用得不多，主要原因可能在于操作较为复杂，条件不易控制，而且纯化效果较差。

### 3. 表面变性法

很早就有人利用酶溶液和惰性液体（三氯甲烷）混合振荡，造成选择性表面变性来制备过氧化氢酶、醇脱氢酶和  $\alpha$ -淀粉酶等。振荡处理后通常分成 3 层：上层为未变性蛋白质，中间层为乳浊状变性蛋白质，下层为三氯甲烷。这种处理时间通常不宜过长，否则将导致所有蛋白质变性。利用泡沫形成也可达到选择性表面变性的目的，例如，通氯气到磷酸核糖变位酶和核苷磷酸化酶的溶液中，可使磷酸核糖变位酶表面变性而纯化核苷磷酸化酶。以后又有人设计了一种表面变性泡沫分离器，用于回收有效成分以进行酶的纯化。

应用表面变性法时需控制的因素很多，除了泡沫大小以及泡沫形成的速率外，pH 值和温度十分重要。和酸碱变性一样，它的应用面远不如选择性热变性。

总之，选择性变性灵活性很大，如果发挥得当，可能极大地提高酶的纯度。成功的关键在于严格控制条件，除了所选用的主要因素外，还需注意其他因素，其中也包括蛋白质浓度，蛋白质浓度太低时，一般不宜应用此法。

## 第四节 酶的结晶

结晶 (crystallization) 是溶质从过饱和状态的液相或气相中析出，并生成形状一定、分子有规则排列的晶体的现象，是一种制备纯物质的有效且常用的方法。结晶包括 3 个过程：形成过饱和溶液、晶核形成和晶体生长。溶液达到饱和是结晶的前提，过饱和度是结晶的推动力。

工业上为得到过饱和溶液一般采用的方法有：将饱和溶液冷却、将部分溶剂蒸发、化学反应结晶和盐析结晶。这些方法在制备酶的结晶时同样可以考虑，但是往往酶的结晶需要在极其温和的条件下使酶溶液极为缓慢地接近结晶的条件，才能使酶结晶析出，否则，酶就可能以无定形的形式直接沉淀出来。为此，通常进行结晶时，或是通过毛细管、或是借助透析方式缓慢地加入硫酸铵等沉淀剂，待溶液呈现微弱的浑浊后，再移入某一适宜温度下静候结晶出现，也可在加入相应的试剂后，再缓慢地改变 pH 值和温度，使之逐渐接近结晶条件。

晶种的产生有两种情况，即自发生成和外界添加晶种。生物产物的结晶操作一般采用后

一种方法, 因为对于溶液黏度较高的情况, 晶核很难产生, 而在高过饱和度下, 一旦产生晶核, 就会同时出现大量晶核, 溶液发生聚晶现象, 产品质量不易控制。

在晶体的生长过程中, 溶质分子移向晶核, 结晶逐渐长大, 这是一个自发的过程, 因此, 结晶需要的时间很不相同, 短的几小时, 而最长的可能以年计。

结晶质量直接反映酶制剂质量的好坏, 评价晶体质量的主要指标包括: 晶体的大小、形状(均匀度)和纯度。工业上通常需要得到粗大而均匀的晶体, 这样的晶体对过滤和洗涤等操作都比较容易, 在贮存过程中也不易结块。提高晶体质量可采用的途径包括如下几种。

(1) 合适的饱和度 饱和度过小无疑不利于结晶的生成, 而饱和度过大又会出现下列问题: 成核速率过快, 产生大量微小晶体, 结晶难以长大; 晶核生长速率过快, 容易在晶体表面产生液泡, 影响结晶质量; 结晶器壁上容易产生晶垢, 给结晶操作带来困难。对于酶溶液, 浓度一般以 1%~5% 为宜。

(2) 纯度 酶溶液应该达到相当的纯度, 除了少数例外, 不纯的溶液通常不能得到结晶, 因为晶核很快地为杂质所包围掩盖, 无法长成晶体。

(3) 温度 操作温度的不同可能影响晶形和结晶水, 因此结晶操作的温度一般控制在较小的范围内。对于冷却结晶的情况, 如果降温速度过快, 溶液很快达到较高的过饱和度, 生成大量微小晶体, 会影响结晶产品的质量。

(4) 搅拌 增大搅拌速率可提高成核和生长速率, 但搅拌速率过快会造成晶体的剪切破碎。

(5) 溶剂和 pH 值 结晶操作过程中选择溶剂和 pH 值应以降低酶蛋白的溶解度为目的, 这样可以提高结晶的回收率, 当然应保证在酶的稳定范围内。

(6) 重结晶 有时为了进一步提高晶体的纯度, 可以进行重结晶操作, 特别是在不同溶剂中反复结晶往往可取得较好的效果, 因为杂质和结晶物质在不同溶剂和不同温度下的溶解度是不同的。

## 参 考 文 献

- 1 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展. 北京: 科学出版社, 1999. 236
- 2 陶慰孙, 李惟, 姜涌明. 蛋白质分子基础. 北京: 高等教育出版社, 1999. 71
- 3 徐凤彩. 酶工程. 北京: 中国农业出版社, 2000. 71~74
- 4 俞俊棠, 唐孝宣. 生物工艺学. 上海: 华东理工大学出版社, 2002. 420~423
- 5 Marshak D R, Kodonaga J T, Burgess R R. 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 朱厚础译. 北京: 科学出版社, 2000. 46
- 6 孙彦. 生物分离工程. 北京: 化学工业出版社, 1998. 114
- 7 陈石根, 周润琦. 酶学. 上海: 复旦大学出版社, 2001. 127

## 第四章 酶的固定化

酶是一种由氨基酸组成的蛋白质，其高级结构对环境十分敏感，各种因素如物理因素（温度、压力、电磁场）、化学因素（金属离子、离子强度、pH值、有机溶剂）和生物因素（酶修饰和酶降解）均可能使酶丧失生物活力。即使在酶的适宜反应条件下，随着反应时间的延长，反应速率也会逐渐下降。同时酶蛋白在反应液中与产物在一起，反应后酶不能回收重复利用，产物的分离纯化较为复杂，只能采用分批法进行生产等。这些对于现代工业来讲，都说明酶不能作为理想的催化剂。

为了更好地发挥酶的催化功能，各国学者不断努力。如果能够将酶束缚于特殊的相，使它能与整体流体相分开，但仍能进行底物和效应物（激活剂或抑制剂）的分子交换，这种酶可以像一般化学反应的固体催化剂一样，既有酶的催化特性，又能像一般化学催化剂一样有回收、重复利用等优点，从而使生产工艺可以实现连续化、自动化。

酶与载体结合后，在水中呈不溶状态时仍具有催化活性的这种现象，最早是由美国的奈尔森（Nelson）和格里芬（Griffin）在1916年发现的，他们将转化酶吸附在骨炭上仍显示出酶的催化活性。直到20世纪50年代，酶固定化技术的研究才真正有效地开展。1953年，德国的格鲁布霍费（Grubhofer）和施来斯（Schleith）首先将聚氨基苯乙烯树脂重氮化，然后将淀粉酶、胃蛋白酶、羧肽酶和核糖核酸酶等与上述载体结合，制成固定化酶。到了20世纪60年代，固定化技术迅速发展。1969年日本的千畑一郎应用固定化氨基酰化酶从DL-氨基酸生产L-氨基酸，是世界上固定化酶大规模应用的首例。

### 第一节 固定化酶概述

#### 一、固定化酶的定义

固定化酶是20世纪50年代发展起来的一项新技术。最初是将水溶性酶与不溶性载体结合起来，成为不溶于水的衍生物，称为水不溶性酶（water insoluble enzyme）和固相酶（solid phase enzyme）。但是后来发现，也可将酶包埋在凝胶内或置于超滤装置内，高分子底物与酶在超滤膜的一边，反应产物可以透过膜而逸出，在这种情况下，酶仍然处于溶解状态，只不过被固定在一个有限的空间内不能自由流动。因此用水不溶性酶或固相酶就不恰当了。1969年固定化氨基酸酸化酶在工业生产中被正式应用。在1971年的第一届国际酶工程会议上，正式采用固定化酶（immobilized enzyme）。

所谓固定化酶，即用固体材料将酶束缚或限制于一定区域内，仍能进行其特有的催化反应，并可回收及重复使用的一类技术。固定化酶的形式多样，可制成机械性能好的颗粒装成酶柱用于连续生产；或在反应器中进行批式搅拌反应；还可制成酶膜、酶管等应用于分析化学；还可制成微胶囊酶，作为治疗酶应用于临床。

#### 二、固定化酶的优点

固定化酶与游离酶相比，有以下优点：①容易将固定化酶和底物、产物分开；②可以在

较长时间内进行反复分批反应和装柱连续反应；③在大多数情况下，能够提高酶的稳定性；④酶反应过程能够加以严格控制；⑤产物溶液中没有酶的残留，简化了产物的提取纯化工艺；⑥比游离酶更适于进行多酶反应；⑦可以增加产物的收率，提高产物的质量；⑧酶的使用效率提高，成本降低。

与此同时，固定化酶也存在一些缺点：①固定化时，酶活力有损失；②增加了生产的成本，工厂初始投资较大；③只能用于可溶性底物，而且适于小分子底物，对于大分子底物不适合；④与完整菌体相比不适宜于多酶反应，特别是需要辅助因子的反应；⑤胞内酶必须经过酶的分选过程。

### 三、固定化酶的重要性

由于酶具催化作用的高效性，使得其应用越来越广泛。但是，人们在应用酶的过程中，也发现其有一些不足之处。如酶的稳定性差，酶在温度、pH值、无机离子等因素的影响下容易失去活性；酶在水中与底物进行反应，反应后的酶即使还有活性也难于分离再利用，因而生产成本高；同时，酶很难从反应体系当中分离出来用于连续的工业化生产；酶反应的产物与底物同时存在于同一反应体系中，反应后，酶的应用范围受到一定的限制。由于酶的分离与提纯有许多技术性难题，造成酶制剂来源有限、成本高，不利于大规模使用。因此，在大规模生产中，使酶能反复使用，是很有经济价值的课题。固定化技术的出现，是使酶工程产业化的必要条件，由于酶的固定化，使之易与溶液中的底物和产物分离，且可使酶反复使用，效率高，生产成本大大下降，其稳定性增强。固定化酶在工业生产上的应用为生产自动化、管道化、连续化提供了条件。

目前，酶固定化技术已在食品工业、精细化学品工业、医药，特别是手性化合物等行业得到广泛应用，在废水处理方面也取得了一定进展。用酶技术生产化工产品，条件温和，无“三废”产生，随着人类对环保的日益关注，酶的应用会备受关注，如何充分利用天然高分子载体，对其改性，或利用超临界技术、纳米技术、膜技术等来固定酶，必定会成为研究的热点。同时，开发新型、高效的固定化酶反应器，进一步提高转化率和生产能力，也是未来研究的重点。而固定化酶在各行业的应用研究也必将推动酶固定化技术的进一步发展。

固定化酶的形式多样，可制成机械性能好的颗粒装成酶柱用于连续生产；或在反应器中进行批次搅拌反应；也可制成酶膜、酶管等应用于分析化学；又可制成微胶囊酶，作为治疗酶应用于临床。现在又有人用酶膜（包括细胞、组织、微生物制成的膜）与电、光、热等敏感的元件组成一种装置，称生物传感器，即是在固定化作用的基础上，通过化工设计，使一系列生物化学反应连续化、自动化，能与仪表、自控系统、计算机系统相连接，从而高效低耗地为人们提供产品。早在1970年，一些研究者着手研究蛋白质作为半导体元件——生物芯片（biochip）的可能性。这是生物传感器的一个最有戏剧性的应用。它的目的是生产生物分子电子装置，为现代电子计算机更新换代奠定基础。因为用蛋白质构成的生物芯片电子计算机，将比硅片更小、更快、更节能、更高效、更可靠。这种计算机有可能被更广泛地应用于各领域，甚至机器人的生产。

在美国和日本，已将固相酶用于各种生产过程，如使用固相酶进行饱和碳氢化合物或烯的氧化；使淀粉和纤维素（如木屑、茎叶或由于某种原因不能重新使用的废纸以及其他纤维素物质）变成葡萄糖，再用另一种酶进一步将其变为果糖。美国的卡普朗（Kaplan）在研究报告中还证实，如使某些叶绿体酶固相化，那么借助它的作用，在太阳光的作用下就可以把水分解成氢和氧，这为太阳能的利用开辟了无比广阔的前景。

## 第二节 酶的固定化方法

已发现的酶有数千种。固定化酶的应用目的、应用环境各不相同，而且用于固定化酶的材料多种多样，因此酶的固定化方法很多，没有对任何一种酶都适用的方法。酶的固定化方法通常按照用于结合的化学反应的类型进行分类，可分为吸附法、包埋法、共价结合法、交联法4种。

### 一、吸附法

吸附法分为离子吸附法和物理吸附法，是利用离子键、物理吸附等方法，将酶固定在纤维素、琼脂糖等多糖类或多孔玻璃、离子交换树脂等载体上的固定方式。工艺简便及条件温和是其显著特点，其载体选择范围很大，涉及天然或合成的无机、有机高分子材料，吸附过程可同时达到纯化和固定化，酶失活后可重新活化，载体可以再生。

#### 1. 物理吸附法

酶被物理吸附于不溶性载体上的一种固定化方法。此类载体很多，有机载体如活性炭、面筋、淀粉等，无机载体如氧化铝、皂土、高岭土、多孔玻璃、硅胶、二氧化钛等，最近大孔型合成树脂、陶瓷等载体也十分引人注目。

物理吸附法具有酶的活性中心不易被破坏和酶的高级结构变化少的优点，因而酶活力损失很少。但是它有与载体相互作用力弱、酶易脱落等缺点。

在卵磷脂/异辛烷存在下，将脂肪酶吸附固定在大孔共聚物载体上，固定化脂肪酶水解椰子油，酶活力为游离酶的70%，重复使用15次后，固定酶活性仍保持其最初活性的56%。以CaCO<sub>3</sub>粉末为载体，吸附法固定脂肪酶的方法，固定化酶很容易从反应体系中回收，重复使用5次，酶活力保留73.37%，用其催化棕榈油固相甘油解反应生成甘油单酯，是一条“绿色”工艺，并减少了催化剂的消耗。

#### 2. 离子吸附法

离子吸附法是将酶与含有离子交换基的水不溶性载体相结合的固定化方法。此类载体有阴离子交换剂如DEAE-纤维素、DEAE-葡聚糖凝胶、Amberlite IRA-93、Amberlite IRA-410、Amberlite IRA-900；阳离子交换剂如CM-纤维素、纤维素-柠檬酸盐、Amberlite CG-50、Amberlite IRC-50、Amberlite IR-120、Amberlite IR-120、Amberlite IR-200、Dowex-50等。

用DEAE-Sephadex固定化氨基酰化酶：将DEAE-Sephadex充分溶胀，用0.5mol/L NaOH和水洗涤后，加入pH7.0的米曲酶粗酶液充分混合后，4℃搅拌过夜，吸去上清液，用蒸馏水和0.15mol/L乙酸钠溶液洗涤固定化酶，4℃保存备用。固定化酶活力回收率50%~60%。

离子吸附法操作简单，处理条件温和，酶的高级结构和活性中心的氨基酸残基不易被破坏，能得到酶活回收率较高的固定化酶。但是酶与载体之间的结合容易受缓冲液种类或pH值的影响，在离子强度高的条件下反应时，酶往往会从载体上脱落。迄今为止，已有许多酶用离子吸附法进行固定化。

影响酶蛋白在载体上吸附程度的因素如下。

- ① pH值 影响载体和酶的电荷变化，从而影响酶吸附。
- ② 离子强度 多方面的影响，一般认为盐阻止吸附。
- ③ 蛋白质浓度 若吸附剂的量固定，随蛋白质浓度增加，吸附量也增加，直至饱和。

④ 温度 蛋白质往往是随温度上升而减少吸附。

⑤ 吸附速率 蛋白质在固体载体上的吸附速率要比小分子慢得多。

⑥ 载体 对于非多孔性载体，则颗粒越小吸附力越强。多孔性载体，要考虑吸附对象的大小和总吸附面积的大小。

为了更好地发挥吸附法的适用性能，一些人将吸附法与交联法等相结合。岳振峰等以粉末状壳聚糖为载体，采用先吸附后交联的固定法，固定  $\alpha$ -葡萄糖氧化酶，酶活力为 14300U，酶活力回收率为 59.6%，效果较好，其酸碱稳定性及热稳定性好，可望为今后固定化酶法生产低聚麦芽糖的工业化提供参考。

## 二、包埋法

包埋法 (entrapment) 是用一定方法将酶包埋于半透性的载体之中，制成固定化酶。该载体 (包埋剂) 的孔径只允许小分子的底物、产物自由穿过，不允许大分子的酶穿过，从而使酶易于与产物分离。

其优点是酶分子本身不参与水不溶性载体的形成，许多种酶都可用这种方法进行固定化。这种方法较为简便，酶分子仅仅是被包埋起来，而未受到化学反应，所以可以得到活力较高的固定化酶，但是这种方法对于作用于大分子底物的酶是不适用的。同时由于高聚物网架会对大分子物质产生扩散阻力导致固定化酶动力学行为改变，使活力降低。

这是一种不需要化学修饰酶蛋白的氨基酸残基，反应条件温和，很少改变酶结构的固定化方法，其基本原理是单体和酶溶液混合，再借助引发剂进行聚合反应，将酶固定于载体材料的网格中。固定化时保护剂和稳定剂的存在不影响酶的包埋产率。这种酶包埋在高聚物内的方法对大多数酶、粗酶制剂甚至完整的微生物细胞都是适用的。

包埋法主要分为凝胶包埋法和微胶囊包埋法。凝胶包埋法是将个别酶分子包在高聚物格子中，可以将块状聚合形成的凝胶切成小块，也可以直接包埋在珠状聚合物中，后者可以使固定化酶机械强度提高 10 倍，并改进酶的脱落情况。微胶囊包埋法是将酶溶液或悬浮液包裹在膜内，膜既能使酶存在于类似细胞内的环境中，又阻止酶的脱落或直接与微胶囊外环境接触。小分子底物则能迅速通过膜与酶作用，产物也能扩散出来。此法包埋的酶量很多，在医学上具有很大的应用可能性，因此逐渐受到人们的注意。

### 1. 凝胶包埋法

又称为网格法。将酶分子定位于凝胶内部的微孔中，制成一定形状的固定化酶，大部分为球状或片状，或可按需求制成其他形状。载体材料有聚丙烯酰胺、聚乙烯酰胺和光敏树脂等合成高分子材料以及淀粉、明胶、胶原、海藻酸和角叉菜胶等天然高分子化合物。

天然凝胶在包埋时条件温和，操作简便，对酶活性影响甚少，但强度较差。而合成凝胶的强度高，对温度、pH 值变化的耐受性强，但需要在一定的条件下进行聚合反应，才能把酶包埋起来。在聚合反应过程中往往会引起部分酶的变性失活，应严格控制好包埋条件。

例如，用聚丙烯酰胺凝胶包埋 SOD。聚丙烯酰胺作为包埋剂具有较好的机械强度、半透性、惰性、不与酶发生物理化学变化、包埋后酶的活性丧失较小等优点。固定化酶具有明显的热稳定性、抗酸碱性、保存时间较长及可重复使用等优点。

### 2. 微胶囊包埋法 (microencapsulation)

又称为半透膜法。将酶分子定位于半透性的聚合体膜内制成微胶囊，直径  $1\sim 100\mu\text{m}$ 。半透膜的孔径为几埃至几十埃 ( $1\text{\AA}=0.1\text{nm}$ )，比一般酶分子的直径小些，固定化的酶不会从小球中漏出来。只有小于半透膜孔径的小分子底物和小分子产物可以自由通过半透膜，而大于半透膜孔径的大分子底物或大分子产物则无法进出。

微胶囊固定化酶的制备方法有界面聚合法、液体干燥法、界面沉淀法和脂质体包埋法。微胶囊包埋法中，常用的作为半透膜的材料有聚酰胺膜、火棉胶、硝化纤维、聚苯乙烯以及壳聚糖等。微胶囊包埋固定化酶具有很多优点：微胶囊的大小可以控制；胶囊化时间较短；酶和底物接触表面积很大，利于酶反应；多种酶可以同时包埋在同一囊中，利于多酶固定化。

(1) 界面聚合法 其原理是将疏水性单体和亲水性单体在界面进行聚合，将酶包埋于半透性聚合物中的方法。具体过程是：将酶水溶液和亲水单体用一种与水不溶的有机溶剂制成乳化液，再将溶于同一种有机溶剂的疏水单体溶液边搅拌边加入到上述乳化液中，在乳化液中的水相和有机溶剂相之间的界面发生聚合作用，这样水相中的酶就被包埋于聚合物膜中。

(2) 液体干燥法 将一种聚合物溶于一种沸点低于水且与水不混溶的有机溶剂中，加入酶的水溶液，以油性表面活性剂为乳化剂，制成第一乳化液。把它分散于含有保护性胶质（如明胶）、聚丙烯醇和表面活性剂的水溶液中，形成第二乳化液。在不断搅拌、低温和真空条件下蒸出有机溶剂，得到含酶微胶囊。常用的聚合物有乙基纤维素、聚苯乙烯、氯化橡胶等，常用的有机溶剂有苯、环己烷和三氯甲烷。

(3) 界面沉淀法 利用某些高聚物在水相和有机相的界面上溶解度极低而形成皮膜的性质将酶包埋。如含有高浓度血红蛋白的酶溶液在与水不互溶、沸点比水低的有机相中乳化，加入油性表面活性剂，形成油包水的微滴，再将溶于有机溶剂的高聚物在搅拌下加入乳化液中，然后加入一种不溶解高聚物的有机溶剂，使高聚物在油-水界面上沉淀形成膜，最后转移到水相，从而制成固定化酶。最常用的高聚物有硝酸纤维素、聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯等。

(4) 脂质体包埋法 这是一种近年来发展起来的技术。采用双层脂质体形成的极细球粒包埋酶。将卵磷脂、胆甾醇和二鲸蜡磷酸酯（7：2：1）溶于三氯甲烷中，加入酶液，混合物在旋转蒸发器中，在氮气下 32℃ 转动乳化，然后在室温下放置 2h，再在氮气气流中 4℃ 处理 10s，在室温下静置 2h，过 Sepharose 6B 柱，可分离得到含有酶的微胶囊。

### 3. 纤维包埋法 (fiber entrapment)

将酶分子包埋在合成纤维的管状空腔内，制成固定化酶。并且可以将这种纤维制成酶布，适于大规模生产。

## 三、共价结合法

共价结合法是酶蛋白分子上的官能团和固相支持物表面上的反应基团之间形成化学共价键连接，从而固定酶的方法。由于酶与载体间连接牢固，不易发生酶脱落，有良好的稳定性及重复使用性，成为目前研究最为活跃的一类酶固定化方法。

其常用的载体包括天然高分子（纤维素、琼脂糖、淀粉、葡萄糖凝胶、胶原及衍生物等）、合成高聚物（尼龙、多聚氨基酸、乙烯-顺丁烯二酸酐共聚物等）和无机支持物（多孔玻璃、金属氧化物等）。

共价结合法中的几个影响因素。①要求载体亲水，并且有一定的机械强度和稳定性，同时具备在温和条件下与酶结合的功能基团。②偶联反应的反应条件必须在温和 pH 值、中等离子强度和低温的缓冲溶液中。③所选择的偶联反应要尽量考虑到对酶的其他功能基团副反应尽可能少。④要考虑到酶固定化后的构型，尽量减少载体的空间位阻对酶活力的影响。

共价结合法的优点：得到的固定化酶结合牢固、稳定性好、利于连续使用，是目前应用和报道得最多的一类方法。共价偶联法的缺点也很明显：载体活化的操作复杂，反应条件激烈，会引起酶蛋白高级结构的变化，破坏部分活性中心，因此往往不能得到活力高的固定化酶，酶活力回收率一般为 30% 左右，甚至底物的专一性等酶的性质会发生变化。

### (一) 酶分子与载体连接的功能基团

酶蛋白上可供载体结合的功能基团有以下几种：①酶分子 N 端的  $\alpha$ -氨基或赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基；②酶分子的 C 端的羧基以及 Asp 残基的  $\beta$ -羧基和 Glu 残基的  $\gamma$ -羧基；③Cys 残基的巯基；④Ser、Tyr、Thr 残基的羟基；⑤Phe 和 Tyr 残基的苯环；⑥His 残基的咪唑基；⑦Trp 残基的吲哚基。在应用过程中，最常用的是氨基、羧基和苯环，被偶联的基团还应该是酶的非活性中心基团，否则会引起酶活的大量丧失。

### (二) 载体的选择

对载体的要求：①载体结构疏松，表面积大，有一定的机械强度；②载体必须带有在温和条件下与酶共价结合的功能基团；③载体吸附功能有一定的专一性；④载体来源广泛，价格便宜，能够重复利用。

### (三) 偶联反应

酶与载体分子的连接反应取决于载体上的功能基团和酶分子的非必需侧链基团的类型，而且要在十分温和的 pH 值条件、中等离子强度和低温的缓冲液中进行。所用载体可以分为 3 类：天然有机载体，如多糖、蛋白质、细胞；无机物，如玻璃、陶瓷等；合成聚合物，如聚酯、聚胺、尼龙等。多种偶联反应能够进行酶的固定化，如下所述。

#### 1. 重氮法

对于带有芳香族氨基的载体，先用  $\text{NaNO}_2$  和稀盐酸处理成重氮盐衍生物，在 pH8~9 时，酶蛋白与之发生偶联反应，得到固定化酶。

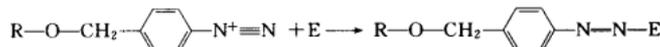
$\text{NaNO}_2$  和稀盐酸反应生成  $\text{HNO}_2$ 。



将含有苯氨基的不溶性载体与亚硝酸反应，生成重氮盐衍生物，使载体具有活泼的重氮基团。

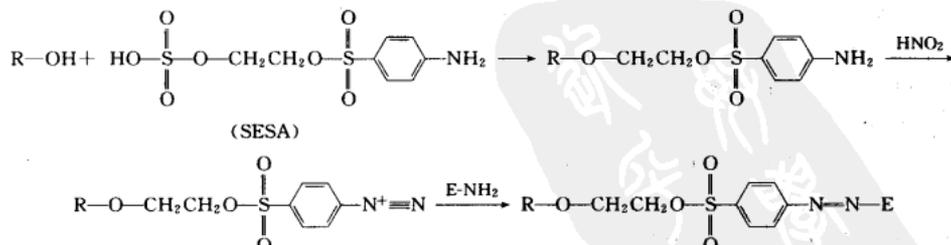


载体活化后，活泼的重氮基团可以与酶分子中的酚基或咪唑基发生偶联反应，而制得固定化酶。



酶蛋白中参与固定化反应的基团可能是 Tyr 的酚基、His 的咪唑基。常用载体及其反应如下。

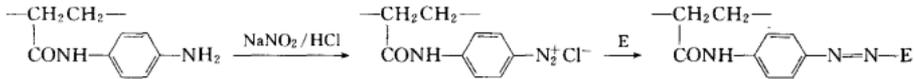
(1) 多糖类的芳香族氨基酸氨基衍生物 在碱性条件下用对  $\beta$ -硫酸酯乙磺基苯胺 (SESA) 活化多糖，形成对氨基苯磺酰乙基纤维素 (ABSE-纤维素)，然后重氮化，与酶偶联。



(2) 氨基酸共聚体 如 L-Leu 和对氨基-DL-苯丙氨酸的共聚物，与亚硝酸作用转变为重氮盐，供酶固定化用。

(3) 聚丙烯酰胺衍生物 如 Bio-Gel 或 Enzacryl。Enzacryl AA 是一种含有芳香氨基的

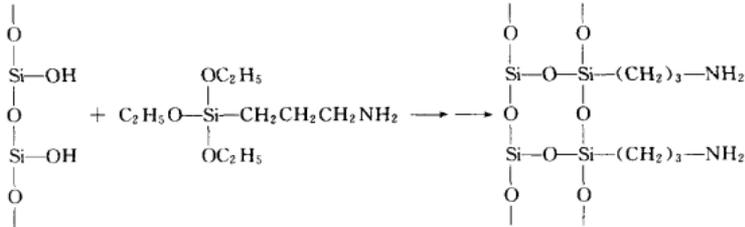
聚丙烯酰胺衍生物，经重氮化后可固定化酶。可以固定化氨基酰化酶、 $\alpha$ -淀粉酶等。



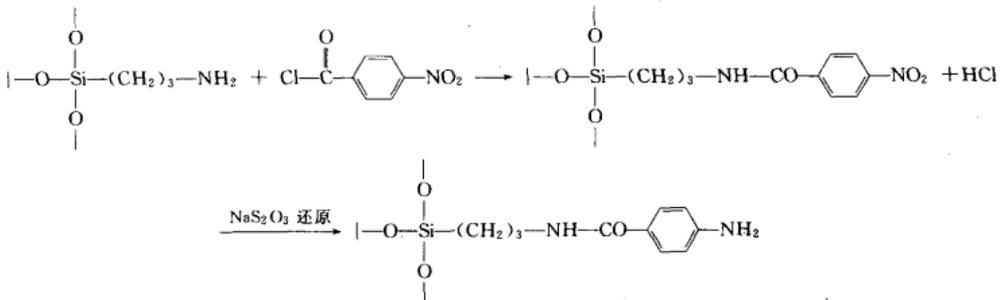
(4) 苯乙酰树脂 是一种聚氨基苯乙烯和一种异丁烯-间氨基苯乙烯的共聚物，通过重氮化后可以固定化酶。

(5) 多孔玻璃的氨基硅烷衍生物

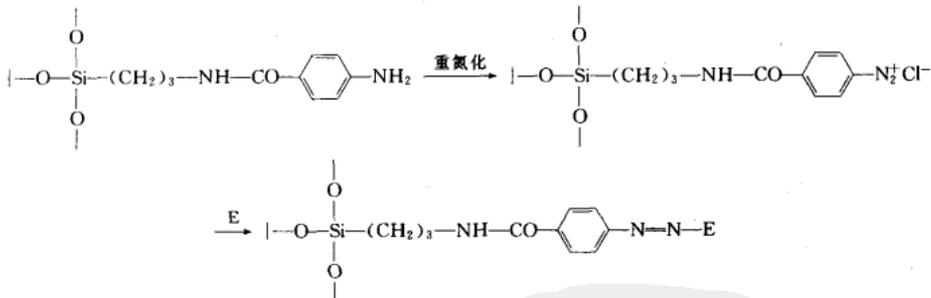
① 玻璃的化学改造物多孔玻璃在丙酮中与  $\gamma$ -氨基丙基三氧乙烷硅回流加热，生成烷基胺玻璃。



② 烷基胺玻璃用对硝基苯酰氯处理后，再还原，转变为芳香基衍生物。



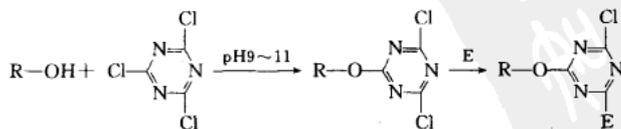
③ 此芳香基衍生物经重氮化后与酶结合，产生固定化酶。



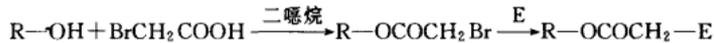
## 2. 芳香羟化法

具有卤素取代的芳香环或含有卤素取代的杂环的高聚物以及含有卤乙酰基的高聚物，可以通过烷基化、芳香基化，在碱性条件下，与酶分子上的氨基、酚基、巯基等反应，实现酶的固定化。

① 三嗪反应。纤维素等载体在碱性条件下和均三氯三嗪等反应，引入活泼的卤素基后，能与酶的氨基、酚羟基反应，产生固定化酶。

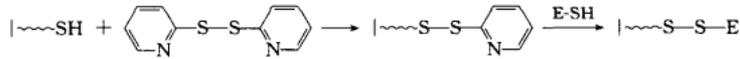


② 将纤维素在二噁烷存在下与溴乙酰反应，形成溴乙酰纤维素，可以固定化酶用。



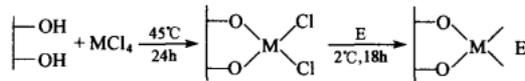
### 3. 巯基-二巯基交换反应

带有一-SH 或二巯基的载体，通过巯基-二巯基的交换反应，和酶分子上非必需巯基偶联。对于含有巯基的载体，先用 2,2'-二吡啶二硫化物处理，生成二巯基中间产物，在酸性条件下可以与酶分子的巯基发生交换反应，生成固定化酶。



### 4. 金属偶联法

某些载体，如纤维素、尼龙、硼硅玻璃、滤纸等，可以用金属溶液浸泡 24h，洗出未反应的金属盐后，制得活化的载体，将活化的载体放入酶溶液中，可以将酶固定化。



S L. Wang 等将由绿脓杆菌制备的壳多糖酶用共价结合法固定在聚合物载体羟丙甲基纤维素-乙酸-琥珀酸盐上，该载体在 pH5.5 以上是可溶性的，低于 pH4.5 时是不溶性物质，用粗制酶溶液固定，有效固定酶达 99%。天然壳多糖酶激活能量为 41.38kJ/(g·mol)，而固定酶激活能量为 24.91kJ/(g·mol)，固定最适 pH8，温度 50℃，半衰期由游离酶的 9 天提高至现在的 13 天，酶重复使用 10 次后，酶活力仍保持 70%。

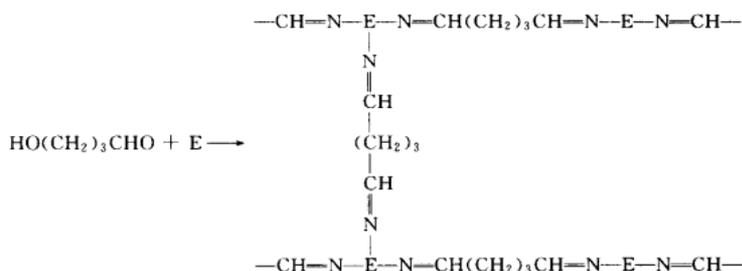
A M Dessouki 等将支链淀粉酶用共价结合法分别固定在由环氧氯丙烷活化的琼脂糖和由环氧氯丙烷活化的三氯三嗪-酪蛋白上，并合成共聚物丙烯酸-丙烯酸。使用 10 次仅有轻微损失（约 20%）。使用  $(0.5 \sim 10) \times 10^4 \text{ Gy}$   $\gamma$  射线做一次照射实验，游离酶在  $5 \times 10^4 \text{ Gy}$  时，活性完全丢失，而固定酶在  $5 \times 10^4 \text{ Gy}$  时仍对射线有很高抵抗能力。安小宁等采用壳聚糖包埋磁粉，经戊二醛修饰、环氧氯丙烷交联制得高磁性壳聚糖微粒，此微粒共价结合卵清黏蛋白得到磁性亲和吸附剂，应用于胰蛋白酶的亲和纯化，纯化倍数为 1.56，活性回收率为 41.2%。

磁性高分子微球是近 20 年来发展起来的一种新型功能高分子材料。磁性高分子微球是指内部含有磁性金属或金属氧化物（如铁、钴、镍及其氧化物）的超细粉末而具有磁响应性的高分子微球，可以通过共价键来结合酶从而形成固定化酶，此种形式的固定化酶在外加磁场的帮助下，进行快速运动或分离，在生物工程领域有着广泛的应用前景。与非磁性微球相比，磁性高分子微球作为酶固定化载体，具有以下优点：①有利于固定化酶从反应体系中分离和回收，操作简便，对于双酶反应体系，当一种酶的失活较快时，就可以用磁性材料来固定化另一种酶，回收后反复使用，降低成本；②磁性载体固定化酶放入磁场稳定的流式床反应器中，可以减少持续反应体系中的操作，适合于大规模连续化操作；③利用外部磁场可以控制磁性材料固定化酶的运动和方向，替代传统的机械搅拌方式，提高固定化酶的催化效率。

## 四、交联法

交联法（crosslinking）是用多功能试剂进行酶蛋白之间的交联，是酶分子和多功能试剂之间形成共价键，得到三向的交联网架结构。除了酶分子之间发生交联外，还存在着一定的分子内交联。根据使用条件和添加材料的不同，还能够产生不同物理性质的固定化酶。常

用交联试剂有戊二醛、双重氮联苯胺-2,2-二磺酸、1,5-二氟-2,4-二硝基苯、己二酰亚胺酸二甲酯等。



共价交联法有 4 种形式。

#### 1. 酶直接交联法

在酶液中加入适量多功能试剂，使其形成不溶性衍生物。固定化依赖于酶与试剂的浓度、溶液的 pH 值和离子强度、温度和反应时间之间的平衡。操作简单，但是缺乏选择性，活力回收往往不高。

#### 2. 酶辅助蛋白交联

当可得到的酶量有限时，可以使用第二个“载体”蛋白来增加蛋白质浓度，从而使酶与惰性蛋白共交联的方法。这种“载体”蛋白即辅助蛋白，可以是白蛋白、明胶、血红蛋白等。

#### 3. 吸附交联法

此法先将酶吸附在硅胶、皂土、氧化铝、球状酚醛树脂或其他大孔型离子交换树脂上，再用戊二醛等双功能试剂交联。用此法所得固定化酶也可称为壳状固定化酶。

#### 4. 载体交联法

用多功能试剂的一部分功能基团化学修饰高聚物载体，而其中的另一部分功能基团偶联酶蛋白。

交联剂一般价格昂贵，单用交联剂制备的固定化酶活力比较低，此法也很少单独使用，科研工作者一般都将其作为其他固定化方法的辅助手段，常和吸附法、包埋法结合使用，可以得到活力更高的固定化酶。

### 五、各种固定化酶的特点比较

由表 4-1 可见，几种固定化方法各有利弊。包埋法、共价结合法、交联法 3 种虽然结合力强，但不能回收、再生；吸附法制备简单，成本低，能回收再生，但是结合力弱，在受到离子强度、pH 值变化影响后，酶容易从载体上游离下来；包埋法各方面都不错，但不适合大分子底物和产物。在固定化过程中要根据特定的技术需要和资金状况进行选择。

表 4-1 不同固定化方法的优缺点比较

特点	吸附法	包埋法	共价结合法	交联法
制备	易	易	难	难
结合力	弱	强	强	强
酶活力	高	高	中	低
底物专一性	无变化	无变化	变化	变化
再生	可能	不可能	不可能	不可能
固定化费用	低	中	中	高

## 第三节 固定化酶的形态与性质

### 一、固定化酶的形状

固定化酶的形状依不同用途有颗粒、线条、薄膜和酶管等。颗粒占绝大多数，它和线条主要用于工业发酵生产，薄膜主要用于酶电极。酶管机械强度较大，亦宜用于工业生产。

#### 1. 颗粒状

各种固定化方法均可制作颗粒状固定化酶。

#### 2. 线条

这是照纺纱的方法用三醋酸纤维与酶混合后制成线条。葡萄糖异构酶、转化酶、葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶、乳糖酶等均可用此法。具体方法是将酶的含甘油水溶液，一边搅拌，一边一滴一滴地加入溶于亚甲基二氯（methylene chloride）的三醋酸纤维素中，使其乳化后，用喷丝头在含丙酮的凝集器中纺线。这些线条真空干燥，除去亚甲基二氯，备用。

#### 3. 薄膜

酶薄膜是用火棉胶、硝酸纤维、玻璃纸、骨胶原、明胶等，加戊二醛交联或其他方法处理后制成，供木瓜酶、葡萄糖氧化酶、过氧化酶、氨基酰化酶、脲酶、转化酶等固定化之用。

#### 4. 酶管

尼龙、聚氨基苯乙烯和聚丙烯酰胺均可作为载体。例如，尼龙管用弱酸部分水解后，分离出的氨基，用亚硝酸使其破坏，余下的羧基，在碳化二亚胺试剂存在下，与联苯胺相反应，转变为氨基芳基衍生物。将此衍生物重氮化，使酶通过重氮偶联而成为酶管。酶管也可由交联载体而制成。此法是将酶的氨基与尼龙内部面积经过部分水解形成的氨基，用戊二醛交联后成为酶管，可以糖化酶、转化酶、脲酶等为列。

### 二、固定化酶的活力

与溶液酶相比，固定化酶的酶活力是下降的。其原因有多种：固定化酶由于与不溶性载体的结合引起结构发生变化；酶活性中心的重要氨基酸残基与载体相结合；酶与底物间的相互作用受到空间位阻。采用包埋法时，酶活下降，可能由于在固定化过程中酶有些变性，同时底物和产物对凝胶的渗透力较小。在固定化过程中有些措施可以提高固定化酶的活力。如对于乳糖酶，在固定化过程中加入一种抑制剂，如葡萄糖酸- $\delta$ -内酯，进行聚丙烯酰胺凝胶包埋，抑制剂可以保护酶的活性中心，这样可以获得高活力的固定化酶。而对于天冬氨酸酶，在它的底物延胡索酸或产物 L-天冬氨酸存在时，进行聚丙烯酰胺凝胶包埋，同样可以得到活力较高的固定化酶。

#### 1. 固定化酶的效果测定

固定化酶的活力是以反应初速率表示的，即每毫克（干重）固定化酶每分钟转化  $1\mu\text{mol}$  底物量或形成  $1\mu\text{mol}$  产物的酶量为一个酶活单位。对于酶管、酶膜、酶板等，则以单位面积的初速率来表示。

#### 2. 偶联效率

偶联效率以载体结合酶量或酶活力的百分数来表示。由于固定化酶的酶活力受多种因素影响，因此酶活力百分数不能确切反应载体的偶联效率，所以常用酶的蛋白量来表示。在固定化过程中，当酶与载体结合后，用适量的缓冲液淋洗固定化酶，收集洗脱液中的未固定化

酶，并测定其中蛋白量，即残留的蛋白量。

$$\text{偶联效率} = \frac{\text{加入的蛋白量} - \text{溶液中残留的蛋白量}}{\text{加入的蛋白量}} \times 100\%$$

### 3. 活力回收和相对活力

与溶液酶比较，固定化酶的活力下降，固定化酶活力占溶液酶活力的百分数称为活力回收率。

$$\text{活力回收率} = \frac{\text{固定化酶活力}}{\text{溶液酶活力}} \times 100\%$$

## 三、固定化酶的稳定性

酶的稳定性是关系到固定化酶能否实际应用的大问题，大部分固定化酶的稳定性比溶液酶有不同程度的提高，延长了使用寿命。

① 热稳定性 酶作为生物催化剂，和普通的化学催化剂一样，温度越高，反应速率越快。但是，酶的本质是蛋白质，一般对热不稳定。这就形成一对矛盾。而固定化酶耐热性提高，使酶的最适温度提高，酶催化反应能在较高温度下进行，加快了反应速率，提高了酶的作用效率。

② 对蛋白酶的稳定性 溶液酶经过固定化后，对蛋白酶水解的抵抗力提高，可能是因为蛋白酶进入固定化酶的空间位阻增加所致。

③ 操作稳定性 固定化酶在操作过程中可以长时间保留活力，半衰期在一个月以上，才具有工业应用价值。不同固定化酶的操作稳定性比较见表 4-2。

表 4-2 不同固定化酶的操作稳定性比较

酶	固定方法	温度/℃	操作时间/天	残余活力/%
$\beta$ -半乳糖苷酶	交联法	30	100	50
天冬氨酸酶	包埋法	37	20	50
青霉素酰化酶	烷基法	37	77	100
木瓜蛋白酶	共价法(尼龙)	37	73	54
	吸附法(甲壳素)	37	35	50
	共价法(蔗糖纤维素)	37	34	50

④ 贮藏稳定性 大部分的固定化酶经固定化后，贮藏稳定性增强，如固定化的木瓜蛋白酶在 4℃下，120 天酶活力无变化。但是固定化酶制成后，最好立即使用，如长期贮藏，酶活力也会下降。

## 四、固定化酶的催化特征

固定化酶具有酶的特性，如底物专一性、酶反应的最适 pH 值、酶反应的温度、 $K_m$  值、最大反应速率、稳定性等，但是都由于固定化过程而与游离酶不同。

(1) 底物专一性 当一种酶用水不溶性载体固定化后，由于空间位阻，酶对高分子量底物的活性显然减少，例如，糖化酶用 CM-纤维素叠氮衍生物固定化时，对相对分子质量 8000 的直链淀粉 (amylose) 的活性为游离酶的 77%，而对相对分子质量 500000 的直链淀粉的活性只有 15%~17%。

(2) 反应的最适 pH 值 酶固定化后，对底物作用的最适 pH 值和 pH 曲线常发生偏移。最适 pH 值和 pH 曲线的变动，依酶蛋白和/或水不溶性载体的电荷而决定。一般来说，阴离子聚合物载体制备的固定化酶，由于载体会吸引溶液中的阳离子，包括  $H^+$ ，使固定化酶

周围的  $H^+$  浓度比周围高，即偏酸，这样外部溶液的 pH 值必须偏碱才能抵消环境作用，使其表现出最大活力。反之，使用带正电荷的载体其最适 pH 值偏酸。

(3) 米氏常数 米氏常数  $K_m$  反映了酶与底物的亲和力。固定化酶的  $K_m$  与游离酶的  $K_m$  有些不变，有些变化很大。使用载体结合法制成的固定化酶  $K_m$  变动的原因，有时主要是出于载体与底物间静电相互作用的缘故。例如，用 CM-纤维素叠氮衍生物结合法制成的固定化无花果酶的  $K_m$  比游离酶少 1/10，这是因为正荷底物（苯酰-L-精氨酸乙醚）与载体多阴离子的 CM-纤维素间的静电吸引力提高，所以固定化酶区域的底物浓度比外部溶液高，在较高底物浓度下酶催化的反应可以更快进行，表现  $K_m$  就下降了。

(4) 最大反应速率 最大反应速率视固定化方法不同而有差异。例如，用多孔玻璃的重氮化结合所得的固定化转化酶的最大反应速率与游离酶相同，而用聚丙烯酰胺凝胶包埋的转化酶的最大反应速率则比游离酶少 1/10。

## 第四节 固定化酶的反应动力学

固定化酶催化系统是一种非均相的反应系统。以微胶囊包埋法为例，反应过程包括：①底物从反应液主体移向载体表面（底物外部扩散）；②从载体表面移向酶、作用位点（底物内部扩散）；③底物被催化生成产物；④产物从反应位点移向载体表面；⑤产物再移至反应主体液。当酶被固定于载体表面时则不存在底物内部扩散和产物从反应位点移向载体表面的扩散过程。所以说，固定化酶的催化过程不仅受到酶促反应过程的影响，更主要的受到了由于固定化产生的物质传递过程的影响。

### 一、影响固定化酶促反应的主要因素

#### 1. 分子构象的改变

酶分子构象的改变是指固定化过程中酶与载体的相互作用引起酶的活性中心或调节中心的构象发生了变化，导致酶与底物的结合活力下降或酶的催化活力下降的一种效应。



溶液酶



固定化酶

#### 2. 位阻效应

位阻效应是载体的遮蔽作用，如载体的空隙太小，或者固定化位置或方法不当，给酶的活性中心或调节中心造成空间障碍，使底物和效应物无法与酶接触等引起的。选择合适的载体和固定化方法，可以减弱这种效应。

#### 3. 微扰效应

由于载体的亲水性、疏水性及介质的介电常数等，使紧邻固定化酶的环境区域即微环境发生变化，改变了酶的催化能力及酶对效应物做出调节反应的能力。这种效应可以通过改变载体和介质的性质而做出调节。

#### 4. 分配效应

分配效应是由于载体与底物或效应物之间的疏水性、亲水性及静电作用引起微环境（固

定化酶紧邻的局部环境)与宏观环境之间物质的不等分配,改变了酶反应系统的组成平衡,从而影响酶反应速率的一种效应。分配系数  $K_p$  是定量描述这种效应的,  $K_p$  是指载体内外底物或其他物质的浓度之比。

### 5. 扩散效应

扩散效应是指底物、产物及其他效应物的迁移和传递速率所受到的限制。一般水溶液及凝胶中的物质扩散系数很低,当酶的催化活性很高时,在固定化酶的周围形成浓度梯度,造成微环境和宏观环境之间底物和产物浓度有差别。

## 二、固定化酶促反应的过程分析

反应达到稳态时,在限速步骤的限制下,各步骤的速率相同。其中最有可能成为限制性的步骤是外扩散或内扩散步骤。存在的扩散效应将使固定化酶的反应动力学行为偏离其液态下的行为。若将这种偏离归结到酶动力学方程中的两个重要常数  $v_{\max}$ 、 $K_m$  中,则对进一步的研究和应用极为有利和方便。

为简化起见,在讨论外扩散限制时,忽略固定化酶颗粒内部的扩散问题;讨论内部扩散时,假定固定化酶颗粒外部传质阻力小,颗粒外表处的底物浓度与液体大环境中相应浓度相等。

### 1. 外扩散限制

当反应达到稳态时,传质速率与反应速率相等。

$$K_L(S - S_a) = v_{\max} S_a / (S_a + K_m) \quad (4-1)$$

式中,  $K_L$  为传质系数,  $m/h$ ;  $S$  为底物浓度,  $mol/L$ ;  $S_a$  为载体表面底物浓度,  $mol/L$ ;  $v_{\max}$  为最大反应速率,  $mol/(L \cdot h)$ ;  $K_m$  为米氏常数,  $mol/L$ 。

这是一个关于载体表面底物浓度  $S_a$  的二次方程,近似求解可得下式。

$$v = v_{\max} S / [S + K_{m(app)}] \quad (4-2)$$

式中,  $K_{m(app)}$  为表观米氏常数。

$$K_{m(app)} = K_m + \alpha / K_L \quad (4-3)$$

在不同的解法中其表达式中的  $\alpha$  有所不同,如  $\alpha = v_{\max}$ 、 $\alpha = \frac{3}{4} v_{\max}$ 、 $\alpha = v_{\max} K_m / (S + K_m)$  等。

对于式(4-2),其动力解析与米氏方程相同,  $v_{\max}$  中的酶浓度为固定化酶浓度。

传质系数  $K_L$  与物质的扩散系数  $D_e$  成正比,与传质阻力临界膜厚度  $\Delta y$  成反比。

$$K_L = D_e / \Delta y \quad (4-4)$$

$D_e$  取决于传递物质的性质,  $\Delta y$  则与流体的物理性质和流动状态有关。由式(4-3)知,当  $K_L$  很小时,  $K_{m(app)}$  比  $K_m$  大,即在相同的  $S$  下,反应速率减小;当  $K_L \rightarrow \infty$  时,  $K_{m(app)} = K_m$ , 此时不存在外扩散限制。所以,在操作上,通过改变流体的流动状态能够改变或消除外扩散的影响。如在不同的占空速率  $SV$  下测定固定化氨基酰化酶柱水解乙酰-DL-蛋氨酸反应的  $K_{m(app)}$ , 见表 4-3。

表 4-3 流速对表观动力学常数的影响

占空速率 $SV/h^{-1}$	14	23	28	34	41
表观米氏常数 $K_{m(app)} / (mmol/L)$	36.9	25.6	22.1	19.6	17.3

可见,因高流速流动增加了流体的湍动状态,使临界膜厚度  $\Delta y$  减小,强化了  $K_L$ , 结果是流速愈高,  $K_{m(app)}$  愈小。

## 2. 内扩散限制

在固定化酶的内部不存在流体流动，其传质完全依赖于扩散作用。在反应达到稳态时，如对球状固定化物，辅以合适的假设条件可得下式。

$$\frac{d^2 S_r}{dr^2} + \frac{2dS_r}{rdr} = \frac{v_{\max} S_r}{D_e (S_r + K_m)} \quad (4-5)$$

式中， $r$  为距球心的距离； $S_r$  为距球心  $r$  处的底物浓度。

对方程进行适当变换处理后，以数值积分法可求出底物浓度的固定化颗粒内的分布和反应速率。

为简便起见，定义固定化酶的有效系数  $\eta$  为：

$$\eta = \frac{\text{有微孔内扩散效应下的反应速率}}{\text{无微孔内扩散效应下的反应速率}} \quad (4-6)$$

得固定化酶的反应速率  $v$  为：

$$v = \eta v_{\max} S_a / (K_m + S_a) \quad (4-7)$$

有效系数  $\eta$  是一个与内扩散系数 Thiele 模数  $\phi$  有关的因子。

$$\phi = R \sqrt{v_{\max} / (K_m D_e)} \quad (4-8)$$

式中， $R$  为固定化颗粒半径。

在等  $S_a / K_m$  下， $\eta$  与  $\phi$  之间的关系如图 4-1 所示。

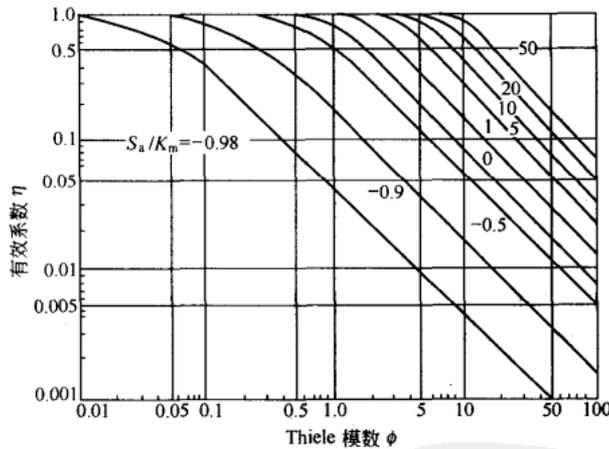


图 4-1 固定化酶的  $\eta$  与  $\phi$  在等  $S_a / K_m$  下的关系  
(板状；用球状解析时，将  $\phi$  值乘 3)

在实际应用中，为测得  $\eta$  值可用如下方法。

① 用不同粒径的固定化酶，分别测其  $v$ 。当粒径再小，而  $v$  不变时， $\eta = 1$ ，用大粒子的实测  $v$  反应速率与之相比即得大粒子的  $\eta$  值。

② 用两种粒径 ( $R_1$ 、 $R_2$ ) 的粒子，分别测其反应速率 ( $v_1$ 、 $v_2$ ) 后，根据  $R_1 / R_2 = \phi_1 / \phi_2$ 、 $v_1 / v_2 = \eta_1 / \eta_2$  的关系，在图 4-1 中对  $\eta$ 、 $\phi$  做双向搜索拟合，即可得  $\eta_1$ 、 $\eta_2$ 。

综合式 (4-6) ~ 式 (4-8) 以及图 4-1 可知  $\eta$  与固定化粒径  $R$  成反比，与  $v_{\max}$  即酶浓度 (量) 的 1/2 次方成反比，与反应的亲和力  $K_m$  的 1/2 次方成正比。即酶的反应速率愈高，

固定化后，在内扩散效应的影响下，其反应效率的发挥程度就愈低。

类似于式 (4-2) 一样处理，可将式 (4-7) 写成下式。

$$v = v_{\max} S / [S + K_{m'(\text{app})}] \quad (4-9)$$

这样就将  $\eta$  并入  $K_{m'(\text{app})}$  之中，在应用时便更加简单。

### 3. 扩散效应的判定

判定出固定化酶在反应过程中究竟存在哪种扩散效应，与对反应动力学的解析及应用都至为重要。其判定的方法很多，其中比较简便易行的是 Arrhenius 图解法。根据反应速率与温度  $T$  之间的关系，如果反应受纯动力学控制，则在较低的温度下，活化能的响应值不变，如图 4-2 所示曲线下部；在中等温度下，若存在内扩散限制，则活化能的响应值减半，如图 4-2 所示曲线中段；若存在外扩散限制，即使在较高温度下，活化能的响应值亦为零，如图 4-2 所示曲线上部。判定时应注意在酶反应中此处的反应速率常数  $K$  的测定和解释条件。

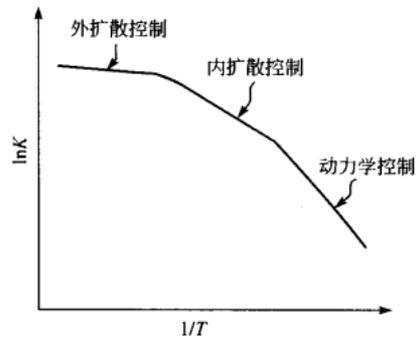


图 4-2 Arrhenius 图解法判定扩散效应

### 参 考 文 献

- 1 罗贵民. 酶工程. 北京: 化学工业出版社, 2002
- 2 郭勇. 酶工程. 北京: 轻工业出版社, 1994
- 3 陈响声, 居乃琥, 陈石根. 北京: 轻工业出版社, 1987
- 4 贾士儒. 生物反应工程原理. 北京: 科学出版社, 2003



# 第五章 酶的生产

## 第一节 天然植物酶和动物酶的生产

20世纪50年代伊尔勒(Earle)等人开始进行病毒疫苗的细胞培养,揭开了动物细胞培养的序幕,并得到迅速发展。这一技术现在已经被广泛应用于疫苗、激素、多肽药物、单克隆抗体、酶、皮肤、人体组织和器官的生产。1902年哈勃兰德(Haberlandt)首次提出分离植物单细胞并将其培养成植株的设想,现在这个设想早已实现,并且人类已能够通过植物细胞培养获得400多种人们所需的物质。现在植物细胞培养技术主要用于色素、药物、香精、酶等次级代谢产品的生产。

所谓动植物细胞培养产酶,就是通过特定技术获得优良动植物细胞,在人工控制条件的反应器中进行培养,以获取所需产物——酶的过程。同微生物发酵相比,动植物细胞培养有一些显著的特殊性,应在培养过程中给予重视:①动植物细胞比微生物细胞大得多,体积为微生物细胞的几千倍;②动植物细胞均对剪切力敏感,其中动物细胞因为没有细胞壁,对剪切力更为敏感;③动植物细胞的生长速率比微生物低,故生长倍增时间和发酵周期均较微生物要长;④动物细胞的营养要求比微生物和植物都复杂,往往需要添加血清和其他营养成分。

### 一、植物细胞培养产酶

植物为人类提供了大量的色素、香精、药物和酶,目前这些物质几乎都是通过提取分离法获得的,但由于植物的栽培和生长受地理环境和气候等条件的影响较大,使这种方法受到原料的限制。而植物细胞培养法相比较而言,有如下优势:产率高;周期短,如木瓜从发芽到收获需8个月,而发酵周期仅为10~30天;易于管理,劳动强度低;产品质量高,这是由于目标产物浓度高,而且处于可控条件下,从而免受农药和微生物的污染。目前通过植物细胞培养生产的酶见表5-1。

表 5-1 植物细胞培养生产的酶

酶	植物细胞	年份	酶	植物细胞	年份
糖苷酶	胡萝卜细胞	1981年	酸性转化酶	甜菜细胞	1988年
$\beta$ -半乳糖苷酶	紫苜蓿细胞	1982年	碱性转化酶	甜菜细胞	1988年
漆酶	假挪威槭细胞	1983年	糖化酶	甜菜细胞	1988年
过氧化物酶	甜菜细胞	1983年	木瓜蛋白酶	木瓜细胞	1990年
	大豆细胞	1989年	苯丙氨酸裂合酶	花生细胞	1986年
$\beta$ -葡萄糖苷酶	利马豆细胞	1987年		大豆细胞	1989年

#### 1. 植物细胞培养产酶的一般工艺过程

外植体→细胞获取→细胞培养→分离纯化→产物。

外植体是指从植株取出一小段(包括根、茎、叶、芽、花、果实、种子等),经过预处理后,用于植物组织培养和细胞培养。

细胞是由外植体中获得的，可以采用机械法或酶法进行直接分离，也可通过愈伤组织诱导法或原生质体再生法得到一定体积的小细胞团或单细胞悬浮液。

将获得的植物细胞在无菌条件下转入新鲜培养基，在人工控制条件的生物反应器中，进行细胞悬浮培养，并获得所需的酶。培养完毕后，将细胞从培养液中分离，利用生化分离手段将培养液中的酶分离纯化出来。

## 2. 工艺条件的控制

(1) 培养基 植物细胞与微生物细菌对培养基的要求有较大差别。植物细胞需要大量的无机盐，除了P、S、K、Ca、Mg等大量元素外，还需要B、Mn、Zn、Mo、Cu、Co、I等微量元素；需要多种维生素和植物激素，如硫胺素、吡哆素、烟酸、肌醇及激动素等；植物细胞要求的氮源一般为无机氮源，如硝酸盐和铵盐；植物细胞多以蔗糖为碳源。

(2) 温度和pH值 植物细胞一般选用室温（25℃左右）培养。有些植物的最适生长温度和最适发酵温度有所差别。至于pH值，一般在微酸性范围，即pH5~6。

(3) 搅拌 植物细胞代谢较慢，需氧量小，而且过多的氧气反而带来不良影响，对剪切力敏感，所以通风和搅拌不能太强烈。

(4) 刺激剂的应用 在培养基中添加适当的刺激剂，常用的有微生物细胞壁碎片和胞外酶，可以有效地提高某些产物的积累量。

## 二、动物细胞培养产酶

动物细胞培养有两种方法：一类是来自血液或淋巴组织的细胞、肿瘤细胞和杂交瘤细胞等，采用悬浮培养；另一类是来自复杂器官的细胞，具有锚地依赖性，必须依附在固体或半固体的表面才能生长和进行正常的代谢，这类细胞必须采用贴壁培养，如采用滚瓶培养系统和微载体系统。而固定化细胞培养既适用于锚地依赖性细胞，又适用于非锚地依赖性细胞。动物细胞培养工艺条件控制如下。

(1) 温度 不同种类的动物细胞对温度的要求不同，如哺乳动物细胞的最适温度为37℃，鸡细胞为39~42℃，昆虫类细胞为25~28℃，鱼类细胞20~26℃。一般来讲，细胞对低温的耐受力强于对高温的耐受力。

(2) pH值 大多数动物细胞最适pH7.2~7.4，低于pH6.8或高于pH7.6时，细胞停止生长，甚至死亡。通常在培养基中加入一定浓度的磷酸缓冲液，用于防止培养过程中代谢产物造成pH值的变化。

(3) 溶氧 不同种类的动物细胞，或处于不同生长阶段的同种细胞，对溶解氧的要求都是不同的。应根据具体情况，随时对溶氧加以检测和调节控制。

(4) 渗透压 培养液的渗透压应与动物细胞内的渗透压处于等渗状态，一般控制在700~850kPa。

## 第二节 微生物酶的生产

1894年，日本科学家首次从米曲霉中提炼出淀粉酶，并将淀粉酶用作治疗消化不良的药物推向市场，从而开创了人类有目的地生产和应用酶制剂的先例。1908年，德国科学家从动物的胰脏中提取出胰酶（胰蛋白酶、胰淀粉酶和胰脂肪酶的混合物），并将胰酶用于皮革的鞣制。同年，法国科学家从细菌中提取出淀粉酶，并将淀粉酶用于纺织品的退浆。1911年美国科学家从木瓜中提取出木瓜蛋白酶，并将木瓜蛋白酶用于除去啤酒中的蛋白质浑浊物。此后，酶制剂的生产和应用就逐步发展起来了。然而，在此后的近半个世纪内，酶制剂

的生产一直停留在从现成的动植物和微生物的组织或细胞中提取酶的方式。这种生产方式不仅工艺比较复杂,而且原料有限,所以很难进行大规模的工业生产。1949年,科学家成功地用液体深层发酵法生产出了细菌 $\alpha$ -淀粉酶,从此揭开了近代酶工业的序幕。此后在欧洲、美国和日本先后建立了一些酶制剂工厂,生产动植物酶,如胰酶、胃蛋白酶、木瓜酶、麦芽淀粉酶以及真菌淀粉酶、细菌淀粉酶等少数品种,其应用范围还限于作为消化剂、制革工业脱灰软化剂和棉布退浆剂等,20世纪50年代前酶制剂工业没有什么惊人发展。

直到20世纪60年代,随着发酵技术和菌种选育技术的进步,日本酶法生产葡萄糖获得成功,欧洲加酶洗涤剂开始流行,70年代酶法生产果葡糖浆又获成功,带动了淀粉深加工工业的兴起,开始大量需要工业酶,使酶制剂工业出现重大转机。酶制剂工业是新型的发酵工业,它为工业生产带来了许多好处,如节约成本、改善品质、减少环境污染等。20世纪80年代以后,遗传工程被广泛用于产酶菌种的改良,现在酶制剂工业已成为国民经济的一门重要的高科技产业。酶制剂的世界市场于1970年以后迅速增长。从1978年不到2亿美元增加到1990年的5亿美元。1992年以后,世界工业用微生物酶制剂的市场规模发展迅速,如表5-2所示。1993年已达10亿美元,据估计1999年为19.2亿美元,2002年达25亿美元,2008年将达30亿美元。酶制剂工业是生物工程的重要组成部分,各国都十分重视生物催化剂——酶制剂的发展。

表 5-2 世界工业用微生物酶制剂的市场规模

年 份	销售金额/亿美元	增长/%	年 份	销售金额/亿美元	增长/%
1993年	10	—	1998年	17.3	12.34
1995年	12.50	7.20	1999年	19.2	10.98
1996年	13.5	8.00	2000年	22.10	15.10
1997年	15.40	14.07	2002年	25.7	12.20

国际上知名的酶制剂企业在20世纪80~90年代有70多家,后来经过兼并改组,不少著名企业,如美国Miles公司、荷兰GistBrocades公司、芬兰Finnsugar公司等从这个行业名单中消失。在酶制剂市场中,丹麦Novozymes公司和美国Genencor国际公司分别占世界市场的50%和20%。就近年来酶制剂市场在各应用领域的分配来说,据Businesscommunications Co.估计,1997~2002年的5年中,食品用酶由7.25亿美元增至11.76亿美元,年增长率11.4%;洗涤剂用酶由4.89亿美元增加到8.48亿美元,年增长率13.3%;纺织、制革、毛皮工业用酶由1.65亿美元增加到2.58亿美元,年增长率10.3%;纸浆造纸业用酶由1.0亿美元增加到1.92亿美元,年增长率16.2%;化学工业由0.61亿美元增加到0.96亿美元,年增长率10.5%,平均年增长率为12.2%。与1985年时食品工业占酶制剂市场62%、洗涤剂用酶占33%、制革纺织业用酶占5%相比,10多年来明显的变化是非食品工业用酶领域迅速扩大,主要是植物纤维加工用酶,如纤维素酶、半纤维素酶在棉布加工、纸浆漂白、废纸脱墨等方面有了较大发展,反映了人们环保意识的增强。在日本,目前食品工业酶市场规模约为100亿日元,其中1/3为淀粉糖化用的 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、 $\beta$ -淀粉酶和异构酶,其次是用于肉类软化和蛋白质水解的蛋白酶、肉类加工用的谷酰胺转移酶、果汁加工用的纤维素酶与油脂加工和乳制品用的脂肪酶。

酶主要通过两条途径获得:一是化学合成,包括酶的化学全合成、酶类似物和模拟酶的化学合成;二是生物合成,即从生物中提制。继1964年中国率先从氨基酸出发合成了具有生物活性的胰岛素之后,1969年又有学者通过化学方法人工合成了有活性的核糖核酸酶,而且发展了一整套固相合成肽的自动化技术。但是,从经济和技术等角度考虑,用化学方法来合成酶的生产还比较遥远。因此,直接从生物制取酶还是现今最主要的办法。

在酶制剂工业发展的早期，酶多从动植物原料中提取，是最早采用并且一直沿用至今的一种方法。采用各种提取技术，直接从动植物的细胞或组织中将酶提取出来，提取方法虽简单易行，但必须要有充足的原材料，这就使酶的广泛应用受到了限制。但是，在动植物或微生物资源丰富的地区，提取法仍然具有应用价值。例如，在屠宰厂，可从家畜胰脏中提取胰酶；在水果加工厂，可从菠萝皮中提取菠萝蛋白酶。

动植物原料一般生长周期长，同时还受地理、气候和季节等各种因素的限制，不适于大规模工业化生产。所以，近年来都转向采用微生物发酵制取，其优点如下。

① 种类繁多，动植物体内所有的酶几乎都能从微生物中找到，并且微生物的筛选方法简单、成熟，有可能在短时间内根据其应用特点和要求从成万个菌株中筛选出最佳的产酶菌株。

② 繁殖快、发酵周期短、培养基价格低廉，能通过控制培养条件大幅度提高酶的产量，酶制剂可以实现大规模、低成本的工业化生产。

③ 微生物具有较强的适应能力，可以通过改变微生物的遗传性质，培育出新的、更理想的菌株，从而大大提高产酶水平。通过对产酶菌种的选育，可以使参与微生物分解代谢的酶活水平提高几千倍，使参与合成代谢的酶活提高几百倍。

④ 同样的反应可以用来源于不同微生物的性质相近的酶催化，因此可灵活选择生物反应器，以便与前后工序相配合。

基于以上优点，利用微生物生产酶制剂大大降低了酶的生产成本，提高了酶制剂的生产能力，从而推动了工业规模酶制剂的生产和发展。

## 一、产酶菌的获取

### 1. 工业上对产酶菌的要求

① 非致病菌，在系统发生上与病原体无关，也不产生毒素。这一点对食品用酶和医药用酶尤为重要。

② 菌种的遗传性能稳定，不易变异退化，不易感染噬菌体。

③ 除蛋白酶生产菌种外，其他产酶菌种的产蛋白酶活力应该很低，防止目标酶的水解。

④ 目标酶的产量要高，酶的性能符合应用需要，而且酶的提取简便，最好是产胞外酶的菌株。

⑤ 能利用廉价原料，发酵周期短，容易培养。

产酶菌一般都要通过筛选得到，筛选包括以下环节：菌样采集、菌种分离、菌种纯化和生产性能鉴定。

### 2. 产酶菌的分布规律

① 相近菌种产生的酶在性质上一般相近或相似，例如，地衣芽孢杆菌和淀粉液化芽孢杆菌是近缘菌，它们产生的蛋白酶性质就很相似；反之，不相关的菌种，所产的酶或酶系则往往不同。

② 胞外酶的稳定性和最适反应条件通常和菌产酶的最适生长条件一致。例如，嗜碱枯草杆菌来源的蛋白酶作用的最适 pH 值就比嗜中性地衣芽孢杆菌来源的蛋白酶高出几个 pH 值单位。同样，从耐热的凝结芽孢杆菌得到的  $\alpha$ -淀粉酶与常温淀粉液化芽孢杆菌来源者相比，其作用的温度范围就要高 10℃ 左右。但是胞内酶的热稳定性常比该菌的最适生长温度要稍低一些，这可能是因为细胞内环境对酶有保护作用。

③ 为获得能够降解某种物质的产酶菌株，一般可从该物质比较丰富的地方寻找。例如，豆科植物根系土中，往往存在根瘤菌；油田和炼油厂周围土层中常见分解石油的微生物；分

解尿酸的产酶菌株可从鸡棚、鸡粪堆中分离；而要降解某些合成物质的产酶菌则往往能在污水处理处得到。菌样采集后，通常还要进行一些“富集”预处理，例如，在较高温度培养一定时间，或使用高选择性生长培养基培养一定时间，以提高目标菌种的数量。然后再进行菌种的分离、纯化。产酶菌可采用常规的平板划线法或直接稀释法分离、纯化。

### 3. 菌种生产性能的检定

生产性能检定主要通过初筛和复筛确定。初筛是从已分离出来的菌种中挑出能产生目标酶的菌株，复筛是在初筛的基础上筛选产酶量高、性能更符合要求的菌株。初筛要求检出方法快捷、简便；复筛则要求测定方法相对准确可靠。

初筛多采用平板培养透明圈法。例如，筛选水解酶的生产菌，就以该酶的底物作为平板培养基的主要碳源或氮源。这种情况下，如果某菌株产生所需要的酶，那么经过一段时间的培养后，就会在该菌落的周围形成一个透明的水解圈（clearing or lysis zone）。例如，用含有木聚糖的平板筛选产木聚糖酶的菌株。从透明圈的大小可大致判断出菌株的产酶能力。但是，根据透明圈来判断并不一定准确，因此，必须进行摇瓶培养，采样测定酶的活力。从产生透明圈的早晚可大致判断该菌株的产酶时间，通过比较不同培养条件下透明圈的大小还可大体了解该菌对培养条件的要求。有时透明圈不明显，可在培养结束时加入底物的沉淀剂，使未分解的底物析出，这样透明圈就能更清晰地衬托出来，如采用刚果红染色法和乙酸铜染色法。另一种办法是以接有色素的色原底物（chromogenic substrate）作为平板培养基的主要碳源或氮源，可以直接观察到水解圈的有无及大小，如果是产酶菌，那么在它生长繁殖时，就会将其周围的色原底物水解，释放出色素或接有色素的单体，形成澄明透亮的光环，更便于迅速检出。

复筛多采用摇瓶培养的方法进行，即是将初筛出来的产酶能力较强的菌株移入三角瓶内振荡培养，然后用常规的测定方法对培养产物进行分析检定，从中找出产酶量最高、性能更符合要求的菌株。由于摇瓶条件和发酵罐条件大致接近，所以测得的结果一般能反映产酶菌的实际生产能力。

## 二、产酶菌的培养

### （一）菌种的保存与制备

微生物的优良性状和菌种的保存方法与保存条件有着直接关系。微生物种子的保藏方法多样，各种方法所适用微生物的种类和效果都不一样，在具体应用中各有利弊，不管采用的措施简单还是复杂，它们的原则都是一致的，即选用优良的纯种（最好是休眠体，如分生孢子、芽孢等），创造一个使微生物代谢缓慢、生长繁殖受抑制、不易突变的环境。其环境条件要素是干燥、低温、缺氧以及添加保护剂等。常用的保藏方法有定期移植保藏法、液体石蜡保藏法、沙管土壤保藏法、麸皮保藏法、蒸馏水保藏、冷冻干燥保藏法及液氮超低温保藏法等，各种方法在微生物学方面的书均有详细论述，在此不一一介绍。

在种子制备时应注意两点：①防止污染，尽量减少转移的次数，如直接用固体斜面菌种接种种子瓶；②避免对种子培养基进行长时间高热灭菌，以防对种子的生长产生不良影响。

### （二）培养方法

这里的微生物培养着重指微生物发酵，即让所需要的微生物大量繁殖，并进而产生大量的目标代谢产物——酶。按培养基状态可以分为固体发酵法和液体发酵法。

#### 1. 固体发酵法

固体发酵又称固态发酵，是指微生物在湿的固体培养基上生长、繁殖、代谢的发酵过程。固体发酵的应用很广，历史悠久，是一项古老的发酵技术。古代的人类应用于制造干酪

食品、面包发酵、制曲酿酒、腌制食品、堆肥生产等方面，在人类发展文明史上有着重要贡献。

随着近代科学技术的进步和工业生产的日益扩大，液体深层发酵技术发展迅猛，无论在生产规模和产量方面都大大超过固体发酵。液体发酵工艺具有产量大、机械化程度高、易于监控、转化率高的优点，如大型的发酵设备连续化生产培养酵母，在24h内就可以生产数吨的蛋白质，蛋白质含量高达40%~80%，一座年产万吨饲料酵母的工厂所生产的蛋白质数量相当于666.6hm<sup>2</sup>耕地生产的大豆蛋白。但这种工艺存在投资大、能耗高、成本高的缺点，特别是生产中存在着大量废液污染环境的问题。由于上述限制，加上20世纪70年代以来世界性能源危机的出现和环保意识的增强，固体发酵这一古老的技术又重新受到重视。对污染控制难度的比较最初人们认为，固体发酵比液体发酵较难，倾向于应用液体发酵，但随着近几年来技术的发展，固体发酵污染相对较难控制的问题已得到解决，固体发酵污染面积小，污染后损失小，而液体发酵不污染则罢，如污染就是一罐。

因此近年来中国利用固体发酵产酶发展势头良好。虽然在具体操作和规模及深度方面与国外研究相比仍有一定距离，比如，在利用细菌固体发酵降解农业残留废弃物方面，中国研究很少，大部分停留在发酵试验阶段或用于饲料方面。近年来，由于微生物基因遗传技术的应用，优良菌株的发现和筛选，以及生产工艺方面的改进，也促进了固体发酵技术的发展。

固态的湿培养基一般含水量在30%~80%等。此培养基通常是“手捏成团，落地成散”，所以此发酵有时也可称为半固体发酵。中国农村的堆肥、青饲料发酵和酒曲生产，都是典型的固态发酵。固体发酵主要适合于霉菌，这是由于霉菌细胞内的渗透压比较高，不会因为固体基质的高渗透压而致死。目前中国仍有利用固体发酵法生产酶制剂的，最普遍的是酿酒工业的糖化曲和饲料工业中的酸性蛋白酶。

(1) 固体发酵所用菌种 优良菌种的筛选和培养是固体发酵技术得以应用与突破的关键。除传统的发酵菌株外，菌种的筛选还要符合下列条件：①繁殖速度快，菌体蛋白质含量高；②能较好地同化基质碳源和无机氮源；③无毒性及致病性；④菌种性能稳定，抗杂菌能力强。通常采用的菌种有面包酵母、米曲霉、黑曲霉、白地霉等真菌。此外在生产中采用混菌培养，利用菌群的协同作用提高对底物的利用率，效果良好。在国内，利用菌种多数为霉菌等真菌，只有少数纤维素酶的生产用细菌。在国外，利用嗜热、嗜碱及嗜温性细菌固体发酵生产目标酶的研究大大多于国内，并且在利用其降解农业废弃物方面亦领先一步。中国在开发优良菌种扩大利用范围方面仍大有作为。

(2) 固体发酵的原料 固体发酵的原料来源十分广泛。利用最多的是谷物的糠麸，还有淀粉或糖的农副产品及其渣粕和工业废渣等，如薯渣、玉米渣等淀粉渣可用于酶制剂方面。而利用秸秆类和蔗渣等农业废弃物则较困难，主要是因为此类原料对酶的降解有较大抗性。工业废渣是另一类数量庞大的可利用原料，如豆制品的豆渣、酒糟、啤酒渣、果品饮料加工的果渣、工业发酵生产的各种废渣等，此类废渣含水量大，有机质含量高，处理不及时极易污染环境，直接干燥则耗能太大，得不偿失，直接作饲料由于不能保存，喂养不当，反而无益。采用固体发酵技术可大量处理此类废渣，能获得较好效果。有关这方面的应用，国内外均有成功的经验和商品化生产。此为绿色环保工程，值得大力推广。

(3) 固体发酵的方法 根据固态发酵微生物的特点分为好氧发酵、兼性好氧与厌氧固体发酵。厌氧菌固体发酵生产较简易，一般采用窖池堆积，压紧密封进行。好氧菌的固体发酵生产可以将接种后的培养基摊开铺在容器表面，静置发酵，也可以通气或翻动，使能迅速获得氧和散去发酵产生的热。因通气、翻动、设备条件、发酵菌种和产物等的不同，固体发酵的反应器和培养室也是多种多样的。

① 浅盘法 将固体培养基平铺在浅盘或竹匾内，进行微生物培养和产酶。固体培养基的堆积厚度约 3~5cm，放在能够控制温度的曲房内盘架上进行发酵。该法占用曲室面积大，曲盘数量多，全部依靠手工操作，劳动强度大，卫生条件也差，曲盘清洗灭菌、维修等耗蒸汽和材料也很多，且产量和质量不易稳定，现代工业生产已很少应用。

② 转桶法 将固体培养基接入菌种后，放在可旋转的转桶内，当桶慢慢转动时，培养基即在转桶内翻动，通气及温湿度调节较为均匀，有利于控制微生物生长和产酶的适宜条件。本法的机械化程度较上法稍高，劳动强度也有所减轻，但转桶的清洗灭菌操作较难。

③ 厚层通气法 在浅盘法和竹帘法生产实践的基础上改进而来，将固体培养基经过蒸煮灭菌拌入种曲后，平铺在水泥制的具有多孔假底的大池内，培养基厚度一般在 20~30cm。近年来，国外已有厚度达数英尺者。培养基铺好后，待微生物已开始生长、曲温逐渐升高时，即从池内假底下面通入一定温度和相对湿度的空气，室内同时保持一定温度和相对湿度进行培养，使微生物能在比较适宜的环境生长繁殖和产酶。

与前两种方法比较，设备利用率大大提高，发酵中途也不必人工经常翻曲，劳动强度减轻，是固体发酵法中较好的一种办法。

国外在霉菌酶的生产中采用固体法的较多，尤其是日本，20 世纪 60 年代实现全部机械化。美国所用的浅盘制曲法，系 Underkfler 于 1954 年设计的，加水润湿的麸皮在绞笼中煮熟后送入密闭培养室中的盘内，通入调温调湿空气培养之。日本则使用厚层制曲，合蒸料与培养于一炉，麸皮拌谷糠加稀酸溶液于曲箱假底，通入自动调温、调湿及控制氧气比例的无菌空气。为防污染起见，原料有时还用甲醛或  $\beta$  丙烯内酯灭菌。

在固态发酵中，细菌或酵母附着于固体培养基颗粒的表面生长，而丝状菌可以穿透固体颗粒基质，进入颗粒深层生长。在固体培养中，微生物是在接近于自然条件的状况下生长的，有可能产生一些通常在液体培养中不产生的酶和其他代谢物，如霉菌毒素等，应当引起重视。微生物生长和代谢所需的氧大部分来自气相，也有部分存在于与固体基质混合在一起的水中。所以固态发酵常涉及气、固、液三相，使情况变得非常复杂。固体发酵的气体传递速率比液体发酵高得多，因为固态发酵中固体颗粒提供的液体表面积比深层发酵中气泡提供的界面大得多。由于固体发酵是非均相反应，测定和控制都非常困难，可用于工程设计的参数较少，因此过去大部分发酵过程都依赖经验。随着科学技术的发展和计算机的应用，近来关于固体发酵过程的传热、传质、数学模型的放大方面的研究有显著进展。

## 2. 液体发酵法

液体发酵又分液体表面发酵和液体深层发酵法两种。其中液体深层通气发酵是现代普遍采用的方法，中国酶制剂、抗生素、氨基酸、有机酸和维生素等发酵产品均采用此法生产，而液体表面发酵法实际上已被淘汰。

(1) 液体表面发酵法 又称液体浅盘发酵法或静置培养法。本法系将已灭菌的液体培养基接入微生物菌种后，装入可密闭的发酵箱的浅盘中，薄薄一层，液体厚度约 1~2cm，然后向盘架间通入无菌空气，通过浅盘培养基的表面以供给氧气，并维持一定的温度进行发酵。用此法发酵无须搅拌，动力消耗少，但培养基的灭菌需在另外的设备中进行。缺点是控制杂菌污染较难，所需场地较大。

(2) 液体深层通气发酵法 本法是中国目前酶制剂发酵应用最为广泛的方法，所用主要设备——发酵罐是一个具有搅拌桨叶和通气系统的密闭容器。发酵罐的容量，国内多采用 10~50t，国外普遍采用 100t 以上。目前从培养基灭菌、冷却到发酵都在同一罐内进行。液体发酵法生产酶制剂的工艺技术，目前采用分批（间歇）发酵法，也有人主张在酶的生产中尝试另外两种方式。

① 分段式培养 (two-steps cultuer, sequential cultuer) 是根据生产菌在生长阶段和产酶阶段对培养条件要求的不同加以区别对待进行的一种培养。例如, 以灰色链霉菌生产  $\alpha$ -甘露糖苷酶为例, 该菌可先用富集培养基在 28℃ 进行培养, 使菌体充分生长; 17h 后, 分离取出菌体, 洗净, 再转入含有酵母  $\alpha$ -甘露聚糖作为诱导物的稀盐培养液中进行培养, 让酶大量诱导合成; 这样 18~24h 后,  $\alpha$ -甘露糖苷酶的浓度就能达到最高水平, 产量远高于批量式发酵。由于是一种“针对性”的培养, 营养物质浪费少, 有人认为对酶生产来说它是一种很有前途的培养方式。但也有异议, 因为从总体看, 这种培养获得的产量不一定最高, 而且不适用于大规模生产。

② 连续发酵 (continuous culture) 即先将菌体培养至某一生长阶段, 如对数期, 然后一方面连续添加新鲜的培养基, 另一方面又不断地以相同速率放出培养产物。添加和放出速率应与生长产酶速率一致, 使菌体始终处于恒态条件下生长和产酶。连续发酵的优点是可以大大提高劳动生产率, 同时还可能打破酶合成过程中的反馈阻遏, 使产酶率显著提高。例如, 用野生型的铜绿色极毛杆菌生产酰胺酶, 乙酰胺等可以诱导它的合成, 但乙酸等能阻遏其产生。在乙酰胺等诱导物存在的条件下进行批量式发酵时, 产酶率为每毫克菌体每分钟产酶 5~10U; 但如果在同样条件下进行连续发酵, 那么产酶率可提高 12 倍以上。连续发酵的关键是如何避免染菌和菌株变异。连续发酵现也常用于突变株筛选。这一方法若获得成功, 将会大大提高酶制剂工业的技术水平和经济效果。

综上所述, 固体发酵法与液体发酵法相比的主要优缺点, 归纳如表 5-3 所示。

表 5-3 固体发酵法与液体发酵法相比的主要优缺点

优 点	缺 点
培养基水分含量少, 废水、废渣少, 环境污染少, 容易处理; 能耗低, 供能设备简易; 培养基原料多为天然基质或废渣, 广泛易得, 价格低廉; 设备和技术较简易, 后处理方便; 产物浓度较高, 后处理方便	菌种限于耐低水分活度的微生物, 菌种选择性少; 发酵速度慢, 周期较长; 天然原料成分复杂, 有时变化, 影响发酵产物的质和量; 工艺参数难检测和控制; 产品少, 工艺操作消耗劳力多, 强度大

### (三) 培养条件

培养条件关系到菌株的生长、繁殖, 也影响酶的合成, 因此, 在选择发酵条件时既要考虑到菌的生长需要, 又应兼顾到酶的合成要求, 并在两者间做出权衡、选择, 找到最佳的结合点。一般的办法总是先确定菌生长的最适条件, 然后再调整各种因素, 以期同时满足酶合成的需求。由于固体发酵与液体发酵培养条件差异较大, 在此分别叙述。

#### 1. 固体发酵的培养条件

(1) 原料的处理 首先是物料的粉碎, 其目的是提高微生物和原料的接触面积, 释放原料中的营养物质, 使微生物容易消化。但若粉碎过细, 不仅增加动能消耗, 使工作环境的粉尘难于处理, 而且发酵过程中因通风不足容易引起酸败菌大量繁殖。若粒度过大, 则物料难以降解, 营养物质也无法释放, 微生物生长缓慢, 严重影响发酵过程。

其次要求发酵底物应有合理的碳氮比和生长因子, 以及长效和短效物质的比例。碳源物质除来源于原料中提供的小分子物质外, 剩下的主要来自纤维素或淀粉的降解, 其最初的降解产物并不能满足菌株迅速生长的需要, 所以发酵初期要加入容易利用的物质作为发酵的启动因子。氮源物质大多使用尿素、硫酸铵、磷酸铵、硝酸铵或氯化铵。尿素和硫酸铵的添加量与发酵产物的真蛋白含量呈抛物线的关系, 且以尿素效果较好。当尿素添加量为 2% 时, 发酵产物的真蛋白含量最高。尿素添加量不宜高于底物干物重的 1%。例如, 康宁木霉和长柄木霉对氮的耐受性分别为 0.33% 和 0.48% (以硫酸铵计)。除了以上的比例外, 还要注意

生长刺激物质和生长因子的使用，另外如果菌种拌和不均匀，尤其是无机添加物拌和不均匀，就会使局部烧料而其他地方营养不足。

(2) 发酵条件的控制 温度、时间、水分等因素及其交互作用对物料发酵有显著影响，而温度是首要因素。一方面随温度上升，细胞中的生物化学反应速率和生长速率加快；另一方面机体的重要组分，如蛋白质、核酸等对温度都较敏感，若温度升高，它们可能遭受不可逆的破坏。温度过高会降低秸秆中木质素的降解率和瘤胃干物质的消化率；温度过低，会导致固体发酵进度缓慢。根据报道，绝大多数真菌的发酵温度为 25~35℃，嗜热真菌则高达 50℃。

如果用真菌固体发酵，最好原料的 pH 值偏酸性，这样有利于真菌的生长而抑制细菌的滋生。以秸秆为例，实际生产中固体发酵接种时不必考虑基料的 pH 值，因为其可在发酵早期产生大量的有机酸，使秸秆的 pH 值降低，为后期发酵创造适宜的酸性环境。对于细菌则应该令 pH 值在中性左右；对于放线菌，发酵 pH 值应控制在中性偏碱。

水分含量过低会使菌体的生长受到抑制；增加水量，则蛋白质产率增大。但水分含量过高会影响 O<sub>2</sub> 通入及热量的散失，发酵过程中产生的 CO<sub>2</sub> 也难以排除，对菌株的生长不利。并且含水量过大不但制曲时容易污染细菌，造成种曲不纯，而且菌丝吃料缓慢，不易形成孢子，种曲制成后不易干燥，严重影响种曲保藏。

要缩短发酵周期，就要考虑所用的发酵菌种和发酵工艺。有研究认为，混合菌接种时间对菌种的产酶效率具有明显影响，从而导致玉米秸秆中纤维素利用率的不同。用显微镜观察、细胞计数发现微生物的生长处于稳定期时，应及时出料，防止微生物自溶使蛋白质降解，降低产品质量。真菌大多数为好氧或兼性厌氧菌，因此无须密封。

## 2. 液体发酵的培养条件

(1) 培养基组成 在培养条件中，培养基组成对菌体的生长和酶的合成都有着最直接的影响。

① 碳源 碳源是菌体细胞组成的原料，在细菌、酵母和霉菌的细胞干物质中，碳约占 50%，是菌体生长发育必需的能源物质。各种微生物利用碳源的能力很不相同，有的可利用多种碳源生长和产酶，有的却只有利用特定的碳源才能进行酶的合成。例如，链霉菌 (*Streptomycin*) 生产葡萄糖异构酶需要 D-木糖或木聚糖；假丝酵母生产脂肪酶却只能利用葡萄糖。一般来说，生产分解代谢有关的酶类应避免使用易被利用的碳源为培养基（如葡萄糖等），也不宜提供过于丰富的碳源，否则可能导致分解代谢产物阻遏。某些碳源是酶的诱导物，选择适宜的碳源既可提高相应酶的产量，也有利于定向地促进某些酶的合成，如甘露聚糖可诱导甘露聚糖酶的生成。

② 氮源 细胞的干物质中氮含量仅次于碳和氧，它是组成菌体蛋白质和核酸的重要元素。从分子态的 N<sub>2</sub> 到复杂的含氮化合物都能被不同的微生物利用，不同微生物对氮源的利用情况差异较大。例如，用橘青霉生产 5'-磷酸二酯酶，菌的生长和产酶都以有机氮效果为好；有的菌却倾向利用无机氮，如以黑曲霉生产淀粉酶，用硝酸盐可使其产酶率显著提高。还有一类情况，菌的生长和产酶阶段对氮源的要求也不同，例如，有机氮可促进绿色木霉生长，而铵盐或硝酸盐却有利于其纤维素酶的合成。此外，氮源的具体性质和使用浓度都能在不同程度上影响到菌体的生长和酶的形成。

③ 碳氮比 (C/N) 在某些情况下，碳氮比可直接关系到菌的生长和产酶。例如，较低的碳氮比 (C/N) 常有利于蛋白酶产量的提高，但是这种条件下，发酵后期培养基的 pH 值往往会向碱侧偏移，反过来又会阻遏蛋白酶的积累。因此选择并控制适宜的碳氮比也是提高酶产量的一个重要因素。

④ 金属离子及对应的阴离子 这些离子直接参与细胞物质的组成, 或作为酶的活性组成部分与活化剂发挥作用。例如,  $\text{Co}^{2+}$  能促进葡萄糖异构酶的生成, 而  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  等影响却相反。值得注意的是, 离子浓度常具有关键的意义, 例如,  $\text{Co}^{2+}$  浓度小于  $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  时, 能显著提高葡萄糖异构酶的产量, 但大于  $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  时, 它产生的却是阻遏效应。至于离子性质, 对钠 ( $\text{Na}$ ) 的化合物而言,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的促进作用最大; 对氟 ( $\text{F}$ ) 的化合物而言,  $\text{CaF}_2$  促进作用最显著。  $\text{Cl}^-$  和  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  常起阻遏作用。

⑤ 生长因子 它们是一些微量有机物, 主要是些 B 族维生素, 也包括氨基酸、嘌呤、嘧啶及其衍生物, 有时还包括一些脂肪酸及其他膜成分。生长因子有两种作用。一是对微生物代谢活动起调节作用, 在产酶菌的培养过程中, 如果添加含有某种生长因子的物质, 常可使酶产量大大提高; 二是作为辅酶的构成成分, 影响酶的活性, 某些产酶菌在缺乏它们的培养基中虽然可以生长得很好, 而且同样可以合成酶蛋白, 但是形成的酶却可能不具有活性。

⑥ pH 值 培养基的酸碱度对微生物的生长和产酶往往有很大的影响。大多数细菌最适 pH7 左右, 霉菌偏向于酸性。在微生物生长繁殖的过程中会产生引起培养基 pH 值改变的代谢产物, 尤其当微生物产酸能力较强时, 若不适当地加以调节, 就会抑制甚至杀死其自身。概括地说, 相当多的水解酶, 产酶的最适 pH 值与酶作用的最适 pH 值相近; 不过, 有些水解酶和氧化酶, 二者相差可能较大。很多微生物能同时产生几种相关的酶, 当培养基的 pH 值改变时, 各种酶的合成比例也可能随之而变。有些酶在其催化过程中能引起介质酸碱度的改变, 通常有利于那些能产生中和介质产物的酶类生成。培养基的 pH 值和培养基组成往往有关, 特别是培养基组成成分的生理性质对它有很大的影响。

⑦ 湿度 湿度能直接影响固体发酵的产酶率, 也与产酶达到高峰的时间有关。不过由于菌和酶的种类繁多, 难以找出一定的规律。

据估计, 培养基的成本约占发酵成本的 70%, 在考虑培养基组成时, 除了上述各种影响因素外, 培养基的价格也应重点考虑。在设计培养基时, 可以通过正交法、化学工程法、响应面法等确定最优配方。

(2) 通气量 由于大多数产酶菌是好气菌, 因此调节通气量对提高酶产量往往有直接意义。一般来说, 采用液体深层发酵时, 较小的通气量有利于霉菌的孢子萌发和菌体生长, 而较大的通气量则常可促进酶的形成。固体发酵似有不同的规律, 菌体生长通常要求较好的通气条件, 而较小的通气量却能显著提高酶的产量。

(3) 培养温度 培养温度不仅能影响菌的生长, 也能影响酶的合成。微生物不同的生理活动需要在不同的温度条件下进行, 例如, 乳酸链球菌在  $34^\circ\text{C}$  时繁殖速率最快,  $25\sim 30^\circ\text{C}$  时细胞产量最高,  $40^\circ\text{C}$  时发酵速率最快,  $30^\circ\text{C}$  时乳酸产量最高。因此, 研究不同微生物生长或积累代谢产物阶段时, 采用不同的最适温度对提高发酵生产的效率具有十分重要的意义。大多数情况是, 产酶菌在低于最适生长温度条件下培养时, 酶产量比较高。因此对生产菌种要掌握它的不同温度要求, 在发酵前期可以将其控制在较高的温度下以利于菌体快速生长, 而在发酵后期则应将温度降低, 以促进产物生成。另一方面, 培养温度也可能直接影响酶合成后的稳定性, 特别是酶的耐热性。

#### (四) 采酶时机

对于大多数胞外酶来说, 酶的合成和菌体的生长有大致平行的关系: 生长停止时, 酶产量达到最大; 继续培养, 酶产量往往会以不同的速率逐渐下降。例如, 重组枯草芽孢杆菌生产溶葡萄球菌酶, 培养 15h 左右达到产酶高峰, 菌的生长也趋于稳定; 16h 后酶产量迅速下降。一般而言, 要掌握准确的采酶时机, 在实验阶段及中试时就必须严格操作, 做出稳定的生长产酶曲线, 为工业生产提供可靠数据。一般的生长产酶曲线为 S 形, 如图 5-1 所示。

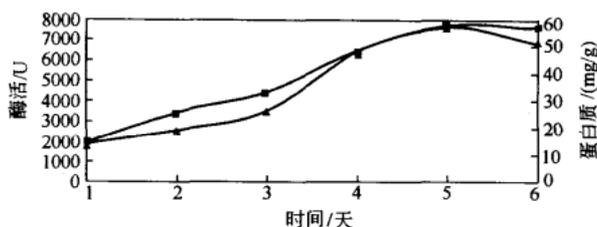


图 5-1 生长产酶曲线示意

—□—酶活；—○—蛋白量

优良菌种的筛选、适宜培养条件的确定是获得高酶产量的重要措施，但是仅靠这些办法往往不够，为使酶产量有一个飞跃，还需要另外一些更有效的办法，这将在下面的章节中介绍。

### 三、微生物酶的生产流程

#### 1. 酶的生产流程

酶的种类很多，产酶菌种各异，但其发酵生产的工艺流程是相似的，一般有固态发酵法和液态发酵法之分，具体采用何种方法由微生物和酶的种类来决定。以最常见的纤维素酶生产工艺为例，主要流程如图 5-2 所示。

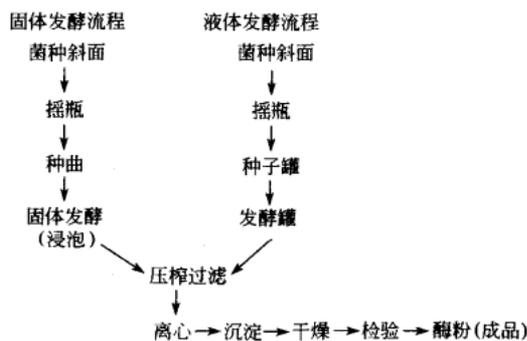


图 5-2 纤维素酶发酵生产的一般工艺流程

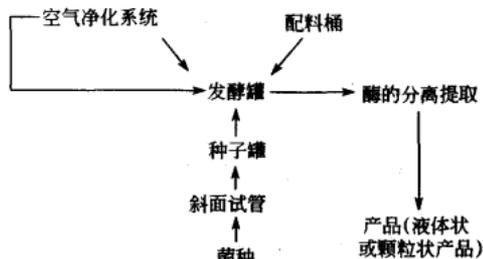


图 5-3 液体深层发酵生产的一般工艺流程

下面从固体发酵、液体发酵两方面分别简要介绍微生物发酵的工艺流程。液体深层发酵工艺流程如图 5-3 所示。液体深层发酵过程的控制、发酵产酶过程中菌种产酶的性能是决定发酵效果的重要因素，为了提高产酶水平，需要对发酵过程参数进行良好的控制。这些过程参数除培养基组成成分以外，还包括温度、pH 值、搅拌、消泡剂、溶解氧等，这些参数对微生物产酶的影响是相互联系、相互制约的，若给予良好的调节控制，可使酶的生物合成达到最佳水平。

固体发酵生产的主要步骤有菌种扩大培养、原料预处理、接种发酵、干燥灭活和成品包装。由于固体发酵含水量一般为 30%~80%，固形物含量大，需要发酵菌数量大，一般要求达到发酵原料的 10% 以上，因此菌种需由单菌扩大培养为菌母。原料均预处理后，调制混合，热蒸汽灭菌，添加无机氮源、营养盐和某些助剂后与菌母搅拌混合，进入发酵生产过程。固体发酵是需氧发酵，物料厚度要适当，要疏松以通气，发酵过程会产生热，水分蒸发，需翻动物料，控制通风和空气湿度等。目前已采用一些新技术对生产工艺进行改造，如菌种

改多级培养为恒化器连续培养，发酵过程采用自动翻料、卸料的机械化操作，采用净化空气防止杂菌污染等措施来保证产品质量。

## 2. 酶的发酵染菌及其控制

从种子制备到发酵结束这一全过程中，应定时取样，进行无菌检验，以及早发现染菌并及时做出恰当处理，避免染菌带来的损失进一步加重。

(1) 无菌检查 从培养基灭菌后到放罐前，应每隔 8h 取样一次做无菌检查。主要通过肉汤培养法和双碟培养法，辅以显微镜观察，确定是否染菌，并将样品保存并观察至本罐放罐后 12h，确认无菌污染后才可弃去。

(2) 染菌的处理 杂菌污染的处理方法应根据染菌的时间和杂菌的危害而定。

① 若是种子罐染菌，则不能接入下一步，只能高压蒸汽直接灭菌后放掉。

② 发酵罐前期染菌的，若污染菌株危害大，也应灭菌后放掉，若危害不大，可重新灭菌和接种。如杂菌量很少，且生长缓慢的，可继续进行，但要时刻注意杂菌的数量变化。

③ 发酵中后期染菌的，可以加入适量杀菌剂以抑制杂菌生长，也可通过降低温度和降低补料量来减缓杂菌的生长速率。如不奏效，应提前放罐。

遭遇染菌的发酵罐放罐后，应用甲醛等化学物质处理，再用蒸汽灭菌，并进行严密检查，防止渗漏，这样才能保证下一批免于染菌。

(3) 染菌的原因 根据对染菌原因分析的统计资料，空气带菌为最主要的原因，其次还包括种子带菌、夹套穿孔以及设备泄漏。染菌时应首先从以上几方面着手找出原因，及时补救。

## 3. 品级酶发酵生产举例

(1) 菌种选育 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶生产菌种均为地衣芽孢杆菌的突变株。丹麦 Novozyme 公司 Outrup 等人将地衣芽孢杆菌 (*Bacillus Licheniformis*) ATCC9798 作为出发菌株，经物理化学方法反复处理，使  $\alpha$ -淀粉酶活力提高了 25 倍。日本丸尾等人以地衣芽孢杆菌 NYK74 为出发菌株，采用亚硝基胍为诱变剂，反复连续诱变及自然选育 6 次，挑选环丝氨酸抗性突变菌株，发现耐高温淀粉酶产量随耐药性剂量增大而增大。在抗环丝氨酸剂量为  $400\mu\text{g}/\text{mL}$  的突变株中，得到一株产酶比出发菌株提高了 2000 倍的菌株。

(2) 发酵生产 以乳糖、大豆粉、棉子粉、柠檬酸钠、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、玉米浆为原料配制培养基，接种种龄 40h 的地衣芽孢杆菌种子 5%，通空气  $0.5\text{mL}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ，搅拌功率  $478.1\text{W}/100\text{L}$ ，在中间补料下发酵 100h。在  $15^\circ\text{C}$  进行压滤，滤液在  $10^\circ\text{C}$  下超滤浓缩到 50%，然后在  $32^\circ\text{C}$  真空浓缩到 20%，并在  $10^\circ\text{C}$  精滤除菌。然后加入  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 、山梨酸钾、对羟基苯甲酸酯、对羟基苯丙酯作为防腐剂，乙酸钙作稳定剂，制成成品液体酶，总得率 72%。

## 第三节 提高酶发酵产量的方法

正常情况下，酶产量受其合成调节机制的控制，要大幅度提高酶产量就必须设法打破这种调控机制。

### 一、酶的合成调控机制

酶和其他蛋白质一样，它的合成可在复制 (replication)、转录 (transcription) 和翻译 (translation) 等各种水平上进行调节控制。对于原核生物 (prokaryote) 来说，由于其转录和翻译过程紧密关联，因此，只要控制转录，也就可控制酶的合成。原核生物的转录调节机

制现在普遍接受的是操纵子模型。

### 1. 操纵子 (operon)

操纵子包括结构基因 (structure)、启动基因 (promotor) 和操纵基因 (operator) 3 个部分。结构基因荷载着有关酶的结构密码, 决定酶的结构和性质; 在代谢功能上相互关联的酶, 其结构基因常集中在操纵子 DNA 链的一个或几个特定区段内, 组成多顺反子 (poly-cistran)。操纵基因和启动基因等组成操纵子的调控部分。

图 5-4 是大肠杆菌的乳糖操纵子 (Lac 操纵子) 的结构示意。这是个较简单的操纵子模型, 其中 Z、Y 和 A 分别代表与乳糖代谢有关的 3 种酶的结构基因, 它们和操纵基因等共同组成一个基因表达调控单位。操纵基因在操纵子中起“开关”作用, 当开关“开启”时, 附着在启动基因上的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 (DNA dependent RNA polymerase, DDRP) 就能通过这一开关, 沿着结构基因移动, 并以结构基因为模板进行转录, 合成相应的 mRNA; 而后 mRNA 再转入翻译, 合成有关的蛋白质或酶。反之, 当操纵基因“关闭”时, DDRP 无法从起始点滑向结构基因, 转录无法进行, 当然也就不能合成相应的蛋白质或酶。操纵基因的开关又受调节基因 (regulator gene) 的控制。调节基因编码调节蛋白, 调节蛋白是一类别构蛋白, 大多表现阻遏作用 (repression), 故称为阻遏蛋白 (repressor)。在某些酶的合成调节机制中, 阻遏蛋白直接和操纵基因结合, 阻遏转录的进行; 而在另一些酶的合成调节机制中, 阻遏蛋白本身不能直接和操纵基因结合, 只有在相应的效应物存在的条件下, 两者结合形成阻遏蛋白-效应物配合物以后, 才能进一步与操纵基因结合, 使之关闭; 这种效应物称为辅助阻遏物 (co-repressor)。

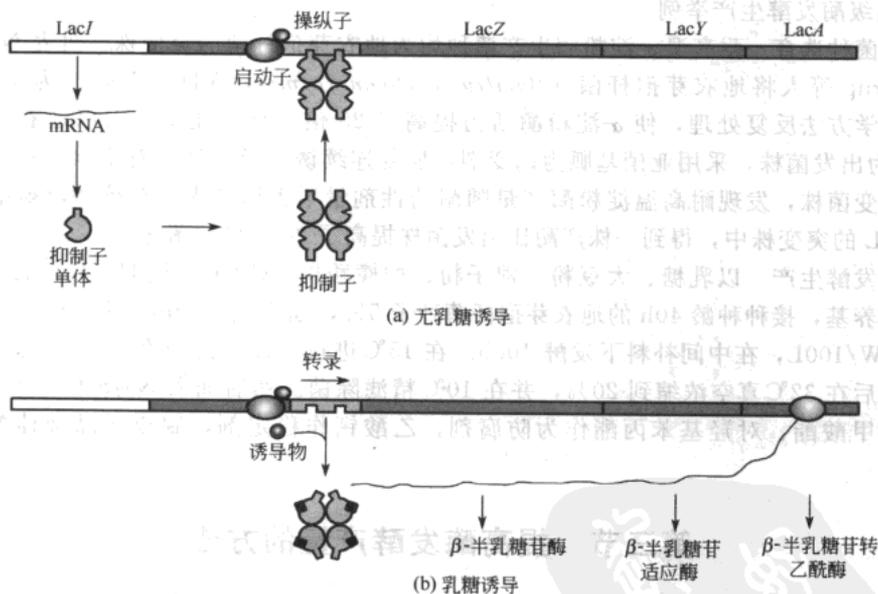


图 5-4 大肠杆菌的乳糖操纵子 (Lac 操纵子) 的结构示意

操纵子是酶合成调控的结构基础。结构基因决定酶的结构和性质, 但不影响酶的合成速率和水平。对特定的酶而言, 其合成水平的调节要通过控制结构基因以外的其他基因部分 (如操纵基因等) 实现。调节方式有两种: 诱导和阻遏。

### 2. 诱导和阻遏

某些酶在通常情况下不能合成或者合成很少, 但加入“诱导物 (inducer)”后, 就能大

量合成, 这种现象称为诱导 (induction)。在酶的诱导中, 调节蛋白就是阻遏物, 诱导物就是效应物。在没有诱导物时, 调节蛋白直接和操纵基因结合, 阻遏酶的合成; 当诱导物出现时, 它们能和诱导物结合, 发生变构效应, 失去和操纵基因结合的能力, 使“开关”打开。因此, 加入诱导物时能诱导酶大量合成。参与分解代谢的酶如淀粉酶、纤维素酶等受这种方式调节。

另一种调节方式称为阻遏。阻遏有两种类型: 末端代谢产物 (反馈) 阻遏和分解代谢产物阻遏。末端代谢产物阻遏 (end product repression) 是指在生物的生长发育过程中, 原以一定速率合成某些酶, 当这些酶催化生成的产物过量积累时, 这些酶的合成就会受到阻遏, 这就叫末端代谢产物阻遏, 也称为反馈阻遏 (feedback repression)。末端代谢产物阻遏的机制可能是阻遏蛋白本身没有和操纵基因结合的能力, 因而在通常情况下不会构成阻遏; 但是, 这种阻遏蛋白能以酶反应的末端代谢产物为效应物, 即辅阻遏物, 与之结合, 产生别构效应, 形成能和操纵基因结合的阻遏蛋白-尾产物配合物, 阻遏酶的合成。参与合成代谢的酶受这类调节方式控制。某些参与分解代谢的酶也可能受尾产物的阻遏调控。末端代谢产物阻遏在微生物代谢调节中有重要作用, 它保证了细胞内各种物质维持适当的浓度, 当微生物已合成足量的产物, 或外界加入该物质时, 就停止有关酶的合成, 而缺乏该物质时, 又开始合成有关的酶。

分解代谢产物阻遏 (catabolite repression) 是指有些酶, 特别是参与分解代谢的酶, 当细胞在容易被利用的碳源 (如葡萄糖) 上生长时, 其合成受到的阻遏, 这种现象也称为葡萄糖效应 (glucose effect)。分解代谢产物阻遏的机制较复杂, 原因之一可能和启动基因与 DDRP 的结合有关。因为转录速率取决于启动基因的强弱以及它和 DDRP 的结合速率, 而它和 DDRP 的结合又与某些因子, 如 cAMP 有关。cAMP 是“分解代谢产物 (基因) 活化蛋白” [catabolite (gene) activation protein, CAP] 或者说“cAMP 受体蛋白” (Camp receptor protein, CRP) 活化的必要因子。某些实验表明, 在进行转录时, 只有当 CAP 被 cAMP 活化并一起进入到启动基因的某结合位点以后, DDRP 才能附着到启动基因上, 催化转录的进行。葡萄糖等碳源的某种中间代谢产物 (X), 能阻止 ATP 环化形成 cAMP, 同时还能促进 cAMP 分解成 AMP, 导致 cAMP 浓度下降, 无法形成有效的 cAMP-CAP 配合物, 继而阻遏转录的进行。反之, 如果加入 cAMP, 阻遏就能得到减轻或解除。但这种解释可能不是分解代谢产物阻遏的全部机制, 因为也有一些例证说明分解代谢产物阻遏与 cAMP 无关。

真核生物的蛋白质合成调节机构和原核生物的基本相同, 但更加复杂。图 5-5 为真核生物的蛋白质合成调节机构示意。不同之处有如下几点。

① DNA 和组蛋白等结合在一起, 以染色质形式存在, 组蛋白等对复制和转录过程起调控作用。

② 每个结构基因都有自己的启动基因等调控系统, 独立进行转录, 不形成多顺反子, 其结构基因中包含不编码氨基酸的插入序列 (intervening sequence), 称为内含子 (intron), 相对应的编码序列称为外显子 (extron)。

③ 似乎没有和操纵基因相对应的“开关”, 一种称为促进子 (enhancer) 的 DNA 序列调控着 DDRP 和启动基因的结合, 一旦两者结合就能开始转录。

④ 形成的 mRNA 要在 5'-端接上 pppG (即“戴帽”), 在 3'-端加 poly A 序列 (即加尾), 中间还有修剪 (trimming 和 clipping) 以及剪接 (splicing, 移除内含子) 等转录后加工过程。

⑤ 翻译后形成的蛋白质还需活化、添加辅基、糖苷化以及形成多亚基结构等翻译后加

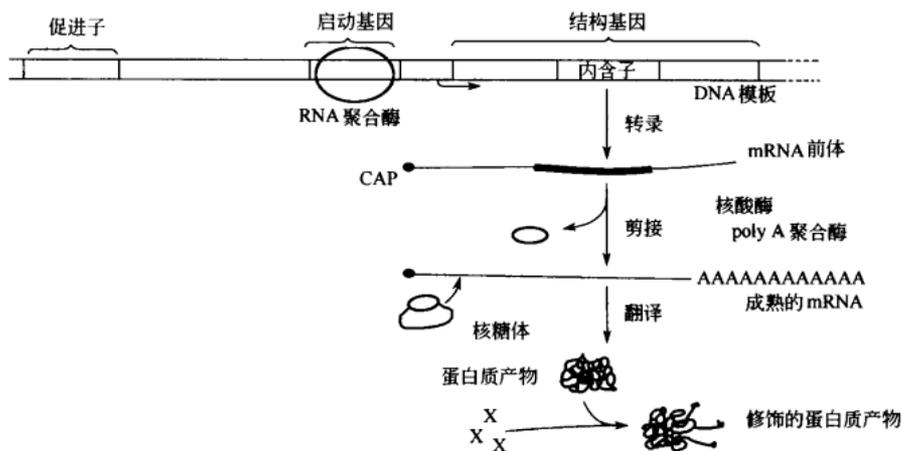


图 5-5 真核生物的蛋白质合成调节机构示意

工程序才具有相应的生物活性。

### 3. 打破酶合成调节机制限制的方法

酶的合成调节机制保证了生物机体能将体内的原料与能量最经济有效地用于合成生命最需要的物质。但是，从应用的目的出发，则应设法打破这种调节控制，以期使某些酶的产量大幅度提高。事实上，已有的报道表明，在采取相应的措施后，参与分解代谢的酶类，其产量可有上千倍的变化，而参与合成代谢的酶类，其产量也能有百倍之悬殊。打破这种调节可从内、外两方面入手：①条件控制，如添加诱导物、降低阻遏物浓度；②遗传控制，如基因突变、基因重组。

## 二、通过条件控制提高酶产量

### 1. 添加诱导物

这种办法仅适用于诱导酶类，且效果十分显著。关键在于选择适宜的诱导物和诱导物浓度。以前认为把底物作为诱导物的首选对象，但事实上底物不一定都有诱导作用，而不能作为底物者有时却能诱导酶大量生成。现在认为，强有力的诱导物首先是那些难以代谢的底物类似物。例如，异丙基- $\beta$ -D-巯基半乳糖 (IPTG) 不易被  $\beta$ -半乳糖苷酶作用，却是极好的诱导物，可使该酶的产量提高近千倍，甚至达到细胞合成蛋白质总质量的百分之几。其次，诱导物也可以是底物或诱导物的前体或衍生物。例如，将纤维素或蔗糖作成棕榈酸酶或乙酸酯，它们就能分别诱导纤维素酶和蔗糖酶，使这些酶的产量增加几十倍甚至上百倍。此外，对于许多分泌到细胞外发挥作用的分解代谢酶来说，它们催化生成的产物也往往具有强的诱导能力。例如，以纤维素作唯一碳源可诱导纤维素酶，但是真正起诱导作用的似乎还是它的分解产物：纤维二糖；以木聚糖作底物诱导木聚糖酶时，最初起到诱导作用的似乎也是木二糖。

值得指出的是，诱导和阻遏之间没有绝对的界限，许多诱导物在某些情况下也可能导致阻遏，问题的关键在于诱导物的浓度。这种浓度效应也同样反映在底物及其类似物上，当培养基中的底物浓度很高而且易被分解时，往往会引起酶的分解代谢产物阻遏；反之，如果将底物以十分缓慢的速率逐渐加入，常可有效地诱导酶的生成。

诱导物浓度对酶诱导形成的速率也有一定影响，在一定的浓度范围内，酶的诱导生成速率与诱导物的浓度成正比。但是，浓度继续增大到一定值时，酶的诱导生成速率的上升趋势

就会逐渐减缓，最后达到一饱和值。

在加入诱导物后，目标酶并不是立刻产生的，通常要经过一个短暂的潜伏期——几分钟，甚至十几个小时，诱导才会出现。当诱导物除去后诱导则会立即停止，这种现象称为“去诱导”。诱导和其他培养条件一般没有直接关系，但是，在诱导培养时，通过控制培养的pH值有时也可选择性地诱导某种酶的生成。

## 2. 通过降低阻遏物浓度提高酶的产量

阻遏可由分解代谢产物引起，也可由酶反应的终端产物引起，因此控制这两种产物的生成与积累常能提高酶的产量。基本原则是，应避免使用过于丰富的培养基和避免使用易被利用的碳源，并设法阻止效应物的形成，降低培养基中效应物的浓度。

当微生物在一种易被利用的碳源培养基中快速生长时，会导致胞内环腺苷酸（cAMP）浓度降低，使结构基因的转录停止，因此对分解代谢产物阻遏的酶来说，适宜碳源或相应生长因子的选择尤为重要。例如，Yamane 等用甘露糖作为碳源生产纤维素酶，比使用半乳糖时酶活提高了1500倍。如果从经济方面考虑必须采用会导致分解阻遏的碳源，可以采用流加或连续发酵的方法，使发酵罐中的碳源浓度始终保持在较低水平，以减少阻遏作用。例如，用液化气单胞菌生产多聚半乳糖醛酸反式消去酶，该酶被半乳糖醛酸以及易被利用的其他碳源所阻遏。若以缓慢的速率添加多聚半乳糖醛酸，并限制其他碳源的供应，那么该酶的产量可提高近1000倍。

某些酶能够在细胞生长过程中合成，但随着代谢途径中终端产物的积累或在培养介质中加入该物质，酶的合成将受到阻遏。对于此类酶，有两种办法可以解决终端产物阻遏。一是在培养基内添加尾产物类似物或添加阻止尾产物形成的抑制剂。例如，在微生物培养基中加入 $\alpha$ -噻唑丙氨酸，可使细胞中参与组氨酸合成的10种酶的产量提高约30倍。另外一种更为有效地避免终端产物在胞内积累的方法是采用营养缺陷型突变菌株（auxotrophic mutant），这样，只要限制其生长必需因子的供应，就能够降低胞内终端产物的浓度。例如，限制组氨酸营养缺陷型变异株的组氨酸供应，可使其和组氨酸合成有关的10种酶解除阻遏，产量提高25倍左右。又如，采用大肠杆菌硫酸胺缺陷型变异株并限制硫酸胺供应，同样可解除与硫酸胺合成有关的4种酶的阻遏，其中磷酸硫酸胺素焦磷酸酶的产量可升高约1000倍。类似地，让营养缺陷型变异株在基本培养基上缓慢生长，也能显著提高酶的产量。例如，Moyed 曾经用一株部分嘧啶缺陷型菌种生产天冬氨酸转氨甲酰酶，产量比原菌株提高了500倍。此外，还可给营养缺陷型变异株供应较难同化的生长因子前体或衍生物。例如，在大肠杆菌尿嘧啶缺陷型变异株的培养基中不加尿嘧啶而供应二氢乳清酸，结果使与嘧啶生物合成有关的6种酶避免了终端产物阻遏。

通过条件控制提高酶产量是一种比较直接、有效的途径，但是往往不易找到适宜的诱导物和降低（辅）阻遏物浓度的有效方法与条件，即使可以实现成本也较高，因此人们更倾向于从遗传控制着手，以期从根本上改造菌种（株）。

## 三、通过基因突变提高酶产量

突变是指生物的遗传性状发生变异，以致影响了生物的正常遗传。这种变异是突然发生并可遗传的。基因突变（gene mutation）发生在结构基因上，往往导致酶的结构和性质改变；基因突变发生在操纵子其他部位上，则通常能引起酶产量升高或降低。根据酶的合成调节机制，基因突变后有两种情况可使酶的产量提高：一是从诱导型（inductive 或 adaptive）转变为组成型（constitutive），即获得的突变株在没有诱导物存在的条件下，酶产量也能达到诱导的水平，这种突变称为“组成型突变”；二是阻遏型（repressive）变为去阻遏型，这

种情况下, 突变株在通常引起阻遏的条件下, 酶产量也能达到没有阻遏的水平。

基因突变可自发地发生, 但自发突变发生的频率是很低的, 而且变异程度不大, 等待菌株自发突变而获得新菌种的过程十分缓慢, 是一种守株待兔的被动育种方式, 因此人们在实际工作中还需采取某些方法进行诱变。

### 1. 物理方法

物理诱变主要是采用辐射, 包括紫外线、X射线、激光、 $\gamma$ 射线( $^{60}\text{Co}$ )及快中子辐射等。它们的作用是直接引起核酸分子中4种脱氧核苷酸, 特别是C、T发生氧化变化, 造成DNA损伤和畸变。

### 2. 化学方法

化学诱变剂种类繁多, 但具有高效诱变作用的并不多。常用的化学诱变剂根据其作用方式不同分为以下3种类型。

① 碱基类似物, 如5-溴尿嘧啶等, 这类诱变剂能通过代谢错误地掺入到DNA中引起突变, 因而对代谢处于停顿状态的细胞来说没有作用。

② 与核酸碱基起化学反应的诱变剂如亚硝基胍等, 这类诱变剂能直接和DNA中的A、C、G等反应而导致突变。

③ 引起移码突变的诱变剂如吡啶黄染料等, 它们能引起DNA链中核苷酸的插入或缺失而造成移码突变。在DNA链上增添或缺失1、2、4或5个碱基时, 均会引起移码突变; 而增添或缺失3或6个碱基时, 则不影响读码, 只引起较短的缺失或插入。

在生产中用得较多的是紫外线照射、亚硝基胍处理等。实践表明, 经常更换使用不同的诱变手段, 控制适度的突变率, 其效果比连续使用同一手段或过高、过低的突变率要好。

### 3. 生物学方法

物理诱变、化学诱变, 特别是用亚硝基胍处理等虽然可取得很好的效果, 但却潜在着致癌的危险, 而且多次使用后, 某些微生物对它们还会产生明显的抗性, 因此近年来人们的注意力开始转向生物学方法, 即采用转座子为诱变因子。转座子是一种DNA片段, 编码与转座有关的蛋白质, 能在基因组的许多位点上插入, 导致高极性突变。现常使用的有Tn-5, 它具有卡那霉素的抗性基因, 能专一性较低地迅速插入染色体。

基因突变是使微生物获得新性状、培育高产菌株的一种有力手段。它的发展方向是如何提高突变的专一性, 例如, 通过亚硝基胍(NTG)等进行选择性诱变或通过蛋白质工程进行定位突变。

在采用基因突变育种时, 一个十分重要的问题是必须同时建立一种快速有效的筛检方法, 以便能将具有前途的突变株及时不漏地筛选出来。

(1) 组成型变异株的筛检 第一种办法是以低诱导力的诱导物为主要碳源或氮源配制微生物培养基, 直接将诱变后的产酶菌接种于该培养基上进行培养, 适当限制这种诱导物的供应量, 或另外添加诱导抑制剂, 在这种条件下, 凡是能够增殖的菌株一般都是组成型突变株。例如, 将诱变后的大肠杆菌在恒定的低乳糖培养基中培养, 结果筛选出不需要诱导物的产 $\beta$ -半乳糖苷酶的组成型突变株, 该酶的产量可达到细胞内合成蛋白质总量的25%。

第二种办法是将诱变后的产酶菌株在含有诱导物和不含诱导物的培养基上交替培养, 以使组成型变异株获得绝对优势。例如, 将诱变后的大肠杆菌在第一个周期用葡萄糖培养基培养, 虽然是诱导型亲株占优势, 但组成型也同时得到了扩增; 然后, 再转到乳糖培养基上进行培养, 此时组成型突变株不像诱导型那样需要诱导时间而能直接利用乳糖, 生长更为有利, 重复这种交替培养, 可使组成型变异株最终获得绝对优势。

(2) 抗分解代谢产物阻遏型变异株的筛检 对酶制剂工业而言, 在很多情况下往往不易

得到一种既不引起分解代谢产物阻遏又经济的碳源，因此，如果能够得到一种抗分解代谢产物阻遏的变异株就很有意义。其筛检办法主要有如下几种。

① 以目标酶的底物为唯一氮源。例如，将诱变后的产气杆菌接种于含有葡萄糖和以组氨酸为唯一氮源的培养基上培养，最后可得到产组氨酸酶的抗葡萄糖效应变异株。

② 将诱变后的产酶菌株在含有葡萄糖和不含葡萄糖的培养基上交替培养。例如，先将诱变后的大肠杆菌在葡萄糖培养基上培养，以抑制利用其他碳源的菌株，然后再将长出来的菌株转移至别的碳源培养基上培养。这样，虽然抗分解代谢阻遏的菌株最初可能生长迟缓，但经过反复交替培养、增殖后，可最终得到抗性变异株。

(3) 抗尾产物阻遏型变异株的筛检 通常采用的办法是在诱变后的产酶菌株培养基中加入在结构上和尾产物相类似的毒性抗代谢物。例如，用三氟亮氨酸筛选出来的变异株，亮氨酸合成酶的产量比亲本提高了 10 倍。

与通过条件控制进行调节的办法相比，基因突变由于能较经济地从根本上改造菌种的特性并引入新的生物学性状，因此在 20 世纪 60~70 年代成为提高酶等发酵产品产量的常用手段。但它也有缺点，即预见性小、工作量大。与基因突变不同，基因重组 (gene recombination) 依据的原理是：如果酶的基因拷贝数越多，控制其表达的启动子愈强，表达愈有效，那么这种酶的量也应该越高。因此如果设法增加目的酶的基因拷贝数，并将其置于强的表达控制系统之下，那么就可以定向地培育成高产菌株。基因重组包括体内基因重组和体外基因重组。

#### 四、通过体内基因重组提高酶产量

体内基因重组 (generecombination in vivo) 包括少数或者个别基因的重组，主要通过接合、转导、转化等方法进行；也包括整个染色体的重组，主要途径是原生质融合。图 5-6 为各种体内基因重组的示意。

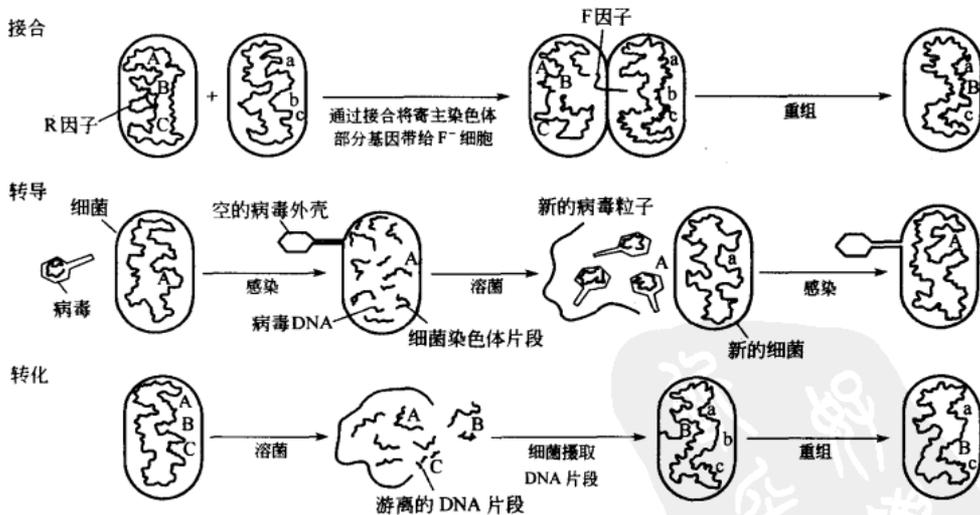


图 5-6 各种体内基因重组示意

##### 1. 接合

质粒 (plasmid) 是一种除染色体外的 DNA 片段，许多肠道细菌体内都含有质粒。质粒带有某些遗传信息，能整合到染色体 DNA 中，也能脱离染色体独立存在，独立进行复制，

还可通过细胞间的接触由一个细胞转移到另一细胞,在这种情况下供体细胞仍保留原来的质粒,而受体细胞则增加一个质粒。有趣的是,有些质粒在脱离染色体时,还能将染色体的部分基因带走,转移到另一细胞,改变受体细胞的基因组成。

## 2. 噬菌体转导

噬菌体有烈性噬菌体 (virulent) 和温和性噬菌体 (temperate) 之分。前者如 T 偶数噬菌体,它们感染细菌后能导致细菌解体破裂。温和性噬菌体如  $\lambda$ 、 $\phi 80$  等,它们感染细菌后,不引起细胞破裂,而是进行溶源化 (lysogenization): 噬菌体的基因直接掺入到细菌的染色体中,和寄主的染色体基因连接,并伴随染色体基因进行协同复制,但不形成成熟的噬菌体,而是以一种原噬菌体 (prophage) 形式潜伏下来。带有原噬菌体的细菌称为溶源化细菌。原噬菌体在一定条件如紫外线照射下,也可被诱发烈性化,脱离染色体不再进行协同复制,而形成成熟的噬菌体,导致细菌破裂,然后再感染新的细菌,或溶源化,或导致细胞破裂。和接合相似,原噬菌体脱离染色体时,也可能带走部分染色体基因,在再度感染细菌时,就会使相应的基因从一个菌株转导到另一个菌株。噬菌体的转导又分限制性转导和普遍性转导。前者即是噬菌体插入染色体中的位置是一定的,例如,  $\lambda$  噬菌体插入大肠杆菌 K12 染色体中时,它的位置就在乳糖代谢有关酶的基因旁边,能转导这些酶的基因。普遍性转导就是噬菌体能转导许多不同位点的基因。限制性转导多造成杂因子,而普遍性转导则可导致重组体出现。转导反复进行,可使相应的基因拷贝数目增加,从而提高酶的产量。

现在已经可以得到能携带大肠杆菌染色体上任何基因的转导噬菌体。

## 3. 转化

某些细菌,如枯草杆菌,能从培养基中吸收外源 DNA 片段,如果这些 DNA 片段和细菌 DNA 有高度同源性,两者间就可能发生重组,从而改变受体的遗传性状,这种现象称为转化 (transformation)。DNA 间的同源性愈高,形成的转化子一般也愈稳定。

根据已有报道,在体内基因重组方法中,转化可能是提高酶产量最为有效的一种方法。这种方法在  $\alpha$ -淀粉酶产酶菌株的选育中获得了显著的成功。以枯草杆菌为例,野生型菌株 Marberg 的淀粉酶基因在处于调节基因 *amyR1* 的控制下时,酶产量为 10U/mL;通过转化分别导入高产突变株的调节基因 *amyR3* 与分泌有关的基因 *pap* 后,得到的菌株淀粉酶产量分别为野生型的 5 倍与 3 倍;而引入 *pap* 基因的菌株,其蛋白酶的产量也为野生型的 3 倍。如果通过转化将这两个基因导入同一菌株,那么产生的效果将不是简单的相加,而接近相乘——提高产量约 14 倍。通过转化将各种突变基因组合起来,最后得到的转化菌株的淀粉酶产量甚至可达到原始菌株的 1500 倍,即 15000U/mL。

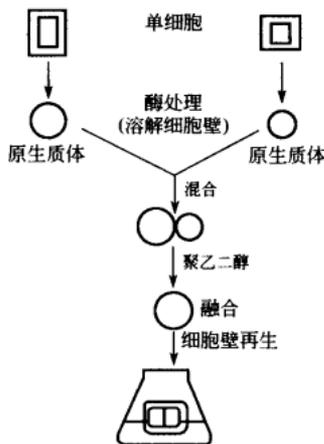


图 5-7 原生质融合技术示意

接合、转导和转化实际上都是一种基因转移过程,如果将基因突变和基因转移结合起来,那么不仅可以获得大量新的菌株,而且也可能使目的酶的产量大幅度提高。

## 4. 原生质融合

从技术本身而言,基因突变和基因转移都能构建出高产菌株,但并非对所有生物都行之有效,因此又发展了原生质融合 (protoplast fusion)。这是一种将异种细胞染色体相互融合形成新的杂种细胞的技术,其原理如图 5-7 所示。和动物细胞不同,微生物细胞与植物细胞具有细胞壁,因此必须先用相应的酶处理,使之形成裸露的原生质体,然后再在聚乙二醇和  $\text{Ca}^{2+}$  等存在的条件下进行融合。融合后,如果两个染色体有高度同源性,那么将发生基因重组,有时甚至可将

多种来源的染色体或基因进行重组。由于是两个或多个完整的基因组汇在一起，因而重组的频率很高，提高的潜力很大。原生质还可以和脂质体进行融合，从而有效地导入大分子 DNA。

## 五、通过体外基因重组提高酶产量

体外基因重组 (gene recombination in vitro)，简称 DNA 重组技术 (recombinant DNA technique) 或基因工程 (gene engineering)。它是外源基因与载体 DNA 通过酶学方法在体外进行重组，然后将形成的重组子转化到受体细胞，使所需要的外源基因在受体细胞中得到复制表达，从而达到改造生物遗传特性目的的一种技术与方法。与基因突变相比，它具有更大的预见性和主动性。而且也不像体内基因重组那样易受种间不相容性的限制，可在远源的 DNA 分子间进行杂交，并能选择适宜的载体、受体系统，合理进行重组设计，高效表达目的基因，因此人们特别重视这种技术。应用这种技术时应考虑以下问题。

### 1. 目的基因

目的基因获得方法主要有：基因片段物理分离法、DNA 片段单链化酶切除法、目的基因片段亲和保护酶切法、DNA 片段转化分离法、mRNA 亲和分离法、mRNA 反向转录法和 DNA 片段化学合成法等。其中前 3 种方法仅限于特殊情况应用，第 4 种也称为鸟枪 (shotgun) 法，它和第 5 种方法具有较大的普遍适用性。不过，为使真核基因能在原核细胞中得到表达，一般认为最好采用 mRNA 反向转录法，此法如果与特殊的载体质粒结合，将 cDNA 直接掺入到载体，则更为有效。但是，近年来随着人工合成 DNA 技术的进步，人们更倾向于选择 DNA 片段化学合成法，因为反向转录法有一些缺点：①要获得十分纯净的 mRNA 很难；②合成 cDNA 往往缺少 5' 末端；③反转录过程常可能出现随机终止；④有时还需要外加某些接头序列 (linker)。人工合成法则可以根据受体细胞转录、翻译系统的特点，选择最佳的密码子，合成人们所需要的任何序列，包括重组需要的接头序列在内的全序列。

### 2. 载体

载体可将异源基因引入受体细胞，并使之能在其中进行复制、表达。载体应符合下述要求：对一种限制性内切核酸酶只有少数 (1~2 个) 切点；带有特殊标记，能指示重组子的转入；在重组后，即连接了异源 DNA 后不失去扩增能力；拷贝数目多 (即“松弛型”)；容易分离；安全；最好是高效表达载体。常用载体有质粒和噬菌体。

### 3. 工具酶

在基因工程中最常用的工具酶是限制性核酸内切酶、脱氧核苷酸末端转移酶、反转录酶、核酸酶 S<sub>1</sub> 和 DNA 连接酶等。

限制性核酸内切酶是一类能识别特定核苷酸序列，并能专一地切断双链 DNA 的核酸内切酶。根据其专一性 (专一识别序列和酶切点) 及对辅助因子的要求的特点分为 3 类：I 型、II 型、III 型。用于基因工程的是 II 型限制性核酸内切酶，它们能识别 4~6 个核苷酸组成的回文结构序列，或通过“错切”方式产生黏性末端 (sticky 或 cohesive end) 的 DNA 片段，或通过“平切”的方式形成平头末端的 DNA 片段。

脱氧核苷酸末端转移酶催化脱氧核苷酸连接到 DNA 的 3'-OH 末端，在基因工程中用以形成人工黏性末端。当以 Co<sup>2+</sup> 作为辅助因子时，该酶不仅能催化脱氧核苷酸转移到 3'-OH 的末端，对平头的 DNA 和 5'-端突出的 DNA 也能发挥作用。

DNA 连接酶催化 DNA 的 3'-OH 与 5'-磷酸端形成磷酸二酯键，是 DNA 重组工作中不可缺少的关键酶。通常应用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶，因为它既能催化黏性末端连接，又能催化平头末端连接，同时只要求 ATP 作为辅助因子。

#### 4. 基因重组

这是关键的一环，包括直接黏结法和加尾黏结法。前者简便，但易产生自身连接，无效重组率较高，特别是外源 DNA 片段大于 18kb 时更是如此。后者无效组合率低，但要用到多种工具酶。为了提高直接黏结法的有效重组率，可以采用在识别和作用的核苷酸序列专一性上有部分共同要求的两种限制性核酸内切酶。

#### 5. 重组子转化

进行重组子转化时，首先要选择适宜的受体细胞，这种细胞具有以下特点：能接受外源 DNA、在标记上与载体相对应、有利于表达、安全。

最常用的受体细胞是大肠杆菌，它的优点是遗传背景清楚，有成套的载体、受体系统，可供各种基因进行稳定高效的克隆、表达；缺点是该菌属于革兰阴性菌，表达产物除少数能分泌到培养介质和细胞周质外，通常都积累于胞质内，有时还可能形成无活力的不溶性包含体 (include body)，给产物的分离纯化带来困难。

其次是枯草杆菌，它们已广泛用于许多工业酶的生产，优点是它们属非病原性的土壤微生物，没有热原物质等问题，表达产物可直接分泌到培养介质，但是其遗传背景不如大肠杆菌清楚，而且往往包含大量蛋白水解酶，常导致表达产物降解。

第三是酵母，它的优点是无热原物质等的污染，也可构建成分泌型受体菌株，而且能进行翻译后加工，如糖苷化等，适于真核基因的表达，但是表达水平一般较低。

除此之外，近年来人们的注意力也开始转向动物、植物细胞，因为它们能有效地进行翻译后加工，以天然构象的形式将表达产物分泌出来，同时不会产生微生物表达后可能带来的各种问题。但培养不易，产量较低，成本高。

其次要选取易被感受的生理状态，并加适宜的处理以提高转化效率。对大肠杆菌、假单胞杆菌来说，常用  $\text{CaCl}_2$  处理法，这种情况下  $1\mu\text{g}$  的 DNA 一般可获得  $10^7$  个左右的转化子；对于枯草杆菌来说，由于其转化率普遍较低，并且转化率随单体占有的百分比而不同，同时开环的和线性的 DNA 都不具有转化能力，因此仅选取感受态往往不够，一般先用溶菌酶处理使之变为原生质，然后再在聚乙二醇存在的条件下进行转化。

#### 6. 基因表达及相关问题

重组子进入受体细胞后，先通过 DDDP、DDRP 进行复制、转录，形成 mRNA，然后 mRNA 再在核糖体上进行翻译，合成蛋白质，完成基因克隆、表达过程。但是，要使引入的基因得到高效表达，在构建重组子时必须考虑以下问题。

① 为使外源基因得到高效表达，应在适当的位置上放置一个强的启动基因（启动子），即一个能为受体细胞 DDRP 转录识别的起始信号序列。其次，还应在 mRNA 的起始密码子上游端 3~12 个碱基处放置一个能被受体细胞核糖体识别的 SD 序列，该序列由 3~9 个碱基组成，能与 30S 亚基形成配合物，引发蛋白质合成。各种受体细胞要求的启动子与 SD 序列可能不同。图 5-8 显示如何调整启动子、SD 与外源基因起始密码子的距离，从而达到能在大肠杆菌中高效表达的一般方法。其中，关键的一步是借助一种外切核酸酶进行修剪，以便在两者间形成一个不同核苷酸长度的混合体系。

② 选择适宜的表达方式。外源基因可采用两种方式表达。一种是以天然蛋白 (native protein) 形式直接表达，即将目的基因直接连接于适宜的启动子与 SD 序列后进行表达，表达产物无须加工就是天然蛋白。但是在构建重组子时，起始密码子 AUG 前端必须有一适宜的序列能被限制性核酸内切酶作用，并需保证 AUG 和启动子与 SD 序列间有适宜的距离。

另一种是以融合蛋白 (fusion protein) 的形式表达，即将目的基因连接于受体细胞（或载体）的某基因下游，或该基因 N 端部分序列的下游，然后借助该基因的表达带动目的基

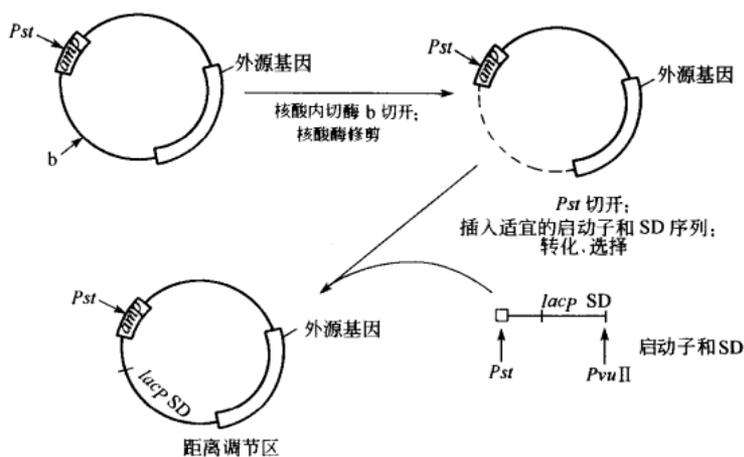


图 5-8 调整启动子、SD 与外源基因起始密码子间的距离

因的表达，因而得到的表达产物是一融合蛋白，即在目的蛋白的 N 端前面还附有别的蛋白质或肽段。这种表达方式的优点是：目的基因处于受体或载体基因的调节系统控制之下，表达效率较高，产物较稳定，表达产物能做成分泌型；同时外加的肽段还可作为标签（tag）用于进行产物的亲和纯化。采用融合基因表达方式的一个重要问题就是如何将目的蛋白从表达产物中分离出来。一般来说，如果目的蛋白内部不含有 Met，那么，可以采用 CNBr 化学断裂法；否则就必须在目的基因前插入一段适当的接头（linker），以便在表达后借助位点专一的或序列专一的肽酶从接头处切出目的蛋白。

③ 保持载体的稳定性。载体，特别是重组质粒，常易出现载体（基因）丢失现象。有两种情况：一是质粒在细胞分裂过程中产生了不等分配，称为“分离不稳定性”，这种情况可采用抗生素选择压法解决，也就是在培养基中添加载体“标记”抗生素，使质粒丢失的菌体无法生存；二是基因结构发生了改变，即“结构不稳定性”，这种情况较复杂，据报道可通过控制培养条件调整菌体的生长速率加以解决。

④ 表达产物的分泌。基因表达产物合成后，或停留于细胞质中，或结合于质膜，组成胞内酶，或穿过质膜，外输到细胞质或培养介质中成为胞外酶，这就是所谓的“分泌”（secretion）。革兰阳性菌和阴性菌不同，后者细胞外有一层细胞壁屏障，分泌蛋白一般止于周质，不能进入培养介质，成为“周质酶”或“周质蛋白”；而前者则由于没有细胞壁的阻碍，表达产物可直接进入培养介质，称为“外泌”（excretion）。从生产角度考虑，外泌显然最为有利，这也是人们倾向于采用芽孢杆菌等作为生产菌的原因之一。要使表达产物能够分泌，通常应该在产物的 N 末端添加一段由 10 个左右亲水氨基酸和相继 20~30 个疏水氨基酸组成的信号肽。

为了获得外泌蛋白，有 3 种办法可供考虑：一是突变，即通过突变筛选出影响细胞壁结构的抗生素，如环丝氨酸、新生霉素、氨基糖苷和多烯等具有抗性的突变株，这些菌株一般是超产、高分泌型的，但是应注意其中许多外膜渗漏型（leaky）的突变株，其物理性能往往太弱；二是与外膜蛋白如 OmpF 做成融合蛋白；三是引入能诱发大肠杆菌细胞壁通透性增大的 *kil* 基因。

值得一提的是，分泌实际上是蛋白质合成后的一种定域运转方式；DNA 重组技术既可赋予表达产物以分泌性质，同时也是研究运转机制的有用手段。

⑤ 保证异体蛋白在受体细胞内的稳定性。现在已知在大肠杆菌内至少有 8 种以上的蛋

白酶可以分解酪蛋白、胰岛素等异体蛋白，外源基因表达产物作为异体蛋白也同样面临这一问题。解决的办法有3种：一是选择蛋白酶基因缺失的变异株作为受体细胞；二是同时克隆蛋白酶的抑制剂基因；三是促进基因表达产物的加速分泌。

#### 7. 基因工程在酶生产中的应用

基因工程在酶生产中可以发挥以下几个方面的作用：①提高微生物中原有酶的产量；②用微生物表达、生产动物或植物的酶基因；③构建“多酶复合物”或“多酶复合体系”；④通过移除、添加或置换基因中的某些碱基，克隆表达进行酶分子改造。

### 六、其他提高酶产量的方法

其他提高酶产量的方法有添加表面活性剂。通常用于提高酶产量的表面活性剂多是非离子的，如 Tween 80、Triton X-100 等。它们对微生物没有毒性，或者毒性极小，产酶促进效果也因菌和酶而有所不同。应用表面活性剂时，浓度十分重要，一般都有一个最高极限。而且，酶产量增加的幅度没有一定的规律，通常产量较低的酶，在添加表面活性剂以后，产量可以明显增加。表面活性剂提高酶产量的机制，特别是对胞外酶来说，可能是因为其能加大细胞膜的通透性。

实验室的微生物发酵产酶水平虽然在一定程度上可以反应其工业化生产的水平及潜力，但工业化产酶从规模、选用设备及生产模式等方面都与实验室生产大不相同。下面主要介绍了国内外酶制剂生产的设备现状与趋势，并针对国内条件，对酶制剂生产车间的要求做出了设计和建议。

## 第四节 酶制剂生产设备

### 一、微生物选育设备

国外菌种选育工作发展较快，除了新的选育方法，还广泛应用倒平板机、微机控制或专用机器人系统，并采用自动连续分析仪，一天可分离选育 2000 株菌种以上，工效比国内高 30~40 倍。

### 二、无菌空气制备设备

#### 1. 空气压缩机

国外一般采用大容量的离心式空压机（如 Bolvay 公司美国工厂）或用无油螺杆空压机。特别是瑞士阿特拉斯生产的无油螺杆空压机，可根据发酵用气量多少，自动调节进气量，节约能量。此设备在国外酶制剂工厂大量推广。国内一般均用小容量的少油或无油的往复式空压机，耗能大。

#### 2. 空气净化系统

(1) 电加热高温灭菌 在美国部分工厂采用 400℃电加热高温灭菌替代庞大的空气净化装置。

(2) 广泛采用绝对滤菌和噬菌体的 Bio-X 过滤器 此种过滤器在净化系统中只要稍加控制压缩空气的相对湿度，压缩空气经 Bio-X 过滤器后，即可达 100% 滤除 0.01μm 以上的各种杂质的目的，包括细菌 (0.3μm)、噬菌体 (0.04μm) 等微生物，获得无菌空气，供发酵使用。这种过滤目前主要由两种材料组成，以英国 Dommick Hunter 公司聚四氟乙烯和美国 Pall 公司的聚偏二氟乙烯为代表。由于材料不同，两种过滤器的滤芯在化学稳定性、耐温和疏水性能上有差异，英国 D. H. 公司的产品稍具优势。

在国内一般沿用经典净化系统，过滤器介质由棉花、玻璃纤维、纸质或金属烧结管组成，除菌效率最高为 99.999%。

### 三、发酵设备

#### 1. 液体发酵设备

(1) 大型化 Solvay 公司在美国酶制剂工厂的发酵罐 120m<sup>3</sup>，丹麦 Novo 公司 150m<sup>3</sup>，而中国一般为 20~30m<sup>3</sup>，最大容量为 80m<sup>3</sup>。

(2) 结构先进 国外酶制剂工厂发酵设备全为不锈钢制造，近年来又推行 316L 不锈钢制作发酵罐；传动结构合理，为节约电力，采用二级或无级变速；轴封结构好，不易漏气，有的公司还采用双端面蒸汽保护轴封装置，对降低染菌率大有帮助；搅拌设计合理，氧的利用率高；冷却器一般采用传热系数较高的蛇管冷却器。

国内的发酵罐部分还采用碳钢材质，传动装置一般均采用皮带传动，设备稳定性差，噪声大，轴封结构不合理，漏气严重，造成染菌的隐患，冷却器一般采用立式盘管。

(3) 排除气泡装置 丹麦 Novo 公司为了提高设备的利用率等，在排气管加装除泡装置，可以提高罐容 8%~10%，消泡剂用量可减少 30%~80%。

(4) 微机控制 微生物发酵要取得理想效果，就必须对发酵过程进行严格的控制，即在了解发酵进行情况的基础上，根据需要做出调整，使发酵过程利于产物的积累和产品质量的提高。发酵的信息主要通过取样分析获得。通过取样分析获得的有关发酵情况的信息也称为参数，主要分为物理、化学和生物 3 类参数。

物理参数主要有温度 (°C)、压力 (Pa)、搅拌速率 (r/min)、搅拌功率 (kW)、空气流量 [V/(V·min)]、黏度 (Pa·s)；化学参数主要包括 pH 值 (酸碱度)、基质浓度 (g% 或 mg%)、溶解氧浓度 (mmol/L, mg/L, 饱和度%)、氧化还原电位 (mV)、产物浓度 (μg/mL)、废气中氧的含量 (%)、废气中 CO<sub>2</sub> 的含量 (%)；生物参数有菌体浓度和菌丝形态等。

丹麦 Novo 公司发酵生产采用微机装置，控制 9 个参数，特别是排气中检测有机物含量，并以此自控发酵的有关参数，使发酵正常运行。

#### 2. 固体发酵设备

随着科学技术的进步，固体发酵存在的缺点将逐渐被克服。前苏联、日本等国家的固体发酵已可实现大规模的机械化生产。在中国，适宜于特定微生物培养的固体发酵设备也不断出现。发酵设备的型式、种类极为繁多，根据设备的特点分类，基本上可以分为如图 5-9 所示几类。

固定式和移动式都存在投资偏大、占地面积大、劳动强度较高、操作不便、监测困难等问题，在此仅详细介绍多层圆盘式发酵机。

多层圆盘式发酵机 (图 5-10) 为立式圆筒结构，直径 3.2m。支承物料的是 6 层自动卸料的多孔支承板，板分数页分别固定在各自的小轴上，可以铰链式开合，卸料时小轴转动 90°，使各页支承板处于垂直位置，让物体自行下落。发酵机中心有一根搅拌轴，搅拌桨叶装在各支承板上方，以定期翻料，消除培养“死角”。顶盖的人孔兼作进料之用，物料可通过各支承板依次卸至最下层并出料。多层圆盘式发酵机械自动化程度高，生产量较大，节省发酵车间面积。但是该机械制造成本较高，操作复杂，在国外常用。

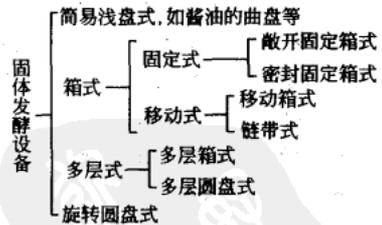


图 5-9 固体发酵设备分类

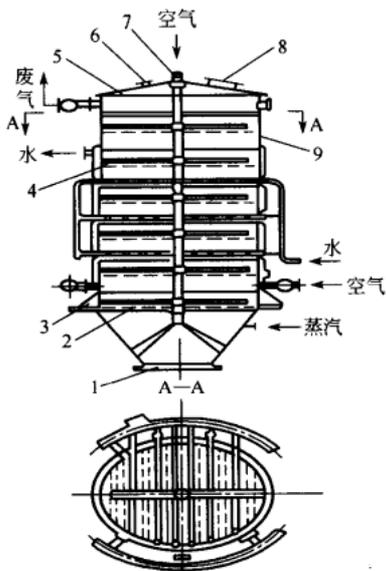


图 5-10 多层圆盘式发酵机

- 1—卸料口；2—支承板小轴；3—支架；  
4—翻料桨叶；5—顶盖；6—排气口；  
7—搅拌轴；8—进料孔；9—外壳

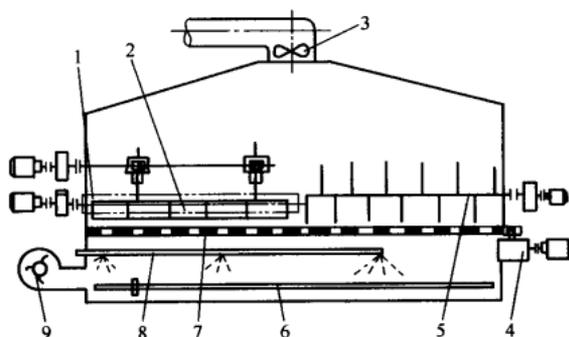


图 5-11 GTF-5 型固体通风发酵机的结构示意图

- 1—抛撒机构；2—摊刮机构；3—抽风机；4—筛盘  
转动机构；5—翻料机构；6—升温装置；7—筛盘；  
8—喷雾装置；9—鼓风机

旋转圆盘式发酵机是目前国内较为先进的新型固体发酵设备。图 5-11 为广东省农业机械研究所于 1988 年研制成功的 GTF-5 型固体通风发酵机的结构示意图，该机全封闭结构，不仅杜绝了杂菌污染，能更有效地保持温度、湿度，并能方便地进行自动化测温、控温、控湿，给微生物生长繁殖提供有利条件。料床为圆盘动力旋转式，既可消除发酵死角，又得以与入料、翻料、摊平、出料等机构灵活配合，实现各步骤的机械化，大大方便了生产，从而可与前后工序的设备配套，形成自动化程度较高的生产线。

#### 四、提取设备

由于酶制剂的品种、用途、要求、提取工艺不同，随工艺改变，提取设备也不尽相同且种类繁多，在此仅介绍几个主要酶制剂的提取设备。

##### 1. 固液分离设备

一般国外固液分离设备有 3 种。①预涂层真空转鼓过滤机，一般适用于像糖化酶一类发酵液的固液分离。②卧式螺旋沉降式离心机加碟片式离心机，这类分离设备主要应用于细菌类发酵的固液分离。以上两类的特点是连续性操作，洗渣效果好，滤液澄清无细渣，收率高。③全自动板框过滤机，可用于分离真菌和细菌发酵液。国内均采用手工板框过滤机，部分半自动板框过滤机，分批操作，洗渣效果一般很差，收率低，一般在 85% 左右。

##### 2. 浓缩设备

国外在大规模生产时应用的浓缩设备主要有两大类：①高真空度浓缩设备，蒸发温度低于 35℃，收率高；②超滤装置浓缩，大型工业生产主要采用平板膜、卷式膜为主。国内以小型中空纤维膜、管式膜为主。

##### 3. 除菌设备

为保证产品质量，国外均采用微孔膜装置进行除菌。如丹麦 Novo 公司通过微孔膜除菌

后，产品细菌数小于 100 个/mL 以下。

#### 4. 干燥设备

国外干燥设备采用全自控流化床干燥，批量少时采用真空干燥。这些设备收率高，基本无粉尘飞扬。国内一般采用箱式干燥或气流干燥与沸腾床组成的干燥设备，一般手工操作，粉尘飞扬多，收率低。

#### 5. 造粒干燥设备

国外将造粒干燥设备融为一体，不仅在碱性蛋白酶造粒上使用，根据用户要求，已推广到多种酶制剂产品。此设备制成的酶粒有一定强度，成品颗粒中粉尘小于 0.00083%，因此，工人劳动保护得到了比较彻底的解决。国内造粒设备一般采用挤压式设备，产品无法涂膜保护，产品质量差，粉尘超标严重。

## 第五节 酶生产车间的设计与要求

微生物酶制剂的发酵生产在整个酶生产中占有重要的地位，这不仅是因为它具有吨位大、能耗高、排放量大的特点，更因为发酵指数的高低及发酵液的质量，将直接影响整个酶制剂产品的产量和质量。本节仅介绍设备平面布置、发酵罐、培养基灭菌、无菌空气制备及对发酵过程的自动化控制设计等几方面。

### 一、工艺设备平面布置设计

一般厂区内公用工程设施如空压站、冷冻站、锅炉房及变电站等均配套齐全，因此以下仅对车间工艺、设备的布置进行介绍。设计遵循的基本原则是：工艺流程通畅、管道配置合理并且操作方便。较典型的酶制剂发酵生产车间设计平面布置为：大型发酵罐一般是安装于一层地面，穿过二层、三层楼板，以三层为操作面；二层主要布置化验室，更衣室，配电室及发酵罐、三级种子罐的空气过滤器；一层主要布置配料室、原辅料贮存、变压器室、空调机房、补料消毒罐及其他功能房间。室外北侧布置液体贮罐、空气过滤器、旋风分离器等。整个车间布置人流考虑从厂房南侧进入，物流在厂房北侧进入，液体物料及冷却水、冷冻水、蒸汽、压缩空气也在厂房北侧走外管进入使用点。平面布置设计时应考虑以下问题。

① 发酵罐东西向轴距应考虑发酵罐基础与厂房柱基础，不得互相影响。发酵罐靠中间柱布置，人员背光操作。

② 接种管道尽量短，并易于消毒。

③ 化验室、霉菌室、菌种室靠近小罐侧，以减少震动对分析仪器的影响。

④ 菌种室、霉菌室内设有摇瓶室、恒温室、无菌室，相应配套人员及物料净化设施应参照生产质量管理规范（GMP）要求进行设计。

### 二、发酵罐设计

发酵罐是一个发酵车间的核心部分，其主要功能是为菌体生长提供一个受控制的环境，以获得所期望的产物。因为大多数工业发酵是需氧的，所以通气搅拌装置又是发酵罐最重要的组成部分。在设计和制造发酵罐时，可以从以下诸方面考虑改进。

#### 1. 发酵罐的传动形式

发酵罐应能在无菌条件下工作数天，且应在长时间运转过程中不受影响。如今发酵罐的传动已由原来的三角皮带轮传动改为立式齿轮传动，它结构紧凑、体积小、质量轻、传动效率高，使用可靠，不需要经常维护和检修。

## 2. 发酵罐的通气和搅拌

因为需氧微生物的发酵通常以通气方式向微生物供氧，所以发酵罐的通气搅拌装置对微生物发酵过程的影响极大。

① 空气分布器是发酵罐中的通气装置，它的主要功能是使导入的空气能够比较均匀地进入发酵液。设计中常用的有单孔管和多孔环管。单孔管的出口位于底层搅拌器的正下方，这种装置简单实用，在实际应用中效果很好。现在很少采用多孔分布器，这是由于在发酵过程中通气量比较大，气泡直径仅与通气量有关，而与分布器孔径无关，而且在强烈搅拌下，使用多孔分布器还会造成不必要的压力损失，易使物料堵塞小孔，引起灭菌不彻底。

② 发酵罐搅拌器的主要功能是破碎空气泡，以增加氧传递的界面及缩短扩散途径，并维持整个发酵罐内的物料处于均一状态。近年来国内外发酵罐的搅拌系统发展很快，结合进口二手设备，并根据空气进入发酵罐的分布要求，设计时底层搅拌器一般选用具有使空气径向分布的原盘涡轮式，上部选用具有轴向混合功能的搅拌器，使气液充分混合，提高传质、传热及溶氧效果。

罐内结构设计时取消底轴承，并对中间支撑进行改进，增加平衡器，结构简单，减少了染菌机会，轴瓦材料采用氟塑料，耐磨且润滑，使用寿命长。

## 3. 发酵罐的换热装置

在发酵过程中，随着菌体对培养基的利用以及机械搅拌的作用，将产生一定的热量，若不能及时疏散，将会影响酶的活性及产量，因此一个好的发酵罐应提供足够的降温面积，通过冷却介质及时带走发酵过程中产生的热量。新型发酵罐设计时，一般采用罐外盘管提供工艺需要的大部分换热面积，不足部分在罐内安装适量的内盘管。内盘管沉浸在物料中，热量损失小、传热效果好，与挡板一起改变了流体的流动状态，减少漩涡，提高搅拌强度和传热效果。罐体外盘管内流体在弯道内做强制湍流，提高了传热效率，且部分换热件外置，增大了罐内有效容积，有利于罐内清洗和消毒，同时外盘管与罐体焊为一体，提高了罐体的刚度，从而降低了罐体壁厚，减少了发酵罐的制作费用。

## 4. 发酵罐的功率

过去发酵罐所配备电动机的功率约为  $1\sim 115\text{kW}/\text{m}^3$  培养液，资料数据显示，溶氧与搅拌转速的 11.7 次方、通气量的 0.13 次方成正比，即搅拌转速对溶氧效果的影响较大，所以目前发酵罐所配备的电动机功率可大至  $3\sim 4\text{kW}/\text{m}^3$  培养液，同时将通气量压缩在较低的水平上，即采取高功率消耗、低通气量的办法来加强搅拌过程中的剪应力和翻动量，以提高氧的传递速率和液-固相的混合过程，同时也可避免高通气量引起的搅拌功率下降过多、泡沫严重、装料量小、液体蒸发量大的缺点。具体设计时，为降低生产成本，功率选择一般在  $2\text{kW}/\text{m}^3$  培养液，考虑到生产工艺的灵活性以及在培养液进行实罐消毒时减少功率消耗，节省能源，设计中选用变频器效果较好。

## 5. 发酵罐材质

有些发酵产品对铁很敏感，如发酵要求的最适铁含量在  $2\mu\text{g}/\text{mL}$  以下，盐霉素发酵对铁含量的要求更低，所以一般发酵罐材质应使用不锈钢。对原碳钢发酵罐内壁进行不锈钢喷涂，实际使用效果较好。

## 三、培养基灭菌

发酵培养基的灭菌一般采用湿热灭菌，即直接用蒸汽灭菌。蒸汽在冷凝时释放出大量潜热，并具有强大的穿透力，且在高温及水分存在的条件下，微生物细胞中的蛋白质极易凝固而引起微生物死亡，故湿热灭菌具有经济和快速的特点，广泛应用于培养基和设备的灭菌。

根据灭菌方式不同，培养基灭菌又分为实罐灭菌（实消）和连续灭菌（连消）两种。生产实践证明，灭菌温度较高而时间较短，要比温度较低而时间较长好，如对同样的培养基进行 126~132℃、5~7min 的连续灭菌，其所得的培养基质量要比一般采用 120℃、30min 的实罐灭菌好，可以获得较高的发酵水平。但连续灭菌的不足之处是需要设备较多，操作麻烦，染菌的机会也相应增多。采用实罐灭菌时，由于需要在罐内加热和冷却培养基，这段时间发酵罐不能用于发酵生产，故实罐灭菌中进行发酵生产的时间要比连续灭菌少，即发酵设备的利用率较低。但实罐灭菌操作比较简便，染菌机会少，而且当采用较低的冷却水温和较大的冷却面积时，并不影响培养基质量，所以设计中多采用实罐灭菌。根据实际使用经验，在实罐灭菌的基础上，设计时可以采用加大配料罐体积和台数或增加预热罐，即让大部分料液在进入发酵罐之前即预热到 50~60℃，这样在发酵罐内的加热时间就减少了，提高了设备的利用率。

#### 四、无菌空气制备

大多数酶制剂的生产菌是好氧菌，所以发酵过程中必须通入无菌空气来满足菌株生理上的需要。空气除菌是酶发酵生产中极其重要的一环，如果空气除菌不当或除菌设备失效，就会引起大面积染菌，造成极大的损失。过去采用棉花、活性炭过滤器，大大增加了空气系统的阻力，使能耗上升，费用高。现在多采用折叠式膜过滤器，经使用证明：它不仅设备体积小，过滤效率高，而且操作、维修、更换方便，效果较好。其滤膜采用进口聚四氟乙烯膜，滤膜孔径小，截留能力强；孔隙率高，流速快，流量大；滤膜吸附性小；适应性强。气体过滤精度能 100% 滤除 0.102 $\mu\text{m}$  以上微粒，包括 0.102~0.145 $\mu\text{m}$  的细菌和 0.104 $\mu\text{m}$  的噬菌体。为了保护终端精过滤器，发挥其除菌的主要功能，维持其更佳的经济寿命，在空气过滤系统中必须使用预过滤器。空气过滤系统及其灭菌工艺流程见图 5-12。

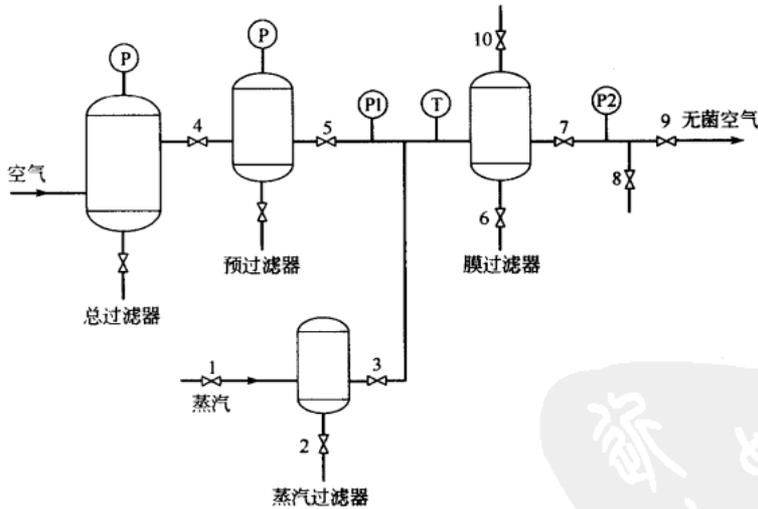


图 5-12 空气过滤系统及其灭菌工艺流程

正常操作时，阀 4、5、6、7、8、9 开启，阀 1、2、3、10 关闭。过滤器消毒时，依次关闭预过滤器出口阀 5、空气入罐阀 9；打开蒸汽入口阀 1 和下吹口阀 2，慢慢将蒸汽中的冷凝水放出至蒸汽溢出，再关小阀 2。然后打开蒸汽过滤器出口阀 3，开大过滤器下吹口阀 6，微开上吹口阀 10，开大空气下吹口阀 8，缓慢升温、升压至 120℃ 保温 20~30min。结束

消毒时，依次关闭蒸汽过滤器出口阀 3、入口阀 1，待膜过滤器压力降至 0.106MPa，缓慢开大预过滤器出口阀 5，关闭膜过滤器出口阀 7，再打开入罐阀 9，进行倒消。

## 五、发酵过程的自动化控制

发酵控制的目的是通过对微生物生长和产物合成的调节，在最低经济成本下得到最佳的经济效益。自动化设计时，一般根据工艺生产的要求，采用国内、国外先进水平的自动化常规仪表和集散型微机对生产过程的温度、压力、pH 值、空气流量以及溶解氧等参数进行检测及自动控制，以确保生产过程的正常进行，提高产品质量，降低能耗，改善操作条件并提高劳动生产率。发酵集中控制室设置在三层操作面，靠近发酵罐区，与生产区之间采用双层玻璃隔断，不仅可方便地观察到生产现场，又对控制室起到隔音作用。一般采用集中控制与就地指示相结合的控制方式，对生产过程中的参数进行检测、控制。大生产中比较成熟的检测、控制参数为：各级种子罐的压力检测、温度检测及控制；发酵罐压检测，温度、pH 值检测及控制；补料及消沫系统顺序控制；溶解氧、料液称重及液位检测；进罐空气流量指示计算。另外取一台发酵罐进行罐尾气检测，以便及时掌握尾气中二氧化碳及氧含量情况。控制系统采用 UXL 集散型微机控制系统，它是一种中小规模的 DCS，由操作员站、现场控制（或监视）单元、信号转换单元、通讯总站等组成。该系统可靠性高，具有良好的人机接口界面及很高的性能价格比。针对比较复杂的补料系统，国外比较先进的是采用流量计测量用调节阀控制，或采用计量泵补料系统；而在中国发酵工业中，多数生产厂家由于原料清洁度差，补料速率变化范围大，特别是可用于发酵过程中耐高温、抗腐蚀的流量计造价高，调节阀可靠性差等因素，上述两种补料方案实施难度大。

设计中采用计量罐脉冲滴加补料的控制方法，根据工艺要求的补料速率，计量罐可选用 1L 或 2L 罐。计量罐由罐体、进料阀、出料阀、电极和观察窗等组成（图 5-13）。罐体采用不锈钢材料，观察窗采用耐急剧温度变化的石英玻璃，进料阀和出料阀均采用不锈钢波纹管气动隔膜开关阀，外加气动先导电磁阀。补料时，首先打开进料阀料液进入计量罐，当液位上升触到电极时，通过电极电路自动关闭进料阀，然后打开出料阀，把罐内料液排光，即完成补加一罐的操作。如果补料速率为 100L/h，那么每 36s 计算机控制补加一罐，从宏观上看，是连续滴加，而从瞬间来看，是脉冲方式补加，所以称之为脉冲滴加方式。该方式实际使用效果较好。

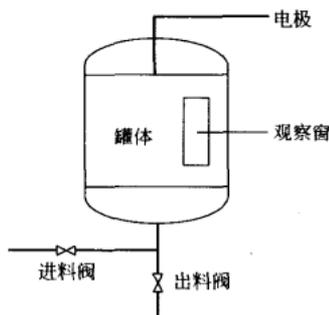


图 5-13 计量罐示意

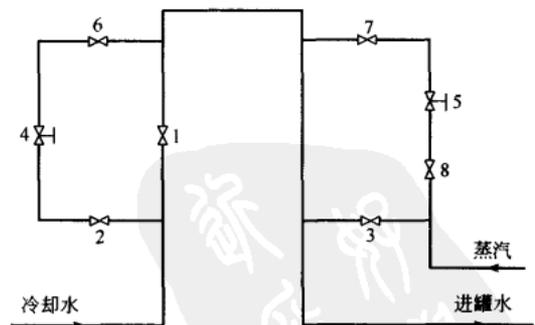


图 5-14 种子罐温度控制系统示意

针对小型种子罐既需要降温控制又需要升温控制的特点，以前采用控制热水（由蒸汽、冷水进行汽、水混合制得）的温度、流量进行调节，实践证明，这种控制方式温度控制精度差，滞后时间长。设计中采用电磁开阀、关阀的控制方式（见图 5-14），即当种子罐消毒结

束后,只需要降温,打开阀1,其他阀均为关闭状态。正常生产过程中,阀1、阀3关闭,其他手动阀均为常开。若需降温,电控阀4开启,阀5关闭,若需升温;电控阀4关闭,阀5开启。这种控制方式做到了成本低、维护方便以及可靠性高的使用效果,得到了很好的推广应用。

总之,在整个发酵生产设计中,其生产厂房应布置合理,工艺管道尽量短;发酵罐设计要有较好的通气、搅拌及换热装置,内部结构简单,利于清洗、消毒;为了保证发酵过程的纯种培养,必须对接触菌种的设备、物料、空气等进行彻底消毒、过滤,不能有杂菌进入;采用先进的微机控制系统把发酵过程的关键工艺参数控制在最佳状态,使整个生产过程做到经济运行,少投入,多产出。

### 参 考 文 献

- 1 周晓云. 酶技术. 北京:石油工业出版社,1995
- 2 霍兴云,冯德清. 酶制剂工业国外发展现状趋势及对策. 食品与机械,1995,2:13~16
- 3 郑裕国,薛亚平,金利群. 生物加工过程与设备. 北京:化学工业出版社,2004.7
- 4 陈石根,周润琦. 酶学. 上海:复旦大学出版社,2001.2
- 5 Archana A, Satyanarayana T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21: 12~17
- 6 Amare Gessesse, Gashaw Mano. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25: 68~72
- 7 岑沛霖,蔡谨. 工业微生物学. 北京:化学工业出版社,2000.6



# 第六章 酶 制 剂

## 第一节 酶制剂概述

### 一、酶制剂的定义

从生物（包括动物、植物、微生物）中提取的具有生物催化能力的酶，辅以其他成分，用于加速加工过程和提高产品质量的制品，称为酶制剂。

### 二、酶制剂的分类

#### 1. 从形态上分类

从形态上可以将酶制剂分为固体酶制剂和液体酶制剂。例如，在制糖工业和发酵工业上，经常使用的、用于制备葡萄糖的葡萄糖淀粉酶，就有固体和液体两种。

固体酶制剂体积小，容易运输、保存，比较稳定，所以大多数酶制剂以固体形式生产、销售。固体酶制剂的主要缺点是杂质含量高，酶活性较低，生产过程中需要沉淀和干燥，酶活性损失较大。

液体酶制剂是继固体酶制剂之后发展的剂型，相对于固体酶制剂，它的生产比较简单，成本较低，使用方便。液体酶制剂的生产关键是要解决酶制剂的稳定性问题，为此，液体酶制剂中大多需要加入适当的稳定剂和保护剂。另外，液体酶制剂的运输和保存也较固体酶制剂难度大些。

#### 2. 按酶制剂在应用领域上的分类

按酶制剂的应用领域可以分为：用于工业生产上作为催化剂的工业酶制剂，如 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、葡萄糖异构酶、青霉素酰化酶、天冬氨酸酶、富马酸酶等；用于饲料中提高动物消化率的酶制剂，又称饲料酶制剂；用于食品生产加工的酶制剂，又称为食品酶制剂；用于临床检测的诊断酶制剂；用于化学分析的酶分析制剂；用作药物的药物酶制剂，用于洗涤剂的洗涤酶制剂等。

#### 3. 按酶的来源不同分类

按酶的来源不同，可将酶制剂分为植物酶制剂、动物酶制剂和微生物酶制剂。

#### 4. 按酶生产加工方法的不同分类

针对应用的需要，可将酶分为游离酶制剂、固定化酶制剂、酶试纸、酶电极等。

#### 5. 按酶的组成成分分类

根据酶制剂中所含酶种类的多少可分为单一酶制剂（只含有一种酶，如淀粉）和复合酶制剂。复合酶制剂由一种或几种单一酶制剂为主体，加上其他单一酶制剂混合而成，或由一种或几种微生物发酵获得。复合酶制剂可利用各种酶的协同作用，降解各种底物，最大限度地达到酶制剂的作用。

#### 6. 按酶的含量分类

根据酶制剂中酶的浓度，可将酶分为普通酶和浓缩酶。普通酶具有价格低、效果好等优点。浓缩酶颜色较深，具有成本较低、用量少的特点。

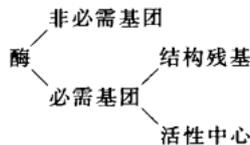
## 第二节 酶的保存与酶制剂的生产技术

### 一、酶的失活机理及稳定化技术

自然界中很多酶的催化效率和专一性是传统工业催化剂无法相比的，因而酶在各个领域中的应用越来越普遍。然而，酶在工业上应用时最大的问题是它的稳定性差，容易变性失活。

#### 1. 酶的组成和结构特点

除少数 RNA 具有催化活性之外，酶都是蛋白质，具有一级结构、二级结构、三级结构、四级结构。一般酶都有一个活性中心，在催化反应时，起作用的部分就是活性中心。活性中心是酶分子在三维结构中相近的氨基酸残基或这些残基的某些基团，通过肽链的盘绕折叠而在空间构象上相互靠近，构象的维持主要依赖蛋白质的二级结构、三级结构。酶除活性中心之外，还具有一个结构残基，这些残基对维持酶蛋白分子的完整并形成有规则的空间构象起着重要作用。酶的组成如下所示：



#### 2. 酶的失活机理

酶蛋白所具有的特异活性构象是分子中许多基团相互作用的结果，当环境改变或一些基团的相互作用被减弱（或完全消失）时，就会引起一大部分结构很快崩溃，从一种有秩序的构象过渡到一种杂乱构象，这一现象就称为酶变性。酶的空间结构一旦遭到破坏，活性中心的构象也就随之发生改变，酶因之失活。因此，酶失活的实质是酶蛋白分子空间结构的改变或破坏。引起酶失活的因素主要包括以下几种。

(1) 蛋白水解酶 水解肽链。

(2) pH 值改变 催化必需基团电离；强酸强碱条件下出现肽键水解、脱氨基作用、 $\beta$ 消除和外消旋化、氨基酸变化等。在其他条件不变时，酶在一定的 pH 值范围内活性最高。一般酶活性的最适 pH 值接近于中性（6.5~8.0）。但也有例外，如胃蛋白酶的最适 pH1.5。大多数酶在特定的 pH 值范围内稳定，偏离这个范围便会失活，这个范围因酶而异，如溶菌酶在酸性区稳定，而固氮酶则在中性偏碱区稳定。

(3) 氧化作用 各种氧化剂可氧化芳香族氨基酸的侧链蛋氨酸、半胱氨酸和胱氨酸残基；变性剂、去污剂、重金属离子、巯基试剂等也可与其作用。

(4) 热 高温导致氢键或疏水键破坏。酶制剂的活性随温度的升高而增加，但当温度升高到一定程度时，又使酶变性而丧失活性。一般酶活性的最适温度为 30~45℃，超过 60℃ 时酶会变性，高温、高湿会使酶失活或活性降低。酶的保存温度一般在 0~4℃，但有些酶在低温下反而容易失活，因为在低温下亚基间的疏水作用减弱，会引起酶的解离。此外，0℃ 以下溶质的冰晶化还可引起盐分浓缩，导致溶液的 pH 值发生改变，从而可能引起酶疏基间连接成为二硫键，损坏酶的活性中心，并使酶变性。

(5) 金属离子及其他影响酶活性的基团 一碘乙酸、高铁氰化物和重金属离子等可与酶的必需基团结合或发生反应，从而使酶丧失活性。因此在酶制剂生产过程中一定要注意温度、酸碱性、重金属离子等因素对酶制剂的影响，以求达到酶制剂的最佳使用

效果。

(6) 水分活度与酶制剂处理的相关性 生产过程中通常所使用的高温处理方法包括干热处理(如热空气等)及湿热处理(如高温高压水蒸气等),且物料中一般都含有一定的水分,酶的变性失活不仅仅是因为热量的作用,还有水分活度的作用。一般而言,酶在非常干燥的情况下,结构(构象)比较稳定,具有一定的耐热性;而当体系中含有一定水分或是在高温水蒸气作用下时,酶就极易变性、失活。因此在改善酶的热稳定性方面,不仅应考虑改善酶的单纯热稳定性,还应考虑提高其耐湿热性。

(7) 制作方式 固体酶制剂一般都做成颗粒状。酶制剂被特定的包裹物质包在颗粒内,避免了与外界接触,所以其稳定性特别强,一般在室温下保存一年其活力没有明显损失。国内酶制剂稳定化工艺主要采取载体吸附结合包埋工艺,其技术关键是不溶性载体的选取,好的载体可使酶制剂耐受 75~85℃ 的制粒高温。

### 3. 酶的稳定化

酶的化学本质是在氨基酸顺序排列成一级结构的基础上,通过氢键、盐键、疏水作用和静电作用等次级键再折叠成对活力发挥起关键作用的二级结构、三级结构(构象)。因此,通过改变酶的内在氨基酸结构和外界化学微环境可影响其构象而提高酶的稳定性。获得高稳定性酶可通过以下途径。

(1) 选择法 即筛选耐高温的菌种释放的酶。

(2) 固定化 就是将酶固定在不溶性载体上。具体方法是将酶在琼脂凝胶等固相材料上适当固相化;或用纤维素衍生物等固相载体处理酶分子;或用明胶、海藻酸钠等将酶微囊化包埋,从而稳定酶的构象,消除逆性因子的变形作用。Bernfeld 和 Van 在 1963 年首先用交联聚丙烯酰胺固定胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、 $\beta$ -淀粉酶等。纤维包埋是将酶包埋在合成的纤维微孔穴中,是一种理想的包埋方法。微囊化是将酶包埋在直径 1~100nm 的球形半透聚合物膜内,只要底物和产物分子的大小能通过半透膜,底物和产物分子就能自由扩散,达到既能催化反应,又能保护膜内酶的目的。酶经固定化后,稳定性提高,热稳定性中最适温度、米氏常数升高,对 pH 值、变性剂、抑制剂及长期保存的稳定性升高。例如,固定化的胰蛋白酶,其稳定性比游离酶高 1000 倍,而固定化的脂肪酶与可溶性酶相比,稳定性提高 140 倍。

(3) 化学修饰 采用修饰剂修饰酶的关键功能基团,增加酶蛋白的氢键、盐键和内部的疏水作用,使蛋白质表面亲水化。具体方法可采用甲基乙酰胺盐等单功能试剂与酶的某些表面基团进行反应,或用乙基咪唑等化学修饰剂使酶的某些氨基酸残基乙基化、乙酰化,或用戊二醛等双功能试剂使酶分子产生交联来提高酶的稳定性。例如,用苯四酸酐酰化 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶,通过亲水化则可达稳定化。修饰酶分子的任一氨基可引入 3 个新的羧基,在酶热失活的微碱性条件下,羧基电离,使酶表面高度亲水化而达到稳定化。据测定在 60℃ 时,酶的稳定化效应可提高 1000 倍左右。用苯四酸酐修饰的 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶的稳定性,实际上等于极端嗜热菌蛋白酶的稳定性,这是目前已知的最稳定的蛋白水解酶。化学修饰剂通过共价键连接到酶的表面,形成一个覆盖层,可能得到比天然蛋白质更稳定的构象。这种稳定化酶的方法不仅可提高酶的稳定性,还可赋予酶的新性能。

(4) 添加激活剂 某些金属离子、阳离子、多糖、多戊醇和表面活性剂等化学环境中可影响酶的氢键、盐键、静电作用、疏水作用,针对不同的酶可用不同的化合物来稳定酶的构象。例如,甘油、糖和聚乙二醇等多羟基化合物,能形成很多氢键,并有助于形成溶剂层,这种溶剂层可增加表面张力和溶液黏度,降低蛋白质的水解程度而稳定酶的作用。

(5) 蛋白质工程 具体方法可从极端环境分离、筛选、培养产生耐温耐酸碱酶的菌种；或用基因突变、基因拼接等蛋白质生物工程创造新的基因，产生新的酶一级结构，获得改变了构象的稳定酶。蛋白质工程是提高酶的稳定性最根本的方法，主要通过基因工程技术增加蛋白质的疏水性，使酶表面亲水化，取代易氧化的活性基团或易脱胺的氨基酸等方法。蛋白质工程虽然可能是今后酶稳定化的主流，但目前由于蛋白质的三维结构测定和蛋白质纯化、结晶等技术尚无大的突破，其他传统的稳定化方法仍是必不可少的手段。

## 二、酶制剂的生产技术

酶制剂是由微生物产生的生物制品。酶的制备一般包括 4 个基本步骤，即发酵、提取、纯化和结晶（或制剂）。首先将所需要的酶从原料中引入溶液，此时不可避免地要夹带着一些杂质，而后再将酶从溶液中选择地分离出来，或者从酶溶液中选择地除去杂质，最后制成纯净的酶制剂。

中国酶制剂的传统提取生产工艺是硫酸铵盐析和喷雾干燥。在 20 世纪 80 年代进行了工业酶制剂大规模分离提取技术和设备的研究，攻克了发酵液分离关，为酶制剂精制创造了条件，采用了超滤浓缩等新技术，逐步采用有机溶剂沉淀、淀粉吸附或直接生产液体浓缩酶的工艺路线，对固体酶制剂运用辐照技术，研究解决了液体酶制剂的稳定性问题，使酶制剂产品逐步由粗制酶向精制酶，由工业酶向食品酶，由固体酶为主向液体酶为主过渡，使产品质量升级换代。

### 1. 发酵

利用微生物来生产饲用酶制剂有两种方法：一是固体发酵；二是液体发酵。用固体发酵的方式来生产酶制剂也叫表层发酵。与液体深层发酵相比，其生产投资规模小、生产成本低、不会产生环境污染，其发酵的酶活力高，酶系全。但缺点是：生产工人劳动强度较大、产量不易扩大。液体发酵生产酶制剂的主要优点是：操作劳动强度小、可自动化、产量可大规模生产。主要缺点是：生产投资规模大、生产成本低、技术要求高、产生的废水易污染环境。目前国内生产的酶制剂，采用固体发酵法占绝对优势。特别是对于酶的应用，如饲料中成分复杂时，多种酶的效果比单酶效果好。固体发酵生产的酶，酶系复杂，酶不经浓缩，将发酵产品烘干后粉碎，然后测定其活力单位，再添加填充剂，以达到产品的企业标准，包装后成成品。这样的复合酶比单一酶更受到使用单位的欢迎。液体发酵的产品一般是其中某一种酶的酶活极高，而其他酶的酶活极低，使用时与其他单一酶配合使用，但总的酶系还不能与固体发酵产生的酶的酶系相比。不论细菌还是真菌、放线菌均能采用固体发酵的方法来生产酶制剂。

用来生产饲用酶制剂的微生物应该不产生毒素、激素或其他有害物质。目前用来生产酶制剂的微生物主要采用一般公认为安全的微生物。美国食品药品监督管理局（FDA）规定枯草杆菌、米曲霉菌、黑曲霉、啤酒酵母和脆壁酵母等微生物无须经鉴定可直接生产。

### 2. 提取

提取过程的主要任务是从发酵液中提取酶，由许多过滤和浓缩步骤完成，包括真空鼓过滤和先进的滤膜过滤。对于以液体形式出售的酶产品，提取的最后步骤是标准化和稳定化。

(1) 细胞破碎 胞外酶可以直接进行提取分离；胞内游离存在的“游离酶”以及与颗粒体（如细胞核、线粒体、微粒体、质膜）结合的“结合酶”都有一个破碎细胞的过程，“结合酶”还有一个转变成水溶液的问题。因此对酶类的提取要采用多种方法。常用的细胞破碎法如下。

① 机械法 如绞碎、刨碎、匀浆、研磨、挤压或超声波等。研磨时还可加入细砂、石

英粉、氧化铝等以利细胞破碎。

② 化学法 用盐、碱、表面活性剂、EDTA、丙酮和正丁醇等可使细胞破碎、颗粒体结构解体，从而把酶释放出来。例如，常将胰脏用数倍量丙酮处理 2~3 次，制成丙酮粉，供多种酶的提取用；用胆酸盐处理膜结构上的脂蛋白和“结酶”，使两者形成复合物，并带上静电荷，由于电荷之间的排斥作用，使膜破裂，达到溶解。

③ 酶解法 用组织自溶或用溶菌酶、脱氧核糖核酸酶、磷脂酶等降解细胞膜结构，然后再进行提取。但应知道组织自溶法对某些酶的提取是不利的，如胰蛋白是以酶原形式纯化后再激活成胰蛋白酶的，若用自溶法提取，酶原已转成酶，纯化就很困难。而用纯的工具酶降解法无此缺点，但成本较高。

④ 冻融法 采用反复冷冻与融化法，由于细胞中形成了冰晶及剩余液体中盐浓度的增高可以使细胞破裂。

## (2) 酶的提取

① 溶剂提取 酶的提取溶剂可以用水、一定浓度的乙醇、乙二醇、丁醇和稀盐溶液、缓冲溶液等；也可以用稀碱或稀酸溶液，如用稀硫酸提取胰蛋白酶，用稀盐酸提取胃蛋白酶。溶剂用量一般为原料质量的 1~5 倍。搅拌可加速提取，但转速不宜太快，否则会产生泡沫而难以过滤或使酶变性。多数酶的提取要在 50℃ 以下操作，但有的酶在较高温度下提取更好，如胃蛋白酶在 45℃ 提取收率较高，一般可在 -5~40℃ 间适当选择。提取液的 pH 值应在酶的稳定 pH 值范围内，并应远离其等电点的 pH 值为宜，如蛋白酶选用 pH2.5~3.0，胰蛋白酶和  $\alpha$ -糜蛋白酶则用 0.5mol/L 硫酸提取。若在中性或碱性提取时，最常用的是 0.15mol/L 氯化钠、0.02~0.05mol/L 磷酸缓冲液、0.02~0.05mol/L 焦磷酸缓冲液。正丁醇的亲脂性强，能透入酶的脂质结合物中，又兼有亲水性，有类似表面活性剂的作用，适用于提取“结酶”。

为了减少提取液体积，可用多段逆流提取或柱型抽提法。液渣分离可用过滤法（如板框压滤、旋转真空过滤）或离心法。过滤时可加硅藻土、纸浆等为助滤剂。离心时可加入氢氧化铝凝胶、磷酸钙凝胶等以除去悬浮的胶体物质。

② 机械提取 发酵完成后，发酵罐内充满了残余的培养基、水、微生物和酶所形成的大量发酵液。用真空转鼓过滤器将酶与发酵液的其他成分分离开来。过滤器外涂有厚厚的一层硅藻土，水和酶可以渗透过去，而培养基和微生物却被黏着在硅藻土表面上。转鼓过滤器旋转的过程中，发酵液喷散开来，水和酶被吸进过滤机的中央，培养基和微生物则留在硅藻土表面，稍后用巨型刀片将硅藻土及附着其上的培养基及微生物一同去除。再经过一系列其他的过滤过程后，通过简单的水分蒸发过程，最终将酶从水中分离出来。

## 3. 酶液的浓缩

为减少纯化操作的容积，通常先将提取的酶液进行浓缩。工业上可用真空减压浓缩、薄膜浓缩、冷冻浓缩和逆向渗透作用进行浓缩。对于少量酶液下述方法浓缩更合适。

(1) 用葡聚糖凝胶（分子筛）浓缩 取相当于酶液量 1/5 的干葡聚糖凝胶 G-15 或 G-25，分次加入酶液中，搅拌 30min，使凝胶吸水膨胀，进行吸滤。经重复数次操作即可在短时间内把酶液浓缩至所需的体积。也可将酶液装于透析袋内，埋入干凝胶中，袋内酶液也可得到浓缩。

(2) 用聚乙二醇浓缩 将稀酶液装入透析袋内，袋外覆以聚乙二醇，袋内水分被袋外的聚乙二醇所吸收，在短时间内可以达到浓缩的目的，得到所需的浓酶液。

(3) 用超滤法浓缩 超滤技术在其可筛分范围内分离酶分子时不发生“相态”变化，可以避免酶蛋白变性，且分离速率快，所以愈来愈被广泛采用。各种不同孔径的超滤膜，适用

于实验室规模及一定工业规模的酶液浓缩。如国产二醋酸纤维素制成1~20nm孔径的超滤膜，用于实验室规模固氮酶液的脱盐和浓缩，效果良好。

#### 4. 杂质的去除

酶提取液中常含有杂蛋白、多糖、脂类及核酸等杂质，可用下述方法去除。

(1) 调pH值和加热法 利用蛋白质对酸、碱和热变性方面性质的差异，可去除非活性杂蛋白。如制备脂肪酶时，在pH 3~4时以40℃温度加热150min，淀粉酶活力可丧失90%而被除去，而脂肪酶活力仍保持80%以上。

(2) 蛋白质表面变性法 蛋白质表面变性后其性质有所不同，借以去除杂蛋白。如制备过氧化氢酶时，加入三氯甲烷和乙醇进行振荡可以将杂蛋白变性而去除。

(3) 蛋白质沉淀剂法 利用乙酸铝、利凡诺、单宁酸、离子型表面活性剂等蛋白质沉淀剂可以去除杂蛋白及黏多糖类杂质。使用时要注意这类试剂常可引起酶变性失活，因此应迅速除去。

(4) 选择性变性法 各种蛋白质对变性剂的稳定性不同，可以用选择性变性剂去除杂蛋白。如细胞色素C对三氯乙酸较稳定，所以在制备时可用2.5%三氯乙酸使其他杂蛋白变性而沉淀除去。

(5) 加保护剂热变性法 酶与底物或竞争性抑制剂结合后，其稳定性常显著增加，所以常用它们为保护剂，再用一些剧烈手段破坏杂蛋白。如用D-甲基苯甲酸为D-氨基酸氧化酶的保护剂，经加热除去杂蛋白，使该酶得到很好的提纯。

(6) 核酸沉淀剂法 酶液中的核酸类杂质，可以用氯化锰、鱼精蛋白硫酸盐等沉淀剂使其沉淀而除去。必要时，也可用核糖核酸酶将核酸降解后除去。

#### 5. 酶的纯化

酶是蛋白质，因此凡用于蛋白质的纯化手段均适用于酶的纯化，如盐析法、聚乙二醇沉淀法、有机溶剂分级沉淀法、等电点法、选择性沉淀法、各种柱色谱法（吸附色谱、离子交换色谱、凝胶过滤）、各种电泳法及亲和色谱等。不同之处是酶的纯化过程尚需选用迅速简便的活力测定方法，以追踪酶的去向。在选用酶的活力测定方法时，分析方法的迅速要比其精确度更为重要。即宁可要一个需时5min、准确度为5%的方法，也不要一个需时30min、准确度为0.5%的方法。在建立活力测定法之后，再根据各单元的纯化步骤及活力分布情况用列表形式表达。表的内容包括：操作步骤、总体积、酶浓度（每毫升酶活力）、总活力、蛋白质浓度（mg/mL）、比活力（即纯度，酶活力单位/毫克蛋白）、产率（每步总活力/第一步的总活力）和纯化倍数（每步比活力/第一步比活力）。

一个典型的酶纯化过程常包括多个单元操作，各单元操作如何串联，需靠实践摸索。每经过一个步骤一般可提高酶纯度2~3倍，总纯度可提高数千倍，而总产率常仅百分之几或百分之十几。总的原则是选用最少的步骤而能取得最好的纯化效果，因为增加步骤势必增加酶的丢失。通常对于含盐浓度高的粗提取液一般不宜采用吸附法，而多用盐析法；对于低离子强度的酶溶液则可用吸附法或离子交换法。交替使用不同分级沉淀法常比单独重复同一类型的方法更能奏效，所以常将吸附法、盐析法和有机溶剂分级沉淀法串联起来进行纯化。当这些方法仍达不到要求时，还可以采用一些包括电泳、色谱法在内的其他类型纯化方法。

当酶达到一定纯度时，便可以进行结晶，结晶也是纯化酶的有效手段之一。但应注意的是药用酶有些并不需要结晶。酶的第一次结晶纯度有时仍低于50%。酶的结晶通常可以在较纯的酶液中添加硫酸铵、氯化钠等盐达到一定饱和度，使酶慢慢结晶出来。此时必须控制温度和pH值。盐浓度要逐渐提高，添加速率要慢，才能得到较好的结晶。有时在低温下，用丙酮、乙醇等有机溶剂进行结晶。近年来采用平衡透析法，即将酶液装入透析袋中，置于

一定饱和度的盐溶液中进行透析，这种操作可以获得大量结晶。

## 6. 酶的制剂

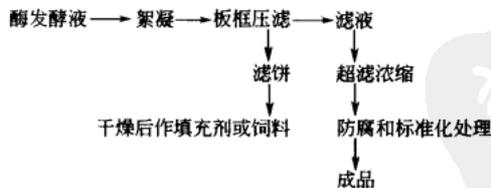
由其化学和物理特性所决定，酶易受外部各种因素如高温、pH值和蛋白质水解的影响钝化。液体酶可通过添加盐和糖来降低水分和液体活性以提高稳定性。另一种方法是通过干燥方法去除水分生产干酶浓缩物，这种方法可在干燥过程中添加特定载体，进一步提高其稳定性，酶的活性部分（催化点）将与基质粘住，因而能保护催化点免受外部环境的影响。干酶制剂比液体酶具有较高的贮存稳定性，试验表明经适当处理的干酶制剂贮存50周其活性无损失，还可与其他饲料组分如维生素、矿物质混合生产预混料，或用于生产配合饲料而不损失酶的活性，而且干酶制剂通常比液体酶更易均匀混入饲料。因此，在酶制品和饲料预处理方法相一致时，应选择稳定性合适的干酶制剂。

## 第三节 液体酶制剂

随着酶制剂工业的发展，一些大规模生产的微生物酶制剂多倾向采用液体酶，这样不仅可消除生产粉末状固体酶制剂对人体的呼吸系统造成的伤害及环境污染，同时还可充分发挥液体酶生产工艺过程简单、能耗低、酶得率高、机械化程度高等优点，但液体酶易失活，为长期而有效地保持液体酶的稳定性，在液体酶中添加稳定剂和防腐剂是最常用的方法。

酶的活性功能决定于其分子结构的完整和严格的构象，温度升高会导致酶的空间结构破坏，从而丧失其原有的生物活性。黄原胶大分子具有网状结构，可产生筛孔效应，对较小的酶蛋白分子进行空间限位，减少了酶分子之间的相互碰撞，一定程度上提高了酶分子的热稳定性；亲水性黄原胶大分子的加入使得水的自由度变小，加强了酶蛋白分子的疏水作用；黄原胶大分子上的一些疏水基团与酶分子表面的疏水区域或孔发生疏水相互作用，使酶吸附于大分子介质上，增加了酶分子表面的亲水性，也就提高了酶的稳定性；甘油对酶稳定性的作用，可能是羟基基团和酶分子的相互作用或是醇类减少了介质的介电常数，加强了酶分子的疏水作用；明胶对酶的保护作用，可能是由于蛋白质表面相互作用区域排除了水，因而降低了自由能，增加了蛋白质的稳定性；苯甲酸能非选择性地抑制广范围的微生物细胞的呼吸酶系的活性，特别是具有很强的阻碍乙酰辅酶A缩合反应的作用，从而抑制微生物的生长。山梨酸能与微生物酶系统中的巯基结合，从而破坏许多重要酶系，达到抑制微生物增殖及防腐的目的。

### 一、液体酶生产工艺流程



### 二、液体酶生产工艺

#### (一) 絮凝工艺

精制浓缩液体酶的生产过程中，絮凝工艺是最关键的一步。如果絮凝效果不好，将导致处理时间长，增加染菌的可能性。采用絮凝工艺对发酵液进行预处理可除去发酵液中的菌体和其他不溶性粒子，从而大大改善了发酵液的过滤性，提高了澄清度。

对于絮凝的作用机理有如下解释：①絮凝剂中和了悬浮粒子表面上的电荷（菌体细胞表面上亦存在着羧基和氨基，故带有电荷），最终导致了这些粒子的絮凝；②絮凝剂的包埋或吸附作用，把菌体及其他不溶性粒子机械地吸附并包埋在其中。

### 1. 絮凝方法

絮凝方法主要有如下两种。

方法 1：加水 30%~40%，加膨润土、硅藻土、苯甲酸钠、阴离子型聚丙烯酰胺 (APAM) 适量。

方法 2：加水 1/3、木屑 1%，依次加入适量硫酸锌、黄血盐、APAM。

这两种方法滤液清澈透亮，滤速快，滤饼水分少，可应用于大规模生产。

### 2. 絮凝注意事项

在絮凝处理的试验研究和工艺操作中，应该注意以下几点。

①絮凝剂的使用效果与多种因素有关，其中最重要的是絮凝剂的浓度，搅拌转速和搅拌时间。

②絮凝剂的添加量从零开始增加时，被絮凝的悬浮粒子的量相应增加，但超过一定浓度后，已絮凝的粒子又发生分散。因此，要通过试验确定絮凝剂的最佳添加量。

③添加的絮凝剂与悬浮液中的粒子接触是发生絮凝的前提条件，因此需要进行搅拌。但是，生成的絮凝物是很脆弱的，过分的搅拌会使絮状物破碎倾向大于生成倾向，因此，又必须控制搅拌转速和时间。根据实际生产情况，一般采用搅拌 30min，转速 50~80r/min 的操作，可取得良好的絮凝结果。

## (二) 板框过滤

若发酵后产酶为胞外酶，则滤液的清浊直接影响液体酶的品质及超滤设备的使用。开始进料时，由于滤布比较干净，应靠罐内的压差自然进料。如果一开始就加压进料，会造成滤液的浑浊。待一段时间，当滤液很清，且滤速恒定时，缓缓加压进料。在此特别强调，板框接收槽的放液口要有一个使浑浊液重回絮凝罐的装置，一旦发现滤液浑浊，便能及时打回。每批滤完后，要把滤布洗净，安放整齐，以待下次再用。板框过滤出的滤饼，各厂家应根据实际情况进行处理。在其生产过程中，需要一部分填充料进行标准化处理，因此，可以将滤饼烘干处理后作填料。

## (三) 超滤浓缩工艺

超滤是加压膜过滤方法的一种，其工作原理是在一定压力下，把大分子溶质阻留在膜的一侧（留在原来溶液中），而小分子溶质透过至膜的另一侧，从而达到分离纯化、浓缩产品的目的。超滤法适用于生物大分子发酵产品（如糖化酶、 $\alpha$ -淀粉酶）等的提取、纯化和浓缩。该工艺具有成本低、操作方便、条件温和、较好地保持酶活力、产品回收率高等优点。超滤器的进口压力为  $4 \times 9.8 \times 10^4$  Pa 左右，出口压力  $(2 \sim 4) \times 9.8 \times 10^4$  Pa 左右，进出料口之压差以  $1 \times 9.8 \times 10^4$  Pa 左右为宜。操作温度在 40℃ 以下。酶液的浓缩倍数根据需要而定，一般在 4~5 倍左右。运行过程中定时测定超滤液的流量及酶活力，以确认超滤器运行是否正常。超滤浓缩得到液体酶制剂，收率达 80% 以上。

国际上 20 世纪 60 年代开始采用超滤技术对酶进行浓缩提纯。该技术具有以下优点：①在常温下浓缩提纯，减少了温度对酶制剂质量的影响，其产品纯度高，收率高，并能对低浓度的酶产品进行有效的浓缩；②与真空蒸发相比，超滤的能耗低，二者的能耗比为 1:0.83；③操作简单；④与盐析沉淀、溶剂萃取法相比，可以省去无机盐（硫酸镁）及有机溶剂（乙醇、丙酮）等助剂的消耗。

1976 年，中国开始了酶制剂浓缩提纯的研究和工业试验，它包括用平板式超滤器对

BF-7658 $\alpha$ -淀粉酶的浓缩提纯，用PAN管式超滤器对2709碱性蛋白酶的浓缩提纯，用醋酸纤维素管式膜对AS 3.3409黑曲糖化酶的提纯。最近又成功应用外压中空纤维式超滤器、卷式超滤器对酶制剂浓缩提纯。

传统的絮凝沉淀、干燥工艺能耗高，酶失活率也高，酶的流失相当严重，所以将超滤技术引入酶制剂工业后加工工序势在必行。

### 1. 超滤复合工艺

传统的酶制剂提取工艺如图6-1所示。

整个工艺糖化酶提取率仅75%左右，有时更低。盐析废液中含有大量残存的糖化酶，约占生产量的20%，残存量在500~2000U/mL之间，无法回收，损失较大。目前，国内较为成熟的超滤复合工艺如图6-2所示。

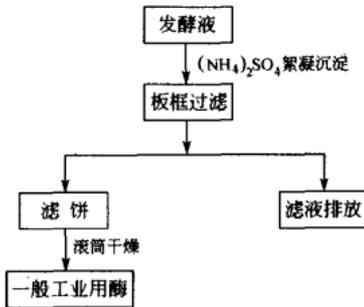


图 6-1 传统的酶制剂提取工艺

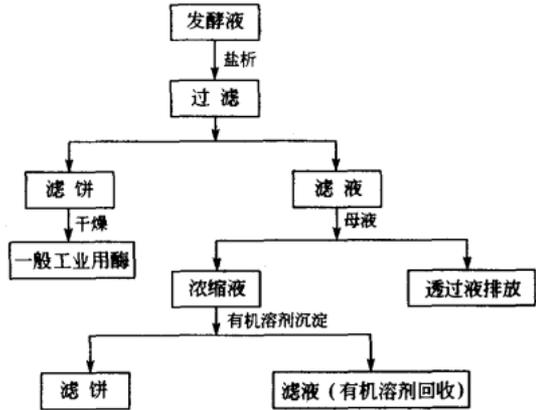


图 6-2 超滤复合工艺

若采用外压中空式超滤器，在压力0.08MPa下进行循环浓缩，浓缩倍数可达32倍，糖化酶废液由1160U/mL增浓到15261U/mL，酶累计透过率3.7%。

### 2. 浓差极化现象及解决方法

酶本身是一种蛋白质，也可以说是一种两性离解的电解质，在水溶液中为一亲水胶体。成膜物质特别是聚矾与酶之间的静电力、氢键、疏水作用及电荷转移极易使酶为膜面吸附，造成超滤吸附阻力增加。人们已发现蛋白质超滤时，沿膜面浓差极化层虽极薄，但它却成为分离过程中重要的控制因素之一。上述各种因素将使酶液通量下降。采用改变流速、扩散系数、流体黏度、浓度与温度、离子强度及添加适当缓冲因子等措施都可使膜通量有所回升。

### 3. 膜材料的选择

国内目前较为成熟的板式膜以CA、PS、SPS、PAN、PAN-PVC等为主。中空膜以PS为主，PAN有一定生产。总体来讲，CA膜孔径容易控制，适用于大部分的酶制剂，但物理化学性质较差，极易被微生物消化。PS膜的主要特点是透水量小，持续衰减快。PAN膜有较好的亲水性，纯水和酶液透过量较大。PAN-PVC膜的性能较PAN膜更优，但都不如PS膜耐高温、耐酸碱。SPS膜是在聚矾共沸物的基础上添加了带亲水性基团—SO<sub>3</sub>H的磺化聚矾，使矾类膜的纯水及酶液透过性能得以较大改善，但因其成本较高，使推广应用受到限制。

工程实际操作中常采取提高酶液沿膜面的剪切速率以减小酶于膜面处的浓差极化和膜面

吸附。此外，针对所需分离酶的化学性质选择合适的高分子材质膜也极为重要。工程上一般选用亲水性膜。疏水性膜可用化学改性、预涂覆技术以改善其使用效果。

#### 4. 组件的评价

膜组件无外乎板框式、卷式、中空式（内压、外压）、膜管式4种。板框式超滤组件出现最早，且技术最成熟，只是设备一次投入较大，但具有安装、清洗及膜面检漏较为方便以及维护费用较低等优点。近年来，国家海洋局杭州水处理中心开发的薄层流道板式超滤器，因具有膜堆密度高、高剪切、可反冲等优点，在酶制剂工业中值得推广。中空式超滤器在膜组件中有较高的比超滤面积，在应用中有一定竞争能力。中空组件目前以PS膜居多，使它的优越性受到一定遏制。管式组件最早在无锡酶制剂厂得以应用，卷式组件近几年发展较为迅速，相继得以应用。

#### 5. 膜恢复和再生技术进展

超滤膜使用一段时间以后，因蛋白质等物的堵塞与吸附使之不得不进行有效恢复再生。一般可先用自来水减压清洗5~20min，然后浸泡4h以上，再减压清洗5min左右，膜通量可以基本恢复到原始的80%~90%。由于各种酶的生产条件不同，发酵液的情况千变万化，当仅靠清洗无法恢复到初始值时，就需进行必要的化学清洗。最初采用含酶洗涤剂、碱性或酸性氧化物水溶液体系进行复合清洗，现在人们倾向于采用离子型、中性等表面活性剂来增强洗涤效果。

目前，酶制剂生产厂家在及时正确清洗方面仍有薄弱环节。为确保清洗效果，超滤装置最适宜的运行时间为6.5~7.0h，两组超滤装置交替使用。

#### （四）酶液防腐

酶制剂活力下降的主要原因之一是细菌、霉菌和酵母等微生物的侵袭。防腐剂具有显著的杀菌或抑菌作用，若在特定条件下配合使用防腐剂作为一种保藏手段，对防止酶液败坏、减少酶活损失有显著的效果。在酶液中添加防腐剂的方法简便、成本低廉，一般不需要什么特殊设备，甚至可使酶液在常温及简易包装的条件下贮藏，如若配合低温冷藏及稳定剂一起使用，效果会更佳。常用的防腐剂有苯甲酸钠、山梨酸钾、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯等。室温下浓缩酶液的保存时间较粗酶液长，且酶活损失较低，所以浓缩酶液也是提高酶液稳定性的一个重要手段。酶液的防腐保藏若在加防腐剂的基础上采用低温冷藏（5~10℃）保藏，将会大大提高液体酶的稳定性，减少酶活损失，从而延长保存期。

#### （五）液体酶稳定剂

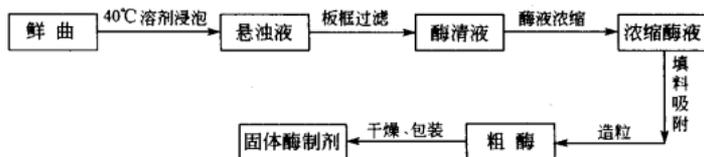
各种酶在保存或使用一段时间后，由于受到各种因素的影响，原来完整的空间结构将会逐渐受到破坏，致使酶活力逐步降低，最后完全丧失其催化功能。为了延长保存期，通常在酶液中加入一定量的稳定剂，如多元醇类、糖类、乙醇及有机钙等，所以用来溶解对羟基苯甲酸丙酯的乙醇能够增强酶液的稳定性，减少酶活的损失。果胶酶在防腐保藏过程中，pH值不随时间的变化而变化，酶液的pH值始终为3.0~3.5，pH值的稳定性为酸型防腐剂的作用发挥创造了一个有利条件，从而可延长酶液的保质期。

## 第四节 固体酶制剂

### 一、固体酶生产工艺流程

发酵结束出曲后，用溶剂浸泡酶曲，40℃左右搅拌浸提，立即用板框压滤机过滤，除去残渣，滤去菌丝、孢子等杂质，然后加入填料吸附造粒。经低温抽气干燥，即得一定要求酶

活分布的酶制剂。后处理工艺流程如下。



## 二、酶在制粒过程中的稳定性

酶是一类特殊的蛋白质，是由活性细胞产生的生物催化剂物质。它的分子构象不稳定，在制粒过程中，高温作用可使蛋白质变性，从而使酶的活性丧失。目前市场上的饲用酶制剂，生产厂家已对其进行稳定化处理。处理方法有载体结合和包被技术。当制粒温度为70℃时，粉末状 $\beta$ -淀粉酶在压粒后的存活率为10%左右；而与谷物载体结合的颗粒状 $\beta$ -淀粉酶在制粒后存活率可达到50%左右。这说明用谷物作载体吸附酶后其稳定性增强。其原因在于，酶与底物的接触提供了在制粒时防蒸汽湿热的保护。然而，这种保护是有限的，当制粒预调质温度为65℃时，它有相当的稳定性；随着调质温度升到75℃时，酶活性失去70%左右。所以此处理方法并不能保证酶在制粒过程中保持稳定性。

为在制粒过程中尽可能保存酶的活性，研究人员采用对载体结合酶进行包被处理的方法，其产品称为第二代饲用酶。这种用特殊材料包被的饲用酶具有更高的耐热性，在75℃条件下，其稳定性是原来的两倍。

木瓜蛋白酶干燥工艺有60℃热风10~16h吹干或热风真空干燥、热风喷雾干燥、冷冻真空干燥和冷冻真空喷雾干燥。不同干燥工艺对其性能和价格的影响见表6-1。

表 6-1 不同干燥工艺对木瓜蛋白酶性能和价格的影响

项 目	热风吹干	喷雾干燥	冷冻干燥
干燥失重/%	8~10	6~8	5~8
粉剂细度	60~100目	300~400目	60~100目
水溶性[酶:水=1:50(质量比)]	差	好	好
室温贮存活力稳定性	差	好	差
价格	低	中	高

固体状态酶的稳定化主要采取这样的方法：酶液+稳定剂→混合→造粒→干燥。

## 三、填料及载体的选择

造粒生产过程的目的是最终得到自由流动、无粉尘、使用安全方便的固体颗粒产品。不同的酶具有不同的稳定性，尤其是热稳定性。有些酶能耐相当高的温度。通常情况下，颗粒化包被的酶具有较好的热稳定性。在蒸汽制粒过程中酶的热稳定性在很大程度上取决于含酶颗粒中非酶组分的组成合理化性质。

① 在含酶的颗粒中添加适当组分，其热稳定性大大提高。这些组分有两类：一类是疏水物质，如蜡、牛油，涂在含酶颗粒表面；另一类是水不溶物。疏水物质占含酶颗粒总量的5%（质量分数）以上，最好能占8%（质量分数）；而水不溶物至少占80%（质量分数）以上，较好的占90%。如果疏水物质不涂在表面，应该均匀分布在含酶颗粒内部，含量为5%~15%（质量分数），在某些情况下甚至可高达98%（质量分数）。疏水物质如果涂在含酶的芯的表面，此时疏水物质合适含量为1%~50%（质量分数），最好控制在5%~15%。

制成的颗粒有多种形状，如球形、椭球形和一些不规则形状。

② 在实际应用的颗粒中往往含有多种酶。酶在颗粒中存在的方式并不重要，在颗粒中的分布可以是均匀的，也可以是不均匀的。大部分酶处于颗粒的芯中，少部分在涂层里。酶蛋白在颗粒中的含量为 0.01%~10%（质量分数），通常情况下处于 0.3%~2.5%（质量分数）之间。酶在颗粒中的含量在很大程度上取决于酶的性质。颗粒中可含有一定比例的可溶性组分，如棕榈油（或另一种可溶性植物油或脂肪）、氢化棕榈油（或另一种氢化植物油）、牛油、氢化牛油或蜡。这些可溶性油可作为酶和其他有机成分的模式，在制粒时，酶和其他一些相关物质加入到熔化的油中，在成粒、冷却条件下固化。为了使酶与其他组分（包括可溶性油）充分混合，并使酶在颗粒中均匀分布，颗粒的直径不宜太大，对于球形颗粒，直径是重要的线性量度，最大不应超过 2mm。颗粒直径的下限取决于如何避免在生产 and 后处理过程中形成粉尘，通常不小于 0.1mm。

③ 固体酶制剂中的填料主要选择水不溶物。水不溶物包括在水中完全不溶的物质和溶解度极低的物质，溶解度低于 1g/100mL 水。如  $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{CaSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaHPO}_4$ 、含有硅酸铝的矿物质（如黏土、高岭土、膨润土和皂土）、惰性金属氧化物（如氧化镁、二氧化钛）、各种生物大分子物质（如多糖、纤维素和某些淀粉）、碎细的谷物（如燕麦、大麦、小麦磨成的细粉、大豆粉）和活性炭等。

#### 四、固体酶制剂的干燥方法

常使用的干燥方法有：喷雾干燥、真空烘箱干燥、滚筒干燥、鼓风干燥及流化床干燥。流化床干燥由于条件温和（温度低），处理量大且能使产品颗粒化，因此已越来越多地受到重视。或者采用流化床干燥法对酶进行稳定化处理，选用玉米淀粉作为载体，酶液中添加适量蔗糖，并含有一定离子强度及 pH 值的缓冲液，包被剂选用聚阴离子多羟基化合物。通过这样处理后，可提高酶的热稳定性，尤其是耐湿热性。

采用浓缩酶液，以元明粉为载体，低温下（ $<40^\circ\text{C}$ ）在一个特制的流化床中，同时完成载酶制粒和干燥过程，制得的颗粒酶制剂再在辅助流化床中进行表面涂膜处理，制得胶囊型颗粒制剂。生产过程连续，颗粒粒度可以自动控制。

#### 参 考 文 献

- 1 张树政. 酶制剂工业（上册）. 北京：科学出版社，1984
- 2 郭勇. 酶的生产与应用. 北京：化学工业出版社，2003
- 3 禹邦超，刘德立. 应用酶学导论. 武汉：华中师范大学出版社，1994
- 4 宋代军. 常用酶制剂的生产方法. 四川畜牧兽医，2000，27（1）：33
- 5 曾辉，何新民，张新武等. 精制液体糖化酶的开发研制. 食品与发酵工业，1999，25（2）：43~46
- 6 艾桂萍，徐建平，李铮铮等. 酶保护剂对提高酶稳定性的作用. 现代检验医学杂志，2003，18（3）：18~19
- 7 周理红，许梓荣. 酶的失活机理及稳定化技术. 浙江畜牧兽医，2004（6）：7~8
- 8 程启芬. 饲用酶及处理方法. 粮食与饲料工业，1997（2）：22~23
- 9 肖瑞卿，林武存. 木瓜酶液配制后保存与使用时间的观察. 重庆医学，1998，27（4）：247~248
- 10 何建铨，章序文，李育炜. 膜分离在酶精制中应用. 化学世界，2002（s1）：196~198
- 11 程启芬. 制粒后液体酶添加系统. 饲料研究，2002（9）：26~29
- 12 刘亚林，李忠平. 制粒对饲料用微生物和酶制剂活性的影响. 饲料工业，1994，15（11）：15~16
- 13 王泉林，王水明. 制粒对太湖牌饲用复合酶活力的影响. 中国饲料，1994（5）：19
- 14 郑文波，白玉坤，王振来. 影响酶制剂发挥作用的主要因素. 饲料管理，1998，2：12~13

- 15 张红艳, 刘成更, 阎春娟. 液体发酵果胶酶的防腐保藏技术. 广州食品工业科技, 2004 (3): 71~72, 108
- 16 潘力, 林伟铁, 鲍时翔等. 无载体酶稳定化——交联酶晶体. 工业微生物, 1998, 28 (2): 40~43
- 17 张贺迎, 武金霞, 张瑞英等. 稳定剂对糖化酶溶液的保护作用. 河北大学学报 (自然科学版), 2002, 22 (4): 374~377



# 第七章 酶的应用

## 第一节 酶在轻工方面的应用

### 一、酶在纺织品加工中的应用

目前在纺织中应用生物酶的技术范围较广，已在纤维改性，真丝脱胶，原麻（苎麻、亚麻、红麻）脱胶，染整的退浆、精炼、整理和净洗加工，纺织印染的废水处理以及服装的成衣加工等方面有所应用。酶制剂在改进染整加工工艺、节约能耗、减少环境污染、提高产品质量、增加附加值和开发新型原料的产品等方面都具有独特的优势。目前在纺织加工中使用较广泛的酶制剂主要是纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶、果胶酶、脂肪酶、过氧化酶、漆酶、葡萄糖氧化酶 8 类。

#### 1. 纤维素酶在纺织加工中的应用

纤维素酶是催化水解纤维素生成葡萄糖的酶类的总称，是由多组分酶组成的酶系。它能作用于天然或再生纤维素纤维，包括棉纤维、麻纤维、竹纤维、黏胶纤维、铜氨纤维和 Lyocell 纤维等，纤维素酶对织物减量处理后，可去掉织物表面茸毛，使织物光洁、明亮、柔软，打光并减少起球现象。纤维素酶进行仿旧整理是纤维素酶应用最成功、用量最大的领域，它通过对织物纤维表面的剥蚀作用，使织物表面被磨损，染料被剥离，产生水洗石磨的外观，同时基本解决了浮石水洗整理中存在的问题，加工质量好，生产效率高，对环境污染少，可选设备范围广，对织物（缝线、边角和标记）损伤小，织物的柔软性和悬垂性好，设备磨损小，可以对较轻薄的织物进行加工。纤维素酶抛光整理是去除烧毛工序未烧尽的织物（包括针织物、毛巾和服装等）表面的绒毛，达到表面光洁、抗起毛起球的目的，使织物具有柔软、蓬松等独特性能。其原理是纤维素酶对纤维素水解，再配合机械搅拌（冲击）实现整理，由于没有化学处理，既节约能源，又减少了废水污染。

#### 2. 蛋白酶在纺织加工中的应用

蛋白酶是水解肽键的一类酶，蛋白质在蛋白酶的作用下，能迅速水解为肽、肽等，最后成为氨基酸。蛋白酶用来处理毛、丝等蛋白质纤维，对羊毛制品起到抛光作用，光泽度高，低温染色其色泽鲜艳，柔软整理，织物具有手感柔软、滑爽的性能，具有可机洗、抗起球起毛等护理功能，能有效消除有机氯，对人体无伤害，用于丝的脱胶，无损纤维。蛋白酶对羊毛进行处理，可使羊毛获得减量；如果在酶直接处理前对羊毛织物进行氧化预处理，可获得较大减量和毡缩率，从而实现羊毛织物的防毡缩整理；蛋白酶处理羊毛去除 60% 以上的鳞片类脂，亲水性得到明显改善，可使羊毛织物获得低温染色的性能。生丝的酶精炼主要由预处理、酶脱胶、皂炼或合成洗涤剂精炼及链后处理等工序组成，由于蛋白酶对丝胶的水解是一种均相或介于均相和多相之间的水解模式，因而水解反应的效率较高，对丝的损伤小。

#### 3. 淀粉酶在纺织加工中的应用

淀粉酶是水解淀粉和糖原的酶类总称，通常通过淀粉酶催化水解织物上的淀粉浆料，由于淀粉酶的高效性及专一性，酶退浆的退浆率高，退浆快，污染少，产品比酸法、碱法更柔软，且不损伤纤维。淀粉酶的种类很多，根据织物不同，设备组合不同，其工艺流程也不

同。目前所用的退浆方法有浸渍法、堆置法、卷染法、连续洗等。由于淀粉酶退浆机械作用小,水的用量少,可以在低温条件下达到退浆效果,具有鲜明的环保特色。

#### 4. 果胶酶在纺织加工中的应用

果胶酶是分解果胶的多种酶的总称,可用于分解棉纤维中的果胶质,易于蜡质萃取。在纺织中碱性果胶酶主要是用于棉(棉织物、棉麻织物等)精炼的过程,替代碱的精炼工艺。通常通过碱性果胶酶精炼处理来去除纤维解质层中的蜡质(疏水性复合物)、果胶和蛋白质,对次生层进行改性,去除纤维表面的杂质和有色物质,获得均匀染色,提高亲水性能和柔软性能、织物服用性能等。具有对织物无损伤、对人体和环境无伤害、对设备无损坏的优点。

#### 5. 过氧化氢酶在纺织加工中的应用

过氧化氢酶是一种氧化还原酶,可催化分解过氧化氢成为水和氧气,它主要用于漂白工艺后去除残余的双氧水,提高后继染色的性能和质量,并且没有过量的危险。过氧化氢酶也可用于纱线染色机、溢流喷射染色机、绞盘染色机和卷染机等氧漂生物净化处理。

#### 6. 漆酶在纺织加工中的应用

漆酶是一种氧化还原酶,诺和信公司的 Denilit II S 就是通过基因改性的黑曲霉漆酶,可以进行牛仔服装仿旧整理工艺,获得的织物手感厚实,表面光洁、平整,色泽明快、淡雅。

#### 7. 脂肪酶在纺织加工中的应用

脂肪酶是分解天然油脂的酶,其在纺织加工中主要用于绢纺原料的脱脂处理;同时,脂肪酶在羊毛洗毛中是较好的助洗剂,能去除羊毛附生的杂质、脂蜡,使羊毛获得可纺性;对棉织物进行精炼处理,能有效去除棉的脂蜡;对涤纶进行处理,可改善涤纶表面的亲水性。

#### 8. 葡萄糖氧化酶在纺织加工中的应用

葡萄糖氧化酶主要用于织物的漂白整理,用这种酶处理对双氧水的产生非常有效,处理时不需添加双氧水稳定剂,处理后织物手感柔软、丰满。

## 二、酶在造纸工业中的应用

法国巴黎纤维素与制浆造纸研究所专家 Jean-Claude Pommier 对造纸用的原料木材进行分析研究,发现木材原料中含有纤维素、半纤维素和木素,同时也有纤维素酶和半纤维素酶存在。这些酶很容易降解纤维素和半纤维素,然而能使木素降解的酶却很难找到。现在,纤维素酶和半纤维素酶在纸浆漂白、废纸脱墨及精浆技术中已被成功应用。

#### 1. 酶在纸浆漂白中的应用

传统的化学漂白法是采用氯或氯化物对纸浆漂白,含氯漂白的废液含有很多有毒的氯化有机物,如三氯甲烷、各种氯代酚、二噁英等,有致突变、致癌作用,能在生物体内积累,造成生物体系的很多问题,从而对环境和生态造成严重破坏。含氯漂白车间产生的污染物是相当严重和突出的。减少或消除污染的纸浆漂白技术有少氯漂白技术、无元素氯漂白技术(elementalchlorine-free, ECF)和全无氯漂白技术(totallychlorine-free, TCF),如氧脱木素技术、臭氧漂白技术、过氧化氢漂白技术。这些技术需要改变原制浆造纸的工艺流程,并需要相当的资金投入。运用酶可以减少氯、氯化物和其他化学漂白剂的用量,大幅度降低废液中有毒氯化有机物的含量,并可提高纸浆的白度,而且对原工艺流程几乎很少改变,基本上不需要或只需要很少的投资。

(1) 木聚糖酶 20世纪80年代中期开始出现用木聚糖酶去除化学浆中半纤维素的生物漂白方法,从那以后这方面的研究很多,利用木聚糖酶的生物漂白新技术开始成功地应用于工业生产。在使用化学漂白剂之前用木聚糖酶预处理纸浆,可以减少化学漂白剂的用量,结

果降低了漂白废液中有机卤化物、二噁英等的浓度，纸浆的强度性质不变或有所提高，使浆料更易于精磨。浆料是碱性很强、温度较高的体系，所以用作生物漂白剂的木聚糖酶，最好有很强的耐碱耐高温性。这方面的研究逐步进展，采用基因工程与蛋白质工程手段获得性质优良的耐热耐碱木聚糖酶已成为各相关实验室的研究热点，期望不久的将来重组酶会更有效地应用于漂白工艺中。有些研究结果认为用木聚糖酶处理纸浆不宜含有纤维素酶，否则可能会引起纤维素的降解。

(2) 漆酶 纸浆的颜色主要决定于纸浆内的木素，木聚糖酶的作用是通过水解半纤维素以增加木素的溶出，提高化学漂剂的可及性，而非直接作用于木素，所以是起辅助化学漂白的作用，因而木聚糖酶只能起到助漂的作用，不能真正替代化学漂白剂。这样，木聚糖酶生物预漂白并不能完全替代化学漂白，能减少污染却不能最终消除污染，因此要从根本上消除有毒含氯漂白废液的污染，就要完全采用生物手段除去纸浆中残留的木素。能够直接进攻木素的主要氧化酶有3种，即木素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶。在这3种酶中，漆酶被认为是在纸浆漂白工业中最具有应用前景的酶。

早期的研究结果认为，漆酶的氧化还原电位较低，不能氧化降解木素中占主要成分的非酚木素结构。漆酶能够氧化非酚型的木素模型化合物，从而吸引了许多科学家研究漆酶对纸浆的生物漂白作用。漆酶介体系统(laccase-mediator-system, LMS)对纸浆进行适当时间的处理，可引起卡伯值大幅下降。用漆酶介体系统可以与其他任何漂白过程相配合。已经证明漆酶催化的氧化反应需要氧作催化反应的中间物。在漆酶介体脱木素过程中存在一个氧化还原循环，即漆酶氧化介体形成小分子化合物自由基，并扩散到纸浆中，然后与纸浆中的木素反应使之降解。漆酶介体系统目前还处在试验研究阶段，但已呈现出在纸浆生物漂白和提高纸浆漂白质量等方面的诱人前景。木素的结构非常复杂，并且在纸浆中木素与木聚糖形成复合体紧密地附着在纤维上，难以除去。仅依赖于一种酶的作用可能还不够，利用木聚糖酶与木素酶等的共同作用有望完全降解掉纸浆中残留的木素，实现真正意义上的生物漂白。

(3) 半纤维素酶 国外利用半纤维素酶作为纸浆漂白助剂已试验成功。如果把原始的未漂纸浆，特别是硬木浆，进行酶处理后再施加基本的漂白程序，纸浆就会获得更好的漂白结果。首先把优化半纤维素酶与未漂纸浆混合均匀，在pH4.8、温度在50℃的条件下反应30min后，再进行氯化、碱处理、次氯酸盐和二氧化氯四段漂白过程。这种漂白过程与未经酶处理的漂白过程相比，纸浆白度可提高1.1度。当白度相同时，可节省氯用量的84%。目前由于半纤维素酶的制造过程还很复杂，酶的价格还很高，经酶处理后的漂白浆所节省的化学药品不能补偿半纤维素酶的价格，因此，半纤维素酶在纸浆漂白过程中还不能应用。人们正期待着廉价的半纤维素酶研究成功，使漂白过程简化，污染更少。

(4) 纤维素酶 纤维素酶主要用于废纸脱墨过程和精浆过程中，日本一公司已获得这两项技术的专利。在废纸脱墨之前，首先用纤维素酶处理，脱墨效果有明显的提高。例如，在每吨废纸浆中使用1kg纤维素酶，在50℃的温度下处理2h，或者在每吨废纸浆中使用5kg纤维素酶，在室温下处理5h，然后再进行一般的脱墨程序，与未经酶处理的废纸浆相比，白度可增加8度。

将纤维素酶和纤维素二糖混合起来作为精浆过程的添加剂，现已在许多纸厂使用。用酶处理后的纸浆可提高打浆度20%~30%。实践证明，这一过程在盘磨打浆机中的效果最佳。还有一些纸厂根本不经过精浆过程，只需把纤维素酶和纸浆混合，搅拌均匀，并严格控制酶的质量、纸浆浓度、温度以及pH值，就可以达到精浆的效果。例如，把0.1%~0.2%的纤维素酶加入到纸浆中，控制温度在40~50℃、pH5~7的范围内，处理30min~1h之后，

纸浆的滤水性可增加 20%~35%。可使纸机车速增加, 废纸纤维用量的比率加大, 还能使纸张的强度、抗撕裂度等物理性能得到改进。

## 2. 处理造纸废水中有机氯化物的酶类

在传统的化学漂白废液中含有很多有毒的氯化有机物。辣根过氧化物酶能处理多种酚和芳香胺, 并可使含酚废水脱色; 酪氨酸酶对废水中氯酚的去除也相当有效; 木素过氧化物酶也能催化有机氯化物的脱氯。漆酶能氧化多种生物起源或人工合成的酚类和芳香胺类化合物, 漆酶与过氧化物酶相比, 具有以下几个优点: 过氧化物酶作用时需要  $H_2O_2$  存在, 而漆酶不需要; 非常稳定; 催化有机氯化物脱氯更为有效。漆酶的催化能力要优于木素过氧化物酶。

## 3. 酶在改善纤维性质方面的作用

用木聚糖酶处理漂白后的纸浆, 然后用电子显微镜检查, 结果显示纤维的外部发生细纤维化, 纤维柔韧性增加表明纤维内部也有细纤维化。研究还显示木聚糖酶处理漂白后的纸浆, 纤维膨胀的保水值有相当增加。打浆性能提高, 打浆时间减少, 能耗减少, 与此同时纸浆强度性质未变。用酶处理回收纸浆能够增加游离度, 在条件适宜的情况下, 这样处理没有明显的产出减少和纤维张力强度性质的不良改变。但这种处理必须很好地掌握酶的浓度和处理时间, 因为只需要酶去除纤维表面的某些成分, 而过分作用会引起诸如滤水能力下降等负面效果。被用于这方面研究的酶有木聚糖酶、半纤维素酶、纤维素酶, 其中木聚糖酶通过有选择地去除木聚糖还能增加黏度。

## 4. 酶法脱墨

回收的废纸采用酶法脱墨, 是一种有效和经济的方法, 可以减轻化学方法脱墨带来的环境污染, 已经应用于工业生产中。回收纸浆的滤水性能比初次纸浆差, 酶法脱墨的又一长处是可以提高回收纸浆的滤水能力。与化学脱墨法相比, 酶法脱墨后的纸浆具有很好的物理性能、高白度、高自由度和低残留墨等优点。这类专利中所提到过的酶有纤维素酶(特别是碱性纤维素酶)、半纤维素酶、酯酶、脂肪酶、果胶酶和漆酶, 研究最多的是纤维素酶和半纤维素酶。

## 5. 酶法除树脂

木片或纸浆中的树脂含有脂肪酸、树脂酸、甾醇、脂肪酸甘油酯、其他脂质和蜡类等, 可造成树脂黏附, 导致停机与纸的质量下降等问题。用不同的酯酶去除树脂非常有效, 不仅可以解决上述问题, 还可以提高纸浆和纸的质量、减少化学漂白剂的消耗、减低废水负荷以及节省存放木材的空间和投资。这个方法已经在商业上取得应用。

## 6. 用酶去除腐浆

造纸过程还会由于生长微生物而分泌出一些黏液, 沉积在造纸机上形成一层生物膜, 对造纸机产生比较严重的影响。解决这个问题应先了解产生黏液的微生物或黏液的成分, 然后用适当的酶或酶组合来处理。例如, 在造纸机循环水中生长的微生物芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和假单胞菌 (*Pseudomonas*), 能分泌果聚糖 ( $\beta$ -2,6-键连接而成的果糖高聚物) 形成黏液膜。用能水解果聚糖的酶可以将聚合物降解成水溶性的低聚物, 这样就可以去除黏液。

## 7. 用酶去除纤维束浆块

在制浆过程中没有完全分散的纤维束将形成浆块。漂白硫酸盐浆最重要的质量指标之一就是纤维束数量。一种名为 Shivex 的酶制剂配方(有些含有木聚糖酶)可用于提高去除纤维束的效率, 在去除纤维束的同时还能增加纸浆漂白的效率。

## 8. 酶用于去皮

高质量的机械浆或化学浆需要完全去皮, 因为即使少量的树皮残留也会造成产品颜色变

暗。去皮要消耗大量能量，而且导致原材料的损失。树皮以及形成层中果胶含量比较高，还含有半纤维素，因此果胶酶显得特别重要。另外，木聚糖酶可能也有重要作用。运用能水解果胶的酶预处理后再进行去皮，能耗下降 80%。但酶应用在该工序中最大的问题是酶对形成层的渗透困难。

#### 9. 酶法浸渍

微生物产生的酶可用于降解草木类（如亚麻、大麻等）植物中的连接物质，从纤维束中释放出纤维酶法浸渍比传统方法快、易于控制并且难闻气味少。果胶酶被认为在该过程中起着重要的作用，木聚糖酶、纤维素酶和半纤维素酶等多糖酶也可能参与该过程。对于森林资源贫乏的国家，酶法浸渍的研究应用更有意义。

#### 10. 用酶可避免粘辊

近年来，像桉树等热带硬木用于制浆的量在增加，这些树种生长快，因而木片来源丰富。但热带硬木的导管分子大而且硬，正常打浆难以使之细纤维化，结果印刷时暴露在纸张表面的导管被撕裂，纸张就出现破孔，这就使热带硬木纸浆的应用价值降低。增加打浆时间可增加浆料的细纤维化程度和柔软性，但浆的滤水性能变差。一项专利说明，一种商用纤维素酶可改善硬木导管的柔软度，酶处理后粘辊概率降低 85%，同时浆的滤水性能提高，纸页平滑度、抗张强度得到改善。

### 三、酶制剂在制革中的应用

随着生活水平的提高，人们对皮革制品的质量性能和卫生性能提出了更高的标准：要求皮革制品有较高的柔软度、丰满性和弹性以及良好的手感，并且要尽量保证皮革天然的外观；对人类和环境无毒无害，而制革用的酶制剂本身无毒；同时也能提高产品的质量。因此近年来酶制剂已是制革者首选材料之一。

酶在制革中的应用最早主要是酶脱毛和软化两方面，随着酶制剂工业的发展，其使用已经远远超过此范围。酶在鞣制准备工段的各主要工序都被应用，成为高档皮革生产过程中不可缺少的材料。酶在准备工段中主要作用概括如下：除去革内对制革无用之物、松散胶原纤维。因此准备工段中各工序的处理对象主要是各种蛋白质和脂肪等。由于酶具有高效性和专一性的特点，因此可以根据各工序的需要，有针对性地使用酶制剂，在较小用量下达到理想效果，减少有害物质的使用，缩短处理时间，提高成革质量。目前制革常用的酶制剂主要是酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶，在不同的工序根据不同的要求使用一种酶或某两种酶协同使用，可以达到预期的效果。

(1) 浸水 浸水是制革工段的第一步操作，浸水酶依靠作用于纤维间固化的脂肪与非胶原蛋白来缩短浸水时间，这些蛋白质有时覆盖于皮的外表面，使胶原纤维与水较难结合。酶用于浸水旨在广泛的反应而不是专一的反应，如蛋白酶可同时使皮胶原降解和去除纤维间的蛋白质，使皮充水容易，因此根本目的是使生皮恢复到鲜皮状态。在传统的浸水工艺中，为了缩短周期经常使用一些酸、碱、盐和表面活性剂作为浸水助剂，单靠这些产品进行生皮的回湿比较困难，并且这些材料本身会给环境带来一定的污染，对成革的质量也有一定的影响。为了避免这些问题，近年来在浸水中加入酶制剂已经相当普遍。浸水工序使用的酶制剂主要是细菌和霉菌蛋白酶，也有用胰酶和糖酶的，还可以使用脂肪酶。这些酶作用于纤维间质等非胶原成分，有效地水解、除去皮内白蛋白、球蛋白和蛋白多糖等，降低纤维的黏结性，促进水的渗透，使浸水过程快速均匀。更重要的作用是有利于胶原纤维的松散，增强成革的柔软度和丰满度。

(2) 脱毛 制革工业目前基本采用灰碱法脱毛，但是排除的脱毛废液含有高浓度的硫化

物, 严重污染环境, 而用酶法代替灰碱法脱毛便可彻底消除硫化物的污染。20 世纪 80 年代中国许多制革厂开始对酶脱毛进行研究和应用。目前应用于脱毛工艺的酶主要是 1398、2709、3942、166 和 209 等中性蛋白酶, 其中 166 和 209 在酶脱毛工艺中用得较多。酶法脱毛与硫化物脱毛相比, 化学需氧量 (COD) 可减少 60%, 硫化物可减少 70%。但是传统工艺采用的蛋白酶质量不稳定, 其纯度不高、专一性差、酶系组分多、作用复杂, 脱毛时容易造成脱毛不净或烂面、松面等问题。虽然酶脱毛的应用已经做过大量的研究, 但仍有其不足未能解决, 如酶用量大、时间长、胶原蛋白损失大、成革空松、革粒面伤害明显。尽管存在这些缺点, 但是从环保长远考虑, 酶脱毛的应用意义重大。现代工艺一般采用酶-碱结合脱毛、少量碱加酶脱毛工艺。

(3) 浸灰、复灰 酶制剂在浸灰、复灰中的应用是作为一种助剂存在的。制革中浸灰、复灰的主要作用是分离和松散胶原纤维。酶制剂在浸灰、复灰中使用的主要优点是促进胶原纤维的分离和松散、消除皱纹、清洁粒面、减少硫化钠用量, 减少污染、改善成革的柔软度和强度, 可明显提高得革率。由于浸灰系统碱性较强, 要求浸灰酶具有较高的耐碱性。

(4) 脱脂 脱脂工艺是准备工段中的另一个步骤, 也可以使用酶制剂。皮中天然油脂含量很高, 尤其是一些绵羊皮, 皮重的 20%~30% 由脂肪组成。脱脂的常规方法是用阴离子表面活性剂或非离子表面活性剂或溶剂。表面活性剂使脱脂在液相进行, 但结果并不能令人满意, 相比起来, 溶剂更为有效, 但需要前期的准备操作增加了成本, 延长了工艺时间并导致了严重的生态问题。

脱脂过程可分为三步: ①破坏含脂囊的蛋白膜; ②去除油脂; ③在水中乳化油脂或将油脂溶解在溶剂中。一旦这三步中任一步操作不当或不充分, 整个脱脂工艺就前功尽弃了。一种酶制剂能成为有效的脱脂剂要经过三步: 蛋白质水解、脂肪水解和乳化。有人用碱性脂肪酶与蛋白酶、胰酶联合使用来改进猪皮的脱脂效果。酶法脱脂主要利用脂肪酶对油脂分子的水解作用, 但是不能像溶剂那样除去各类脂肪。早期的脂肪酶主要是由动物胰脏中提取的或是由不同种类的霉菌发酵制得的, 使用 pH5.0~8.0。用酶制剂脱脂既可单独进行, 也可与浸水、浸灰、软化、浸酸等其他工序同时进行。在软化工序加入脂肪酶, 可与胰酶一起具有协同效应, 使软化效果更好。

(5) 软化 软化是用水解蛋白酶去除胶原以外的蛋白质。酶软化是制革中不可缺少的工序。软化对成革的丰满性、柔软性、弹性、光滑性和手感等方面都有重要的作用。软化的作用就是清除脱毛、浸灰后皮内残留的纤维间质、类脂物、表面分解物、毛球、毛根、小毛、色素、脏污等, 以利于后面的鞣制、染色和修饰, 使胶原纤维适度分离; 利于鞣剂的渗透和结合, 并适度破坏弹性纤维、竖毛肌, 使成革具有柔软、丰满有弹性、粒面光滑的特点。软化用酶制剂主要是胰酶, 还有一些细菌蛋白酶液应用于软化工序中。软化酶的最适 pH8.0 左右, 国内制革者在软化的过程中常用胰酶和 1398 酶同时软化裸皮。

(6) 酶制剂处理废物 所有水解酶包括蛋白酶、糖酶、脂肪酶的混合物, 都可用于制革过程中对肉和废液的处理, 回收诸如脂肪、可作动物食料的蛋白质等, 节省了能源。原料皮在制革过程中有 25% 转变成革, 其余的则作为边角废料被废弃。对这些废料的统一处理办法是利用未用的生皮边制胶, 利用鞣制后的废革屑制造再生革, 价值极低。近年来研究了胶原蛋白酶法降解, 实现生物资源的高值转化, 取得了可喜成绩。

#### 四、酶在洗涤剂工业中的应用

洗涤剂是工业用酶最大的应用领域。加酶洗涤剂去污能力强, 对洗涤品损伤轻, 可降低洗涤温度以及减少水的用量而节约能耗。现在市场上常见的酶洗涤剂通常含有表面活性剂成

分。使用该类产品后，污物受到周围的表面活性剂阻碍而不能与酶进行接触，由此降低了洗涤效能，而含有表面活性剂的废水排放后会污染环境。现在已经开发出含酶的香精油洗涤剂，香精油可以乳化脂肪等污物，使酶与污垢接触反应，使用后香精油挥发因而不会污染水系统。

一般织物上常见的污垢有4种：①血、奶、黏膜分泌的黏液、汗腺分泌物及各种蛋白质食品污垢等；②淀粉质的老化物质及尚未完全糊化的物质；③衣领、袖口等处的人体分泌的脂污垢；④织物经多次洗涤后，被纤维素分子与水形成的凝胶所封闭的浸入棉单纤维结构内部的污垢。这些污垢同时黏附在织物上，单一的加酶洗衣粉无法将上述污垢同时去除。但在合成洗衣粉中添加复合酶就可以较全面地分解各种混合污垢。

现已商品化的洗涤剂用酶有碱性蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、碱性纤维素酶等，最近新开发的酶制剂有甘露聚糖酶、过氧化物酶、虫漆酶和虫胶酶等。其中蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶可分别除去织物上的蛋白质、脂肪、淀粉污垢，如血渍、奶渍、油渍、果汁、巧克力渍、酱油斑渍等。淀粉酶还具有抗反染和抗污垢再沉积的功效；纤维素酶对织物具有护理功效，能够使织物保持原有的光泽和柔顺，加酶洗涤剂出色的洗涤效果使它在整个洗涤制品中产销量比例在不断扩大；脂肪酶的去污能力只有经过多次洗涤才能发挥出来，有时虽经过多次循环洗涤，仍不能使顽固的油渍污垢明显清除，因此，目前它的应用还受到限制。

(1) 蛋白质分解酶 蛋白质分解酶是最早被利用的酶制剂，至今为止，其用量在洗涤剂用酶制剂中仍然是最大的。蛋白质分解酶可以分解来自人体的角质层、血渍以及来自各种食物的多种多样的蛋白质。蛋白质分解酶将这些蛋白质分解而低分子化后，再促使其与其他污垢同时去除。此外，蛋白质还能起到黏结剂的作用，将依附在纤维上的无机粒子、皮脂之类的污垢黏结起来。在蛋白质分解酶将这些蛋白质分解的同时，依附其上的污垢也随之脱落下来。蛋白质分解酶还有防止洗涤水中游离蛋白质污垢向衣料再沉积，以及有将依附在衣料上的细菌溶解的效果。

(2) 脂肪酶 脂肪酶能将来自皮脂或食品中的脂质污垢中含有的甘油三酯分解成甘油单酯和脂肪酸，甘油单酯和脂肪酸易被表面活性剂乳化，即可方便地去除。脂肪酶还具有抑制甘油三酯对疏水性纤维的再污染。脂肪酶耐碱性和耐表面活性剂的性能良好，适应于各种各样的基质。但是，其效果难以在一次洗涤后即显示出来，必须反复多次洗涤才能发挥出应有的效果。其原因是因为脂肪酶对甘油三酯的分解作用主要是在洗涤以后的干燥过程中完成的（纤维的含水量越低脂肪酶的活性越高）。所以，分解产物必须在下一次洗涤时，才能从纤维上去除。近年来，出现了一些反应性更好、对油污吸附性更强的改良脂肪酶，这种脂肪酶在初次的洗涤过程中即能获得明显的效果。

(3) 淀粉酶 淀粉酶应用于餐具或衣料用洗涤剂中，淀粉酶能分解淀粉类污垢，使之降解后达到去除的目的，淀粉酶还能防止降解后的低分子淀粉的再污染以及防止存在于淀粉间的铁锈之类粒子的再沉积。 $\alpha$ -淀粉酶能将淀粉分子内的 $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷进行随机分解，最适宜pH6~7，最适宜的使用温度为75~80℃。因此，在高温下进行洗涤的自动餐具清洗机用的洗涤剂中，多添加有此种酶。最近，在一些手洗型餐具洗涤剂中也添加有淀粉酶。近年来，欧美的衣料用洗涤剂中，也开始推广使用淀粉酶。而以低温洗涤为中心的日本等地区尚未推广使用淀粉酶。在衣料用洗涤剂中使用的淀粉酶必须是在高碱性、低温介质中才能充分保持活性。最近此类酶的开发工作正在积极进行之中。

(4) 纤维素酶 纤维素酶是针对以棉纤维为主要对象的酶，按作用机制可分为葡聚糖酶和纤维素水解酶。前者能将纤维素分子链上的 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷基团随机分解。后者能将纤维素分子链从末端开始分解为纤维素二糖小分子单元。现在用于洗涤剂的纤维素酶几乎都是葡

聚糖酶。而将几种不同的葡聚糖酶与纤维素水解酶复配后的混合物也有销售。

## 第二节 酶在食品方面的应用

就现有情况来看,酶制剂已经在天然食品添加剂生产中占有一定的优势。酶技术已广泛应用于食品行业的各个领域,如制糖工业、酿造工业、焙烤工业以及水果蔬菜加工等方方面面。应用于食品工业的酶制剂主要有淀粉酶、糖化酶(又称淀粉葡萄糖苷酶)、蛋白酶、葡萄糖异构酶、果胶酶、脂肪酶、纤维素酶、葡萄糖氧化酶等。由于酶催化效率高、作用专一的特性,通过合理开发和应用酶技术可以提高产品深加工的程度、提高生产效率和产品质量,获得良好的经济效益。用于食品方面的酶的种类及应用范围见表7-1。酶制剂用于食品加工生产中可以改善食品的风味和品质,也可用于对原料进行深加工,改进食品的加工工艺,提高产品质量。当前,随着食品工业发展水平的提高,食品酶制剂越来越显示出其重要作用,大有发展前景。

表 7-1 应用于食品方面的酶的种类及应用范围

酶	应用范围	酶	应用范围
淀粉酶	葡萄糖浆生产、酿造、水果加工、焙烤	果胶酶	水果加工
纤维素酶	水果加工、香精生产	磷脂酶 A2	蛋黄酱生产、乳化剂生产、食用油生产
葡聚糖酶	酿造、小麦加工	蛋白酶	焙烤、酿造、蛋白质加工
乳糖酶	牛奶加工	木聚糖酶	小麦加工、焙烤
脂肪酶	香精生产、酶改性奶酪、脂肪改性、乳化剂合成		

酶制剂作为食品添加剂的一种,广泛用于食品加工中,其安全问题不能不让人感到忧虑。在中国每年食物中毒报告就有2万~4万人,但专家估计这个数字可能尚不到实际发生率的1/10,也就是说中国每年食物中毒例数至少在20万~40万人。美国与欧盟之间发生的含激素肉牛的贸易争端等事件,说明再也不能将酶制剂来源安全性的评估和食品安全问题等闲视之了。1999年5月欧盟规定食品工业用酶的选择必须考虑几个原则,这些原则包括安全性、法规容许、成本、来源稳定性、纯度、专一性、催化反应能力以及在加工过程中保持稳定等。

### 一、在食品原料生产中的应用

酶在食品工业中的最大用途是生产加工食品的原料,利用酶来加工生产原料主要集中在以下几个方面。

(1) 淀粉的加工 通过不同的淀粉酶分解淀粉,可以生产出饴糖、麦芽糊精、麦芽糖浆(三糖、四糖)、高麦芽糖浆(麦芽糖达60%)、麦芽糖、麦芽糖醇、果糖和低聚糖等甜味剂,分别用于糖果、冰淇淋、饮料等各类食品的加工。

(2) 甜味剂原料的加工 用橙皮苷酶和橙皮苷反应可以生产橙皮素-F-葡萄糖苷二氢查耳酮,这是一种对人体安全的甜味剂,其甜度为蔗糖的70~100倍。在日本,利用蛋白酶生产天冬甜素,这是一种非糖高甜度甜味剂,已广泛用于各类食品的生产。

(3) 水解动物蛋白粉的原料加工 利用明胶、干酪素、鱼粉等这些动物产品加工的副产品,经调浆后用蛋白酶水解,再经灭酶、脱色杀菌、真空浓缩及喷雾干燥等处理可以制得水解动物蛋白粉。这种动物蛋白粉具有优异的保水性、乳化性,不易产生沉淀;有良好的抗氧化性,对易变质食物起保护稳定作用;具有良好的表面活性、溶解性、润滑性,能有效改善调整食品的风味和结构品质;极易被人体吸收利用,促进细胞生长,改善人体多种功能,促

进儿童生长发育。水解动物蛋白粉可以作为添加剂用在火腿和香肠等肉制品、果奶饮料、味精、保健食品、乳品等食品中，用以增强食品风味，提高制品营养价值，使食品稳定性增加，延长保质期。

(4) 水解植物蛋白达到蛋白质改性 作为生产淀粉副产品的面筋蛋白，由于含有较多的疏水性氨基酸，分子内疏水作用区域较大，功能性较差，限制了面筋在食品中的应用范围。利用中性蛋白酶水解小麦面筋蛋白，生产出的水解面筋蛋白乳化性、溶解性、起泡性等特性大大提高，可以作为品质改良剂用在焙烤食品、灌肠等食品的生产中。除了小麦面筋蛋白以外，其他植物蛋白，如大豆蛋白、玉米蛋白等都可以通过酶处理的方法来改善其功能性。大豆蛋白酶改性，对于提高大豆蛋白质的溶解性具有特殊重要性。玉米蛋白是一种贮存蛋白，在 pH2~5 之间具有很高的不溶性，当用胰蛋白酶水解处理使 11.9% 的肽键断裂时，在同样的 pH 值范围内，溶解度可达 30%~50%。燕麦粉经 Alcalase 或 Neutrase 酶处理，在等电点 (pH5.1) 条件下溶解度提高 3~4 倍。

## 二、直接参与食品的生产过程

酶在食品工业中除广泛应用于食品原料加工外，一些酶制剂可直接参与食品的生产过程，直接用于生产某些食品。

### (一) 啤酒酿造

啤酒的酿制，传统工艺采用麦芽、大米和酒花经发酵而成。酿制啤酒实质上是靠酶的作用，是麦芽中的多种内源酶将酿制用的原辅料分解成可发酵糖、糊精、氨基酸和肽等。不难看出如将麦芽内源酶换成外源酶，而加入酶制剂来取代麦芽中部分内源酶，便可以用大麦等谷物代替部分麦芽，同样可将原辅料淀粉和蛋白质分解，以便达到节省麦芽、提高辅料用量和降低成本的目的，并将有助于啤酒质量的稳定。啤酒生产也受到麦芽的糖化力、麦汁的黏度和发酵度等因素不同程度的制约。为了降低生产成本、提高产量和稳定品质，在啤酒酿造中采用提高辅料比和外加酶制剂相结合的生产新工艺，正日益受到世界各国啤酒行业的重视。酶制剂在啤酒酿造过程中的主要作用有如下几方面。

(1) 提高辅料比 麦芽中的  $\alpha$ -淀粉酶可以糖化 3 倍麦芽的淀粉原料，而所含  $\alpha$ -淀粉酶除用于糖化麦芽本身的淀粉外已所剩无几。因此，当辅料的比提高 30% 以上时，由于未发芽谷类辅料所含酶的数量较少，仅仅靠麦芽本身的酶是不够的。糖化过程中外加淀粉水解酶类和复合酶，能够促进辅料中淀粉、蛋白质等的水解，获得合理的麦汁组成，有助于提高辅料比，降低生产成本。据报道，啤酒酿造中添加甘薯  $\alpha$ -淀粉酶，可将辅料提高到 50% 左右，而对啤酒的质量无影响。

(2) 生产代用麦汁 使用耐高温  $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、普鲁兰酶和蛋白酶制取的啤酒麦芽糖浆和功能性低聚糖浆代替原辅料，这是啤酒生产上利用酶制剂缓解糖化能力不足、提高啤酒产量的一项新举措。

### (3) 改善麦汁质量

① 加快过滤速率 谷物原料中含有较多量的多糖，如  $\beta$ -葡聚糖、戊聚糖等，这些成分有胶体的性质，如果在糖化过程中没有足够的酶起作用，往往使得麦汁的收得率低，同时还产生过滤困难、啤酒澄清度差等问题。通过使用  $\beta$ -葡聚糖酶、半纤维素酶，降解谷物原料中的胚乳细胞壁，使得淀粉粒呈松散状态，则可显著改善麦汁过滤性能，利于啤酒酿造。

② 提高发酵度 麦汁制备时添加高转化率的液体糖化酶、 $\alpha$ -淀粉酶、真菌淀粉酶、啤酒复合酶等，可增加麦汁中糖/非糖的比例，从而生产发酵度控制在 75% 左右的干啤酒。

③ 提供足够的  $\alpha$ -氨基氮  $\alpha$ -氨基氮是酵母进行发酵的主要氮源，但在使用质量差的麦

芽或辅料超过 30% 时, 常会导致麦汁的  $\alpha$ -氨基氮达不到 185~200mg/L 的最佳范围。蛋白酶能将高分子蛋白质分解成中低分子的蛋白质、氨基酸和肽, 不仅为酵母正常发酵提供  $\alpha$ -氨基氮, 而且对啤酒的泡沫特性、风味以及非生物稳定性有十分重要的作用。

#### (4) 提高啤酒品质

① 降低麦汁色泽 外加酶可以缩短糖化时间, 减少麦皮中色素、单宁等不良杂质在糖化过程中浸出, 从而降低麦汁色泽, 有利于生产淡爽型啤酒。

② 促进啤酒风味成熟 啤酒中双乙酰是啤酒成熟的主要指标。双乙酰的形成途径为: 糖类、丙酮酸- $\alpha$ -乙酰乳酸-双乙酰, 乙酰乳酸脱羧酶可调节双乙酰前体物质走支路代谢途径直接分解成乙偶姻, 进而转化成 2,3-丁二醇, 使双乙酰在啤酒中含量大大降低, 从而保证啤酒的风味质量。

③ 提高啤酒的非生物稳定性 啤酒中的多酚、多肽及二价金属离子等由低分子量向高分子量缩聚, 可引起啤酒的浑浊。其中, 多酚的聚合为主要原因, 这种现象主要形成于发酵后期阶段。添加蛋白酶可以分解蛋白质或改变其电性, 使之不与多酚物质结合, 有效地防止了冷浑浊, 从而提高了啤酒的非生物稳定性。

④ 防止啤酒风味老化 啤酒的风味物质主要是高级醇、酮类、醛类、双乙酰等酵母代谢副产物, 而影响啤酒风味的主要物质是含羧基、醛基、硫基化合物及烯醇等, 这些物质又极易氧化, 改变它们原有的性质, 使啤酒失去新鲜味而产生不愉快的苦涩味、老化味及其他异味。啤酒生产中常加入葡萄糖氧化酶, 使氧与瓶颈中的葡萄糖生成葡萄糖酸内酯而消耗溶解氧, 可起到除氧和抑菌的作用, 从而保持风味不发生变化。合理使用葡萄糖氧化酶可以有效防止啤酒的老化、变质, 保持啤酒特有的色、香、味。

⑤ 消除杂菌污染 在啤酒生产过程中, 防止杂菌污染十分重要。杂菌中以占 66% 的乳酸杆菌为主, 可采用高效溶菌酶有效抑杀有害杂菌。溶菌酶是一种催化革兰阳性菌细胞壁中肽多糖水解的酶, 破坏细菌的细胞壁, 使细胞溶解死亡, 在纯生啤酒生产中效果良好。

## (二) 焙烤食品

酶制剂可以改良小麦面粉的质量, 增强面粉的发酵能力, 提高焙烤制品的品质, 健康安全, 因而越来越受到众多的食品科学工作者和消费者的关注。焙烤食品时, 在面团中添加淀粉酶、蛋白酶、转化酶、脂肪酶等, 可使发酵的面团气孔细而均匀, 体积大、弹性好, 色泽佳。用纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶的混合物处理柑橘瓣, 可脱去囊衣, 得到质量上乘的橘子罐头。用蛋白酶处理废弃蛋白如碎肉、动物血、杂鱼等, 可以得到含蛋白质和维生素高的有机蛋白产品。现在已有人用枯草杆菌中性蛋白酶和风味酶联合水解珍珠养殖场开珠后的废弃物马氏珍珠贝肉, 研制出富含牛磺酸的珍珠贝肉营养液。日本日清制油公司应用脂肪酶水解食用油得到富含中链脂肪酸的油脂。最近中国也研究出一种脂肪酶, 可将食用油降解, 防止原来食用油中的主要成分甘油三酯在人体内的积累, 这项用生物酶处理食用油的新技术消除了人们因吃烹调食物过多而导致肥胖和心脑血管疾病的顾虑。目前这项新技术已开始应用于食品油的生产。

酶制剂如麦芽糖淀粉酶和  $\alpha$ -淀粉酶应用于焙烤食品的历史, 在国外可追溯到几十年前, 随着焙烤行业的迅猛发展, 人民生活水平的不断提高, 消费者对产品品种多样化和健康安全提出了更高的要求。当人们发现溴酸钾有致癌的可能性时, 许多国家都禁止了使用, 于是人们便转而寻求一种安全无毒的替代品。酶作为生物大分子物质属于食品助剂, 只要适量使用, 一般不考虑其毒性。因此, 酶制剂在烘焙制品中所起的作用由此突现出来。现代生物技术的日新月异, 催生了应用于焙烤行业的一系列酶制剂, 如具有独特抗老化性能的麦芽糖淀粉酶, 强化面筋的葡萄糖氧化酶和脂肪酶, 软化面筋的蛋白酶以及乳糖酶等, 这几种酶制剂

在食品焙烤中各具特色，发挥出独特的效用。欧洲各国目前使用的酶制剂主要包括脂肪氧化酶、葡萄糖氧化酶等。日本目前使用的酶有真菌淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶和半纤维素酶。不同的酶催化作用和机理不同，现将焙烤中常用的酶制剂分别介绍如下。

### 1. 葡萄糖氧化酶

众所周知，溴酸钾是一种作用缓慢的氧化剂，且在高温下起作用，维生素 C 或其他氧化剂则是中速或快速氧化剂。随着食品工业向天然健康安全方向发展，除维生素 C 外，该类化学品的使用都将会受到质疑。迄今为止，欧盟、英国等多个国家和中国台湾地区禁止在焙烤食品烘焙过程中添加溴酸钾。寻找一种有效的替代品为当务之急，人们将目光转向了氧化酶，于是具有独特效应的葡萄糖氧化酶应运而生，它是常用的面团氧化剂溴酸钾的替代品。面筋蛋白质由麦谷蛋白和麦醇蛋白组成，面筋蛋白中的半胱氨酸是面筋的空间结构和面团形成的关键。蛋白质分子间的作用取决于二硫键（—S—S—）的数目和大小。二硫键可在分子内形成（麦醇蛋白），也可在分子间形成（麦谷蛋白）。葡萄糖氧化酶在氧气存在的条件下能将葡萄糖转化为葡萄糖醛酸，同时产生过氧化氢（ $H_2O_2$ ）。过氧化氢是一种很强的氧化剂，能够将面筋分子中的巯基（—SH）氧化为二硫键（—S—S—），从而增强面筋的强度。一般情况下，面团中有许多暴露的—SH 基，这些巯基（—SH）很容易氧化。据报道，在葡萄糖氧化酶的作用下，面粉或面团水溶性部分的—SH 含量明显下降。葡萄糖氧化酶能显著地改善面粉的粉质特性，延长稳定时间，减小软化度，提高评价值，改善面粉的拉伸特性，增大抗拉伸阻力，改善面粉的糊化特性，提高最大黏度，降低破损值，结果就可形成更耐搅拌、干而不黏的面团。

此外， $H_2O_2$  作用于两个相邻的阿拉伯木聚糖残基而产生偶联导致氧化凝胶作用，同时葡萄糖氧化酶还可改善面团的流变学特性及面团中气泡的表面张力，提高了面团强度，强化了面筋，生成了更强、更具有弹性的面团，对机械冲力有更强的承受力，更好的人炉急胀特性以及更大的焙烤食品体积，起到改善面粉质量的作用。葡萄糖氧化酶有两种形式：葡萄糖氧化酶 500MG 和葡萄糖氧化酶 BG。葡萄糖氧化酶易与面粉混合，可先做 1:10 的预混，再进一步混合。葡萄糖氧化酶在广泛的温度范围内都具有活性，在 pH3.5~7.0 范围内活性稳定。在冷藏条件下（5℃）葡萄糖氧化酶标示活力至少 1 年，用量为 0.25~7.0g/100kg 面粉；对于某些面筋较弱的小麦面粉，如大部分国产小麦，其作用更为明显。例如，葡萄糖氧化酶添加量为 50mg/kg，强筋面粉（特一粉）的拉伸阻力和能量平均比对照增加了 23.3% 和 16.2%；面筋粉（富强粉）的拉伸阻力和能量平均比对照增加了 107.7% 和 87.1%。注意防止过量增加，过量会导致面筋过强而变脆。

使用半纤维素酶有时会使面团发黏，这是由于结合水被释放出来，因此半纤维素酶常和葡萄糖氧化酶一起使用，这种组合可替代有些焙烤食品中的乳化剂。在有些应用中，添加巯基氧化酶能增加葡萄糖氧化酶的作用。巯基氧化酶能够特异性地氧化面团中的自由巯基基团，葡萄糖氧化酶和巯基氧化酶具有协同效应。葡萄糖氧化酶对添加部分新小麦制得的面粉有良好的促进后熟作用，且添加量只需 4~5mg/kg 即可。

### 2. $\alpha$ -淀粉酶

在焙烤的制作过程中，面团发酵时，酵母需要足够的糖源作为营养物质。而在面粉中仅有 1%~1.5% 的单糖、双糖及少量的可溶性糊精在面团发酵时可供酵母利用，它不能满足酵母正常繁殖的需要。在面团中，大多数淀粉以结晶状态存在，淀粉酶不能分解天然状态的淀粉。然而，在制粉过程中，一部分淀粉颗粒被破坏，这样淀粉酶就能分解这些破损的淀粉颗粒。在面团中，淀粉酶能内切直链淀粉成糊精，而糊精又在淀粉内生酶的作用下降解成麦芽糖。酵母利用这些糖源及其他营养物质，在氧气的参与下进行旺盛的繁殖，产生大量的

CO<sub>2</sub> 气体和其他物质，从而使焙烤食品体积增大，由于糊精的存在使焙烤食品纹理疏松。另外， $\alpha$ -淀粉酶可改变胶体淀粉的胶性，软化胶体，使焙烤食品内的各个小气室弹性增加并胀大，从而增加焙烤食品体积，使焙烤食品体积和比容达到正常标准，改善内部组织的柔软程度，内部质构和组织均匀细腻，并减缓淀粉的老化，保持焙烤食品的柔软时间，改善焙烤食品颜色及其风味。

焙烤生产中常用的  $\alpha$ -淀粉酶有细菌  $\alpha$ -淀粉酶、真菌  $\alpha$ -淀粉酶、发芽的小麦粉或大麦粉。实验结果表明，对国产小麦面粉，加细菌  $\alpha$ -淀粉酶的焙烤食品在 6 天内基本不硬化；加真菌  $\alpha$ -淀粉酶的焙烤食品以中等速率硬化；加发芽大麦粉的焙烤食品与未加  $\alpha$ -淀粉酶的对照焙烤食品以基本相同的速率硬化。 $\alpha$ -淀粉酶可有效延缓焙烤食品老化，然而，即使是高含量地添加，也不能完全抑制焙烤食品的老化过程。不同来源的  $\alpha$ -淀粉酶抗焙烤食品老化效果明显不同。添加发芽大麦粉的焙烤食品不含低分子量糊精，不能延缓焙烤食品老化，而添加真菌或细菌  $\alpha$ -淀粉酶的焙烤食品含有低分子量糊精，具有抗老化作用，这表明低分子量糊精真正具有抗老化作用。

### 3. 麦芽糖淀粉酶

美国每年焙烤食品总产量的 3%~5% 由于保鲜问题而被销毁，造成相当于 10 亿美元的经济损失。这主要是由于焙烤食品的老化即淀粉的回生引起的，为此人们不断研究各种添加剂以延长焙烤食品的货架寿命，降低经济损失。而麦芽糖淀粉酶具有这种独特的抗老化作用，它水解直链和支链淀粉，主要生成  $\alpha$ -麦芽糖和小部分的糊精，从而保持焙烤食品的弹性、松软、新鲜。麦芽糖淀粉酶可用于延长焙烤食品的货架期（抗老化），同时不会导致面团发黏而影响面团的加工性能。在烘焙过程中，作用于面粉中淀粉部分，使其产生小分子量的糊精，防止淀粉和面筋之间的相互作用而产生的老化。

麦芽糖淀粉酶在淀粉糊化温度条件下才表现出高度的活性，而在低于 35℃ 时活性很低。因此，麦芽糖淀粉酶不改变面团的布拉本德特性。麦芽糖淀粉酶耐热性处于真菌  $\alpha$ -淀粉酶和热稳定的细菌  $\alpha$ -淀粉酶之间，在烘焙过程中仍能起作用，而在烘焙的最后阶段被灭活。因此，不会导致淀粉的过度分解。真菌淀粉酶或细菌淀粉酶过量会导致面团发黏，耐热型细菌淀粉酶一旦过量添加，则焙烤食品在烘焙过程中易出现塌裂，而且在贮存过程中焙烤食品心发黏。麦芽糖淀粉酶则减少了这种现象的发生。麦芽糖淀粉酶对于焙烤食品的柔软度和弹性也有一定的影响。根据研究，焙烤食品中淀粉和蛋白质的相互作用是引起焙烤食品失去风味、老化的主要原因。含有麦芽糖淀粉酶的焙烤食品能增加一定量的低分子糖类物质。根据假设，这些小分子的糊精阻碍或干扰了蛋白质的网络和淀粉颗粒之间交叉结合，从而拖延了老化速率。

### 4. 脂肪酶

脂肪酶具有某种防止焙烤食品老化的作用，这早在 1968 年就被报道，但人们并不清楚它在焙烤食品制作中的用途。现研究发现，该酶在面团内有双重作用：一是氧化面粉中的色素使之退色，使焙烤食品内部组织洁白；二是氧化不饱和脂肪酸，使之形成过氧化物，过氧化物可氧化蛋白质分子中的硫氢基团，形成分子内或分子间二硫键，并能诱导蛋白质分子聚合，使蛋白质分子变得更大，从而提高了面团筋力，改善了面筋蛋白的流变学特性，增加面团对过度发酵的耐受性以及入炉急胀能力，从而增大了焙烤食品的体积，改善了焙烤食品心的一致性，增加了焙烤食品心的柔软程度。最近研究发现，脂肪酶还在焙烤食品制作中对面团结构的纹理有着出色的作用，它可改善面团的稳定性和对过度发酵的耐受性，降低面团的黏度，提高入炉急胀性能而使焙烤食品体积增大，改善焙烤食品心结构使其均匀细腻，焙烤食品心更白，更为柔软，与麦芽糖淀粉酶一起使用还有协同效应。

脂肪酶最佳用量为 500~2500U/kg, 可用于不同质量的面粉、不同的烘烤过程中。它的最佳应用则是用于无脂肪配方或仅含油配方, 有非常特殊的增大体积、改善组织结构的作用。有实验证明脂肪酶在添加脂肪或油的配方中的作用, 如当使用了氢化的植物起酥油时, 脂肪酶不会带来更大的效果, 因为起酥油本身会增大焙烤食品的体积, 改善焙烤食品心结构。

与众多酶制剂一样, 脂肪酶的添加量在很大程度上与焙烤食品类型、焙烤食品制作配方相关, 对于某一类型的面粉, 最适添加量由烘焙实验确定。脂肪酶添加过量会导致面团过于僵硬强壮, 从而使焙烤食品体积增幅变小。其原因是该酶增强了面团的网络结构, 所以太高的加量导致太强的面筋。由于大豆中含有丰富的脂肪氧化酶, 因此, 欧美国家在焙烤食品中广泛添加酶活性大豆粉, 用于焙烤食品组织的增白, 提高筋力和弹性。同时, 不饱和脂肪酸被氧化后, 还能增加焙烤食品的香味。

#### 5. 半纤维素酶

面粉中的半纤维素主要为阿拉伯木聚糖, 尽管面粉中的阿拉伯木聚糖含量只有 3%, 但它结合加入其中的水分的 30%。戊糖能结合比本身重 10 倍的水, 因此其自身降解和修饰对其功能影响很大。在内切木聚糖酶的作用下, 面团中的阿拉伯木聚糖会部分水解, 水分就从面团中逐渐释放出来, 结果面团变软, 其机械力就提高了。最终结果是, 在烘焙中, 焙烤食品心形成减缓, 烘烤膨胀使焙烤食品体积增大, 焙烤食品心更松软。内切木聚糖酶的作用因为阿拉伯呋喃糖苷酶而增强, 阿拉伯呋喃糖苷酶能将半纤维素分子的阿拉伯糖支链切断, 使得底物更易被内切木聚糖酶降解。最后, 面团的稳定性和机械性都提高。含半纤维素酶的酶制剂能够解决面粉因添加膳食纤维而带来的问题, 不可溶戊聚糖的存在和粗糙的麸皮颗粒会干涉面筋的网络结构, 半纤维素酶能将非淀粉多糖部分溶解, 从而提高焙烤食品品质。

研究证明可溶性戊聚糖使焙烤食品体积增加, 而不溶性戊聚糖可使焙烤食品体积减少。半纤维素酶可以将不溶性的戊聚糖分解为可溶性的戊聚糖, 使抗延伸阻力下降而延伸性增加, 同时焙烤食品的体积得到改善, 并改善了面团的机械性能和入炉急胀性能, 从而获得较大体积的焙烤食品制品, 改善了食品内部结构及色泽, 提高了产品柔软性及货架期等。木聚糖酶与传统的戊聚糖酶相比, 纯度更高且副作用小, 表现为质量稳定性明显提高, 较低用量即可达到戊聚糖酶同样的效果。小麦中戊聚糖酶过度分解影响到小麦戊聚糖的吸水能力。一旦木聚糖酶、戊聚糖酶添加过量, 面团便发黏。建议用量为 2~16g/100kg 面粉。另外, 木聚糖酶还可与麦芽糖淀粉酶、真菌  $\alpha$ -淀粉酶、脂肪酶、葡萄糖氧化酶等之间相互协同作用, 充分发挥其特殊效果。

#### 6. 蛋白酶 (protease)

正常面粉中蛋白酶活力很低, 但受到虫嗑的小麦粉, 蛋白酶活力很高, 且难以控制。蛋白酶用于焙烤食品制作, 是为了调节面团的物理性质, 改善焙烤食品的品质。蛋白酶加入筋力过强的面粉或需要特别柔韧性、延伸性的面团中, 可使延伸性增大, 和面时间缩短。但使用时必须小心控制, 过量会降低面团持气能力, 添加剂量应以达到理想流变学性质为准。蛋白酶加入可提高氨基酸和肽的水平, 前者是香味化合物的中间产物, 后者则是潜在的氧化剂、风味加强剂、甜味剂和苦味剂。蛋白酶类型会影响到所产生的羧基化合物类型, 适量的添加可提高焙烤食品风味。现在已经开发出了一些特定的胞外蛋白酶, 只水解外端氨基酸, 这样可释放一些亮氨酸和苯丙氨酸, 这两种氨基酸都是焙烤食品芳香味的构成物质。

#### 7. 乳糖酶

乳糖酶可以分解乳糖为葡萄糖和半乳糖。乳粉中的乳糖不能被酵母所利用, 因酵母细胞

中不能分泌出乳糖酶，所以乳糖全部作为剩余糖存在于面团中。由于乳糖熔点低，在烘烤含乳糖的焙烤食品时，要降低烘焙温度。通过乳糖酶的作用，将乳糖分解成葡萄糖可供酵母发酵，而剩余的半乳糖则可参与着色反应。

### 8. 混合酶

各种酶制剂之间往往存在协同效应，若能将这几种酶复配作用，往往效果更佳。如木聚酶或半纤维素酶与真菌 $\alpha$ -淀粉酶之间存在协同作用；脂肪酶与真菌 $\alpha$ -淀粉酶、木聚糖酶之间存在协同作用；同样，抗老化的麦芽糖淀粉酶与真菌 $\alpha$ -淀粉酶、木聚糖酶、脂肪酶之间，葡萄糖氧化酶与真菌 $\alpha$ -淀粉酶、木聚糖酶之间也存在协同效应。根据各种小麦面粉的不同特性，同时结合不同酶制剂的各自特殊的效果，并很好地利用酶制剂之间的协同增效作用，必将会给烘焙制品加工业带来新的生机，随着酶技术和生物技术的进一步发展，也一定会有更多和更好的新型天然食品酶制剂问世。

复合型酶制剂的复配技术和配方将是焙烤食品品质改良研究的首要形式。尽管已知的酶有许多作用，但单一的酶往往是特异性的酶，其产品品质的提高往往是间接的。几种酶制剂混合使用往往有协同增效作用，起到 $1+1>2$ 的效果，还可减少单一酶的使用量。

葡萄糖氧化酶与脂肪酶对面粉的协同改善效果非常理想，葡萄糖氧化酶解决了脂肪酶所达不到的强度，脂肪酶解决了葡萄糖氧化酶所达不到的延伸度。半纤维素酶和其他酶制剂混合使用有增效作用。 $\alpha$ -淀粉酶和木聚糖酶一起使用能使焙烤食品的体积增加30%。木聚糖酶和纤维素酶同时使用能使细胞壁降解。阿魏酸酯酶和半纤维素酶一起使用可降低面团的黏度。酶制剂和乳化剂复合使用能有效改善面粉的品质，如十八烷基乳酸钙(CSL)能使焙烤食品体积增大并延长其货架寿命。商业上开发的面粉改良剂往往是按特定要求将特异性酶混合成复合型的、傻瓜型的，复合型酶制剂的专利越来越多。

### (三) 干酪加工

在乳品工业中所用的酶主要有：①凝乳酶，制造干酪；②过氧化氢酶，牛奶消毒；③溶菌酶，添加在婴儿奶粉中；④乳糖酶，分解乳糖；⑤脂肪酶，黄油增香。其中以干酪生产与分解乳糖最为重要。虽然酶工程学是近年来才兴起的学科，但酶在乳品中的应用由来已久。很久以前，人们就利用皱胃酶（凝乳酶）来生产干酪。总体来说，当前在干酪生产中最常用、最重要的几种酶为：蛋白酶（主要为凝乳酶）、乳过氧化物酶、脂肪酶等。蛋白酶和脂肪酶可加速干酪成熟，并可用于生产酶改善性干酪，脂肪酶在霉菌催熟干酪中可用于风味改良，意大利干酪中脂肪酶的使用是辛辣和刺激味的来源。乳过氧化物酶可用于乳制品中，如软白干酪。

干酪是以奶与奶制品为原料，加入一定量的乳酸菌和凝乳酶使奶中蛋白质凝固后，排除乳清，再经一定时间的成熟而制成的一种发酵奶制品。在干酪的生产和成熟期间，酶对其组织结构、风味和营养价值的提高起了非常重要的作用。由于干酪成熟时间较长，成熟费用较高，使其生产成本增加，自20世纪50年代以来，人们就在不断寻求加速干酪成熟的方法。添加各种酶类促熟干酪是研究最早应用最多的方法之一。这些酶中，按其来源可分为三类：①添加到奶中的酶；②奶中固有的酶；③发酵剂产生的酶。

#### 1. 凝乳酶

干酪生产中所添加的酶为凝乳酶，作用就是促进乳蛋白的凝固，提高产品的得率。目前添加的凝乳酶有动物凝乳酶、植物凝乳酶和微生物凝乳酶。动物凝乳酶是干酪生产中应用最早的一类酶，用它生产的干酪在风味、质地和产量等方面都优于其他酶类。传统干酪生产中应用的小牛皱胃酶含75%~95%的纯凝乳酶和5%~25%的胃蛋白酶。由于纯凝乳酶比胃蛋白酶有较高的凝乳特性，在干酪成熟期间蛋白质分解较弱，不会因蛋白质过度分解产生苦

味，因此，干酪生产商都喜欢选择使用含纯凝乳酶较高的皱胃酶。

近年来，随着酶分离技术的发展，美国和加拿大用离子交换法已分离出含 100% Chymosin 的纯凝乳酶用于干酪生产，这种酶不仅受奶粉成分和酸度影响较小，而且使用量较少，干酪的质量和产量都大大提高。虽然 Chymosin 是目前世界上最为理想的一种酶，但随着全世界干酪产量的增加，没有足够的小牛供提取皱胃酶或凝乳酶，而成年牛胃中的纯凝乳酶的含量较低，这使人们不得不寻求其他凝乳酶的替代品。于是猪胃蛋白酶和牛胃蛋白酶就得到了广泛的应用，但由于这些酶受乳的 pH 值和  $\text{Ca}^{2+}$  含量的影响较大，且易产生苦味，使其使用受到一定的限制。而将胃蛋白酶和凝乳酶按一定比例混合使用，能够取得较好的效果。有些国家（如以色列），鸡胃蛋白酶也广泛地应用于干酪生产，但其水解能力太强，易使干酪产生苦味。

许多植物中存在着使乳凝固的凝乳酶，目前使用较多的是无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶和 Cynarins（从葡萄牙一种植物花中提取）。全世界约有 1% 的凝乳酶来源于植物，虽然这些酶来源广泛，价格便宜，但用于干酪生产时，凝乳质地松软，产量较低，且易产生苦味。由于这些原因，这些酶在干酪生产中还不能大量使用。相信随着酶及蛋白质研究的不断深入，这类来源广泛、价格低廉的酶会具广阔的应用前景。

微生物蛋白酶是目前最有开发潜力的一种凝乳酶，全世界干酪生产所使用酶中微生物蛋白酶占 20% 左右。由于微生物繁殖速率快、周期短，可大量工业化生产，这类酶越来越受到人们的重视。美国是微生物蛋白酶使用量最大的国家之一，1989 年美国使用微生物蛋白酶 50 万加仑<sup>●</sup>，约占干酪总用酶量的 56%。目前使用最多的微生物蛋白酶主要是 Fromase 和 Emporase。

一些研究表明，微生物蛋白酶对 pH 值的敏感性比小牛皱胃酶小，并且酸化速率快，凝乳时间短，但是此酶蛋白水解特性较差，使干酪产量降低，并且成熟过程中易产生苦味，这也许是一些欧洲国家限制使用微生物凝乳酶的原因之一。

奶中固有的蛋白酶主要有碱性蛋白酶和酸性蛋白酶，其中尤其是碱性蛋白酶在干酪成熟过程中起着非常重要的作用，它的最适 pH7.8~8.0，并且在凝乳中和干酪成熟期间仍有活性。而酸性蛋白酶和凝血酶（thrombin）也对干酪成熟有作用。在干酪中添加发酵剂是为了降低奶中的 pH 值，促进干酪凝块的形成。但残留在干酪中的发酵剂会在成熟期间产生很多酶，对蛋白质的分解和风味物质的产生起着重要作用。

## 2. 碱性蛋白酶

酪蛋白是牛乳的一种重要成分，它的必需氨基酸组成较为合理，如它含有丰富的赖氨酸，是一种很好的动物蛋白质。但酪蛋白被消化吸收时也有不尽如人意之处，主要是由于它在胃中易形成大凝块，影响人体特别是婴幼儿对它的吸收利用。利用碱性蛋白酶水解牛乳蛋白后发现其溶解指数明显增加，说明牛乳蛋白（特别是酪蛋白）水解生成一些低肽分子，改变了牛乳蛋白的性质，这将有利于人类对酪蛋白的消化吸收。并且近来还发现酪蛋白水解物中的一些肽分子还具某种功能作用。现在已有人对酪蛋白的酶促降解做了系统研究，确定出了酶促反应的温度、时间和酶-底物浓度比等参数。

## 3. 血纤维蛋白溶酶（胞浆素）

应用血纤维蛋白溶酶促熟干酪的方法是近年来才采用的。血纤维蛋白溶酶是乳中固有的一种蛋白酶，该酶优先水解 C 末端的赖氨酸和精氨酸残基上的肽键。在乳中血纤维蛋白溶酶是以血纤维蛋白溶酶原的形式存在的，这种酶原实质上是丝氨酸蛋白酶。乳中的天然激活

● 指“美加仑”，符号 US gal，1US gal=3.78541dm<sup>3</sup>。

剂能将丝氨酸蛋白酶转变成血纤维蛋白溶酶，这种酶和酶原大部分结合在酪蛋白胶粒上，也有少部分与脂肪膜结合，在干酪生产过程中，可一并进入干酪凝块中，当 pH 值降低或添加 1mol/L NaCl 可使血纤维蛋白溶酶从酪蛋白胶粒中解离出来。虽然添加血纤维蛋白溶酶对干酪成熟具有明显的促熟效果，但因其价格昂贵不能大规模使用。因此，人们尝试激活乳中血纤维蛋白溶酶进行促熟干酪。

#### 4. 脂肪酶

在干酪生产中应用的脂肪酶主要是乳脂肪酶类，乳中的甘油三酯是干酪中脂质的主要来源，脂肪酶对脂肪中脂肪酸残基及酯键的位置具有很高的专一性，因此一种脂肪酶的反应产物是相对恒定的。在干酪生产中通过使用不同的脂肪酶可得到不同的脂肪酸组成，以使各种干酪的典型风味特征得到充分体现，其中短链脂肪酸对干酪风味形成影响最大。在促熟干酪中，脂肪酶可改善干酪的风味、质构，并缩短成熟时间。

### 三、用酶制剂改善食品风味、品质和产量

食品工业的一个重要方面是使食品或饮料改善风味、品质和产量，酶在此方面大有用处。在食品加工过程中，通过添加一些酶类，可以使产品的颜色、风味、质地、稳定性优化，改善食品的品质。对于含有难消化成分的食品而言，可以通过添加一些酶类，来改善这类食品的营养和消化利用性能。

果蔬本身所含有的果胶、纤维素、淀粉和蛋白质等是引起果蔬汁浑浊和褐变和产生苦味物质等不良现象的主要因素，以传统的提取、澄清等工艺难以解决上述因素，并且营养成分大量损失。将酶技术用于果蔬汁提取、澄清，不仅克服了传统工艺的缺点，更重要的可有效地分解去除大分子，且大幅度增加了果蔬汁的品质。

随着果蔬汁饮料加工业的兴起，酶技术与果蔬汁饮料加工业的结合日益紧密。人们已开发出多种酶类应用于果蔬汁饮料中，如果胶酶、果胶酯酶、纤维素酶、半乳糖甘露聚糖酶、鼠李糖苷酶、中性蛋白酶、液化葡萄糖苷酶、阿拉伯聚糖酶、葡萄糖氧化酶等。在国外甚至出现了果蔬汁饮料加工专用的复合酶。由于酶技术应用于果汁超滤工艺中使超滤膜通透量提高、清洗方便快捷，用超滤法生产透明果汁和浓缩果汁即将成为标准工艺。果蔬汁中应用酶制剂可使加工工艺简单、容易，提高产品的质量和产品的稳定性，有助于保持产品的风味和色泽。酶制剂在果蔬汁加工中的应用主要有以下几个方面。

#### 1. 提高出汁率

酶能提高果蔬汁的出汁率。用于提高果蔬汁出汁率的酶主要有果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶以及蛋白酶。高等植物细胞壁和细胞膜由果胶物质、纤维素、蛋白质等物质构成。它们在通常情况下难以破碎，细胞内液体难以释放，果蔬汁加工和压榨难度大，出汁率低。果胶具有很高的黏稠度，它的存在给榨汁、过滤和澄清带来困难。加入果胶酶能催化果胶解聚，使大分子长链的原果胶降解为低分子的果胶、低聚半乳糖醛酸和半乳糖醛酸。使用果胶酶处理，可以大大提高榨汁收得率和果汁澄清效果。由于果胶酯酶与聚半乳糖醛酸酶的协同作用，使果胶降解，黏度下降，只需较短时间，悬浮物立即沉淀而完成澄清过程。同时它可作果浆处理剂，将果浆中的果肉液化变成流质。用果胶酶处理的果汁即使浓缩也不会凝聚成冻，故可制作浓缩果汁。

纤维素酶和半纤维素酶能催化纤维素水解，能使纤维素增溶和糖化，在果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶和蛋白酶等共同作用下，植物细胞壁降解，使细胞内的液体比较容易地释放出来，增加果蔬的出汁率。并使加工和压榨工艺变得容易。

#### 2. 澄清果蔬汁

果蔬汁饮料分为澄清汁和浑浊汁。未加酶处理生产的果蔬汁是浑浊汁，要获得澄清汁则必须加酶处理。这是因为果蔬汁中含有大量的果胶物质，它们是半乳糖醛酸的聚合物，呈胶体状态，保持果蔬汁的浑浊性和稳定性。有些果蔬汁浑浊还由于果蔬汁中含有极少量的不溶性淀粉、不溶性蛋白质和脂肪。用于果蔬汁澄清的酶主要有果胶酶（聚半乳糖醛酸酶、果胶酯酶）、液化葡萄糖苷酶、蛋白酶等。为防止浓缩果汁形成阿拉伯树胶而浑浊，在生产浓缩果汁时可以加入阿拉伯聚糖酶。例如，在苹果浑浊汁中，浑浊粒子是蛋白质和果胶复合物，其中蛋白质占36%。在苹果汁（pH3.5）中，粒子表面的果胶和其他多糖物质带负电荷，粒子内部的蛋白质带正电荷，这些可溶性果胶起着保护胶体的作用，使浑浊汁悬浊稳定。当加入内切聚半乳糖醛酸酶和果胶酯酶混合制剂使果胶中30%的酯键和5%的糖苷键被水解时，带正电荷的蛋白质被暴露出来，当它们与其他带负电荷的粒子相撞时，形成不溶性的颗粒沉淀下来。经过过滤后可以得到澄清果汁。苹果汁澄清的工艺一般为：将溶于水的酶制剂、明胶和硅藻土加入到浑浊汁中，在适当的温度和速率下搅拌，果汁中开始出现沉淀，果汁澄清后，过滤或离心即可得到澄清的果汁。经实验证明：在苹果汁中添加0.07%的果胶酶制剂，在45℃下反应2h，过滤后可得到透光率达95%左右、吸光度为0.15的透明果汁。酶的澄清作用还可以用于桃、梨、葡萄、芒果、香蕉等多种澄清果汁的制作中。

胡萝卜是一种营养价值较高的蔬菜，尤其是 $\beta$ 胡萝卜素含量为所有果蔬之首。目前胡萝卜汁的市场价格与 $\beta$ 胡萝卜素含量密切相关，含量越高，价格也越高，因此，提高胡萝卜出汁率和增加果汁中 $\beta$ 胡萝卜素的含量具有非常重要的意义。提高胡萝卜出汁率和增加 $\beta$ 胡萝卜素含量的工艺过程如下：鲜胡萝卜→清洗→去皮→破碎→加热→灭酶（85~90℃）→冷却（45~50℃）→调节pH4.5→酶解（45~50℃，30min）→榨汁→均质→过滤→装瓶→杀菌→分析检测胡萝卜汁。

### 3. 酶在果汁超滤工艺中的作用

超滤比传统的过滤速率快、效果好，但如果果胶的残留物和一些中性聚糖分解不彻底，则在超滤时极易堵塞超滤膜，使超滤速率下降，超滤膜难以清洗。将酶技术应用于超滤工艺中，使原来难以解决的问题变得容易。酶制剂能提高超滤膜的通透量。用酶制剂清洗超滤膜片，能缩短清洗时间，增加膜片的使用寿命。用于超滤和清洗的酶有鼠李糖苷酶、半乳糖酶、阿拉伯聚糖酶、半乳糖甘露聚糖酶、淀粉酶、果胶酶等。国外的酶制剂公司甚至研制出了专门用于果汁超滤工艺的复合酶制剂，酶制剂能增加超滤膜的通透量，同时可减少膜清洗时间和缩短化学清洗时间，增加了超滤膜的使用寿命，增加了产量，节省了能源。

### 4. 酶技术用于保护果蔬汁饮料的稳定性、风味、色泽

有些果蔬汁如柑橘汁、胡萝卜汁的色泽和风味主要依赖于汁中的浑浊成分，即悬浮于果汁中的各种不溶的微小粒子。澄清的柑橘汁饮料是消费者很难接受的。这些微小粒子主要由果胶、蛋白质、脂肪等构成。而新鲜的柑橘汁中含有果胶酯酶，如果果汁不经过灭酶技术处理使之失活，那么由于果胶酯酶的作用，使果胶转化成低甲氧基果胶和果胶酸，它就有可能与果汁中的高价阳离子作用生成不溶性的果胶酸盐。由于果胶酸盐的吸附作用，导致浑浊粒子沉降，使产品絮凝和离析。因此要生产稳定的浑浊汁，就必须对果胶酯酶的活力进行控制。

众所周知，将苹果和土豆切开后，暴露部分很快褐变。这是由于大多数的水果和蔬菜中都存在着过氧化物酶和多酚氧化酶的活力。在果蔬汁加工过程中，它们能使果蔬汁中的酚类化合物氧化，不同程度地破坏果汁的色泽、香气和味道。因此在果蔬汁加工过程中，也必须采取措施对这些酶的活力加以控制。

果蔬汁的香气与风味是影响其质量高低的主要因素，极易在加工过程中损失。近年来研究

表明,在果蔬汁中添加酶制剂可使风味前体物水解产生香味物质。风味前体物是通常与糖形成糖苷以键合态形式存在的风味物质。研究表明,单萜类化合物是嗅觉最为敏感的芳香物质,而果蔬中大多数单萜物质均与吡喃、呋喃糖以键合态形式存在,果蔬成熟过程中内在 $\beta$ -葡萄糖苷酶游离释放出部分单萜类物质,但仍有大量键合态的萜类未被水解,因此可通过外加 $\beta$ -葡萄糖苷酶促进果蔬汁的香气与风味。用葡萄糖氧化酶减少果汁中氧气和葡萄糖。 $\beta$ -葡萄糖苷酶可改进某些果汁的香气构成。美国研究利用蛋白酶水解小麦面筋生成香料;用脂肪酶水解脂肪生成香料。如用适当工艺将风味酶添加到加工过的果蔬汁中,可使果蔬汁恢复原来新鲜的风味。只要食品中存在合适的底物和作用条件,添加某种风味酶就可产生某种风味。

#### 5. 酶技术对果蔬汁营养成分的影响

利用酶技术生产果蔬汁不仅能提高果蔬汁的出汁率,提高产量,使生产加工工艺变得容易,而且对果蔬汁的营养成分也起到保护作用。利用酶液化工艺生产的苹果汁、山楂汁、南瓜汁、胡萝卜汁等果蔬汁中可溶性固形物的含量明显提高,而这些可溶性固形物是由可溶性蛋白质和多糖类物质等营养成分组成的。果蔬汁中的胡萝卜素保存率也明显提高。

#### 6. 用于柑橘类水果的果汁脱苦

柑橘类果汁在提炼之后不久就会变苦,这主要是由柠檬苦素和柚皮苷所致。酶法脱苦主要是利用不同的酶分别作用于柠檬苦素和柚皮苷,生成不含苦味的物质。工业生产中常用固定化柚皮苷酶减少柑橘类果汁中的柚皮苷含量以去除苦味物质,取得良好的效果。通过柚苷酶的作用,可以将柚皮苷水解成无苦味的鼠李糖、葡萄糖和柚皮素;通过柠碱前体脱氢酶的作用,在 $\text{NAD}^+$ 或 $\text{NADP}^+$ 存在时,可以使柠碱前体脱氢。将酶加在橘汁中,经 $30\sim 40^\circ\text{C}$ 作用1h可脱苦。

#### 7. 用于带果肉橘子汁防止白浊

生产柚苷酶的黑曲霉也产生橙皮苷酶,可将引起白色浑浊的、橘肉带来的橙皮苷分子中的鼠李糖与葡萄糖切下,成为水溶性橙皮素。将橘肉置于酶液中保温0.5h,可使橙皮苷溶解除去。

#### 8. 用于果汁脱色的花青素酶

可切去花青素的葡萄糖苷键引起自发开环而成为无色物质。如用花青素酶处理桃酱、葡萄汁可使之脱色。

#### 9. 用于橘子囊衣的脱除

加工橘子砂囊,一般用酸碱处理脱去囊衣,并排出大量废水。从黑曲霉中筛选出来的内切型聚半乳糖醛酸酶等具有很强的脱囊衣作用。

### 四、在食品保鲜和贮藏中的应用

食品在加工、运输和保藏过程中,常由于受到氧气、微生物、温度、湿度、光线等因素的影响,而使食品的色、香、味及营养发生变化,甚至导致食品败坏,降低食品的食用价值。因此,如何尽可能地保存食品原有的优良品质特性始终是食品加工、运输和保存过程中的一个重要环节。酶技术不仅用于食品加工过程和生产食品原料,还可用于原料和成品的保鲜、贮藏。

#### 1. 酶法保鲜的特点

酶法保鲜技术是利用酶的催化作用,防止或消除外界因素对食品的不良影响,从而保持食品原有的优良品质与特性的技术。使用酶来进行食品保鲜,与其他方法相比具有以下优点。

① 酶本身无毒、无味、无臭,不会损害食品的价值。

- ② 酶对底物有严格的专一性，添加到成分复杂的原料中不会引起不必要的化学变化。
- ③ 酶催化效率高，用低浓度的酶也能使反应迅速地进行。
- ④ 酶作用所要求的温度、pH 值等作用条件都很温和，不会损害食品的质量。
- ⑤ 必要时用简单的加热方法就能使酶失活，终止其反应，反应终点易于控制。

正是由于酶法保鲜具有这些优点，它可广泛应用于各种食品的保鲜，有效地防止外界因素，特别是氧化和微生物对食品造成的不良影响。

## 2. 在食品保鲜中的酶制剂的种类与应用

一些酶可以通过除氧或抑制微生物的生长来延长食品贮存期，目前应用较多的是葡萄糖氧化酶和溶菌酶的酶法保鲜技术。而在加工中应用木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶或霉菌酸性蛋白酶技术都可以降解使啤酒浑浊的蛋白质组分，防止啤酒冷浑浊，延长啤酒贮存期，达到保鲜的作用。

(1) 葡萄糖氧化酶 葡萄糖氧化酶在有氧条件下能催化葡萄糖氧化成与其性质完全不同的葡萄糖酸内酯。该酶具有高度专一性，就连与葡萄糖结构很相似的己糖、戊糖和双糖，该酶也几乎不能催化 (<1%)。由于葡萄糖氧化酶催化过程不仅能使葡萄糖氧化变性，而且在反应中消耗掉一个氧分子，因此，它可作为除葡萄糖剂和脱氧剂广泛应用于食品保鲜。

① 防止食品氧化 氧化是造成食品色、香、味变坏的重要因素，含量很低的氧就足以使食品氧化变质。将葡萄糖氧化酶和其作用底物葡萄糖混合在一起，包装于不透水而可透气的薄膜袋中，封闭后置于装有需保鲜食品的密闭容器中，当密闭容器中的氧气透过薄膜进入袋中，就在葡萄糖氧化酶的催化作用下与葡萄糖发生反应，从而达到除氧保鲜的目的。葡萄糖氧化酶也可直接加入到罐装果汁、果酒、水果罐头及色拉调料中，起到防止食品氧化变质的作用。如防止白葡萄酒在多酚氧化酶的作用下而变色、果汁中的维生素 C 因氧化而破坏、多脂食品中的脂类因氧化而酸败等。此外，也可有效地防止罐装容器内壁的氧化腐蚀。

葡萄糖氧化酶用在鱼类冷藏制品的保鲜，一方面是利用其氧化葡萄糖产生的葡萄糖酸，从而使鱼制品表面 pH 值降低，抑制了细菌的生长；另一方面是除去了氧，从而降低了脂肪氧化酶、多酚氧化酶的活力。

另外也有把葡萄糖氧化酶和过氧化物酶混合使用，添加到果蔬中密封保藏，可以脱去氧气，延长果蔬的贮藏期。

② 脱糖保鲜 用葡萄糖氧化酶去除食品中残留的葡萄糖，目前应用最多的是脱水制品生产（如蛋白粉、蛋白片等）。因为蛋的蛋白质中含有 0.5%~0.6% 的葡萄糖，葡萄糖的羰基与蛋白质的氨基发生美拉德 (Maillard) 颜色反应，而使产品发生褐变，出现小黑点或使全蛋粉的溶解度下降等。在蛋液中加入适量的葡萄糖氧化酶 (100~200mg/kg)，不断地供给适量的氧气，在合适的条件下 (30~32℃) 处理一段时间，使葡萄糖完全氧化，从而很好地保持蛋类制品的色泽和溶解性。此外，葡萄糖氧化酶也可应用于脱水蔬菜、肉类及虾类食品，防止因葡萄糖引起的褐变反应。

(2) 溶菌酶 溶菌酶又称胞壁质酶或 N-乙酰胞壁质聚糖水解酶，广泛存在于哺乳动物乳汁、体液、禽蛋及部分植物和微生物体内。是一种催化细菌细胞壁中的肽多糖水解的酶。溶菌酶具有杀菌、抗病毒和抗肿瘤细胞的作用。溶菌酶专一催化肽多糖分子中的 N-乙酰胞壁酸与 N-乙酸氨基葡萄糖之间的  $\beta$ -1,4-键水解。自身是一种无毒蛋白质，但它能选择性地分解微生物的细胞壁，从而使微生物产生内容物渗出而死亡。溶菌酶对革兰阳性菌、好气性孢子形成菌、枯草杆菌及地衣型芽孢杆菌等都具有强烈的抗菌作用，而溶菌酶化学性质非常稳定，最适溶菌酶作用的 pH6~7，温度 50℃，在酸性条件下很稳定，pH3 时能耐 100℃ 加热 45min。溶菌酶对没有细胞壁的人体细胞不会产生不利影响。溶菌酶作为无毒无害的蛋白

质，是一种安全性很高的食品杀菌剂。对人体无害，安全性高，用溶菌酶处理食品，可有效地防止和消除细菌对食品的污染，起到防腐保鲜作用。现溶菌酶已用在低度酒、香肠、奶油、糕点、面条、饮料及乳制品防腐保鲜中。

溶菌酶可以从蛋清中分离得到，也可以通过微生物发酵制得。在食品中应用较多的是蛋清溶菌酶，它对金色葡萄球菌以外的许多革兰阳性菌具有强烈的溶菌作用，其中最敏感的是溶壁小球菌、枯草杆菌、巨大芽孢杆菌和藤黄八叠球菌等。蛋清溶菌酶作用的有效 pH5~9，最适温度为 37℃。溶菌酶添加到食品中可以用于食品的保鲜，如干酪、水产品、乳制品、香肠、奶油、生面条、低度酒等。溶菌酶添加到婴儿奶粉中可防止婴儿肠道感染。

① 干酪保鲜 在干酪的生产中，添加一定量的溶菌酶，可防止微生物污染而引起的酪酸发酵，以保证干酪的质量。如应用鸡卵白溶菌酶可以减少肉制品、干酪、水产品等保藏中因微生物作用而发生的变质。

② 水产品的保鲜 一些新鲜水产品（如虾、鱼等）在含甘氨酸（0.1mol/L）、溶菌酶（0.05%）和食盐（3%）的混合液中浸渍 5min 后，沥去水分，保存在 5℃ 的冷库中，9 天后无异味，色泽无变化。

③ 低浓度酿造酒的保鲜 酿造酒的酒精含量较低，有些微生物可在其中生长，而引起变质。例如，清酒的酒精含量为 15%~17%，大部分微生物不能在其中生长，而有一种称为火落菌的乳酸菌，则可在清酒中生长，并生成乳酸和产生不愉快的味道。若在清酒中加入 15mg/kg 的溶菌酶，即可起到良好的防腐效果。

④ 乳制品的保鲜与强化 新鲜的牛乳中含有少量的溶菌酶，每 100mL 约含 13mg，而人乳中含有溶菌酶 40mg/mL。若在鲜乳或奶粉中加入一定量的溶菌酶，则不但有防腐保鲜剂的作用，而且可达到强化的目的，有利于婴儿的健康。

⑤ 其他食品的保鲜 在香肠、奶油、生面条、饮料等食品中，加入溶菌酶均可起到良好的保鲜作用。在应用溶菌酶作为食品保鲜剂时，必须注意到酶的专一性，对于酵母、霉菌和革兰阴性菌等引起的腐败变质，溶菌酶不能起到防腐作用。

许多食品及原料的腐败、变质与酶有密切关系，它们大多是在酶的催化作用下进行的，因此，从酶的作用机理出发采用物理或化学方法抑制酶的活性，对食品的保鲜和贮藏具有重要的作用。酶法保鲜技术因其所具有的鲜明特点而引起世人瞩目。但酶法保鲜的应用研究尚处在起步阶段，大力加强酶在食品保鲜中的应用研究具有非常重要的意义和广阔的前景。

## 五、用于制备生物活性成分

利用酶技术可以生产多种具有功能活性成分的物质，这已经成为功能食品开发的重要途径。

### （一）活性肽的酶法生产

蛋白质是人体所必需的营养成分之一，它在人体内以氨基酸或肽的形式被吸收。近年来发现小肽类（2~7 个氨基酸）在人体的吸收代谢中具有重要的生理功能。如酪蛋白磷酸肽可保证 Ca 在人体内以离子形式存在，便于人体吸收；降血压肽能够消除人体血管内的紧张素，使血管舒张，降低血压；乳球蛋白肽具有广泛的抑菌作用。

目前人们认同的活性肽的定义是对肌体构成一套高度自动化的物质，是沟通细胞间、血管间联系的信使，为外分泌、内分泌、神经系统行使传递功能，从而使肌体组成了高度严密的系统，促使生物体生长、发育和繁殖的正常进行。在活性肽的制备过程中，酶水解法是一种重要的方法。酶的选择要求酶的专一性强，并且不会随着水解度的提高出现苦味。针对不同底物，选用不同的混合酶，这样能获得较好的氨基酸、二肽、三肽比例。通常选择胰蛋白

酶和胰凝乳蛋白酶的混合物，因为胰蛋白酶能专一地与赖氨酸或精氨酸残基结合，而胰凝乳蛋白酶仅能水解酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸残基的肽键。另外也可应用植物蛋白酶，如无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶。近年来有报道说，微生物酶具有更高的选择性。由蛋白质水解物所制备的活性肽类食品，具有易消化、易吸收、抗过敏、治疗低血压、降低胆固醇等多种特点和生理功能。目前，活性肽类食品在日本、美国、西欧均已上市，仅日本就有牛乳肽制品、大豆肽制品、胶原肽制品、蛋清肽制品、畜血肽制品等多种产品上市。

## (二) 功能性低聚糖

低聚糖亦称寡糖，是由2~10个单糖分子以糖苷键连接成直链或支链的低聚合度糖。由于单糖的种类、糖苷键连接的形式不同，生成的品种较多，功能各异，因此又可分为普通低聚糖和功能性低聚糖。常见的功能性低聚糖有低聚果糖、低聚异麦芽糖、低聚甘露糖、大豆低聚糖、低聚半乳糖、低聚氨基葡萄糖等，而人们常用的蔗糖、麦芽糖、乳糖等则属于普通低聚糖。功能性低聚糖一般难以被消化，这是由于其糖分子相互结合的位置特殊，人体胃肠道内没有代谢这类低聚糖的酶系。这些难消化性低聚糖虽然不能成为人体的营养源，但它们对人体有特别的生理功能，所以被称为功能性低聚糖。普通低聚糖与功能性低聚糖的不同就在于能否被人体胃酸和胃酶所降解，对人体有无特殊的生理功能。

### 1. 低聚木糖

一般认为，低聚木糖是由木二糖至木十糖等组成的，其中以木二糖、木三糖为主要有效成分，而木二糖和木三糖则是分别由2个和3个木糖分子以 $\beta$ -1,4-糖苷键连接构成的。目前，低聚木糖的制备方法主要采用生物酶水解法，即利用内切木聚糖酶水解木聚糖底物得到的以木二糖、木三糖为主要成分的混合物。酶解法的关键在于木聚糖酶对底物的适应性，即选择合适的木聚糖酶。首先木聚糖的结构根据其来源不同而不尽相同，除了木糖残基以 $\beta$ -1,4-糖苷键相连构成的主链外，一般还含有其他种类的糖和其他基团形成的侧链或简单的分支结构，有的木聚糖还含有乙酰基侧链，因此大多数木聚糖为非均一性多聚糖。其次，木聚糖酶是一类复合酶系，不同来源的酶系组分有所不同，主要包括内切 $\beta$ -木聚糖酶、端切木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶等。因此，不同来源的木聚糖底物要求使用不同的微生物木聚糖酶。例如，以桦木木聚糖为底物时宜选用绿色木霉产木聚糖酶；以棉子壳、玉米芯等木聚糖为底物时宜选用球毛壳菌产的木聚糖酶。

### 2. 甘露低聚糖

甘露低聚糖是由甘露聚糖类物质经 $\beta$ -甘露聚糖酶转化的产物，主链是由甘露糖与甘露糖、葡萄糖或半乳糖以 $\beta$ -1,4-糖苷键相连的非吸收性糖类。 $\beta$ -甘露聚糖酶是一类能水解吡喃甘露糖为主链的内切水解酶，利用这种酶水解含 $\beta$ -甘露聚糖的植物胶（如角豆胶、瓜儿豆胶、魔芋粉和田菁胶等）能生成含有不同单糖分子（2~10个）组成的分支甘露低聚糖。

### 3. 异麦芽低聚糖

异麦芽低聚糖主要包括异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等几种低聚糖。目前异麦芽低聚糖的制备方法主要有两种：一是利用糖化酶的逆合作用，糖化酶在高浓度的葡萄糖溶液中发生逆合作用，将葡萄糖缩合为异麦芽糖、麦芽糖等低聚糖，但异麦芽糖含量不高；二是利用麦芽糖在 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的作用下水解，生成两分子葡萄糖，游离出的葡萄糖残基再被 $\alpha$ -葡萄糖苷酶转移到另一葡萄糖分子上，通过 $\alpha$ -1,6-糖苷键连接而成异麦芽糖，若受体为麦芽糖则生成潘糖。

### 4. 甲壳低聚糖酶

甲壳低聚糖是甲壳素和壳聚糖经降解生成的一类低聚物，相对分子质量为1500的甲壳低聚糖对大肠杆菌有强的抑菌作用，特别是较高聚合度的甲壳低聚糖具有阻碍病原菌生长繁

殖的功能，另外它能促进蛋白质合成，活化植物细胞，从而促进植物快速生长。与化学降解相比，甲壳低聚糖酶降解生产的反应条件温和，降解速率快，克服了化学降解产品分子量分布宽、均一性差的缺点，是一种较为理想的降解方法。用于酶降解生产甲壳低聚糖的酶类主要分专一性和非专一性两种，专一性酶有甲壳素酶和壳聚糖酶，非专一性酶有纤维素酶、溶菌酶和脂肪酶等。不同的酶，其降解机理并不完全相同，如果把几种酶混合使用，降解效率将高于单一种酶。

### 5. 低聚果糖

低聚果糖主要由蔗果二糖、蔗果三糖和蔗果四糖组成。合成酶系有三大类：果糖基转移酶，以蔗糖为底物转移合成；菊粉果糖基转移酶，以菊粉为底物转移合成不同的二果糖酐；菊粉内切酶，水解菊粉形成。目前获得高纯度低聚果糖的方法有两种：一种是用单酶法，但由于副产物葡萄糖的抑制作用，所得糖浆仅含 50%~60% 低聚果糖，其后需要用适当的方法去除其中的单糖（葡萄糖和果糖），而得到高纯度的低聚果糖，这种方法一般称为两步法；另一种是使用双酶法或混合酶系法，即在反应体系中同时加入果糖转移酶和另一种或两种能把葡萄糖转化为其他形式的酶（如葡萄糖氧化酶和葡萄糖异构酶），使其协同作用，在蔗糖转化反应过程中同时消除葡萄糖的抑制作用，从而使蔗糖充分转化，同时葡萄糖转化为其他较易除去的形式，再经过简单的分离纯化得到高纯度的低聚果糖，这种方法称为一步法。相比而言，两步法分离、纯化过程的回收率较低，成本较高，因而不适于大规模生产。

其他活性物质酶法生产所用的酶及产物的作用见表 7-2。

表 7-2 酶在功能食品开发中的应用一览

名称	酶底物	酶种类	用途
无乳糖牛乳 低胆固醇乳脂乳	牛乳	$\beta$ -半乳糖苷酶 胆固醇还原酶或胆固醇氧化酶	以供乳糖不耐症患者食用
低变应原米	大米	猕猴桃蛋白酶处理分解大米中的球蛋白	适用于因先天性食用大米高过敏的体质
壳聚糖 黏多糖 硫酸软骨素 肝素 蛋白多糖 海藻多糖 低聚果糖 低聚木糖 纤维低聚糖 魔芋低聚糖 偶合糖	甲壳素 鲜猪皮 动物软骨 猪小肠黏膜 海参胴体 马尾藻 蔗糖 玉米芯、甘蔗渣 纤维素 魔芋淀粉 淀粉和蔗糖	甲壳素脱乙酰酶 胰蛋白酶 木瓜蛋白酶 胰蛋白酶 木瓜蛋白酶 纤维素酶 果糖基转移酶 木聚糖酶 纤维素酶 $\beta$ -甘露聚糖酶 环化糊精合成酶	功能性低聚糖
低聚乳果糖 帕拉金糖 低聚壳聚糖 低聚麦芽糖 低聚菊糖 低聚龙胆糖 麦芽糖醇 异麦芽糖醇	乳糖和蔗糖 蔗糖 壳聚糖 淀粉 菊芋、菊苣 葡萄糖 淀粉 蔗糖	$\beta$ -呋喃果糖苷酶 $\alpha$ -葡萄糖基转移酶 壳聚糖酶 $\alpha$ -淀粉酶 内切菊糖酶 $\beta$ -葡萄糖苷酶 $\alpha$ -淀粉酶液化、 $\beta$ -淀粉酶糖化后催化氢化 $\alpha$ -葡萄糖基转移酶处理后催化氢化	具有低腐蚀性，可用于防龋齿 低卡糖，可用于减肥食品 糖醇

续表

名称	酶底物	酶种类	用途
山梨醇	淀粉	$\alpha$ -葡萄糖基转移酶处理后 催化氢化	
酪蛋白磷酸肽 糖巨肽(GMP)	酪蛋白 $\kappa$ -酪蛋白	蛋白酶 凝乳酶	具有抗病毒、活化双歧杆菌等功能
大豆多肽	大豆蛋白	木瓜蛋白酶等蛋白酶	具有促进脂肪代谢、降低胆固醇、活化双歧杆菌等功能
降血压肽	鱼、虾蛋白	蛋白酶	可抑制血管紧张素转移酶活性
类吗啡肽 高F值低聚肽	谷蛋白(面筋) 玉米醇溶蛋白	蛋白酶 碱性蛋白酶及木瓜蛋白酶	镇痛、促进胰岛素分泌 预防肝硬化、抗疲劳
谷胱甘肽	L-谷氨酸、L-半胱氨酸及 L-甘氨酸	谷胱甘肽合成酶	
卵白肽	卵蛋白	经自身酶法脱糖后,蛋白 酶酶解	提高免疫调节
谷氨酰胺肽 氨基丁酸 鱼油中 EPA(20 碳 5 烯酸)、DHA(22 碳 6 烯酸)的富集	玉米蛋白 L-谷氨酸	蛋白酶 L-谷氨酸脱羧酶 利用各种脂肪水解酶的专一性	降血脂及健脑益智
酶解卵磷脂 腺嘌呤核苷酸(AMP)	大豆磷脂或蛋黄磷脂 产蛋白假丝酵母菌体	磷脂酶 核酸酶	提高卵磷脂的乳化性能 增强婴幼儿对细菌性疾病的抵抗力
脱氧核苷酸 混合核苷酸	鱼白(鱼精) 富含核酸的动植物(花粉等)提取核糖核酸(RNA)	5'-磷酸二酯酶 5'-磷酸二酯酶	防治白血球、血小板减少 保肝,防治白血球、血小板减少
L-肉碱 铁红血素	反式巴豆甜菜碱 畜血、禽血提取血红蛋白	酶法羟化 蛋白酶	
酶改性芸香苷(水溶性芸香苷)	芦笋等植物中提取的芸香苷	葡萄糖转移酶	抗氧化及血管扩张作用,抗衰老及预防动脉硬化,抗血栓
酶改性甜菊苷(葡萄糖基甜菊苷)	甜菊苷	葡萄糖基转移酶	
单葡萄糖苷酸基甘草酸(MGGR)	甘草甜素	$\beta$ -葡萄糖苷酸酶	
人参皂苷的转化	人参皂苷	皂苷糖苷酶	将人参中含量较高 Rb1、Rb2、Rc、Rd 转化为 Rh2, 具强的抗肿瘤活性

### 第三节 酶在饲料方面的应用

最早记载科学描述外源性酶制剂在动物营养中的作用可追溯到 20 世纪 20 年代,在此后的 30 年里,科学家开始研究外源酶在家禽饲料中的应用,并达到了广泛应用。

酶在动物体内消化与新陈代谢过程中起着非常重要的作用。动物能分泌到消化道内的酶主要属于蛋白酶、脂肪酶类和碳水化合物酶类。在消化酶的作用下,底物大分子物质(如蛋

白质、脂肪、多糖等) 降解为易被吸收的小分子物质, 如寡肽、氨基酸、脂肪酸、葡萄糖等。饲用酶制剂大致可分为消化酶和非消化酶两大类。非消化酶是指动物自身不能分泌到消化道内的酶, 这类酶能消化动物自身不能消化的物质或降解一些抗营养因子, 主要有纤维素酶、木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、植酸酶、果胶酶等。消化酶是指动物自身能够分泌的淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶类等。

饲用酶制剂不仅能消除饲料抗营养因子的有害作用, 促进养分的消化和吸收, 提高畜禽的生长速率、饲料转化效率和增进畜禽健康, 而且能减少养殖业排污中氮、磷的排放, 保护生态环境。应用饲用酶制剂是现代化养殖业中经济效益与生态效益兼顾的重要科学技术措施。

饲用酶制剂的商业化应用在国外约有 10 余年的历史。英国 20 世纪 90 年代初酶制剂在鸡饲料中的添加率几乎等于零, 而现在 95% 以上的鸡饲料都添加酶制剂。中国如以珠海溢多利公司 1992 年推出溢多酶作为饲用酶商业化应用的起点, 饲用酶制剂在中国的应用也有 10 多年的历史。

目前中国饲用酶制剂的市场已经初步形成, 并在逐步发展。在中国销售饲用酶制剂的国外公司有近 10 家, 其产品有: 芬兰国际饲料公司的爱维生和保安生系列产品, 芬兰安特罗斯公司的安特复合酶、植酸酶系列产品, 罗氏公司和德国巴斯夫公司的植酸酶产品等。

中国饲用酶制剂企业据不完全统计也有 20 余家, 其产品有: 广东珠海经济特区溢多利有限公司的溢多酶系列产品、广东肇庆华芬饲料酶有限公司的华芬酶系列产品、广东江门英恒生物饲料有限公司的英恒酶系列产品、江苏太湖酶制剂厂的太湖酶系列产品、吉林长春昆仑酶制剂厂的复合酶系列产品等。

## 一、饲料的组成

饲料原料中的脂肪和添加到饲料中的植物油或动物脂肪在肠道经过乳化后才能与胰脂酶充分接触从而得以消化吸收。不饱和脂肪酸有利于乳糜微粒的形成。不饱和脂肪酸含量高的植物油消化吸收率高于动物油, 动物油中猪油消化吸收率高于牛油。幼龄动物对饱和脂肪酸的消化吸收能力较差, 随周龄增大而提高。

饲料中多糖又可分为营养性多糖和结构多糖。营养性多糖主要是淀粉和糖原, 结构多糖在植物性饲料中也指非淀粉多糖, 主要是植物细胞壁组成成分, 包括纤维素、半纤维素、果胶。半纤维素又包括  $\beta$ -葡聚糖、阿拉伯木聚糖、甘露寡糖等。禾谷子实(如玉米、高粱、小麦和大麦等)是畜禽饲料中碳水化合物的主要来源, 其主要成分是淀粉, 非淀粉多糖含量也较高。豆类饲料原料中的非淀粉多糖主要是果胶和纤维素。非淀粉多糖在目前可以说是影响饲料有机物质消化利用的最主要因素, 其中可溶性非淀粉多糖在动物消化道可增加食糜黏稠度, 妨碍能量、氨基酸等养分的利用, 对单胃动物产生抗营养作用。非反刍动物体内不能分泌纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、木聚糖酶、果胶酶等, 纤维素、果胶和大部分半纤维素只能被微生物有限地利用。利用微生物生产的外源多糖酶添加到饲料中可以帮助畜禽消化利用这些非淀粉多糖, 如  $\beta$ -葡聚糖酶可水解  $\beta$ -葡聚糖, 木聚糖酶可水解阿拉伯木聚糖, 从而降低其抗营养作用, 提高动物生产性能。

植酸(6-磷酸肌醇)存在于所有植物性饲料中。植酸状态磷的含量一般占总磷量的 60%~80%。植酸还可和矿物元素、蛋白质及一些消化酶等结合, 降低这些养分的利用率或酶的活性。非反刍动物仅消化道上皮细胞分泌极少量植酸酶, 后肠道中的微生物可产生少量。非反刍动物对饲料中植酸磷的利用率很低, 小于 10%。

## 二、饲料中酶制剂的种类及主要作用

### (一) 饲料中酶制剂中的主要种类及分类

世界上已发现的酶的品种有 1700 多种，生产用酶已达 300 多种，饲用酶亦有 20 多种。这些酶主要为消化性酶，多为水解系列酶。主要有纤维素酶（ $C_1$  酶、 $C_x$  酶、 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶）、半纤维素酶、果胶酶、淀粉酶（淀粉酶、糖化酶）、蛋白酶（中性蛋白酶、酸性蛋白酶）、植酸酶。

饲用酶制剂的分类方法很多。根据饲用酶制剂中所含酶种类的多少可分为：饲用单一酶制剂和饲用复合酶制剂。由于饲料成分的多样性，所以复合酶制剂比单一酶制剂效果更好，也更为常用。

#### 1. 单酶制剂

主要的单酶制剂有如下几类。

(1) 淀粉酶 包括糖化酶、 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶等。 $\alpha$ -淀粉酶和  $\beta$ -淀粉酶可将直链和支链淀粉水解为双糖、寡糖和糊精，经糖化酶再分解为葡萄糖。糖化酶能将  $\alpha$ -淀粉酶分解的低分子物质并进一步水分解为葡萄糖，被动物吸收利用。

(2) 蛋白酶 蛋白酶是降解蛋白质肽链的水解酶，有酸性、中性和碱性之分，饲料中选用酸性、中性，主要有胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等。

(3) 植酸酶 能将豆类、谷实类及其他副产品等饲料中的植酸盐水解出磷酸根，以及被植酸螯合的钙、镁、铜、锌等离子，为猪、禽等单胃动物吸收利用。谷物中的磷绝大多数是以植酸磷的形式存在，动物本身不分泌植酸酶，所以对谷物中这部分磷的利用率较低，而通过在饲料中添加微生物分泌的植酸酶，就可以将这部分磷分解释放出来，从而减少无机磷在饲料中的添加量，降低饲料成本，并且可以减少动物粪便中磷的排泄量，降低环境污染。是目前应用较多且前景最好的一种绿色饲料添加剂。

(4) 纤维素酶 包括  $C_1$  酶、 $C_x$  酶和  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酸酶，在其共同作用下，能将饲料中的纤维素分解成葡萄糖，并释放其他养分（如蛋白质、脂肪、淀粉等），为畜禽消化和吸收利用。

(5) 半纤维素酶 包括木聚糖酶（戊聚糖酶）、聚半乳糖酶等，可将植物细胞中的半纤维素水解为五碳糖，并降低半纤维素溶于水后的黏度。

(6)  $\beta$ -葡聚糖酶  $\beta$ -葡聚糖广泛存在于多种植物原料中，黏性较大，是影响营养分子传递和吸收的一个重要的抗氧因子。 $\beta$ -葡聚糖酶能水解葡聚糖等大分子，降低消化道中物质的黏度，促进营养物质的吸收。 $\beta$ -葡聚糖酶是酶制剂饲料添加剂中较为重要和应用较广泛的一种酶。

(7) 果胶酶 果胶质是植物性原料中的一种抗营养因子，影响饲料的利用率。果胶酶可裂解植物细胞壁单糖之间的糖苷键，分解植物表皮的果胶，促进植物组织的分解，促进营养成分的消化和吸收。果胶酶也是较常用的一种饲料酶制剂。

(8) 木聚糖酶 木聚糖是植物细胞壁的主要成分之一，属于非淀粉多糖，为一种广泛存在于植物中的半纤维素，它是由  $\beta$ -1,4-糖苷键连接而成的木糖聚合物。通常，木聚糖以异质多糖形式存在并与纤维素结合在一起。木聚糖酶是木聚糖的专一降解酶，属于水解酶类，包括内切木聚糖酶、外切木聚糖酶和木糖苷酶 3 种。木聚糖酶耐热性能较好，动物肠道内的温度、pH 值对其活性影响不大，而且能耐受制粒过程中的高温，这使其在动物饲料中的运用具有独特优势。

(9)  $\beta$ -葡萄糖苷酶 将纤维二糖、纤维三糖及其他低分子纤维糊精分解为葡萄糖。主要是将植物细胞中的半纤维素酶分解为各种五碳糖，并可降低半纤维素溶于水后的黏度。

以上酶类根据在饲料中的作用可分为两类：①消化性酶，主要指畜禽消化道可以合成和分泌，但因某种原因需要补充和强化的酶种，如淀粉酶、蛋白酶等；②非消化性酶，主要指动物通常不能合成与分泌，但饲料中又有其相应底物存在（多为抗营养因子），而需要添加的酶种，如木聚糖酶、果胶酶、甘露聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶、纤维素酶、植酸酶等。

## 2. 复合酶

复合酶是以一种或几种单一酶制剂为主体，加上其他单一酶制剂混合而成，可同时降解饲料中的多种养分和多种抗营养因子，效果优于单一酶制剂。

复合酶根据不同动物和不同生长阶段的特点进行配制，有较好的作用，是目前最常用的饲料添加剂。国内外复合酶制剂主要有以下酶类。

① 以蛋白酶、淀粉酶为主的饲用复合酶，主要功能为补充内源性消化酶不足，适用于小动物。

② 以木聚糖酶、果胶酶、甘露聚糖酶为主的饲用复合酶，消除玉米-豆粕、小麦-豆粕等类型口粮的黏性抗营养因子，在中国的饲料生产中经常使用。

③ 以葡聚糖酶为主，木聚糖酶等为辅，消除大麦、黑麦型日粮的黏性抗营养因子，欧美国家应用比较广泛。

④ 蛋白酶、淀粉酶、木聚糖酶、果胶酶等兼而有之，为通用型饲用酶制剂。

饲用复合酶中各种酶的种类和比例与动物饲粮有关，不同饲粮所含抗营养因子的种类和比例不同，需要饲用酶制剂所含酶的种类和比例也不同。此外，也与动物种类和生长阶段有关，不同动物种类和生长阶段，需要饲用酶制剂所含酶的种类和比例也有所不同。因此，饲用复合酶制剂中各种酶的配比既和饲料化学性质的性质有关，也和动物消化系统的生理特点有关。一种好的饲用复合酶制剂产品需要熟悉酶制剂生产工艺的微生物发酵专家和熟悉饲料成分及动物消化生理特点的饲料营养专家来共同设计。在饲料工业和养殖业中如何正确合理地应用饲用酶制剂，也需要动物营养和饲料科学的专家来共同指导。

## （二）酶制剂饲料添加剂的作用

### 1. 直接分解营养物质，提高饲料利用率

饲用酶制剂可以在动物的消化道内，将饲料中的大分子物质，水解为易吸收的小分子物质，降低营养物质在粪便中的排出量，即对内源酶起辅助补充作用。

仔猪胃肠道消化酶除乳糖酶在2周龄左右开始下降外，其他酶的分泌在出生后随日龄增大而增加，大多数在5周龄左右才能达到高峰，只有糜蛋白酶在3周龄左右可以达到最大。为了缩短母猪繁殖周期和使仔猪尽早适应植物蛋白日粮，早期断奶甚至超早期断奶在养猪生产中普遍施用，但早期断奶产生明显应激，对消化系统发育和消化酶分泌产生不良影响，消化酶分泌急剧减少，断奶2周后才又逐渐恢复与上升。断奶后两周内消化酶分泌不足是断奶仔猪生长阻滞的主要因素之一。在断奶仔猪日粮中添加酶制剂是减轻断奶应激、避免生长阻滞、提高仔猪生长性能的必要和有效的措施之一。

雏鸡大多数消化酶在2周龄左右才发育到高峰，个别的（如脂肪酶）还要到21日龄左右。Noy等（1995）发现雏鸡21日龄十二指肠分泌的胰蛋白酶是4日龄的50倍。从4日龄到21日龄，小肠氮消化率从78%提高到92%。21日龄淀粉酶活性是4日龄的100倍，淀粉的消化率从4日龄的82%上升到21日龄的89%。因此，消化酶分泌不足是雏鸡对饲料利用的主要限制因素之一。

在幼龄动物消化酶发育不完善、年老动物消化酶分泌能力降低以及受到应激或疾病感染后的动物引起消化酶分泌紊乱等情况下，外源消化酶可补充内源酶的不足，增强动物对饲料养分的消化吸收能力，从而提高畜禽生产力和饲料转化效率。

## 2. 消除抗营养分子，改善消化机能

麦类谷物（小麦、大麦、黑麦和黑小麦）胚乳细胞壁含可溶性非淀粉多糖、果胶、植酸、纤维素聚合物，豆粕等饼粕类饲料中含有多种抗营养因子（胰蛋白酶抑制因子、植物凝集素和 $\alpha$ -半乳糖苷）。这些可溶性非淀粉多糖使食糜黏度增大，食糜的流通及消化速率降低，因此这些谷物也被称为黏性谷物。流通缓慢和黏性食糜也有利于微生物增殖，微生物消耗营养，尤其在年龄较大和消化道发育成熟的畜禽后肠道。在日粮中添加非淀粉多糖酶，特别是 $\beta$ 葡聚糖酶、植酸酶、果胶酶和纤维素酶，一方面可打破细胞壁中纤维素、半纤维素和果胶等对养分的束缚，让消化酶迅速充分地接触饲料养分，使营养物质更好地被利用；另一方面，加快饲料养分消化吸收，减少后肠道食糜中可供微生物利用的有效养分含量，肠道微生物增殖受到控制，有利于畜禽健康，尤其在减少使用抗生素或不使用抗生素的情况下效果更加明显。玉米和高粱属于非黏性谷物或低黏性谷物，其中非淀粉多糖含量低。这些谷物为主的日粮中添加非淀粉多糖酶可以减小其营养价值的变异，提高饲养效果和畜禽群体的整齐度，增加经济效益。

## 3. 激活内源酶的分泌，提高消化酶的浓度

由于酶制剂的使用，可提供更多可供多种酶的基质，从而激活动物体内多种消化酶更多地分泌，提高消化酶的有效含量，加速营养物质的消化和吸收，从而提高饲料利用率和加速动物的新陈代谢，促进动物生长。

## 4. 减轻畜牧生产对环境的污染

现代化的养殖业主要以大规模集约化生产为基本特征，对环境的污染日趋严重，如氮、磷造成的水体富营养化问题。在饲料中添加酶制剂，如蛋白酶和植酸酶等，可以增加饲料利用率，减少粪便中有机物、氮和磷的排泄量，减轻环境污染。在含黏性谷物的日粮中添加非淀粉多糖酶，可降低食糜和排泄物的黏度，在家禽可以改善蛋壳清洁度、避免垫料含水率过高和有害菌大量增殖，改善禽舍环境。添加植酸酶可降低排泄物中磷含量20%~50%，也可提高氮的利用率。

# 三、适当选择和合理使用饲用酶制剂

## 1. 依据动物的种类和日龄不同，选择使用消化酶

对于畜禽，在一些特殊的生长发育阶段和饲养管理条件下会出现内源消化酶分泌不足。如幼龄动物消化酶发育不完善、年老动物消化酶分泌能力降低以及受到应激或疾病感染后的动物消化酶分泌紊乱等情况。外源消化酶可补充内源酶的不足，增强动物对饲料养分的消化吸收能力，从而提高畜禽生产力和饲料转化效率。选用适当的消化酶制剂弥补内源酶的不足，可以提高畜禽生产力和改善饲料利用效率。肉仔鸡的食量远大于蛋用雏鸡，但两者胰腺消化酶的分泌近似。肉仔鸡在同样的消化酶水平下要处理更多的食糜，日粮中补加外源性消化酶则显得更重要，饲喂效果显著。

温度和酸碱度是影响酶作用效果的两大环境因素，各种酶都具有各自最适宜（具有最大活性）的，甚至是维持其结构和性质稳定性的环境温度和酸碱度。家禽和猪肠道酸碱度和温度相差较大，适用于猪的酶制剂品种或酶活数量不一定适用于家禽。同一类酶（如蛋白酶）可有不同的来源和性质，如有植物、细菌和真菌来源，不同来源的同一类酶也可能有不同的环境适应性。因此在选择畜禽酶制剂时应注意不同的酸碱性。

## 2. 针对目标底物（日粮类型）选用酶制剂种类

由于酶作用的底物特异性，要使饲用酶制剂发挥优良的效果，在应用时必须考虑饲料原料特性。不同饲料原料的组成和化学结构都有特殊性。在小麦和黑麦中主要的非淀粉多糖是

阿拉伯木聚糖；而在大麦和燕麦中除了阿拉伯木聚糖外主要是 $\beta$ 葡聚糖；豆科种子中主要是果胶。可见，用于小麦豆粕型饲料的酶应主要是木聚糖酶、果胶酶和纤维素酶，而用于大麦豆粕型饲料的则主要是 $\beta$ 葡聚糖酶、果胶酶、木聚糖酶和纤维素酶。

植物饲料原料中的植酸相对上述碳水化合物而言比较简单，它具有固定的化学结构和特性，在植酸酶的使用方面要考虑的因素也就简单得多。

### 3. 根据目标底物含量确定酶制剂的适宜用量

在日粮中使用非消化酶类的目的在于提高饲料中畜禽依靠内源酶不能消化物质的利用率或消除其抗营养作用。若底物过少，加酶就不会产生出明显的改进效果；若底物量过多，添加的酶量或酶活性不充足，则所能降解的底物数量有限，效果也不佳。这就要求底物与酶制剂用量之间应有适宜的比例关系，根据目标底物含量，确定添加酶制剂的用量。

对饲用酶制剂中绝大多数酶的活力大小的度量还没有统一的标准。由于测定所选用的酸碱度、温度和底物对酶活测定结果影响很大，表现出从酶活指标难以判断酶制剂的质量优劣，具有相同酶活力的产品的使用效果差异较大。

### 4. 确定酶制剂的营养改进值或营养当量，对日粮配方进行优化

使用酶制剂的方式有两种：一是直接在根据经典的饲料营养参数设计的日粮中添加酶制剂，该方式简单易行，会提高畜禽生产性能，但将增加饲料成本；二是根据酶制剂提高畜禽生产性能和改善饲料利用的程度，适当降低根据经典饲料营养参数设计的日粮营养水平或利用廉价饲料原料配制日粮，这样可以做到在保持动物生产性能不下降的情况下降低饲料成本。第二种方式所能达到的完美程度依赖于配方技术人员对酶制剂和饲料原料信息的了解程度，如果酶制剂供应商能够在充分科学实验的基础上提出某种酶制剂所能改进的饲料养分消化率的大小或相当的营养价值 [可以称作营养改进值 (INV) 或营养当量 (NE)]，在制作配方时应用这些 INV 或 NE 对经典的饲料营养参数进行调整后再进行计算，就可以达到较高的精准度，实现真正的优化。上述技术信息也应是用户考察和选择酶制剂供应商的重要参考指标。

### 5. 全面考虑日粮的营养平衡、商品属性和经济成本

酶制剂使用前后所能产生的饲喂效果的显著差异常见于一些非常规日粮类型，譬如非淀粉多糖酶制剂应用于以麦类作为主要能量饲料的畜禽日粮中。在日粮类型发生较大变化时，只考虑酶制剂的 INV 或 NE 而力求降低日粮成本是不够的或说是偏颇的，还应该全面考虑日粮的营养平衡，对因为日粮类型改变可能导致的某些营养亏缺应进行弥补。例如，以小麦作为主要能量饲料的日粮与玉米型日粮比较就更易出现生物素缺乏。商品属性也赋予商品饲料重要的价值，饲料原料类型的改变有时也会有损用户已习惯和喜爱的商品特点，如色泽等。弥补营养亏缺和商品属性都会有成本增加。

### 6. 适当的饲料加工工艺，保障酶制剂的应用效果

酶是蛋白质，除了极个别酶可以在 90℃ 左右高温保持结构和功效的稳定，极大多数不具有耐受 70℃ 以上高热的性质。没有经过特殊稳定性处理的酶制剂很难经受住制粒工艺而仍维持较高的活力，更不能适应膨化工艺。对于必须制粒或膨化的饲料，宜采用后喷涂工艺技术将饲用酶（液态）均匀添加到配合饲料中。

## 第四节 酶在医药方面的应用

到目前为止，科学家们已从生物体内提纯并确认出 800 多种酶。但是应用到医药方面作为医药用的酶类制剂不过才有几十种。然而，祖国医药学对含酶类药物的记述却很早，如《药品化义》中记载：“大麦芽，炒香开胃，以除烦闷；生用力猛，主消麦面食积，症瘕气

结，胸膈胀满，郁结痰涎，小儿伤乳，又能行上焦滞血。若女人气血壮盛，或产后无儿饮乳，乳房胀痛，丹溪用此二两，炒香捣去皮为末，分作四服立消，其性气之锐，散血行气，迅速如此，勿轻视之”。又如《本草蒙荃》中记载：“牛肚，健脾胃，免饮积食伤”。由于受技术限制，而未能进一步提纯入药。但由此说明，酶类制剂与中药已早有渊源关系，现在讨论酶类制剂，也可认为是中药制剂的发展。现代研究表明，一切生命现象几乎都在酶的参与下进行。各种代谢异常的疾病无不与酶的失调有关。有些先天性代谢障碍是由于溶酶体中某些酶的缺乏。酶制剂已愈来愈多地用于疾病的治疗和预防，酶在医药上的应用研究已成为现代医学的一个新领域。近代由于酶制剂具有作用明确、专一性强、疗效好等特点而被广泛用作助消化、抗炎、促凝、促纤溶、促进生物氧化以及解毒、抗肿瘤等方面的治疗用药。

## 一、酶制剂按其临床应用分类

酶制剂按其临床应用来分类，主要有以下几种。

### 1. 消化类

这类酶研究最早，是品种最多的一类酶。它们的作用是消化和分解食物中各种成分，如淀粉、脂肪、蛋白质等，使其变成比较简单的物质，便于肠胃道的吸收。当体内消化系统失调，消化液分泌不足时，服用这一类酶就能够补充和纠正体内消化酶的不足，恢复正常的消化机能。在这一类酶中主要有胃蛋白酶、胰酶、淀粉酶、纤维素酶、木瓜酶、凝乳酶、无花果酶、菠萝酶等。

(1) 胃蛋白酶 是从猪、牛、羊的胃黏膜上提取出来的一种水解酶，又称胃泌素。在酸性环境中活性高而且稳定，但遇碱则失效。胃蛋白酶有消化蛋白质的作用，能将食物中的蛋白质变为蛋白胨，从而促进对蛋白质的消化。吃肉类、蛋类、豆类食物过多，若产生了消化不良、食欲不振和病后体弱、吃东西不香等，可服用蛋白酶。常与稀盐酸配成胃蛋白酶合剂服用，但不能和小苏打同服。胃溃疡和肥厚性胃炎病人不宜服用。

(2) 淀粉酶 又名糖化素、淀粉酶素，是从麦芽中取得的，有帮助胃肠消化淀粉类食物的功能。如吃米、馒头、面条、红薯、土豆等过多引起的消化不良，可服用淀粉酶以帮助消化。

(3) 胰酶 又名胰酵素、胰液素，是从猪、牛、羊的胰脏提取的。主要成分含胰淀粉酶、胰蛋白酶和胰脂肪酶，有消化蛋白质、脂肪和淀粉的作用，常用于一般消化不良、食欲不振，尤其适合慢性胃炎、肝脏病和糖尿病病人的消化障碍。

### 2. 抗炎净创类

这一类酶是目前在治疗上发展最快、用途最广的一种。这种酶大多数都是蛋白质水解酶，能够分解发炎部位纤维蛋白的凝结物，消除伤口周围的坏疽、腐肉和碎屑。其中有些酶能够分解脓液中的核蛋白使其成为简单的嘌呤和嘧啶，降低脓液的黏性，达到洁净创口、消除痂皮、排除脓液、抗炎消肿的目的。在这一类酶中，主要有胰蛋白酶、糜蛋白酶、双链酶、 $\alpha$ -淀粉酶、胰脱氧核糖核酸酶等。给药的方法有外敷、喷雾、灌注、注射、口服等。它们可以单独使用，也可以与抗生素等合用，治疗各种溃疡、炎症、血肿、脓胸、肺炎、支气管扩张、气喘等症。

### 3. 凝血类

凝血酶的作用是促使血中纤维蛋白原变成不溶性纤维蛋白，从而促使血液凝固，防止血管出血。凝血酶外用止血药是临床常用的止血药，止血效果国内外公认。可分为人凝血酶、牛凝血酶、纤维蛋白酶、猪凝血酶。适用于结扎止血困难的小血管、毛细血管以及实质性脏器出血的止血，可用于外伤、手术、口腔、耳鼻喉、泌尿、骨科、神经外科、眼

科、妇产科以及消化道等部位出血的止血。该产品主要由牛或猪血中提取。

20世纪80年代前后,美国、英国、日本等已从牛血中提取凝血酶制剂,在临床局部止血的治疗中证实,未出现因凝血酶带抗原性,而口服或局部外用后产生抗体的过敏反应。但因价格昂贵,国内未大量引进使用。90年代以后,国内从来源较广的猪血中提取凝血酶,并应用于临床,在口服和局部止血的治疗上,亦证实了未发现过敏和其他不良反应。从目前使用的止血药来说,凝血酶是局部止血的首选药物,尤其是在消化道出血和外伤大出血的抢救上疗效显著,引起临床医生的广泛关注。

#### 4. 解凝类

这一类酶都是从血液中提取出来的,能溶解血块。纤维蛋白溶解酶的作用是溶解血块,为目前临床上最新的一种酶制品。治疗血栓静脉炎、冠状动脉栓塞等。主要包括如下几类。

(1) 链激酶 链激酶能治疗外伤淤血、水肿、扭伤,除去坏死组织,还可用于治疗严重烧伤、角膜疮疹、尿道和生殖器感染、急性耳炎,注射这种酶制剂可使受伤部位血块溶解,以减轻皮肤因外伤淤血所致痛苦。目前已可以用基因工程构建出重组菌,利用发酵工程方法生产。

(2) 尿激酶 是由肾细胞产生,从新鲜人尿中提取制得的一种能溶解血栓的药物。为高效的血栓溶解剂,作用机制与链激酶不同,本品可直接促使无活性的纤溶酶原变为有活性的纤溶酶,使组成血栓的纤维蛋白水解。临床上用于脑血栓形成、脑栓塞、周围动脉或静脉血栓症、肺栓塞、急性心肌梗死等,也可用于眼科溶解眼前房的血纤维、血块。由于本品是人体内存在的蛋白质,比链激酶不良反应小。由于尿激酶是从正常人体中分泌出来的天然物质,临床应用没有副作用,只要使用得当,即使剂量很大,亦是很安全的。已知有多种相对分子质量形式,主要是54000和34000两种,均具有生物活性。前者为尿中的天然形式,后者是前者的降解产物。临床用前者优于后者。尿激酶是纤维蛋白溶酶原的激活剂,它能使无活性的纤维蛋白溶酶原转变成有生物活性的纤维蛋白溶酶,后者能水解不溶性的纤维蛋白(即血栓)成为可溶性的纤维蛋白碎片,从而达到治疗血栓病的目的。

(3) 蝮蛇抗栓酶 本品系从蝮蛇蛇毒中分离出的酶制剂,能降低血脂、降低血液中纤维蛋白原浓度,降低血液黏度,减少血小板数量,并抑制其功能。用于治疗深部静脉血栓,亦用于脑血栓、心肌梗死及周围动脉闭塞、大动脉炎、静脉系统血栓等症。

(4) 蚓激酶 由蚯蚓中提取分离的一组蛋白水解酶,该酶具有降解纤维蛋白原、水解纤维蛋白、激活纤溶酶原的作用,临床上用于急性脑梗死的治疗和预防,使过高的纤维蛋白原降低。

#### 5. 解毒类

这一类酶的主要作用是解除体内或因注射某种药物产生的有害物质。主要品种有青霉素酶、过氧化氢酶和组织胺酶等。青霉素酶能够分解青霉素分子中的 $\beta$ -内酰胺环,使变成青霉噻唑酸,消除因注射青霉素引起的过敏反应。

## 二、主要治疗酶的种类介绍

### 1. 蛋白酶类

这一类酶的医药用途,总的来说有相同点,均可净化外伤、清除脓液、清除坏死组织、消炎消肿等,常用于因食蛋白性食物过多所致消化不良、病后恢复期消化功能减退以及慢性萎缩性胃炎、胃癌、恶性贫血所致的胃蛋白酶缺乏。

(1) 蛋白酶 用于助消化药和口腔卫生以及消炎等。国内经临床验证对气管炎等炎症有疗效的有黑曲霉产的酸性蛋白酶、宇佐美曲霉产的酸性蛋白酶和中性蛋白酶。蛋白酶除有祛

痰、消炎和消肿外，在烧伤和烫伤治疗上，有使皮肤不粘连起皱和不结疤的疗效。

蛋白酶另外一个重要用途是除去抗生素中的蛋白质。而采用固定化酶既较经济，除去杂蛋白的效果又好。

(2) 胰蛋白酶 本品为蛋白质水解酶，能选择性地水解蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链，能消化溶解变性蛋白质，对未变性的蛋白质无作用，因此，能使脓、痰液、血凝块等分解，变稀，易于引流排除，加速创面净化，促进肉芽组织新生，此外还有抗炎症作用。临床上用于脓胸、血胸、外科炎症、溃疡、创伤性损伤、瘰管等所产生的局部水肿、血肿及脓肿等。喷雾吸入，用于呼吸道疾病。也可用于治疗毒蛇咬伤。

(3) 菠萝蛋白酶 本品系从菠萝液汁中提取的一种蛋白水解酶，是一种具有消炎及抗水肿作用的巯基酶。临床上可用作抗水肿和抗炎药。口服后能加强体内纤维蛋白的水解作用，将阻塞于组织的纤维蛋白及血凝块溶解，从而改善体液的局部循环导致的炎症和水肿的消除。与抗生素及化疗药物并用，能促进药物对病灶的渗透和扩散。它的优点是分解纤维蛋白的大分子，但不破坏凝血所必需的纤维蛋白原。可用于各种原因所致的炎症、水肿、血肿及血栓等，如支气管哮喘、支气管炎、急性肺炎、产后乳房充血、乳腺炎及视网膜炎等。与抗菌药物合并治疗关节炎、关节周围炎及小腿溃疡等均有效。

(4) 糜蛋白酶（胰凝乳蛋白酶） 本品为胰腺分泌的一种蛋白水解酶，能迅速分解变性蛋白质，作用、用途与胰蛋白酶相似，比胰蛋白酶分解能力强、毒性低、不良反应小。用于创伤或手术后伤口愈合、抗炎及防止局部水肿、积血、扭伤血肿、乳房手术后浮肿、中耳炎及鼻炎等。可用于白内障摘除。

(5) 胶原酶 它可以由动物和微生物进行制造，也可由梭状芽孢杆菌产生。胶原酶可作为消炎剂，治疗椎间盘脱位或破裂，甚至可治疗坏死组织和溃疡。

## 2. 淀粉酶

$\alpha$ -淀粉酶同胰蛋白酶等制成多酶片，其作用是帮助消化。使用的产酶菌有黑曲霉和米曲霉。淀粉酶和蛋白酶一起加在牙膏和漱口水中使用，可以减少牙垢的形成，减少牙齿增生物的积累。

## 3. 乳糖酶

牛奶中含5%乳糖，牛奶进入小肠后，经肠黏膜分泌的一种称为乳糖酶的作用，乳糖消化分解为半乳糖与葡萄糖，才能被人体吸收利用。如果人体小肠内乳糖酶的含量不足或缺乏，乳糖在小肠内未被充分消化即进入大肠，被那里的大量细菌发酵而产酸、产气，即可导致乳糖吸收不良症，出现一系列肠胃不适的症状。

乳糖酶又名 $\beta$ -半乳糖苷酶，是一种白色粉末，无味，无臭，溶解后是一种浅棕色液体。乳糖酶通过特定条件水解半乳糖苷键，将乳糖水解成葡萄糖和半乳糖，使其易被肠道吸收。

大量研究表明哺乳动物的乳糖酶活性随年龄的增长，具有典型的生理性降低，成人乳糖酶下降的不可逆受基因控制。全世界乳糖酶缺乏的发生率在50%以上，而中国有90%左右成人缺乏乳糖酶。若乳糖酶缺乏者一次摄入较多乳糖，乳糖未能及时被消化吸收，进入结肠后被肠道细菌分解，产生大量乳酸、甲酸等短链脂肪酸和氢气，造成渗透压升高，使肠腔中的水分增多，引起腹胀、肠鸣、肠绞痛直至发生水泻等症状，总称为乳糖不耐受症。1889年荷兰生物学家首次报道了乳糖酶可水解乳糖。乳糖酶不仅能有效地改善乳糖吸收不良，还能大大减轻症状。国外学者经多年研究，已成功地找到产乳糖酶的微生物，并研制了一系列乳糖酶商品，现已投入市场。

## 4. 溶菌酶

溶菌酶有抗病毒和细菌的能力。溶菌酶是从鲜鸡蛋清中提取的一种能分解黏多糖的多肽

酶，是一种具有杀菌作用的天然抗感染物质。有抗菌、抗病毒、止血、消肿止痛及加快组织恢复功能等作用。临床用于慢性鼻炎、急慢性咽喉炎、口腔溃疡、水痘、带状疱疹和扁平疣等。也可与抗菌药物合用治疗各种细菌和病毒感染。口服和肌注均有效。

#### 5. 超氧化物歧化酶

过氧化物游离基可造成机体的损害，本品是由哺乳动物的红细胞、肝和组织中分离提取的一种肽链大分子的金属酶，能促使过氧化物游离基转化成过氧化氢和氧，从而清除炎症过程中伴随产生的过氧化物游离基，而有强大的抗炎作用。临床用于类风湿性关节炎、骨关节炎、放射性膀胱炎。此外，适用于纤维性海绵体炎，于阴茎硬结区域内注射，1次注射5~10mg后，多数病人症状即获得明显改善。

超氧化物歧化酶(SOD)是20世纪医药学最热门的研究课题。SOD作为清除人体内负氧自由基的清除剂，具有抗炎、抗氧化、抗衰老、抗辐射和抗癌作用。SOD过去主要从牛血中提取，由于牛血中可能携带疯牛病或其他致病因子，国际血防组织已明令禁止从血液中提取SOD作为医药保健品原料，对市场需求量较大的SOD产品，要求从植物内提取。植物含SOD资源，并且唯有玉米产量大，资源丰富，从玉米提取SOD大有前途。

#### 6. 酪氨酸酶

人体中酪氨酸酶有催化酪氨酸合成L-DOPA或进一步合成黑色素的作用。黑色素及其代谢中间物，有抗氧化、神经调节和增强皮肤免疫能力的作用，因此酪氨酸酶在医药和美容保健方面具有重要的应用前景。

黑色素是一类有着复杂结构、非均质的类多酚聚合体。在医药方面，能作为紫外线吸收剂、抗氧化剂和新型的天然药物载体，可用来治疗某些与黑色素缺乏有关的神经系统疾病，如着色性干皮病/帕金森综合征、老年性痴呆症、亨廷顿舞蹈症等；它还具有抗体外HIV病毒的作用，即干扰HIV诱导的合胞体的形成，阻止HIV被膜表面的糖蛋白和T细胞特异抗体与淋巴瘤细胞的结合。现在已在白癜风病人血液中发现有抗黑色素细胞抗体或抗白癜风抗体。这种抗体与表皮底部的基底细胞之间的黑色素细胞结合后影响了形成黑色素细胞的酪氨酸酶的作用，而使黑色素细胞减少，皮肤变白色。通过研究发现，有的白癜风患者是由于基因突变引起酪氨酸酶合成不足或酪氨酸酶活性下降或丧失，这是白癜风最为严重的一种。常用于治疗白癜风的激活药物是光敏素，它可在体外诱导黑色素生物合成。某些中药在体外可直接激活酪氨酸酶活性，对白癜风有很好的治疗效果，如驱虫斑鸠菊可在体外激活酪氨酸酶活性，消白灵片可使白癜风动物模型血液中酪氨酸酶含量增加。

#### 7. 天冬酰胺酶

L-天冬酰胺酶是酰氨基水解酶，是一个广泛应用于儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)治疗的酶类药物。1953年，首次发现豚鼠血清有抗癌作用，1961年证实豚鼠血清中的抗肿瘤因子是L-天冬酰胺酶。自20世纪70年代以来，人们利用大肠杆菌(*E. coli*)和欧文菌(*Erwinia*)等制备L-天冬酰胺酶，不仅应用于儿童ALL的治疗，也应用于帕金森综合征、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤和胰腺癌等疾病的治疗，取得较好的疗效，因而越来越受到人们的重视。

L-天冬酰胺酶在机体内可催化天冬酰胺的水解，生成天冬氨酸和氨，在大量的ALL病人中，其肿瘤细胞依赖外源性的L-天冬酰胺才能生存，而正常细胞自身能合成L-天冬酰胺。L-天冬酰胺酶抗白血病的作用机制是它能够快速消耗血循环中的L-天冬酰胺，从而消耗肿瘤细胞合成蛋白质所必需的底物，快速抑制蛋白质合成，而不影响正常细胞，此即L-天冬酰胺酶的选择性细胞毒作用。

#### 8. 多核苷酸磷酸化酶

利用多核苷酸磷酸化酶制备双链多聚次黄嘌呤核苷酸（多聚肌苷酸）、多聚胞嘧啶核苷酸（多聚胞苷）的复合物。聚胞苷是一种高效的干扰素诱导物，具有抗病毒和增强机体免疫机能的作用，对疱疹性角膜炎、抑制肿瘤生长以及增强免疫等都有作用。

### 9. 透明质酸酶

透明质酸酶是一种高度特异性蛋白酶，能高度特异地作用于透明质酸（透明质酸为组织基质中具有限制水分及其他细胞外物质扩散作用的成分），使之发生液化，可促使皮下输液、局部积贮的渗出液或血液加快扩散而利于吸收，为一种重要的药物扩散剂。临床用作药物渗透剂，促进药物的吸收，促进手术及创伤后局部水肿或血肿消散。其参与作用人工晶体前膜治疗的机理可能为：透明质酸酶作用于眼球壁中的透明质酸，破坏其屏障作用，提高激素类药物在房水中的浓度；人工晶体前膜的形成有胶原纤维和成纤维细胞参与，脑原纤维由胶原原纤维经糖蛋白互相黏合而形成，透明质酸酶特异作用于糖蛋白多糖成分中的透明质酸，阻止胶原原纤维合成胶原纤维，同时使胶原纤维还原为胶原原纤维，促进纤维膜的降解吸收。

虽然透明质酸酶治疗人工晶体前膜效果明显，但由于透明质酸酶可以降低角膜等眼球壁的屏障作用，以及可能使玻璃体液化及后脱离，对眼球的远期影响尚需进一步观察，因此专家主张短期谨慎使用。表 7-3 列出的是目前临床上应用治疗的药用酶及其来源和用途。

表 7-3 主要的药用酶及其来源和用途

酶	来源	用途
淀粉酶	胰脏、麦芽、微生物	治疗消化不良、食欲不振
蛋白酶	胰脏、胃、植物、微生物	治疗消化不良、食欲不振，消炎、消肿，去除坏死组织、促进创伤愈合，降低血压
脂肪酶	胰脏、微生物	治疗消化不良、食欲不振
纤维素酶	霉菌	治疗消化不良、食欲不振
溶菌酶	蛋清、细菌	治疗手术性出血、咯血、鼻出血，分解脓液，消炎，镇痛，止血，治疗外伤性浮肿，增强放射性治疗效果
尿激酶	人尿、基因工程菌	治疗心肌梗死、结膜下出血、黄斑部出血
链激酶	链霉菌	治疗血栓性静脉炎、咳血、血肿、皮下出血、骨折、外伤
青霉素酶	蜡状芽孢杆菌	治疗青霉素引起的过敏反应
L-天冬酰胺酶	大肠杆菌	治疗白血病
超氧化物歧化酶	微生物、血液、肝脏	预防辐射损伤，治疗红斑狼疮、皮炎、结肠炎、氧中毒
凝血酶	蛇、细菌、酵母	治疗各种出血
胶原酶	细菌	分解胶原，消炎，化脓，脱痂，治疗溃疡
溶纤酶	蚯蚓	溶血栓
右旋糖酐酶	微生物	预防龋齿，制造右旋糖酐用作代血浆
弹性蛋白酶	胰脏	治疗动脉硬化，降血脂
核糖核酸酶	胰脏	抗感染，去痰，治肝癌
L-精氨酸酶	微生物	抗癌
L-组氨酸酶	微生物	抗癌
谷氨酰胺酶	微生物	抗癌
L-蛋氨酸酶	微生物	抗癌
$\alpha$ -半乳糖苷酶	牛肝、人胎盘	治疗遗传缺陷病弗勃莱症

## 第五节 酶在环保与能源开发方面的应用

### 一、酶在环保方面的应用

面对日益严峻的全球化环境污染问题，环境工程技术与生物技术的结合发展，为环境保护污染治理提供了新的技术手段。传统的污染治理方法存在着诸多的自身缺陷。主要表现在：处理效率低下、占地广、浪费土地资源和能源、处理成本高、效果不尽理想、容易产生新废弃副产物，甚至产生新的污染源。所以以环境生物技术为新技术体系解决环保污染的问题以保护环境成为当今乃至未来发展的方向。酶与酶技术的开发与应用是环境生物技术中重要的部分。

现代研究表明，酶与酶技术与环境保护的关系十分密切。表现在3个方面。

① 在产品加工过程中用酶来替代化学品（以生物过程代替化学过程反应较温和）可以降低生产活动中的污染水平，有利于实现工艺过程生态化或无废生产，真正实现清洁生产的目标。

② 酶作为生物催化剂，只对产品内容起作用，使产品在过程中产生的污染大大减少，有利于环境的保护。

③ 酶的反应条件温和、专一性强、催化效率高等自身的特点，决定了对污染物处理和环境监测具有高效、快速、可靠的优点。因此，酶工程技术在环境治理领域具有广阔的前景。

酶与酶技术以实际应用的要求为目的，利用酶的催化特性对对象进行有用物质的生产或有害废物的分解。几年来，环保用酶制剂与酶技术已经开始引起学术界的关注。与国外在这方面的研究相比，国内环保用酶的研究工作刚刚起步，在实现工业化、商品化应用方面基本处于空白。

环保用酶与酶技术的开发与应用项目，通过应用系统方法，对高效酶类的选用与开发、酶固定化（载体）材料的选择、酶生物反应器的研究与制造，以成本低、速率快、效率高、安全简便的操作解决环境污染中的废水处理问题，开发出新一代的环保用酶制剂和酶生物反应器系列产品，并且使该技术得到产业化。本项目的开发，给解决生活污水、工业废水、垃圾渗滤液的无害化处理带来崭新的突破，对环保领域酶制剂的开发应用具有积极的意义。

在社会生活不断现代化、工业化高速发展的今天，环境污染问题已日益严峻，传统的解决环境污染的技术和工艺已经满足不了现实的要求，环保领域酶和酶技术的应用已发挥越来越重要的作用，同时由于其广阔的市场前景，必将产生巨大的经济效益和社会效益。

环保用酶与酶技术是国内研究之前沿领域，是一项系统的研究工程。本项目的技术开发主要运用目前国内成熟的酶发酵工艺和提炼工艺的生物下游技术，以生产低成本、高活性环保用酶和酶固定化载体材料以及酶反应器的生产开发。酶与酶技术应用于废水处理的产品开发，将多种适用于废水处理的酶富集于反应器中处理污水。并从以下几个方面着力研究。

① 环保用酶制剂工业化生产技术开发，在污泥的净化处理和生物法的沼气生产中，采用纤维素酶和淀粉酶，以促进其中生物成分的分解。其分解的改善，使沼气的产量得以提高，并且减少了有机干物质。

② 环保用酶固定化廉价载体的应用。

③ 废水处理酶反应器的技术开发。

④ 以新型酶反应器为核心构建污水处理系统技术开发。

1. 应用酶制剂减轻畜禽粪便对环境的污染

由于集约化畜禽养殖生产情况下经常性的大量粪便排放对其周围的土壤、地下水和地表

水以及空气环境所造成的化学及微生物污染问题，以及由此给养殖生产和人们生活带来的消极影响，在饲料中添加酶制剂是减轻畜禽粪便对环境污染的有效措施之一。

(1) 畜牧业带来的环境污染 集约化畜禽生产条件下，养殖场的粪便及其中污染物的排放量是很大的。如对于一个年出栏 10000 头的猪场来说，平均每天的粪便排放量达 17.5t，其中氮和磷的排放量分别达 105kg 和 70kg；年饲养 10000 只产蛋鸡的鸡场平均每天的粪便排放量达 1.5t，其中氮和磷的排放量分别达 24.5kg 和 23.1kg。

畜禽粪便造成的污染主要有如下几类。

① 对土壤及水源的污染 在粪便存放期间，有机质及矿物质都会随粪水渗入土壤内，并进入地下水或随雨水进入地表水体，进而超过土壤或水体的消纳能力，造成植物根系的损伤或旺长，或使水体中藻类大量繁殖而使水质腐败，导致水生生物死亡。据测定，当畜禽场粪水流入池塘而使水中氨含量达到 0.2mg/L 时就会对鱼产生毒性。畜禽场内及周围水体内微生物的含量是其他良好水体的 30 倍以上。

② 对空气的污染 主要来自粪便中产生的有害气体、粉尘和微生物等，如年出栏 5000 头的猪场每天通过粪便向空气排放的氨气达 6.7kg 以上，饲料粉尘近 20kg；年饲养 100 头牛的牛场每天的氨气排放量达 0.8kg 以上，来源于粪便的恶臭（含氨气、硫化氢、甲硫醇、硫化甲基、苯乙烯、乙醛和粪臭素等成分）会对现场及周围人们的健康产生不良影响，如引起精神不振、烦躁、记忆力下降、免疫力下降和心理状况不良等，也会使畜禽的抗病力和生产力降低。一个年出栏 10000 头的猪场每小时可向大气排放约 1.5 亿个菌体，距猪场 80m 远的空气中所含的细菌数量也足以引起动物致病。

③ 动物环境的污染 畜牧场由于粪便的堆积非常容易招引老鼠和鸟类，另外还会孳生大量的蚊子、苍蝇及其他昆虫。畜牧场内及其周围的鼠雀及其他昆虫的密度远远高于离畜牧场较远的地方。

(2) 酶制剂用于减轻畜禽污染的应用 粪便中的有机物主要是畜禽没有充分消化吸收的有机营养物质、体内代谢产物、肠液等，这些有机物被粪便中的细菌分解后会产生一些有害气体，如氨气及胺类、硫化氢、有机酸、粪臭素等，饲料中添加酶制剂可以帮助畜禽更好地消化利用饲料中的营养物质，在基础日粮中添加木聚糖酶，20 日龄肉仔鸡小肠下段主要营养物质的消化率明显提高。假设一个年出栏 20000 只肉鸡的养殖场，全年消耗饲料约 180t（有机物含量约 150t），添加复合酶制剂后可以减少有机物排泄量 6t 左右，这对于减轻微生物的繁殖、苍蝇的孳生和环境的污染是具有十分重要意义的，对于节约饲料消耗、减低饲养成本也有重要价值（节约饲料成本至少在 6000 元以上）。

植物类饲料中所含的磷约有 70% 为植酸磷，动物体内不能分泌分解植酸的植酸酶，因而不能有效利用植酸中的磷，绝大部分的植酸磷都随粪便排出。植酸在饲料原料中还会与一些矿物质如钙、锌等及蛋白质结合，影响它们的消化和利用。因此，在饲料中添加植酸酶不仅可以提高磷的消化吸收率，还可以提高某些矿物质及蛋白质的消化吸收率。在肉鸡饲料中添加植酸酶，磷的排泄量降低 25%，可以推断，在一个存栏 20000 只的蛋鸡场，向含钙 3% 的日粮中添加植酸酶（250U/kg）后每年可以减少粪中磷的排泄量 865.5kg，减少氮的排泄量约 500kg。

针对于酶制剂在畜禽粪便中的应用表明，酶制剂可以明显减少粪便干物质的排泄量，但必须与粪便的合理收集、存贮、干燥、发酵等措施相结合才能有效缓解其对环境造成的污染问题。

## 2. 酶制剂在印染污水处理中的应用

印染废水影响生态环境很大，关键是治理的深度。目前能用于染整加工的酶类大部分是水解酶类，它们的作用物如淀粉、蛋白质、果胶和纤维素的分子量均有不同程度的下降，酶

法加工应用的助剂较少，因此治理废水的难度较小；作用温度低，一般不会超过 60℃，不仅减少能源消耗，而且操作（一般 pH3.0~10.0）安全有保证；酶是生命细胞产生的，所以它的反应范围都限制在维持生命活动的条件下；用酶法加工，不会使织物残留有毒物质，因为基本不需要加其他的助剂，也就不会引入有毒物质；对织物的损伤小，与传统工艺相比，它能够最大程度地保持纤维强力；由于反应条件近似，可以采用多种酶混合，或与传统相结合，进行处理退、煮、练一浴法生产，不仅节能，并且提高了加工效果，工人的健康有保障。染整传统生产普遍使用高温，如煮练、脱胶等，车间温度夏天高达 40℃ 以上，而且气息难闻，严重影响人身健康与安全。而酶加工具有较舒适的生产环境，酶的反应处于弱酸和弱碱范围，可以减少废水的排放，酶作用后分解的产物在废水中一般不会形成有毒害物质，因此是在绿色染整工艺中较理想的加工用剂。

当织物经过酶工艺和几种传统工艺加工后，对废水进行 COD 值（化学需氧量的英文简称，表征水质受还原性物质污染的程度，其值越小，说明污染小）的测量，前者测得的值为最低，也就是说酶法加工的废水受到还原性物质污染的程度最小。再结合前面提到的特点，酶法加工的“绿色”就可以显现出来了。

虽然使用酶比使用化学药剂的某些成本高，其效果也与经过传统工艺处理后的效果相当，但是综合成本比传统工艺低。曾有人以溶比 1:10，织物 100kg 进行前处理对比，传统工艺的综合成本是酶法工艺的 2 倍。

### 3. 城市污水处理

复合酶污水净化剂是利用自然界存在的有机材料和其他生物酶成分制造出的生物酶降解剂类液状清洁产品。复合酶污水净化剂通过激活土著微生物，有效开发和利用河道生态的内循环供氧系统机能，促进河道中溶解氧的恢复，使污染物被有效去除，增强河道的纳污、控污和降污的自净功能，并控制污染物的扩散，从而使受污染水体向良性生态系统演替。北京市土城河污水经过复合酶污水净化剂的原位生物修复，水体自净能力明显增强。经过 5 个月的快速生物修复后，河道的黑臭现象很快消失，表面浮油被清除，整个土城河的水体清澈，河道中已有鱼类出现。

### 4. 溶菌酶消除空调隐患

由于空调机的热交换管、过滤材料上往往积存大量的灰尘和水分，而成为微生物滋生的温床，同时装有中央空调系统的建筑物通常都是密闭不通风的，从而导致室内空气恶化，造成疾病传播。所谓空调酶杀菌技术就是从生物体中提取的溶菌酶固定在空调过滤器的材料上，溶菌酶通过溶解细菌的细胞壁，使之死亡，而溶菌酶对人体则没有任何危害。这项技术的核心就是如何将溶菌酶固定在过滤材料上，使之不会脱落，而且还要保持溶菌酶的活性和高效杀菌能力，同时还不能影响过滤材料的过滤性能。

## 二、酶在能源方面的应用

### 1. 酶在生物柴油合成中的应用

生物柴油是指由动植物油脂与短链醇（甲醇或乙醇）进行酯交换反应所制备的脂肪酸单酯。生物柴油具有环境友好的特点，不含芳香烃且含硫量很低，与石油柴油相比，大大减少了主要污染物的排放，废气排放指标符合严格的欧洲Ⅲ号标准；更为重要的是生物柴油具有可再生性，其资源不会枯竭，并且还具有良好的润滑性能、燃烧充分、运输与使用安全等性能。

生物柴油的合成参见第九章第七节中二的内容。

### 2. 酶法生产沼气

在沼气生产中加入具有水解作用的酶，可将沼气的产量提高 25%。不必改变运行制度，

也无须增加投资。加入与被作用物质相适应的酶制品，不仅可以提高产气量，还可以降低发酵物质的黏度，抑制漂浮层的形成。消化酶应用于污泥的消化与脱水阶段。在污水处理厂的沼气阶段加入具有水解作用的酶，可以在很大程度上降解污泥中的有机物质，使产气量提高25%，并且使消化后的污泥在最后处理中易于分离，相应减少凝结剂的需用量，从而提高全厂的经济效益。

## 第六节 酶在分析检测方面的应用

### 一、酶在食品检测中的应用

随着生活水平的提高，人们对食品质量的要求也越来越高，长期以来获得广泛应用的物理、化学、仪器等检测方法，由于存在某些局限，已不能满足现代食品检测的需要。随着生物技术的发展，人们已逐步认识到酶技术在食品检验中的重要作用及其意义。食品检验中酶检测法就是用酶来测定某些用一般化学方法难于检测的食品成分的含量或测定食品中某些特殊酶的活性或含量，如测定食品中残留有机农药的含量、微生物污染或了解食品的制备、保存情况等。

橙汁中柠檬苦素含量是衡量其风味的重要指标，用碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶作酶源，可定量免疫测定橙汁中的柠檬苦素。用固定化葡萄糖氧化酶与辣根过氧化物酶这两种复合酶作为酶源，可以高速、灵敏地定量检测到果蔬汁中葡萄糖的含量。

Bushway 等用固定化酶来定量检测果蔬中的防霉剂，检测结果与高效液相色谱检验的结果相符。利用酶法可有效检出果汁中的微生物，对果汁的质量进行控制。食品检验者已研究了应用酶法区分冻鲜鱼和冻鱼，主要是通过检测  $\beta$ -羟酰辅酶 A 脱氢酶 (HADH) 的活力来进行区分；另外还可通过检测溶酶体酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺酶的活力来进行区分，实际检测中在冻鱼中的酶活均比冻鲜鱼的酶活高出几倍。利用酶联免疫分析法，可以快速检测鱼制品中所采用的各种原料鱼。

### 二、酶在医药诊断方面的应用

在医学上常通过测定血液或其他体液中酶的活性，来诊断某些疾病和了解病情的发展。例如，急性胰腺炎患者，血清和尿中淀粉酶活性显著升高。患肝炎和心肌炎时，血清中转氨酶活力增高。又如，有机磷农药中毒时，神经组织的胆碱酯酶受到抑制，血清中胆碱酯酶的活力也下降。疾病的治疗效果在一定程度上与诊断的准确性和速率有关。由于酶诊断方法可靠、简便、快捷，使酶在疾病的临床诊断上得到广泛应用。酶在临床诊断的应用有两种情况：一是根据体内与疾病有关的酶活性变化来诊断某些疾病；二是通过利用酶来测定体内与疾病有关的某些物质的量来对疾病进行诊断。

一般来说，健康人体内的一些酶的量或活性恒定在某一范围内，如果患了某种疾病，与之相关的酶量或活性就会发生相应的变化。因此，测定这些酶量或活性的变化，就可以诊断出这些疾病。表 7-4 是根据疾病与酶活性变化的关系，进行疾病诊断的实例。

同样，对于健康人，体内的某些物质的量也保持在一个恒定范围内，超出这个范围，可能就和某种疾病相关。例如，目前检测血液和尿液中的葡萄糖就是采用葡萄糖和过氧化氢酶联合作用的方法。其原理如下。

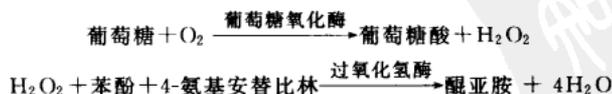


表 7-4 根据酶与疾病的关系对疾病进行诊断

酶	疾病与酶活性的关系
淀粉酶	胰脏与肾脏疾病:活性升高;肝病:活性下降
胆碱酯酶	肝病:活性下降
酸性磷酸酯酶	前列腺癌、肝炎、红细胞等病变:活性增高
碱性磷酸酯酶	佝偻病、软骨化病、骨瘤、甲状旁腺机能亢进等:活性升高;软骨发育不全等:活性下降
谷丙转氨酶	肝炎、心肌梗死等:活性升高
谷草转氨酶	肝病、心肌梗死等:活性升高
胃蛋白酶	胃癌:活性升高;十二指肠溃疡:活性下降
磷酸葡萄糖变位酶	肝炎、癌症:活性下降
醛缩酶	癌症、肝病、心肌梗死等:活性上升
葡萄糖醛缩酶	肾癌、膀胱癌:活性升高
碳酸酐酶	坏血病、贫血等:活性升高
乳酸脱氢酶	癌症、肝病、心肌梗死:活性升高

反应产物靛亚胺可在 500 nm 波长下比色, 根据标准曲线, 计算葡萄糖含量。

另外, 利用尿酸酶测定血液中的尿酸含量, 用于诊断痛风症; 利用胆固醇酯酶或胆固醇氧化酶测定血液中的胆固醇含量, 用于心血管疾病或高血压的诊断等。随着酶工程技术的发展, 这些酶都经固定化制成酶电极, 用于血糖、尿酸、胆固醇的测定, 使测定方法更加简便、快捷。

目前, 在临床诊断上, 酶标免疫测定法开始广泛应用。首先将酶与抗体或抗原结合, 制备成酶标记的抗体或抗原。测定时, 利用酶标抗体(或酶标抗原)与待测样品中的抗原(或抗体)结合, 再借助标记的酶催化特定的反应, 测定出在酶-抗体-抗原结合物中的酶的含量, 就可以计算出待测定样品中的抗体或抗原的含量。通过抗体或抗原的量可以诊断某种疾病。在酶标免疫测定中, 最常使用的标记酶是碱性磷酸酯酶和过氧化物酶。利用酶标免疫测定, 可以诊断肠虫、毛线虫、血吸虫等寄生虫病, 以及疟疾、麻疹、疱疹、乙型肝炎等疾病。

酶检测方面最广泛的应用之一为酶联免疫吸附试验, 也称酶免疫技术。酶免疫技术就是抗原-抗体的免疫反应和酶的高效催化作用(每分钟能催化生成 10 万个分子的产物)有机地结合起来, 使抗原-抗体的免疫反应和酶的高效催化放大作用同时显示出来的新技术。应用此新技术的试验称为酶免疫试验。它的灵敏性强, 准确性高, 速度很快。它能准确地测出各种传染病的抗体, 用于食品细菌学检查、寄生虫学检查, 还用在血液病学、内分泌学、法医学和兽医学等方面。用它测定红斑狼疮病人体内的抗核抗体、肝癌病人的甲胎球蛋白, 可提供早期诊断的依据。有人认为酶免疫技术的应用范围和精确度, 可以和免疫荧光和放射免疫技术相媲美。可见, 这一试验大有发展前途。

### 参 考 文 献

- [日] 相·考亮等著. 酶应用手册. 黄文涛, 故学智译. 上海: 上海科学技术出版社, 1989
- 郭勇. 酶的生产与应用. 北京: 化学工业出版社, 2003
- 姜锡瑞. 酶制剂应用手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [英] G. G. 伯奇等主编. 酶与食品加工. 郑寿亭等译. 北京: 轻工业出版社, 1991
- 钱铭镛. 酶工程基础与酶应用实例. 南京: 江苏科学技术出版社, 1989
- 罗九甫. 酶和酶工程. 上海: 上海交通大学出版社, 1996
- 郭勇, 郑穗平. 酶在食品工业中的应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1996

- 8 李孝辉. 饲用微生物酶制剂及其研究应用概况. 饲料工业, 2001, 22 (1): 40~43
- 9 朱史齐. 酱油、酱类用酶制剂制造新工艺的设想. 中国调味品, 1994 (2): 18~21
- 10 霍兴云. 我国酶制剂工业现状及其发展对策. 化工科技市场, 2001 (2): 16~17
- 11 程启芬. 饲用酶及处理方法. 粮食与饲料工业, 1997 (2): 22~23
- 12 霍兴云, 冯德清. 酶制剂工业国外发展现状趋势及对策. 食品与机械, 1995 (2): 13~16



# 第八章 酶反应器

## 第一节 酶的应用形式

### 一、概述

酶是高效、专一的生物催化剂，为使其催化效力充分发挥出来，除选育出优良的菌种、建立简便有效的纯化制备方法外，还要采用最经济的技术和方法将其规模化生产出来，这是酶工程中需要考虑的一个重要内容。酶的应用是一个需要开拓、不断发展的领域，它面临着许多问题，如酶的应用形式、酶反应器的选择与设计以及酶反应的条件控制等，而酶反应器是其中的中心问题。

### 二、应用形式

随着酶分离纯化、固定化技术的进步，酶的应用形式也在不断地得到改进。对酶反应器而言，由于底物和目标产物不同，酶反应类型、反应条件、规模和要求也不同，因此，酶的成本、稳定性、反复使用的可能性也不同，必须考虑酶应用形式的选择问题，包括以下3类。

#### (一) 完整细胞

该应用形式主要是利用细胞内各种酶用于物质的转化、三废处理等过程而发挥作用。一是利用微生物转化生产不同的产物，如抗生素、蛋白质等；二是利用单种酶，而与微生物本身的生长和代谢活动无关。在第一种情况中，产物的转化一般是在微生物生长的同时或其生长后期，通过它本身的细胞代谢活动完成，要涉及多种酶的联合作用。在第二种情况下，需要特殊的反应条件才能完成特定的生化反应，如加入铁氰化钾加速根瘤土壤杆菌转化蔗糖为3-酮蔗糖。

#### (二) 游离酶

该形式的酶既有胞外酶，也有从微生物代谢产生的胞内来源的酶，主要用于物质转化、产品加工和三废处理等过程中。为提高产品质量，其中的副反应可通过对酶进行不同程度的纯化而克服。游离酶的主要缺点是很难反复使用。

#### (三) 固定化酶

固定化酶主要是利用胞外酶用于物质转化、产品加工、工艺改进及三废处理等过程。由于固定化酶能反复多次使用，反应后可很容易地和反应液分离而保证产品的质量。研究表明，以批量方式应用时，固定化酶至少可反复使用10~15次，某些情况下甚至可达100次以上；以连续方式应用时，也可使用大致相同的时间。最近人们正致力于开发固定化多酶反应器，或将不同酶固定于同一载体或不同载体上。从理论上讲，它兼备完整细胞与固定化酶所具有的优点，但实际应用中尚存在许多问题亟待解决。

对于游离酶和固定化酶的选择，应考虑如下几点：①酶应用的性质与范围；②酶的保存稳定性和操作稳定性；③成本等。

由于大多数酶处于固定化状态时有较高的稳定性，可反复使用，成本相对较低等特点，因此，人们对固定化酶具有更大的兴趣，将来可能成为酶应用的一种主要形式。酶在固定化

过程和应用过程中应考虑以下几方面的问题。

### 1. 酶的固定化方法

(1) 吸附法 (adsorption) 把酶吸附于惰性载体上或吸附于离子交换树脂上。

(2) 包埋法 (entrapment) 把溶液酶包埋于凝胶、中空纤维或微囊内。

(3) 交联法 (cross-linking) 采用双功能或多功能的交联剂,使酶与酶之间相互交联或酶与载体之间交联。此法也常与吸附法或包埋法联合使用,以加强酶与载体之间的结合强度。

(4) 共价结合法 (covalent attachment) 此法系使酶蛋白质上非生物活性部位的功能基团与高聚物载体进行共价键结合。

### 2. 酶固定化过程中应注意的问题

(1) 安全因素 在固定化酶的制备和应用过程中都必须考虑安全因素。除包埋法和吸附法外,在共价结合和交联过程中都有特定的化学反应发生。例如,共价偶联试剂或交联用的双功能试剂本身就具有很强的蛋白质结合性能,还可能在反应过程中形成有毒的副产物。因此,试剂的应用和副产物的残留将构成安全问题,尤其在食品和医药工业中进行应用应特别注意。

(2) 成本因素 将实验室研究的固定化方法运用于大规模实际生产时,除要考虑放大困难外,还应考虑成本不能太高,应具有实际推广价值。当然,在考虑固定化成本时,需将它和总的成本以及和它的工业产值联系起来加以综合考虑。

(3) 产量与活力因素 好的固定化方法应不引起酶活力的失效,固定化酶量大,相对活力高,酶的滞留时间较长。

(4) 稳定性因素 在固定化过程中应考虑酶的操作稳定性 (operational stability)、保存稳定性 (storage stability) 及操作半衰期与保存半衰期。在酶固定化过程中,很多情况下不仅仅只有一种因素,而是两种以上的因素起作用,要将各种因素综合进行考虑。例如,以共价偶联方式进行酶固定化时,其中某些酶分子可能不是通过共价键相连接,而是借助吸附力而固定,这些酶分子在高离子强度下很可能解离脱落。

### 3. 载体的选择

(1) 根据固定化对象确定固定化方法 一般对酶的固定化多采用共价结合、离子结合和物理吸附等方法,而固定化细胞则以包埋法有效。

(2) 根据固定化方法选择载体 具有离子交换基团和吸附蛋白质能力的载体,如 CM-纤维素、DEAE-纤维素、CM-Sephadex、DEAE-Sephadex 及硅藻土、磷灰石等均可作为离子结合和物理吸附法的载体。而具有活性基团如羟基、氨基、羧基、酰氨基、巯基的载体,如多糖类、蛋白质类、多孔玻璃、硅胶等也可经过适当的化学反应结合上更活泼的基团,而直接与酶形成共价键将酶固定化。能形成凝胶或进行凝聚的琼脂、角叉菜胶、海藻酸盐、明胶、聚丙烯酰胺等,可作为包埋法的载体。

(3) 固定化载体的形式 固定化的载体有多种形式:膜片状、管状、纤维状和颗粒状等。非颗粒状载体一般是反应器整体的一个组成部分,在性能上要有足够的机械强度来抵抗反应器中存在的压力降。而颗粒状载体则具有不同形状、大小和密度,既可以是球体状的,也可以是不规则无定形状。球状载体很少出现压密、磨损等问题,而非球状载体则可能因颗粒的大小和出现压密、磨损等问题而妨碍它的应用,单位质量载体上酶的装载容量与颗粒的大小有关。对于非孔型的球状载体,酶的装载容量反比于颗粒的直径。但是,若颗粒太小,反应器有滞留的极限问题,而且比较敏感于机械应力,同时,负荷也将随颗粒的直径而减少。在通常的反应系统中,大多数载体材料的密度略大于水。如果反应系统有不溶性颗粒物

质存在或产生时，为了使固定化酶在反应后易和这些物质分离，使用密度较大的载体就较为有利。

(4) 载体结构 载体结构分为3种类型：孔型、半透膜型和非孔型。采用有孔载体能大大提高酶的装载容量，同时也应注意以下3点。

① 如果酶是包埋在半透膜内，它们有着均一的分布和均一的动力学状态，如果是包埋或偶联于有孔载体内，则由于内扩散效应的影响，接近于载体表面的微环境和载体颗粒内部的微环境将有所不同。

② 如果酶的底物是大分子，则载体的孔径将是一个重要的限制因素。

③ 随着孔的增多、孔径的增大，往往可能给某些载体材料带来机械性能上的问题。

(5) 载体的性质 载体有水不溶性载体和水溶性载体。在固定化酶中通常多采用水不溶性载体。对于以高分子为底物的酶来说，可采用水溶性载体来克服其可能造成的立体障碍。常用的水溶性载体材料有海藻酸、角叉菜胶等。值得注意的是，海藻酸在  $\text{pH} > 4$  时可溶，在  $\text{pH} < 3$  时基本不溶，这样有利于固定化酶的回收。水溶性载体中还包括一些小分子物质，如小分子脂肪酸衍生物，它们对某些酸有稳定作用。

载体也可以分为亲水载体、疏水载体和无机载体。亲水载体适于通常的水溶液反应体系，其机械性能也较差。疏水载体和无机载体由于有较好的机械性能，性能较为稳定，回收也较容易及经济等优点而利于工业上的应用。

载体的亲水与疏水性等特性对反应的动力学特性有很大影响，它们可能直接影响酶的催化性质，也可能通过分配系数的变化而影响反应的最适  $\text{pH}$  值和  $K_m$ ，但在酶反应器中这种影响由于以下两点而显得没有太大作用：第一，在酶反应器中使用的底物浓度一般远远大于  $K_m$ ；第二，对于带电的产物和底物系统来说，如果由它们产生的离子强度足够高，这种影响也往往可以忽略。

(6) 酶偶联量或装载量和实效系数 实效系数是指可以有效地发挥催化作用的酶分子占总的固定化酶分子的比例。有孔型载体，特别是小颗粒载体可大大提高酶的装载容量。但在高装载量下，并非所有的固定化酶分子都能有效地发挥作用。颗粒较小时实效系数较高；单位载体上固定化的酶量较小，实效系数也较高；酶装载量如果太小，实效系数虽然高，但总的活力小，也不经济。因此，在酶装载量和实效系数之间必须加以适当平衡。

## 第二节 酶反应器的分类与特点

### 一、酶反应器简介

生物反应器是用于完成生物催化反应的装备，它包括发酵反应器和酶反应器两种，前者是以生长的非固定化细胞进行生化反应的装置，后者是利用固定化酶或固定化细胞进行生化反应的装置。一般称发酵反应器为发酵罐，而把以酶作为催化剂进行反应所需的设备称为酶反应器。酶反应器是游离酶、固定化酶或固定化细胞催化反应的容器，它不同于化学反应器，反应时的耗能和产能也比较少，通常在常温、常压下发挥作用。酶反应器研究的中心问题是要合理应用酶，降低产品成本，提高产品质量。具体地说，包括选择适宜的酶应用形式、选择适宜的反应器、选择适宜的反应操作条件。

### 二、酶反应器的分类及特点

酶反应器的类型很多，其分类方法也不同。根据几何形状和结构，可分为罐型、管型、膜型或片型几种。按进料和出料的方式可分为分批式、半分批式与连续式反应器。按其功能

结构可分为膜反应器、液-固反应器及气-液-固三相反应器 3 大类。根据酶的应用形式可分为直接应用天然酶进行反应的游离酶反应器和应用固定化酶进行反应的非均相酶反应器。均相酶反应能够在批式反应器或超滤膜反应器中进行,而非均相酶反应可在多种反应器中进行。非均相酶反应器的种类很多,大致可以根据催化剂的性状来选用。按酶的反应类型,可以将酶反应器分成以下几种类型。

### (一) 游离酶反应器及特点

#### 1. 搅拌罐式反应器

目前较常使用的游离酶反应器是搅拌罐式反应器,它由容器、搅拌器及保温装置组成。为促进反应物的混合,也可在容器壁上装上挡板。搅拌罐式反应器又可分为分批式和半分批式。其中,分批式是先将酶和底物一次装入反应器,在适当温度下开始反应,达到一定时间后,将全部反应物取出。而半分批式是将底物缓慢地加入反应器中进行反应,到一定时间后,将全部反应物取出。在反应出现底物抑制时,需采用半分批式操作。此类反应器不能进行酶的回收使用,一般在反应结束后通过特定的方法使酶变性除去。该类反应器结构简单,不需特殊设备,适于小规模生产。

#### 2. 超滤膜反应器

采用这种型式的反应器时,酶处于水溶液状态,由于膜是蛋白质(大分子)物质,具有选择透过性,因此,只允许小分子产物透过,而酶被截留回收,重新使用,可节省用量,特别适用于价格较高的酶。这种反应器可用于分批操作,也适用于连续操作,即一边连续地将底物加到反应器中,一边连续地排出生成物。膜的形状有平板状、管状、螺旋状和中空纤维状。此反应器可作用于胶态或不溶性底物,特别是产物对酶有抑制作用时,采用此装置较为合适。但是,酶的长期操作稳定性差,有吸附损失或在膜表面浓缩极化。

### (二) 固定化酶反应器及特点

#### 1. 搅拌罐型反应器

搅拌罐型反应器有分批反应器(bath stirred tank reactor, BSTR)和连续流搅拌罐反应器(continuous flow stirred tank reactor, CSTR)两种。其特点是:内容物混合充分、均匀。其优点是:结构简单,温度和 pH 值容易控制,传质阻力较低,能处理胶体态底物及不溶性底物,固定化酶易更换等。其缺点是:反应效率较低,载体易被旋转搅拌桨叶的剪切力所破坏,搅拌动力消耗大。

① 分批反应器(BSTR)的特点是:底物与酶一次性投入反应器内,产物一次性取出;反应完成之后,用过滤法或超滤法回收固定化酶或细胞,再转入下一批反应。该反应器具有装置简单、造价较低、传质阻力较小、反应能迅速达到稳态等优点。同时,它具有操作麻烦、固定化酶经反复回收使用时易失去活性等缺点。在工业化生产中,常用于游离酶分批反应器中,在固定化酶中的应用较少。

② 连续流搅拌罐反应器(CSTR)又称为连续流搅拌釜式反应器。其特点是:向反应器投入固定化酶和底物溶液,不断搅拌,反应达到平衡之后,再以恒定的流速连续流入底物溶液,同时以相同流速输出含产物的反应液。它具有在理想状况下混合良好、各部位组成相同,并与输出成分一致的优点。但具有搅拌桨剪切力大、易打碎磨损固定化酶颗粒等缺点。

#### 2. 固定床型反应器

固定床型反应器又称填充床型反应器(packed bed reactor, PBR),它是将颗粒状或片状等固定化酶填充于固定床中,制成稳定的柱床,然后,通入底物溶液,在一定的反应条件下实现酶催化反应,以一定的流速,收集输出的含产物的转化液。由于在柱床中液体流动型

态接近于活塞流型，因此，PBR可以近似地看成是一种平推流型反应器。它是一种单位体积催化剂负荷量多、效率高的反应器，具有效率高、易操作、结构简单等优点，是目前工业生产及研究中应用最为普遍的酶反应器。它适用于各种形状的固定化酶和不含固体颗粒、黏度不大的底物溶液，以及有产物抑制的转化反应。其缺点是：①温度和pH值难以控制；②底物和产物会产生轴向浓度分布；③清洗和更换部分固定化酶较麻烦，床内有自压缩倾向，易堵塞，且床内的压力降相当大，底物必须在加压下才能加入；④传质系数和传热系数相对较低。由于固体颗粒易堵塞柱床，黏度大的底物溶液难以在柱床中流动，而使得当底物溶液含固体颗粒或黏度很大时，不宜采用PBR。近年来，PBR产品类型有带循环的固定床反应器和列管式固定床反应器。

### 3. 流化床型反应器

流化床型反应器（fluidized bed reactor, FBR）是一种装有较小颗粒，可为柱形、锥形等的垂直塔式反应器。底物溶液以足够大的流速，从反应器底部向上通过固定化酶柱床时，便能使固定化酶颗粒始终处于流化状态，其流动方式使反应液的混合程度介于CSTR和PBR之间。它有下列优点：①具有良好的传质及传热性能，pH值、温度控制及气体的供给比较容易；②不易堵塞，可适用于处理黏度高的液体；③能处理粉末状底物；④即使应用细粒子的催化剂，压降也不会很高。其缺点是：①需保持一定的流速，运转成本高，难于放大；②由于颗粒酶处于流动状态，易导致粒子的机械破损；③由于流化床的空隙体积大，酶的浓度不高；④由于底物高速流动使酶冲出，降低了转化率。为避免催化剂冲出，使底物完全转化成产物，可使底物进行循环或使用几个流化床组成的反应器组，或使用锥形流化床。

### 4. 膜型反应器

由膜状或板状固定化酶或固定化微生物组装的反应器均称为膜型反应器。膜型反应器主要有用固定化酶膜组成的平板状或螺旋状反应器、转盘型反应器、空心酶管和中空纤维膜反应器等多种类型。各种膜型反应器特点如下。

① 平板型和螺旋卷型反应器具有压力降小、膜面积清晰、放大容易等特点。但与填充塔等相比，反应器内单位体积催化剂的有效面积较小。

② 空心酶管反应器是将酶固定在钢管的内壁上的，底物溶液流经细管时，只有与管壁接触的部分进行酶反应。管内径在1mm左右，管内流动属于层流。这种反应器除了工业上应用外，更多的则是与自动分析仪等组装在一起，用于定量分析。

③ 转盘型固定化酶反应器是将含酶的膜片与支持材料交替地缠绕在中心棒上。一般用胶原蛋白制作膜片，用网状惰性物作支持材料。支持材料将相邻的两层含酶膜片分开，防止膜层相互重叠，堵塞流道。上述螺旋元件装进两端加盖板的圆筒，即安装进出口管，就制成了螺旋卷膜反应器。含酶的膜是只允许小分子的底物和产物通过的半透性膜，而大分子酶则不能通过。该反应器的优点：a. 螺旋模型将流体流动的单元分隔成许多独立空间，当底物溶液流经各个独立空间，并与酶接触时，均有相同的流体力学条件和停留时间，从而改善接触效果，消除短路；b. 网状支持材料可以提高每一流动间隔的混合效果，加快物质传递。

④ 中空纤维膜反应器是由数千根醋酸纤维制成的内径200~500 $\mu\text{m}$ 、外径300~900 $\mu\text{m}$ 的中空纤维组成的。中空纤维壁的内外结构一般不同。其内层是紧密光滑的半透性膜，有一定的分子截留值，可以截留大分子物质，而允许小分子物质通过。其外层是多孔海绵状支持层。将酶固定于中空纤维的支持层中，然后将许多含酶的中空纤维集中成一束装进圆筒内，筒两端封闭，安装进出口管道，便制成了中空纤维膜反应器。在反应器中，酶与中空纤维的安排方式有两种：a. 将酶固定于中空纤维壁的海绵状外层中，操作时，底物流经纤维内腔扩散到纤维外层，发生酶反应，产物扩散到纤维外室；b. 酶位于中空纤维内腔，底物流经

纤维外室，扩散进入纤维内腔，发生酶反应，产物扩散到纤维外室。中空纤维膜反应器分超滤反应器、反冲反应器和反循环反应器3种类型。超滤反应器是将酶固定在中空纤维壁的海绵状外层上，通过超滤底物透过内壁与酶进行反应，根据反应条件，滤过的溶液或者排放或者循环再使用。反冲反应器是将底物溶液自纤维外室压入，酶既可以是游离的，也可以是以固定化方式存在于纤维壁外层的。反循环反应器则是根据压力差，在纤维的上半部，底物由内向外流动，而在纤维的下半部，则由外流入内，酶可以固定于纤维壁的海绵状外层中，也可以游离形式存在于外层溶液中。该反应器具有纤维束内流体流动不均匀、物质传递有较大阻力等缺点。

#### 5. 鼓泡塔型反应器

在生物反应中，当涉及有气体的吸收或产生时，最好采用鼓泡塔型反应器或三相流化床反应器。一些无载体固定化新鲜菌体的反应器也采用塔型反应器。把固定化酶放入反应器内，底物与气体从底部进入，气体进入反应器前后经过气体分散板得到充分分散，甚至和循环液从底部以切线方向进入，以促使反应器的流动状态符合要求。

### 第三节 酶反应器的设计与选型

#### 一、酶反应器的设计

酶反应器的设计要考虑既能充分发挥生物反应器的优点，又可以克服一些限制因素，以最低的生产成本，获得最高的产量和质量的酶反应器。

反应器设计的基本要求是通用和简单，设计的目的是希望酶反应器在时间上、空间上、经济上最佳。应用固定化酶的工艺过程也不例外。该过程包括酶的生产、精制、固定化、反应、产物的提纯精制以及许多辅助生产过程等。必须在综合考虑这些分过程和辅助过程及它们之间的相互作用和结合方式等因素的基础上，对整个工艺过程进行最优化。酶反应器的设计原理如下。

- ① 底物的酶促反应动力学以及温度、压力、pH值等操作参数对此特性的影响。
- ② 反应器的类型和反应器内流体的流动状态及传热特性。
- ③ 需要的生产量和生产工艺流程。

上述3项组合所建立的式子被称为设计方程式或操作方程式。通常情况下，要建立数学模型，把所要设计和控制的各个量即设计变量和操作变量等以数量表示，制订出打算进行最优化的定量函数（目标函数或评价函数）。表示物料平衡、热量平衡、反应动力学和流动特性等的各关系式都是反应器设计所需要的。

#### 二、酶反应器的性能评价

反应器的性能评价是在模拟原生产条件的情况下，通过测定活性、稳定性、选择性、达到的产物产量、底物转化率等来衡量其加工制造质量。测定的主要参数有空时、转化率、生产强度。

#### 三、与设计有关的参数

空时是指底物在反应器中的停留时间，是反应器体积与底物体积流速之比，又叫稀释率。在底物或产物不稳定或容易产生副产物时，应使用高活性酶，并尽可能缩短反应物在反应器内的停留时间。

转化率是指每克底物中有多少克转化为产物。在设计过程中应尽可能利用最少的原料得

到最多的产物。可能的话,使用纯酶和纯的底物以及减少反应器内的非理想流动,有利于选择性反应。同时,使用高浓度的反应物对产物的分离也有利,尤其是当生物催化剂选择性高而反应不可逆时更加有利,也可以使待除去的溶剂量大大降低。

酶反应器的生产强度表示每小时每升反应器体积所生产的产品质量(g)。其大小主要取决于酶的特性、浓度及反应器特性、操作方法等。使用高酶浓度及减小停留时间能提高生产强度,但并不是酶浓度越高、停留时间越短越好,这样会造成浪费,在经济上不合算。总体而言,酶反应器的设计应该是在经济合理的基础上提高生产强度。同时,考虑到酶对热的不稳定性,设计时还应特别注意质与热的传递,最佳的质与热的转移可获得最大的产率。

#### 四、选择反应器时应考虑的因素

选择酶反应器时应考虑酶的应用形式、底物的物理性质、酶反应动力学、酶的稳定性、反应操作要求、应用的可塑性及成本等。

##### 1. 酶的应用形式与反应器选择

由于回收游离酶有一定困难,所以除了BSTR外,其他反应器一般都不适用。在CSTR和PBR类型的反应器中,颗粒状或片状固定化酶都适用,但膜状和纤维状固定化酶却只适用于填充床操作。另外,如果颗粒状酶易变形或易凝集,或者为了提高催化剂表面与反应器的体积比而需要使用小颗粒状酶或碎片状固定化酶时,这些小颗粒在PBR中往往会产生很高的压降,造成压密堵塞现象,大规模操作常不易获得足够的流速,此时用FBR则可以克服这一困难。

##### 2. 底物的物理性质

底物共有3种形式:可溶性物质、颗粒物质和胶体物质。溶解性底物适用于任何类型的反应器。在颗粒体或胶体状底物可能堵塞填充床的情况下,应用CSTR、FBR较为适合,同时高的搅拌速率、高的流速有利于减少底物颗粒的集结、沉积和堵塞,能使底物保持悬浮状态。同时,应注意高速搅拌等导致酶从载体上脱落。

##### 3. 酶反应动力学

对于大多数酶反应而言,由于在填充床反应器中,底物在每点上相对最终转化来说都处于最大状态,而在连续流搅拌桶式反应器中则恰恰相反,因此PBR的平均反应速率高于CSTR。当产物对反应有抑制作用时,这一优越性将更为突出;当底物对反应有抑制作用时,受到的影响却比PBR小。另外,在CSTR中,酶催化的反应速率随搅拌速率而改变,在PBR中,酶催化的反应速率则随流速而改变。

##### 4. 酶的稳定性

在反应器运转过程中,由于高速搅拌、高速液流的冲击,常使酶受到切变力作用而导致酶结构扭曲而失效,或导致酶从载体脱落,或导致固定化酶磨损最后从反应器中流失。在各种类型的反应器中,CSTR一般远比其他反应器更易引起这类切变损失。

##### 5. 操作要求、应用的可塑性及成本

在选择反应器时,还应考虑到其应用的可塑性,最好是所选反应器有多种用途,可生产多种产品,以降低成本,节约投资。有些酶反应需要不断调整pH值,有些则需要经常供氧,也有的需要间歇地补充反应物,此外,还有一些情况需要不断进行酶的更新。对于这些问题,CSTR类型的反应器可以不中断运转过程而顺利地实行,PBR则不行。

CSTR反应器应用的可塑性较大,结构较简单,成本低。而PBR反应器则逊色些。但是,在考虑成本时,还需注意到酶本身的价值与其在相应的反应中的稳定性。

综上所述,在选择反应器类型时没有一个简单的法则或标准,必须根据具体情况,综合

各种因素来决定。下面再将各类反应器的主要特征加以归纳比较。

BSTR 和 CSTR 的共同特征是：结构简单、操作方便、适用面广（包括可用于黏性或难溶性底物的转化加工），在底物表现抑制作用的情况下可以获得较高产量。BSTR 还可用溶液酶催化，而且比 CSTR 简便。

PBR 最突出的优越性是它有较高的转化率，特别是当产物对反应表现抑制作用时受到的影响较小。缺点是用小颗粒固定化酶时可能产生高的压降和压密现象，底物如具有不溶性、黏性大等特性，这类反应器不适用。

FBR 的优点：物质交换和热交换特性较好，不引起堵塞，可用于不溶性底物或黏性底物的转化，低压降。缺点是：需要消耗较大的动力，不易直接模仿放大。

膜反应器压降小，膜面积清晰，更换容易，放大也较容易，可承受较大的压力。但是反应器内单位体积催化剂的有效面积较小，成本也较高。

一个理想有效的反应器最好能包括上述各种类型的反应器的优点。所以，除了前述的各种类型外，人们还在开发其他更好的形式。

## 第四节 酶反应器的操作

酶工程主要解决如何降低酶催化过程的成本，即能以最少量的酶、最短的时间完成最大量的反应。要完成这个任务，除要选择恰当的酶应用形式，选择和设计合适的酶反应器以外，还要确定合理的反应操作条件。这三者往往是联系在一起的。在酶反应器的操作中，应注意：①控制酶反应器中流体的流动状态；②维持酶反应器的恒定生产能力；③保持酶反应器的稳定，使其能长期运转使用；④防止酶反应器的污染。

### 一、酶反应器中流动状态的控制

酶反应器在操作运转中，反应器中流动方式的改变会使酶与底物的接触不良，造成反应器生产力降低。由于流动方式的改变，造成返混程度的变化，为发生副反应提供了机会。由于压降不断加大，载体填充不规则以及底物上柱不均匀都会产生沟流或部分堵塞，偏离预期的流动状态。在填充床型反应器中，柱高及通过柱的液流流速是决定压降的主要因素。在非压缩性联体柱中压降与流速成线性关系，对流动的阻力是恒定的。易变形或可压缩载体柱的压降随流速的增加而成指数增加。开始时，压缩增加很快，压缩率随时间延长而成指数降低。对于高大的反应柱，为减少压缩作用，可使用较大的、不可压缩的、光滑的、珠形的填充材料，均匀填充及严格控制好流率。在搅拌罐型反应器中，应注意控制好搅拌速率，防止搅拌不均匀或搅拌速率过快，避免使固定化酶产生破碎、失活等现象。有时，固定化酶可能积聚在出料口过滤器上，因而造成酶分布不均匀，解决的办法是在出料口和进料口各装一个过滤器，间隔一定时间后，出口过滤器用进料液反冲，原来的进料口作为出口。

酶反应器的操作中，还应注意阻塞现象。阻塞会引起酶活性损失，这是由于固体或胶体物质沉积妨碍了底物与酶接触。阻塞主要分为两种类型：外阻塞和内阻塞。外阻塞将酶颗粒之间的空隙填塞，最初发生沟流，以后使柱完全堵塞，即使在高压差下液流也不能通过柱。内阻塞是单个酶颗粒的孔内像超滤膜或多孔小粒上的一样，形成一薄层，虽说流体还能自由通过填充柱，但只有很少底物能透过载体颗粒内部，并与固定化酶接触。内阻塞和外阻塞常在一系统内同时发生，也可单独发生。在搅拌型反应器中，出口和进口过滤器的阻塞是主要问题。对于填充床型反应器，当柱的入口处沉积形成紧密的薄层或者底物流量很大时，特别容易形成阻塞。采用间隔式填充，反冲洗柱床或重新装柱，间隙通上行空气流可以避免柱的

阻塞。另外，使底物高流速循环有助于避免阻塞。当使用浓的黏性底物时，阻塞作用也会加重，可采取措施对底物进行预处理。

## 二、酶反应器恒定生产能力的控制

在使用填充床型反应器时，要维持恒定的生产能力有时很难做到。通过控制反应器的流速是一种常用的方法。连续或间歇降低流速可保持转化率恒定，但在生产周期中，单位时间产物的含量会降低，必须根据一定时间内形成产物的量决定流速，而不能按活性或一定时间内达到的百分转化率。扩散限制作用会产生延滞期，即在反应器开始工作后的一段时间内表现出活性不降低，进入这一时期有助于达到恒定的转化。用增加温度的办法也可以维持产量恒定，在反应过程中，随时间而出现的酶活性损失将被较高温度下酶活性的增加所补偿，比较复杂的温度变化可采用微处理机系统精确地加以控制。

将若干使用不同时间和处于不同阶段的柱反应器串联，并与控制流速、提高温度等方法相结合是普遍采用的方法。不断用新柱代替活性已耗尽的柱，使每个柱的生产能力不断衰减，但总的固定化酶的量不随时间而变化。反应器的数量越多，积聚的反应产物的浓度变化就越小。当使用许多较小的柱反应器时，柱的压缩问题也越小。

使用适当的反应器，并维持恒定转化率时，输出水平可以在一定范围内进行变化。通常允许流速在 $\pm 5\%$ 范围内波动。采用错开启动，掌握好换柱时间，能使在预定的输出或转化水平时具有最小波动，反应器也能平稳工作。国外多数工厂最少使用6个柱的反应器组，并用微处理机反馈控制。增加反应器数量可具有更好的操作适用范围，并能减小流速的波动。

反应器可以串联，也可以并联。串联操作要控制的物流较小，酶能较充分地利用，但是操作中的压降和压缩问题比较大。并联有最好的操作适应性，每个反应器基本上可以单独工作，每个单元能很方便地加入或离开运转系统，实际生产中的状态主要取决于各种相互关联的运转参数的含量，重要的参数有固定化载体成本、底物通过反应器的流速、固定化细胞或固定化酶的活性和稳定性等。

## 三、酶反应器的稳定性

酶的稳定性对酶反应器的功效非常重要。为使酶反应器能长期运转使用，最主要的工作是防止酶的变性或中毒失活，以及固定化酶的自溶或载体磨损造成酶的损失。

许多因素会影响实际工作中固定化酶的稳定性，包括底物中某些物质对酶的不可逆抑制作用。引起酶变性作用的最主要因素是温度、pH值、氧化、离子强度及剪切力。此外，还有微生物或酶的作用，尤其是阻塞柱的微生物产生的蛋白酶。酶反应器操作的最适温度是经验性的，较高的温度可增加初期产量和减少微生物污染，但温度过高会造成酶失活加速，缩短酶反应器的使用时间。同样，酶反应器对pH值、离子强度等都有一定的要求，操作中应严格控制，保持酶反应器的稳定。酶还可能受到抑制剂如进料溶液中重金属的毒害而中毒失活，解决的办法是在进料液中添加螯合剂如EDTA。很多酶受底物保护而稳定，结合于细胞的酶在没有底物时失活很迅速，因此，底物的存在对固定化酶是有好处的。

操作中还应注意酶或载体的溶解，酶从载体上脱落以及载体磨损破碎会造成酶的损失。吸附法固定化的酶连续暴露在大量反应液中，尤其在高浓度底物或高浓度盐中会逐步解吸，需采取措施加以克服。有些载体如多孔玻璃会随着使用而溶解，克服的办法是用金属氧化物包裹。在连续搅拌罐反应器或流化床反应器中，酶颗粒的磨损随切变速率、颗粒占反应器体积的比例增加而增加，而随悬浮液流的黏度和载体颗粒强度的增加而减小。解决这个问题的一个新办法是用电磁场搅拌固定化在磁性载体上的酶。

## 四、酶反应器的微生物污染

酶反应器与发酵反应器不同，不必在完全无菌的条件下操作，主要是不需要提供微生物生长的良好条件和丰富的营养物质，但要在具备必要的卫生条件下进行操作。特别是在生产食品和医药产品时卫生条件要求更加严格，要常检测，避免微生物污染，最好尽量做到在无菌条件下进行操作。若底物就是微生物生长所需的营养物质，很容易产生微生物污染。在反应器中存留的时间长或反应器内有易滋生微生物的滞留区或粗糙表面，也很容易引起污染。

防止微生物污染非常重要，这不仅因为不希望介质中有微生物存在，还因为微生物堵塞柱，会消耗底物或产物，产生酶和代谢产物，进而使产物降解，或者产生副产物，或者使固定化酶活性载体降解，当产物如抗生素、酒精、有机酸抑制微生物生长时，污染会减小。向底物加入杀菌剂、抑菌剂、有机溶剂或对底物料液进行过滤等方法均是防止污染的措施之一。在温度 45℃ 以上或在酸性、碱性缓冲液中进行操作都可以减少微生物污染。高浓度底物可以提高渗透压、降低水分活度，也可以抑制微生物生长。

酶反应器在每次使用后，要进行消毒，可用酸性水或含有过氧化氢、季铵盐的水反冲。在连续运转过程中也可周期地用过氧化氢或 50% 甘油水溶液处理反应器，以防止微生物生长。但所有这些操作中，必须考虑在这些条件下固定化酶的稳定性是否受到影响。

## 第五节 酶反应器的应用与发展

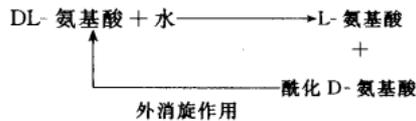
### 一、酶反应器的应用

固定化酶反应器主要应用于连续工业化生产中。具体体现在以下方面。

#### (一) 在氨基酸工业上的应用

##### 1. 利用氨基酰化酶制造 L-氨基酸

利用传统发酵法或酶法制备的氨基酸均为 L-氨基酸。但用化学合成法生产的氨基酸是 L 型（天然型）和 D 型（非天然型）的等量混合物（DL 型），这是一种非光学活性体。然而，只有 L 型是有效的。因此，从大量廉价的化学合成产物中进行光学拆分是 L-氨基酸生产中的重要问题。氨基酸的光学拆分方法很多，其中以酶法为优，可制得光学纯度好、收率高的 L-氨基酸。其反应示意如下。



两种产物可通过溶解度之差加以分离。从 1954 年起氨基酰化酶就被用于从化学合成的乙酰 DL-氨基酸混合物中进行选择性拆分制备 L-氨基酸；到了 1969 年，人们将它制成了世界上第一个用于工业生产的固定化酶。

(1) 氨基酰化酶的固定化方法和载体的比较 由于是使用水溶性酶进行间歇式反应，所以必须经过预热处理及酸处理从反应液中提取 L-氨基酸，以去除酶蛋白和其他杂质。这些操作既降低了 L-氨基酸分离精制的收率，也耗费较多的劳力。为解决这些问题，改进酶法生产的技术，对氨基酰化酶的固定化技术进行了详细的研究。结果表明：物理吸附法效果都很差。但如果用弱碱型纤维素或葡聚糖作为载体，通过离子交换吸附，则可获得高活性和高产值的固定化酶；与此相反，弱碱性合成树脂或 Sephadex 阳离子交换剂则不行。在共价偶联法中，以重氮化的芳香氨基玻璃为载体虽然可以得到活性很高的固定化酶，因为它不稳

定, 无法进行应用; 另一方面, 以卤素取代的乙酰基纤维素为载体的固定化酶, 在活性和稳定性方面则相对较好。交联法在此酶的固定化中效果不佳。在包埋法中, 聚丙烯酰胺包埋可以获得较好的效果, 尼龙包埋次之。

(2) 固定化氨基酰化酶的性质 为选择适于应用的固定化酶, 人们对 DEAE-Sephadex A-25 交换吸附的氨基酰化酶、碘代乙酰纤维素共价偶联的氨基酰化酶及聚丙烯酰胺凝胶包埋的氨基酰化酶进行了比较, 相对于游离酶的结果表明: ①上述各固定化酶的最适 pH 值没有大的偏移 (0.5~1.0); ②固定化酶在金属离子、抑制剂等影响下的反应性、底物专一性及动力学常数也都没有太大的变化; ③固定化酶的热稳定性比游离酶显著升高, 其中 DEAE-Sephadex A-25 固定化尤为突出; ④最适温度和反应活化能有所不同, DEAE-Sephadex A-25 交换吸附的氨基酰化酶最适温度明显升高; ⑤操作稳定性的实验表明, DEAE-Sephadex A-25 交换吸附的氨基酰化酶在 50℃ 中使用的半衰期可达 65 天, 包埋酶在 37℃ 中为 48 天。

(3) 适于工业应用的固定化氨基酰化酶的选择 由于酶和载体的成本都比较高, 为满足工业化生产的要求, 根据固定化酶的稳定性及其可再生性, 人们进一步对上述 3 种固定化酶进行了分析比较。首先否定了碘化乙酰纤维素固定的酰化酶, 因为它要通过偶联制备, 较为繁复, 又很难再生; 其次也否定了包埋酶, 主要是它的操作稳定性较低, 而且也不易再生。DEAE-氨基酰化酶从成本、制备、酶活性、稳定性上都明显优于前两种, 虽然该酶和载体的结合力相对较弱, 但其再生简便, 是理想的应用形式。

(4) DEAE-Sephadex 氨基酰化酶的制备 DEAE-Sephadex 氨基酰化酶制备的最适条件已经确定: 1000L DEAE-Sephadex A-25 预先用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 平衡, 然后加入 1100~1200L 的酶液 (总单位数约  $3.3 \times 10^8$ ), 35℃ 中搅拌交换吸附约 10h, 即可获得每升 160000~200000U 的固定化酶。

(5) 氨基酰化酶反应器 氨基酰化酶通常以 PBR 方式应用。为进行有效的催化应考虑以下因素: ①底物流注方式; ②柱面积对反应速率的影响; ③压降。

底物溶液以上行或下行方式流注对反应速率都无明显影响, 但从上行方式加入底物可能带来气泡, 以选择下行为佳。通过对相同体积、不同长度的酶柱进行实验比较, 除少数情况外, 柱面积对反应速率没有大的影响。实验表明, 在特定温度条件下, 柱的压降和流速与柱长有关。

(6) 底物溶液流速 为使乙酰 DL-氨基酸得到完全的不对称水解, 控制底物溶液流速十分重要。一般来说, 50℃ 的反应条件下, 每小时 1 个床体积的流速可以获得高的转化。

(7) 固定化氨基酰化酶的再生 DEAE-Sephadex 离子交换吸附的氨基酰化酶, 具有很高的操作稳定性, 并能在使用一定时间后, 加入相当于损失的酶量使之简便地再生。

## 2. L-氨基酸的连续生产

以 L-甲硫氨酸生产为例。0.2mol/L 乙酰 DL-甲硫氨酸的 pH7.0 溶液含  $5 \times 10^{-4}$  mol/L  $\text{Co}^{2+}$ , 在 50℃ 条件下, 以 2000L/h 流速通过 1000L 酶柱, 流出液进行蒸发浓缩, 结晶出 L-甲硫氨酸; 余下乙酰 D-甲硫氨酸母液, 再在 60℃ 中加热, 以乙酸酐消旋, 调整 pH1.8, 分离出乙酰 DL-甲硫氨酸, 作为底物再输入反应器中进行水解。

由于固定化酶比溶液酶稳定, 而且可反复使用, 因此酶的消耗可由原来占总成本的 25% 以上降至约 1%; 由于固定化酶的生产过程可以自动控制, 加上产品的纯化步骤可以简化, 劳动力成本也可由原来的 20% 降至 7%~8%; 由于产值的升高、纯化步骤的简化, 底物能获得充分利用, 从而成本也能节省 10% 以上; 在减去固定化酶制备等的费用后, 固定化酶用于氨基酸生产成本可比原来溶液酶工艺降低 40% 左右。

### 3. 利用固定化微生物细胞连续生产 L-天冬氨酸

天冬氨酸广泛用于医药和食品工业，特别是由天冬氨酸和苯丙氨酸可合成二肽甜精，使天冬氨酸的需要量大增，促进了天冬氨酸的酶法生产。

在工业上，天冬氨酸是由反丁烯二酸和铵在天冬氨酸酶的催化下生成的。为了用固定化天冬氨酸酶进行 L-天冬氨酸的连续化生产，需从大肠杆菌中提取天冬氨酸酶。但这种酶在提取过程中活性收率、稳定性均未能满足要求，加上用传统方法生产 L-天冬氨酸的价格并不十分昂贵，因此，设想能否直接固定化具有高活力天冬氨酸酶的大肠杆菌，以进行 L-天冬氨酸的连续化生产。

(1) 固定化菌体制备 聚丙烯酰胺包埋和戊二醛交联都能获得活性催化剂，前者更佳。实验发现，将固定化大肠杆菌在含有 1mmol/L  $Mg^{2+}$  的 1mol/L 延胡索酸铵溶液、pH8.5、37℃ 中悬浮 24~28h 后，天冬氨酸酶的活性可升高 9~10 倍。这是由于大肠杆菌在凝胶中发生了自溶，增大了底物和/或产物的透性所致。

(2) 固定化菌体的性质 研究表明：①固定化菌体和菌体的最适 pH 值不同，前者为 8.5，后者为 10.52；② $Mn^{2+}$  对溶液酶和固定化酶都有活性作用，但对菌体和固定化菌体则无；③ $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  对菌体与固定化菌体的热稳定性都有保护作用；④上述离子对固定化菌体的长期操作有稳定作用。

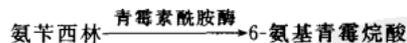
(3) 反应器的应用 研究表明：①底物溶液流速控制在每小时 0.8 床体积时，延胡索酸铵可完全转化为天冬氨酸；②低温条件下，固定化菌体柱的操作半衰期可以很长，37℃ 可达 120 天以上；③固定化菌体柱连续转化产率可达理论值的 95%，成本比直接应用菌体可降低 30% 以上。

### 4. 固定化微生物细胞生产 L-丙氨酸

L-丙氨酸在医药、食品工业上应用很广泛。自 1964 年起，千叶等人以 L-天冬氨酸为原料，利用达肯假单胞菌 (*P. dacinhae*) 的 L-天冬氨酸  $\beta$ -脱羧酶的催化作用，进行了 L-丙氨酸的工业化生产。当采用  $\kappa$ -角叉菜聚糖为载体，固定化达肯假单胞菌连续化生产 L-丙氨酸时，有两个突出的问题：①随反应的进行产生大量  $CO_2$ ，反应液的 pH 值偏向碱性一侧，但酶促反应的最适 pH6.0；②酶促反应系统为气、液、固三相反应系统，当采用一般的柱式反应器时，底物溶液的流动状态形成不了活塞流状态，反应效率下降。为此，开发设计了加压式连续反应装置。采用这套设备，与常压法相比较，pH 值几乎没有升高，流动状态较为理想，生产效率提高 50%。

#### (二) 在抗生素工业中的应用

青霉素酰胺酶催化氨苄西林生成 6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 的反应如下。

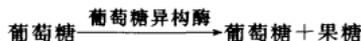


6-氨基青霉烷酸是生产半合成青霉素的关键中间体。B. Ekstrom 等人从大肠杆菌中提取出青霉素酰胺酶，固定化于经 BrCN 活化的 Sephadex G-200 中，用于 6-APA 的工业化生产。采用搅拌罐，分批式反应，反复进行 60 多次，每次过滤回收固定化酶。但在反应过程中由于杂菌污染使固定化酶活力急剧下降。应用这种方法得到的 6-APA 较由菌体所得到的纯度高，抗原性能好。另外，佐藤等人利用聚丙烯酰胺包埋固定化具有青霉素酰胺酶的大肠杆菌细胞，并将其填充于反应柱内，可获得转化率为 85%~90% 的 6-APA，在 30℃ 时半衰期为 42 天。

#### (三) 果葡糖浆的生产

果葡糖浆无论从甜度还是从成本上讲均较蔗糖理想，特别是在食品工业中的应用非常广

泛。果葡糖浆的制备包括分解淀粉获得葡萄糖、葡萄糖在葡萄糖异构酶的作用下生成含葡萄糖和果糖的混合物——果葡糖浆。在工业生产中是利用固定化葡萄糖异构酶来催化葡萄糖的异构化反，其反应机理如下。



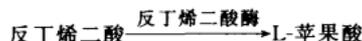
微生物酶催化葡萄糖异构化反应的研究始于 1957 年，而工业化生产始于 1966 年。进入 20 世纪 70 年代，由于固定化技术的发展，迎来了果葡糖浆生产的新时期。固定化葡萄糖异构酶的方法有多种。加热固定菌体是指培养的菌体当其酶活力达到最大时，加热处理使蛋白酶等引起自溶的酶失活，将酶固定化于菌体内部的一种方法。

果葡糖浆生产过程由淀粉的液化与糖化工段、一次精制工段、异构化工段和二次精制工段 4 部分组成。一般来说，异构化反应需连续进行，固定化酶（菌体）制成球形或圆柱状，填充于填料塔内，底物以一定流速连续供给，温度保持在 60~65℃，反应时间以葡萄糖的转化率达到 42%~45% 为准。另外，美国 Standard Bruns 公司采用分批式反应，将固定化酶（菌体）制成直径与厚度之比为 10~1000 的薄板状，然后装配成厚度为 3~5cm 的饼状，将几台或几十台这种形式的反应器连接起来使用。

异构化和以脱色、脱盐为目的的精制操作的成本在果葡糖浆生产中占总成本的很大部分。如果能够生产出不需  $\text{Ca}^{2+}$  为稳定剂的  $\alpha$ -淀粉酶的话，就可去除一级精制操作。另外，采用连续操作，有利于降低色度，减轻精制的负担。

#### （四）在有机酸工业中的应用

L-苹果酸在生物代谢过程中起着重要作用，并作为医药、食品及工业原料而广泛应用。L-苹果酸的生产方法有从天然果汁中提取、化学合成 DL 型后的光学拆分和发酵法等。工业上利用如下酶促反应由反丁烯二酸来生产 L-苹果酸。



千叶等人通过研究发现，黄色短杆菌（*Brevibacterium flavum*）具有较高的反丁烯二酸酶活性；另外，利用  $\kappa$ -角叉菜聚糖进行固定化时，加入单宁等亲水化合物，较使用聚丙烯酰胺固定化，无论在稳定性还是在产率等方面都有很大改善。

日本田边制药株式会社已经采用  $\kappa$ -角叉菜聚糖固定化微生物细胞，并使用与固定化微生物细胞连续生产 L-天冬氨酸同样的反应系统进行高纯度 L-苹果酸的工业化生产。

在柠檬酸生产方面，嶋津等人开发了多重三相流化床型生物反应器，利用固定化黑曲霉菌体连续发酵生产柠檬酸，第 8h 的产率为 1g/(L·h)，其活性半衰期为 105 天。

根据 Gaden 等人的分类，醋酸菌发酵生产乙酸属于第一种类型，即产物的生成与糖类底物的利用直接相关。因此，有必要利用固定化增殖细胞进行乙酸的发酵生产。固定化醋酸菌发酵生产乙酸的反应器主要有固定床和流化床两种，另外还有膜型反应器。

一般在流化床型反应器中，由于反应液的流动，促进了氧、底物的供给，传质性能好，但转化率较低；增大填充率，流动性能变差。因此，为保证有较好的流动状态，一般填充率在 0.3 以下为好。与之相反，固定床型反应器的填充率高，转化率也高，但传质效率下降，使菌体增殖速率与产率难以提高。

#### （五）在乳制品工业上的应用

由于东方人体内半乳糖苷酶活力较低，饮用牛奶时，牛奶中的乳糖难以被分解吸收，常引起身体不适。这对于有些婴儿和老年人来说问题更为严重。为此，科学工作者进行了多方面的研究，例如，在牛奶中加入半乳糖苷酶分解乳糖后，加热使残存酶失活等。在此基础上，又研究了利用固定化半乳糖苷酶连续处理乳糖的生产过程。M. Pastore 等利用乙酰纤

纤维素固定化半乳糖苷酶，建成每天可处理 8t 牛乳的酶反应器，将牛乳中的乳糖分解为葡萄糖和半乳糖。这一反应系统稳定性很高，连续进行酶反应 80 天以上，酶活力不下降。采用固定化半乳糖苷酶处理牛乳时，必须采取一些防止微生物污染的措施，或选用耐热性半乳糖苷酶。

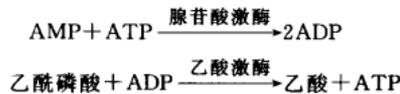
## 二、酶反应器的发展

### 1. 含有辅助因子再生的酶反应器

很多酶反应都需要如辅酶、辅基、能量供给体等辅助因子。这些辅助因子的价格比较昂贵。如果简单的采用添加方式，经济上不划算。因此，开发了含有辅助因子再生的酶反应器，使辅助因子能够反复使用，达到降低生产成本的目的。

例如，利用固定化的脱氢酶，可将固定化 NADH 再生为固定化 NAD。利用半透膜，能将固定化 NAD 保留在反应器内，这样，在反应过程中，固定化 NAD 不断变成固定化 NADH，又不断再生为固定化 NAD，以满足反应的需要。近年来，德国的 Knla 等人成功地用亮氨酸脱氢酶将  $\alpha$ -酮基异己酸转变为 L-亮氨酸，同时使固定在 PEG-20000 上的 NADH 氧化为 NAD，再利用甲酸脱氢酶将甲酸氧化为  $\text{CO}_2$ ，并将 NAD 再还原为 NADH 供反复使用。他们将固定化的辅酶及两种脱氢酶在以 Amiconym 5 超滤膜制作的反应器内连续反应 2 个月，酶系统效率不降低，辅酶的利用可达 80000 次。

又如，美国麻省理工学院有关人员设计了 ATP 再生酶反应器。反应器由 3 部分组成。第 1 部分固定化两个酶系，组成 1 个反应器，底物（氨基酸）在此经过这两个酶系催化合成短杆菌肽 S。每合成 1 分子环状短杆菌肽 S，需消耗 10 分子 ATP，同时产生 10 分子 AMP 及 10 分子磷酸，所产生的 AMP 可经过第 2 部分生成 ATP 再返回使用。第 2 部分主要是通过固定化两种酶来达到再生的目的。



所需的乙酰磷酸由第 3 部分供给，第 1 部分所产生的磷酸在第 3 部分与乙烯酮进行化学反应生成乙酰磷酸。

### 2. 两相或多相反应器

许多底物都不溶或微溶于水，如脂肪、类脂肪或极性较低的物质，在进行酶转化时，在水相中有浓度低、反应体积大、分离困难、能耗大等缺点。如果酶反应能在水-有机相中进行，则可大大增加反应时的底物浓度。在两相或多相体系中反应，还可减少底物，特别是产物对酶的抑制作用，使酶反应进行到底，酶的操作稳定性延长。

一般两相反应常是将酶或固定化酶置于水相中，而底物溶于有机相中，然后在搅拌或乳化条件下进行反应。有机相一般使用碳氧化合物及芳香族化合物，让有机相对酶活的影响减少到最小。

液膜反应器同样也受到重视。它是将酶或水溶性固定化酶溶于水中，然后与一个溶有载体的有机相在剧烈搅拌下形成稳定的乳化液，再将此乳化液倾入缓缓搅拌的溶有底物的水相中，这样就形成了内外是水相，而中间隔了一层有机相的反应系统。

### 3. 固定化多酶反应器

(1) 固定化多酶反应器的意义 多酶反应器（生物反应器）是使生物技术工程转化为产业化的关键技术。随着科学技术的发展，人们有可能将多种酶固定化后制成多酶反应器，来模拟微生物细胞的多酶系统，进行多种酶的顺序反应来合成各种产物。此技术已经呈现出较

好的发展前景，不但可组成高效率、巧妙的多酶反应器，而且还可以形成全新的酶化学合成路线，生产人类所需、自然界不存在的物质。由于固定化技术的发展，使酶可像无机催化剂一样被反复使用；固定化细胞的使用可能代替某些发酵过程，导致形形色色生物反应器的出现，从而可促使生产力大幅度提高。多酶反应器的使用可使产品生产过程中减少不必要的辅助设备，提高生产率，降低成本，获得最大的经济效益和社会效益。利用固定化多酶反应器，可进行顺序的连续反应，完全代替微生物的发酵来生产发酵产品，用小型柱式反应器，可取代今天庞大而低效的微生物发酵罐，此外，化工厂、制药厂高大的反应塔和密如蛛网的管道也将由简单、巧妙的生物反应器所取代。

(2) 多酶反应器的设计目标和要求 多酶反应器的设计目标就是以尽可能低的成本，进行高效率的产品生产。其要求如下。

① 高容积的生产率。容积的生产率随酶浓度或比活的增加而增加，但提高酶浓度和比活力是有限的。

② 简便有效地控制最佳反应条件，使反应器的设计达到易连续化、自动化，能与仪表、自动控制系统或计算机系统相连接。

③ 尽可能降低能耗。

④ 减少污染。

⑤ 反应器加工应简便、易行、投资低。

(3) 使用多酶反应器时的注意事项

① 生物催化剂的特性 为适应不同形式的固定化酶或固定化细胞，需设计不同形式的反应器。如机械性能较好的固定化生物催化剂可适用于搅拌式反应器，也可用于固定床式反应器，而机械性能差的，则在搅拌式反应器上难以应用。

② 反应类型 酶促反应分为六大类，水解酶和异构酶催化的反应比较简单。而一些酶类需辅助因子。为维持反应正常进行，就需不断补充被消耗掉的辅助因子。对单一酶反应来说就需补加辅助因子再生系统。另外，酶促反应往往会产酸或产碱，而使反应系统的 pH 值改变，为维持酶反应的最佳条件，则需不断调整反应系统的 pH 值。有些耗氧反应及产气（如  $\text{CO}_2$ ）反应，则应注意随时调整反应体系的通气量，控制一定的氧分压。

③ 动力学性质 酶促反应的动力学性质，如底物浓度、底物或产物的抑制常数等均与反应器的性能有关，在设计反应器时都应充分给予考虑。

④ 反应器的形式及大小 由于不同酶促反应的反应特性不同，应采取不同形式的反应器，如底物溶解度低的反应不宜使用固定床式反应器，而宜采用搅拌式反应器。反应器的大小主要由生产规模所决定，但也受生物催化剂性能的影响。高活力的固定化酶可用小体积的反应器。

⑤ 热传递和温度的影响 酶促反应速率和酶的热失活速率均与温度有关。酶促反应活化能在  $5\sim 20\text{kcal}^\bullet/\text{mol}$  范围内，而酶失活所需能量为  $10\sim 100\text{kcal}/\text{mol}$ 。虽然酶失活所需能量高于活化能，但若热传递不好，造成热量不断积累，温度升高，则将导致酶失活。因此，控制反应系统的温度十分重要。一般酶促反应的最适温度在  $20\sim 60^\circ\text{C}$  之间。

⑥ 操作稳定性 即使反应条件控制很好，酶在反应过程中活力总要逐渐降低，从而使反应器的效率逐渐降低，这在工业生产上要尽量避免。为解决这个问题，可采用多个反应器串联或并联形式组成反应器组，并按一定顺序进行更换，从而使生产保持在一个恒定的水平下进行。所用反应器的个数及更换时间取决于酶的稳定性，即半衰期。

●  $1\text{cal}=4.1840\text{J}$ 。

酶的应用形式已在逐渐演变发展,从游离酶、菌体到固定化酶、固定化菌体,近年来人们正致力于开发固定化生长菌体、固定化多酶系统,包括辅酶的固定化与再生以及酶-菌体共固定化系统。酶反应器也在发展,除了前述的几种基本形式以外,新的形式正在开发,酶-膜反应器也在逐渐推向应用。需要指出的是,建立酶反应器是指建立由酶(或相应的其他形式)和一定的反应器装置构成的应用体系,当然这里也包括反应的条件控制。但酶反应器似乎可以有更广泛的含义,在某些情况下,人们还往往将它和生物反应器、酶工程或生物工程等概念等同起来考虑。酶工程是以现代酶学、现代生物学(包括生物化学、微生物学、遗传学及分子生物学等)的理论知识为基础,结合化学工程、电子计算机等现代成就,将酶有效地应用于生产实践的一种技术体系。如果说酶工程包括3个主要的组成部分,即酶的生产、制备与应用的话,酶反应器虽然主要在酶的应用过程中发挥作用,但它在酶工程中占有中心的地位,它不仅联系着底物和产物,也联系着催化剂和产物,还反映着酶工程的水平,并随酶工程的发展而发展。例如,酶反应器的中心问题是降低生产成本,获得高产、高稳定性的酶。酶的生产已有一整套产酶菌种选育与提高产量的办法,包括基因重组技术。随着生产的发展,酶反应器可能对酶的特性提出更高的要求,为适应这种需要,蛋白质工程正在兴起,它能对酶进行定向改造。此外“人工酶”也将发展和介入。另外,酶反应器不仅在工农业生产中进行应用,也在分析和医药领域进行应用。酶反应器在分析上可能发挥两方面的作用:一是固定化酶反应器用于酶法分析,这主要是在酶电极、酶柱以及酶标免疫分析中的应用;二是酶自动分析体系的建立。酶反应器在医药领域上的应用也包括两个方面:一是药物酶的固定化与改造,以利于克服免疫反应、延长半衰期和增大疗效;二是“人工脏器”的建立。

总之,酶反应器是酶在生产实践中发挥作用的一个关键环节,它对酶的应用具有十分重要的意义,目前尚处于开发、应用的早期阶段,其最终目标是实现全自动最佳控制。

### 参 考 文 献

- 1 郭勇主编. 酶工程. 北京: 中国轻工业出版社, 1994
- 2 徐凤彩主编. 酶工程. 北京: 中国农业出版社, 2001
- 3 宋思扬, 楼士林主编. 生物技术概论. 北京: 科学出版社, 1999
- 4 魏群主编. 生物工程技术实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2002
- 5 罗贵民主编. 酶工程. 北京: 化学工业出版社, 2002
- 6 瞿礼嘉, 顾红雅, 胡苹, 陈章良主编. 现代生物技术导论. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 1998
- 7 山根恒夫著. 生化反应工程. 西安: 西北大学出版社, 1999
- 8 李再资编. 生物化学工程基础. 北京: 化学工业出版社, 1999
- 9 陈石根, 周润琦编. 酶学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1987
- 10 陈石根, 周润琦编. 酶学. 上海: 复旦大学出版社, 2001
- 11 Kise S, Hyashiida M. J Boitechnol, 1990, 14 (2): 221
- 12 Chang H N, Furusaki S. Adv Biochem Eng Boitechnol, 1991, 44: 27
- 13 刘仲敏, 林兴兵, 杨生玉主编. 现代应用生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2004
- 14 郭永主编. 酶工程. 第二版. 北京: 科学出版社, 2004

# 第九章 酶 化 工

## 第一节 酶与化学工业

酶作为生物催化剂在生物化工领域有着广泛的用途。酶可以催化多种类型的有机化学反应。

### 一、生物酶可催化生产的化学品

#### 1. 医药品

生物酶催化生产化学品在附加值较高的制药产业中已有较多的应用。最早应用生物催化实现产业化的是甾体类药物的生物转化，利用天然甾体化合物，经过微生物催化羧基化、氧化、芳环化、环氧化可生产多种避孕药及可的松类药物。利用链霉菌的羟基化酶可使活性很低的降胆固醇物质康派可丁（compactin）羟基化而得到活性提高上百倍的普伐他汀（pravastatin），该药物的年销售额已达到十多亿美元。此外利用青霉素酰化酶催化分解青霉素生产 6-氨基青霉烷酸（6-APA），为多种半合成青霉素提供了优质廉价的原料。

#### 2. 氨基酸

在氨基酸合成中利用酶催化技术成功的例子有色氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、赖氨酸和丙氨酸。色氨酸和赖氨酸已被广泛用作饲料添加剂和食品添加剂。苯丙氨酸和天冬氨酸可合成为低能量的甜味剂，甜味较一般砂糖高 200 倍，国外生产量已达上万吨，中国近年内亦可实现产业化。

#### 3. 有机酸

在有机酸生产中采用酶催化合成最成功的例子当数苹果酸，利用固定化苹果酸酶可将反丁烯二酸几乎定量地转化为苹果酸。此外还有酒石酸，虽然已有少量生产，但在综合经济指标上与化学合成法相比尚无明显优势而未能进一步扩大。

#### 4. 果糖

利用异构酶将己糖转化为价格更为昂贵的其他单糖（如低发热量或高甜度的其他糖类）的研究虽有很多报道，但实现产业化的只有淀粉经酶催化分解成葡萄糖，再经异构酶转化为果糖的工业化制糖工艺。此工艺的开发成功，解决了食糖短缺时期的困难。目前世界产量已达上百万吨。

#### 5. 大宗化工原料

酶催化生产大宗化工原料产品的研究报道虽然不少，但在综合经济指标都能超过目前的生产工艺而实现产业化的只有聚丙烯酰胺。聚丙烯酰胺广泛应用于水处理、造纸、纺织、三次采油等各个领域，目前世界产量超过万吨。由于中国油田大多都进入三次采油阶段，对高分子量的聚丙烯酰胺需求量激增。1986 年在中国泰山地区的土壤中发现了一种含有能使丙烯腈转化为丙烯酰胺的水合酶的微生物，经过多年的研究，解决了产业化的一系列问题，已建成年产 2000~4000t 的生产装置 4 套，1 套年产 1 万吨级的生产线正在建设中。运转表明，与原化学合成工艺相比，工艺简化、投资少、转化率高、“三废”少、产品纯度高，可制备

相对分子质量超过 2200 万的超高相对分子质量聚丙烯酰胺，充分显示了酶催化工艺的优越性。

## 二、生物酶催化合成手性化合物

酶催化反应具有光学异构特异性，这一特性用于手性化合物的合成将使化学拆分工艺更加简单。手性化合物对于生物活性物质具有非常重要的意义，互为对映体的两个手性化合物在生物活性上有时表现出有和无的差别。无效对映体的存在不仅浪费原料、增加成本，还会污染环境，增加负面效应，因此单一对映体手性化合物的合成是生物活性物质生产中的重要课题。目前生产的近 2000 种药物中约有 1/3 为手性化合物。生物酶可以通过催化还原、水解、羧基化、卤化、光学异构化以及利用生物专一性分解一个对映体而获得另一个所需要的对映体等方式制取所需的手性化合物。目前已有一些实现了产业化，如半合成青霉素和头孢菌素的一些中间体，除虫菊酯类农药的一些中间体，以及 L-多巴、赖氨酸和泛酰内酯等。

## 三、为化学合成新产品提供原料

生物技术为化学合成提供像乙烯、甲醇、苯那样的基础化工原料还是相当遥远的事，但生物技术已经为精细化工产品提供了很好的原料。生物制品再经过化学结构改造可获得很多有实用价值的新产品。微生物产品青霉素和头孢菌素经过酰化酶的作用生成的 6-APA 和 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA)，经化学合成得到很多有实用价值的半合成青霉素和头孢菌素。此外还有庆大霉素、卡那霉素、四环素等多种抗生素的结构改造产物。由微生物发酵生产的降胆固醇活性物质洛伐他汀 (lovastatin) 经过化学结构改造后得到的辛伐他汀 (simvastatin)，降胆固醇的效果比洛伐他汀提高 1 倍，而且减少了副作用。广泛用于农作物害虫防治的微生物发酵物杀虫素，经化学结构改造后得到的氢化杀虫素、羟肟杀虫素和氨基杀虫素均比原先的微生物发酵产物在某些性能上有很大的改善。可以预见，生物技术和化学合成技术的互相渗透将会创造出对人类更有用的新产品。

## 四、酶法生产生物柴油

欧洲和北美利用过剩的菜子油和豆油为原料生产生物柴油获得推广应用。目前生物柴油主要用化学法生产，植物油与甲醇或乙醇在酸或碱催化剂和 230~250℃ 下进行酯化反应，生成相应的脂肪酸甲酯或脂肪酸乙酯生物柴油。现正在研究生物酶法合成生物柴油技术。用发酵法 (酶) 制造生物柴油，混在反应物中的游离脂肪酸和水对酶催化剂无影响，反应液静置后，脂肪酸甲酯即可分离。日本大阪市立工业研究所成功开发使用固定化脂肪酶连续生产生物柴油，分段添加甲醇进行反应，反应温度为 30℃，植物油转化率达 95%，脂肪酶连续使用 100 天仍不失活。反应后静置分离，得到的产品可直接用作生物柴油。

与普通柴油相比，生物柴油具有环境友好的特点，其柴油车尾气中有毒有机物排放量仅为 10%，颗粒物为 20%，CO<sub>2</sub> 和 CO 排放量仅为 10%。按照京都议定书，欧盟 2008~2012 年间要减少 CO<sub>2</sub> 排放 8%，就燃料对整个大气 CO<sub>2</sub> 影响的生命循环分析 (LCA) 指出，生物柴油排放的 CO<sub>2</sub> 比矿物柴油要少约 50%。欧盟最近发布了两项新的指令以推进生物燃料在汽车燃料市场上的应用，这将进一步推动欧洲生物柴油工业的发展。

生物柴油产业是新兴的高新科技产业，中国“十五发展纲要”已明确提出发展各种石油替代品，并将发展生物液体燃料确定为新兴产业的发展方向。

## 第二节 化学工业中酶催化的反应过程及特点

酶作为催化剂长期受到化学合成领域的关注,但其在化学工业上的应用发展缓慢,远逊于其他领域的应用。目前,酶催化工艺已被用于非对映异构体药物中间体的合成等,包括非对映异构体酒精和氨基化合物生产中脂肪酶的应用、非对映体羧酸产品生产中羧基水解酶的应用和新的半合成青霉素产品生产中酰基转移酶的应用等。经常用于有机合成的酶主要有以下几类。

(1) 水解酶 (hydrolase) 用于各种水解反应,如酯、酰胺、肽、酸酐和糖苷等的水解。

(2) 氧化-还原酶 (oxidoreductase) 用于催化氧化-还原反应。

(3) 转移酶 (transferase) 催化各种基团的转移或转化,如催化醛、酮、酰基、糖和磷酸基等基团的转移或转化。

(4) 裂解酶 (lyase) 催化双键的加成或形成,如  $C=C$ 、 $C=O$  和  $C=N$  等双键的加成。

(5) 异构化酶 (isomerase) 催化各种异构化反应,包括消旋化反应、双键的转移和顺反异构化等。

(6) 连接酶 (ligase) 又称合成酶,能够催化  $C-O$ 、 $C-N$ 、 $C-S$  和  $C-C$  等化学键的合成。

### 一、酶催化氨基酸合成

化学合成的氨基酸均为 D、L 混合型产物,药效差。Kula 等开发了酶拆分-原位连续再生辅酶系统——膜分离耦合工艺,可自动化控制及扩大规模生产 L-氨基酸。南京化工大学国家生物工程研究中心成功地利用多酶系统用 D-对羟苯海因转化合成 D-对羟苯甘氨酸,目前正在开发与膜分离相结合的新工艺。他们还开发了酶法与原位结晶分离耦合技术生产 L-丙氨酸的新工艺,并成功地进行了工业化生产。

### 二、酶催化有机酸合成

酶催化技术已用于柠檬酸、L-苹果酸、L-酒石酸和 L-乳酸等多种具有光学活性的有机酸的生产。酶催化技术与原位结晶分离技术耦合生产 L-苹果酸,底物的转化率接近 100%,大大降低了生产成本。

### 三、酶催化抗生素生产

多种青霉素酰化酶(催化生成 6-氨基青霉烷酸、氨苄西林和羟氨青霉素)、头孢菌素酰化酶(催化生成 7-氨基头孢烷酸)和链霉素等都是酶催化技术应用于大规模抗生素工业生产的实例。

### 四、酶催化肽类药物的合成

酶催化肽键合成可用来生产多种多肽药物,如胰岛素、环孢菌素 A 等。催化合成甜味二肽是最成功的例子。此外,酶催化还广泛应用于多种维生素(维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>12</sub>)、甾体药物(氢化可的松、脱氢泼尼松等)及核苷酸类药物(5'-核苷酸)等的生产。

## 五、酶催化芳香酯合成

低分子量芳香酯是一类重要的芳香化合物，多呈天然水果香味，广泛应用于食品工业。生物转化法生产的芳香酯被美国和欧盟认为是天然产物，酶法生产被看成是很有希望的工业化途径。如利用微生物脂肪酶催化合成酒用芳香酯、固定化脂肪酶合成各类具有期望风味的芳香酯等。具有强烈刺激性气味的芳香醇——L-薄荷醇，可以通过脂肪酶催化的酯化反应使其与短链或长链脂肪酸发生反应，减缓薄荷醇的强烈气味，并且使其更易乳化。

## 六、酶催化人造奶油的生产

人造奶油的传统生产方法主要是在碱性催化剂作用下，通过酯交换部分增加饱和脂肪酸的量，从而使油脂具有特定的熔融特性。当反应温度高于 100℃ 时，需要通过真空或充 N<sub>2</sub> 来防止脂肪氧化。脂肪酶可在相对温和的条件下催化油脂间的转酯或酯交换，从而获得质量较好的人造奶油。具有较窄熔融范围的人造奶油可由脂肪酶催化高熔点的棕榈硬酯与植物油（向日葵油、大豆油、米糠油、可可油）之间的转酯作用制得，也可由猪脂、牛脂与液体植物油制得。

## 七、酶催化酯交换

目前，酯交换大量应用于油脂工业中，如动物油和植物油的改性，以及一些功能性油脂的制备，如富含二十二碳六烯酸（DHA）及二十碳五烯酸（EPA）的鱼油或 sn-2 位结合有该类功能性脂肪酸的甘油酯，后者有利于乳幼儿对该类脂肪酸的吸收。

美国农业部的 Neff 等研究小组一直注重对大豆油的高度利用，特别是对大豆油脂交换的研究。酯交换油品的结晶化比硬化油品要迟缓，而且形成的乳状液也要稳定。最近 Brenda 等采用 *Rhizomncor miehai* 来源的固定化脂肪酶研究了米糠油与中链脂肪酸的酯交换反应制取中链脂肪酸甘油酯（MCT），获得较好的效果。后者可作为一些需要高能量人群的膳食。

鱼油中的 *n*-3-脂肪酸（主要为 DHA 和 EPA）所具有的生理活性功能已引起世人的注目，出现了大量相关的制备方法。有人采用 *M. miehei* 和 *Candida antarctica* 脂肪酶的固定化酶，研究了 EPA 或 DHA 或其乙酯与花生油以及大豆硬化油的酯交换，制得富含该脂肪酸的植物油。还有学者采用 *M. miehei* 的脂肪酶对鳕鱼肝油与 EPA 以及 DHA 进行酸解反应，同样可制得富含 DHA 及 EPA 的油脂。

此外，通过在甘油三酯（TAG）分子的特定位置配置特定的脂肪酸，开发具有特定生理功能的构造脂质，已成为油脂领域的热点，其中低热量油脂的开发更是引人注目，此类油脂在美国已创出相当规模的市场销售额。

## 第三节 非水介质中的酶催化反应

近年来对酶在有机介质中的催化作用的研究越来越多，并且日渐深入。传统观念认为酶在有机溶剂中会变性失活，早期人们的试验也证实了这一结论（曾经有人在酶的水溶液中加入乙醇、丙酮进行酶催化试验，在此混合液中，只有在水的含量很高的情况下，酶才具有一定的活性，而且其活性显著低于单相水溶液中的酶活性）。自 20 世纪 80 年代以来，非水介质酶催化取得了重大的突破和长足的发展。酶的催化介质由以前的水溶液经历了两相体系、多液相体系、反胶束体系和微水体系、无水体系，甚至超临界流体，且其研究进展很快。尤

其是反胶束体系、微水体系，目前的研究较为热门，有人预言反胶束体系可能成为生物转化的通用介质。目前微水体系、无水体系中，非水相酶促转酯化研究得较为深入并取得了巨大成果，非水酶促反应的研究成果正在或已转化为生产力。前者用于医药、食品添加剂、高分子材料合成、有毒物的降解等；后者则用于有机合成、酿酒、酱油、食醋、生产农药以及医药和保健食品等方面的含不饱和脂肪酸的油脂等。

## 一、酶在非水介质催化反应中的优点

20世纪80年代以来，国外科学家通过大量的研究总结出了有机介质中的酶催化反应具有如下优点。

- ① 大多数有机底物在有机溶剂中有较大的溶解度。
- ② 在非水介质中酶的热稳定性与贮存稳定性比在水中明显提高。
- ③ 使许多热力学平衡反应由加水分解转化为其逆反应过程。
- ④ 能抑制因水而产生的副反应。
- ⑤ 酶与介质不相溶，易于回收。
- ⑥ 从低沸点的溶剂中分离纯产物比从水中分离更方便。
- ⑦ 无微生物污染。

由于酶在非水介质中反应具有水溶液介质中酶促反应无法比拟的优点，人们对非水溶液的酶催化反应研究也就越来越感兴趣，此后不断有新的研究成果报道，因而非水介质酶催化反应的研究也日显重要。

## 二、多液相体系酶催化反应

### 1. 酶在两相体系和多液相体系中的结构特点

传统酶学认为酶在水溶液中以一定构象存在，和蛋白质的结构一样。在这一结构中，具有两种决定酶活性的物质状态，即紧凑（compact）状态和柔性（flexibility）状态。蛋白质分子内具有氢键，同时溶液中的水分子与蛋白质分子间也能形成氢键，正是由于这两种氢键使得酶活性由强转弱。前者由于与酶蛋白质分子形成分子间氢键的水分子少，分子内氢键起主导作用，酶催化体系表现出刚性（rigidity）；后者溶液中水分子与蛋白质分子官能团形成氢键而使分子内氢键遭到一定的破坏，分子间氢键起主导作用，酶催化体系表现出柔性。这较好地解释了酶的特异性与经典热力学的矛盾（根据以前对蛋白质构象的认识，它在水溶液中稳定而在疏水介质中不稳定）。因此，只要维持一定的水量，即维持酶所需的“必需水”量，酶的催化能力会大大提高。

### 2. 酶的稳定性

国外有学者提出，有机介质中酶的稳定性增强是由于在非水体系中没有充足的导致某些酶失活的水分子。这一假说已得到一些实验的证实，如胰凝乳蛋白酶在无水辛烷体系中，温度为20℃时6个月不变质，而它在水溶液中的半衰期只有几天；Arnold对枯草杆菌蛋白酶的研究表明，工程酶在40%的二甲基甲酰胺（DMF）中的失活率下降了10倍，且热稳定性也大大提高，此外，该研究还表明酶的表面性质也会影响酶在非水相中的稳定性。

### 3. 酶的活性

(1) 含水量对酶活性的影响 酶蛋白分子在水溶液中可形成分子内氢键及与水分子形成分子间氢键，表现出相应的刚性和柔性。因此水对酶的催化作用是绝对需要的，否则将导致酶蛋白质构象的剧变而失去活性。所谓非水体系，指的是一种含微量水的有机介质体系，一般含水量小于1%。研究表明酶的活性只取决于吸附在酶表面的水分多少，而与溶剂含水量

无关。然而维持酶活性的水量究竟该有多少呢？大量探索性试验表明：不同酶维持活性的水量不同，把维持酶活性的包裹在酶表面的吸附层水量称为必需水（essential water），如每分子 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶需要数十个水分子的必需水，而每分子醇脱氢酶的必需水高达几百个水分子。有机溶剂中酶活性与含水量的关系如图 9-1 所示。

低于必需水的下限，酶蛋白会因构象剧烈变化而失活，然而在水量增加的情况下，酶也会因水分过多而活性降低，因此酶也应有一个因过量水而失活的水量上限，这一上限是控制溶液水量和 pH 值等条件的调节参数。

有人主张用热力学水分活度  $a_w$ （thermodynamic water activity）来描述有机溶剂中酶的活性与含水量的关系。水分活度是指在一定的温度与压力下反应体系中水的蒸汽压与纯水的蒸汽压的比值。即用吸附水层中水分活度  $a_w$  来衡量酶活性。体系含水的多少是由溶剂的极性决定的，溶剂对酶的影响实际上是酶的必需水被溶剂剥夺而使酶的活性发生变化。

(2) 溶剂极性对酶活性的影响 用  $a_w$  作为衡量酶活性的关键参数，体系含水量由溶剂的极性决定，当含水量一定时，溶剂的亲水性越强， $a_w$  越小，酶活性便越低，因而酶活性的比较应在恒定的水分活度下进行才更为准确。

通过对溶剂极性的研究，可以用溶剂的疏水参数  $\lg P$ （ $P$  为一种溶剂在正辛醇和水两相体系中的分配系数）来概括它与酶活性之间的关系。即当  $\lg P < 2$  时，酶活性较低；当  $2 < \lg P < 4$  时，酶有中等活性； $\lg P > 4$  时，酶的活性较高。这一结论已得到了充分的证实，如胰凝乳蛋白酶的活性随溶剂亲水性的增大而减弱。

大量的研究表明，溶剂的性质是一个影响酶活性的关键因素。非水溶液中，疏水性溶剂是最好的反应介质。上述得到的胰凝乳蛋白酶的活性随溶剂的疏水性减弱而明显下降，且溶剂的疏水性顺序为：辛烷  $>$  甲苯  $>$  四氢呋喃  $>$  丙酮  $>$  吡啶。

(3) 溶剂与底物结构对酶活性的影响 亲水性底物在疏水性强的溶剂中易进入酶的疏水袋，有利于热力学平衡向期望的方向进行。因此亲水性底物应选择疏水性强的溶剂，而疏水性底物应选择疏水性弱的溶剂。

(4) 水活度的控制对酶活性的影响 在非水介质中，酶催化能保持较高的活性是因为有一层吸附于酶分子外的水层，即必需水。水的含量、浓度和活度都可用来作为描述水对酶催化行为的影响参数。维持酶蛋白分子结构的几种非共价相互作用（静电引力、范德华力、氢键和疏水间作用力）都与水有关，因而在反应中控制水分活度很重要。

目前，关于控制水分活度的方法以用盐水合物控制的报道较多。Halling 等总结出用盐水合物控制水分活度的两种方法：一种是将酶及底物分别与盐的饱和水溶液混合，得到一水分活度，再将两者混合得等水分活度的体系；另一种是在体系中直接加盐水合物，而在一定的温度、压力条件下获得一水分活度。Halling 等通过向反应体系中加入水合盐的方法控制水分活度来研究水分活度对酶活性的影响，研究结果表明，尽管在不同溶剂（苯、甲苯、四氯甲烷和己烷）中酶活力的最大值不同，但达到最大值的水分活度却基本相同，均在 0.5~0.6 之间，如图 9-2 所示。

Halling 在总结了大量实验结果的基础上，提出了最适水分活度的概念，并得出最适水分活度约为 0.55 的重要结论。田桂玲等研究了自由水和含结晶水的无机盐水合物

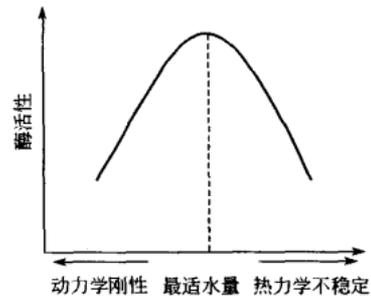


图 9-1 有机溶剂中酶活性与含水量的关系

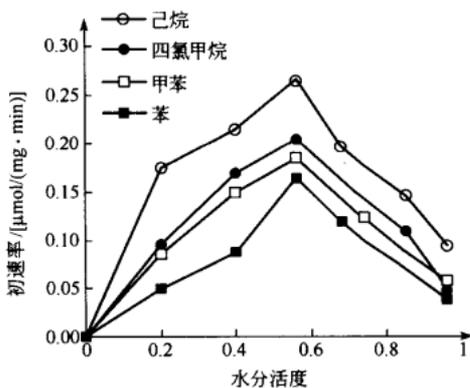


图 9-2 不同溶剂中水分活度对脂肪酶催化酯合成活力的影响

( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 对有机溶剂中  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶和嗜热杆菌蛋白酶粗品催化合成寡肽的影响。研究表明, 足量的无机盐水合物能在有机溶剂中可逆地失去自身所带的结晶水, 以提供酶维持活性所需的“必需水”, 从而有效地控制有机介质中酶促反应体系的水分活度, 促进肽键的形成。何汉平等在正己烷中以脂肪酶催化仲丁醇和乙酸乙烯酯间的转酯化制备己酸仲丁酯为模型, 用已知水分活度的盐-盐-水合物控制反应体系的水分活度, 发现在正己烷中, 反应初速率随水分活度增加而增加, 随溶剂极性的增加而减小。

(5) pH 值对酶活性的影响 在有机溶剂中进行酶催化反应也依赖于酶周围吸附水层(必需水)的 pH 值。酶分子活性中心周围的离子基团只有在特定的酸碱度条件下才具有酶催化反应的最佳离子态, 而且此必需水的最佳 pH 值与在水溶液中反应时的最适 pH 值是一致的。所以酶在有机溶剂中反应前, 需先溶于最适 pH 值的水溶液中, 再冷冻干燥, 酶基团的最适 pH 值离子态就保存在此干状态中。

### 三、反胶束体系酶催化反应

酶催化的介质工程 (medium engineering) 经历了水→有机溶剂→反胶束的过程。许多酶在两相体系或有机介质中均具有不同程度的催化活性。而在反胶束体系中, 由于能较好地模拟自然环境, 大多数酶能保持其良好的催化活性和稳定性, 甚至出现超活性 (superactivity)。

#### 1. 反胶束体系中酶的结构

反胶束是两亲性分子溶解在有机溶剂中自发形成的热力学稳定的、光学透明的球形聚集体。它是一个由两亲性分子的烃链组成的外壳, 疏水尾指向有机溶剂, 极性头指向聚集体内部形成极性腔。具有纳米尺寸的水溶解在极性腔中形成所谓小水池 (water pool)。对酶溶于反胶束的机理已提出了多种模型, 如水壳模型、诱导适合模型和固定尺寸模型等。酶溶解在反胶束中形成水合胶束, 其定位与酶的亲水疏水特性有关。亲水性酶在极性水空间里, 避免了与非水相的作用而失活。疏水性酶在小水池和表面活性剂之间的界面上。研究表明, 酶与反胶束界面的相互作用在分子所带电荷相异时最强。

酶分子的二级结构在反胶束中略有扰动, 这种扰动与反胶束中水含量有关。如细胞色素 C 在低含水量时构象能保留, 而高含水量时优势构象显著损失。

#### 2. 反胶束体系中酶催化反应的动力学特征

反胶束体系中, 酶的动力学特征与在水中大致相似。在底物浓度一定时, 反应速率与酶浓度成正比; 在相同酶浓度下, 反应速率与底物浓度的关系符合 Michaelis-Menten 方程。与水溶液不同的是, 酶在反胶束中的动力学参数  $K_m$  和  $K_{cat}$  与反胶束的组成、酶与表面活性剂的相互作用、底物的分配和交换有关。目前关于反胶束酶动力学的模型还不能令人满意。

#### 3. 反胶束体系中酶的活性及稳定性

反胶束体系中酶活性与水含量有密切的关系, 因此用一个与水有关的参数来描述酶的活性及其稳定性符合实际研究的需要, 有人引入了  $W_0$  ( $W_0$  表示反胶束体系中的含水量, 为体系中水和表面活性剂 S 的物质的量之比)。根据 Sanchez Ferrer 等的报道, 在反胶束体系中酶活性

与含水量  $W_0$  的关系有 4 种情况, 如图 9-3 所示。

图 9-3 中各曲线所代表的意义如下: a 为饱和曲线, 表示酶为了达到最高活性, 要求胶束中有自由水, 较高的  $W_0$  对酶活性无影响; b 对应的是酶的最高活性, 有一最佳含水量, 此时胶束中水池直径与酶尺寸相当; c 代表酶活性随  $W_0$  增大逐渐降低, 低  $W_0$  下酶活性较高; d 为超活性效应。

对反胶束中酶的稳定性, 比较一致的看法是酶的失活与酶的种类、反胶束组成有关, 动力学模型不确定。

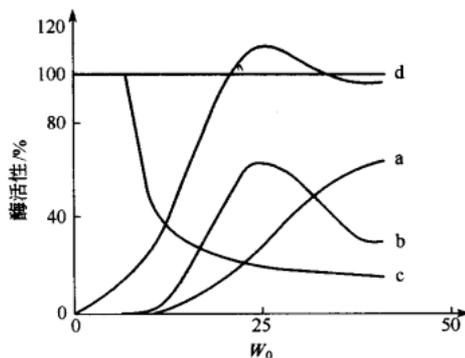


图 9-3 反胶束体系中酶的活性与含水量的关系

#### 4. 反胶束作为酶催化反应介质的优点

除非水介质的普遍优点外, 反胶束介质还有其特殊的优点。它的特点表现在: ①组成的灵活性; ②热力学稳定性及光学透明性; ③有很大的界面积/体积, 其比值远大于两相体系中的有机溶剂/水相的比值; ④产物的回收可通过相调节来实现。

#### 5. 反胶束体系在酶催化反应中的应用

20 多年来, 胶束酶学及低水体系的研究已从基础过渡到应用。它包括: ①辅酶再生; ②肽和氨基酸的合成; ③脂肪酶催化的反应; ④高分子材料的合成; ⑤有毒物的降解。

目前反胶束也广泛用于膜模拟化学和蛋白质的溶液萃取中。今后对于胶束酶学的应用研究也将更进一步深入, 其在生物转化、药学、食品添加剂、降解有毒物等方面获得广泛的应用。

### 四、非水相酶催化反应

近年来, 有关脂肪酶的研究日益受到人们的重视。脂肪酶不仅能催化油脂水解, 而且还能在非水相中用于油脂的转酯化反应, 以提高油脂的品位。转酯化动力学多为国外工作者提出, 曹淑佳等研究了在环己烷中应用酵母脂肪酶催化外消旋 2-辛醇和辛酸合成不对称酯化反应的动力学机制, 指出 2-辛醇的两种异构体与辛酸的酯化反应均遵循 Michaelis-Menten 动力学, 推测在所采用的底物浓度范围 ( $0 \sim 6.0 \text{ mg/mL}$ ) 内, 不存在底物抑制, 且脂肪酶催化的 (*R*)-2-辛醇和 (*S*)-2-辛醇和辛酸的酯化反应符合 Ping-Pong Bi-Bi 反应机制。刘伟雄等研究了乌柏脂与硬脂酸甲酯在固定化脂肪酶作用下的转酯化, 也提出了两种模型, 分别用于研究反应的初速率和起始浓度的关系及反应历程中组分浓度和时间的关系。

酶在合成中应用的研究是个非常热门的课题, 目前已进入到一个新的阶段, 非水溶液或微乳液中用脂肪酶合成酯的研究日益深入, 并受到人们的瞩目, 国内外学者对此进行了大量的研究尝试。曹淑桂等研究了在有机相 (乙酸乙烯酯或苯) 中脂肪酶催化的以单糖和乙酸乙烯酯或乙酸酐为底物的糖酯化反应, 并首次采用亲水性载体硅胶吸附糖和脂肪酶合成了糖脂。叶蕴华等以含结晶水的无机盐水合物 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 代替自由水, 在有机溶剂环己烷和甲苯中分别应用  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶和嗜热杆菌蛋白酶粗品催化合成了寡肽 Z-Tyr-Gly-Gly-Oet 和 Z-Tyr-Gly-NHNHPh (Z= 苄氧羰基); 此外, 叶蕴华等还在混合反相胶束体系 (AOT-Brij 30Pn-庚烷) 中应用  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶催化, 成功地合成了寡肽 (二肽和三肽), 反应产率达  $56\% \sim 88\%$ 。夏咏梅等以自制铜绿假单胞菌脂肪酶催化合成了单脂肪酸及油脂。杨波等在 *Candida antarctica* 脂肪酶 (CAL) 的作用下, 得出含手性中心碳原子的胺类化合物酰胺化的异构选择性规则。周国伟等在微浮凝胶中研究了 CAL 催化

庚酸和庚醇的酯化反应等。非水介质中的酶催化反应除上述报道的研究和应用外，固定化酶催化的生物合成研究进展也相当迅速。

有机相中脂肪酶催化的应用有着广阔的发展前景。如合成高效、安全、低毒性的手性药物中间体及进行药物的手性拆分；采用酶法拆分合成昆虫信息素；在油脂工业中用于油脂的改性；在酿造工业中能提高浓香型酒的风味等。随着酶学的研究发展，脂肪酶的催化机理也定将被揭示，并扩大其在各个领域中的应用。

## 第四节 超临界介质中的酶催化

传统有机溶剂中酶反应的产物中不可避免地残留或多或少的有机溶剂，容易造成产物的污染，使有机介质中酶催化的应用受到一定的限制。近年来，在非水相酶催化研究的基础上发现了超临界流体（supercritical fluids, SCF）。一般而论，无溶剂系统是最优的酶反应系统，在受底物性质所限而非用溶剂不可的情况下，则最好选用水或超临界流体作为反应介质。

作为酶反应的介质，超临界流体当前正受到极大的关注。超临界流体具有传统有机溶剂的所有优点：①增加非极性底物的溶解度；②可进行酶水解反应的逆反应，如酯化、内酯化、酯交换及肽的合成等；③减少底物或产物对酶的抑制；④增加酶的热稳定性；⑤减少反应副产物等。而且，超临界流体的物理性质介于气体和液体之间，因而具有其独特的优越性。它具有气体的高扩散系数、低黏度、低表面张力和液体的高密度的特性，且可通过温度或压力的微小变化改变底物或产物在超临界流体中的溶解度，因此，可根据不同物质在不同温度和压力下溶解度不同，方便地将反应产物从残留反应物和副产物中分离出来，而且超临界流体在反应后可被彻底排除，产物中不留下任何溶剂。特别是对于工业化生产，可使生物催化反应和产物分离同时进行，实行耦联操作，便于自动化生产和下游加工工艺的简化。

超临界流体反应的介质和固定化酶的载体是超临界流体中酶反应体系的重要要素，它们对超临界流体中酶催化的反应有着重要的影响。超临界流体的流速、温度和压力是关键的操作参数。

### 一、超临界流体的选择

超临界流体作为酶反应的介质，对酶反应起着重要作用。它能够改变酶的底物专一性、区域选择性和对映体选择性，并能增强酶的热稳定性，同时酶在不同超临界流体中的活性也存在极大的差异，因此，对超临界流体的选择就显得特别重要。通常，超临界流体的选择首先应遵循两个最基本的原则：一是酶在超临界流体中必须具有较高的活性；二是超临界流体的临界温度与酶的最适反应温度接近，因为操作温度通常与临界温度接近，温度过高会引起蛋白质变性，使酶失活。另外，还需综合考虑以下几个因素的影响：①临界温度和临界压力在实际生产中是否容易达到；②反应底物在该流体中必须具有较高的溶解度；③超临界流体对底物、产物和酶的情性，即不与它们发生化学作用；④对食品和医药无毒等。

常用的超临界流体有： $\text{CO}_2$ 、 $\text{SO}_2$ 、 $\text{C}_2\text{H}_4$ 、 $\text{C}_2\text{H}_6$ 、 $\text{C}_3\text{H}_8$ 、 $\text{C}_4\text{H}_{10}$ 、 $\text{C}_5\text{H}_{10}$ 、 $\text{CCl}_4$ 、 $\text{SF}_6$ 等，其中 $\text{CO}_2$ 较为常用。 $\text{CO}_2$ 具有一些独特的优点，是一种优良的介质。如 $\text{CO}_2$ 的临界温度比较低（ $31.1^\circ\text{C}$ ），接近酶的最适反应温度； $\text{CO}_2$ 的临界压力不是很高（ $7.4\text{MPa}$ ），在工业应用中比较容易达到；特别是 $\text{CO}_2$ 无毒、不可燃、价格便宜、来源广泛，不存在环境污染问题。超临界 $\text{CO}_2$ 的酶催化在酶化学工业中具有广泛的应用前景。

对于某些反应，超临界 $\text{CO}_2$ 并不是一种理想的溶剂，主要是因为 $\text{CO}_2$ 中酶的活性不

高以及极性底物的溶解度较低。Almeida 等的研究结果显示,在酯酶催化正丁酸酯的转酯反应中,超临界 CO<sub>2</sub> 中的反应速率比超临界乙烷和丙烷中小,他们的解释是 CO<sub>2</sub> 的溶剂化效应在高压下较大,并且在 CO<sub>2</sub> 中酶反应的活化能较高。Kamat 等也认为,对异丁烯酸甲酯和 2-乙基乙醇间的转酯反应而言,超临界 CO<sub>2</sub> 并不是一种良好的溶剂,因为超临界 CO<sub>2</sub> 可改变酶周围微环境的 pH 值或与酶表面的氨基形成共价复合物,导致酶的活性降低。于是,有些学者提出,通过酶的化学或物理修饰以提高它在超临界 CO<sub>2</sub> 中的活性。虽然通过聚乙二醇 (PEG) 修饰以提高酶在有机介质中的活性已有大量的研究,但超临界流体中酶反应的相关研究尚未见报道。同时,CO<sub>2</sub> 是一种非极性介质,极性底物在其中的溶解度较低,因而需选择适当的助溶剂来增加极性底物在超临界流体中的溶解度。

Kamat 和 Barrera 等曾对其他一些超临界流体 (乙烷、乙烯和六氟化硫) 中的酶反应做了研究。研究表明,在 11MPa 和 45℃ 条件下,六氟化硫中酶反应的初速率 [5.8mmol/(L·h·mg)] 最大,比在 CO<sub>2</sub> 中 [0.05mmol/(L·h·mg)] 高 100 倍以上,而在乙烷和乙烯中相差不大 [0.20~0.50mmol/(L·h·mg)],是 CO<sub>2</sub> 中的 4~10 倍,说明酶在不同超临界流体中的活性存在极大的差异。研究还发现,超临界六氟化硫是一种比任何传统有机溶剂和其他超临界流体更好的溶剂,可使酶的活性得到充分展示,将为超临界流体中酶反应的进一步研究和应用带来新的前景。目前,超临界流体中的酶催化主要局限于 CO<sub>2</sub>,使得超临界流体中酶催化的广泛应用受到一定的限制,需进一步研究和开发新的超临界流体,以提高酶的活性和反应速率。

## 二、载体的选择

酶在超临界流体中使用的最简单形式是酶粉,但这不利于大规模的工业应用和自动化、连续化生产。将酶固定于比表面积较大的惰性载体表面可增大酶与底物的接触面积,降低扩散限制,能更充分有效地发挥酶的高效催化作用,并且有利于酶的回收和再利用,增加酶的热稳定性。酶的固定化方法有多种,如吸附法、包埋法、载体偶联法和交联法等,由于超临界流体具有低黏度和高扩散系数的特性,吸附于载体上的酶不易脱落,可使用最简单、最经济的吸附法。

载体的选择对超临界酶催化反应有着重要的影响,许多学者对载体的影响做了大量的研究。载体的性质可影响被吸附的酶量,并且载体可改变底物和产物在酶表面的微环境,影响酶分子上的结合水,从而影响酶的活性。Gunnlaugstir 等对载体的疏水性与吸附于载体上的酶量之间的关系进行了研究,结果表明,在超临界 CO<sub>2</sub> 中被吸附的酶量随载体疏水性的降低而减少,而且发现酶的活性强烈依赖于底物和固定化载体的疏水性,然而对于不同的酶反应,载体对酶活性的影响是不同的。在固定化酯酶催化鱼肝油和乙醇的醇解反应中,载体的疏水性越强酯酶的活性越高;而在甘油酯的合成反应中,却观察到相反的结果。这可用载体表面的化学性质对底物和酶结合的影响而得到解释。鱼肝油是疏水性较强的底物,在醇解反应中,它和疏水性较强的载体有较强的亲和力,因而酶表面的底物浓度增加,故吸附于疏水性较大的载体上的酶表现出较高的活性;在甘油酯的合成反应中,固定化于疏水性较弱的载体上的酶具有较高的活性,这是由于疏水性较弱的底物甘油与疏水性较弱的载体有较强的亲和力,因此疏水性较弱的载体可使底物在酶周围的局部浓度增加,而使酶表现出较高的活性。Bosley 和 Clayton 也证实了载体的表面性质 (特别是疏水性) 可影响固定化酶的活性。同时,载体可影响到酶分子表面的结合水。在相同的水含量下,酶在疏水性较弱的载体上表现出较低的活性。因为疏水性较弱的载体能从酶和溶剂中夺走大量的水,造成酶部分失水,而使酶的活性降低;而疏水性较强的载体不足以夺走酶的必需水,因而保持了较高的活性。

因此,可根据底物和载体的疏水性初步选择适当的载体。另外,还应考虑到载体的表面积、颗粒大小和内部孔径等因素。

### 三、工艺参数的影响

流体流速、反应温度和压力是影响超临界流体中酶反应的关键参数,其不仅影响底物和产物在超临界流体中的溶解度及酶的活性,还影响产物的提取。

#### 1. 流速的影响

流体流速影响产物提取的速率、提取物的成分和反应平衡,因而必须选择适当的流速。流速较高时提取速率较快,有利于反应向正方向进行,因而转化率较高,但提取产物的浓度较低,生产中应根据需要选择适当的流速。

Gunn Laugsdottir 和 Sivik 等研究了在超临界 CO<sub>2</sub> 中酯酶催化鱼肝油和乙醇合成乙醇酯的反应,发现流速对产物的提取有显著的影响。流速越快、提取速率越快,乙醇酯的回收率越高。例如,当流速为 0.3NL/min (NL 表示常温、常压下 CO<sub>2</sub> 的体积) 时,经 270min 的提取,乙醇酯的总回收量为 1520mg;而当流速为 0.015NL/min 时,乙醇酯的提取量为 250mg。但是,提取物中乙醇酯的浓度随着流速的增加而降低。同时发现,高流速使乙醇酯的提取更具选择性,即反应混合物中随乙醇酯一起提取出的其他物质的量更少,而且随着流速的增加,反应平衡向合成乙醇酯的方向移动。流速从 0.015NL/min 增加到 0.075NL/min,转化率从 78% 增加至 82%,而当流速进一步提高到 0.15NL/min 时,转化率变化甚少,因此,应根据过程的经济性选择最佳的流速。

#### 2. 温度和压力的影响

超临界流体的性质随温度和压力的不同而异,温度或压力的微小变化会引起其性质发生较大的改变,因而明了温度和压力的影响就显得尤为重要。温度和压力能影响物质在超临界流体中的溶解度,影响水在流体和固定化载体间的分配,但最重要的是影响酶的活性。一般来说,温度越高,物质在超临界流体中的溶解度越小,酶的活性越大,但温度过高会引起蛋白质变性,使酶失活;而压力越大,物质在超临界流体中的溶解度越大,酶的活性越低。但酶活性在不同超临界流体中对温度和压力的敏感程度不同。

Kamat 等研究了在超临界 CO<sub>2</sub>、超临界乙烷和正己烷中温度和压力对酶反应的影响。研究发现,温度对超临界 CO<sub>2</sub> 中酶反应的影响甚小,当温度由 40℃ 上升至 45℃ 时,反应速率几乎没有变化。在高压下,CO<sub>2</sub> 易与酶表面的氨基形成共价复合物,增加了酶的刚性,使酶的活性既不随温度的上升而增加,也不随温度的下降而降低。然而,在超临界乙烷中,温度从 40℃ 上升至 45℃,初始反应速率从 0.18mmol/(L·h·mg) 增加到 0.34mmol/(L·h·mg),而当温度进一步上升至 50℃,酶反应速率几乎没有增加。而在有机溶剂正己烷中,温度每增加 10℃,反应速率几乎增加一倍。这说明温度对酶活性的影响在超临界流体和有机溶剂中是不同的,酶的活性在有机溶剂中比在超临界流体中对温度要敏感得多,主要是因为超临界流体中的压力较高。同时,在传统的有机溶剂中,压力对酶的活性几乎没有影响,而在超临界流体中,压力增加一般使酶的活性下降,例如,在超临界乙烷中,压力从 11MPa 增加到 20.6MPa,酶活性下降了 25%。

另外,温度和压力能影响水在超临界流体和载体之间的分配。Marty 等的研究结果显示,对固定化酯酶在超临界 CO<sub>2</sub> 中催化乙醇和油酸的转酯反应体系,随温度的上升,固相中的水含量下降,超临界 CO<sub>2</sub> 中的水含量增加;同时,随压力的增加,超临界 CO<sub>2</sub> 中的水含量增加,固相中的水含量相对下降。

#### 四、超临界流体中酶催化的应用前景

近年来,有机溶剂中酶催化作用的研究取得极大的进展,这为超临界流体中酶催化的研究和应用开发奠定了基础。超临界流体作为一种特殊的非水介质,在酶催化反应的性质方面与有机溶剂非常相似,或者说,超临界流体在本质上就是一种特殊的有机溶剂,因此,从理论上讲,应用于传统有机溶剂的所有酶催化反应都可能通过选择适当的超临界流体而在超临界流体中进行。

超临界流体中酶催化的应用研究已有一些相关的研究报告。其中,一个重要的应用领域是醇解鱼肝油制备不饱和脂肪酸。有人通过研究指出,某些多聚不饱和脂肪酸(如 EPA 和 DHA)对关节炎和心脑血管疾病有良好的疗效,而市场上的鱼肝油是 EPA 和 DHA 的最好来源,大约含 EPA、DHA 各 10%。但因鱼肝油中的甘油三酯(含 EPA 和 DHA)不能浓缩到所需的浓度,因此必须用化学或酶催化的方法把不饱和脂肪酸从鱼肝油中分离出来。超临界流体中的酶催化因其高选择性、反应条件的温和性、产物易分离性和对产物无污染而被认为是一种颇受欢迎的选择。Gunn Laugsdottir 等对商业化的固定化酯酶(EC 3.1.13)在超临界 CO<sub>2</sub> 中催化该反应进行了研究,表明从反应混合物(其中包括甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯和乙醇酯)中优先提取含 EPA 和 DHA 的乙醇酯是可行的,因为乙醇酯在超临界 CO<sub>2</sub> 中的溶解度比其他酯大得多,并且乙醇酯的提取有利于反应的进行。

具有应用潜力的另一重要领域是药物的手性合成。目前,全世界使用最多的 25 种药物绝大多数是手性的,手性药物的研制已成为国内外药物研究的新方向之一,利用酶的高效性和高立体选择性,合成和制备手性化合物(如手性药物中间体、手性材料等)是超临界流体中酶催化的新应用,它将成为超临界流体中酶催化最具有潜力和发展前景的领域之一。Martins 等利用酯酶 PPL (EC 3.1.1.3)催化丁酸和外消旋环氧丙醇的选择性酯化,得到 S 构型的酯。

目前,超临界流体中酶催化的研究主要局限于 CO<sub>2</sub> 和脂肪酶,且在某些情况下,酶在超临界流体中的活性不高。今后研究开发的重点是如何通过酶的修饰来提高酶在超临界流体中的活性,研究和开发新的超临界流体,扩大酶的应用范围,进一步研究各种工艺参数(特别是压力)的影响等。目前,超临界流体中酶催化技术还处于实验研究阶段,离工业化尚有一定的差距。但是,超临界流体中的酶催化因其独特的优越性,特别是在生物工程下游加工工艺中的潜力,随着研究的不断深入,这一技术不久将会应用于工业生产,并将引起生物工程下游加工工艺新的革命。同时,特别是超临界 CO<sub>2</sub> 对环境无污染,将使传统的化学工业和制药、食品工业向着绿色工业、环境友好的方向发展,具有非常广阔的应用前景。

#### 第五节 油脂工业中的酶催化

将油脂与水一起在催化剂作用下生成脂肪酸和甘油的反应叫油脂水解反应,它在脂肪酸与肥皂工业上广泛应用。脂肪酶催化天然油脂水解制取脂肪酸的方法与传统的高温高压蒸汽裂解方法相比,具有耗能少、设备投资低、脂肪酸色泽浅和质量高、水解率较高等优点。特别是对一些含有不饱和键较多、易氧化和产生副反应的油脂酶水解更为适宜。

传统的油脂水解反应使用无机酸、碱及金属氧化物等化学物质作为催化剂,需要高温、中高压、长时间及设备耐腐蚀的条件,成本高、能耗大、操作安全性差,而且产物脂肪酸颜色深或易发生热聚合,不适用于热敏性油脂,如含共轭酸的油、易发生共轭化的油脂、易发

生脱水的含羟基酸的油脂或含高不饱和脂肪酸的油脂及鱼油等。而以生物酶作催化剂的酶促水解则正好克服上述缺点，而且可以具有选择性，因此有利于减少副反应、提高目标产品脂肪酸的质量和收率。但也存在反应缓慢、反应程度不完全、脂肪酶价格昂贵等问题。

近年来，世界各国对脂肪酶催化油脂水解的研究较多，美国和日本都很重视油脂酶水解的研究与应用开发，他们从 20 世纪 80 年代开始进行固定化酶技术的研究，如果固定化技术解决，将有大的发展。应用脂肪酶催化油脂水解法制取高质量的脂肪酸，特别是不稳定的脂肪酸，具有重要价值。

中国在脂肪酶催化油脂水解方面的开发研究开始较晚，据报道有从不同菌种中提取脂肪酶，如从细菌中提取假单胞菌胞外脂肪酶及从真菌中提取脂肪酶等。

## 一、油脂酶催化水解

用脂肪酶 (lipase) 水解油脂 (甘油三酯) 生成脂肪酸和甘油，如图 9-4 所示。



图 9-4 脂肪酶水解油脂反应

此反应水越多，反应越快，所以有效地进行分解反应的前提是大量的水和油脂溶解的温度，以及使脂肪酶在最佳温度下催化水解反应。

## 二、植物油脱臭馏分中提取维生素 E

植物油脱臭馏分是提取天然维生素 E 的宝贵资源，但其中甘油酯的存在会给后续的高真空蒸馏或分子蒸馏带来困难，同时也影响甾醇的结晶分离和产品质量。国内外一般采用皂化法和酯交换法来分解并除去甘油酯。然而，皂化是在碱性环境中进行的，酯交换也需加碱催化，而维生素 E 在强碱性条件下易氧化分解，从而降低了维生素 E 的提取率，也给生产操作带来困难。利用脂肪酶催化油脂水解反应来分解其中的甘油酯，则是一种简捷而又比较经济的方法。如清华大学雷炳福等人就解脂假丝酵母脂肪酶水解大豆油脱臭馏分中的甘油酯进行了研究，研究结果表明，这种酶促甘油酯水解反应简化了天然维生素 E 的提取工艺，保证了维生素 E 等天然成分的提取率。

## 三、酶促菜子油选择性水解制取芥酸

近年来，由于芥酸用途的拓宽和国际市场对芥酸需求的增大，芥酸成了紧俏的精细化工原料；而且，有人预言，芥酸将是 21 世纪的原料。因此，国内外均加大了芥酸的生产。而菜子油是芥酸的天然“仓库”，芥酸又主要是分布在菜子油甘油三酯的 1 位和 3 位上，因此，利用 1,3-定向酶有选择性地水解出菜子油甘油三酯上的芥酸具有传统的化学水解法和非特异性酶解法所无法比拟的优势。目前，国外已有这方面的文献报道。

## 四、酶促酯交换

将一种酯与另一种脂肪酸或醇或酯混合并伴随酰基交换生成新酯的反应叫酯交换反应。其中，酯-酸交换、酯-酯交换反应可以改变油脂的脂肪酸和甘油酯组成，从而改变油脂的性质，这是油脂工业常用来进行油脂改性的一种重要手段。

传统的酯交换工艺采用的是化学方法，常用的催化剂是金属钠或氢氧化钠、无机酸等，

虽然可以提高甘油三酯分子酰基的迁移性，但会造成反应体系中酰基间的交换与分布的随机性，致使副产品增多。如果用非特异性脂肪酶来催化甘油三酯的酯交换，也会得到与化学法酯交换类似的结果。然而，如果使用 1,3-定向脂肪酶作为催化剂，酰基的迁移与交换则限制在 1 位和 3 位上，这样就能生产出化学法酯交换所无法得到的特定目标产物，这正是酶促酯交换法具有独特魅力之处，其反应模式如图 9-5 所示。利用 1,3-定向脂肪酶催化油脂进行定向酯交换这个特性，有实际意义的应用是利用廉价油脂经过改性而生产珍贵油脂，目前在油脂工业上研究最多也最有研究价值的是类可可脂的生产。

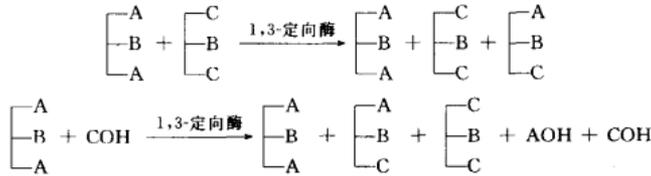
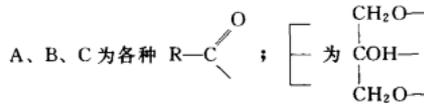


图 9-5 脂肪酶催化甘油三酯的酯交换反应



可可脂是最贵重的油脂之一，是巧克力配方中的重要成分，它具有如下显著特性。①结构特点：其脂肪酸组成主要是软脂酸（P）、硬脂酸（S）、油酸（O），其甘油三酯组分中有 75% 以上是 2 位为油酸的甘油三酯（如 POS、SOS、POP）。②物理特性：常温下呈乳黄色脆性固体状态，在 30~32℃ 下软化，在 32~35℃ 的狭窄范围内迅速熔解，进入人体后可迅速完全熔化。因其独有的特性，加之产量的限制和需求量的不断扩大，使得可可脂价格十分昂贵。

价格因素促使人们转为开发研究更为经济的代用品，以取代巧克力和糖果产品中的可可脂。现已开发的代用品有代可可脂（CBR）和类可可脂（CBE）两大类。代可可脂是指其膨胀性和熔点特性与天然可可脂相似，但在甘油三酯组分结构上却相差较大的代用品，它与天然可可脂相容性很差，故一般单独作为糖衣原料或糕点原料使用；而类可可脂则是指不仅在膨胀性、熔点特性方面而且在脂肪酸组成和甘油三酯组分上以及同质多晶现象方面均与天然可可脂十分相似的代用品，它与天然可可脂相容性很好，在巧克力配方中能以任意比例与天然可可脂混合。故类可可脂比代可可脂更有研究价值，也是人们最感兴趣的主要研究方向之一。

研究类可可脂的焦点集中在寻找 B-POS、B-SOS、B-POP 等几种甘油三酯组分上。虽然通过氢化、分提、化学法酯交换等技术也可以从一般油脂制取类可可脂，但基于副产品多、主产品得率低及成本高等经济方面的考虑，其进展不大。近十几年来发展起来的 1,3-定向脂肪酶催化油脂酯交换改性技术为类可可脂的研究注入了新的活力，并使之取得了很大的进展。目前已研究采用过的原料油脂有棕榈油中间分提物、乌柏脂、茶油等，采用的 1,3-定向酶有动物胰脂肪酶和米黑毛霉（*Mucormiehei*）脂肪酶 Lipozyme IM，供交换的脂肪酸主要是硬脂酸或硬脂酸加软脂酸。目前，日本、英国已有了以棕榈油中间分提物为原料经酶促改性制取类可可脂的小规模生产。中国近几年来对国内特有的油脂资源——乌柏脂和茶子油经酶促改性制类可可脂有较多研究，目前正在探索其产业化道路。

## 五、生物精炼——酶促酯化

在食用油脂精炼工艺中，由于毛油中通常含有较高的游离脂肪酸（FFA），故需采取措施进行脱酸以提高油脂品质。通常采用的脱酸方法有化学碱炼法和物理精炼法。化学碱炼法

就是向油中加入计算量的碱以中和油中的 FFA。由于碱炼过程中总是不可避免地要造成中性油、甾醇、生育酚等的损失，还会产生大量污染环境的废水和皂脚，故此法尤其不适合高酸值油（如毛米糠油）的精炼。现已开发成功物理精炼法来处理高酸值油，但物理精炼法对油脂的前处理要求严格，且必须具有高温高真空条件。

近 10 年来，一种高新技术——生物精炼，主要包括酶促 FFA 酯化，应用于高酸值油脂的脱酸，已引起了有关学者的关注。他们进行了一些试验，并且认为，从炼耗和油品质量出发来考虑，生物精炼与常规的碱炼、脱色、脱臭工艺结合或与物理精炼工艺结合起来应用，是处理高酸值油的一种潜在技术。

生物精炼（酶促酯化）的原理是：借助微生物脂肪酶在一定条件下能催化脂肪酸与及甘油间的酯化反应，从而把油中的大量游离脂肪酸转变成中性甘油酯，这样既降低了酸值，又增加了中性甘油酯的量。经过这种生物精炼脱酸处理的油中还会残余一些游离脂肪酸，可再经过碱炼方法除去，从而获得与传统精炼方法得到的一样质量的食用油。

## 六、脂肪酶的选择及固定化

脂肪酶水解油脂的方法虽已有用于皂粉生产和高纯度脂肪酸生产，但由于反应在常温常压下进行，反应时间长，难以实现连续化，加之酶的成本高，因此尚未达到真正普及。为使酶反应适合油脂水解，进行了固定化脂肪酶油脂水解的研究开发。

### 1. 脂肪酶的选择

采用荧光假单胞菌的脂肪酶水解牛脂、橄榄油、米糠油、棕榈油时，反应温度为 60℃，水解率大于 90%。水解产物分析表明，甘油酯的  $\alpha$  位及  $\beta$  位均被水解，反应温度 70℃ 时牛脂的最终水解率在 90% 以上。用毛虫假单胞菌培养也得到适合油脂水解的耐热性脂肪酶，选择荧光假单胞菌的脂肪酶安全性较好。

脂肪酶是分解天然油脂的酶，水解发生的位置是油脂的酯键。脂肪酶的底物甘油三酯的醇部分是甘油，而酸部分是水不溶性的 12 个碳原子以上的长链脂肪酸，工业上已用于油脂水解的脂肪酶如表 9-1 所示。大多数微生物脂肪酶作用于甘油三酯的  $\alpha$  位。但发现黑曲霉、柱形假丝酵母等菌所产生的脂肪酶无位置专一性，既能水解  $\alpha$  位酯键也能水解  $\beta$  位酯键。

表 9-1 脂肪酶催化裂解天然油脂

酶	天然油脂	酶	天然油脂
蓖麻子 ( <i>Ricinus communis</i> ) 酶	熔点低于 40℃ 的油脂	圆柱形假丝酵母 ( <i>Candida clindrance</i> ) 脂肪酶	橄榄油
猪胰脂肪酶 ( <i>procine pancreatic lipase</i> )	沙丁鱼油、冬化椰子油		
胰脂肪酶 ( <i>pancreatic lipase</i> )	橄榄油	皱褶假丝酵母 ( <i>Candida rugosa</i> ) 脂肪酶	牛脂、椰子油、橄榄油
胰脂肪酶 ( <i>pancreatic lipase</i> )	牛脂、大豆油	黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> ) 脂肪酶	牛脂、椰子油、橄榄油
		少根根霉 ( <i>Rhizopus arrhizns</i> ) 脂肪酶	牛脂、椰子油、橄榄油

利用各种不同酶可开发不同产品，如无位置选择性的脂肪酶可完全水解油脂最终得到脂肪酸和甘油，而利用有位置选择的脂肪酶可部分定向水解得到高含量 R-甘油单酯。目前研究较多、产率较高的微生物脂肪酶见表 9-2。

表 9-2 高产率脂肪酶

脂肪酶	反应类型	产率/%	脂肪酶	反应类型	产率/%
荧光假单胞菌脂肪酶	水解	94~96	假单胞菌脂肪酶	水解	94.7
荧光假单胞菌脂肪酶	甘油解	90	黏质色杆菌脂肪酶	甘油解	83
黑曲霉 8901 脂肪酶	水解	79.8	米里毛酶脂肪酶	甘油解	80
皱褶假丝酵母脂肪酶	水解	95~98			

## 2. 脂肪酶的固定化

脂肪酶的固定化是在一定空间内呈闭锁状态下存在的酶，能连续地进行反应，反应后酶可以回收重复利用，即所谓固定化酶。脂肪酶的固定化方法有两种：一种是利用共价键、离子键及物理吸附法的载体结合法，将脂肪酶固定在非水溶性载体上；另一种方法是包入法，是将脂肪酶裹于凝胶的微小格子内或半透膜聚合物的超滤膜内。除了固定化酶以外，还有更经济的微生物固定化方法。将微生物直接固定化，可省掉提取工序，直接利用微生物菌体作固体催化剂，可使酶的损失减少到最低限度。用于脂肪酶固定化的载体主要有：碳、矾土、CPG-100、Celgard 2500、聚丙烯 (PP) <math><250\mu\text{m}</math>、次乙酰塑料、硅胶、纤维素、Accurel 尼龙、高密度聚乙烯 (HDPE) <math><150\mu\text{m}</math>、HDPE 150~450 $\mu\text{m}</math>、PP 标准研碎、黏土、乙基纤维素、Profax PP、Microthene HDPE。$

大多数普通载体在固定时具有脂肪酶活性损失大的特性。但由高密度聚乙烯 (HDPE) <math><150\mu\text{m}</math> 和聚丙烯 (PP) <math><250\mu\text{m}</math> 制备的 Accurel 粉末是脂肪酶的优良载体。在 pH4~7 的范围内，固定在 HDPE Accurel 粉末上的假丝酵母的活性比游离脂肪酶活性高。在操作温度范围内，固定化脂肪酶的稳定性比游离脂肪酶要高。

## 七、固定化脂肪酶生物反应器

### 1. 逆流式固定床反应器

用于固定化脂肪酶生物催化的逆流式固定床反应器如图 9-6 所示。固定化的酶为荧光假单胞菌脂肪酶，反应温度 60 $^{\circ}\text{C}$ ，水解率大于 90%，连续运行 1 个月后，水解率也不降低，运行中未发现微生物的污染。在塔内需要让油层与水层混合的同时确保流水的通畅，处理速率必须在塔内油水分离速率以下，不要让固定脂肪酶的活性过度发挥。

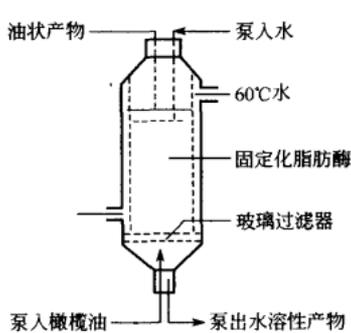


图 9-6 逆流式固定床反应器

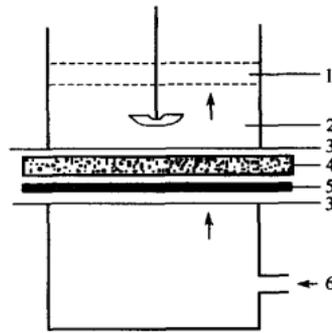


图 9-7 隔膜反应器

1—脂肪酶；2—缓冲液；3—载体；4—固定在 PP Accurel 纤维上的脂肪酶；5—滤布；6—橄榄油

### 2. 隔膜反应器

用于固定化脂肪酶生物催化的隔膜反应器如图 9-7 所示。隔膜反应器中有两个贮槽：低的是橄榄油槽，高的是水槽。油料强行通过由两层组成的膜：第一层是 3~5 $\mu\text{m}$  的聚合滤布，把油分散成细小油滴；第二层是 PP Accurel 纤维垫，纤维垫上固定着脂肪酶。在油滴聚结前，分散的油滴与脂肪酶接触，然后脂肪酸升到缓冲液层的上面，并可以连续从反应器的顶部排出。反应器用 15cm 有机玻璃管制成，隔膜内有 5.0g 溶喷纤维，纤维上含 0.3g Enecco 脂肪酶。重力进料，固定化脂肪酶的半衰期为 223h。

### 3. 连续流搅拌罐反应器 (CSTR)

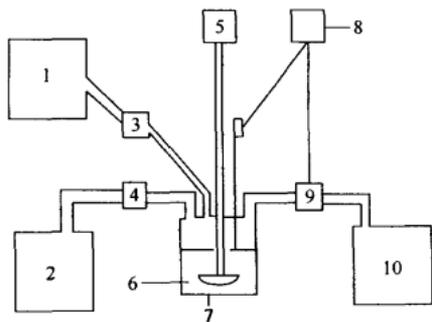


图 9-8 CSTR 示意

1—水槽；2—油槽；3—水泵；4—油泵；  
5—高架搅拌器；6—固定在 HDPE Accurel  
粉上的脂肪酶；7—反应器；8—Therm-O-Watch  
控制器；9—排液泵；10—甜水和脂肪酸收集槽

用于固定化脂肪酶生物催化的连续搅拌罐式反应器如图 9-8 所示。将油和水从各自的贮罐连续泵入反应器，用一个高架搅拌器给容器提供搅拌作用，用 Therm-O-Watch 控制器保持反应器的液体量，当反应内液体量达到预定量时，开动第三台泵。固定的脂肪酶粉末在反应器内混合，但通过排液管入口的屏障，将脂肪酶粉末留在反应器内。

在体积为 50mL 的 CSTR 反应器内，含 20g 固定的脂肪酶，橄榄油的平均流速为 4.7mL/h，水的平均流速为 6.3mL/h，容器的夹套温度保持在 35℃，该反应器连续操作 200 天以上，其固定脂肪酶的半衰期为 237 天。

上述 3 种反应器的半衰期、生产率（用积分获得的转化率曲线计算）如表 9-3 所示。

表 9-3 不同反应器固定化脂肪酶的半衰期和生产率

型 号	半衰期/h	生产率 /(kg FA/kg IMF)	型 号	半衰期/h	生产率 /(kg FA/kg IMF)
逆流式固定床反应器	196	100	CSTR	5680	1100
隔膜反应器	223	1700			

注：FA—脂肪酸；IMF—固定化酶。

对酶法水解油脂，CSTR 和隔膜反应器的生产率导致固定脂肪酶成本与蒸汽水解的能量成本不相上下。

目前脂肪酶油脂水解制造脂肪酸等油化学品的商业开发的主要问题之一是产品成本高（与高温高压油脂水解相比）。为了降低酶催化剂法的成本，许多国家如日本、美国和印度等竞相开展了固定化脂肪酶的开发研究，中国对这些技术的开发还比较薄弱。立足于国内脂肪酶制剂、固定化酶及新型生物反应器的研制，是油脂酶水解的发展趋向和努力的方向。固定化脂肪酶油脂水解工艺发展前景广阔，同时对天然油脂的甘油解也提供了一个新的合成方法。

## 第六节 酶催化合成表面活性剂

用生物工程来研制生物表面活性剂是 20 世纪 80 年代后期国际生物工程领域中发展起来的一个新课题。生物表面活性剂是指利用酶或微生物的生物催化和生物合成方法生产得到的具有表面活性的物质，如糖脂类、氨基酸类、蛋白质类等表面活性剂。

无论是在工业生产方面还是人类日常生活方面，表面活性剂的使用越来越广泛。但是，现在使用的绝大多数类型的表面活性剂都是化学方法合成的。这种方法不可避免地给人类的生存环境带来污染和破坏。生物表面活性剂与化学表面活性剂相比，是一类环境友好的表面活性剂。

生物表面活性剂主要具有以下特征。

① 生物表面活性剂表面性能优良，同样能显著地降低表面（界面）张力，具有渗透、润湿、乳化、增溶、发泡、消泡、洗涤去污等一系列表面性能。

② 有一些生物表面活性剂还有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等的药理作用和免疫功能。例如，

由 *Rhodococcus erythropolis* 在含甘油的培养基中所分泌产生的单琥珀酰海藻糖脂能显著地抑制 Herpes simplex 类型 I 病毒。

③ 生物表面活性剂分子结构类型多种多样,既有结构简单的分子也有复杂的高分子,其中大多数是因其复杂的结构而传统的化学方法所难以合成的。

④ 生物表面活性剂的合成原料多是在自然界中广泛存在的、无毒无副作用的物质,如甘油三酯、脂肪酸、磷脂、氨基酸等。原料的来源方便,价格便宜。

⑤ 最重要的是,生物表面活性剂产品本身无毒,并且能够在自然界完全、快速地被微生物降解掉,不会对环境造成污染和破坏。

所以,随着人们环保意识的增强,研制和应用生物表面活性剂显得越来越重要。生物表面活性剂逐渐代替化学合成的表面活性剂是不可避免的趋势。从 20 世纪 80 年代末至今,各国对生物表面活性剂的研制和开发应用都给予了高度的重视。已经有许多生物表面活性剂,如槐糖脂、鼠李糖脂、脂多糖等应用到了日化、食品工业、石油工业等方面。

目前,主要有两种方法应用于生物表面活性剂的生产:一种是微生物的方法;另一种是酶催化的方法。

酶作为一种具有催化活力的特殊蛋白质,具有催化效率高、反应条件温和、选择性强等特点。通过酶催化可以完成各种各样的有机反应,如氧化、脱氢、还原、羟基化、羟氰化、缩合以及卤代反应等。随着酶在非水介质中同样具有催化活力的发现,酶在表面活性剂合成方面的应用范围越来越大。

与微生物方法相比较,酶法合成的表面活性剂分子多是一些结构相对简单的分子,但同样具有优越的表面活性。酶法的合成还有其他的优点,如反应条件温和,常温、常压的操作没有危险,原料价廉,反应专一性强,副反应少,产物容易分离纯化,以及固定化酶可以重复使用等。酶制剂价格昂贵是酶法合成的一大缺点。下面是几种主要的酶法合成生物表面活性剂。

### 一、酶法合成甘油单酯类生物表面活性剂

工业上甘油单酯的合成多是在 240~260℃ 高温和高压下进行,能源消耗大且产物不易分离。利用酶法的常温和常压则可以节省能源,同时减少热降解副反应的发生。甘油单酯主要是通过 1,3-特异性脂肪酶催化动植物油类或脂肪的甘油解 (glycerolysis)、水解或醇解反应得到。甘油解的反应是在温和的温度和近似无溶剂状态下发生的,产率可达到 90%。1,3-特异性脂肪酶催化的水解反应得到的多是甘油单酯和甘油二酯的混合物,这具有良好的乳化性能。1,3-特异性脂肪酶催化的醇解反应则得到纯度很高的甘油单酯。

对于特殊的甘油单酯也可以通过酶催化甘油和脂肪酸的直接缩合生成。例如,使用特殊的带有疏水性微孔膜的装置就可以在脂肪酶 (a lipase from *Chromobacterium viscosum*) 的催化下连续地从甘油和脂肪酸出发得到甘油单酯。

### 二、酶法合成糖脂类生物表面活性剂

糖脂是由糖和长碳链羧酸 (或羧酸酯) 发生酯化 (或酯交换) 反应得到的化合物,在自然界中广泛存在。按结构上含糖基的多少来划分,糖脂可以分为单糖脂,如甘露糖脂;双糖脂,如海藻糖脂;多糖脂,如 Emulsan, 图 9-9 所示。

糖脂是一类非常重要的非离子型生物表面活性剂,具有优良的表面性能。例如,多糖脂 Emulsan 的乳化性能非常好,能使原油和水相相对稳定,这对重油运输和油水乳化后作为燃料以节省能源有着重要的意义。Emulsan 已被作为商品开发。同时,糖脂也具有多种多样的

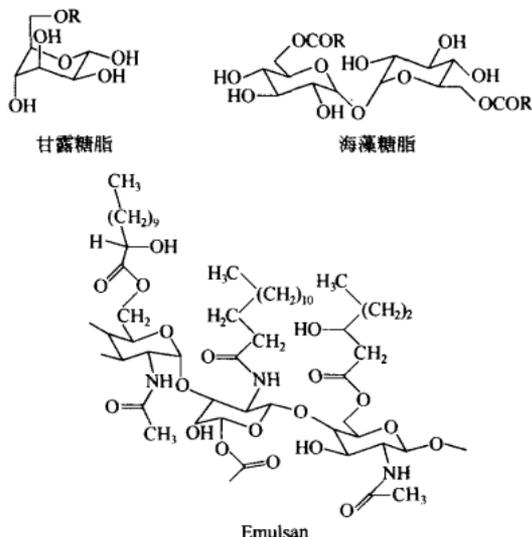


图 9-9 酶法合成的单糖脂、双糖脂和多糖脂

在这些副产物中，往往有许多可以致癌或容易造成人体的过敏反应。

如果要化学合成酯化位置特定的糖脂，则往往需要多步的保护和脱保护反应，不可避免地使反应步骤繁琐，操作麻烦，所以不易推广和应用。

在应用酶制剂合成糖脂方面，应用最多的是脂肪酶。利用脂肪酶的区域选择性，可以很容易地从糖类和脂肪酸或甘油三酯等价廉易得的原料出发合成酯化位置特定的糖脂。而且，反应条件温和，操作方便。

但是，反应底物糖类是亲水物，仅能溶解于一些亲水性很强的有机溶剂，如吡啶、二甲基甲酰胺 (DMF) 等。而长链脂肪酸具有很强的憎水性，所以，必须找到一种合适的溶剂或方式，既能维持脂肪酶的活性又能增加两者的互溶程度 (miscibility)，使反应顺利进行。

1984 年 S. Gino 报道了在缓冲溶液中，利用一些微生物 (*Rhizopus*、*Enterobacterium*、*Aspergillus*、*Pseudomonas*、*Penicillium* 等) 的脂肪酶 (lipase) 催化葡萄糖、果糖、蔗糖等与脂肪酸的酯化反应。但是，水相合成糖脂的方法产率低，而且反应后处理需要冷冻干燥，有机溶剂需多次提取等，操作相当繁琐。

自从人们发现脂肪酶在一些有机溶剂中同样具有催化活性以来，脂肪酶在有机溶剂中合成糖脂的报道越来越多。Klibanov 小组成功地利用脂肪酶催化无水吡啶、无水 DMF 的酯交换反应合成了单酰化的糖脂，如图 9-10 所示。

有报道添加硼酸或苯基硼酸，可与糖可逆形成糖-硼酸盐复合物 (carbohydrate-boronate complex)，使糖在有机体系中得到稳定，从而提高产率。对于特定的酶，也可以在乙腈等强极性溶剂中催化糖脂的合成。例如，Bo Mattiasson 报道来自 *Candida antarctica* 的脂肪酶可以在乙腈中以 100% 的转化率催化辛酸在 6-羟基位酰化葡萄糖。

使用有机溶剂作反应介质时，如果直接用甘油三酯作为提供酰基的反应底物，则反应进程太慢。所以，为了加速反应的进行，所用的脂肪酸酯一定要活化，如用  $\text{RCOOCH}_2\text{CCl}_3$ 、 $\text{RCOOCH}_2\text{CF}_3$  作底物。因为  $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$  是很好的离去基团，所以有利于

药理作用和免疫功能。例如海藻糖脂具有抗肿瘤和抗菌的活性。糖脂类表面活性剂的表面性能和药理免疫功能都是和其结构密切相关的，所以，合成糖脂，考察它结构中亲水部分、亲油部分对其功能的影响是一项很有意义的工作。

到目前，有许多关于糖脂的合成方法。就传统的化学方法合成糖脂而言，由于糖环上的羟基众多，且环境相似，酯化反应中糖环上的酰基容易发生分子内的迁移，这使得在采用一般化学方法直接酯化时的区域选择性很差，易产生大量的副产物。例如，在直接酯化方法生成食品乳化剂脱水山梨糖脂时，其终产物经气相检测至少存在 65 个化合物，主要是各种脱水山梨糖异构体的单脂、双脂及多脂的混合物。在

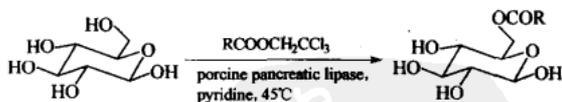


图 9-10 脂肪酶催化合成单酰化糖脂

反应的进行。而且使用有机溶剂时，往往在反应前需要做一些处理。如以无水吡啶 (pyridine) 为溶剂，用 PPL (porcine pancreatic lipase) 催化时，需事先将酶在真空中保存 3 天，使其含水量从 3.6% 降至 0.5%，以维持酶在吡啶中的稳定性。因为有机溶剂对酶有一定的毒性，所以，反应时间不能过长，否则，绝大多数酶便会失活。

使用有机溶剂为反应介质时，一般来说，由于有机溶剂的影响，酶催化单步反应的产率没有无溶剂方法高。而且，如果合成的糖脂是应用于食品添加剂或药品方面的话，因为有机溶剂的毒性较大，也不太适合。不过，有报道使用无毒的弱极性的叔丁醇为溶剂，利用它对二糖的溶解性酶促合成了一些二糖类的糖脂。



图 9-11 无溶剂酶促合成糖脂示意

除了使用溶剂以外，还有一种重要的方法，那就是无溶剂状态下酶促合成糖脂。一般是先将糖进行修饰，然后在酶的催化作用下同长链脂肪酸生成有修饰的糖脂，最后脱去修饰基团得到目标糖脂，如图 9-11 所示。

对糖的修饰有多种方式，一般常见的有缩酮形式和烷基糖苷形式。图 9-12 表示的是部分修饰后的糖。

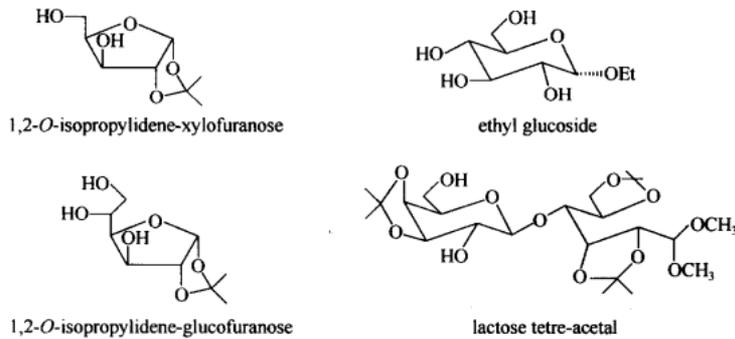


图 9-12 部分修饰后的糖

采用缩酮形式修饰糖时，经过无溶剂状态酶催化之后，要在温和的酸解条件下脱去丙酮亚基基团，最后得到单糖脂或双糖脂，产率很好。但是，引入丙酮亚基基团和脱去丙酮亚基基团的反应，在一定程度上使糖脂的合成复杂了一些。

采用烷基糖苷的修饰则相对简单。引入烷基修饰基团的反应很简单，而且无溶剂状态酶促反应后得到的产物本身就是很好的表面活性剂，无须再脱去修饰基团。

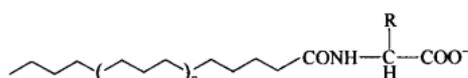
也有人无溶剂法酶促合成糖脂进行了改进。他们使用微波炉加热的方法代替传统的加热方式，发现反应的时间缩短了，产物的产率和光学纯度都有提高。

值得注意的是，在糖基上引入异亚丙基或烷基的目的是修饰，也就是增加糖和熔融脂肪酸的互溶性，使它们更易形成均相，更有利于反应向右进行。这与引入保护基的目的不同的。

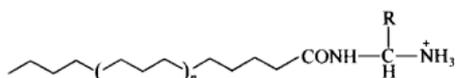
严格地说，酶在绝对无水的条件下是不可能具有催化活性的。因为水分子直接或间接地通过氢键、疏水键、范德华力等作用来维持着酶具有催化活性时所必需的构象。但是，水溶液中也并不是所有的水分子都与酶的活性有关。实际上，只有与酶蛋白分子紧密结合的那层水分子对酶的活性才是至关重要的。只要这层水分子不丢失，酶的催化活性就不受影响。因此可以把在有机溶剂中和无溶剂状态下的酶促反应理解为宏观上的非水相反应，而微观上是微水相反应。

### 三、酶法合成氨基酸类生物表面活性剂

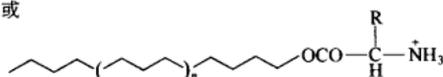
氨基酸类生物表面活性剂是一类表面性能良好的表面活性剂，它们乳化作用良好，



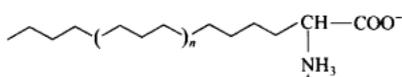
(a) *N*-酰化氨基酸类生物表面活性剂



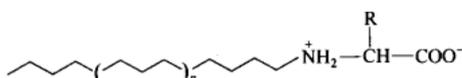
或



(b) 羧基改造的氨基酸类生物表面活性剂



(c) 碳烷基化氨基酸类生物表面活性剂



(d) *N*-烷基化氨基酸类生物表面活性剂

图 9-13 4 种基本结构的氨基酸类表面活性剂分子

为了优化氨基酸类表面活性剂的性能，在这 4 种基本结构类型的基础上，科技人员做了大量的结构改造工作。例如，在图 9-13 (a) *N*-酰化氨基酸类生物表面活性剂的结构中，引入羟基或烷氧基团，形成如图 9-14 所示结构的化合物。

羟基或烷氧基团的引入可显著提高它们抗微生物的活性。

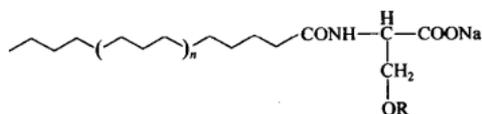


图 9-14 *N*-酰化氨基酸类表面活性剂

### 四、酶法合成和修饰磷脂类生物表面活性剂

磷脂分子结构中有多个敏感官能团，利用酶特异的选择性和专一性，用酶法催化合成磷脂类化合物有其独到的优点。由磷脂酰胆碱出发，经过不同的酶催化可以生成磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、溶血磷脂等一系列具有表面活性的物质，如图 9-15 所示。

### 五、酶法合成异头碳上构成单一的烷基糖苷类生物表面活性剂

化学方法合成糖苷时多会产生端基异构体。采用糖苷酶则可以控制产物异头碳上键的空间构象，生成异头碳上构型单一的烷基糖苷的纯度可达 95%。

生物表面活性剂不仅具有良好的表面活性，而且能被自然界完全降解，无环境污染，具有广阔的推广和应用价值。

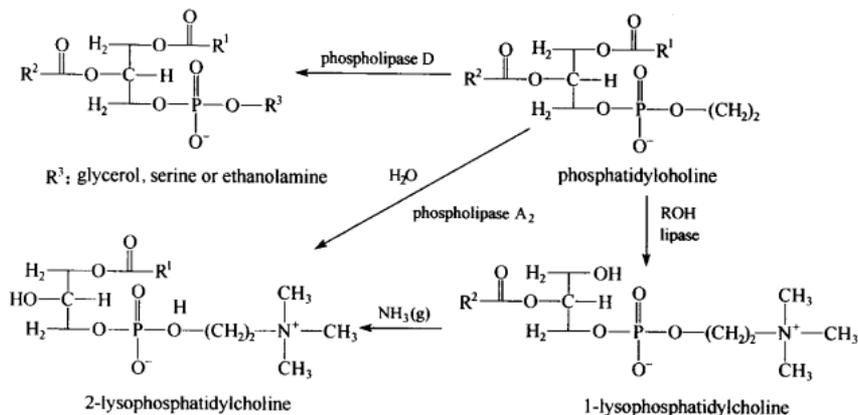


图 9-15 酶法合成磷脂类生物表面活性剂

## 第七节 石油工业中的酶催化反应

### 一、石油的生物催化脱硫

石油中含有大量的硫、氮、金属等杂质，其中含硫质量分数约为 0.03%~7.89%。当石油燃料燃烧时，放出大量的  $\text{SO}_x$  气体，对大气造成污染，同时也是酸雨形成的一个主要原因。随着人们环保意识的加强，各国政府纷纷立法，要求逐渐减少石化产品中的硫含量。例如，在美国，柴油中的硫含量要求小于  $500 \times 10^{-6}$ ，最近规定要求低于  $350 \times 10^{-6}$ ，2005~2007 年硫含量要求控制在  $(10 \sim 15) \times 10^{-6}$  之间。石油馏分脱硫成为炼油工业中的一个主要问题。

现在，石油脱硫的主要方法是加氢脱硫（HDS）。HDS 技术是在金属催化剂的作用下，对石油进行高温高压下的脱硫处理，将有机硫化物转变为  $\text{H}_2\text{S}$ ，再进一步还原为单质硫。加氢脱硫（HDS）反应一般较慢且非特效性，甚至使用催化剂时 HDS 反应速率仍有限，只有在高温、高压、高氢油比时反应才快速进行，投资费用较大，且对于烷基苯并噻吩类硫化物无效，难以满足超低硫油品的要求。氧化脱硫（ODS）可以在较低的温度下进行，但由于反应速率慢且没有选择性或反应速率不可控制，一直也未工业化。

近年来，生物催化脱硫（BDS）技术有了迅速的发展，BDS 技术有可能成为 21 世纪较廉价的降低石油产品硫含量的有效途径。BDS 技术是在温和的条件下，利用适宜的细菌或酶代谢过程催化特定的脱硫反应，释放出硫而将烃类保存下来的过程。细菌的生存是以硫而不是碳为能源。在生化反应过程中，细菌或酶可以再生或自身补充。

BDS 与 HDS 相比较，具有如下优点：①可在常温（20~60℃）、常压下操作；②成本低，BDS 比 HDS 投资少 50%、操作费用少 10%~15%；③灵活性好，可用于处理各种物料，如原油、石脑油、中馏分油、FCC 汽油、残渣燃料油等；④不需要氢气，节省能源，减少  $\text{CO}_2$  排放量；⑤能有效地脱除在传统脱硫技术（HDS）中难于处理的含硫杂环化合物。BDS 技术具有很好的发展前景。

#### • 1. 生物催化脱硫路线

石油中有机硫种类很多，包括硫醇、二硫化物、硫醚和含硫的杂环化合物噻吩等，其中二苯并噻吩（DBT）及其烷基衍生物（ $\text{C}_x$ -DBT）是石油组分中含量高、较难降解的有机硫化物的典型代表。近十几年来，许多研究者主要将 DBT 的降解脱硫作为模型反应来

研究，取得了许多有价值的研究成果，并搞清楚了它们的代谢机制是由于微生物酶的作用。酶脱硫路线主要有两种：一种是还原路线；另一种是氧化路线。

在还原路线脱硫过程中，有机硫被转化成  $H_2S$ ，然后进一步被氧化成为单质硫。此过程由于没有氧的存在，可以防止烃类物质的氧化，减少油品热值的损失。但是这种方法脱硫能力比较差，很难把它应用于工业化生产，因此，常采用氧化法脱硫路线。

在氧化路线中，有机硫被转变为硫酸盐。其脱硫路线分为两种途径，如图 9-16 所示，一种是硫代谢的 4-S 途径，另一种是碳代谢的 Kadama 途径。

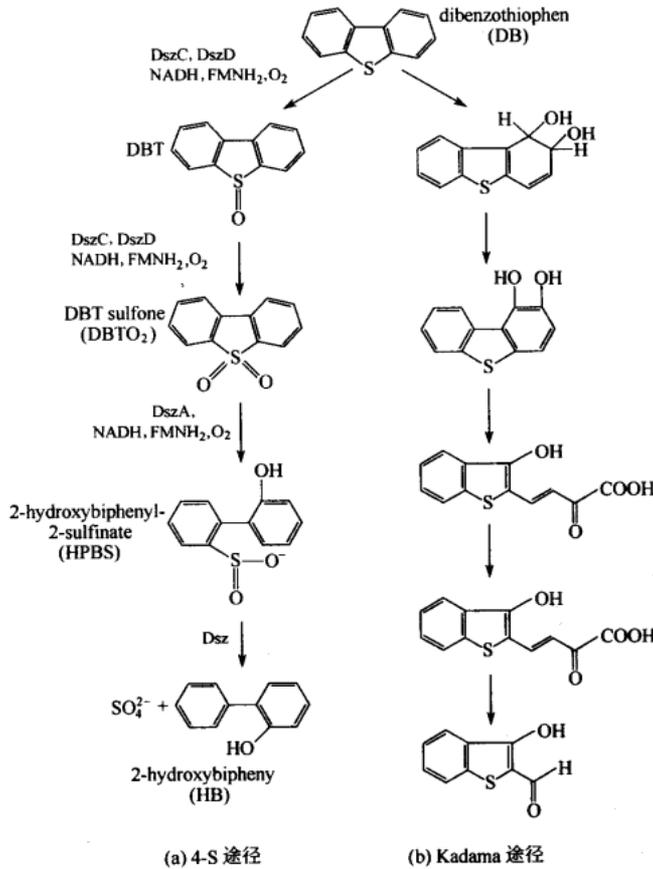


图 9-16 石油生物脱硫路线示意

4-S 途径 [图 9-16 (a)] 分 4 步进行脱硫催化反应，此途径专一切断 DBT 的 C—S 键，将硫原子氧化成硫酸盐或亚硫酸盐而转入水相中除去，DBT 的骨架结构被氧化成羟基联苯后仍留在油相中，对烃类不发生降解。研究发现，采用与 DBT 历程中同样的酶对于硫醇、硫化物、二硫化物、噻吩和苯并噻吩等含硫化合物具有相同的历程。研究证实，生物催化剂对于苯并噻吩类和二苯并噻吩类物质尤其有效。

Kadama 途径 [图 9-16 (b)] 是在两相 (油/水) 生物反应器中通过酶选择性地 将 DBT 分子中的 C—C 键断裂而将 C—S 键保留下来，生成溶于水的小分子有机硫化物，并不破坏含硫化合物基体。由于是整个含硫化合物转入水相，虽可从石油中分离出去，但也损失了有机烃，故油品的液体收率有所下降。若油中含硫化合物以 DBT 计算，则其质量约为硫原子的 5.3 倍，即硫质量分数为 0.2% 的油品脱硫后收率约损失 1.0%。

## 2. 生物催化脱硫的实施

首先将石油或其产品与氧源（包括富氧空气、纯氧气、氧饱和的全氟化碳液体等）接触，由于石油溶解氧的能力比水大得多（如氧气在辛烷中的溶解度比在水中大10倍），则溶于石油中的氧可作为催化剂在脱硫过程中的氧源。然后在生物反应器中与生物催化剂水溶液在乳化剂和湍流或其他方法的作用下形成乳液或微乳液。它是以有机相为连续相的油包水型，液滴直径是微米级的，这样保证了生物催化剂与有机相的紧密接触。液滴直径的选择还与生物催化剂的浓度和比活性、反应系统中氧的浓度和有机硫化化合物的浓度有关。经生物催化脱硫后的乳状液经分离装置将脱硫油和待再生的生物催化剂分开。硫以  $\text{SO}_4^{2-}$  形式溶于水的，除去  $\text{SO}_4^{2-}$  的过程即为生物催化剂再生的过程。

生物催化法脱除石油及其产品中硫的某些研究已进入中试规模。不断有新的概念和方法被提出，例如，①利用DNA重组技术对细菌进行改性，已生产出更高比活性、高稳定性、低成本生物催化剂；②将生物催化剂固定在不溶性树脂、陶瓷、玻璃及人工合成膜等载体上，无须制成水溶液；③通过采用多级反应器来代替单级搅拌釜式反应器（CSTR），有利于提高分级转化率和反应动力学的推动力，可提高平均体积反应速率，减少产品的抑制作用，实现深度脱硫的目的；④利用空气和乳状液相间的浮力发展的气升式搅拌技术，降低了能耗，增加了反应器的长径比，为气液界面的混合和传质创造了条件，同时还提高了氧气的利用率。

## 二、生物柴油的合成

生物柴油是一种清洁可再生的生物能源，发展生物柴油产业有益于保护生态环境，对中国国民经济可持续发展意义重大。发展立足于本国的生物柴油来替代石油燃料，是保障中国能源安全与国防安全的重大战略措施之一。而且，生物柴油是资源永续的可再生能源，而石油能源是可耗尽的；使用生物柴油可显著减少污染物的排放；生物柴油可生物降解，泄漏时对环境也无污染；在适宜的地区种植油料作物，还可保护生态，减少温室气体排放；利用废食用油生产生物柴油，可以减少含有毒物质的废油进入环境或重新进入食用油系统。

为大力推进生物柴油产业的发展，欧美国家的政府给予开发商巨额财政补贴和优惠税收等政策支持，这些国家现已建立了数家生物柴油生产厂并开始大规模利用生物柴油。由于成本问题，各国厂商大多在石油柴油中掺加10%~20%的生物柴油，直接在柴油发动机上使用。

目前，生物柴油主要用化学法生产，即用动植物油脂与甲醇或乙醇在230~250℃、酸或碱催化剂的作用下生成。但此法存在工艺复杂、能耗高、醇必须过量、反应液色泽深、杂质多、产物难提纯、有废碱液排放等缺点。为此，人们开始关注酶法合成生物柴油技术，即用脂肪酶催化动植物油脂与低碳醇间的转酯化反应，生成相应的脂肪酸酯。酶法合成具有提取简单、反应条件温和、醇用量小、甘油易回收和无废物产生等优点，且此过程还能进一步合成其他一些高价值的产品，包括可生物降解的润滑剂以及用于燃料和润滑剂的添加剂。

### 1. 脂肪酶在生物柴油生产中的应用

脂肪酶来源广泛，具有选择性、底物与官能团专一性，在非水相中能发生催化水解、酯合成、转酯化等多种反应，且反应条件温和，无须辅助因子，这些优点使得脂肪酶成为在非水介质中应用最为广泛的酶类。在生物柴油的生产中，脂肪酶是一种适宜的生物催化剂，能够催化甘油三酯与短链醇发生酯化反应，生成生物柴油。

用于催化合成生物柴油的脂肪酶主要是酵母脂肪酶、根霉脂肪酶、毛霉脂肪酶、猪胰脂肪酶等。由于脂肪酶的来源不同，其催化特性也存在很大差异。有文献报道了一些在无有机

溶剂存在时能够有效地催化豆油醇解的脂肪酶，在一个含水量很低的反应系统内，南极假丝酵母脂肪酶能有效地催化植物油甲酯的生成；在一个起始含水质量分数为4%~30%的反应系统内，来自于米根霉的胞外脂肪酶能催化转酯化反应发生，而在没有水存在时，该酶几乎无活性，当废油被用作底物时，该酶被认为是一种潜在的有效酶，这是由于废油中含有一定量的水。Kamini等研究了利用来源于若干隐球菌S-2的脂肪酶在水介质中催化米糠油的醇解，最后反应液中甲酯的质量分数达到80.2%。

近年来，研究者也在不断地寻求性能更优异的脂肪酶。Kakugawa等纯化了一种由能合成糖脂的酵母 *Kurtzmanomyces* sp. I-11 产生的胞外脂肪酶。pH 1.9~7.2，pH 低于 7.1 时，该酶的活性很稳定，优先选择十八碳酰基；在质量分数为 40% 的各种有机溶剂中其活性也十分稳定。尽管该酶的 N 末端序列与南极假丝酵母脂肪酶的 N 末端序列十分相似，但二者所适用的 pH 值范围却显著不同，也就是说它们有着更为广泛的应用范围。Kamini 等生产并纯化了来源于一株隐球菌的脂肪酶。该酶在 pH 7.0、温度 37℃ 时活性最高；在 pH 5.0~9.0、温度 50℃ 时活性仍然稳定；在质量分数为 50% 的各种有机溶剂中 60min 后活性也很稳定。添加适量的二甲基亚砷或二乙醚可显著提高该酶的活性，而添加苯却可抑制该酶的活性。此酶对油脂的选择性很宽，并具有工业催化剂的许多功能，这对于工业规模的生物柴油生产尤为重要。

在生物柴油的生产中直接使用脂肪酶催化，也存在着不少问题，主要有如下几个。

① 脂肪酶在有机溶剂中存在聚集作用，不易分散，因而催化效率较低。为使酶能很好地分散于疏水溶剂中，可通过酶的修饰、酶分子的生物印迹、酶晶体的交联、酶的纯化方式与预处理过程、酶的固定化等对脂肪酶进行改性。

② 目前，脂肪酶对短链脂肪醇的转化率较低，不如对长链脂肪醇的酯化或转酯化有效，而且短链醇对酶有一定的毒性，使酶的使用寿命缩短。采用分步添加短链醇的方法，使其浓度维持在较低的水平，可减少对酶活性的影响。另外，反应生成的甘油最好能及时从反应体系中除去。

③ 脂肪酶的价格昂贵，使用该酶作为催化剂生产成本较高，限制了其在工业规模生产生物柴油中的应用。解决此问题有两种方法：一是采用脂肪酶固定化技术，以提高脂肪酶的稳定性并使其能重复利用；二是将整个能产生脂肪酶的细胞作为生物催化剂。

## 2. 固定化脂肪酶在生物柴油生产中的应用

脂肪酶固定化技术因其稳定性高，可重复使用，保留酶活性，并有获得超活性的可能，容易从产品中分离，在工业规模生产中极具吸引力。酶的固定化方法很多，其中吸附法制备简单且成本低，被认为是大规模固定化脂肪酶的最适宜的方法。

诺维信公司已经开发出了用于非水系统的固定化脂肪酶的廉价方法，可提供固定化脂肪酶 Novozym 435、Lipozyme IM。酶和液态黏合剂经过雾化，喷射到沙粒大小的硅质载体上，硅质颗粒聚集成更大的具有非常好的抗机械力性能的多孔颗粒，固定化脂肪酶的表面积约为 50m<sup>2</sup>/g，酶均匀分布在整个载体表面。

Oznur 等研究了在无溶剂的媒介中利用来源于南极假丝酵母的已固定化的脂肪酶 Novozym 435 催化棉子油的醇解。在温度为 50℃、酶的质量为油质量的 30%、油与醇的摩尔比为 1:4 的条件下，反应 7h，反应液中甲酯质量分数最大达 91.5%。

Yomi 等发现，在固定化南极假丝酵母脂肪酶的催化下，脱胶大豆油能进行转酯化反应，而大豆毛油却不行。这是由于大豆胶体的主要成分磷脂与酶制品的结合干扰了酶分子与底物的相互作用。研究者应用三步醇解法成功地将 93.8% 的脱胶大豆油转化为相应的甲酯，并且脂肪酶可重复使用 25 个周期而无活性损失。另外，由于底物渗透到新制的酶中，其活

性受到限制,致使新制的酶在固定化时的反应初速率较慢,为此新制的酶要在与主反应相同的条件下预处理 24h。Samukawa 等也研究了预处理固定化脂肪酶 Novozym 435 对生物柴油生产的影响。该酶在经过甲基油酸盐处理 0.5h、豆油处理 12h 后,油脂醇解的速率明显加快。

Mamoru 等发现,用多孔高岭土微粒固定的荧光假单胞菌脂肪酶,在非水相发生的甘油三酯和短链醇转酯化反应中表现出最高活性。这是由于固定化酶与自由酶相比,活性位点变得更加有效,所以活性有较大提高。

Yuji 等建立了使用固定化南极假丝酵母脂肪酶分步醇解废弃食用油的反应系统,避免了由于固定化酶接触到较高浓度的不溶甲醇而导致的不可逆失活。两步法醇解是利用废弃油生产生物柴油最有效的工艺,但如果固定化载体被反应器内用于搅拌的叶轮所破坏,那么就要改用三步连续流法生产工艺。两种反应系统废弃油向生物柴油的转化率均超过 90%,并且固定化酶使用超过 100 天而无活性损失。另外,Watanabe 等也研究了使用固定化南极假丝酵母脂肪酶进行催化的两步法和三步连续流法醇解植物油甘油三酯的试验,最后反应液中脂肪酸甲酯的质量分数分别为 95% 和 93%,而且固定化酶能使用 100 天而无任何转化率下降。

脂肪酶固定化技术是酶法合成生物柴油得以工业化应用的关键。固定化脂肪酶在许多方面优于游离酶,但是已工业化的实例很少,主要问题之一就是载体。廉价、易于活化和制备的固定化酶的载体很难得到。另外,低碳醇可对酶产生毒性,而且在反应过程中必须及时除去生成的甘油,否则甘油很容易堵塞颗粒状固定化酶的孔径,缩短固定化酶的寿命。脂肪酶的膜固定化具有其他载体不可比拟的优点,膜除了能起到固定化作用外,还可作为酶催化反应的反应界面、接触界面和分离界面,由固定有脂肪酶的膜所构成的多相酶膜反应器集酶催化反应、产物分离(浓缩)或相分离和催化剂的回收于一体,在生物柴油的生产中有广泛的应用前景。

### 3. 细胞生物催化剂在生物柴油生产中的应用

酶法生产生物柴油进入商业化的最大障碍是脂肪酶的成本太高,一个很有前景的解决方法是以全细胞生物催化剂的形式来利用脂肪酶。这样就无须酶的提取纯化,避免了提纯过程中的酶活性大量损失,并节省了大量的设备投资和运行费用;对于工业化的生物转化过程来说,以此形式利用脂肪酶不但具有更高的成本效率,还具有更多的优势——经过简单培养就能制取且分离简单;截留在胞内的脂肪酶可看作被固定化;另外,产生脂肪酶的絮凝性微生物细胞在培养中就能自发地固定多孔渗水的支撑微孔中。

在细胞生物催化剂的发展中,酵母细胞是一种有用的工具。酵母细胞有相对刚性的细胞壁,在有机化合物和有机溶剂存在的条件下,仍能保持其结构,而且有关人员已经开发出一些增强酵母细胞渗透性的方法,能显著提高细胞的反应活性。Matsumoto 等构建了能大量表达米根霉脂肪酶的菌株酿酒酵母 MT8-1,其胞内脂肪酶的活性达到 474.5IU/L。用预先经冻融或风干方法增强了渗透性的酵母细胞来催化大豆油合成脂肪酸甲酯,最后反应液中甲酯质量分数达到 71%。这是第一个在酵母细胞中积聚由米根霉野生菌株分泌的活性脂肪酶的实例,也是第一个作为全细胞生物催化剂应用于工业的重要反应。Matsumoto 等还进一步利用热带假丝酵母异柠檬酸裂解酶 5'-上游区域作为诱导系统,用 3-磷酸甘油醛脱氢酶的启动子作为组成型表达系统,并优化了温度、碳源和碳源的初始浓度等重要的培养条件,使得酿酒酵母细胞内能过量表达活性米根霉脂肪酶,从而制备更高效的细胞生物催化剂。

Kazuhiro 等将用丙酮干燥过的米根霉 IFO 4697 细胞固定在聚氨酯泡沫微粒内,直接用来催化大豆油生产生物柴油。为增强固定化细胞的转酯化活性,在培养时添加了一些相关底

物，其中添加橄榄油或油酸效果显著，但必须不含葡萄糖。在反应体系含水质量分数为15%和分步添加甲醇的条件下，反应液中甲酯质量分数达90%，达到了用胞外酶催化的水平，但却比利用胞外酶经济方便。Kazuhiro 等还考察了戊二醛交联处理对固定在支撑微粒内的米根霉细胞的脂肪酶活性的影响。用质量分数为0.1%的戊二醛溶液处理后，胞内脂肪酶的活性在6批次产生甲酯的反应中并没有明显下降；若不用戊二醛溶液处理，则酶的活性每批次都会显著下降。用戊二醛处理的固定化细胞生物催化剂，脂肪酶活性稳定期长，是生物柴油工业化有潜力的途径。

不但产生胞内脂肪酶的细胞能作为细胞生物催化剂，重组后的产胞外脂肪酶的细胞也可以作为生物催化剂。Matsumoto 等构建了一个新的酵母细胞表面，作为FS蛋白或FL蛋白的细胞壁锚定区。含有一个来自米根霉的先导序列(rProROL)的重组脂肪酶蛋白能与FS蛋白或FL蛋白相融合，此融合蛋白在一个诱导启动子的控制下表达并分布在新构建的细胞表面。免疫荧光显微方法证实，细胞表面分布有FS ProROL和FL ProROL融合蛋白，细胞表面的脂肪酶活性达61.3IU/g(细胞干重)。用这种细胞作为全细胞生物催化剂，能成功地催化从甘油三酯和甲醇生产脂肪酸甲酯，反应72h，产率达到78.3%。这是细胞表面分布高活性脂肪酶的第一个例子，而且分布有FL ProROL蛋白的酵母细胞表现出很强的絮凝性。因此，以FL蛋白为基础的细胞表面分布系统赋予酵母菌株新型的酶分布方式和强的絮凝能力，并有着广泛的应用前景。

利用基因工程技术可进一步提高脂肪酶的使用效率，提高脂肪酶的表达水平和对短链醇的耐受性，使细胞生物催化剂在生物柴油的工业化生产中更有前途。

## 第八节 酶催化的有机合成

酶不仅可以在生物体内催化天然有机物质的生物转化，也能在生物体外促进天然的或人工合成的有机化合物的各种转化反应。应用酶或微生物细胞进行催化反应是有机合成化学领域的一个重大进展，较化学法合成具有明显的优势。酶法合成的优点在于降低了反应活化能，可在常温常压下进行催化，分子转换率高，专一性强，并具有高度的化学选择性、区域选择性和立体选择性，能催化特殊的功能基团键，副反应少，可获得高纯度的单一产物。酶催化在化学合成领域中具有较高的催化基础理论价值和广泛的实用潜力。

目前，酶法或多酶系统催化(微生物转化)反应已用于药物、食品添加剂等精细化学品的生产合成。已实现工业化或准工业化的酶法合成包括：类固醇及甾醇合成、类萜合成、生物碱合成、半合成抗生素的合成、有机酸类的合成、糖的转化、药用多肽及蛋白质合成、氨基酸类合成、核苷酸类合成、胺合成及日用化学品合成等；此外，酶法修饰的蛋白质、多肽、脂蛋白、多糖、糖脂类及多核苷酸等药用生物大分子还具有很重要的医疗保健价值。

在酶法合成中，有机相中的酶促催化、酶法手性化合物与药物的合成及拆分已成为当前重要的应用技术和研究内容，是酶法合成的热点。

酶在有机合成中的一个重要角色是不对称合成或拆分醇、醛、酮、抗生素、糖苷酶抑制剂及抗病毒药物等手性化合物及药物。其中水解酶、裂解酶、异构酶、醇脱氢酶、环氧化酶、醛缩酶及腺苷脱氨酶等，由于其特有的区域、位点及立体的底物选择性，而具有进行对映体拆分和不对称合成的独特优势，这在化工合成手性化合物或药物时是难以办到的。而手性分子识别可决定药物的生理活性、毒性及治疗效果，酶法拆分及不对称合成化合物及药物在国际上受到高度的重视。用酶法合成许多有价值的化合物和手性药物已受到人类的充分关注。

## 一、酶催化的水解及合成反应

### (一) 酯的合成及水解反应

水解酶易得而且使用方法简单，在酯化反应和酯的水解反应中，酶作催化剂的情况非常多，最常用的酶有两类：酯酶和脂肪酶，有时也可以用蛋白酶。

#### 1. 酯的合成

酯的合成常用羧酸和醇作原料，例如，*Pseudomonas asfragi* 的脂肪酶经 PEG 修饰后能溶于苯中，可在 25℃ 有效催化萜烯醇香料（香茅醇、香叶醇、金合欢醇、植醇）和短链羧酸（2~5 碳酸）的酯化反应，产率 80%~95%，酶也可以完成单脂肪酸甘油酯的合成以及促进内酯的合成等。另外酯交换反应也是制备酯的一个重要方法，当采用此法合成新酯时，也可以用酶作催化剂，如图 9-17 所示。



图 9-17 脂肪酶催化酯的合成

脂肪水解酶还可催化内酯的合成，Gargouri 等用脂肪酶催化合成了内酯，如图 9-18 所示，并研究了酶的类型、温度及溶剂对反应的影响。实验结果表明，在异丙醚中，用固定化脂肪酶 N-435 在 35℃ 催化反应时，内酯的产率为 73.8%。

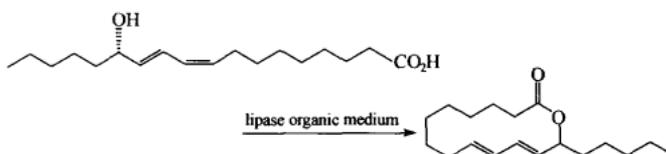


图 9-18 脂肪酶催化内酯的合成

维生素 A 的重要药理活性受到药物化学家的关注。但是，维生素 A 不稳定，在空气中易氧化，在紫外照射下易失活。解决问题的方法之一是将维生素 A 酯化，从而提高它的稳定性。用不同的化学方法合成维生素 A 酯时，均发现维生素 A 的降解严重，产生的副产物较多，因而降低了酯化产率。而 Maugard 等用 5 种脂肪酶在不同的有机溶剂中催化合成了几种维生素 A 酯，如图 9-19 所示。其中，在己烷中用脂肪酶 Lipozyme 催化合成油酸维生素 A 酯时，产率达到 90%。这是由于有机溶剂中酶催化反应条件温和，且反应选择性高，可以有效地避免化学法引起的副反应。

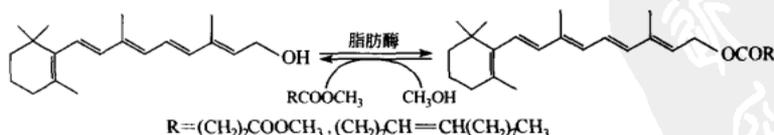


图 9-19 脂肪酶催化合成维生素 A 酯

Gatfield 最先用真菌脂肪酶在有机介质中对内酯合成进行了研究。十五酸内酯可由 15-羟基十五烷酸合成，而  $\gamma$ -丁内酯可由 4-羟基丁酸制备。Gutman 等用猪胰脂肪酶在疏水溶剂中催化  $\gamma$ -羟基酸的立体选择性内酯合成。同样，*Pseudomonas sp.* 脂肪酶可催化外消旋

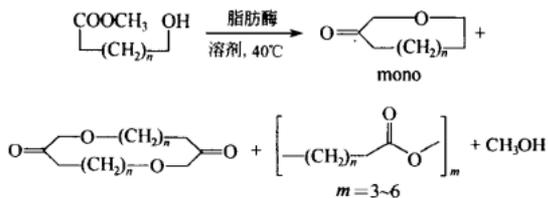


图 9-20 脂肪酶催化合成多聚内酯

10-羟基十一碳酸甲酯的立体选择性内酯合成。由于发生分子间转酯反应，结果形成大量的大环内酯。研究表明，羟基酸的长度可控制形成分子间或分子内内酯。10-羟基癸酸可形成分子间大环内酯，而 16-羟基十六碳酸只形成分子间内单酯。潘冰峰等用猪胰脂肪酶、青霉脂肪酶和柱状假丝

酵母脂肪酶催化  $\omega$ -羟基十三酸甲酯合成内酯，环化转化率达 83.5%，产物以单分子、双分子、三分子内酯最多，同样条件下，用  $\omega$ -羟基癸酸甲酯合成内酯，环化转化率为 9%，但可以合成多达 6 个分子的内酯，不形成单分子内酯，后者的催化反应为合成多聚内酯提供了途径，如图 9-20 所示。这与酶的立体因素和溶剂 (solvent) 效应有关，可选择适当的酶得到所需要的内酯。

Chen 等用 *Candida cylindracea*、*Pseudomonas* sp. 及猪胰脂肪酶在异辛烷、四氯化碳和环己烷中催化二醇和二酸间缩合反应。反应表现出特殊的温度依赖性，当温度为 55~75℃ 时，单内酯的产率为 23%~38%；而当温度低于 45℃ 时，单内酯的产率低于 4%，寡聚酯成为主导产物。很明显内酯化反应较聚合反应需要较高的活化能。

## 2. 酯的水解反应

由于酯在酸性或碱性条件下水解，都可能引起碳架的改变，得到副产物。而酶催化的水解反应，条件温和，不会影响碳架结构，因此酯的水解反应用酶来催化显得尤为重要。例如，在酸性或碱性条件下水解环丙醇乙酸酯，都会发生开环反应，生成丙醛和一个羟醛缩合产物，而用猪肝脂肪酶作催化剂，在 pH7.5 的条件下水解才得到环丙醇，如图 9-21 所示。

再如  $\alpha$ -芳基丙酸酯的水解，在 CLEC-CR 酶的作用下，优先水解具有 S 构型的  $\alpha$ -芳基丙酸酯，如图 9-22 所示。

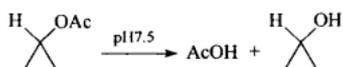


图 9-21 猪肝脂肪酶催化的酯水解

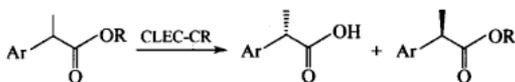


图 9-22 CLEC-CR 酶催化的  $\alpha$ -芳基丙酸酯水解

## (二) 酰胺的合成及水解反应

如果有酶参与，酰胺键的形成或裂解，可以得到具有光学活性的氨基酸、二肽或多肽等肽类衍生物。因此酶催化酰胺的反应无论是在实验室还是在工业上都得到了应用，特别是在抗生素（以青霉素和头孢菌素为主）的研究中，应用最为广泛。

### 1. 酰胺和肽的合成

酶催化反应在青霉素和头孢菌素的酰胺键生成中起着极为重要的作用。例如，在酶的作用下，7-氨基去乙酰氧基头孢菌素酸 (7-ADAC) 和 D-苯基甘氨酸 (D-phenylglycine) 可以转变为头孢菌素 (cephalexin)，如图 9-23 所示。

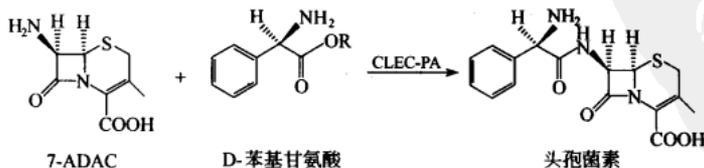


图 9-23 酶催化合成头孢菌素

当底物分子含有多种不同反应能力的官能团时，若想得到单一的目标产物，选用酶作催化剂是最佳的，如天冬酰胺的合成（图 9-24）。

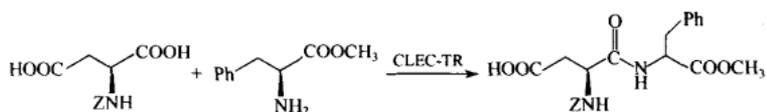


图 9-24 酶催化合成天冬酰胺 (Z=苄氧羰基)

蛋白水解酶或脂肪水解酶催化的逆反应可用于肽或酯的合成。另外，蛋白水解酶还可以催化非蛋白氨基酸底物参与的合成反应。

Ye 等成功地在有机溶剂中以酶促法合成了 N 端保护的亮-脑啡肽 Z-TyrGlyGlyPheLeu-OH (Z=苄氧羰基)，其中每一步反应均为非水介质中的酶催化反应。在反应过程中，酪氨酸侧链羟基不需保护。合成路线采取 [3+2] 策略。其中，两个片段肽 Z-TyrGlyGlyOEt 和 Boc-PheLeuNHNHPh (Boc=叔丁氧羰基) 分别用  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶和嗜热杆菌蛋白酶在二氯甲烷和叔戊醇中催化获得，产率分别为 71% 和 67%。将 Boc-PheLeuNHNHPh 脱除 Boc 基，然后在叔戊醇中用嗜热杆菌蛋白酶催化两个片段肽的缩合。再经 FeCl<sub>3</sub> 水溶液脱去 C 端 PhNHNH 后得到了预期的目标产物。Ye 研究了含水量对反应产率的影响，发现  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶在二氯甲烷中催化反应的最适含水量范围是 0.15%~0.25% (体积分数)，而嗜热杆菌蛋白酶在叔戊醇中催化反应的最适含水量范围是 6%~8% (体积分数)。由此可见，疏水性溶剂所需最佳含水量比亲水性溶剂少，这是由于亲水性溶剂易剥夺酶表面的“必需水”，因此需要加入更多的水以保持酶的活性构象。

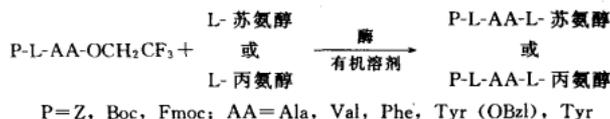
Filippova 等用枯草杆菌蛋白酶 (SDS-subtilisin) 在乙醇中催化合成了一系列四肽 (Z-Ala-Ala-P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'-pNA)。当 P<sub>1</sub> 或 P<sub>1</sub>' 位是侧链未保护的碱性或酸性氨基酸残基时，均得到目标化合物，如表 9-4 所示，显示了酶催化反应的优越性。

表 9-4 枯草杆菌蛋白酶催化 P<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>' 位含 Arg、Lys、His、Glu 和 Asp 残基的四肽合成

酰基供体	酰基受体	产物	收率/%
Z-AlaAlaArgOCH <sub>3</sub>	H-Phe-pNA	Z-AlaAlaArgPhe-pNA	92
Z-AlaAlaLysOCH <sub>3</sub>	H-Phe-pNA	Z-AlaAlaLysPhe-pNA	81
Z-AlaAlaLysOH	H-Phe-pNA	Z-AlaAlaLysPhe-pNA	83
Z-AlaAlaHisOCH <sub>3</sub>	H-Phe-pNA	Z-AlaAlaHisPhe-pNA	42
Z-AlaAlaAspOH	H-Phe-pNA	Z-AlaAlaAspPhe-pNA	31
Z-AlaAlaGluOH	H-Phe-pNA	Z-AlaAlaGluPhe-pNA	84
Z-AlaAlaGluOH	H-Arg-pNA	Z-AlaAlaGluArg-pNA	92
Z-AlaAlaLysOH	H-Glu-pNA	Z-AlaAlaLysGlu-pNA	83

注：pNA = p-nitroanilide; Z=苄氧羰基。

蛋白水解酶的底物专一性会因溶剂不同而发生改变。例如，在有机溶剂 (organic solvent) 中可以催化含 D-氨基酸多肽的合成，还可以催化非氨基酸化合物为底物形成酰胺键的反应。肽醇是重要的手性配体、合成中间体及某些酶的抑制剂。用侧链羟基不保护的苏氨酸 (throl) 和丙氨酸 (alaol) 为酰基受体底物，N 端保护的氨基酸三氟乙酯作为酰基供体，用枯草杆菌蛋白酶和  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶可以催化合成一系列 N-保护肽醇，如图 9-25 所示。



P=Z, Boc, Fmoc; AA=Ala, Val, Phe, Tyr (OBzl), Tyr

图 9-25 蛋白酶催化合成肽醇

17 位氨基或 17 位胍基的雌酚酮衍生物在结构上与蛋白氨基酸差异很大。但在一定条件下，这类化合物同样可作为蛋白水解酶的底物。Ye 等成功地以其作为酰基受体底物，用枯草杆菌蛋白酶催化合成了一系列 *N*-保护氨基酸-雌甾缀合物，如图 9-26 所示。

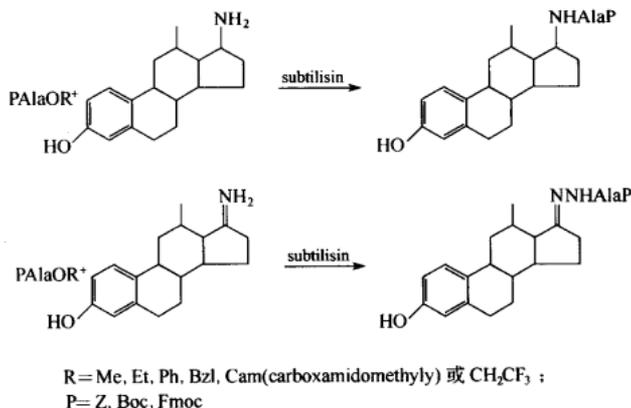


图 9-26 蛋白酶催化合成氨基酸-雌甾缀合物

非蛋白氨基酸是一些生物活性肽类似物的重要组成部分，它们也可以作为酶的底物，通过酶促方法合成含非蛋白氨基酸的多肽。Miyazawa 等以外消旋卤代苯丙氨酸酯为酰基供体，用硅藻土吸附的  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶在乙腈中催化合成了一系列二肽衍生物，如图 9-27 所示，并研究了不同酯基对反应的影响。实验结果表明，三氟乙酯是比三氟甲酯更好的酶的底物。苯丙氨酸苯环上的 H 被卤素取代后，仍然能够得到预期的 L-L 构型产物，产率与苯丙氨酸相比有所下降，并且苯环上的取代基及其位置对反应产率有显著影响。实验结果表明，在有机溶剂中， $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶 ( $\alpha$ -chymotrypsin) 可以接受非蛋白氨基酸形成酰胺键，有机溶剂可以拓宽酶的底物专一性。

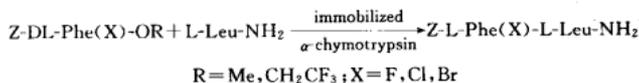


图 9-27  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶催化的合成系列二肽衍生物

双萜类化合物紫杉醇同样可以作为酶的底物。紫杉醇能阻碍细胞分裂，是重要的抗癌药物，但是它在水溶液中不易溶解而使它的药效大大降低。Clark 和 Dordick 等利用有机溶剂中酶催化反应在紫杉醇 (a) 的 2'-OH 引入亲水性基团，有效地提高了紫杉醇的水溶性。实验结果表明，嗜热杆菌蛋白酶可以专一地催化 2'-OH 发生酰化反应。使用不同的酰化试剂，酰化产率多数在 50% 以上。然后用脂肪酶催化 b 水解及与葡萄糖的转酯反应，生成 c 和 d 的产率分别为 75% 和 85%，而 c 和 d 的溶解度分别是紫杉醇的 1625 倍和 58 倍，如图 9-28 所示。

非水介质中酶催化反应的发展提供了一种合成手性化合物的新方法。脂肪水解酶和蛋白水解酶等在有机溶剂中对某些手性化合物表现出高度的立体选择性，使它们在手性化合物的拆分及催化合成等方面显示出广阔的应用前景。

利用酶促不对称酰化作用可以拆分消旋酰基化合物和消旋醇，如图 9-29 所示。

## 2. 酰胺和脲的水解

氨基酸中的酰胺键水解，很少用酶来催化。但是 *N*-乙酰基取代的氨基酸中的酰胺键，在酶的作用下水解却非常重要。酰化氨基酸水解酶能够选择性地使 L 构型的反应物水解，

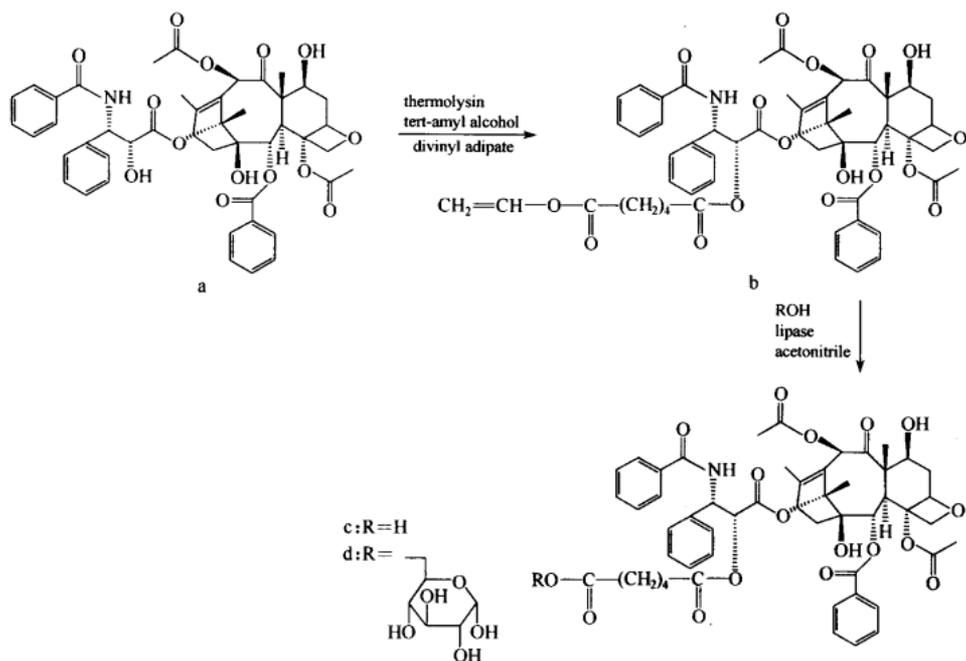


图 9-28 嗜热杆菌蛋白酶催化的紫杉醇引入亲水性基团反应

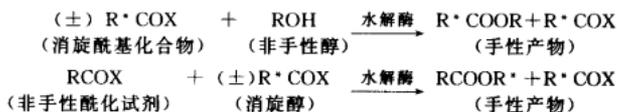


图 9-29 酶催化的不对称酰化作用

而 D 构型的反应物不受影响，并可从混合物中分离出来，如图 9-30 所示。

另外，脘的水解可以用酶来催化。在脘水解酶的作用下，可以使脘转化为酰胺，也可以将脘转化为羧酸，如图 9-31 所示。

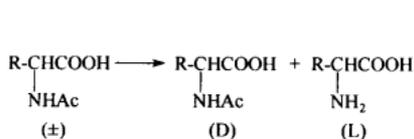


图 9-30 酶催化的酰化氨基酸水解反应

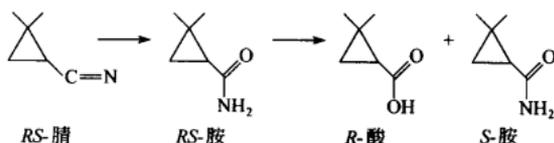


图 9-31 酶催化的脘水解反应

### (三) 氨基水解酶在有机合成中的应用

#### 1. 化学选择性

在有机合成中，常需要水解氨基时不伤害其他可水解基团，如酰基、缩醛、醚键等。Faber 小组在对固定化酶 SP409 的研究中发现，这种复合酶对酯、磷酸酯类底物显示出了化学选择性，如图 9-32 所示。

很多含缩醛及醚键的脘类也都能化学选择性地转化成相应的羧酸，所用的催化剂包括固定化酶 SP409、SP316 及菌种 *Rhodococcus* sp. CH5、*Brevibacterium* R312 等，但很多时候

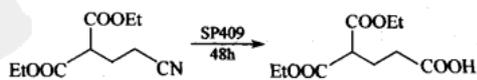


图 9-32 酶催化下酯基取代氰化物的水解

产率都不理想,如图 9-33 所示。

因氰基水解生成的酸对环氧开环有催化作用,酶催化含环氧基的氰化物水解时,难以实现化学选择性,水解的同时总是生成双羟基物,如图 9-34 所示。

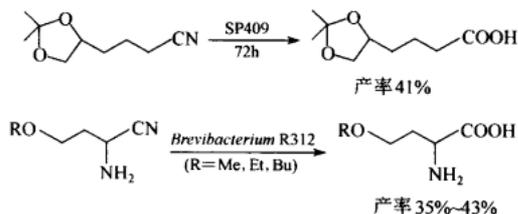


图 9-33 酶催化下缩醛、烷氧基取代氰化物的水解

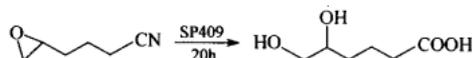


图 9-34 酶催化下环氧取代氰化物的水解

氮杂环化合物是有机化学中的一个重要方面,尤其是吡啶及吡咯嘧啶系列,但是杂环羧酸在酸性环境中易脱羧,即使在温和条件下,稍稍升温也会导致脱羧。因此在杂环氰化物的水解中,酶催化反应的温和条件显得尤为重要,而氰基水解酶在大多数情况下可以实现这种转化,并且可以用不同菌种分别得到酰胺或羧酸,如图 9-35 所示。

酶催化的条件温和,水解带羟基的腈类时,可避免易发生的消除或反 Aldol 反应,如图 9-36 所示。

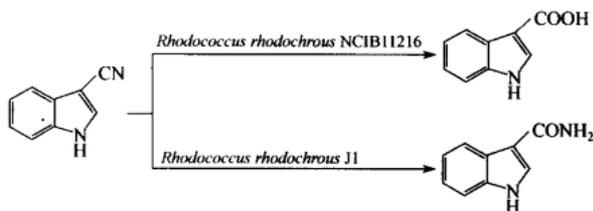


图 9-35 酶催化下杂环氰化物的水解

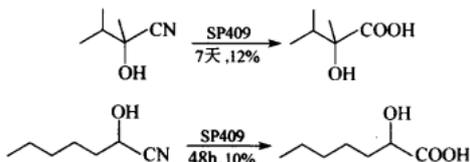


图 9-36 酶催化下羟基取代氰化物的水解

糖化学中很多底物对酸碱敏感,酶催化水解氰基也是糖化学应用的一个重要领域。如在以下分子中,烯丙基腈对碱敏感,而双键及保护基则对酸敏感,用酶催化的方法这些基团就不会受影响,如图 9-37 所示。

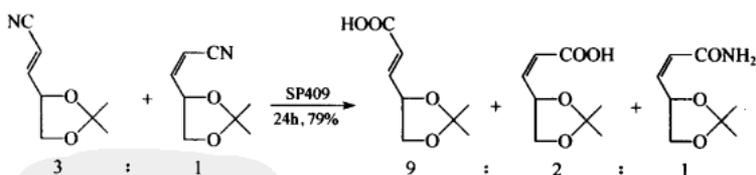


图 9-37 酶催化下糖类氰化物的水解

## 2. 区域选择性

酶催化下二腈的单水解是区域选择性水解的典型例子,其中对称二腈的酶水解研究得比较多,脂肪族和芳香族均有所涉及。在苯二腈的情况下,氰基的位置很重要。在用 SP361 及 *Rhodococcus* sp. AJ270 催化两种情况下,间位、对位取代物都生成相应的氰基苯甲酸,而邻二腈则表现得比较复杂,如图 9-38 所示。

Turner 小组研究了不对称二腈的酶水解,虽然得到的全部为单水解产物,但区域选择性不佳。采用带氨基的全氟苯二腈后,选择性大大提高,水解的总是氨基邻位的氰基,产物

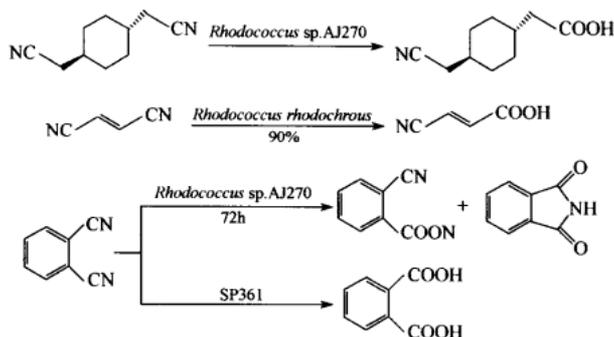


图 9-38 酶催化下二腈的区域选择性水解

是酰胺而不是羧酸，如图 9-39 所示。

Faber 小组还对三腈的酶水解进行了研究，主要得到端位单羧酸，如图 9-40 所示。

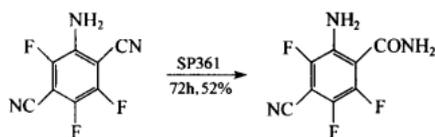


图 9-39 酶催化下含氟芳基二腈的区域选择性水解

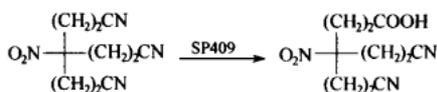


图 9-40 酶催化下三腈的区域选择性水解

### 3. 立体选择性

近几年来生物催化氰基水解反应的立体选择性逐渐成为关注的中心。很多实验结果表明氰基水解酶 (nitrilase) 和氰基水合酶 (nitrile hydratase) 对底物的立体选择性不强，反应的立体选择性主要体现在酰胺酶 (amidase) 一步，作用机制目前尚不清楚。

$\alpha$ -羟基腈的动力学拆分研究得较早，用不同的菌种可以分别得到 *R*、*S* 两种构型的  $\alpha$ -羟基酸，其中， $\alpha$ -羟基苄腈 *S* 构型因为化学平衡的缘故，会自动消旋，实际上实现了动态动力学拆分，使 *R* 型羧酸的产率达到 91%，如图 9-41 所示。用苯甲醛和氢氰酸混合物代替  $\alpha$ -羟基苄腈进行反应，得到同样的结果，由此推断消旋过程可能经过苯甲醛、氢氰酸中间体。

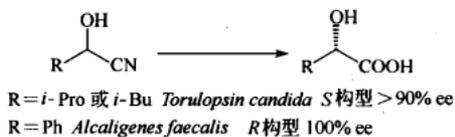


图 9-41 酶催化下  $\alpha$ -羟基腈的对映选择性水解

与  $\alpha$ -羟基腈相比， $\alpha$ -氨基腈的手性拆分研究得更多，如图 9-42 所示。其产物 *L*-氨基酸是众所周知的生物活性分子和药物中间体。

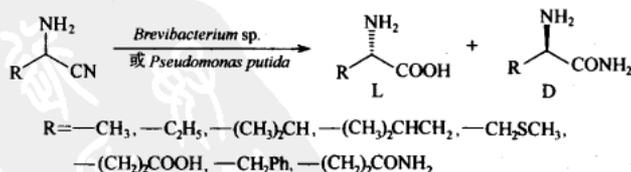


图 9-42 酶催化下  $\alpha$ -氨基腈的对映选择性水解

$\alpha$ -芳基取代的丙酸是一类重要的非甾族抗炎药，其 *S* 构型比 *R* 构型效力强得多，而氰基酶催化水解产物是 *S* 构型的酸，即天然的 *L* 构型酸，如图 9-43 所示。有的情况下，发现手性拆分的结果中有光学活性的氰化物，这说明确实存在光学选择性的氰基水合酶。

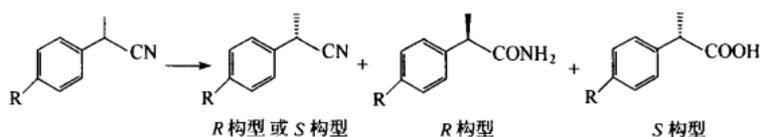


图 9-43 酶催化下  $\alpha$ -芳基丙腈的对映选择性水解

利用酶催化水解相应的氰化物，可以制备  $\alpha$ -芳基取代丙酸类光学纯抗炎药，如图 9-44 所示。目前，在这类药物中，除萘普生 (naproxen) 外，其余均以消旋体形式上市。

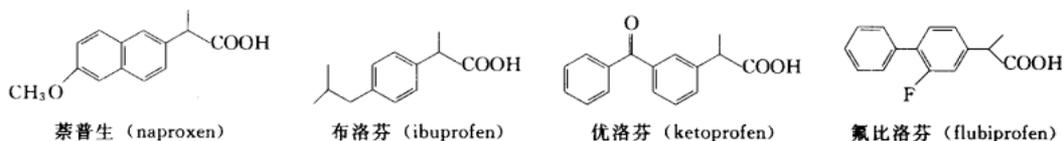


图 9-44 部分  $\alpha$ -芳基丙酸类的光学纯抗炎药

利用氰化物光学选择性水解，可以制备除草剂  $\alpha$ -芳氧基丙腈，如图 9-45 所示。整个过程包括一个快速的非选择性氰基水合酶作用步骤和一个慢速的 *S*-选择性酰胺酶作用步骤。

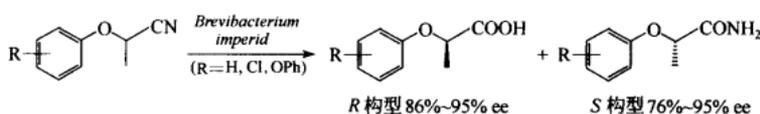


图 9-45 酶催化下  $\alpha$ -芳氧基丙腈的对映选择性水解

关于前手性二腈不对称水解的研究目前还很少，而且只涉及 3-羟基（或醚基）取代的戊二腈类和二取代丙二腈类。

3-取代戊二腈的光学选择性同 3-羟基的保护基关系密切，有苯环的取代基效果比较好，但如果以苄基取代—OR，那效果也不理想，这说明极性官能团如醚、酯等对手性识别有很大影响。这个过程可能经过一个 *S*-选择性步骤生成酰胺，再经非选择性水解生成酸，如图 9-46 所示。

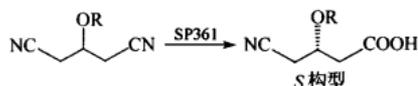


图 9-46 酶催化下 3-取代戊二腈的不对称水解

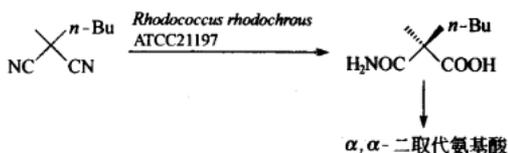


图 9-47 酶催化下二取代丙二腈的不对称水解

二取代丙二腈的酶催化光学选择性水解提供了一种制备光学活性  $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸的新方法，因为  $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸位阻较大，一般不能从直接拆分得到，如图 9-47 所示。估计这个不对称水解过程先经过一个快速的非选择性步骤得到二酰胺，再经慢速的 *R*-选择性水解得到产物。直接以二酰胺作为底物也得到同样结果，表明了这一解释的合理性。

#### 4. 氰基水解酶的工业应用

氰基水解酶温和和高效的特点使之在工业生产上有很重要的应用价值。当今最主要的工程应用是日本 Nitto 公司的丙烯酰胺工程，年产已达 3 万吨。在这项工程中，酶催化与传统的酸水解相比具有绝对优势，不仅能有效地将反应中止在第一步，不致生成丙烯酸（图 9-48），而且产率可达 100%，远远高于传统酸水解的 65%，同时可以避免在中和强酸时生成副产物

硫酸铵。从工艺流程图上看，酶催化的效率比传统铜催化高得多，如图 9-49 所示。

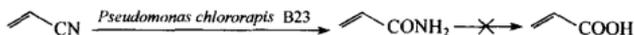


图 9-48 丙烯腈的微生物催化水解

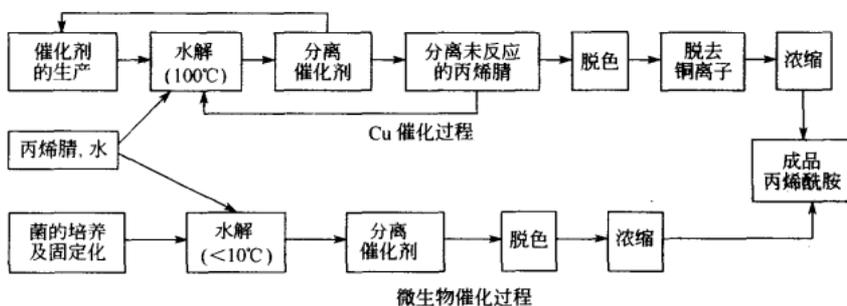


图 9-49 微生物催化和铜催化生产丙烯酰胺工艺流程比较

瑞士 Lonza AG 公司在 B 族维生素烟酸和烟酰胺的工业生产中，也已采用酶催化方法，如图 9-50 所示。通过改变培养条件分别诱导氰基水解酶或氰基水合酶，可以得到单一产物，通过将产物不断分离的方法可以减少产物对酶的抑制，从而提高生产效率。

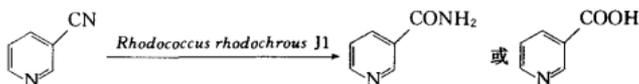


图 9-50 微生物催化生产烟酸和烟酰胺

## 二、酶催化的氧化-还原反应

酶催化的氧化还原反应，常得到具有光学活性的产物。不过这一类酶一般需要有辅酶存在才能发挥作用，也可用模拟酶催化剂催化氧气液相氧化芳香族化合物以及制备环氧化物。

### 1. 氧化反应

酶催化的氧化反应包括醇氧化、醛氧化以及酮氧化成酯的反应。如伯醇与仲醇的氧化一般采用醇脱氢酶，马肝脱氢酶（HLAD）就是其中之一。新型  $\beta$ -环糊精衍生物催化糠醛制糠酸，环己酮氧化成环己内酯，如图 9-51 所示。酶还可催化脱氢氧化反应，氮、硫、硒等原子的氧化反应等。

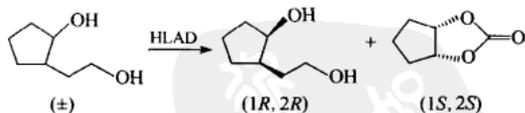


图 9-51 酶催化的脱氢氧化反应

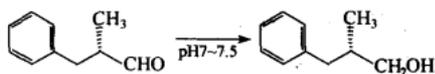


图 9-52 酵母粉还原  $\alpha$ -甲基苯丙醛合成伯醇

### 2. 醛和酮的还原反应

除甲醛之外，所有醛都是潜手性的。因此在酶催化下，醛还原得到  $\alpha$  碳为手性的伯醇。例如， $\alpha$ -甲基苯丙醛在酵母粉的作用下可还原成伯醇，如图 9-52 所示。

酮的生物催化还原也是一类重要的反应，而且还原产物通常具有光学活性。如图 9-53 所示。

### 3. 二羰基及多羰基化合物的还原



图 9-53 酶催化酮的还原反应

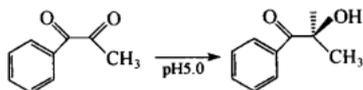


图 9-54 酶催化二羰基化合物的还原

含有两个羰基以上的化合物，在酶的作用下还原，根据条件的不同（特别是 pH 值的变化），所得的产物也会有所不同。如图 9-54 所示，二羰基化合物在酵母的作用下，pH5.0 时，只有一个羰基被还原，显示出高度的区域专一性和立体专一性。但如果 pH 值增大，就会生成二醇及部分消旋化合物。

### 三、酶催化的取代反应

#### 1. 氨基酸侧链的取代反应

许多酶都可以用来催化丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸衍生物  $\beta$  碳上的取代反应以及蛋氨酸等化合物  $\gamma$  碳上的取代反应。如 *O*-乙酰基丝氨酸在酶的作用下，发生  $\beta$ -碳原子上的取代反应，得到 L-半胱氨酸；再如，L-半胱氨酸与 L-高丝氨酸反应，在酶的作用下， $\gamma$ -碳上的羟基被取代，生成 L-胱硫醚，如图 9-55 所示。

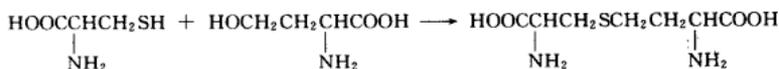


图 9-55 酶催化氨基酸侧链的取代反应

#### 2. 芳香族化合物的取代反应

在酶的催化作用下，可以合成侧链带有羟基或吡啶的氨基酸。一个典型的例子就是  $\beta$ -酪氨酸酶，它可以催化由苯酚、乙酰基甲酸和氨来制备 L-酪氨酸的反应，如图 9-56 所示。

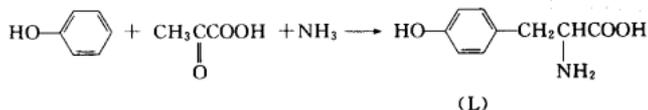


图 9-56 酶催化芳香族化合物的取代反应

### 四、酶催化的加成与消除反应

有机合成中很少用酶来催化消除反应，只有在研究反应机理的时候。相对来说，酶催化加成反应要重要得多，因为酶催化加成通常可以得到具有光学活性的产物。

#### 1. 碳碳双键的加成

H. E. Hogberg 及 P. Berglund 等人系统地研究了碳碳双键在酵母粉下的加成反应，如图 9-57 所示。

所有常用的裂合酶都可以催化羧基邻位的不饱和键上的加成反应，而且这类反应几乎都

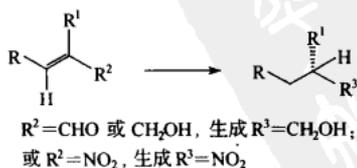


图 9-57 酶催化碳碳双键的加成反应

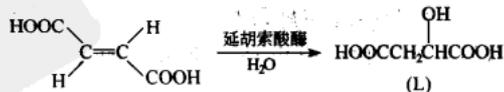


图 9-58 反丁烯二酸酶催化反丁烯二酸与水加成的反应

是反式加成。反丁烯二酸酶 [延胡索酸酶 (fumarase)] 是一种应用最多, 也是研究最为深入的酶。在它的催化作用下, 反丁烯二酸与水加成, 可以得到 L-羟基丁二酸, 如图 9-58 所示。

## 2. 碳氧双键的加成

醛缩合酶可以催化羟醛缩合反应。在这一类酶中, 以果糖-1,6-二磷酸缩酶 (FDPA) 在有机合成中的应用研究最为深入。如图 9-59 所示, 在二羟基丙酮与 2-羟基丙醛的反应中, 以果糖-1,6-二磷酸缩酶催化, 得到呋喃醇 (furanol)。

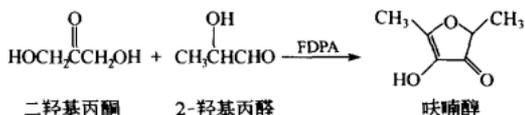


图 9-59 酶催化碳氧双键的加成反应

## 五、酶聚合反应

近年来, 对酶催化聚合反应的研究十分活跃, 主要侧重于小分子。此类研究的报道占酶催化反应研究报道总量的 95% 以上。作为一类特殊的酶催化反应, 酶催化聚合反应的研究目前尚处于起步阶段。酶催化聚合反应可以在温和的条件下高效专一地合成大分子, 特别是一些普通方法难以合成的功能高分子, 且对环境无不良影响。因此, 酶催化聚合反应必将对未来工业聚合方法产生深远影响。目前酶催化聚合研究主要集中在缩聚反应和开环聚合两个方面。缩聚反应如多糖的合成、脂肪族聚酯的合成、聚苯醚及其衍生物的合成等。开环聚合如聚碳酸酯的合成、脂肪内酯的合成等。Bisht 等报道了环  $\omega$ -十五烷内酯 (PDL) 的开环聚合。在所采用的几种脂肪酶中, 以固定化酶 PS-30 催化效果最佳。70℃ 时, 聚合产物数均分子量达到 62000。当转化率达到 40% 后, 聚 PDL 的数均分子量变化很小。水含量升高, PDL 聚合速率上升, 但数均分子量下降。2-(4-羧苯基)-乙基异丁烯酸酯在辣根过氧化物酶 (HRP) 催化下能发生化学选择性聚合, 得到可溶于三氯甲烷等溶剂的粉末状聚合物。由于侧链带异丁烯基, 该聚合物很可能成为一种新型感光材料。作为一种新兴的聚合方法, 酶催化聚合为高分子合成开辟了一条全新的、环境友好的途径, 是高效合成新型功能高分子材料的有效方法, 在医药、环保乃至国防等方面都有着广泛的应用前景。

## 参 考 文 献

- 1 沈寅初. 生物技术在化学工业中的应用. 上海化工, 1998, 23 (12)
- 2 丰洋. 生物化工技术发展现状和趋势. 中国石油和化工, 2004, (3)
- 3 孙娜, 杨丰科, 刘均洪. 酶催化技术在工业上的应用进展. 工业催化, 2003, 11 (6)
- 4 艾俊哲, 梅平. 非水介质中的酶催化反应. 化学通报, 2002, (11)
- 5 刘森林, 宗敏华. 超临界流体中酶催化的研究进展. 微生物学通报, 2001, 28 (1)
- 6 常致成. 酶催化油脂水解技术新进展及发展趋势. 表面活性剂工业, 2000, (3)
- 7 吴苏喜. 脂肪酶在食用油脂工业上的应用. 中国油脂, 1999, 24 (3)
- 8 李祖义, 陈倩. 酶法合成表面活性剂. 工业微生物, 2001, 31 (2)
- 9 杜长海, 马智, 贺岩峰等. 生物催化石油脱硫技术进展. 化工进展, 2002, 21 (8)
- 10 时雨荃, 张淑芬, 赵竹喧等. 石油的生物催化法脱硫. 化学工业与工程, 1998, 15 (4)
- 11 杨继国, 林炜铁, 吴军林. 酶法合成生物柴油的研究进展. 化工环保, 2004, 24 (2)
- 12 闫红, 邢光建, 胡娟等. 生物催化剂在有机合成中的应用. 化学研究与应用, 2000, 12 (4)
- 13 彭立凤. 有机相脂肪酶催化的有机物合成反应. 合成化学, 2000, 8 (4)
- 14 沈鸿雁, 田桂玲, 叶蕴华. 非水介质中酶催化反应研究新进展. 有机化学, 2003, 23 (3)
- 15 吴中柳, 李祖义. 氰基水解酶在有机合成中的应用. 有机化学, 2001, 21 (1)

## 第十章 酶工程的研究方法

酶的研究方法是基础理论研究和发酵工业生产实践中的一个重要组成部分，是研究酶的最基本手段。它的原理是酶能够专一高效地催化化学反应。酶在研究过程中既可作为研究的主体对象，又可以作为研究其他物质的工具，因此根据研究对象的不同可以将酶研究分为两种类型。第一种类型的酶研究，主要研究酶的最适温度、最适 pH 值、温度稳定性、pH 值稳定性等酶自身的一些性质，是研究的主体对象；研究发现一些酶属于糖蛋白，往往需要将蛋白质结构中的糖基结构切下来，在切糖的时候可以选择采用化学法切，同时也可以采用糖肽酶切，如果采用糖肽酶来切，则糖肽酶在研究的过程中是作为一种工具酶来使用的，因此这种用酶来分析的方法就属于第二种类型的酶研究。

本章主要是介绍第一种类型的酶分析，即以酶作为研究对象的分析。本章主要内容包括酶活力的测定、酶的电泳及分子量的测定、酶蛋白的结构和序列分析以及酶的免疫学分析等。

### 第一节 酶活力测定

酶活力的测定是研究酶的性质一个最基本的步骤，酶的活性水平可通过测定酶（促）反应过程中单位时间内底物的减少量或者产物的生成量来测定酶（促）反应速率而得知。一般情况下酶反应的产物和底物的改变量是一致的，因此在操作过程中可以选择相对容易测定且误差较小的一项来测定，目前绝大部分酶活力的测定都是采用测定产物生成率的方法。在测定酶活力时，必须考虑酶的最适温度、最适 pH 值以及是否还需要某种辅助因子。同时还必须使反应系统中的底物过量，以确保测定时的初始反应速率与酶的浓度成正比。

#### 一、影响酶活力的因素

酶活力测定时，反应条件的选择是非常重要的，因为酶活力的高低受许多不同因素的共同影响，因此测定时应尽量使待测定的酶处于最佳的反应条件下，使每个酶分子都能够正常地发挥它的催化作用。测定时影响酶活力的因素主要有如下几方面。

##### 1. 底物

底物对酶活力的影响比较明显。首先是酶反应底物类型的选择，酶对不同来源底物的米氏常数  $K_m$  值（亲和力）是不一样的，当选用对酶具有亲和力高的底物时，检测出来的酶活力可能就高，而当选用亲和力低的底物时，酶活力可能就低。同时在选用底物时还应使该底物的水解生成物易于检测。

其次在测定酶活力时还应选择一定的底物浓度。为了不使酶反应速率受到底物浓度的限制，通常情况下应使反应系统中有足够高的底物浓度。在一些特殊情况，如受高底物浓度抑制，参与反应的几种底物的最适浓度范围都很狭窄的情况下，应特别注意控制各底物浓度于确定的范围内。

##### 2. 温度

温度对酶反应速率的影响非常显著，温度既能影响化学反应速率本身，也能影响酶的稳

定性，同时还能影响酶的构象和酶的催化机制。一般而言，温度对酶活力的影响如图 10-1 所示。当温度很低时，温度对最大反应速率的影响遵守 Arrhenius 公式：从酶反应的温度系数来看，在酶的活力有效温度范围内，温度每变化  $1^{\circ}\text{C}$ ，反应速率可能相差 10%。

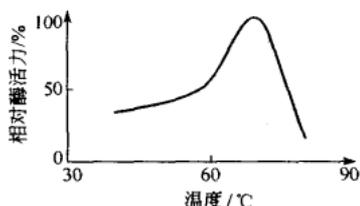


图 10-1 温度对酶活力的影响

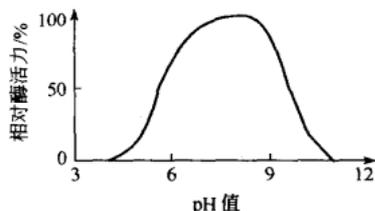


图 10-2 pH 值对酶活力的影响

### 3. pH 值

pH 值对大多数酶的活力都有比较显著的影响 (图 10-2)。这是因为反应体系中的  $\text{H}^+$ 、 $\text{OH}^-$  能够改变酶活性中心的解离状况，升高或者降低酶的活性，破坏酶的结构与构象，导致酶失效以及改变可逆反应进行的方向等。因此，在进行酶活力测定时必须选择适宜的反应 pH 值。

酶反应过程中 pH 值的稳定主要是通过不同的缓冲体系来控制的。选择缓冲液时应考虑以下几个问题：①选择的缓冲液尽量使其 pK 值接近要调整的 pH 值，使其缓冲能力达到最强；②同一种酶的催化反应在不同缓冲液下所表现出来的活性水平可能有所不同；③在选用某些缓冲液测定酶活力时可能会发现酶活力下降很快或是不稳定，这主要是由于这一缓冲液可能与酶形成配合物，从而导致酶活性受到抑制；④某些缓冲体系可能因稀释和温度等的变化而改变其 pH 值，缓冲液体系有时还可能被反应体系降解破坏；⑤同一个 pH 值的缓冲液往往可选用不同的缓冲体系，而不同的缓冲体系价格差别是很大的，一些有机缓冲液的价格要比无机的高得多，因此在选择时还应考虑该缓冲体系是否廉价、易于制备。

最后，选择缓冲液时还必须注意离子强度影响的问题，酶活力测定时通常情况下都选用 50mmol/L 离子强度。

### 4. 辅助因子

有许多酶必须与一些有机辅助因子或金属离子结合后才能发挥它们的催化活性。因此，在进行酶活性测定时，反应溶液中应该加入特异的辅助因子以满足酶对这些辅助因子的需要。在测定酶活力时有时还需要加入某些相应的物质以提高酶在反应系统中的稳定性。在制备样品和反应过程中为了避免待测酶受蛋白酶的降解，往往还需要加入一些蛋白酶抑制剂。

### 5. 对照

测定酶活力时通常都应该带有适当的对照，以消除非酶促反应所生成的产物对测定的影响。对照包括样品对照和底物对照。样品对照是指由于酶样品本身不纯或者是含有反应生成的产物从而影响测定准确性，这时就可用只加酶而不加底物的样品对照来消除影响；底物对照是指反应过程中的底物自发分解为所要测定的生成产物，从而影响测定结果，这时可以通过不加酶而只加反应底物来作为对照消除底物的影响。同时，这两种对照还可以结合在一起，即酶和底物都加，但酶必须经过灭活，以此来作为对照消除非酶促反应的影响。

## 二、酶活力的测定原理

酶活力测定的目的就是要通过酶反应速率的测定求得酶的浓度或含量。酶活力的测定主

要是通过酶的反应初速率来反映的，酶的反应速率可用单位时间内反应物（底物）的减少或产物的增加来表示。一般情况下，产物和底物的改变量是一致的，因此在理论上两者都可以。实际上由于在酶反应系统中使用的底物浓度往往很大，反应时间通常很短，因此底物的减少量仅占总量的很少一部分，所以不容易准确地测定；而产物则从无到有，这个变化非常明显，只要测定的方法足够灵敏，就能够准确地检测出来。所以在测定时一般采用分析酶反应产物的方法。

许多酶反应的进程曲线表明，真正代表酶催化活性的只能是反应初始阶段的速率，即反应初速率，因为只是在酶反应的最初阶段，底物或产物的变化量才是随反应时间而线性增加的。初速率 ( $V_0$ ) 可从酶反应进程曲线中反应初始阶段的直线线段部分求得，以直线线段的斜率表示。如果这条直线线性不明显，那么应沿曲线的最初部分画出通过零时点或外推到零时点的切线（图 10-3），并以这条切线构成的斜率代表酶的反应初速率。进程曲线可以通过连续测定得到，也可在不同时间间隔取样进行测定后绘制。但是用取样法绘制的曲线，至少应由 3 个时间点组成：零时点；适当选择的时间间隔点，这一点取决于具体的反应和测定方法；以及两倍于这个间隔的点。并且要求在这种时间范围内反应量不超过底物总量的 20%。

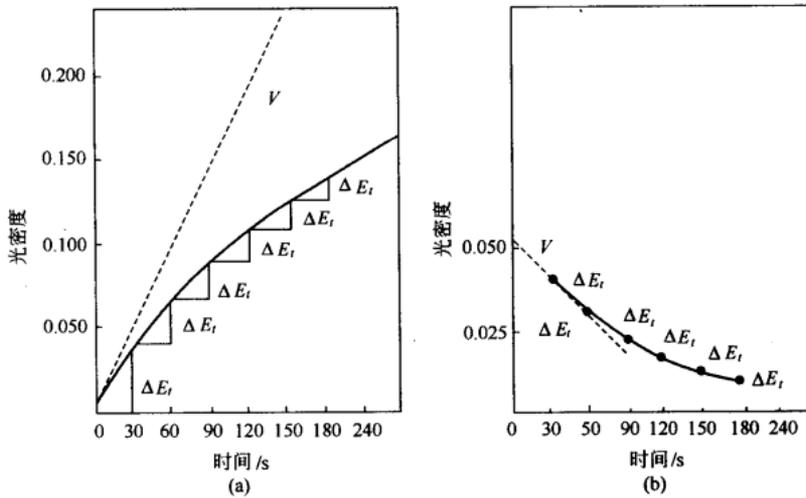


图 10-3 从非线性的进程曲线求得初速率

(a) 通过  $t=0$  (零时点) 的进程曲线切线；(b) 外推到  $t=0$  的进程曲线切线

在进行酶活力测定时，测得的反应速率必须和酶浓度间有简单的线性比例关系。为此，首先必须用标准酶制备一条酶浓度曲线，即以反应速率相对酶浓度作图制备的曲线。一方面通过这条曲线来判断酶反应的条件是否适宜、正确；另一方面通过它可以求得待测样品中酶的浓度或含量。

要使测得的反应速率与酶浓度有良好的线性关系，最基本的一点就是必须测得酶反应的初速率。图 10-4 可以很好地说明这种相关性。图 10-4 (a) 是在不同酶浓度条件下得到的反应进程曲线，由这条曲线可以看出，酶浓度不同，酶反应速率下降的先后、快慢也不相同；如果将这些曲线在不同时间测得的反应速率相对酶浓度作图，就可得到图 10-4 (b) 所示的酶浓度曲线。可见只有在反应时间 ( $t_0$ ) 测得的反应速率与酶浓度间具有最好的线性比例关系，而在  $t_1$  和  $t_2$  ( $t_2 > t_1 > t_0$ ) 时测得的结果则不具有这种相关性，反应时间越长，偏离也越大。所以，在进行酶活力测定时，通常应该先制备两条曲线，即酶反应进程曲线和酶浓度曲线。从酶反应进程曲线可求得反应初速率，然后根据初速率绘制酶浓度曲线，并可通过酶

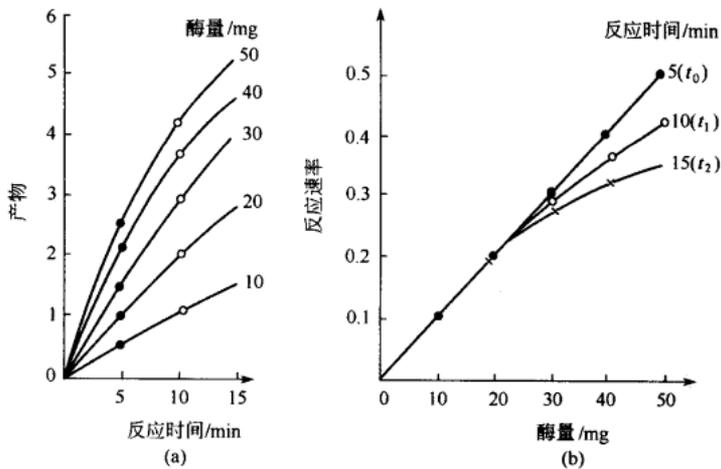


图 10-4 酶反应进程曲线和酶浓度曲线

(a) 酶反应进程曲线；(b) 酶浓度曲线

浓度曲线来检验酶反应测定系统是否合适。

一般情况下，酶反应速率与酶浓度间能够很容易地建立线性比例关系，但有时也会出现一些偏离线性的现象（图 10-5）。出现图 10-5 (a) 这种现象的可能原因是：①测定的不是反应初速率，这时可以通过缩短测定时间来解决问题；②反应系统受酶以外的其他组成因子的限制，例如，酶偶联分析时，偶联工具酶不够过量，增加工具酶，情况就可能好转；③待测样品中可能包含可逆抑制剂，通过透析或其他方法加以处理后可以解决此问题。图 10-5 (b) 所示的偏离可能是因为：①反应系统中含有不可逆抑制剂，如含有少量能抑制酶活性的重金属离子，这种情况下可通过透析或加入一定量与反应无关的蛋白质来减轻或消除偏移；②酶可能需要某种辅酶或活化剂，而这些辅助因子又易于解离，如果辅助因子不足时就可能出现这种情况，做适量补充供应后常可恢复正常。出现图 10-5 (c) 这种异常情况的可能是由于酶反应的底物不稳定造成的。

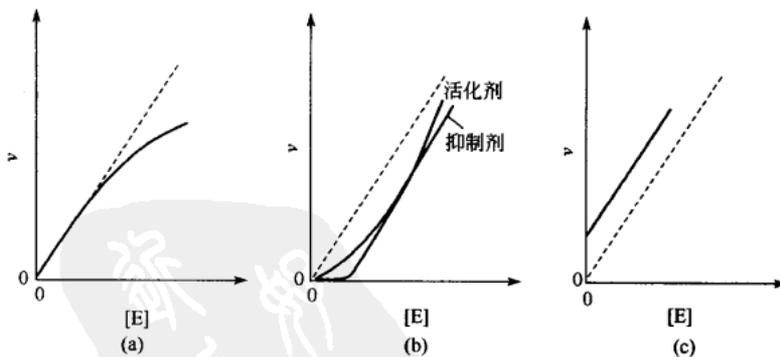


图 10-5 酶浓度曲线可能出现的异常情况

(---为正常情况)

### 三、酶活力的测定方法

到目前为止，已经发展形成了许多种酶活力的测定方法，主要有化学法、光学法、量气

法、酶偶联法等。下面将酶活力的一些常用测定方法的主要原理和步骤做一个简要的介绍。

### 1. 化学法

化学法测定酶活力具有许多优点，如操作简便快速，不需要一些大型特殊的仪器，几乎所有的酶反应都可根据产物和底物在化学性质上的差别设计相应的检定方法等优点，因此被广泛使用。

化学法测酶活力的原理是，在反应体系中，让酶与底物反应一定的时间后，通过添加酶的变性剂停止酶反应，然后通过化学的方法检测反应体系中生成物的含量，并计算出酶活力的大小。如果生成的产物中带有发色基团，则可直接通过比色法测定生成物的量，从而计算出酶活力；如果产物不带有发色基团，则可以用某些特定的物质与生成的产物反应，生成发色的物质，然后再通过比色法测出酶活力的大小。

下面以测定木聚糖酶活力的 DNS 法为例具体介绍测定酶活力的操作步骤。

#### (1) 材料与试剂

① 仪器设备 恒温水浴锅、小试管、混匀器、移液枪等。

② 样品稀释液 50mmol/L、pH 6.5 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液。

③ 底物 (1% 木聚糖) 称取 10g 梓木木聚糖于样品稀释液中，加热溶解后定容至 100mL。

④ DNS 试剂 称取 1g 3,5-二硝基水杨酸，溶于 1000mL 含有 1% 的 NaOH 和 0.2% 苯酚的溶液中。使用前在试剂中加入 0.05% 的无水亚硫酸钠。

⑤ 饱和酒石酸钾钠溶液 用蒸馏水配制 40% 的酒石酸钾钠溶液。

⑥ 木糖标准品 用蒸馏水配制 10 $\mu\text{mol/L}$  的木糖标准溶液。

#### (2) 操作步骤 标准曲线的制作步骤如下。

① 取 5 支小试管，每管加入 0.9mL 底物溶液，置于 50 $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中预热 5min。

② 将木糖标准品用稀释液分别稀释 0 倍、1 倍、2 倍、3 倍、5 倍，分别吸取 0.1mL 加入小试管中，混匀后准确反应 10min。

③ 加入 1mL DNS 溶液终止反应，然后将试管置于沸水中煮沸 15min 显色。

④ 加入 1mL 饱和酒石酸钾钠溶液稳定颜色。

⑤ 将试管置于冷水中冷却，至室温时用不含木糖的对照调零，测定各管 540nm 处的吸光度。然后以吸光度值为纵坐标，以木糖的量为横坐标作图，制作出标准曲线。

样品酶活力的测定：测定步骤与标准的步骤一样，只是把木糖标准溶液换成适当稀释的酶液，以不加样品只加稀释液的为空白对照调零，测出吸光度值后用标准曲线计算出样品的酶活力。

### 2. 光学法

光学法测定酶活力根据各自不同的原理主要有荧光测定法、光吸收测定法以及旋光测定法等。

光吸收测定法的原理是根据反应产物与底物在某一波长或某一段上有明显的特征吸收差别而建立起来的连续观测方法。光吸收法的应用范围很广，几乎所有的氧化还原酶都可用此法测定。催化双键饱和化和双键形成的酶反应以及那些催化环状结构变化的酶反应也可以利用光吸收法测定。在应用光吸收法测定酶反应速率时，如果只需要了解酶活性的相对大小，那么可直接以单位时间内相应波长的光吸收值改变来表示；但是如果表达成更确切的单位，则应先通过吸收系数算出底物浓度或者产物浓度的变化量，然后再计算得出。

荧光测定法的原理是酶反应的底物与产物之一具有荧光，那么荧光变化的速率可代表酶

反应速率。脱氢酶催化的反应和利用荧光原底物的酶反应可用此法来测定。荧光法测得的酶活性大小通常只能以单位时间内荧光强度的变化来表示。荧光测定法的优点是灵敏度极高，它比光吸收测定法还要高 2~3 个数量级。因此，特别适于酶量或底物量极低时的快速酶反应分析。荧光测定法的主要缺点是荧光读数与浓度间没有直接的比例关系，而且常因测定条件如温度、散射、仪器等而不同，所以如果要将酶活性以确定的单位表示时，首先要制备校正曲线，然后再根据这曲线确切定量；它的另一缺点是易受其他物质干扰，有些物质如重铬酸钾常会抢夺能量，降低荧光强度，有些物质如蛋白质能吸收和发射荧光，这种干扰在紫外光区尤为显著，故测定的荧光最好是可见光，特别是以红荧光为好。

旋光测定法的原理是某些酶反应过程中常伴随着旋光变化，最后由反应体系旋光度的变化来确定酶的活性，在没有其他更好的方法可用时，可以考虑旋光测定法。旋光法测定也受到许多条件的限制，旋光法的缺点是准确度和灵敏度不高，酶反应过程中高比旋的蛋白质分子可能发生旋光变化，导致测定的精确度下降，如果底物和产物的旋光太低，就不能进行直接测定等。此外，旋光测定法操作也不甚方便，故一般很少用。

### 3. 酶偶联法

酶偶联法是指在被测酶的反应体系中加入过量的、高度专一的“偶联工具酶”，使反应延续进行到某一可以直接、连续、简便、准确地测定的阶段，同时用光学法或电学方法进行检测或跟踪。

## 四、酶活力的单位

酶活力的大小是用酶的单位数来表示的，在进行测定后，一般都要将结果换算成酶单位数。所谓酶的活力单位，就是指在某一特定条件下，使酶反应达到某一速率所需要的酶量，这一速率就是指在单位时间内酶催化反应底物的变化量。酶单位有各种不同的表示方法。

(1) 习惯单位 20 世纪 60 年代前，国际上还没有酶单位表示法的统一标准。由于各自定义的不同，常容易造成混淆。最常用的表示法还是用单位时间内吸收值的变化来表示酶单位。

(2) 国际单位 1961 年国际生化联合会酶委员会建议使用统一的国际单位 (IU)，一个国际单位 (IU) 定义为在酶反应最适条件下 (最适温度、最适 pH 值等)，每分钟催化  $1\mu\text{mol}$  底物转化所需要的酶量。酶量通常用 IU/mL 来表示。当底物为蛋白质、多糖等包含多个能被酶作用的键或基团时，可用催化  $1\mu\text{mol}$  被作用的基团或键变化所需要的酶量表示酶单位。

(3) Katal 单位 1972 年国际生化联合会酶委员会又提出一种新的酶单位 Katal (Kat)，1Kat 定义为最适反应条件下每秒钟催化  $1\text{mol}$  底物发生反应所需要的酶量。

(4) 其他单位 在确定酶制剂的纯度时通常用到比活力，即单位质量的酶蛋白中具有的酶单位数 (U/mg 蛋白)。当酶制剂已达到极高纯度，且酶的分子量已知，甚至每个酶分子上的活性中心数目也已知时，还可采用分子活力或转换率表示，它们分别表示在最适条件下，每个酶分子或每个活性中心每分钟催化底物分子或相关基团转化的数目。分子活力或转换率可用来进行酶催化效率的估计和比较。

## 第二节 电泳检测和分子量测定

### 一、电泳检测

电泳技术已成为鉴定生物大分子并分析它们的纯度的基本工具。有时，为了制备也要用

到电泳技术。此法的原理是酶蛋白质具有可电离的基团，在溶液中能够形成带电荷的离子，因而，它们在电场的作用下就会发生移动。由于各种分子所带净电荷的多少不同，因此，它们在电场中移动的速率也就不同，这就是电泳的基本道理。早期的电泳方法是在蔗糖溶液中进行。但是，由于操作麻烦，所需仪器昂贵，严重地限制了它的使用。用淀粉凝胶代替蔗糖作支持介质和抗对流介质后，电泳在生物学上的应用增加了。但只是在应用了聚丙烯酰胺凝胶作电泳支持物后，才使电泳总体达到今天这样的普及。

### 1. 电泳的基本原理

在电场中，带正电的离子向负极移动，带负电的离子向正极移动。所以带电荷的生物大分子都能进行电泳。

$$v = \frac{Eq}{d6r\eta\pi}$$

分子在电场里运动的速率 ( $v$ ) 与场强的电荷 ( $Eq$ ) 成正比，但与分子的大小 ( $d$ ) 和溶液的黏度 ( $\eta$ ) 成反比。分子在电场中的移动速率常用电泳迁移率表示，即带电颗粒在单位电场强度下的泳动速率。

$$M = \frac{dL}{Et}$$

式中， $M$  为迁移率； $L$  为颗粒泳动距离； $t$  为通电时间。

在一定条件下对于一定的分子  $M$  是一定的。因此它是描述物质在电泳行为中的特征参数。

影响迁移率的因素有如下几种。①蛋白质分子的性质。迁移率特别与分子所带电荷有关，带电荷量越多，泳动速率越快。分子大小和形状也影响泳动速率，较大分子与周围介质摩擦力增加，泳动率下降。球蛋白分子的摩擦力和静电作用力小于纤维蛋白分子，因此泳动速率快。②电场。根据欧姆定律，迁移率与电流、电压、电阻有关。迁移率与电流和电压成正比，与电阻成反比。电阻随支持物的长度而增加，随支持物的宽度而降低。电泳时往往产生大量的热，引起电阻降低，电流和电压升高，样品泳动速率加快。另外，温度升高，缓冲液容易挥发，酶和蛋白质易变性。为了得到重复稳定的结果，电泳槽要有冷却系统或在冷室操作，避免温度升高。③缓冲液和离子强度。缓冲液的种类直接影响电泳结果。用 Tris-HCl 分离蛋白质时，HCl 解离成  $\text{Cl}^-$ ，其泳动速率比蛋白质快得多。由于样品与缓冲液离子的泳动速率不一致，引起不对称峰出现。若改用 Tris-HAc 和 Tris-硼酸，可消除此现象。缓冲液 pH 值直接影响样品的解离程度和电荷密度。距样品等电点愈远的 pH 值下，样品带电量愈多，泳动速率越快。缓冲液的离子强度增加，样品所带电荷降低，样品泳动速率减缓。④支持介质。介质结构对分子泳动速率有很大影响。介质对样品颗粒的吸附可导致样品的拖尾，降低分辨率。纸的吸附作用最大，醋酸纤维素吸附较小。有的支持介质（如纸和淀粉胶）具有较强的电渗作用，即电泳缓冲液相对于固体支持物的相对移动。显然，电渗作用影响了泳动率。醋酸纤维素和聚丙烯酰胺凝胶的电渗作用很小，是常用的电泳介质。以凝胶作支持介质还有分子筛作用。迁移率随凝胶交联度增加、孔径减小而减低，小分子的迁移率比大分子大，用琼脂糖和聚丙烯酰胺作支持介质时就有这种情况。若用 Sephadex 作支持物，其分子筛效应正好相反，大分子颗粒的泳动速率快于小分子颗粒。

### 2. 电泳的类型

电泳基本上分为两大类：自由界面电泳和使用支持物的区带电泳。前者包括 Tiseiills 式微量电泳、显微电泳、等电聚焦、蔗糖密度梯度电泳及等速电泳等。后者按支持物的类型又分为：纸上电泳、醋酸纤维素薄膜电泳、薄层电泳、非凝胶电泳和凝胶电泳。从使用形式上

可分为水平式电泳、垂直式电泳、板形电泳、柱形电泳、双向电泳、连续流动电泳及电泳和色谱（如分子筛）相结合的技术。从使用目的上可分为分析型和制备型两种。按操作原理可分为一般电泳、等速电泳、等电聚焦电泳和免疫电泳等几种。自由电泳过程中扩散严重，分辨率有限，而且设备昂贵、操作繁琐，现已基本被区带电泳所取代。区带电泳分辨率很高，而且设备简单、操作方便，经济实用。

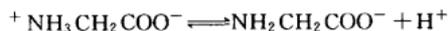
## 二、聚丙烯酰胺凝胶电泳

目前对蛋白质分离有着高分辨率的电泳支持物首推聚丙烯酰胺凝胶（PAG），它电渗作用小、孔度可以控制、物理化学性质稳定。PAG 电泳（PAGE）是根据物质所带电荷及其分子大小、形状的差异，在电场作用下产生不同泳动速率而分离的技术，它有静电效应和分子筛效应，分辨率很高。在 PAG 中加入两性电解质载体便成为等电聚焦电泳，加入十二烷基磺酸钠（SDS），即为 SDS-PAGE。

### 1. 盘状电泳

PAGE 有连续和不连续之分。凝胶与电极缓冲液的 pH 值和离子强度相同，称为连续式电泳。这种凝胶因系微孔物质，样品不易扩散，加上兼有分子筛作用，分离效果不错。在这种连续电泳方式的基础上，又开发了不连续凝胶电泳，电泳带像一个薄盘嵌在凝胶柱中间，故称盘状电泳。由于使用的胶浓度、pH 值、缓冲系统、电压都是不连续的，所以又称不连续电泳，简称 Disc 电泳。盘状电泳的特点是不连续性。首先是胶浓度不连续。使用两种凝胶，上层称浓缩胶（stock gel），浓度一般为 3%，其孔径大，高度 2~3cm；下层为分离胶（separated gel），浓度根据被分离物的分子量大小而定，一般是 7.5%~30%，其孔径小，高度 5~6cm；有时也可在浓缩胶上再加一层样品胶，其中除混有样品外，其余与浓缩胶相同。其次是 pH 值不连续。浓缩胶 pH6.7，分离胶 pH8.9，电极缓冲液的 pH8.3。第三是缓冲系统不连续。制备凝胶用 Tris-HCl 缓冲液，电极缓冲液为 Tris-Gly。第四是电压梯度不连续。由于 Cl<sup>-</sup> 和 Gly<sup>-</sup> 的泳动速率不同，造成电压梯度不连续。正是由于这种不连续性使盘状电泳对样品具有浓缩作用，即使浓度很低的蛋白质（10~50μg），也能形成一条清晰的带，因而盘状电泳具有很高的分辨力。

此法的原理可通过通电后各种离子的电泳行为来解释。上述缓冲液中的 Gly 既可以净电荷为零的两性离子存在，也可以带负电的 Gly<sup>-</sup> 存在。



通电时，氯化物、蛋白质、溴酚蓝和甘氨酸的阴离子都开始向阳极移动。当甘氨酸离子进入样品缓冲液和浓缩胶时，就遇到了低 pH 值环境，因而上式中的平衡向偶离子的方向移动，而偶离子在电场中是不动的。甘氨酸偶离子停止向样品和浓缩胶移动，就造成了移动离子的短缺，因而使电流减弱。但是，通过整个电泳系统的电流必须维持恒定，因此，在快离子（Cl<sup>-</sup>）和慢离子（甘氨酸的 COO<sup>-</sup>，此时仅占 Gly 分子的 0.1%，其余 99.9% 为偶离子）之间的区域电压增加，结果在 Cl<sup>-</sup> 和 Gly<sup>-</sup> 间产生一个很高的局部电压梯度。在这个条件下，离子的相对迁移率是：Gly<sup>-</sup> < 蛋白质离子 < 溴酚蓝离子 < Cl<sup>-</sup>。在这个强的局部电场中，所有的阴离子蛋白质都移动迅速。

盘状电泳的优点：蛋白质以一个很窄的区带进入分离胶，分离所得的区带也很窄，因此大大提高了分辨率。但是，盘状电泳的缓冲系统、各种胶的 pH 值条件的选择有限制。

### 2. SDS-PAGE

SDS-PAGE 是专门用来测定蛋白质的分子量的技术。虽然蛋白质在 PAG 中的迁移率是它所带电荷和它的分子量大小的函数，但可能有这样的情况：两个分子量不同的蛋白质以相

同的速率向阳极移动。这可能是由于蛋白质分子大小的差别被它们所带净电荷的差别所补偿。为了克服这个问题, Simpiro 等人试图在十二烷基硫酸钠 (SDS) 存在下来分离蛋白质混合物, 发现如果在 PAGE 系统中加入 SDS, 则蛋白质的迁移率主要取决于它的分子量, 而与所带电荷和形状无关。以后, Weber 等用此法测定了 40 种蛋白质的分子量, 证明是可行的。

SDS 是阴离子去污剂, 它能与蛋白质的疏水部分相结合, 并能把大多数蛋白质拆成组成它们的亚基形式。由于大多数蛋白质与 SDS 的结合是按摩尔比 1.4:1 进行的, 结合量很大, 蛋白质表面负电荷极大增加, 因而屏蔽了无 SDS 时正常存在的任何一种电荷。SDS 与蛋白质结合引起了蛋白质构象的变化, 使雪茄形的蛋白质分子的轴比改变, 在巯基乙醇的作用下, 二硫键还为巯基, 不同蛋白质组成的短轴趋于一致, 长轴与分子量成正比。它们的泳动速率不再取决于电荷和形状, 仅与蛋白质的分子量有关。

用此法测分子量时, 至少要有 3~4 种标准蛋白质, 而且它们的分子量要分布在未知蛋白质的两侧。盘状电泳也可在 SDS 存在下使用。

和常规电泳比较, SDS-PAGE 的操作有下面几点不同: ①缓冲液, 在 0.2mol/L、pH 7.2 的磷酸缓冲液中加入 0.2% 的 SDS 和 0.2% 的巯基乙醇; ②样品, 电泳前蛋白质要溶解在 1% SDS 和 1% 巯基乙醇的 0.1mol/L、pH 7.2 的磷酸缓冲液中, 100℃ 加热 2~5min。此法的最大缺点是, SDS 与蛋白质分子结合后, 就发生构象变化, 解离成亚单位, 失去原有活性。另外, 有些蛋白质在 SDS 体系中的相对迁移率与其分子量不呈线性关系, 如某些糖蛋白, 含二硫键较多的蛋白质等的迁移率一般偏低, 并不能代表其实际分子量。因此, 一定要先用若干指示蛋白进行电泳, 绘制出  $\lg M_r - M$  曲线。只有符合这种直线关系的蛋白质, 方可用此法测分子量。

### 3. 凝胶等电聚焦

等电聚焦是利用某些两性电解质支持物在电场中形成 pH 梯度, 使蛋白质样品在与它们的等电点相应的 pH 值区域集中, 等电点不同的蛋白质泳动后形成位置不同的区带而得到分离。等电聚焦电泳可以在液体介质中进行, 常用蔗糖密度梯度稳定聚焦了的蛋白质区带, 适宜做大量制备用, 每个区带能聚焦 20~80mg 蛋白质。然而液体法所用仪器价格昂贵、操作复杂, 又有扩散和收集不便等因素, 使分离效果不理想, 因此近来已很少应用。以 PAG 为介质时, 设备简单、操作方便, 分辨率很高, 适宜于小量分离及分析, 因此, 凝胶法比液体法应用广泛得多。

等电聚焦的关键问题是用载体两性电解质形成 pH 梯度, 稳定分离了的蛋白质区带, 分离了的蛋白质的鉴定和 pH 值的测量。

① 载体两性电解质使用脂肪族多氨基多羧基物质作介质, 在电场中可获得理想的平滑 pH 梯度。这种物质的商品名称 Ampholine, 它实际上是一系列不同等电点的脂肪族多氨基多羧基同系物及异构物的混合物, 由丙烯酸与多乙烯多胺加成后产生。由于合成物的不同分子氨基和羧基的比例不同, 从而形成连续的等电点。通常的范围在 pH 3~10。

② 用凝胶作抗对流介质的等电聚焦就是凝胶等电聚焦。常用的抗对流介质是聚丙烯酰胺凝胶 (PAG)。它的作用: 一是维持连续线性 pH 梯度的稳定性; 二是稳定分离了的蛋白质区带, 防止其重新混合。

③ 等电聚焦电泳在通电之初, 载体的电导很高, 载体两性电解质在电场中移动并形成 pH 梯度, 这时电导和电流都逐渐下降, 而电压逐渐升高, 形成电压梯度。电流下降到零, 整个系统的电荷趋于零, 达到稳定状态, 但功率始终维持不变。蛋白质也在电场中运动, 不过由于其分子量大, 它们要花费更多的时间才能到达其相应的等电点位置。所形成的 pH 梯

度范围决定于 Ampholine 的组成。已有不同 pH 值范围的 Ampholine 出售。pH 值范围越窄，分辨力越高。聚焦效果与电压密切相关，电压高，分辨力也高，样品聚焦成很窄的带。灵敏度达到 0.01~0.02 个 pH 值单位。

为了维持恒定的功率，需要有良好的冷却系统。通常在 4℃ 进行电泳。聚焦系统有两层循环冷却水，温度可分段恒定。表 10-1 列出了在不同 pH 值范围内凝胶薄层等电聚焦所用的电流、电压和聚焦时间。

表 10-1 在不同 pH 值范围内凝胶薄层等电聚焦所用的电流、电压和聚焦时间

pH 值范围	电流/mA		电压/V		聚焦时间/h
	开始	终止	开始	终止	
3.5~9.5	80	25	400	1000	1.5
2.5~6.0	100	30	600	900	2.0
5.0~8.5	80	25	800	1500	1.5~2.0
7.5~10.5	50	15	500	1000	2.5

等电聚焦的加样方式与结果无关，不管样品放在 pH 梯度的什么部位，它总是移动到等于其等电点的那个 pH 值区域。

④ pH 值和 pI 值的测定。可用染色法观察蛋白质，用表面电极直接测 pH 值。或将凝胶柱切成 0.5cm 小块，加蒸馏水 1mL，捣碎凝胶块并测其 pH 值。测 pH 值时，温度要尽可能地与聚焦温度一致。大气中 CO<sub>2</sub> 对 pH 值测定影响很大，CO<sub>2</sub> 能很快、很容易地溶解在碱性 Ampholine 溶液中，从降低介质的 pH 值。在板状等电聚焦电泳系统中，这种情况更易发生。因而最好用表面电极尽快测定。从原理上看，等电聚焦是一个比较完善的分离方法。它分辨率高，可分离等电点相差 0.1 个 pH 值单位的蛋白质，最高分辨率甚至可达到 0.0025 个 pH 值单位，比常规电泳的灵敏度高数倍；等电聚焦能抵消扩散作用，使区带越走越窄；样品可以充满整个柱（管），无须以一个窄带加入；稀的样品也可以进行分离；此法还可直接测出蛋白质的等电点，精确度可达 0.01 个 pH 值单位；另外，电泳时间短，操作简便，还能做薄层等电聚焦和双向电泳，适用于少量样品的分析鉴定，不适于制备分离。然而此法也有缺点，它要求用无盐溶液，而在无盐溶液中有的蛋白质可能会沉淀。另外在等电点发生沉淀和变性的蛋白质也不宜用此法分离。

### 三、酶的相对分子质量测定

酶蛋白的相对分子质量是酶研究的一个主要组成部分，可选用的方法有：超离心法、凝胶过滤法、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（PAGE）、毛细管筛分电泳法以及质谱法等。早期的酶蛋白的相对分子质量测定主要采用超离心法，但此法对仪器要求较高，操作也比较繁琐，现在已很少使用。之后出现了凝胶过滤法，这种方法主要是用于测定活性蛋白质的相对分子质量。目前使用较多的是 SDS-PAGE 法，此方法比较方便，但会出现比较大的偏差（5%~10%）。近几年来，毛细管筛分电泳法和质谱法测相对分子质量由于具有蛋白质用量少和精度较高等优点，得到了比较快的发展和运用。用一种方法测得酶的相对分子质量后，最好再用其他方法测定加以佐证。

#### 1. 凝胶过滤法

凝胶过滤又称分子筛色谱或排阻色谱，它是蛋白质分离纯化过程中非常重要且普遍使用的一种方法。其原理是多孔的载体对不同体积和不同形状分子具有不同的排阻能力，单个组分的混合样品流经凝胶柱时，大分子的物质由于分子直径大，不易进入凝胶微孔，而直接从凝胶缝隙中流出，因此最先流出，而小分子则进入凝胶的微孔内，因此向下的流速较慢，

从而把混合物分开，达到纯化的目的。凝胶过滤是纯化酶蛋白的一种重要方法，同时也可用于蛋白质相对分子质量的测定，主要是测定活性条件下蛋白质的相对分子质量。

根据凝胶过滤色谱的原理，同一种蛋白质的洗脱特征与该组分的相对分子质量大小有关，不同大小的相对分子质量蛋白质组分按照从大到小的顺序逐个流出凝胶柱。蛋白质洗脱时其洗脱体积  $V_e$  和该蛋白质相对分子质量的对数呈线性关系，可以表示为下式。

$$V_e = K_1 - K_2 \lg M_r$$

式中， $K_1$ 、 $K_2$  为常数； $V_e$  为洗脱体积。

要精确地测定蛋白质的相对分子质量，可以用一系列不同相对分子质量的标准蛋白质样品，先分别用大于所用载体上限分子和小于其下限的分子来分别测定它们的洗脱体积，用以标定凝胶柱的  $V_0$  和  $V_t$ ，然后再测定一系列已知相对分子质量的标准蛋白质样品的洗脱体积  $V_e$ ，所得  $(V_e - V_t)/(V_0 - V_t)$  与标准样品的相对分子质量 ( $M_r$ ) 的对数成线性关系，由标准蛋白质可作出一条标准曲线，然后再由标准曲线计算出待测蛋白质样品的相对分子质量。也可以  $\lg M_r$  对  $V_e$  作图，然后计算出待测蛋白质的相对分子质量。 $V_0$  值的测定通常用不被凝胶排阻的大分子物质溶液（通常采用蓝色葡聚糖-2000 等有色溶液）过凝胶柱，测定其洗脱曲线，到达洗脱峰峰顶时洗出的溶液体积就是该凝胶柱的  $V_0$ 。

用凝胶过滤法测定蛋白质的相对分子质量有许多优点，比如方法简单，容易掌握，样品用量少，操作过程中不会使蛋白质变性，样品测完后还可以回收等。但是此方法也存在着一些局限性，比如有些酶蛋白会与交联葡聚糖形成配合物，因而会在色谱时出现异常；用此法测定含糖量高的糖蛋白时，结果比真实值大；用此方法测定相对分子质量后通常还应用另一种测定原理不同的方法再测定一次加以验证。

## 2. SDS-PAGE

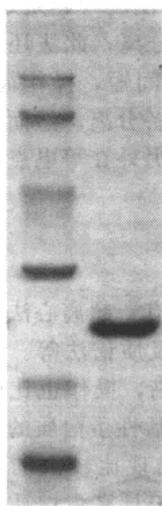


图 10-6 SDS-PAGE 测定酶相对分子质量的图谱

采用 SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量的原理是，在 SDS 电泳中，SDS 与蛋白质样品的疏水部分相结合，破坏了蛋白质的折叠结构，并使其稳定地存在于一个广泛均一的溶液中。SDS 蛋白质复合物的长度与其相对分子质量成正比。由于在样品中和聚丙烯酰胺凝胶中加入了离子去污剂和强还原剂后，蛋白质亚基的电泳迁移率主要取决于亚基相对分子质量的大小，而电荷的影响可以忽略，因此就可根据不同相对分子质量蛋白质样品的迁移率来计算待测定蛋白质样品的相对分子质量。图 10-6 是一种酶相对分子质量的测定图谱。

测定时数据处理方法如下：以标准蛋白质相对分子质量的对数为纵坐标，以相对迁移率  $R_f$  ( $R_f = \text{蛋白质迁移率} / \text{指示剂迁移距离}$ ) 为横坐标作图，得到一条标准曲线。在同样条件下，计算出未知相对分子质量蛋白质电泳后其相对迁移率，未知蛋白质的相对分子质量可以由其相对迁移率从已知相对分子质量蛋白质的标准曲线求出。

SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量的方法比较简单，且操作容易，因此目前应用比较广泛，但是此方法测的结果精确度不高，且所测出来的都是蛋白质亚基的相对分子质量。如果蛋白质是由多个亚基组成的，那么就不能采用此方法。

## 3. 超离心法

超离心法的原理是通过超速离心机首先测定蛋白质的沉降系数  $S$ ，蛋白质的沉降系数又与蛋白质的相对分子质量有一定的对应关系。蛋白质的沉降系数与蛋白质相对分子质量的对应关系有如下公式。

$$M_r = RTS/[D(1-\bar{u}\rho)]$$

式中,  $M_r$  为蛋白质的相对分子质量;  $R$  为气体常数;  $T$  为温度, K;  $S$  为沉降系数;  $D$  为粒子扩散系数;  $\bar{u}$  为粒子的偏比容;  $\rho$  为溶剂密度。

所以, 只要测定出蛋白质的沉降系数后就可以计算出蛋白质的相对分子质量。由于此法对仪器设备的要求高, 操作繁琐, 且需要大量的蛋白质样品, 因此现在已很少使用。

#### 4. 质谱法

质谱法测定蛋白质的相对分子质量精度非常高, 有时差别可达到一个氨基酸残基, 因此应用得越来越广泛。图 10-7 是用质谱法测定一种相对分子质量在 66000Da 左右的酶蛋白图谱。

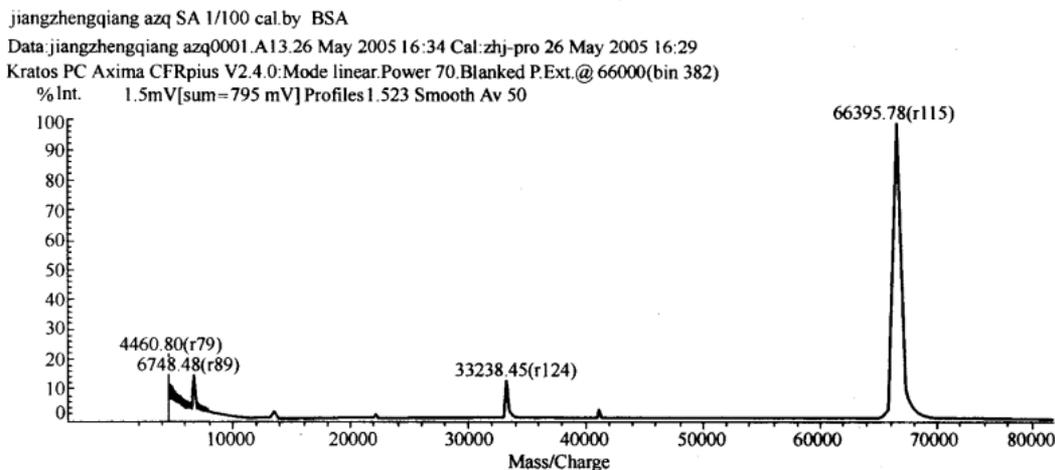


图 10-7 一种蛋白质的质谱图

### 第三节 酶蛋白的定量、组成和氨基酸分析

#### 一、蛋白质的定量

蛋白质的定量测定是研究蛋白质的最基本的方法。溶液中蛋白质浓度的测定方法很多, 目前比较常用的方法主要有凯氏定氮法、280nm 光吸收法、Bradford 检测法、Lowry 检测法、二喹啉甲酸 (BCA) 检测法、氨基酸分析法等, 下面将就这些不同测定方法的原理、优缺点等进行介绍。

##### 1. 凯氏定氮法

是蛋白质浓度测定最经典的方法。它的原理是基于每种蛋白质都有恒定的含氮量 (14%~16%), 蛋白质经浓硫酸消化分解后, 其中的氮转变为胺盐, 再与浓的 NaOH 作用, 使氨气释放出来并将其吸收于标准酸溶液中, 然后用反滴定法测定残留的酸, 从而推算出样品中的含氮量, 并最终得到蛋白质的含量。但是此方法取样量大, 操作繁琐且费时, 因此目前在酶的研究中很少有人采用。

##### 2. 280nm 光吸收法

280nm 光吸收法的原理是蛋白质分子中通常有酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等苯环结构, 这些结构在 280nm 波长处有最大吸收峰, 当蛋白质浓度在 0.1~1.0mg/mL 之间时, 其吸光

度值与蛋白质浓度成正比，故可用 280nm 波长吸收值大小来测定蛋白质的含量，此法的灵敏度在 0.2~2mg/mL 左右，比较适合于测定粗提蛋白质成分的混合物。

这一方法的优点是简单、快速，且不消耗蛋白质样品，因此常用于检测样品中是否含有蛋白质成分，因此在做柱色谱纯化蛋白质样品时常用此方法在线检测蛋白质的洗脱峰。它的缺点是测定的准确度较差，不能严格定量，因为此方法是根据酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸残基的强吸收值来测定的，不同的蛋白质具有不同的吸收系数，同时此方法还不能检出不含有这 3 种残基的蛋白质。

### 3. 双缩脲法

此方法的原理是  $\text{Cu}^{2+}$  与蛋白质的肽键 ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ) 配位，形成紫色配合物，此物质在 540nm 下具有最大吸收值，其颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，而与蛋白质的相对分子质量及氨基酸的组成无关，因此可以用比色法来测定。此法的灵敏度在 0.5~10mg/mL，优点是快速，且核酸等非蛋白质成分，包括硫酸铵不干扰显色。缺点是存在一些干扰物，主要是一些具有肽性质的缓冲液。

双缩脲法测定蛋白质含量的具体方法如下。

#### (1) 试剂

① 蛋白质标准溶液 可用 10mg/mL 的牛血清白蛋白作为标准。

② 双缩脲试剂 分别称取 1.5g 无水硫酸铜和 6.0g 四水合酒石酸钾钠溶于 500mL 蒸馏水中，然后缓慢加入 300mL 20% 的氢氧化钠溶液，最后定容到 1000mL。

#### (2) 方法

① 制作标准曲线 取 5 支小试管，每支试管中分别加入 0mL, 0.2mL, 0.4mL, 0.6mL, 0.8mL 蛋白质标准溶液，然后在试管中加入蒸馏水，使其体积达到 1mL，混匀后每管中再加入 4mL 双缩脲试剂，混匀，在室温下静置 30min 后测定各管溶液 540nm 处的吸光度值，最后以标准蛋白质的量为横坐标，以吸光度值为纵坐标作图，得到标准曲线。

② 样品的测定 将样品适当稀释后，在试管中加入 1mL 样品溶液，然后加入 4mL 反应试剂，测定方法同标准蛋白质的测定，测出吸光度值后用标准曲线计算出样品的蛋白质浓度。

### 4. Bradford 检测法

此法的原理是考马斯亮蓝 G-250 有红、蓝两种不同颜色的形式，在一定浓度的乙醇及酸性条件下，可配成淡红色的溶液，当它与蛋白质通过范德华力结合后，染料的最大吸收值从 465nm 变为 595nm，生成蓝色化合物，此化合物颜色的深浅与蛋白质浓度的高低呈正比关系，因此可通过检测反应液 595nm 处的光吸收值的大小来计算蛋白质的含量。

此法是一种迅速、可靠的通过染色法测定溶液中蛋白质的方法。此法的优点是快速、敏感 (25~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，几乎没有蛋白质的损失，且干扰物质较少。主要缺点是因为染料与不同的纯化蛋白质的相互作用有强弱，因此不是一种严格的蛋白质定量方法。

此方法测定蛋白质的过程如下。

#### (1) 试剂

① 蛋白质标准溶液 可用 1mg/mL 的牛血清白蛋白作为标准。

② 反应试剂 试剂中各组分的终浓度分别为 0.01% 考马斯亮蓝 G-250、8.5% 磷酸、47g/L 醇。

#### (2) 操作步骤

① 制作标准曲线 取不同体积的含有 5 $\mu\text{g}$  左右的蛋白质标准溶液于小试管中，加入蒸馏水使其体积达到 100 $\mu\text{L}$ ，然后再加入 5mL 反应试剂，混匀，2min 后测定其 595nm 处的光

吸收值。以 100 $\mu$ L 蒸馏水加入 5mL 的反应试剂作为空白对照调零。

② 样品的测定 样品测定的方法和步骤同上，以水代替样品作为空白对照。最后测出样品的 595nm 处的吸收值后，用标准曲线来计算出样品中蛋白质的含量。

#### 5. Lowry 检测法

Lowry 检测法是双缩脲法的发展，其原理是蛋白质在碱性溶液中形成铜-蛋白质复合物，然后这一复合物与磷钼酸-磷钨酸（福林试剂，即 Folin 试剂）反应，产生钼蓝和钨蓝复合物的深蓝色，这种深蓝色的复合物在 745~750nm 处有最大的吸收峰，其颜色的深浅（吸收值）与蛋白质浓度成正比，因此可根据 750nm 的光吸收值大小计算蛋白质的含量。目前，这一标准、快速的蛋白质定量检测方法已得到广泛的应用。

此方法的优点是：它是一种可靠的蛋白质定量方法，灵敏度高（5~100 $\mu$ g/mL）。缺点是干扰物质多，反应速率慢，某些试剂不稳定，蛋白质在测定过程中会发生不可逆的变性。此种方法测定蛋白质浓度的方法如下。

##### (1) 试剂

- ① 蛋白质标准溶液 0.5mg/mL 的牛血清白蛋白作为标准。
- ② DOC 溶液 配制 0.2% 的脱氧胆酸钠溶液。
- ③ TCA 溶液 配制 72% 的三氯乙酸（TCA）溶液。
- ④ CTC 贮备液 50mL 含有 0.2%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和 0.2% 酒石酸钾的溶液慢慢加入到 50mL 含有 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的溶液中，混匀后即为 CTC 贮备液。
- ⑤ 20% 的 Folin 试剂 Folin 试剂为购买得到。

##### (2) 方法

① 标准曲线的制作 取 5 个小离心管，每管里面加入 0 $\mu$ L、10 $\mu$ L、20 $\mu$ L、30 $\mu$ L、40 $\mu$ L 的蛋白质标准溶液，然后每管用蒸馏水加至 200 $\mu$ L，混匀后每管加入 20 $\mu$ L DOC 溶液，混匀，静置 10min；加入 20 $\mu$ L 的 TCA 溶液，混匀，3000g 离心 10min；倒出上清液，在每管中加入 200 $\mu$ L 的蒸馏水，混匀，再加入 200 $\mu$ L 的 CTC 工作液，混匀后静置 10min；加入 100 $\mu$ L 的 20% 的 Folin 试剂，混匀，静置 30min；待其颜色最深时测定混合液在 750nm 的吸光度值，最后以蛋白质浓度为横坐标，以吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。

② 样品的测定 样品测定的方法和步骤同上，只是所加入的样品体积可依据样品大致的浓度来确定。水代替样品作为空白对照。最后测出样品的 750nm 吸光度值后，用标准曲线来计算出样品中蛋白质的含量。

#### 6. 二喹啉甲酸（BCA）检测法

二喹啉甲酸（BCA）检测法的原理是在碱性环境下蛋白质分子中的肽键结构能与  $\text{Cu}^{2+}$  配位生成配合物，同时将  $\text{Cu}^{2+}$  还原成  $\text{Cu}^+$ 。而 BCA 试剂可敏感特异地与  $\text{Cu}^+$  结合，形成有色复合物，此复合物在 562nm 处有高的光吸收值。其颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，因此可根据光吸收值的大小计算蛋白质的含量。

此方法的优点是单一试剂，终产物稳定，几乎没有干扰物质的影响，且灵敏度高（0.5~10 $\mu$ g/mL）。缺点是反应时间长，蛋白质会发生不可逆的变性。

#### 7. 氨基酸分析法

氨基酸分析法是目前测定蛋白质浓度最准确的方法之一。用此方法分析计算出的蛋白质含量最接近蛋白质含量的真实值，因为目前其他的方法都必须在测定时用一个已知蛋白质来作标准曲线，将待测蛋白质与已知蛋白质的所测数据相比较，从而得出待测蛋白质浓度的相对值，而实际上两种蛋白质的可用于测定蛋白质含量的相关基团并不是完全一样的，因此测出来的值会有一定的误差。

以上是目测定蛋白质浓度时经常采用的一些方法，由于它们测定的原理以及所使用的设备均有不同，因此，都存在着各自的优缺点，表 10-2 列出了这些不同方法的测定精确度以及各自的优缺点。

表 10-2 不同蛋白质浓度测定方法的比较

方法	精确度	优点	缺点
凯氏定氮法		精确度高	操作繁琐
280nm 光吸收法	0.2~2mg/mL	方便快捷,不会使蛋白质变性	精度不高,一般不能用来定量测定
双缩脲法	0.5~10mg/mL	方便快捷	存在一些干扰物
Bradford 检测法	25~200 $\mu$ g/mL	方便快捷,干扰物少,灵敏度高	
Lowry 检测法	5~100 $\mu$ g/mL	灵敏度高,不同蛋白质样品测定差异小	干扰物质多,反应速率慢,试剂不稳定
二喹啉甲酸检测法	0.5~10 $\mu$ g/mL	干扰物少,灵敏度高	反应时间长,蛋白质会发生不可逆的变性
氨基酸分析法		精确度高	操作繁琐

## 二、酶的氨基酸组成测定

氨基酸是酶蛋白的基本组成部分，它是一种小分子的两性化合物，分子质量一般在75~200Da之间。对蛋白质进行氨基酸的组成分析是很有必要的，它可以用来推算出蛋白质的含量，同时，在蛋白质测序中有时会因为蛋白质的N端封闭或者是样品本身不是蛋白质或大部分不是蛋白质而测不出，这时氨基酸的组成测定就是一个很好的办法。酶的氨基酸组成测定主要分为3步，即蛋白质的水解、氨基酸的组成分离以及氨基酸的组成分析。

### 1. 蛋白质的水解

常使用酸或酶水解。盐酸水解是目前水解蛋白质或多肽应用最广泛的一种方法，用此法能够得到除 Trp 和 Cys 以外的其他所有的氨基酸，方法也比较简便，一般采用 5.7mol/L 的盐酸真空状态下 110 $^{\circ}$ C 水解 24h 或者是在 150 $^{\circ}$ C 下水解 90min。由于用磺酸来代替盐酸水解有许多优点，因此近年来已被广泛应用。但用磺酸水解也有一定的局限性，如对含有较多碳水化合物化合物的糖蛋白分子不能用本方法测定色氨酸，因为当水解液中存在碳水化合物时，色氨酸容易被破坏。用酶水解条件比较温和，选择专一性低、水解活力高的蛋白酶水解，可以使蛋白质基本水解成游离氨基酸，受酸水解影响较大的氨基酸，如 Trp、Asn、Gln 等，都可用酶水解直接得到。但酶水解不易达到彻底水解，影响氨基酸的回收率。

影响氨基酸分析的因素有很多，水解是其中最重要的因素之一，它是整个氨基酸分析的第一步，因此其水解效果成功与否直接影响到后续氨基酸的分析。

### 2. 氨基酸的组成分离

获得游离氨基酸的混合物后，就要对它们进行分离和定量测定。分离通常采用离子交换色谱法，组成成分检测则一般通过茚三酮或荧光胺反应。茚三酮法测定氨基酸的原理是游离氨基酸与茚三酮反应形成紫色化合物，此化合物在 570nm 有最大的吸收峰，因此可于 570nm 比色测定。荧光胺法测定的原理是荧光胺与伯胺反应产生荧光团，荧光团可在 390nm 被激发，在 475nm 发出荧光，荧光强度与伯胺浓度成正比。

### 3. 氨基酸的组成分析

氨基酸的组成分析一般采用气-液色谱法和高效液相色谱法 (HPLC)，目前采用已将自动进样、氨基酸分析和定量连为一体的氨基酸自动分析仪来测定。氨基酸的分析方法很多，但是每种方法都有其优缺点，对几种分析方法的特征比较如表 10-3。许多氨基酸组成成分分析结果表明：酶与其他蛋白质一样，分子中所有氨基酸都是 L 型，它们之间以肽键相互连接，酶分子的氨基酸组成都或多或少地和酶的催化性质与来源相关。

表 10-3 氨基酸几种分析方法的特征比较

试剂	反应时间	灵敏度	衍生物稳定性	其他情况
茚三酮	1~2min	>100pmol	稳定	经典的氨基酸分析方法
荧光胺	<1s	100pmol	稳定	适合肽类分析
异硫氰酸苯酯(PITC)	5min	150pmol	不稳定	需要纯的样品
OPA	1min	5pmol	较稳定	反应速率快
Dansyl-Cl	60min	5pmol	稳定	灵敏度非常高

### 三、酶蛋白的一级结构测定

酶蛋白是由 20 种氨基酸按照一定顺序通过肽键连接成一长链，再通过链内、链间的离子键、疏水作用等多种作用力进行折叠卷曲形成一定构象而产生其特异性的活性蛋白质。酶蛋白的一级结构即氨基酸的排列顺序，决定了酶的高级结构及功能。同时酶蛋白质一级结构的获得也有助于进行其基因结构的研究。因此，测定酶的一级结构是酶结构与功能研究中的重要组成部分。随着研究方法和手段的更新，酶的一级结构的分析向提高灵敏度、缩短周期的方向发展。酶一级结构分析的主要方法有两种：一是直接进行肽链的拆分、裂解及氨基酸分析；二是通过测定编码蛋白质的核苷酸顺序推测相应蛋白质的氨基酸顺序。目前，绝大部分的蛋白质测序都是采用第一种方法。

采用化学法对酶蛋白的一级结构进行测定时主要有两个关键步骤。第一个关键步骤是将氨基酸残基酶蛋白的末端裂解下来，裂解的方式主要有化学法和酶法，酶法裂解产生的肽较小（5~10 个残基），适用于手工序列分析，化学法裂解则产生较大的肽（50~100 个残基），适合于用序列仪进行分析，但是由于化学法和酶法相比较具有裂解彻底、效率高、消耗少等很多优点，因此在实际测定过程中一般采用化学法裂解。第二个关键步骤就是对氨基酸残基进行鉴定，主要是通过 HPLC 等方法进行分离和分析。

酶蛋白一级结构的测定主要包括以下程序。

#### 1. 样品的准备

在对酶蛋白样品进行测序前必须对样品进行一定的处理，使其达到一定的要求。首先是样品纯度的要求，每种蛋白质都有它特定的氨基酸排列顺序，因此做序列测定用的蛋白质必须是纯的。一般要求纯度在 97% 以上，杂蛋白含量超过 5% 时便很难测定序列。常用来检测蛋白质样品均一性的方法有：双向电泳、离子交换色谱、亲和色谱、Western 印迹等。通常以电泳时呈现一条带以及末端残基鉴定是单一的样品作为序列测定样品。

其次就是要对样品进行脱盐处理，使蛋白质样品中含有尽量少的杂质。脱盐的方法有透析、凝胶过滤、超滤等方法，其中最简单快速的方法是凝胶过滤和超滤。采用凝胶过滤时一般选用 Sephadex G-25 脱盐柱，选用直径 10mm 的柱子，装入 60~80mm 高的柱料，直接手工过滤，上样后用蒸馏水洗脱，2~3min 后就可收集到蛋白质样品。超滤脱盐也非常方便，现在市场上用超滤管销售，按照不同的要求，超滤截留的分子质量有 3000Da、5000Da、10000Da 等不同的规格，直接将样品装入超滤管离心就可以达到脱盐的目的，同时还能够浓缩蛋白质溶液。

第三还应测定蛋白质的相对分子质量、构成蛋白质多肽链的数目和大小以及蛋白质的配基，同时还应对蛋白质的端基进行分析，以确定 N 末端是否被封闭或酰胺化，以避免测定的盲目性。

#### 2. 样品肽链的片段化

肽链裂解的方法基本上可分为两大类：一是化学法；二是酶法。这两种方法裂解蛋白质

的专一性因个别蛋白质而异。如何选择肽键裂解的切点，对序列分析至关重要。裂解时要求裂解点少，专一性强，收率高。使用蛋白水解酶时，还必须注意，蛋白质是在天然状态下裂解，还是先变性然后再裂解。在有些情况下，天然蛋白质的有限水解，可以得到许多有用的信息。下面就对这两类裂解方法进行介绍。

(1) 化学裂解法 化学裂解法有溴化氰 (CNBr) 裂解法、BNPS-Skatole、羟胺裂解法等多种方法。目前采用最多的方法是溴化氰裂解法，下面就主要介绍溴化氰裂解法。

溴化氰裂解法的原理是溴化氰能够专一地裂解蛋氨酸残基的羧端肽键，溴化氰与蛋白质中蛋氨酸侧链硫醚基反应，生成溴化亚氨内酯，此产物与水进一步反应，将肽键断裂。

溴化氰裂解是在酸性条件下进行的，容易引起样品中其他肽键的裂解，因此当其他肽键裂解时，所得到的肽段就可能比预计的要多。蛋白质样品中的蛋氨酸含量一般很少，因此一般裂解得到的都是比较小的肽段，整个反应过程还必须在充氮的条件下进行，以防止蛋氨酸被氧化，而不能被溴化氰裂解。

(2) 酶法裂解 用水解酶专一地裂解蛋白质样品中的肽键具有许多优点：一是专一性强，降解后的肽段容易纯化；二是产率高，副反应少。用酶法裂解肽键还要考虑以下几种因素：①所选用的蛋白质水解酶必须有比较高的纯度，这样就不容易带入新的肽段，影响实验结果的准确性；②蛋白质水解时还必须选择合适的 pH 值、适宜的反应温度、适当的反应时间等，以使蛋白酶处于最佳的催化活性条件下；③为了确保蛋白质样品有效彻底地水解，还应确定适当的酶与蛋白质的比例，将蛋白质进行变性处理等。

目前在进行蛋白质样品酶法裂解时，有许多种蛋白水解酶可供选择，其中最为常用的有胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶等。

胰蛋白酶是最常用的蛋白水解酶，它是一种碱性蛋白酶，最适 pH8.5~9.0 之间，它能够高度专一性地剪切 Lys 和 Arg 羧基端的肽键。因此，如果在氨基酸组成已知的情况下水解，就能够估计水解会得到多少个肽段。在对碱性蛋白质进行水解时，通常需要用化学修饰来改变裂解部位，因为碱性蛋白质一般都含有较多的 Lys 和 Arg，这样就会在水解后生成大量的肽段，不利于后续的分析，修饰后就可以有效地减少蛋白质的水解位点，使水解能够得到适量的有利于序列测定的肽段。

胰凝乳蛋白酶具有比较广的水解专一性，其最适 pH8.0 左右。它能够水解芳香族氨基酸的 C 端肽键，它对具有疏水性侧链基团的氨基酸羧端肽键的水解速率比其他肽键快得多，因此，水解时必须很好地控制反应的条件，这样才会使水解片段不会太多。在对碱性蛋白质进行水解时，用胰凝乳蛋白酶水解，可得到适度大小的肽段，这样就可以避免用胰蛋白酶水解碱性蛋白得到过多肽段的缺点。

胃蛋白酶具有比上述两种蛋白酶更广的水解专一性，它的最适 pH2.0~4.0 之间，处于酸性范围内，主要作用于 Phe、Tyr、Leu、Glu 等芳香族氨基酸的羧基端侧链，但是其水解的位点并不是完全不变的，有时还会因具体的肽链结构而有所不同。用胃蛋白酶进行水解时，蛋白质样品不经过变性就能够顺利水解。

### 3. 肽链片段的分离纯化

肽链经过化学法或酶法裂解后得到各种不同大小的肽段，首先必须对它们进行分离纯化。分离的原理主要是根据肽段的物化特性，包括分子大小、电荷、极性、溶解度以及特殊的共价结合等性质。常用的方法有凝胶过滤法、离子交换法、毛细管电泳法、高效液相色谱法等。

目前肽链片段的分离越来越多地倾向于使用 HPLC，因为高效液相色谱法与其他分离方

法相比具有比较明显的优势。如分离时间快,一般1h就能完成;其次就是样品的回收率高,一般都能够达到90%以上;还有就是高效液相色谱的分辨率非常高。高效液相色谱法的缺点就是对设备要求较高。

肽段在分离过程中要求有相应的检测方法。肽键在280nm或是215nm处有较强的光吸收值,因此可以直接进行检测。同时还可以用其他的方法对收集到的肽段进行检测,在基于显色反应的方法中,茚三酮法比较常用,但灵敏度较低,用荧光胺法检测比用茚三酮灵敏1~2个数量级。目前一般都很少使用化学显色反应法。

#### 4. 肽链片段的序列分析

肽链片段的序列分析分为N末端测定和C末端测定。

(1) N末端测定 N末端氨基酸残基的测定过程一般包括偶联、裂解、转化、鉴定等几个步骤,肽段的 $\alpha$ -氨基与一些偶联剂偶联后,则与其紧接着的第2个氨基酸残基的结合力会大幅度减弱,然后很容易就可以用酸将此残基裂解,使下一个 $\alpha$ -氨基又暴露出来,因此又可以与偶联试剂偶联,这样氨基酸残基就逐个被裂解下来,最后通过纸色谱、薄层色谱等方法进行鉴定。

N末端氨基酸残基的测定过去多采用2,4-二硝基氟苯标记,现在则广泛采用二甲氨基萘磺酰氯标记,除此之外还有异硫氰酸苯酯法、氨肽酶法、DABITC法等,标记的N端氨基酸通常再借助电泳或色谱法确定。下面主要介绍几种比较常用的方法。

① 二硝基氟苯法 2,4-二硝基氟苯在pH 8.0~9.0、室温的条件下与肽链的N端氨基作用,形成二硝基苯基肽链(DNP-肽)。由于2,4-二硝基氟苯与氨基缩合形成的键很稳定,所以DNP-肽经盐酸水解后,除N端氨基酸为黄色DNP-氨基酸衍生物外,其余均为游离氨基酸。黄色的DNP-氨基酸以及水解过程中形成的DNP-OH和DNP-NH<sub>2</sub>可以用乙醚抽提出来,进行纸色谱或聚酰胺薄层色谱后,根据色谱斑点的位置做定性鉴定;或者用温热的1% NaHCO<sub>3</sub>洗脱后,测定洗脱液360nm波长处的吸收值做定量测定。

② 丹磺酰氯分析法 二甲氨基萘磺酰氯简称丹磺酰氯(DNS-Cl),这种荧光试剂能够专一地与N端的 $\alpha$ -氨基反应,生成氨磺酰衍生物DNS-肽。此衍生物经盐酸水解后得到DNS-氨基酸和其他一些氨基酸。反应产物DNS-氨基酸在紫外线下有强烈荧光,因此可以通过荧光检测。肽段经水解后的产物不需要经过提取,可以直接用薄层色谱、电泳等相应的分析方法进行分析鉴定。

③ 封闭N端的测定 有些蛋白质的N端是封闭的,不能直接与上述试剂反应,因此必须将这些封闭基团除去之后才能进行正常的测定。N端封闭基团主要有N-乙酰丝氨酸、N-乙酰苏氨酸、N-焦谷氨酸、N-甲酰甲硫氨酸中的甲酰基等。目前降解这些基团的方法有酶解法和化学降解法,主要还是使用酸降解。

(2) C末端测定 C末端测定的方法很多,通常采用的方法有胍解法、减数C末端测定法、羧肽酶法等。

胍解法是目前化学法测定C末端残基的最重要的方法之一。其测定原理是当蛋白质与无水胍在100℃反应5~10h后,除C端氨基酸外,其他所有的氨基酸都转变成相应氨基酸的胍基, C端氨基酸则以游离氨基酸形式释放出来,胍解下来的C端氨基酸可借助2,4-二硝基氟苯试剂及分级抽提等方法,再以色谱技术迅速鉴定出种类和数目。但是用此方法测定时也有一些缺陷,比如C端为半胱氨酸和胱氨酸的肽就不能用此法测定,因为这两种氨基酸在胍解时分解,必须先氧化或烷基化后再胍解测定。

羧肽酶法也是一种比较常用的有效方法之一。羧肽酶是一类外肽酶,能够专一性地从肽链C末端开始逐个降解,释放出游离氨基酸,释放出的氨基酸数目和种类随着时间的变化

而发生变化，可用氨基酸自动分析仪进行定性和定量测定，然后根据氨基酸释放的动力学曲线，即以时间为横坐标，释放量 (mol) 为纵坐标作图，便可确定该肽链的 C 端氨基酸的序列。

为了使不同羧基末端的降解速率趋于平稳和接近，必须采取一些有效的措施，比如在降解的样品中加入一些能保留酶的活性而又能破坏蛋白质的结构的变性剂等。

(3) 序列分析 得到纯的肽段后，就可以对其进行氨基酸的序列测定。整个肽片段的序列分析有很多种方法，其中最主要的有 Edman 顺序降解法、酶学降解法以及质谱法。

① Edman 顺序降解法 此方法是目前蛋白质测序技术中最基本也是最有效的方法。Edman 顺序降解过程主要包括 3 个主要的反应 (如图 10-8 所示)：首先是肽链中  $\alpha$ -氨基与异硫氰酸苯酯 (PITC) 的偶联反应，反应过程中生成异硫氰酸苯酯-肽 (PITC-肽)；其次是靠近异硫氰酸苯酯-肽的氨基酸 N 端的裂解反应；第三个反应为转化反应，即裂解产物由不稳定状态的 PTZ-氨基酸转化为稳定的 PTH-氨基酸，最后生成的 PTH-氨基酸可通过气相色谱、高效液相色谱、质谱等方法 and 手段进行分析，目前应用比较广泛的是用  $C_{18}$  反相柱高效液相色谱进行分离。

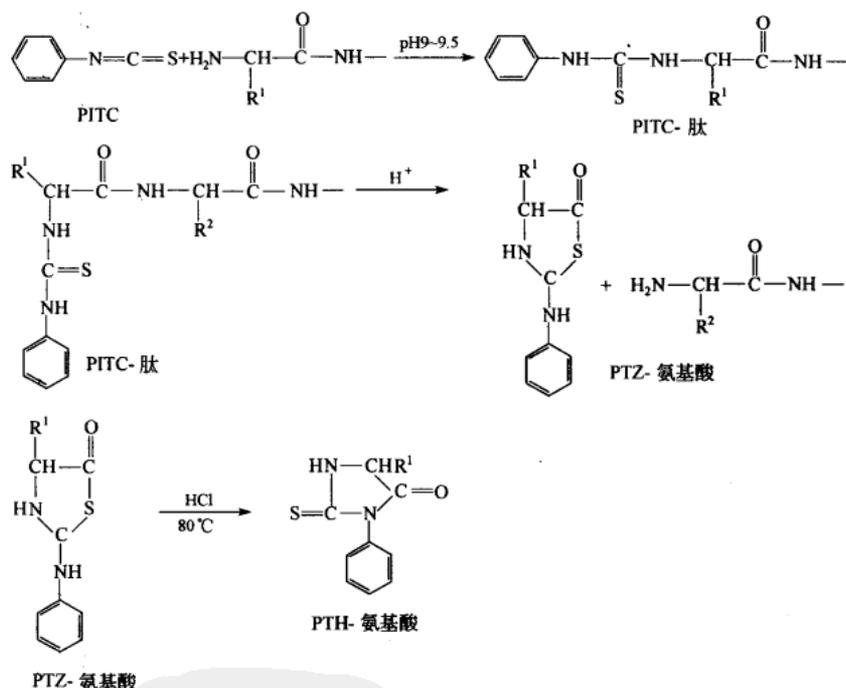


图 10-8 Edman 顺序降解示意

② 酶学降解法 酶学降解测定肽段序列的方法也有很多，其中最主要的有氨肽酶法和羧肽酶法。氨肽酶法的测定原理是氨肽酶能够从肽链的 N 端逐个地切下氨基酸，然后将切下来的氨基酸分别进行检测鉴定，最终就能得出肽链的氨基酸序列。目前较为常用的氨肽酶主要有亮氨酸氨肽酶、细胞外氨肽酶等。羧肽酶法的原理与氨肽酶法相似，只是酶剪切时是从肽链的 C 端开始的。常用的羧肽酶主要有羧肽酶 A、羧肽酶 B 和羧肽酶 C。

### 5. 酶蛋白总序列的确定

酶蛋白总序列的确定一般要选取两种或两种以上的酶切方法或化学断裂方法，分别制备两组或两组以上的肽链片段，且每套断链方法没有相同的切点，即得到两种或两种以上的重

叠肽，并分别对它进行序列分析。在选择裂解方法时，一般先选择一套切点较少的方法，得到一些稍长的肽链片段，然后再选用一套切点较多的方法，以得到一些比较短的肽段。然后再将这些肽链片段的进行重叠、比较和分析。

在得到酶蛋白的氨基酸序列后还应确定蛋白质二硫键的位置。早期测定二硫键用对氯汞苯甲酸法，后来又出现 5,5-二硫-2-硝基苯甲酸法和 *N*-乙基顺丁烯二酰亚胺法。二硫键位置的确定目前比较常用的方法是采用角线电泳法，即将肽段混合物在过甲酸中氧化，然后将氧化前后的产物在 pH 6.5 中进行双向电泳，其中不含二硫键的片段分别分布于对角线上，而含二硫键的片段，由于胱氨酸氧化后形成半胱氨酸磺酸，迁移率增大，将离开对角线。

这样就完成了整个酶蛋白的序列分析。

#### 四、酶的二级结构、三级结构测定

酶的二级结构是指肽链主链中的若干肽段形成的规则的或不规则的构象。酶的二级结构构象主要有螺旋结构、 $\beta$  折叠股和  $\beta$  折叠片、 $\beta$  发夹和  $\Omega$  环、回折、三股螺旋、无规则卷曲等。图 10-9 是几种蛋白质不同二级结构构象示意。

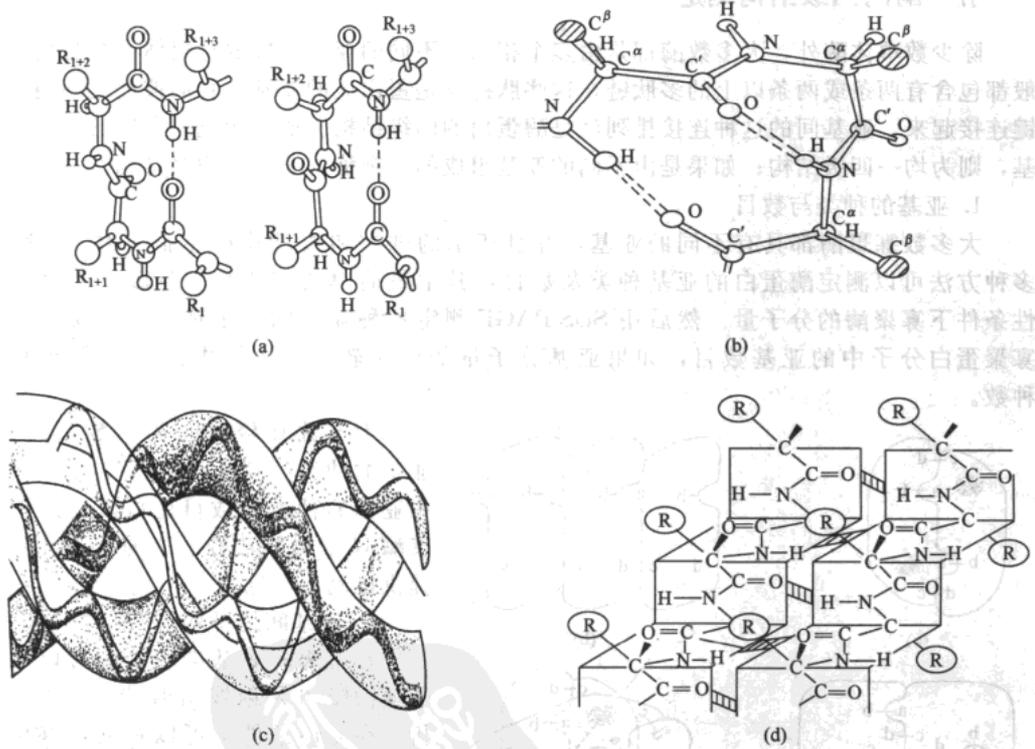


图 10-9 几种蛋白质不同二级结构构象示意  
 (a) 两种  $\beta$  转角；(b)  $\gamma$  转角；(c) 三股螺旋；(d)  $\beta$  折叠片

二级结构构象的测定主要是借助旋光色散和圆二色性技术。

酶蛋白质的三级结构是指多肽链在二级结构的基础之上经过盘旋、折叠后形成紧密的、借助各种次级键维持的球状构象。图 10-10 是血红蛋白  $\beta$ -亚基三级结构示意。

三级结构的测定一般采用分光光度法，但最有效的方法是 X 射线衍射技术法。

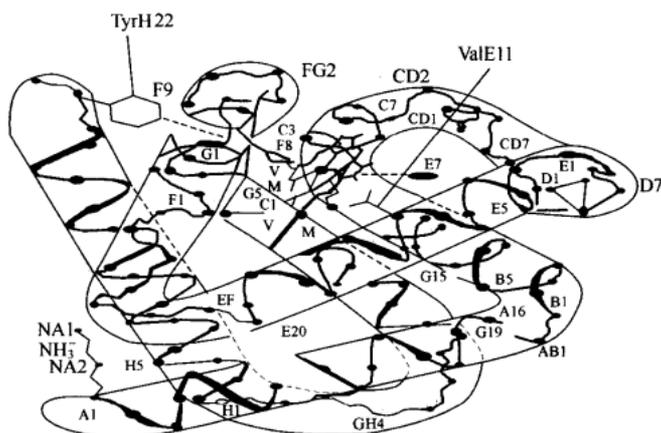


图 10-10 血红蛋白  $\beta$ -亚基三级结构示意图

## 五、酶的四级结构测定

除少数单体酶外，大多数酶都是由多个相同或不同的亚基组成的寡聚体，酶蛋白分子一般都包含有两条或两条以上的多肽链，这些肽链就是蛋白质的亚基，它们彼此之间通过次级键连接起来，亚基间的这种连接排列就是酶蛋白的四级结构。如果构成蛋白质的是相同的亚基，则为均一四级结构；如果是由不同的亚基组成的，则称为非均一四级结构。

### 1. 亚基的种类与数目

大多数寡聚酶都具有不同的亚基，并且亚基的种类和数目差别都非常大。目前有很多种方法可以测定酶蛋白的亚基种类及数目，其中最简单的方法是用凝胶过滤法测定活性条件下寡聚酶的分子量。然后用 SDS-PAGE 测定各种亚基的分子量。这样便可以确定寡聚蛋白分子中的亚基数目，如果亚基分子量的区别较大，还能由此确定不同亚基的种数。

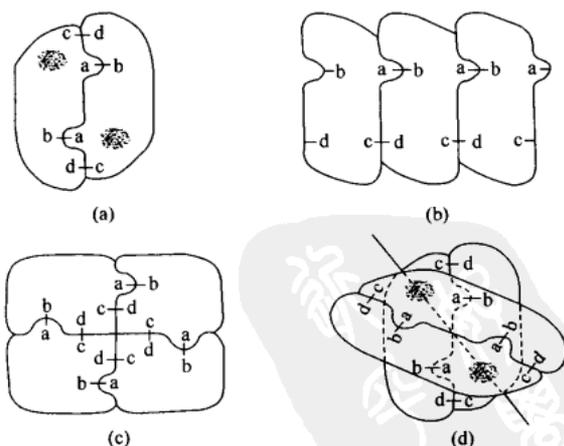


图 10-11 蛋白质亚基的结合示意

- (a) 相同结合形成  $C_2$  对称二聚体；(b) 不同结合形成无限长的二聚体；(c) 不同结合形成紧密二聚体；(d) 由相同结合形成的四聚体

大多数寡聚酶的亚基数都为偶数，亚基的种类一般为 1~2 种。确定寡聚酶中亚基的种类和数目还可以通过测定寡聚酶 N 末端氨基酸残基的种类和数目来提供推测的信息。

### 2. 亚基间的排列与结合

寡聚酶的亚基排布一般可以通过电子显微镜和 X 射线衍射结构法来观察分析，在变性条件下可以观察到寡聚酶被解离为亚基，说明亚基间是通过弱的非共价键结合的。X 射线衍射分析表明，在这些非共价的结合中，非极性键的数目多于氢键的数目，更多于静电键；而非极性键主要是范德华力与疏水键；寡聚蛋白分子中的亚基都是对称排布的；亚基排列的一般规律是能最大限度地增

加亚基间接触位点数。每个酶蛋白的亚基一般都是独立的球状构象，亚基之间是借助于非共价键而紧密地结合在一起，两个亚基相互作用的表面，在形状和极性基配方面，都是高度互补的。相同的亚基之间有两种结合方式，即相同的结合方式和不同的结合方式，其结合方式如图 10-11 所示。而不同的亚基之间的结合仅需要二者结合的表面及具有物理的和空间的互补性。

## 六、活性中心的测定

酶的活性中心主要是指酶分子中与催化功能直接相关的氨基酸残基以及按照特定的立体构象组成的活性结构区域。整个酶催化的过程包括两个关键环节，即酶和底物的结合以及酶催化底物的反应。因此，酶活性中心的测定也主要是针对这两个部位进行的。

### 1. 催化基团的测定

催化基团的测定方法根据不同的原理主要分为共价标记法、动力学参数测定法、比较生化分析法、X 射线衍射分析法等。

共价标记法是一类较为直接的方法，通过它可了解到催化中心的氨基酸组成及其附近肽段的组成，具体方法有两种：①用氨基酸试剂进行“有限”标记，在不引起蛋白质变性的条件下，用某一专一性的氨基酸试剂进行酶的修饰，然后测定酶活力的变化，这样可判断被修饰的氨基酸是否属于催化部位；②用底物、抑制剂或类底物进行亲和标记。在用底物来标记酶的活性中心时，必须满足两个条件：反应不是一次；形成的酶-底物配合物十分稳定。

动力学参数测定法的原理是酶活性中心的解离状态和酶的活性直接有关，因此通过动力学方法求得有关参数后，就可对酶活性中心的化学性质做出判断。

比较生化分析法是指对具有相同催化功能的酶进行比较分析。对许多酶的一级结构的分析表明，很多具有相同催化功能的酶，即使来源不同，在它们的活性中心往往仍可找到相同或者相似的肽段，因此可通过分析同类已知结构的酶来推测未知酶的活性中心。

X 射线衍射分析不仅能够分析了解这些构成催化部位的氨基酸残基所处的相对位置与实际状态，还能了解一些与催化部位有关的其他基团。

### 2. 结合基团的测定

共价标记法，由于酶的催化基团具有较强的反应性能，因而标记较易；但是对于结合部位来说，酶与底物之间的结合主要通过氢键、疏水键等次级键，结合基团一般没有高的反应性能，应用弱的试剂往往达不到标记效果，而过强的反应却又会使同种类型的氨基酸残基普遍标记，因而难以做出确切的判断。

结合基团的测定中，动力学参数测定法和 X 射线衍射分析法同“1. 催化基团的测定”。

对酶的活性结构研究表明，酶的蛋白质本质为酶的催化活性提供了多种功能性残基；酶的一级结构一方面为酶准备了功能片段，另一方面为酶形成特定的活性构象奠定了基础；酶通过高级结构将相应的功能基团组织在酶分子的特定区域，形成活性中心；活性中心是直接参与和底物结合并参与催化底物转化的各有关氨基酸残基特定构象分别组成的活性结构；活性中心的这种活性结构也要求活性中心以外的其他氨基酸残基共同维系。因此，对于酶的活性而言，所有这些氨基酸残基，包括活性中心的氨基酸残基在内的，都是必需的。它与活性中心的区别是：活性中心的有关基团都是必需基团，而必需基团不一定都属于活性中心组成。

## 第四节 酶的免疫学方法

免疫学方法的原理是利用免疫反应（抗原-抗体反应）的高度特异性和酶促反应的高度

敏感性，进行对抗原或抗体的检测。自 1971 年 Engvall 等在免疫学方法的基础上建立起了检测可溶性物质的酶联免疫吸附实验后，酶联免疫检测法得到了快速的发展，目前已经成为一类比较成熟的方法。酶免疫分析是其发展的一个方向，它是以待测抗原或抗体和酶标抗体（或抗原）的专一结合反应为基础，然后通过酶活力测定来确定抗原（或抗体）含量的一类分析法，是一种定性和定量的综合技术。酶免疫分析可分为酶联免疫吸附分析和酶多型免疫分析。酶联免疫吸附分析又称非均相分析法，因为酶在和抗原（或抗体）结合后其活性不发生变化，但在测定时必须进行相的分离；酶多型免疫分析由于和抗体结合后酶的活力发生变化，故可直接在同一相中进行测定，没有相分离的必要，称为均相法。另外还有一种介于均相与非均相之间的双抗体酶免疫分析方法。

### 一、非均相酶免疫测定法

非均相酶免疫测定是将待测抗原或抗体（或与待测抗原或抗体特异性结合的成分）结合到固相载体上，再通过免疫酶的结合和底物显色过程进行检测。非均相酶免疫测定法又包括以下几种具体的方法。

#### 1. 竞争法（competitive EIA）

竞争法的原理是在测定体系中，如果抗原（或抗体）的量一定，那么当加入待测抗体（或抗原）和酶标抗体（或抗原）进行免疫反应时，待测物质和酶标物质间就会产生竞争，相对仅有酶标物质进行免疫反应者，两者的差值显然代表待测物的量。竞争法原理示意如图 10-12。其中主要包括以下步骤。

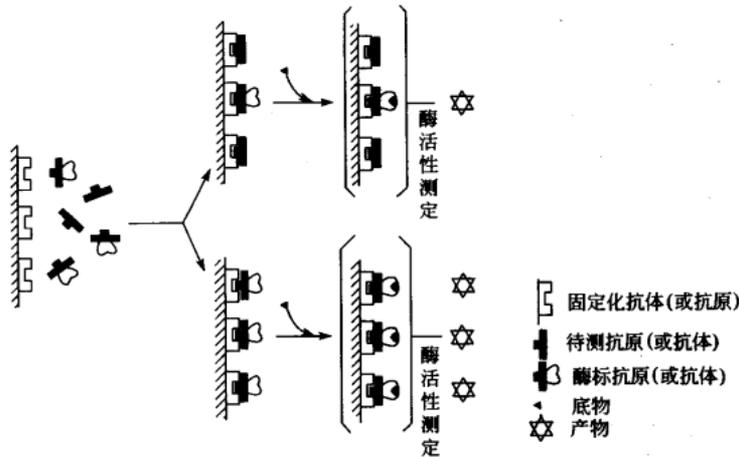


图 10-12 竞争法原理示意

- ① 将定量的抗体（或抗原）分别吸附固定于载体。
- ② 分别加入待测抗原（或抗体）和酶标抗原（或抗体）组成的混合物和“纯”的酶标抗原（或抗体）进行免疫反应。
- ③ 洗去游离的抗原（或抗体）。
- ④ 分别保温进行酶反应和活力测定。
- ⑤ 最后再根据两组测定差值确定待测抗原（或抗体）的含量。

如果要获得确切的含量，可先将步骤②中用标定的酶标抗原（或抗体）代替混合物制备一条标准曲线，然后再对照这条曲线求知抗原（或抗体）的量。

#### 2. 双抗法（sandwich EIA multivalent antigen）

双抗法适于多价抗原的测定，这类抗原既能和固定用的抗体结合，也能和测定用的酶标抗体结合，由于这种结合具有双重选择性，因此，双抗测定法有极高的专一性。这种方法的特点是抗原和酶标抗体不一定要经过纯化，而且灵敏度很高，能测定极微量的抗原。双抗法原理示意如图 10-13 所示，主要包括 4 个步骤。

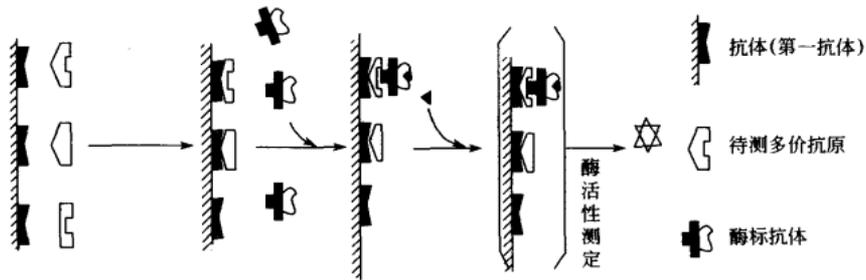


图 10-13 双抗法原理示意

- ① 将抗体（第一抗体）固定于载体表面。
- ② 加入待测抗原溶液，进行免疫反应，然后洗去过剩的溶液。
- ③ 再加入酶标抗体（第二抗体），洗去过剩的酶标抗体。
- ④ 进行酶反应和活力测定。

### 3. 抗抗法 (sandwich EIA for antibody)

抗抗法是利用特定抗原能专一地结合和固定待测抗体，然后再利用酶标抗体抗球蛋白直接测定固定了的待测抗体。因此只要抗原足够纯净和专一，测定可以高度准确。

抗抗法原理示意如图 10-14 所示，主要包括 4 个步骤。

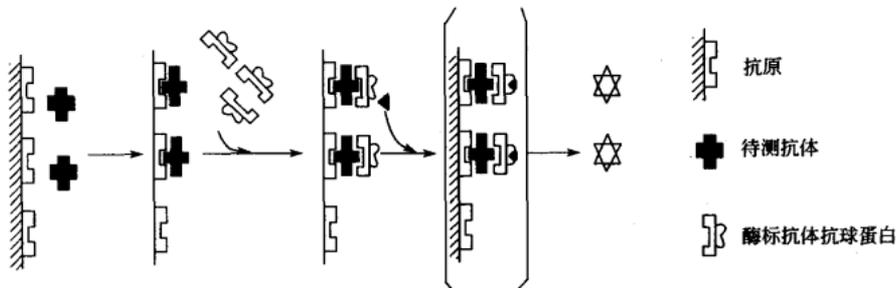


图 10-14 抗抗法原理示意

- ① 固定抗原。
- ② 选择性地结合和固定待测抗体。
- ③ 加入酶标抗体抗球蛋白。
- ④ 进行酶反应和酶活力测定，酶活力代表抗体量。

### 4. 抑制性测定法

它是一种将间接法和竞争法结合所产生的测定方法，主要是根据待测样品中抗原与包被的同种抗原可与相应抗体发生竞争性结合的原理，一般用于测定抗原。其原理示意（图 10-15）及一般操作步骤如下。

- ① 用待测抗原的同种抗原定量包被酶标反应板，孵育后洗涤。
- ② 用封闭液封闭酶标反应板，孵育后洗涤。
- ③ 加入待测样品，同时加入一定量的参考抗体（对照孔仅加入等量参考抗体），孵育后

洗涤。

④ 加入酶标记的第二抗体（或第二抗体替代物，如酶标 SPA 等），孵育后洗涤。

⑤ 加入酶底物溶液，测定酶的催化活性。与对照孔比较，待测样品孔中颜色的深度与待测液中抗原的含量成反比。

### 5. 桥联法

又称抗酶抗体法或不标记抗体酶法。它的基本原理是利用抗同种动物免疫球蛋白的抗血清，将直接或间接结合在抗原上的抗体和抗酶抗体连接在一起，使酶间接地连接到待测抗原上（又称搭桥），然后通过底物显色进行检测。此法可用于检测抗原或相应抗体，其特点是不需要纯化抗血清，操作简便、特异、敏感和重复性好，应用效价高和特异性强的抗酶抗体是此法成功的关键。桥联法原理示意如图 10-16 所示，主要包括如下 5 个步骤。

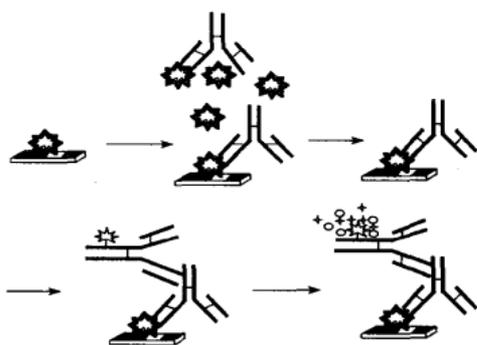


图 10-15 抑制性法原理示意

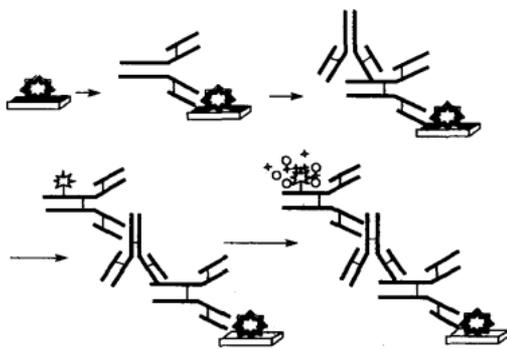


图 10-16 桥联法原理示意

① 如用于检测抗原，则将待测样品包被到空白酶标反应板上，孵育后洗涤，然后用封闭液对反应板进行封闭，加入相应第一抗体，孵育后洗涤。如用于检测相应抗体，则用抗原包被酶标板并进行封闭后，加入待测抗体，孵育后洗涤。

② 加入第二抗体（抗同种动物免疫球蛋白抗血清），孵育后洗涤。

③ 加入与待测抗体同种属的抗酶抗体，孵育后洗涤。

④ 加入抗酶抗体所对应的酶类，孵育后洗涤。

⑤ 加入酶底物，并对其催化活性进行检测。

## 二、均相酶免疫测定法

均相酶免疫测定法无须分离游离的和结合的酶标记物，因而不需要载体。半抗原与酶标记物结合后，可使酶的活性受到抑制或激活，但当再与相应抗体结合后，其酶活性被激活或抑制。其原理示意如图 10-17。均相法和非均相法相比，由于前者不需要进行相分离，故而较为简便，但是要得到适于这种方法的酶标抗原较多的技术困难，特别是酶标抗原与抗体结合后的活力变化更难以预见、难于控制，因而这种方法应用不多。

用均相酶免疫法测定时有两种不同的形式：①当半抗原与酶结合使酶的活性激活，再与相应抗体结合后，其酶活性被抑制时的测定；②当半抗原与酶结合使酶的活性抑制，再与相应抗体结合后，其酶活性被激活时的测定。其原理和过程分别如下。

(1) 当半抗原与酶结合使酶的活性激活，再与相应抗体结合后，其酶活性被抑制时的测定。

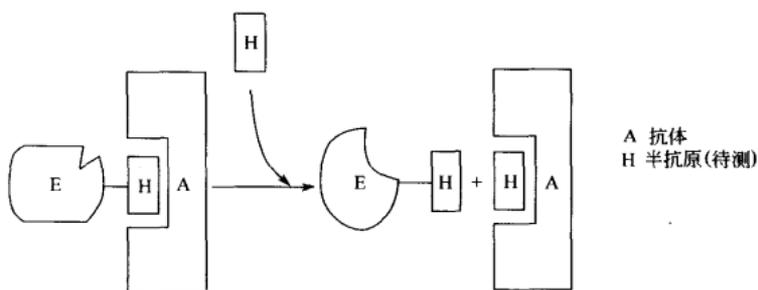


图 10-17 均相酶免疫测定法原理示意

① 将酶标记半抗原形成具有酶活性的半抗原-酶复合物（酶标半抗原）。

② 将一定量的酶标半抗原、待测样品及抗体混合，当待测样品中无相应半抗原时，形成抗体-酶标半抗原复合物（无酶活性），当待测样品中存在相应半抗原时，形成抗体-酶标半抗原复合物（无酶活性）、抗体-半抗原复合物，并剩余部分酶标半抗原（有酶活性）。待测样品中的半抗原含量越高，竞争性结合后酶标半抗原的剩余量越大，总体反应中酶活性越高。

③ 加入相应酶底物，根据降解底物量判断待测标本中小分子半抗原的有无和数量。

(2) 当半抗原与酶结合使酶的活性抑制，再与相应抗体结合后，其酶活性被激活时的测定。

① 将酶标记半抗原形成无酶活性的半抗原-酶复合物（酶标半抗原）。

② 将一定量的酶标半抗原、待测样品及抗体混合，当待测样品中无相应半抗原时，形成抗体-酶标半抗原复合物（有酶活性），当待测样品中存在相应半抗原时，形成抗体-酶标半抗原复合物（有酶活性）、抗体-半抗原复合物，并剩余部分酶标半抗原（无酶活性）。待测样品中的半抗原含量越高，竞争性结合后酶标半抗原的剩余量越大，总体反应中酶活性越低。

③ 加入相应酶底物，根据降解底物量判断待测标本中小分子半抗原的有无和数量。

均相酶免疫测定主要用于检测小分子半抗原，如激素和药物成分等。可用于此类检测方法的酶类主要有 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、溶菌酶和苹果酸脱氢酶等。此法的检测敏感性低于酶联免疫吸附测定法（ELISA），但操作简便、快速，准确性和重复性好，所需仪器少，为很多自动化测定系统所采用。

### 三、双抗体酶免疫测定法

双抗体酶免疫测定法为一类介于非均相酶免疫测定法和均相酶免疫测定法之间的测定方法，主要利用抗原与抗体间的可逆性结合，以及当抗原、抗体比例适合时可交联形成大分子复合物的原理进行的。检测的基本步骤如下。

① 将待测抗原（样品）与一定量抗原特异的第一抗体混合，共同孵育，使其充分结合。

② 加入足量的酶标记抗原，共同孵育，使第一抗体的抗原结合部位完全饱和。

③ 加入第一抗体的第二抗体，形成抗原-第一抗体-第二抗体的水不溶复合物。

④ 以离心法分离沉淀物，并对沉淀进行洗涤。

⑤ 将酶的底物加入沉淀中，对其催化活性进行检测，沉淀物中的酶活性与待测抗原量成反比。

## 四、其他类型和方法

酶免疫测定的方法还有很多种类型，这些类型多为酶联免疫测定方法与其他测定技术组合应用的产物，这些新的方法虽然带有相关方法的优点，但往往也产生一些不足。

### 1. 免疫酶斑点技术

此技术是在进行 ELISA 测定时，借用免疫印迹技术的某些基本原理和方法。其优点主要体现在定性和半定量检测方面，它与 ELISA 检测的主要区别是多数采用硝酸纤维素膜作为载体，而不用聚苯乙烯（或其他塑料）微孔反应板，所用酶底物经分解后局部产生不溶性沉淀产物。

### 2. 免疫电镜技术

它是指用电子显微镜检查用电子致密物质标记的抗体与其对应抗原反应的技术。免疫电镜技术可对有关抗原进行鉴定、检测和定位，是一种亚细胞水平上的研究方法。

### 3. PCR-ELISA

此方法是聚合酶链反应（PCR）技术与 ELISA 技术结合所产生的一种检测方法。主要用于检测标本中的特定基因。可代替常规基因扩增后的电泳检测，方便处理大量样品。目前已有多种商品化的试剂盒销售。

## 五、免疫分析中几个主要的操作步骤

### 1. 常用酶及其底物选择

在酶联免疫吸附实验中酶和底物的选择是非常重要的，选择酶时一般要求达到以下标准：①酶必须无毒且具有较高的催化活性；②具有高的稳定性，标记的抗原（或抗体）后仍具活性；③具有高的转换率，且检测方法简便，可以采用光吸收法或荧光法；④价廉易得且待测液中没有干扰酶活性测定的因素。

常用的商品化酶中主要有辣根过氧化物酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、溶菌酶、葡萄糖淀粉酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、苹果酸脱氢酶等。目前在进行酶标免疫分析时一般选用辣根过氧化物酶。因为该酶既可以标记抗原，又可以标记抗体。

一般情况下选用辣根过氧化物酶，能够选择的底物主要有过氧化物和供氢体，过氧化物中目前较为常用的是过氧化氢和过氧化氢尿素。过氧化氢不稳定，只能在使用前临时配制，而过氧化氢尿素相对比较稳定，可保存较长时期，因此近年来过氧化氢尿素得到了普遍的使用。供氢体的种类相对来说比较多，可以根据实际的需要来选择。

### 2. 酶标记物的制备

酶标记物的制备是指将酶通过具有双功能或多功能化学基团的交联剂结合到抗原或抗体分子上，或将酶分子氧化产生活性基团，再与抗原或抗体结合的过程。实验室常用的交联剂主要有戊二醛、过碘酸钠、氰尿酸氯等，其中最常用的为戊二醛和过碘酸钠。

选择的酶标记方法必须满足不影响酶活性和免疫活性、操作简便、产量高、形成的产品稳定等条件。现在最常用的交联法是过碘酸钠交联法和戊二醛交联法。过碘酸钠交联的原理是过碘酸首先氧化酶蛋白上的糖基，生成醛基后再与抗原或抗体上的氨基反应，过碘酸钠的交联主要作用于糖蛋白酶，如过氧化物酶等。戊二醛交联的方式有两种：一种是一步法，即直接向酶与抗原（或抗体）蛋白的混合液中滴加戊二醛，此法已广泛用于碱性磷酸酶等的标记；另一种为两步法，即先向酶溶液中加入戊二醛溶液，然后再洗去多余的戊二醛，最后再加入抗原（或抗体）蛋白进行交联反应。一步法方法简单，但对不同酶的交联效果差别很大，常用于碱性磷酸酶的标记，但不适合用于辣根过氧化物酶的标记。

下面介绍两种比较常用的酶标记物的制备方法。

### (1) 戊二醛交联法标记碱性磷酸酶

① 材料与试剂 0.01mol/L 的 PBS 溶液 (pH7.2)、2.5 % 的戊二醛溶液、0.05mol/L 的 Tris-HCl 溶液 (pH 8.0)、60% 的中性甘油溶液、碱性磷酸酶。

② 操作步骤 称取 5mg 碱性磷酸酶溶于 1mL 抗体溶液中, 在 PBS 溶液中透析 24h, 每 4h 换一次透析液, 加入 20 $\mu$ L 2.5 % 的戊二醛溶液, 室温下静置 2h; 继续在 PBS 溶液中透析 12h, 每 4h 换一次透析液; 在 0.05mol/L 的 Tris-HCl 溶液 (pH8.0) 中透析 12h, 每 4h 换一次透析液; 用含 1% BSA 的 Tris-HCl 溶液 (pH8.0) 稀释碱性磷酸酶溶液至 4mL 左右。

### (2) 过碘酸钠法标记辣根过氧化物酶

① 材料与试剂 0.1mol/L 的过碘酸钠溶液; 0.001mol/L pH 4.4 的乙酸钠缓冲液; 0.2mol/L pH 9.5 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 缓冲液; 4mg/mL 硼氢化钠溶液, 用时现配; 0.1mol/L pH 7.4 的硼酸盐缓冲液; 用硼酸盐缓冲液配置 60% 的中性甘油。

② 操作步骤 称取 2mg 辣根过氧化物酶溶于 1mL 蒸馏水中, 加入 200 $\mu$ L 过碘酸钠溶液, 室温搅拌 20min; 用乙酸钠缓冲液 4 $^{\circ}$ C 透析过夜; 加入 20 $\mu$ L 0.2mol/L pH 9.5 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 缓冲液, 使溶液的 pH9~9.5, 立即加入 1mL (2mg) 待标记的抗原或抗体蛋白, 室温下放置 2h; 加入 100 $\mu$ L 的硼氢化钠溶液, 4 $^{\circ}$ C 放置 2h; 4 $^{\circ}$ C 用硼酸盐缓冲液透析 24h; 加入等量的中性甘油溶液, -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

### 3. 测定

酶标免疫分析的准确度和多种因素有关, 一般情况下, 它的准确度和放射免疫分析法相当。精确度因测定方法和测定范围而不同, 灵敏度则取决于实验条件与测定方法。通常酶标免疫分析测定时首先采用标准抗原或抗体, 在确定的反应条件下制备一条标准曲线。标准抗体可采用高效价混合血清, 抗原则需要经过充分纯化。图 10-18 分别为采用竞争法和其他方法测得的标准曲线。

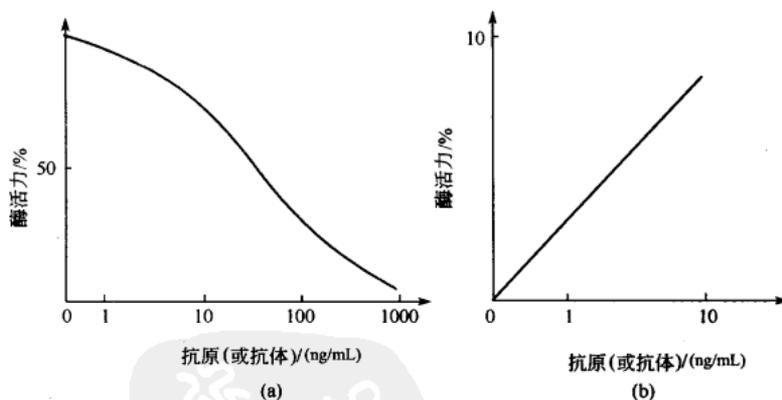


图 10-18 采用竞争法和其他方法测得的标准曲线  
(a) 竞争法; (b) 其他方法

## 六、测定实例

下面将分别介绍两种酶免疫分析方法——竞争法和免疫酶斑点法的具体操作步骤。

### (一) 竞争法

#### 1. 实验材料与试剂

- ① 仪器与设备：酶标板、移液器、血清稀释板、培养箱、冰箱、酶标仪等。
  - ② 包被稀释液：pH 9.6、50mmol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液。
  - ③ 封闭液：5% BSA/PBS 溶液。
  - ④ 洗涤液：NaCl 8.0g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.9g、KCl 0.2g，用双蒸水定容至 1000mL，调节 pH 7.4。
  - ⑤ 样品稀释液（PBS，pH 7.4）：NaCl 8.0g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.9g、KCl 0.2g，用双蒸水定容至 1000mL，调节 pH 7.4。
  - ⑥ 酶标第二抗体或其代用品（酶标 SPA）。
  - ⑦ 底物溶液（TMB-过氧化氢尿素溶液）。
- 底物溶液 A：3,3',5,5'-四甲基联苯胺二盐酸（TMB）200mg、无水乙醇 100mL，双蒸水定容至 1000mL。
- 底物溶液 B：Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.6g、柠檬酸 9.33g、0.75% 过氧化氢尿素 6.4mL，加蒸馏水至 1000mL，调节 pH 5.0~5.4。

TMB-过氧化氢尿素应用液：A 液与 B 液按 1:1 混合。

- ⑧ 终止液：2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液。
  - ⑨ 酶标记抗原：直接购买。
- ## 2. 实验步骤
- ① 将包被稀释液适当稀释特异性抗体后包被酶标反应板，每孔 100 $\mu$ L，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后，用洗涤液洗 3 次，每次 3min。
  - ② 每孔加入 200 $\mu$ L 封闭液，在 37 $^{\circ}$ C 下封闭酶标板 1h，然后用洗涤液洗 3 次，每次 3min。
  - ③ 每孔中加入适当稀释后的样品 50 $\mu$ L，然后再加入 50 $\mu$ L 一定浓度的酶标抗原，对照样品的孔中加入 50 $\mu$ L 的样品稀释液和 50 $\mu$ L 的酶标抗原，37 $^{\circ}$ C 下孵育 40min，然后用洗涤液洗 3 次，每次 3min。
  - ④ 每孔中加入 100 $\mu$ L 底物应用液，37 $^{\circ}$ C 下避光显色 10~20min，当对照孔出现明显颜色时，每孔中加入 50 $\mu$ L 终止液。
  - ⑤ 在终止后的 20min 内用酶标仪测定酶标板各孔的 OD 值。

## 3. 结果判断

- ① 在进行精确的定量测定时，需要用已知浓度的抗原样品稀释不同的倍数检测，按各孔测定的 OD 值与对照孔 OD 值的比值绘制标准曲线，然后根据标准曲线和待测样品的 OD 值计算出待测样品的抗原含量。
- ② 各测定孔显色的深度与待测样品中抗原的含量成正比，如果测定只需要判断阴性或阳性结果，一般按待测样品孔 OD 值与对照孔 OD 值的比值表示，当比值小于一特定数值时判断为阳性。判断比值标准的大小主要决定于对照孔中加入的酶标记抗原的浓度，一般通过调节酶标记抗原的浓度，使判断标准比值在 0.3~0.8 为最适。

## (二) 免疫酶斑点法

### 1. 实验材料与试剂

- ① 稀释液：10% 牛血清溶液（用 10mmol/L pH 7.4 PBS 溶液配制）。
- ② 封闭液：2% 的牛血清白蛋白溶液（用 10mmol/L pH 7.4 PBS 溶液配制）。
- ③ 洗涤液：含有 0.5% Tween 20 的 10mmol/L pH 7.4 PBS 溶液。
- ④ 底物溶液：供辣根过氧化物酶标记时使用，以 4-氯-1-萘酚为底物。500mg 4-氯-1-萘酚溶于 16mL 冷甲醇中，先加入 10mmol/L pH 7.4 PBS 溶液，再加入 50 $\mu$ L 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，

试剂用时临时配制。

## 2. 操作步骤

- ① 取硝酸纤维素膜，用铅笔做好加样方格（5mm×5mm）。
- ② 将膜浸入 10mmol/L pH 7.4 PBS 溶液中 30min 后，取出用滤纸吸干。
- ③ 将要包被的抗原或抗体用 10mmol/L pH 7.4 PBS 溶液稀释至 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- ④ 每个小方格内加入 0.1~0.2 $\mu\text{L}$  的稀释好的样品，室温自然干燥。
- ⑤ 将膜放入封闭液中振荡封闭 30min。
- ⑥ 将膜用洗涤液洗涤 3 次，每次 3min。
- ⑦ 将膜用滤纸吸干，浸入到适当稀释的待检样品中，室温下振荡 30~40min。
- ⑧ 将膜用洗涤液洗涤 3 次，每次 3min。
- ⑨ 将膜片放入酶标记抗体溶液中，室温下振荡 30min。
- ⑩ 将膜用洗涤液洗涤 4 次，每次 3min。
- ⑪ 将膜片浸入底物溶液中，在振荡条件下显色。一般 15min 左右显色充分。
- ⑫ 用流水冲洗 5min 后，将膜片放入蒸馏水中终止反应。

## 3. 结果判断

① 在进行精确的定量测定时，需要用已知浓度的抗原样品稀释不同的倍数检测，按各孔测定的 OD 值绘制标准曲线，然后根据标准曲线和待测样品的 OD 值计算出待测样品的抗原含量。

② 如果测定只需要判断阴性或阳性结果，可根据有无显色反应来判断结果是阳性或是阴性。

## 参 考 文 献

- 1 陈石根，周润琦编著. 酶学. 上海：复旦大学出版社，2001
- 2 汪家政，范明主编. 蛋白质技术手册. 北京：科学出版社，2000
- 3 杨建雄主编. 生物化学与分子生物学实验技术教程. 北京：科学出版社，2002
- 4 历朝龙主编. 生物化学与分子生物学实验技术. 杭州：浙江大学出版社，2000
- 5 陶慰孙，李维，姜涌明主编. 蛋白质分子基础. 北京：高等教育出版社，1995
- 6 朱立平，陈学清主编. 免疫学常用实验方法. 北京：人民军医出版社，2000



# 附录 1 常用酶的检测方法

## 一、 $\alpha$ -淀粉酶活力测定

### (一) 分光光度法 (第一法)

#### 1. 原理

$\alpha$ -淀粉酶能将淀粉分子链中的  $\alpha$ -1,4-糖苷键随机切断成长短不一的短链糊精、少量麦芽糖和葡萄糖,而使淀粉对碘呈蓝黑色的特异性反应逐渐消失,渐变成红棕色。蓝黑色消失的速率与酶活性有关,故可在标准条件下,通过测定反应后溶液的吸收值计算其酶活力。

#### 2. 试剂和溶液

(1) 原碘液 称取分析纯结晶碘 11g,分析纯碘化钾 22g,先用少量蒸馏水使碘完全溶解后,再加蒸馏水定容至 500mL 贮于棕色瓶内。

(2) 稀碘液 取原碘液 2mL,加碘化钾 20g,加蒸馏水溶解定容至 500mL,贮于棕色瓶内(需当天配制)。

(3) 2%可溶性淀粉 称取 2.0000g 可溶性淀粉(以绝干计),用少量蒸馏水混合调匀,徐徐倾入煮沸的蒸馏水中,加热煮沸至透明为止,冷却定容至 100mL。此溶液当天配制使用。

(4) 0.02mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 (pH6.0) 称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 45.23g 和柠檬酸 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 8.07g,用蒸馏水溶解定容至 1000mL,配好后应以酸度计校正 pH6.0。

(5) 0.1mol/L 盐酸溶液 按 QB601 配制。

#### 3. 仪器和设备

- ① 分光光度计。
- ② 恒温水浴, 50~100℃, 精度  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 。
- ③ 试管, 25mm $\times$ 200mm。
- ④ 容量瓶。
- ⑤ 自动吸管。
- ⑥ 秒表。

#### 4. 待测酶液的制备

(1) 液体酶制剂 直接用 0.02mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 (pH6.0) 配制,使最终酶液浓度控制在 65~70U/mL 范围内。

(2) 固体酶制剂 称取酶粉 1~2g,精确至 0.0002g。先用少量磷酸缓冲液溶解,并用玻璃棒捣研(或用磁力搅拌器搅拌),直至固体全部溶解(10~15min),将上清液倾入容量瓶中,沉渣部分再加入少量缓冲液,如此捣研 3~4 次,最后全部移入容量瓶中,用缓冲液稀释至刻度(使酶浓度控制在 65~70U/mL 范围内),摇匀。通过 4 层纱布过滤,收集滤液供测定用。

#### 5. 测定

① 吸取可溶性淀粉溶液 20.0mL 和磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 (pH6.0) 5.0mL 于试管中,在 70℃ 恒温水浴中预热平衡 5min。

② 加入稀释好的待测酶液 1.0mL，立即用秒表记录时间，摇匀，准确反应 5min。

③ 立即用自动吸管吸取反应液 1.00mL，加到预先盛有 0.1mol/L 盐酸 0.5mL 和稀碘液 5.00mL 的试管中，摇匀。

④ 以 0.1mol/L 盐酸 0.5mL 和稀碘液 5.00mL 的混合液作为试剂空白，于 660nm 波长下，用 10mm 比色皿迅速测定其吸光度 (A)。根据吸光度查附表 1，求得测试酶液的浓度 (c)。

#### 6. 计算

$$X = c \times n \times 16.67$$

式中，X 为样品的酶活力，U/mL 或 U/g；c 为测试酶的浓度，U/mL；n 为样品的稀释倍数；16.67 为换算系数。

所得结果精确至整数。

#### 7. 结果的允许差

平行试验相对误差不得超过 2%。

### (二) 目视比色法 (第二法)

#### 1. 原理

同分光光度法。

#### 2. 试剂和溶液

(1) 原碘液 同分光光度法。

(2) 稀碘液 同分光光度法。

(3) 2% 可溶性淀粉 同分光光度法。

(4) 0.02mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 (pH6.0) 同分光光度法。

(5) 标准终点色溶液

A 液：称取分析纯氯化钴 ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2439g 和分析纯重铬酸钾 0.4878g，以蒸馏水溶解定容至 500 mL。

B 液：称取铬黑 T ( $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}$ ) 40mg，以蒸馏水溶解定容至 100mL。

使用时取 A 液 40mL 与 B 液 5.0mL 混合。此混合液宜冰箱保存，使用 15 天后需要重新配制。

#### 3. 仪器和设备

① 恒温水浴，50~100°C，精度 ±0.1°C。

② 容量瓶。

③ 试管，25mm×200mm。

④ 秒表。

#### 4. 测定方法

(1) 待测酶液的制备 直接用 0.02mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 配制，最终酶液浓度需控制在 300~350 U/mL 范围内。

(2) 测定 取 2mL 标准终点色溶液于白瓷板空穴内，作为比较颜色的标准。取 2% 可溶性淀粉 20mL 和 pH6.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 5mL 放于 25mm×200mm 试管中，在 60°C 恒温水浴中预热 4~5min。然后加入预先稀释好的酶液 0.5mL，立即记录时间，充分摇匀，定时用吸管取出反应液 0.5mL，滴于预先充满比色稀碘液 (约 1.5mL) 的白瓷板空穴内，当穴内颜色反应由紫色逐渐变为红棕色，恰与标准终点色相同时，即为反应终点，并记录时间 (min)。

注：① 酶反应全部时间控制在 2~2.5min 之内。

② 测定时照明采用 40W 日光灯，灯与瓷板的间距应为 60cm 左右为宜。

③ 白瓷板可用 10mL 比色管代替。

### 5. 计算

酶单位活力可用 1g 酶粉或 1mL 酶液于 60℃、pH6.0 条件下, 以 1h 液化可溶性淀粉的质量 (g) 来表示 [g 可溶性淀粉/(g·h) 或 g 可溶性淀粉/(mL·h)]。

$$X = \frac{60 \times 20 \times 2\% \times n}{T \times 0.5}$$

式中, X 为酶活力单位, U/g; n 为稀释倍数; T 为测定时记录时间, min; 60 为时间, min; 20 为可溶性淀粉的体积, mL; 2% 为淀粉浓度; 0.5 为测定时稀酶液用量, mL。

附表 1 吸光度与测试 α-淀粉酶浓度对照表

吸光度(A)	酶浓度(c) /(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c) /(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c) /(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c) /(U/mL)
0.100	4.694	0.139	4.497	0.178	4.310	0.217	4.144
0.101	4.689	0.140	4.492	0.179	4.306	0.218	4.140
0.102	4.684	0.141	4.487	0.180	4.301	0.219	4.136
0.103	4.679	0.142	4.482	0.181	4.297	0.220	4.132
0.104	4.674	0.143	4.477	0.182	4.292	0.221	4.128
0.105	4.669	0.144	4.472	0.183	4.288	0.222	4.124
0.106	4.664	0.145	4.467	0.184	4.283	0.223	4.120
0.107	4.659	0.146	4.462	0.185	4.279	0.224	4.116
0.108	4.654	0.147	4.457	0.186	4.275	0.225	4.112
0.109	4.649	0.148	4.452	0.187	4.270	0.226	4.108
0.110	4.644	0.149	4.447	0.188	4.266	0.227	4.105
0.111	4.639	0.150	4.442	0.189	4.261	0.228	4.101
0.112	4.634	0.151	4.438	0.190	4.257	0.229	4.097
0.113	4.629	0.152	4.433	0.191	4.253	0.230	4.093
0.114	4.624	0.153	4.428	0.192	4.248	0.231	4.089
0.115	4.619	0.154	4.423	0.193	4.244	0.232	4.085
0.116	4.614	0.155	4.418	0.194	4.240	0.233	4.082
0.117	4.609	0.156	4.413	0.195	4.235	0.234	4.078
0.118	4.604	0.157	4.408	0.196	4.231	0.235	4.074
0.119	4.599	0.158	4.404	0.197	4.227	0.236	4.070
0.120	4.594	0.159	4.399	0.198	4.222	0.237	4.067
0.121	4.589	0.160	4.394	0.199	4.218	0.238	4.063
0.122	4.584	0.161	4.389	0.200	4.214	0.239	4.059
0.123	4.579	0.162	4.385	0.201	4.210	0.240	4.056
0.124	4.574	0.163	4.380	0.202	4.205	0.241	4.052
0.125	4.569	0.164	4.375	0.203	4.201	0.242	4.048
0.126	4.564	0.165	4.370	0.204	4.197	0.243	4.045
0.127	4.559	0.166	4.366	0.205	4.193	0.244	4.041
0.128	4.554	0.167	4.361	0.206	4.189	0.245	4.037
0.129	4.549	0.168	4.356	0.207	4.185	0.246	4.034
0.130	4.544	0.169	4.352	0.208	4.181	0.247	4.030
0.131	4.539	0.170	4.347	0.209	4.176	0.248	4.026
0.132	4.534	0.171	4.342	0.210	4.172	0.249	4.023
0.133	4.529	0.172	4.338	0.211	4.168	0.250	4.019
0.134	4.524	0.173	4.333	0.212	4.164	0.251	4.016
0.135	4.518	0.174	4.329	0.213	4.160	0.252	4.012
0.136	4.513	0.175	4.324	0.214	4.156	0.253	4.009
0.137	4.507	0.176	4.319	0.215	4.152	0.254	4.005
0.138	4.502	0.177	4.315	0.216	4.148	0.255	4.002

续表

吸光度(A)	酶浓度(c) /(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c) /(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c) /(U/mL)	吸光度(A)	酶浓度(c) /(U/mL)
0.256	3.998	0.293	3.891	0.330	3.779	0.367	3.673
0.257	3.995	0.294	3.888	0.331	3.776	0.368	3.670
0.258	3.991	0.295	3.885	0.332	3.774	0.369	3.668
0.259	3.988	0.296	3.881	0.333	3.771	0.370	3.665
0.260	3.984	0.297	3.878	0.334	3.768	0.371	3.662
0.261	3.981	0.298	3.875	0.335	3.765	0.372	3.659
0.262	3.977	0.299	3.872	0.336	3.762	0.373	3.656
0.263	3.974	0.300	3.869	0.337	3.759	0.374	3.654
0.264	3.971	0.301	3.866	0.338	3.756	0.375	3.651
0.265	3.968	0.302	3.863	0.339	3.753	0.376	3.648
0.266	3.964	0.303	3.860	0.340	3.750	0.377	3.645
0.267	3.961	0.304	3.857	0.341	3.747	0.378	3.643
0.268	3.958	0.305	3.854	0.342	3.744	0.379	3.640
0.269	3.954	0.306	3.851	0.343	3.741	0.380	3.637
0.270	3.951	0.307	3.848	0.344	3.739	0.381	3.634
0.271	3.948	0.308	3.845	0.345	3.736	0.382	3.632
0.272	3.944	0.309	3.842	0.346	3.733	0.383	3.629
0.273	3.941	0.310	3.839	0.347	3.730	0.384	3.626
0.274	3.938	0.311	3.836	0.348	3.727	0.385	3.623
0.275	3.935	0.312	3.833	0.349	3.724	0.386	3.621
0.276	3.932	0.313	3.830	0.350	3.721	0.387	3.618
0.277	3.928	0.314	3.827	0.351	3.718	0.388	3.615
0.278	3.925	0.315	3.824	0.352	3.716	0.389	3.612
0.279	3.922	0.316	3.821	0.353	3.713	0.390	3.610
0.280	3.919	0.317	3.818	0.354	3.710	0.391	3.607
0.281	3.916	0.318	3.815	0.355	3.707	0.392	3.604
0.282	3.914	0.319	3.812	0.356	3.704	0.393	3.602
0.283	3.913	0.320	3.809	0.357	3.701	0.394	3.599
0.284	3.911	0.321	3.806	0.358	3.699	0.395	3.596
0.285	3.909	0.322	3.803	0.359	3.696	0.396	3.594
0.286	3.908	0.323	3.800	0.360	3.693	0.397	3.591
0.287	3.906	0.324	3.797	0.361	3.690	0.398	3.588
0.288	3.905	0.325	3.794	0.362	3.687	0.399	3.585
0.289	3.903	0.326	3.791	0.363	3.684	0.400	3.583
0.290	3.900	0.327	3.788	0.364	3.682	0.401	3.580
0.291	3.897	0.328	3.785	0.365	3.679	0.402	3.577
0.292	3.894	0.329	3.782	0.366	3.676		

## 二、糖化酶活力测定

糖化型淀粉酶（即淀粉 $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶）有催化淀粉水解的作用，从淀粉分子非还原性末端开始，分解 $\alpha$ -1,4-糖苷键生成葡萄糖，葡萄糖分子中含有醛基，能被次碘酸钠氧化，过量的次碘酸钠酸化后析出碘，再用硫代硫酸钠标准溶液滴定，计算出酶活力。

### 1. 试剂和溶液

(1) 0.1mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH4.6) 称取乙酸钠 ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 6.7g 和冰乙酸 ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 2.6mL, 用蒸馏水溶解, 定容至 1000mL。上述缓冲液应以酸度计或精密试纸校正 pH 值。

(2) 0.1 mol/L 硫代硫酸钠溶液

① 配制 称取硫代硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 24.82g 和硫酸钠 0.2g, 溶于煮沸后冷却的蒸馏水中, 定容至 1000mL, 即得 0.1mol/L 硫代硫酸钠溶液。贮于棕色瓶中密封保存, 配制后应放置 1 周标定使用。0.05mol/L 溶液则用蒸馏水稀释制得。

② 标定 取在 120℃ 下干燥至恒重的标准重铬酸钾 0.25g, 精密称量。置碘量瓶中, 加水 50mL 使溶解, 加碘化钾 2g。轻轻振摇使溶解, 加 1mol/L 硫酸溶液 40mL 摇匀, 密塞。在暗处放置 10min 后用蒸馏水 250mL 稀释, 用此液滴定至近终点时, 加淀粉指示液 3mL, 继续滴定至蓝色消失而显亮绿色, 并将滴定的结果用空白试验校正。1mL 的 0.1mol/L 硫代硫酸钠液相当于 4.903mg 重铬酸钾。根据本液的消耗量与重铬酸钾的用量, 计算硫代硫酸钠的浓度。本溶液需每月标定一次。

(3) 0.1mol/L 碘液 称取碘化钾 (KI) 36g, 溶解在 100mL 蒸馏水中, 再加入碘 ( $\text{I}_2$ ) 12.98g 溶解, 定容至 1000mL, 贮存于棕色瓶中。

用标准的 0.05mol/L 硫代硫酸钠溶液标定碘液。

吸取 10mL 待标定的碘液放入 250mL 碘量瓶中, 以 0.05mol/L 硫代硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 溶液滴定至淡黄色时, 加入 1% 淀粉指示剂 2~3 滴, 继续滴定至无色为终点。

$$N = \frac{N_1 V_1}{2V}$$

式中,  $N$  为碘的浓度, mol/L;  $N_1$  为硫代硫酸钠的浓度, mol/L;  $V_1$  为消耗硫代硫酸钠的体积, mL;  $V$  为碘液体积, mL。

(4) 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 称取 4g 氢氧化钠 (NaOH), 加蒸馏水溶解, 定容至 1000mL。

(5) 1mol/L 硫酸溶液 量取浓硫酸 5.6mL, 慢慢加入于 80mL 蒸馏水中, 冷却后定容至 100mL, 摇匀。

(6) 20% 氢氧化钠溶液 称取 20g 氢氧化钠, 溶解定容至 100mL。

(7) 2% 可溶性淀粉 称取可溶性淀粉 2g, 然后用少量蒸馏水调匀, 徐徐倾入已沸的蒸馏水中, 煮沸至透明, 冷却定容至 100mL, 此溶液需当天配制。采用浙江菱湖食品化工联合公司生产的可溶性淀粉。

## 2. 仪器和设备

① 恒温水浴, 40℃ ± 0.2℃。

② 秒表。

③ 比色管, 50mL。

## 3. 测定方法

### (1) 待测酶液的制备

① 固体酶 称取定量酶粉 (取样量和稀释倍数见附表 2), 精确至 0.0009, 先用少量乙酸-乙酸钠缓冲液溶解, 用玻璃棒捣研, 将上清液小心倾入容量瓶中, 沉渣部分再加入少量缓冲液, 如此捣研 3~4 次, 最后全部转入容量瓶中, 用缓冲液定容至刻度 (估计酶活力, 按附表 2 相对应稀释倍数, 使酶活力在 100~250U/g 范围内), 摇匀, 通过 4 层纱布, 滤液供测定使用。

② 液体酶 精确吸取定量酶液 (取样量和稀释倍数见附表 2), 于已放置乙酸-乙酸钠缓冲液的容量瓶中, 将移液管用缓冲液洗涤 2~3 次, 定容, 待测定。

(2) 测定 于甲、乙两支 50mL 具塞比色管中, 分别加入 2% 可溶性淀粉溶液 25mL 及 0.1mol/L pH4.6 的乙酸-乙酸钠缓冲液 5mL, 摇匀, 40℃ 的恒温水浴中预热 (5~10min)。在甲

附表 2

估计酶活力 / (U/g) 或 (U/mL)	稀释倍数	估计酶活力 / (U/g) 或 (U/mL)	稀释倍数
200~1000	2~5	10000~30000	50~200
1000~3000	5~20	30000~60000	200~300
3000~6000	20~30	60000~90000	300~500
6000~10000	30~50		

管(样品)中加入酶样液 2mL, 立即记时间, 摇匀。在此温度下准确反应 30min 后, 立即各加 20% NaOH 溶液 0.2mL, 摇匀, 将两管取出迅速用水冷却, 并于乙管中补加酶液 2mL。

取上述反应液 5mL 放入碘量瓶中, 准确加入 0.1mol/L 碘液 10mL, 再加入 0.1mol/L 氢氧化钠 15mL (边摇晃)。暗处放置 15min, 加入 1mol/L 硫酸 2mL, 用 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定, 直至蓝色刚好消失为其终点。

#### 4. 计算

糖化酶活力单位的定义: 在 40℃、pH4.6 的条件下, 1h 水解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个糖化酶活力单位。

$$X = (A - B)c \times 90.05 \times \frac{1}{2} \times \frac{32.2}{5} \times n \times 2$$

$$= 579.9 (A - B)cn$$

式中,  $X$  为样品的酶活力, U/g 或 U/mL;  $A$  为空白所消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积, mL;  $B$  为样品所消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积, mL;  $c$  为硫代硫酸钠标准溶液的浓度, mol/L; 90.05 为 1mL 1mol/L 硫代硫酸钠所相当的葡萄糖质量, mg;  $1/2$  为吸取酶液 2.00mL, 以 1.00mL 计; 32.2 为反应液的总体积, mL; 5 为吸取反应液的体积, mL;  $n$  为稀释倍数; 2 为反应 30min, 换算成 1h 的酶活力系数。

所得的结果精确至整数。

#### 5. 结果的允许差

平行试验相对误差不得超过 2%。

### 三、蛋白酶活力测定

蛋白酶活力单位定义: 在一定温度和 pH 值条件下, 每分钟水解酪蛋白释放  $1\mu\text{g/g}$  酪氨酸的酶量定义为 1 个蛋白酶单位, 以 U/g 或 U/mL 表示。

#### (一) 福林法 (第一法)

福林试剂 (磷钼酸与磷钨酸混合物) 在碱性情况下极不稳定, 可被酚类化合物还原而呈蓝色反应 (钼蓝和钨蓝的混合物), 由于蛋白质分子中有含有酚基的氨基酸 (如酪氨酸、色氨酸及苯丙氨酸等), 它使蛋白质或其水解产物也呈这个反应, 于是就可利用这个原理来测定蛋白酶活力的强弱。即以酪蛋白为作用底物, 在一定 pH 值与温度条件下, 同酶液反应, 经一定时间后, 加入三氯乙酸, 以终止酶反应, 并使残余的酪蛋白质沉淀, 同水解产物分开, 经过滤后取滤液 (即含蛋白水解产物的三氯乙酸液)。用碳酸钠碱化, 再加入福林试剂使之发色, 用分光光度计或光电比色计测定。蓝色反应的强弱, 同三氯乙酸中蛋白水解产物的多少成正比, 而水解产物的量又是同酶活力成正比例关系。因此, 根据蓝色反应的强弱就可推测蛋白酶的活力。

#### 1. 试剂和溶液

(1) 福林试剂 于 2000mL 磨口回流装置内加入钨酸钠 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 100g, 钼酸钠 ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 25g, 蒸馏水 700mL, 85% 磷酸 50mL, 浓盐酸 1000mL, 文火回

流 10h。取下回流冷却器，在通风橱中加入硫酸锂 ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ) 50g，蒸馏水 50mL，混匀，加入几滴浓溴水 (99%)，再煮沸 15min，以驱逐残溴及除去颜色，溶液应呈黄色而非绿色。若溶液仍有绿色，需再滴加溴液，再煮沸除去之。冷却后，定容至 1000mL。混匀，4~5 号细菌漏斗过滤，制得的试剂应呈金黄色，贮存于棕色瓶中。

使用溶液：1 份福林试剂与 2 份蒸馏水混合，摇匀。

(2) 0.4mol/L 碳酸钠溶液 称取无水碳酸钠 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 42.4g，用蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

(3) 0.4mol/L 三氯乙酸 ( $\text{CCl}_3 \cdot \text{COOH}$ ) 溶液 称取三氯乙酸 65.4g，用蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

(4) 0.5mol/L 氢氧化钠溶液 按 GB 601 配制。

(5) 1mol/L 及 0.1mol/L 盐酸溶液 按 GB 601 配制。

(6) 缓冲溶液

① 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 适用于中性蛋白酶。称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 6.02g 和磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.5g，加蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

② 0.05mol/L 乳酸-乳酸钠缓冲液 (pH2.5) 适用于酸性蛋白酶。

A 液：称取 10.6g 80%~90% 乳酸，加蒸馏水定容至 1000mL。

B 液：称取 16g 70% 乳酸钠，加蒸馏水定容至 1000mL。

取 A 液 16mL 与 B 液 1mL，稀释 1 倍即成 0.05mol/L pH2.5 乳酸-乳酸钠缓冲液。

③ 0.05mol/L 硼酸缓冲液 (pH10.5) 适用于碱性蛋白酶。

A 液：称取硼酸钠 (硼砂) 19.08g，加蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

B 液：称取氢氧化钠 4.0g，加蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

使用溶液：取 A 液 500mL、B 液 400mL 混匀，用蒸馏水稀释定容至 1000mL。上述各种缓冲溶液，均需用 pH 计校正。

(7) 1% 酪蛋白溶液 称取干酪素 1.000g，精确至 0.001g，用少量 0.5mol/L 氢氧化钠溶液 (酸性蛋白酶则用浓乳酸 2~3 滴) 湿润后，加入适量的各种适宜 pH 值的缓冲液约 80mL，在沸水浴中边加热边搅拌，直至完全溶解，冷却后转入 100mL 容量瓶中，用适宜的缓冲液稀释定容至刻度。此溶液配成后应及时使用或放入冰箱内保存，以免繁殖细菌而变质，有效期为 3 天。

(8) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  酪氨酸标准溶液 精确称取在 105 $^\circ\text{C}$  烘箱中烘至恒重的酪氨酸 0.1000g，精确至 0.0002g，用 1mol/L 盐酸 (HCl) 60mL 溶解后定容至 100mL，即为 1mg/mL 酪氨酸标准溶液。

吸取 1mg/mL 酪氨酸标准溶液 10.00mL，用 0.1mol/L 盐酸溶液定容至 100mL，即得到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  酪氨酸标准溶液。此溶液配成后也应及时使用或放入冰箱内保存，以免繁殖细菌而变质。

## 2. 仪器和设备

(1) 恒温水浴 40 $^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ 。

(2) 分光光度计 应符合 GB 9721 的规定。

## 3. 测定方法

(1) 标准曲线的绘制 按附表 3 配制各种不同浓度的酪氨酸溶液。

分别取上述溶液各 1.00mL (需做平行试验)，各加 0.4mol/L 碳酸钠溶液 5.00mL、福林试剂使用溶液 1.00mL，置于 40 $^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$  水浴中显色 20min，取出，用 10mm 比色皿，以不含

附表 3 酪氨酸溶液浓度

管号	酪氨酸标准溶液的浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	取 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 酪氨酸标准 溶液的体积/ $\text{mL}$	加入水的体积 / $\text{mL}$
0	0	0	10
1	10	1	9
2	20	2	8
3	30	3	7
4	40	4	6
5	50	5	5

酪氨酸的 0 管为空白, 用分光光度计于波长  $680\text{nm}$  分别测定其吸光度。以吸光度  $A$  为纵坐标, 酪氨酸的浓度  $c$  为横坐标, 绘制标准曲线 (此线应通过零点)。

根据作图或用回归方程, 计算出当吸光度为 1 时的酪氨酸的量 ( $\mu\text{g}$ ), 即为吸收常数  $K$  值。其  $K$  值应在  $95\sim 100$  范围内。

## (2) 测定

### ① 待测酶液的制备

a. 称取酶粉  $1\sim 2\text{g}$ , 精确至  $0.0002\text{g}$  (或吸取液体酶  $1.00\text{mL}$ ), 用少量该酶的缓冲液溶解, 并用玻璃棒捣研, 然后将上清液小心倾入容量瓶中, 沉渣中再添加少量上述缓冲液再次溶解、捣研  $3\sim 4$  次, 最后全部移入容量瓶中, 用缓冲液定容至刻度, 摇匀。用 4 层纱布过滤, 滤液根据酶活力再一次用缓冲液稀释至适当浓度 (稀释至被测试液吸收值在  $0.25\sim 0.40$  范围内), 供测试用。

b. 酶粉 (或液体酶) 测定时, 稀释倍数参考附表 4。

附表 4

酶活力单位/ $U$	总 倍 数	第一次稀释	第二次稀释
20000	2000	$2\text{g}(\text{mL})\rightarrow 200\text{mL}(100\text{倍})$	$5\text{mL}\rightarrow 100\text{mL}(20\text{倍})$
30000	2500	$2\text{g}(\text{mL})\rightarrow 500\text{mL}(250\text{倍})$	$5\text{mL}\rightarrow 50\text{mL}(10\text{倍})$
40000	4000	$2\text{g}(\text{mL})\rightarrow 200\text{mL}(100\text{倍})$	$5\text{mL}\rightarrow 200\text{mL}(40\text{倍})$
50000	5000	$2\text{g}(\text{mL})\rightarrow 500\text{mL}(250\text{倍})$	$5\text{mL}\rightarrow 100\text{mL}(20\text{倍})$
$80000\sim 100000$	10000	$2\text{g}(\text{mL})\rightarrow 500\text{mL}(250\text{倍})$	$5\text{mL}\rightarrow 200\text{mL}(40\text{倍})$

② 测定 取 4 支试管, 分别加入  $1\text{mL}$  稀释酶液, 其中一支为空白管, 3 支为平行试验管。置入  $40^\circ\text{C}$  水浴中预热  $3\sim 5\text{min}$ , 在 3 支平行试验管中分别加入  $1\text{mL}$   $1\%$  酪蛋白溶液, 准确计时保温  $10\text{min}$ 。立即加入  $2\text{mL}$   $0.4\text{mol/L}$  三氯乙酸溶液,  $15\text{min}$  后用滤纸过滤。分别吸取  $1\text{mL}$  清液, 加  $5\text{mL}$   $0.4\text{mol/L}$  碳酸钠溶液, 最后加入  $1\text{mL}$  福林使用液, 摇匀, 于  $40^\circ\text{C}$  水浴中显色  $20\text{min}$ 。

空白管中先加入  $2\text{mL}$   $0.4\text{mol/L}$  三氯乙酸溶液, 再加  $1\text{mL}$   $1\%$  酪蛋白溶液,  $15\text{min}$  后用滤纸过滤。以下操作与平行试验管相同。

空白管为对照, 在  $680\text{nm}$  波长, 用  $10\text{mm}$  比色皿测其吸光度, 取其平均值。

## 4. 计算

$$X = K \times \text{OD} \times \frac{4}{10} \times N \times \frac{1}{W}$$

式中,  $X$  为样品的酶活力,  $U/\text{g}$  或  $U/\text{mL}$ ;  $K$  为标准曲线中  $\text{OD}$  值为 1 时所相当的酪氨酸的质量,  $\mu\text{g}$ ;  $\text{OD}$  为样品平行试验管的平均吸光度; 4 为试管中反应液总体积,  $\text{mL}$ ; 10 为反应  $10\text{min}$ , 以  $1\text{min}$  计;  $N$  为稀释倍数;  $W$  为酶的称取量,  $\text{g}$ 。

所得结果精确至整数。

#### 5. 结果的允许差

平行试验相对误差不得超过 3%。

说明:

① 对于同一台分光光度计与同一批福林试剂, 其工作曲线  $K$  值可以沿用, 当另配福林试剂时, 工作曲线应重作。

② 当用不同产品的酪蛋白对同一蛋白酶测定时, 其结果会有差异, 故蛋白酶活力表示时应注明所用酪蛋白的生产厂。

#### (二) 紫外分光光度法 (第二法)

蛋白酶在一定的温度与 pH 值条件下, 水解酪蛋白底物, 然后加入三氯乙酸终止酶反应, 并使未水解的酪蛋白沉淀除去, 滤液对紫外光有吸收, 可用紫外分光光度法测定, 根据吸光度计算其酶活力。

##### 1. 试剂和溶液

同福林法。

##### 2. 仪器和设备

(1) 恒温水浴  $40^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 紫外分光光度计 应符合 GB 9721 的规定。

##### 3. 测定方法

(1) 求  $K$  值 按第一法的附表 3 配制不同浓度的酪氨酸标准溶液, 然后, 直接用紫外分光光度计测定其吸光度 ( $A$ ), 并计算  $K$  值, 其  $K$  值应在 130~150 范围内。

(2) 待测酶液的制备 称取酶粉 1~2g, 精确至 0.0002g (或吸取酶液 1.00mL), 以下操作同福林法。测定酶粉 (或液体酶) 时稀释倍数参考附表 5。

附表 5

酶活单位/U	总倍数	第一次稀释	第二次稀释
20000~50000	2000	1g (mL)→200mL(100 倍)	10mL→100mL(10 倍)
80000~100000	4000	1g (mL)→200mL(100 倍)	5mL→100mL(20 倍)

(3) 测定 除酶液吸取 2.00mL、酪蛋白溶液吸取 2.00mL、三氯乙酸吸取 4.00mL 外, 其他操作条件同福林-酚法测定中的反应, 静置沉淀, 直至过滤。滤液用紫外分光光度计, 在 275nm 波长下, 用 10mm 比色皿, 测定其吸光度 ( $A$ )。

##### 4. 计算

$$\begin{aligned} X &= A \times K \times \frac{8}{2} \times \frac{1}{10} \times n \times E \\ &= \frac{2}{5} AKnE \end{aligned}$$

式中,  $X$  为样品的酶活力, U/g 或 U/mL;  $A$  为试样溶液的平均吸光度;  $K$  为吸收系数; 8 为反应试剂的总体积, mL; 2 为吸取酶液 2.00mL, 以 1mL 计; 10 为反应时间 10min, 以 1min 计;  $n$  为稀释倍数;  $E$  为紫外法与福林法的换算系数 (中性蛋白酶、碱性蛋白酶系数为 0.50; 酸性蛋白酶系数为 0.77)。

所得结果精确至整数。

##### 5. 结果的允许差

平行试验相对误差不得超过 3%。

## 四、脂肪酶活力测定

1g 酶粉于 40℃、pH7.5 的条件下水解脂肪，每分钟产生 1 $\mu$ mol 的脂肪酸，即为一个脂肪酶国际单位，以 U/g 表示。

脂肪酶在一定条件下，将甘油三酯水解，在不同水解阶段可以放出脂肪酸、甘油二酯、甘油单酯和甘油。水解释放出的脂肪酸可用标准碱液滴定。从而测定脂肪酶活力。反应式如下。



### 1. 试剂和溶液

- (1) 聚乙烯醇 (PVA) 聚合度 1750 $\pm$ 50。
- (2) 橄榄油 采用北京芳草医药公司生产的试验试剂。
- (3) 95% (体积分数) 乙醇 GB 679。
- (4) 底物溶液的制备

① 称取 40g 聚乙烯醇 (PVA)，加蒸馏水约 800mL，在沸水中加热并不断搅拌，使其完全溶解，冷却后定容至 1000mL。用双层纱布过滤后备用。

② 量取 4% 聚乙烯醇溶液 150mL，加 50mL 橄榄油，用高速组织捣碎机搅动 6 min (分两次搅动，每次 3min，中间休息 5min)，即成乳白色 PVA-橄榄油乳化液。该溶液要现用现配，配好的溶液若保存于冰箱中，可存放 1 周。

- (5) 0.025mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.5)

A 液：称取磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 17.01g，加水溶解并定容至 500mL。

B 液：称取磷酸氢二钾 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 44.77g，加水溶解并定容至 500mL。

使用液：吸取 A 液 13mL，加 B 液 100mL，混匀，即成 0.25mol/L 磷酸缓冲液，使用时用蒸馏水稀释 10 倍，即成 0.025mol/L 磷酸缓冲液，用 pH 计校正。

(6) 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液 按 GB 601 配制与标定  $c(\text{NaOH})=0.5\text{mol/L}$  氢氧化钠标准溶液，使用时，准确稀释 10 倍。

- (7) 1% 酚酞指示剂 按 GB 603 配制。

### 2. 仪器和设备

- ① 恒温水浴：40℃ $\pm$ 0.2℃。
- ② 高速组织捣碎机：8000~12000r/min。
- ③ pH 计：分度值为 0.02 pH 值单位或 2mV。
- ④ 电磁搅拌器。
- ⑤ 微量滴定管：10mL，分刻度小于或等于 0.05mL。

### 3. 测定方法

(1) 酶液的制备 称取酶粉 1~2g，精确至 0.0002g，先以少量磷酸缓冲液溶解，并用玻璃棒捣研，将上清液倾入容量瓶中，沉渣部分再加入少量缓冲液，如此反复捣研 3~4 次，最后全部移入容量瓶中，用缓冲液定容至刻度，摇匀，转入组织捣碎机打搅 3min 后供测定使用。

测定酶粉时，稀释倍数参考附表 6，控制酶液浓度，样品与对照消耗碱量之差在 1~2mL 范围内。取样时，应将酶液摇匀后再取。

附表 6

估测酶活力/U	4000	5000	6000
稀释倍数	600	750	900

## (2) 测定

### ① 电位滴定法 (第一法)

a. 用 pH9.22 的磷酸钠 (硼砂) 缓冲液, 按 pH 计使用说明书校正仪器。

b. 取两个 100mL 烧杯, 于第一个空白杯 (A) 和第二个样品杯 (B) 中, 各加入底物溶液 4.00mL 和 0.025mol/L pH7.5 磷酸缓冲液 5.00mL, 再于 A 杯中加入 95% 的乙醇 15.0mL, 放入 40℃ ± 0.2℃ 水浴中预热 5~10min, 然后于 A、B 两杯中各加入待测酶液 1.00mL, 立即混匀计时, 在 40℃ ± 0.2℃ 水浴中准确反应 15min, 于 B 杯中立即补加 95% 乙醇 15.0mL 终止酶反应, 取出。

c. 在烧杯中放一枚转子, 置于电磁搅拌器上, 在搅拌下, 用 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定, 直至 pH10.3, 为其终点, 记录消耗 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液的体积。

### ② 指示剂滴定法 (第二法)

a. 取两个 100mL 三角瓶, 分别于空白瓶 (A) 和样品瓶 (B) 中, 各加入底物溶液 4.00mL 和 0.025mol/L pH7.5 磷酸缓冲液 5.00mL, 再于 A 瓶中加入 95% 的乙醇 15.0mL, 放入 40℃ ± 0.2℃ 水浴中预热 5~10min, 在两瓶中各加入酶液 1.00mL, 立即混匀计时, 在 40℃ ± 0.2℃ 水浴中准确反应 15min, 在 B 瓶中立即补加 95% 乙醇 15.0mL 终止酶反应。

b. 于空白和样品溶液中各加入酚酞指示剂 2~3 滴, 用 0.05mol/L NaOH 标准溶液滴定, 直至微红色并保持 30s 不退为其终点, 记录消耗 0.05mol/L 氢氧化钠标准溶液的体积。

## 4. 计算

$$X = \frac{(B-A) \times c \times 50 \times n}{t \times 0.05}$$

式中, X 为样品的酶活力, U/g; B 为滴定样品时消耗氢氧化钠标准碱液的体积, mL; A 为滴定空白时消耗氢氧化钠标准碱液的体积, mL; c 为氢氧化钠标准溶液浓度, mol/L; 0.05 为氢氧化钠标准溶液浓度换算系数; 50 为 0.05mol/L 氢氧化钠溶液 1.00mL 相当于脂肪酶 50μmol; t 为反应时间, min; n 为稀释倍数。

所得结果精确至整数。

## 5. 结果的允许差

平行试验相对误差不得超过 2%。

## 五、葡萄糖异构酶活力测定

### (一) 酶促反应法 I (适用于链霉菌产生的葡萄糖异构酶)

#### 1. 试剂

(1) 700g/L 葡萄糖溶液 称取 70g 分析纯葡萄糖加入煮沸的蒸馏水中, 再加热使其完全溶解, 冷却, 用蒸馏水定容至 100mL。

(2) 0.2mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH7.5)

0.2 mol/L 磷酸二氢钠 (GB1267) 溶液: 称取 31.2g 磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 用蒸馏水溶解并稀释至 1000mL。

0.2mol/L 磷酸氢二钠 (GB 1263) 溶液: 称取 71.6g 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 用蒸馏水溶解并稀释至 1000mL。

取一定量上述二溶液混合, 用 pH 计校正至 pH7.5。

(3) 0.5 mol/L 硫酸镁 (GB 671) 溶液 称取 12.3g 硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 加蒸馏水溶解, 用蒸馏水定容至 100mL。

(4) 0.5mol/L 高氯酸 (GB 623) 溶液 量取 21mL 高氯酸 ( $\text{HClO}_4$ ), 用蒸馏水定容至

500mL。

## 2. 反应

固定称取适量的酶（用固定化酶完整颗粒，不磨碎），用 0.02mol/L 磷酸缓冲液（pH7.5）1mL 在 3~7℃ 浸泡 16h，加磷酸缓冲溶液 1.5mL、硫酸镁溶液 0.5mL、葡萄糖溶液 1.5mL，加蒸馏水调整至总体积 5mL。70℃ 反应 1h，加高氯酸溶液 5mL 终止反应，然后测定果糖含量。

### （二）酶促反应法Ⅱ（适用于游动放线菌产生的葡萄糖异构酶）

#### 1. 试剂

（1）3.0mol/L 葡萄糖溶液 称取分析纯无水葡萄糖 54g，加煮沸蒸馏水使其溶解，并定容至 100mL。

（2）0.3mol/L 磷酸缓冲溶液（pH7.0） 称取 107.4g 分析纯磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ），加蒸馏水溶解并定容至 1L（A 液）；称取 46.3g 分析纯磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）（GB 1267），加蒸馏水溶解，并定容至 1L（B 液）。各取一定量 A、B 液混合，用 pH 计校正至 pH7.0。

（3）0.03 mol/L 硫酸镁溶液 称取 0.739g 分析纯硫酸镁（ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ），加蒸馏水溶解，并定容至 100mL。

（4）0.003mol/L 硫酸钴溶液 称取 0.0843g 分析纯硫酸钴（ $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ），加蒸馏水溶解，并定容至 100mL。

#### 2. 反应

固定称取适量的酶（用固定化酶完整颗粒，不磨碎），用 0.03mol/L 磷酸缓冲液（pH7.0）1mL 在 3~7℃ 浸泡 16h，加磷酸缓冲溶液 0.5mL、硫酸钴溶液 0.5mL、硫酸镁溶液 0.5mL、葡萄糖溶液 2.5mL，加蒸馏水调整至总体积 5mL。75℃ 反应 1h，加高氯酸溶液 5mL 终止反应，然后测定果糖含量。

### （三）果糖测定法（半胱氨酸-吡唑法）

#### 1. 试剂和溶液

（1）15g/L 半胱氨酸盐酸盐溶液 称取生化试剂纯半胱氨酸盐酸盐 0.375g，用蒸馏水溶解，并稀释定容至 25mL。

（2）1.2g/L 吡唑-酒精溶液 称取吡唑 30.0mg，用无水酒精溶解并定容至 25mL，放置在棕色瓶中，24h 后使用。

（3）硫酸溶液 量取分析纯浓硫酸 450mL，在不断搅拌下徐徐倒入 190mL 蒸馏水中。

（4）标准果糖溶液 称取预先在 55℃ 真空干燥至恒重的分析纯果糖 125.0mg，用蒸馏水定容至 25mL（5mg/mL），存放于冰箱中备用，使用时稀释 100 倍（50 μg/mL）。

#### 2. 测定程序

（1）标准曲线的绘制 取 25mL 比色管分别加 50μg/mg 的果糖标准溶液 0mL、0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL，再用蒸馏水分别补充至 1mL；然后每管中加入 0.2mL 半胱氨酸盐酸盐溶液、6mL 硫酸溶液；摇匀后，立即加入 0.2mL 吡唑-酒精溶液，摇匀，于 60℃ 水浴中保温 10min；取出用水冷却呈红紫色，用 10mm 的比色皿，在 560nm 波长下比色，以吸光度对果糖作图，即得标准曲线。

（2）样品测定 将反应终止溶液适当稀释后，准确吸取 1.0mL，使其中果糖含量在 10~40μg 范围内，然后按标准曲线绘制的后步操作进行。根据获得的吸光度在标准曲线图上查得相应的果糖量。

#### (四) 计算

$$X = \frac{u}{W}$$

式中,  $X$  为酶活力,  $U/g$ ;  $u$  为酶单位,  $U$ ;  $W$  为样品量,  $g$ 。

注: ① GIU 为酶单位的规定。酶在上述方法 I 或方法 II 的反应条件下, 1h 生成 1mg 果糖的酶量规定为 1 个单位, 以 GIU 表示。将其除以 10.8 即为国际单位, 此时以 IGIU 表示。

② 果糖 ( $mg/h$ ) 为根据吸光度在标准曲线图上查得的果糖质量 ( $\mu g$ )  $\times$  稀释倍数  $\times$  1000。

#### (五) 生产能力

生产能力是指在适宜条件下, 酶活力降至原来活力的 10% 时, 1kg 绝干固定化酶能转化绝干葡萄糖为果糖的量, 以  $t/kg$  表示。果葡糖中果糖含量为 42% (质量分数)。

$$P = \frac{\sum S}{1000W}$$

式中,  $P$  为生产能力,  $t/kg$ ;  $\sum S$  为转化糖量的总和,  $kg$ ;  $W$  为转化时所用固定化酶的量,  $kg$ 。

#### (六) 酶活力保存率

$$X_2 = \frac{E}{E_0} \times 100\%$$

式中,  $X_2$  为酶活力保存率, %;  $E$  为剩余活力;  $E_0$  为原酶活力。

#### (七) 强度

固定化酶用 60℃ 蒸馏水浸没, 然后缓慢搅动 20h, 再用两个手指用力压之, 放开后不成浆 (或极少成浆) 仍硬。否则, 为不合格。

#### (八) 检验规则

① 产品需经生产厂技术部门检验, 并签发合格证方可出厂。生产厂以一批次发酵罐培养的酶经固化后制得的固定化酶为同一批次的产品。

② 订货单位若需抽样检验, 应从该批酶中抽取两份, 按本标准规定的试验方法进行检验。若有一个样品或一项指标不符合标准的要求, 应与生产厂协商, 再取 1 倍量的同批样品共同进行复验。如仍不合格时, 则全批产品作为不合格产品, 退交生产厂处理。若产品经复验合格, 订货方应承担试验费用。

#### (九) 标志、包装、运输、贮存

① 固定化葡萄糖异构酶的外包装应用硬纸箱, 除注明品名、生产厂名、规格、注册商标外, 还应注明食品添加剂, 箱里并应附有产品检验合格证。合格证上印有品名、颗粒说明、所用菌种、批号、数量、规格、生产日期、检验员等。

② 内包装为食品用塑料袋, 应印有注册商标、产品名称、规格、质量、生产厂名。

③ 本品含有生物活性物质, 对光线、温度、湿度易引起失活, 在运输途中应避免日光曝晒和雨淋。贮存仓库应保持清洁、阴凉、干燥、通风。

## 六、果胶酶活力测定

果胶酶是一类水解果胶的酶的总称, 包括果胶酯酶 (PE)、聚半乳糖醛酸酶 (PG) 和聚半乳糖醛酸裂解酶 (PGL) 等多种。它们的作用方式和产物各不相同, 无法找到一种方法适用于所有果胶酶的活力测定。经分离纯化后, 可采用不同的方法测定酶活力。对于混合的果胶酶, 一般采用次碘酸钠法和黏度法测定。

#### (一) 次碘酸钠法

果胶酶水解果胶生成半乳糖醛酸。半乳糖醛酸具有还原性糖醛基, 可用次碘酸钠进行半

乳糖醛酸的定量测定，以此来表示果胶酶的活性。对于分离纯化的外切聚半乳糖醛酸酶也采用本法测定活力。

### 1. 试剂和溶液

(1) 1%果胶溶液 称取果胶 1.0000g，精确至 0.0002g，用热水溶解煮沸，冷却后过滤，调 pH3.5，用蒸馏水定容至 100mL，在冰箱中贮存备用，使用时间不超过 3 天。

(2) 0.05mol/L 硫代硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 溶液 按 QB 601 配制与标定 0.1mol/L 溶液。使用时准确稀释一倍。

(3) 1mol/L 碳酸钠溶液 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 按 QB 601 配制。

(4) 0.1mol/L 碘标准溶液 ( $\text{I}_2$ ) 按 QB 601 配制与标定，贮存于棕色瓶中。

(5) 2mol/L 硫酸溶液 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 取浓硫酸 ( $d=1.84$ ) 5.6mL，缓慢加入适量水中，冷却后用水定容至 100mL，摇匀。

(6) 0.5%可溶性淀粉指示剂 按 QB 603 配制。

(7) 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH3.5)

A 液：称取柠檬酸 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 21.01g，用蒸馏水溶解并定容至 1000mL。

B 液：称取柠檬酸钠 ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 29.41g，用蒸馏水溶解并定容至 1000mL。取 A 液 140mL、B 液 60mL，混匀，缓冲液 pH3.5 (用 pH 计校正)。

### 2. 仪器和设备

(1) 比色管 25mL。

(2) 恒温水浴  $50^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ 。

(3) 容量瓶 25mL、50mL、100mL、200mL、250mL。

(4) 碘量瓶 250mL。

(5) 吸管 1mL、5mL。

(6) 滴定管 25mL。

### 3. 测定方法

#### (1) 制备酶液

① 固体酶 用已知质量的 50mL 小烧杯称取样品 1.0000g，精确至 0.0002g，以少量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH3.5) 溶解，并用玻璃棒捣研，将上清液小心倾入适当的容量瓶中，残渣再加少量缓冲液，反复捣研 3~4 次，最后全部移入容量瓶，用缓冲液定容，摇匀，以 4 层纱布过滤，滤液供测试用。

② 液体酶 准确吸取浓缩酶液 1.00mL 于一定体积的容量瓶中，用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH3.5) 稀释定容。

③ 固体酶或浓缩酶液均需按附表 7 要求准确稀释至一定倍数，酶液浓度应控制在消耗 0.05mol/L 硫代硫酸钠标准溶液 ( $V_2 - V_1$ ) 之差在 0.5~1.0mL 范围内。必要时可先做预备试验。

附表 7

酶活力单位/U	总稀释倍数	第一次稀释	第二次稀释
20000	1000	1g(mL) → 100mL (100 倍)	5mL → 50mL (10 倍)
30000	2000	1g(mL) → 100mL (100 倍)	5mL → 100mL (20 倍)
40000	4000	1g(mL) → 100mL (100 倍)	5mL → 200mL (40 倍)
50000	5000	1g(mL) → 100mL (100 倍)	5mL → 250mL (50 倍)
80000	8000	1g(mL) → 200mL (200 倍)	5mL → 200mL (40 倍)
100000	10000	1g(mL) → 200mL (200 倍)	5mL → 250mL (50 倍)

## (2) 测定

① 于甲、乙两支比色管中，分别加入 10g/L 果胶溶液 5mL，在  $50^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  水浴中预热 5~10min。

② 向甲管（空白）中加入柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（pH3.5）5mL；乙管（样品）中加入稀释酶液 1mL、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（pH3.5）4mL，立刻摇匀，计时。在此温度下准确反应 0.5h，立刻取出，加热煮沸 5min 终止反应，冷却。

③ 取上述甲、乙管反应液各 5mL 放入碘量瓶中，准确加入 1mol/L 碳酸钠溶液 1mL、0.1mol/L 碘液 5mL，摇匀，于暗处放置 20min。

④ 取出，加入 2mol/L 硫酸溶液 2mL，用 0.05mol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定至浅黄色，加淀粉指示液 3 滴，继续滴定至蓝色刚好消失为其终点，记录甲管（空白）、乙管（样品）反应液消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积。同时做平行样品测定。

### 4. 计算

1g 酶粉或 1mL 酶液在  $50^{\circ}\text{C}$ 、pH3.5 的条件下，1h 分解果胶产生 1mg 半乳糖醛酸为 1 个酶活单位。

$$X = (A - B) \times c \times 0.51 \times 194.14 \times n \times \frac{10}{5 \times 1 \times 0.5}$$
$$= 396.05(A - B)cn$$

式中，X 为样品的酶活力，U/g 或 U/mL；A 为空白消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积，mL；B 为样品消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积，mL；c 为硫代硫酸钠标准溶液的浓度，mol/L；0.51 为 1mmol 硫代硫酸钠相当于 0.51mmol 的游离半乳糖醛酸；194.14 为 1mmol 半乳糖醛酸的质量，mg；n 为酶液稀释倍数；10 为反应液总体积，mL；5 为滴定时取反应混合物的体积，mL；1 为反应时加入稀释酶液的体积，mL；0.5 为反应时间，h。

所得结果应精确至整数。

注：果胶暂用 Sigma 公司产品为标准底物。若购不到，使用其他厂产品时，必须做对照试验。

### 5. 结果的允许差

平行试验，滴定时消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积不得超过 0.05mL。

## (二) 黏度法

果胶被果胶酶水解后黏度下降。黏度下降至 20%~80% 范围时，与酶浓度成正比。测定时，将 1mL 酶液加到 5mL 含 1% 果胶的柠檬酸缓冲液（pH4.2）中，于  $30^{\circ}\text{C}$  反应 1h，然后用黏度计测定黏度下降值。

在上述条件下，引起黏度下降 50% 的酶量定义为 10 个酶活力单位。此法也适用于内切半乳糖醛酸酶的活力测定。

## 七、碱性磷酸酶活力测定

碱性磷酸酶在碱性条件下催化磷酸单酯水解生成无机磷酸。该酶的测定一般采用 NPP 法或定磷法。

### (一) NPP 法

以对硝基酚磷酸（NPP）为底物，在酶作用下，NPP 水解生成黄色的对硝基酚，可用分光光度计测定。

#### 1. 试剂和溶液

① 1.0mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH9.5）：不同来源的碱性磷酸酶可采用不同的 pH 值，

但都在 pH8~10 范围内, 如枯草杆菌碱性磷酸酶用 pH9.5, 大肠杆菌碱性磷酸酶用 pH8.8 等。

② 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4)。

③ 40mmol/L NPP 溶液。

## 2. 测定方法

取酶液 0.5mL, 加入 1mol/L、pH9.5 Tris-HCl 缓冲液 1mL, 混匀, 于 30℃ 水浴中预热 5min; 然后加入 40mmol/L NPP 溶液 0.5 mL, 迅速混匀并开始计时, 立即测定 OD<sub>420</sub>; 置 30℃ 水浴中反应 10min, 取出立即测定 OD<sub>420</sub>。

## 3. 计算

在上述条件下, 420nm 波长处的吸光率每变化 0.001 定义为 1 个酶活力单位 (U)。

$$\text{酶活力(U)} = \Delta\text{OD}_{420} \times 1000$$

式中,  $\Delta\text{OD}_{420}$  为在 420nm 波长下测定的反应前后吸光率 (光密度) 之差。

为减少误差, 可用 20% 三氯乙酸 2mL 终止酶反应, 空白测定则先加三氯乙酸, 后加 NPP。同法测定 OD<sub>420</sub>。

若酶活力太高, 可用 0.1mol/L pH7.4 Tris-HCl 缓冲液稀释。

## (二) 定磷法

以单磷酸腺苷 (AMP) 为底物, 按上述方法进行酶反应, 生成的磷酸用钼蓝定磷法测定 650nm 波长下的光密度变化, 从而测定酶活力。

测定时, 取 0.5mL 酶液, 加 1mol/L、pH7.4 Tris-HCl 缓冲液 1mL, 30℃ 预热, 恒温 5min, 加入 40mmol/L 单磷酸腺苷 (AMP) 溶液 0.5mL, 30℃ 反应 10min, 加入 20% 三氯乙酸 2mL 终止反应。吸取反应液 1mL, 用钼蓝定磷法测定 650nm 波长下的光密度 (OD<sub>650</sub>)。空白实验则先加三氯乙酸, 后加底物, 同法测定 OD<sub>650</sub>。

在上述条件下, OD<sub>650</sub> 每变化 0.001 定义为 1 个酶活力单位 (U)。

$$\text{酶活力(U)} = (\text{OD}_{650} - \text{OD}_{650\text{空白}}) \times 1000$$

## 八、葡萄糖氧化酶活力测定

葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸和双氧水, 产生的葡萄糖酸用过量的氢氧化钠中和后, 用盐酸反滴定, 可得到葡萄糖酸的生成量, 从而计算酶活力。

### 1. 试剂和溶液

① 2% 葡萄糖-磷酸缓冲液: 称取无水葡萄糖 20g, 用 0.06mol/L、pH5.6 磷酸缓冲液溶解, 定容至 1000mL。

② 0.1mol/L 标准氢氧化钠溶液。

③ 0.1mol/L 标准盐酸溶液。

④ 1% 酚酞指示剂: 1g 酚酞溶于 100mL 60%~90% 的乙醇溶液中。

### 2. 测定方法

取 250mL 三角瓶, 加入 2% 葡萄糖-磷酸缓冲液 25mL, 加入酶液 1mL, 立即振荡反应 1h。加入 20mL 0.1mol/L 标准氢氧化钠溶液终止反应, 用 0.1mol/L 标准盐酸溶液滴定过量的氢氧化钠, 记录消耗的盐酸体积 ( $V_1$ )。

对照实验是在加入酶液前先加入氢氧化钠溶液, 不必振荡, 其他操作相同, 记录对照实验所消耗盐酸体积 ( $V_2$ )。

### 3. 计算

在上述条件下, 每分钟催化葡萄糖氧化生成 1 $\mu$ mol 葡萄糖酸的酶量定义为 1 个酶活力

单位。

$$\text{酶活力(U)} = (V_2 - V_1) \times c \times \frac{1000}{60}$$

式中， $V_2$  为空白滴定消耗的盐酸体积，mL； $V_1$  为样品滴定消耗的盐酸体积，mL； $c$  为盐酸的浓度；60 为反应时间，min；1000 为由 1mmol 换算成  $1\mu\text{mol}$ 。



## 附录 2 工业化酶制剂的标准

### 一、工业用 $\alpha$ -淀粉酶制剂

中华人民共和国行业标准 QB 1805.1—1993  $\alpha$ -Amylase for industrial

#### (一) 主题内容与适用范围

本标准规定了工业用  $\alpha$ -淀粉酶制剂的技术要求、实验方法、检验规则和标志、包装、运输、贮存要求。

本标准适用于以水解淀粉的芽孢杆菌 (*Bacillus amyliquefaciens* NO. BF7685 及 CW102) 深层培养、提纯制取的  $\alpha$ -淀粉酶制剂。

#### (二) 引用标准

QB/T 1803 工业酶制剂通用试验方法。

QB/T 1804 工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮存。

#### (三) 产品分类

产品按形态分为固体酶和液体酶两种剂型。

#### (四) 技术要求

##### 1. 外观要求

固体剂型 黄褐色粉末，无潮解结块现象，易溶于水。

液体剂型 褐色液体，允许有少量凝聚物。

##### 2. 理化要求

理化要求应符合附表 8 规定。

附表 8

项 目	固 体 剂 型			液 体 剂 型		
	优等品	一等品	合格品	优等品	一等品	合格品
气味	无异味	无异味	—	无异味	无异味	—
酶活力/(U/g)	2000	2000	2000	1000	1000	1000
	3000	3000	3000	2000	2000	2000
	4000	4000	4000	3000	—	—
干燥失重/%	≤8.0			—		
细度[0.40mm(39目)标准筛的通过率]/%	≥80		≥75	—		
容重/(g/mL)	—			≤1.25		
pH值(25℃)	—			5.5~7.0		
酶活力保存率/%	25℃, 保存半年	100 <sup>①</sup>	≥95	≥85	—	—
	25℃, 保存3个月	—	—	—	100 <sup>①</sup>	≥95
重金属(以Pb计)/%	≤0.004			—		
大肠菌群/(个/100g)	≤3000			—		
细菌总数/(个/g)	≤5000	—	—	≤5000	—	—
霉菌/(个/g)	≤200	—	—	≤200	—	—
沙门菌	不得检出	—	—	不得检出	—	—

① 标签上标示的酶活力，即为标示酶活力。

注：1. 出口产品按合同执行。

2. 一等品、合格品不得用于食品工业（蒸馏酒类除外）。

### (五) 试验方法

按 QB/T 1803 执行。

### (六) 检验规则和标志、包装、运输、贮存

按 QB/T 1804 执行。

## 二、耐高温 $\alpha$ -淀粉酶制剂

中华人民共和国行业标准 QB/T 2306—1997

### (一) 范围

本标准规定了耐高温  $\alpha$ -淀粉酶制剂的术语与定义、技术要求、试验方法及检验规则和标志、包装、运输、贮存要求。

本标准适用于以地衣芽孢杆菌（或其他变异菌种）经深层发酵培养、提纯制取的耐高温  $\alpha$ -淀粉酶制剂。

### (二) 引用标准

下列标准包含的条文，通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

QB 601—1988 化学试剂 滴定分析（容量分析）用标准溶液的制备。

QB 4789—1984 食品卫生微生物学检验。

QB/T 5009.11—1996 食品卫生理化检验 食品中总砷的测定方法。

QB/T 5009.12—1996 食品卫生理化检验 食品中铅的测定方法。

QB 8451—1987 食品添加剂中重金属限量试验法。

QB/T 1803—93 工业酶制剂通用试验方法。

QB/T 1804—93 工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮存。

### (三) 术语与定义

#### 1. 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶

由精选的地衣芽孢杆菌经发酵提纯制取的具有较高耐热性的  $\alpha$ -淀粉酶制剂。

#### 2. 酶活力单位

在 70℃、pH6.0 条件下，1min 液化可溶性淀粉 1mg 成为糊精所需要的酶量，即为 1 个酶活力单位，以 U/mL 或 U/g 表示。

### (四) 技术要求

#### 1. 外观要求

液体剂型 褐色液体，具有该酶特有的气味，允许有少量的凝聚物。

固体剂型 黄褐色粉末，易溶于水，具有该酶特有的气味，无潮解结块现象。

#### 2. 理化卫生要求

应符合附表 9 规定。

### (五) 检验规则

按 QB/T 1804—1993 标准中的 2 执行。

### (六) 标志、包装、运输、贮存

按 QB/T 1804—1993 标准中的 3 执行。

## 三、工业用糖化酶制剂

中华人民共和国行业标准 QB 1805.2—1993 Glucoamylase for industrial use

附表 9

项 目	液体剂型(酶活力 20000U/mL)			固体剂型(酶活力 20000U/g)		
	优等品	一等品	合格品	优等品	一等品	合格品
酶活力保存率	25℃以下 6 个月、5℃以下 12 个月达到标示酶活力	25℃以下 3 个月达到标示酶活力 95%	25℃以下 3 个月达到标示酶活力 90%	25℃以下 6 个月、5℃以下 12 个月达到标示酶活力	25℃以下 6 个月达到标示酶活力 95%	25℃以下 6 个月达到标示酶活力 90%
酶耐热性存活力(95℃, 60min)/%	≥95		≥90	≥95		≥90
pH 值	5.8~6.8			—		
干燥失重/%	—			≤8.0		
容重 g/mL	1.15~1.25			—		
细度[0.40mm(39 目)标准筛的通过率]/%	—			85	80	
重金属(以 Pb 计)/%	≤0.004		—	≤0.004		—
铅(以 Pb 计)/%	≤0.001		—	≤0.001		—
砷(以 As 计)/%	≤0.0003		—	≤0.0003		—
菌落总数/(个/mL)或(个/g)	≤5×10 <sup>4</sup>		—	≤5×10 <sup>4</sup>		—
大肠菌群/(MNP/100mL)或(MNP/100g)	≤3×10 <sup>3</sup>		—	≤3×10 <sup>3</sup>		—
沙门菌(25g 样)	不得检出			不得检出		
霉菌/(个/mL)或(个/g)	≤100	≤200	—	≤100	≤200	—
酵母/(个/mL)或(个/g)	≤100	≤200	—	≤100	≤200	—
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> /%	≤0.000005		—	≤0.000005		—

注: 1. 合格品不得用于食品工业(蒸馏酒类除外)。

2. 产品酶活力规格除 20000U/mL(或 U/g)外, 还可按供需合同执行。

### (一) 主题内容与适用范围

本标准规定了工业用糖化酶制剂的技术要求、试验方法、检验规则和标志、包装、运输、贮存要求。

本标准适用于以黑曲霉(*A. niger* No. AS 3.4309 及 CW 201)及其变异菌株深层培养、提纯制取的糖化酶制剂。

### (二) 引用标准

QB/T 1803—93 工业酶制剂通用试验方法。

QB/T 1804—93 工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮存。

### (三) 产品分类

产品按形态分为固体酶和液体酶两种剂型。

### (四) 技术要求

#### 1. 外观要求

固体剂型 黄褐色粉末, 无潮解结块现象, 易溶于水。

液体剂型 褐色液体, 允许有少量凝聚物。

#### 2. 理化要求

理化要求应符合附表 10 规定。

附表 10

项 目	固 体 剂 型			液 体 剂 型		
	优等品	一等品	合格品	优等品	一等品	合格品
气味	无异味	无异味	—	无异味	无异味	—
酶活力/(U/g)或(U/mL)	40000	40000	40000	50000	50000	50000
	50000	50000	50000	80000	80000	100000
	80000	80000		100000	100000	
	100000	100000				
干燥失重/%	≤8.0			—		
细度[0.40mm(39目)标准筛的通过率]/%	≥80	≥80	≥75	—		
容重/(g/mL)	—			≤1.25		
pH值(25℃)	—			3.0~5.0		
酶活力保存率/%	25℃,保存半年	100 <sup>①</sup>	≥95	≥85	—	—
	25℃,保存3个月	—	—	—	100 <sup>①</sup>	≥95
重金属(以Pb计)/%	≤0.004			—		
大肠菌群/(个/100g)	≤3000			—		
菌落总数/(个/g)	≤5×10 <sup>4</sup>	—	—	≤5×10 <sup>4</sup>	—	—
霉菌/(个/g)	≤200	—	—	≤200	—	—
沙门菌	不得检出	—	—	不得检出	—	—

① 标签上标示的酶活力,即为标示酶活力。

注:1. 出口产品按合同执行。

2. 一等品、合格品不得用于食品工业(蒸馏酒类除外)。

#### (五) 试验方法

按 QB/T 1803—1993 执行。

#### (六) 检验规则和标志、包装、运输、贮存

按 QB/T 1804—1993 执行。

### 四、工业用蛋白酶制剂

中华人民共和国行业标准 QB 1805.3—1993 Proteinase for industrial use

#### (一) 主题内容与适用范围

本标准规定了工业用蛋白酶制剂的技术要求、试验方法、检验规则和标志、包装、运输、贮存要求。

本标准适用于采用附表 11 中的菌种,以发酵法生产,经提纯制取的蛋白酶制剂。

#### (二) 引用标准

QB/T 1803—1993 工业酶制剂通用试验方法。

QB/T 1804—1993 工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮存。

#### (三) 产品分类

1. 产品按形态分为固体酶和液体酶两种剂型。

2. 产品按作用的 pH 值,分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶 3 种,其代号与生产菌分别见附表 11。

#### (四) 技术要求

##### 1. 外观要求

固体剂型 黄褐色粉末,无结块、潮解现象。

液体剂型 棕褐色液体,允许有少量凝聚物。

附表 11

类别	代号	生产菌
酸性蛋白酶	537	宇佐美曲霉( <i>Aspergillus usamii</i> No. 537)
	3350	黑曲霉( <i>Aspergillus niger</i> No. 3350)
中性蛋白酶	1.398	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> No. 1.398)
	3942	栖土曲霉( <i>Aspergillus terricola</i> No. 3942)
	166	放线菌( <i>Actinomyces</i> No. 166)
碱性蛋白酶	2709	地衣芽孢杆菌( <i>Bacillus licheni formis</i> No. 2709)
	CW301	地衣芽孢杆菌( <i>Bacillus licheni formis</i> No. CW301)
	209	短小芽孢杆菌( <i>Bacillus pumilus</i> No. 209)
	SMJ	嗜碱性短小芽孢杆菌( <i>Bacillus pumilus alkaliphilic</i> No. SMJ)
	CW302	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> No. CW302)

## 2. 理化要求

理化要求应符合附表 12 的规定。

附表 12

项 目		固 体 剂 型			液 体 剂 型		
		优等品	一等品	合格品	优等品	一等品	合格品
酶活力/(U/g)或(U/mL)	酸性蛋白酶	30000	30000	30000	30000	30000	30000
		40000	40000	40000	40000	40000	40000
		50000	50000	50000	50000	50000	50000
	中性蛋白酶	30000	30000	30000	30000	30000	30000
		40000	40000	40000	40000	40000	40000
		50000	50000	50000	50000	50000	50000
	碱性蛋白酶	50000	50000	50000	50000	50000	50000
		80000	80000	80000	100000	100000	100000
		100000	100000	100000	150000	150000	150000
干燥失重/%		≤8.0			—		
细度[0.40mm(39目)标准筛的通过率]/%		80	80	75	—		
容重/(g/mL)		—			≤1.25		
pH 值(25℃)	酸性蛋白酶	—			2.5~5.0		
	中性蛋白酶	—			5.5~7.2		
	碱性蛋白酶	—			6.0~7.5		
酶活力保存率/%	25℃, 保存半年	100 <sup>①</sup>	≥90	≥85	—	—	—
	25℃, 保存 3 个月	—	—	—	100 <sup>①</sup>	≥90	≥80
重金属(以 Pb 计)/%		≤0.004			≤0.004		
大肠菌群/(个/100g)		≤3000			≤3000		
细菌总数/(个/g)		≤5000	—	—	≤5000	—	—
霉菌/(个/g)		≤200	—	—	≤200	—	—
沙门菌		不得检出			不得检出		

① 标签上标示的酶活力,即为标示酶活力。

注: 1. 出口产品按合同执行。

2. 一等品、合格品不得用于食品工业。

## (五) 试验方法

按 QB/T 1803—1993 执行。

## (六) 检验规则和标志、包装、运输、贮存

按 QB/T 1804—1993 执行。

## 五、洗涤剂用碱性蛋白酶制剂

中华人民共和国行业标准 QB 1806—1993 Alkali proteinase for detergent

### (一) 主题内容与适用范围

本标准规定了洗涤剂用碱性蛋白酶的技术要求、试验方法、检验规则和标志、包装、运输、贮存要求。

本标准适用于以地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis* No. 2709 及 No. CW301)、嗜碱性短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus alkaliphilic* No. SMJ)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* No. CW302) 经深层培养、提纯制取的洗涤剂用碱性蛋白酶制剂。

### (二) 引用标准

QB/T 1803—93 工业酶制剂通用试验方法。

QB/T 1804—93 工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮存。

### (三) 产品分类

产品按形态分为固体酶和液体酶两种剂型。

### (四) 技术要求

#### 1. 外观要求

① 固体酶为不规则的球形或短杆形颗粒，无结块。易溶于水。由非酶成分引起的浑浊，不影响溶液中酶的活性。

优等品 白色至浅灰色颗粒，颗粒外包有一层惰性材料。

一等品 经滤除发酵残渣制成。一等品及合格品为灰色颗粒，也可为着色颗粒，但着色所用颜料不得污染织物。

② 液体酶为棕褐色，能与水完全混溶。

#### 2. 理化要求

理化要求应符合附表 13 的规定。

附表 13

项 目	固 体 剂 型			液 体 剂 型		
	优等品	一等品	合格品	优等品	一等品	合格品
气味	无异味	无异味	—	无异味	无异味	—
酶活力/(U/g)或(U/mL)	50000	20000	20000	50000	50000	50000
	100000	50000	—	100000	100000	100000
干燥失重/%	≤4.0	≤6.0	≤8.0	—		
粒度[0.80~0.25mm(20~62目)标准筛的收得率]/%	≥90	—	—	—		
粒度[1.18~0.40mm(14~39目)标准筛的收得率]/%	—	≥80	≥75	—		
容重/(g/mL)	≤1.10			≤1.25		
pH 值(25℃原酶液)	—			6.0~7.0		
崩解(溶解)时间(30℃)/min	≤1.5	≤2.5	≤5.0	—		
酶活力保存率/%	25℃, 保存半年	100 <sup>①</sup>	≥90	—	—	—
	25℃, 保存3个月	—	—	100 <sup>①</sup>	≥90	≥90
沙门菌	不得检出	—	—	不得检出	—	—

① 标签上标示的酶活力，即为标示酶活力。

注：出口产品按合同执行。

### (五) 试验方法

按 QB/T 1803—1993 执行。

### (六) 检验规则和标志、包装、运输、贮存

按 QB/T 1804—1993 执行。

## 六、工业用脂肪酶制剂

中华人民共和国行业标准 QB 1805.4—1993 Lipase for industrial use

### (一) 主题内容与适用范围

本标准规定了工业用脂肪酶制剂的技术要求、试验方法、检验规则和标志、包装、运输、贮存要求。

本标准适用于以解脂假丝酵母 (*Y. filamentous* No. AS2.1405) 菌株深层培养, 经提纯制取的固体剂型的中性脂肪酶制剂。

### (二) 引用标准

QB/T 1803—93 工业酶制剂通用试验方法。

QB/T 1804—93 工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮存。

### (三) 技术要求

#### 1. 外观要求

本品为灰黄色粉末, 无潮解、结块现象, 易溶于水。

#### 2. 理化要求

理化要求应符合附表 14 规定。

附表 14

项 目	指 标	
	优等品	合格品
气味	无异味	—
酶活力/(U/g)或(U/mL)	4000	4000
	5000	5000
	6000	6000
干燥失重/%	≤8.0	
细度[0.40mm(39目)标准筛的通过率]/%	≥80	≥75
酶活力保存率(25℃, 保存半年)/%	100 <sup>①</sup>	≥80
重金属(以 Pb 计)/%	≤0.004	—
大肠菌群/(个/100g)	≤3000	—
细菌总数/(个/g)	≤5000	—
霉菌/(个/g)	≤200	—
沙门菌	不得检出	—

① 标签上标示的酶活力, 即为标示酶活力。

注: 1. 出口产品按合同执行。

2. 合格品不得用于食品工业。

### (四) 试验方法

按 QB/T 1803—1993 执行。

### (五) 检验规则和标志、包装、运输、贮存

按 QB/T 1804—1993 执行。

## 七、食品添加剂固定化葡萄糖异构酶制剂

中华人民共和国国家标准 GB 8274—1987 Food additive immobilized glucose isomerase preparation

本标准适用于微生物发酵法生成的酶经固定化制成的固定化葡萄糖异构酶。

### (一) 技术要求

#### 1. 外观

不结块，无异味。

#### 2. 项目和指标

应符合附表 15 要求。

附表 15

项 目	指 标	项 目	指 标
酶活力/(U/g)	≥2000	铅/%	≤0.001
生产能力/(t/kg)	≥1.5	砷(以 As 计)/%	≤0.0003
酶活力保存率(0~5℃ 3个月)/%	≥85	黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> /%	≤0.0000005
强度	合格	大肠菌群/(个/100g)	≤30
重金属(以 Pb 计)/%	≤0.004	沙门菌	不得检出

注：生产使用的菌株和固定化酶需经毒性鉴定方能使用。

### (二) 检验规则

1. 产品需经生产厂技术部门检验，并签发合格证方可出厂。生产厂以一批次发酵罐培养的酶经固化后制得的固定化酶为同一批次的产品。

2. 订货单位若需抽样检验，应从该批酶中抽取两份，按本标准规定的试验方法进行检验。若有一个样品或一项指标不符合标准的要求，应与生产厂协商，再取 1 倍量的同批样品共同进行复验。如仍不合格时，则全批产品作为不合格产品，退交生产厂处理。若产品经复验合格，订货方应承担检验费用。

### (三) 标志、包装、运输、贮运

1. 固定化葡萄糖异构酶的外包装应用硬纸箱，除注明品名、生产厂名、规格、注册商标外，还应注明食品添加剂，箱里并应附有产品检验合格证。合格证上印有品名、颗粒说明、所用菌种、批号、数量、规格、生产日期、检验员等。

2. 内包装为食品用塑料袋，应印有注册商标、产品名称、规格、质量、生产厂名。

3. 本品含有生物活性物质，对光线、温度、湿度易引起失活，在运输途中应避免日光曝晒和雨淋。贮存仓库应保持清洁、阴凉、干燥、通风。

## 八、工业酶制剂通用试验方法

中华人民共和国行业标准 QB/T 1803—1993 General methods of determination for industrial enzymes

### (一) 主题内容与适用范围

本标准规定了工业酶制剂的试验方法。

本标准适用于工业酶制剂的检测。

### (二) 引用标准

GB 601 化学试剂 滴定分析(容量分析)用标准溶液的制备。

- GB 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备。  
GB 604 化学试剂 酸碱指示剂 pH 变色域测定通用方法。  
GB 1250 极限数值的表示方法和判定方法。  
GB 4789.2 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定。  
GB 4789.3 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定。  
GB 4789.4 食品卫生微生物学检验 沙门菌检验。  
GB 4789.15 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母数测定。  
GB 6004 试验筛用金属丝编制方孔网。  
GB 6682 实验室用水规格。  
GB 8170 数值修约规则。  
GB 8451 食品添加剂中重金属限量试验法。  
GB 9721 化学试剂 分子吸收分光光度法通则（紫外和可见光部分）。

### （三）总则和基本要求

#### 1. 总则

- （1）方法中所采用的名词术语、计量单位应符合国家规定的标准。  
（2）方法中所用的各种分析仪器（如分析天平、酸度计、分光光度计和紫外分光光度计等）要按时检定；所用的滴定管、移液管、容量瓶等器具应按有关检定规程定期校正。  
（3）方法中所用的“仪器”为试验中所必须使用的特殊仪器，一般实验仪器不再列入。  
（4）方法中所用的水，在未注明其他要求时，应符合 GB 6682 中三级（以上）规格要求。  
（5）方法中所列的试剂，在未注明其他规格时，均指分析纯（AR）。  
（6）方法中的“溶液”，除另有说明外，均指水溶液；“稀释至刻度”是指用水稀释定容至刻度。  
（7）同一检测项目，有两个或两个以上试验方法时，各实验室可根据各自的条件选用，但以第一法为仲裁法。  
（8）理化要求以实测数据报告其试验结果，数据的计算与取舍，遵照 GB 8170 执行；极限值的判定按 GB 1250 中修约值比较法进行，结果的有效数字要与技术要求相一致。

#### 2. 基本要求

- （1）测定样品，必须做平行试验。  
（2）标准溶液的浓度，一般采用物质的量浓度，单位用摩尔每升或摩尔每立方米表示，如盐酸标准溶液 [ $c(\text{HCl})=0.1\text{mol/L}$ ]。  
（3）试验中所用玻璃器皿，用前须以铬酸洗涤液或合成洗涤剂浸泡，用自来水冲洗，再用蒸馏水洗干净。  
（4）试验方法中吸取或称取时的有效数字，表示要求达到的精确度。

### （四）外观及气味检查

取固体酶样（或 10mL 液体酶）2g，倒入 25mL 干燥小烧杯中，置于鼻下先嗅其气味，然后再目视检查外观，做好检查记录。

### （五）酶活力的试验方法

酶活力的测定，见附录 1 中各种酶的酶活力测定方法。

### （六）干燥失重的试验方法

#### 1. 原理

在常压下,将试样置于 $103^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 电热干燥箱中烘干2h,用称量法测定其失去挥发物的质量,以百分数表示。

## 2. 仪器和设备

- (1) 电热干燥箱  $103^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- (2) 称量瓶  $25\text{mm}\times 40\text{mm}$ 。
- (3) 干燥器 以变色硅胶作干燥剂。
- (4) 分析天平 感量 $0.1\text{mg}$ 。

## 3. 分析步骤

用烘干至恒重的称量瓶称取酶样约 $2\text{g}$ ,精确至 $0.0002\text{g}$ ,置于 $103^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 电热干燥箱中,将盖取下,侧放在称量瓶旁,烘干2h,取出,加盖,放入干燥器中冷却至室温(约 $30\text{min}$ ),称量。

## 4. 计算

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100\%$$

式中, $X$ 为样品的干燥失重(质量分数),%; $m_1$ 为干燥前称量瓶加样品的质量,g; $m_2$ 为干燥后称量瓶加样品的质量,g; $m$ 为称量瓶的质量,g。

所得结果精确至一位小数。

## 5. 结果的允许误差

平行试验相对误差不得超过 $0.5\%$ 。

## (七) 细(粒)度的试验方法

### 1. 原理

取一定量的酶样,用规定的标准筛进行筛分,称量,计算通过标准筛酶样的质量占总取样量的百分数(或计算双层筛中间物质量占总取样量的百分数)。

### 2. 仪器和设备

#### (1) 标准试验筛

SSW 1.18/0.630 mm GB 6004 (相当于原14目)

SSW 0.80/0.450 mm GB 6004 (相当于原20目)

SSW 0.40/0.250 mm GB 6004 (相当于原39目)

SSW 0.25/0.160 mm GB 6004 (相当于原62目)

(2) 物理天平 感量为 $0.2\text{g}$ 。

### 3. 分析步骤

(1) 称取固体酶样 $100\text{g}$ ,精确至 $0.2\text{g}$ 。

(2) 将规定的标准筛装上筛底盘,然后把称好的样品全部转入标准筛上,加盖,振荡筛分 $5\text{min}$ (并不时敲打筛帮),静置 $2\text{min}$ ,取下上盖,小心将筛上物全部转入到已知质量的烧杯中,用天平称量,计算 $X_1$ 。

(3) 洗涤剂用酶按产品标准中粒度规定,采用上下限双层筛进行筛分,称取双层筛的中间物(即下层的筛上物)质量,计算 $X_2$ 。

### 4. 计算

$$X_1 = \frac{100 - m}{100} \times 100\%$$

$$X_2 = \frac{m}{100} \times 100\%$$

式中,  $X_1$  为样品的细度 (质量分数), %;  $X_2$  为样品的粒度 (质量分数), %;  $m$  为筛上物 (或中间物) 的质量, g; 100 为取样量, g。

所得结果精确至整数。

#### 5. 结果的允许差

平行试验相对误差不得超过 1%。

### (八) 容量的试验方法

#### 1. 原理

量取固体酶或液体酶 100mL, 在 20℃, 称其质量, 计算单位体积酶的质量, 即为样品的容重, 以 g/mL 表示。

#### 2. 仪器和设备

(1) 恒温水浴 20℃ ± 1℃。

(2) 分析天平 感量为 0.1mg。

(3) 容量瓶 100mL (准确校正过)。

#### 3. 分析步骤

用一个洁净、干燥的已知质量的 100mL 容量瓶, 取下瓶塞, 在上口处放一个三角玻璃漏斗, 将酶样 (20℃) 自然地缓缓注入容量瓶中, 直至刻度。取下三角漏斗, 加盖瓶塞, 称量。

#### 4. 计算

$$X = \frac{m_1 - m}{100}$$

式中,  $X$  为样品的容重, g/mL;  $m_1$  为容量瓶加样品的质量, g;  $m$  为容量瓶的质量, g; 100 为取样体积, mL。

所得的结果精确至两位小数。

#### 5. 结果允许差

平行试验相对误差不得超过 5%。

### (九) pH 值的试验方法

#### 1. 原理

将指示 (玻璃) 电极和参比 (甘汞) 电极浸入被测样液中, 构成一个原电池, 其电动势与溶液的 pH 值有关, 通过测量原电池的电动势即可得出溶液的 pH 值。

#### 2. 试剂和溶液

(1) 酒石酸盐标准缓冲液 用无二氧化碳水溶解外消旋的酒石酸氢钾 ( $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ), 并剧烈振摇至饱和溶液。25℃时, pH3.56。

(2) 磷酸盐标准缓冲液 称取磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 3.40g 和磷酸氢二钾 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 3.55g, 溶于无二氧化碳的水中, 并稀释至 1000mL。25℃时, pH6.86。磷酸二氢钾和磷酸氢二钾须预先在 120℃ ± 10℃ 干燥 2h。

也可用专供校准用的混合磷酸盐 pH 缓冲液 (25℃, pH6.864)。

(3) 硼酸盐标准缓冲液 称取四硼酸钠 ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 3.81g, 溶于无二氧化碳水中, 并稀释至 1000mL, 此溶液浓度  $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}) = 0.01 \text{ mol/L}$ 。25℃时, pH9.18。存放时应防止空气中二氧化碳进入。

也可用专供校准用的硼砂 pH 缓冲液 (25℃, pH9.18) 配制。

(4) 氢氧化钙标准缓冲溶液 于 25℃, 用无二氧化碳水溶解氢氧化钙制成饱和溶液, 其浓度  $c[1/2\text{Ca}(\text{OH})_2]$  应在 0.0400 ~ 0.0412mol/L。存放时应防止空气中二氧化碳进入。

一旦出现浑浊，应弃去重配。25℃时，pH12.45。

(5) 水 符合 GB 6682 中三级水规格。

### 3. 仪器

(1) pH 计 分度值为 0.02 pH 值单位，并应有电磁搅拌器。

(2) 指示（玻璃）电极 用前须在水中浸泡 24h 以上，用后应立即清洗，并浸入水中。

(3) 参比（饱和甘汞）电极 使用时电极上端小孔的胶皮塞必须拔出，以防止产生扩散电位，影响测定结果。电极内氯化钾溶液中不能有气泡，以防止短路。

### 4. 分析步骤

(1) 将温度补偿旋钮调至 25℃，用接近被测溶液 pH 值的两种标准缓冲溶液校正 pH 计，定位。

(2) 用水冲洗电极，再用样液洗涤电极，调整样液温度并将温度补偿调至 25℃，测定样液的 pH 值。重复测定操作，直到 pH 值读数稳定 1min 为止。

所得结果精确至一位小数。

(3) 结果的允许差

平行试验之差不得超过 0.1 pH 值单位。

### (十) 洗涤剂用酶制剂崩解（溶解）时间的试验方法

#### 1. 原理

称取固体酶样 1g，放入一定量的水中，在规定的温度与搅拌速率下，记录其在水中全部崩解（溶解）所需的时间。

#### 2. 仪器

(1) 恒温水浴（30℃±0.2℃）。

(2) 电磁搅拌器（带温控的）。

(3) 分析天平（感量为 0.1mg）。

(4) 秒表。

#### 3. 分析步骤

称取固体酶样 1.000g，精确至 0.001g，置于事先盛有 100mL 30℃±0.2℃水的 150mL 烧杯中，放入一枚转子，置于 30℃电磁搅拌器上，立刻计时，以中速搅拌，记录样品在水中全部崩解（溶解）所需的时间。

正式试验时，根据预备试验的结果，按预测的时间停止搅拌，观察并记录在水中全部崩解（溶解）的时间。所得结果精确至秒。

#### 4. 结果的允许差

平行试验之差不得超过 30s。

### (十一) 酶活力保存率的计算方法

#### 1. 原理

根据标签上标示的酶活力和实测的酶活力，计算出实测酶活力为标示酶活力的百分数。

#### 2. 酶活力保存率的计算

$$X = \frac{E_1}{E} \times 100\%$$

式中，X 为样品的酶活力保存率，%；E<sub>1</sub> 为样品的实测酶活力，U/g 或 U/mL；E 为样品的标示酶活力，U/g 或 U/mL。

所得结果精确至整数。

## (十二) 卫生要求的检测

1. 重金属的测定, 按 GB 8451 进行。
2. 细菌总数的测定, 按 GB 4789.2 进行。
3. 大肠菌群的测定, 按 GB 4789.3 进行。
4. 霉菌和酵母的测定, 按 GB 4789.15 进行。
5. 沙门菌的检验, 按 GB 4789.4 进行。

## 九、工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮运

中华人民共和国行业标准 QB/T 1804—1993 General principles of inspection and mark, packing, transport, storage for industrial enzymes

### (一) 主题内容与适用范围

本标准规定了工业用酶制剂的检验规则和标志、包装、运输、贮存要求。

本标准适用于经提纯制取且包装出厂的各种工业用酶制剂。

### (二) 检验规则

#### 1. 组批

生产厂以每一班次或每一罐次生产的且经包装出厂的、具有同样工艺条件、同一产品名称、批号、规格的同质量证明书的产品为一批。

#### 2. 不合格项目分类

- (1) A类不合格项目 沙门菌、霉菌、大肠菌群、细菌总数、重金属。
- (2) B类不合格项目 酶活力、酶活力保存率、干燥失重、pH值。
- (3) C类不合格项目 外观、气味、细(粒)度、容重、净重(净体积)、包装、标签。

#### 3. 检验分类

##### (1) 出厂检验(交收检验)

① 产品出产前, 须由生产厂的质量检验部门, 按本标准和产品标准规定逐批进行检验, 检验合格并签发质量合格的产品, 方可出厂。

② 出厂检验项目包括外观、气味、酶活力、酶活力保存率、干燥失重、细(粒)度、pH值、净重(净体积)、包装、标签。

##### (2) 型式检验(例行检验)

① 一般情况下, 一个季度进行一次。有下列情况之一者, 也需要进行型式检验。

- a. 更改主要原辅材料。
- b. 工艺上有较大更改与变化。
- c. 长期停产后, 恢复生产。
- d. 出厂检验与上次型式检验结果有较大差异。
- e. 国家质量监督机构进行抽查。

② 型式检验项目为产品标准中的全部技术要求。

#### 4. 抽样与判定

(1) 外观、气味、净重(净体积)、包装及标签按附表16抽样并判定。

(2) 其他项目按附表16抽取样品, 充分混匀后分析, 单项进行判定。如有A类不合格项, 就判整批产品不合格, 并不予复验; 有B类不合格项, 或有两个或两个以上C类不合格项, 应重新自同批产品中抽取两倍量样品进行复验, 以复验结果为准。若仍有B类不合格项或有两个或两个以上C类不合格项, 就判整批产品为不合格。

附表 16

批量范围箱/桶、袋	样本大小箱/桶、袋	合格判定数(Ac)	不合格判定数(Re)
1~25	2	0	1
26~150	3	0	1
151~1200	5	1	2
1201~3500	8	1	2
>35001	13	2	3

(3) 包装检查方法：固体剂型酶制剂，将单位小包装封口朝下，抖动 3 次，不得有撒漏现象；液体剂型酶制剂，将桶的封口塞拧紧，把桶倒置 1min，不得有渗漏。

5. 受获方有权在交货当时，从交付批产品中抽样，按本标准和产品标准规定进行验收检验。其中酶活力指标应在收货后 10 天内完成检验及报告。

6. 若供需双方对产品质量发生争议时，可由双方协商，选定仲裁单位委托其检验仲裁，费用由败诉方承担。

### (三) 标志、包装、运输、贮存

1. 产品外包装须用内衬食品用塑料薄膜或防潮纸的纸板箱或塑料桶。外包装上应注明产品名称、生产厂名、厂址、规格、出厂日期、净重（净体积）及单位包装数量、注册商标，还应附有质量检验合格证。

2. 产品内包装应使用聚乙烯塑料袋或符合食品卫生要求的铝箔袋、塑料瓶（桶）及其他无毒容器。

内包装上应注明产品名称、生产厂名、商标、规格（酶活力）、单位包装净量、出厂日期（批号）、执行标准号及等级、贮存条件与保质期。

3. 内包装，固体酶规格分为 0.5kg、1.0kg、2.0kg 3 种，液体酶分为 0.5L、1.25L、25L 3 种，或按供需双方合同执行。质量允许公差净重（净体积）不大于 2.0kg（2.0L），允许公差为  $\pm 2\%$ ；大于 2.0kg（2.0L）为  $\pm 1\%$ 。但每箱总质量不得低于包装箱上标记数。

4. 酶制剂含有生物活性物质，在运输过程中应防雨、防潮，防止日光曝晒。装卸时应轻拿轻放，码放整齐，防止倾倒重压。

5. 产品在贮运过程中，严禁与有毒、有害、有腐蚀性物品和其他污染物混装、混贮、混运。

6. 产品应贮存在清洁、阴凉、干燥、通风的库房中，或采用低温（5~10℃）贮存，以提高酶的稳定性，延长保质期。

7. 产品酶活力保存率的限定日期即为最低保质期，固体酶为半年，液体酶为 3 个月。各生产厂可根据实际情况具体标注。超过保质期，酶活力可能降低，但仍能使用，只是使用量需相应增加。



## 内容提要

本书阐述酶、酶学及酶工程的一般概念及其发展和应用的基本理论与基本技术，尤其强调酶概念、酶技术及酶应用领域的拓展。具体内容包括：酶学、酶技术、酶的分离纯化、酶的固定化、酶的生产、酶制剂、酶的应用、酶反应器、酶化工、酶的研究方法等。同时附录有常用酶的检测方法和工业化酶制剂的标准。

本书可作为相关专业科技工作者及有关行业技术人员的参考书，也可作为高等学校生物工程、食品工程等相关专业的教材。

ISBN 7-5025-8595-8



9 787502 585952 >

销售分类建议：生物/生物技术

ISBN 7-5025-8595-8

定价：46.00元