

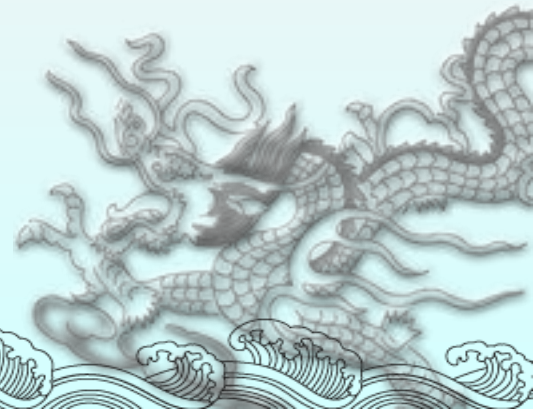
# 第九章 酶与酶工程

Enzyme And Enzyme Engineering



# 主要内容

- 第一节 酶的基本概念
- 第二节 酶工程发展概况
- 第三节 酶的生产和应用

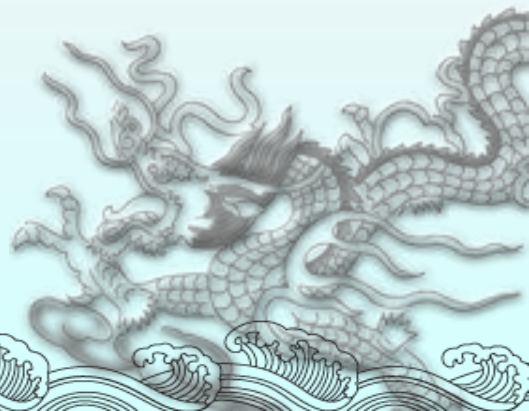


# 第一节 酶的基本概念

一、人们对酶的认识和酶的生物学意义

二、酶的催化特性

三、酶活力的测定



# 一、人类对酶的认识及其生物学意义

人们对酶的认识最早起源于酿酒、造酱、制饴和治病等生产与生活实践



# 制酱过程：蒸煮、制曲、发酵







香种玫瑰







香酥玫瑰





香辣玫瑰

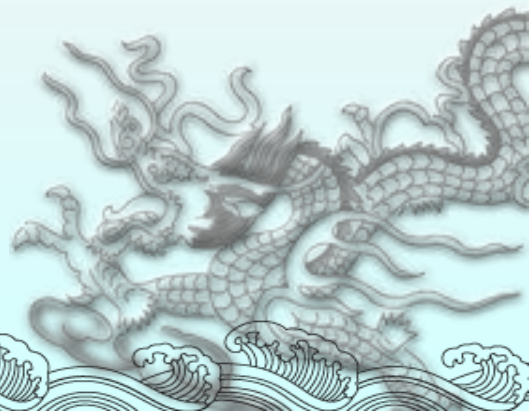
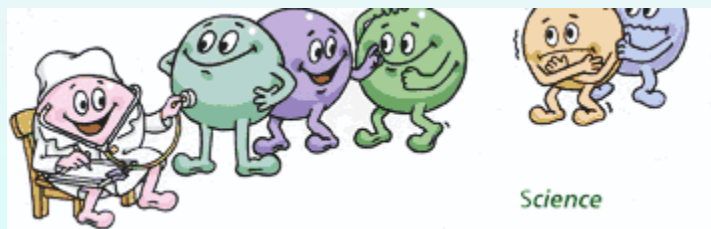


# 中国

我们的祖先在几千年以前就已经开始利用酶：

- 夏禹时代，人们就会酿酒；
- “周礼”上也已有造酱、制饴的记载；
- 春秋战国时期，已采用曲治疗消化不良等疾病的案例。

当然，在那个时代，我们祖先对酶还是缺乏认识。



# 西方

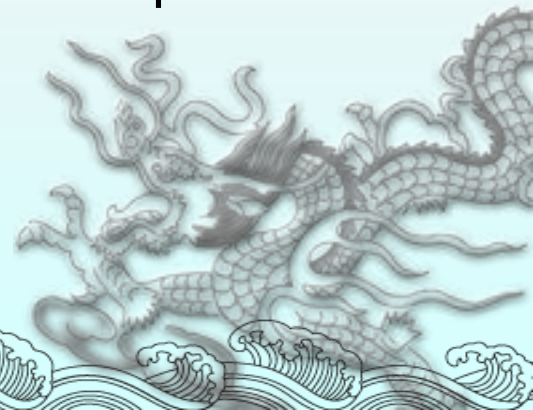
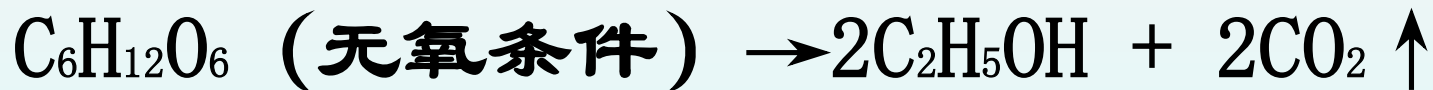
随着人们对酿酒发酵过程研究的深入，从19世纪起对酶的认识也逐渐深入。



# 模糊的认识阶段

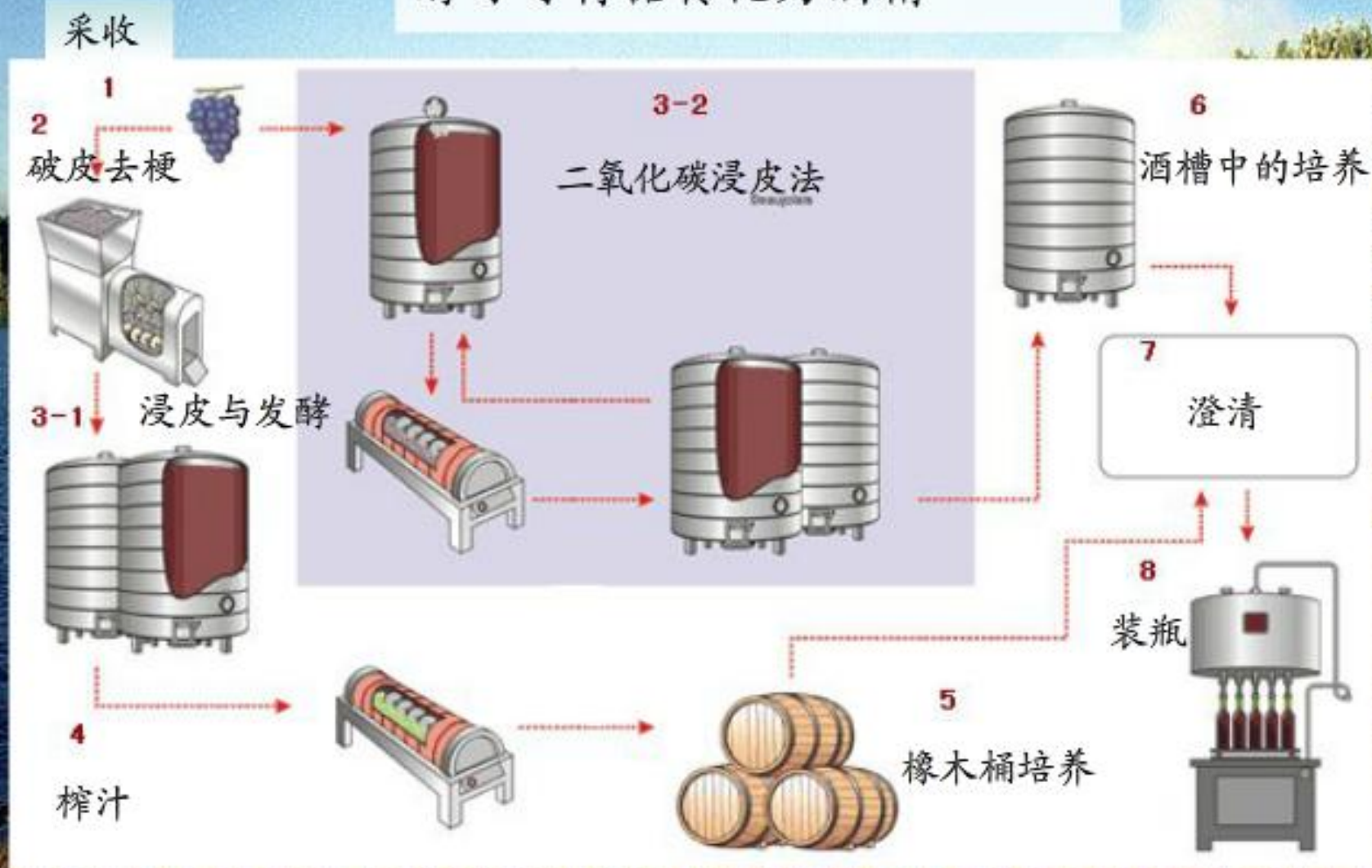
——1810年Jaseph-Lussac发现：

**酵母可将糖转化为酒精**



# 葡萄酒酿造

1810年, Jaseph-Gaylussac:  
酵母可将糖转化为酒精

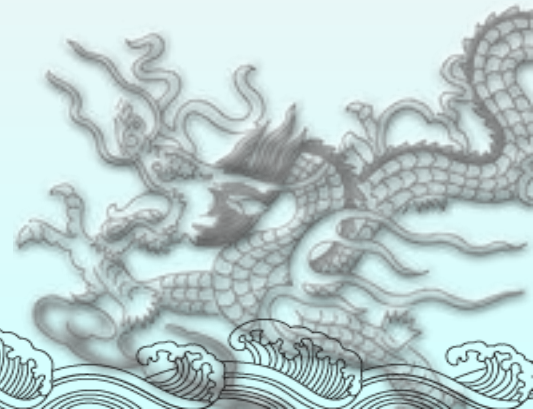


# ◆ 酶的现代史可以追溯到1833年

1833年, 佩恩 (Payen) 和帕索兹 (Persoz) 首先发现酶;

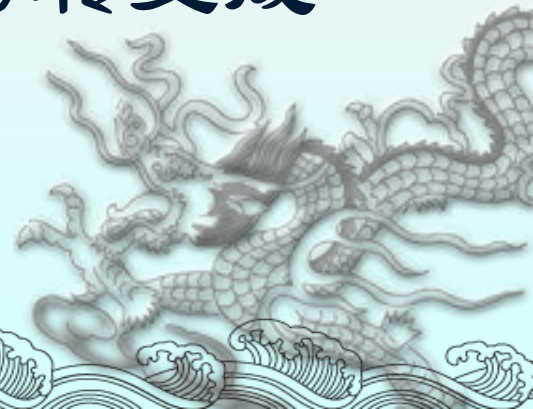


Payen



# 1833年,他们在Annales de Chemie et de Physique期刊发表文章

文章中,法国化学家Anselme Payen和Jean-Francois Persoz描述了从大麦的麦芽中分离淀粉酶多聚体的过程,并将之命名为**淀粉酶**。该产物将糊化淀粉转变成糖,主要是麦芽糖。





1835年瑞典的Jöns Jacob Berzelius

首次证明了用麦芽提取物可以比硫酸更有效地降解淀粉，并将这一过程称为催化。



# 胃蛋白酶的发现

1783, 意, 斯帕兰札尼 (L. Spallanzani, 1729 ~ 1799) :

肉块 → 小巧金属笼, 鹰吞下。一段时间后, 取出小笼子

肉块消失

1. 为何要将肉块放入笼子中?

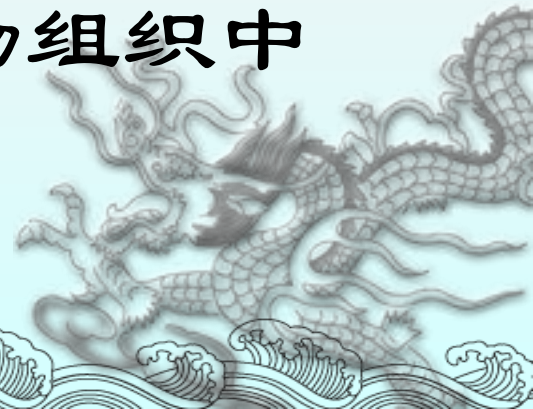
2. 是什么物质使肉块消失了?



**1836年德国生理学家**  
**Theodor Schwann (施旺)**



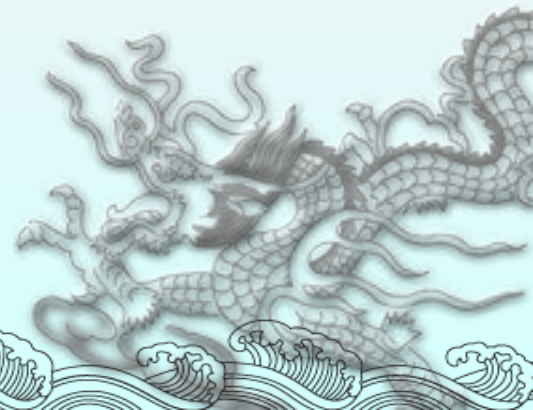
在研究消化过程时，分离出一种在胃内消化蛋白的物质，将它命名为胃蛋白酶。这是第一个从动物组织中提取到的酶。



在对酶的认识上还存在着一段长达60年关于酵母的争论

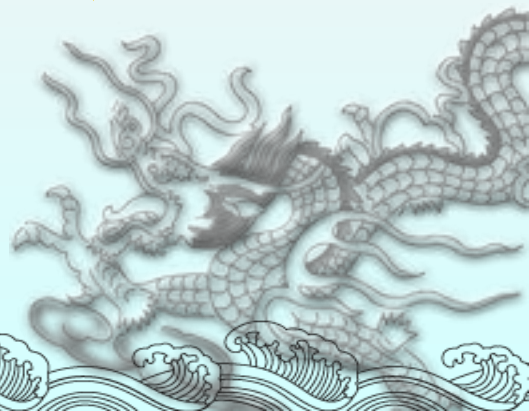


**1839年，德国化学家Jutus von Liebig建立了一个模型来阐述酵母在发酵过程中的作用。他把在发酵混合液中的酵母看作一个能产生震荡的分解物质：蔗糖原子经过重排，变为酒精和二氧化碳。**



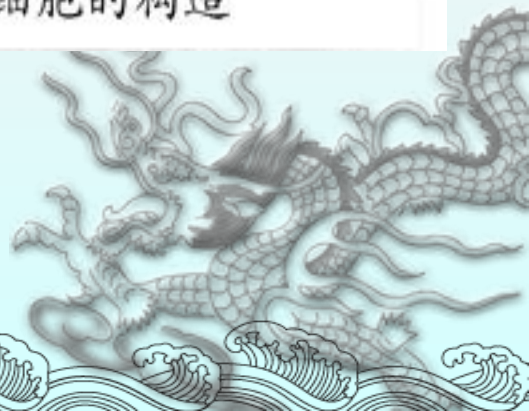
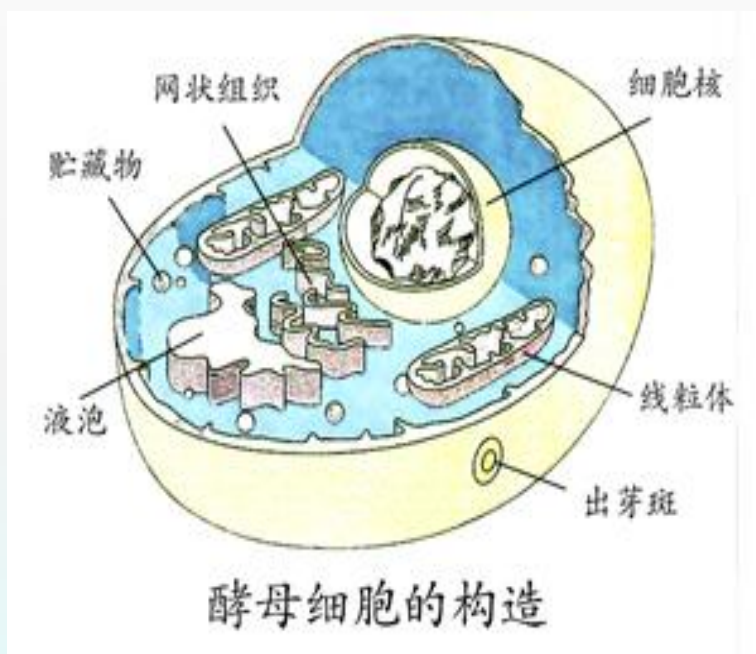
Liebig首次认为发酵现象是由于酵母细胞中含有发酵酶，是发酵酶催化糖发酵产生酒精。

但由于当时科学和技术的限制，他未能从酵母细胞中制备出可催化发酵的酶制品。



而到1858年，法国化学及生物学家Louis Pasteur发表一系列文章证明发酵仅在活体细胞状态下才会发生——

- ◆ 即是与生命相关的现象
- ◆ Louis Pasteur视其为一种生理活动。



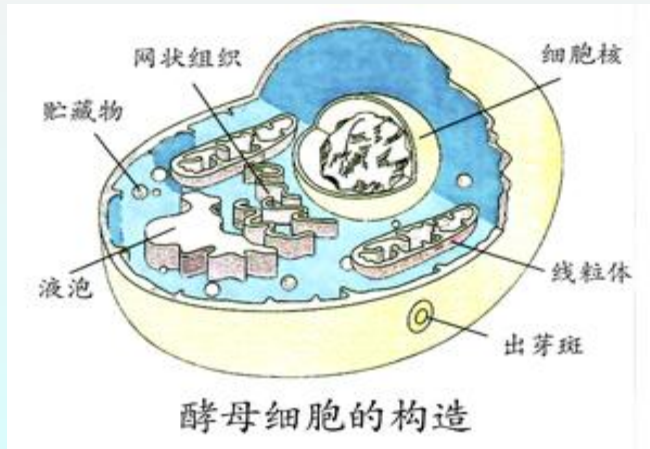
**对酵母在发酵过程中作用机理的分歧，引发了Liebig和Pasteur之间的激烈争论。**



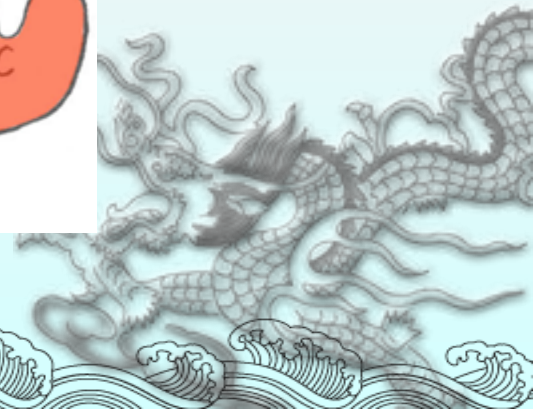
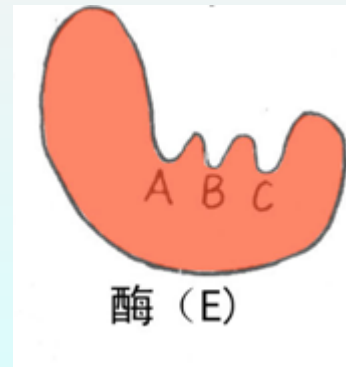
**直到Liebig和Pasteur先后于1873年和1895年去世，争论仍未结束。**



1897年，德国化学家  
Eduard Büchner 和 Hans  
Büchner（常称Büchner 兄弟）  
发现一种离体酵母提取物可以  
使酒精发酵，即酵母细胞  
产生一种酶，这种酶引起发  
酵。



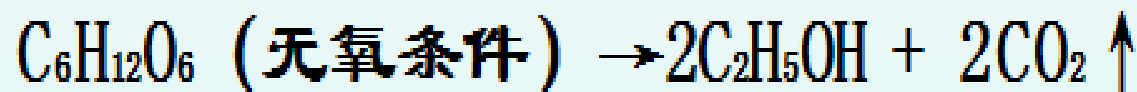
分离



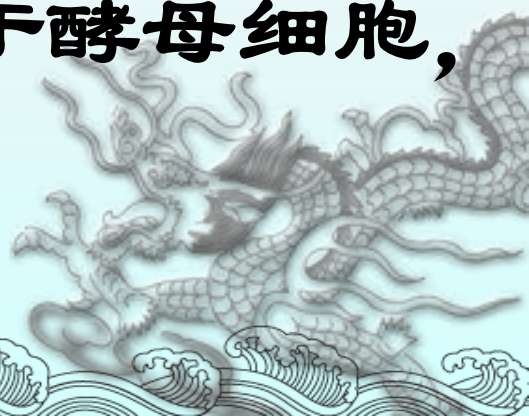
**离体酵母提取物(发酵酶)**

**活体酵母细胞**

**效果相同**



**换句话说，这一转变并不依赖于酵母细胞，而是依赖于无生命的酶。**



# Buecher兄弟研究结果的意义

——从实验上说明了发酵与细胞的活力无关

——表明了酶能够以溶解的、有活性的状态从破碎的细胞中分离出来

——推动了酶的分离以及对酶的理化性质的进一步探讨和研究



- ◆ 至此，Liebig和Pasteur之间的争论就最终得到解决。
- ◆ Büchner兄弟也由此奠定了现代生物化学的基石。



**从此时开始，人类对  
具有生物催化的酶有了  
一个较为清晰的认识**

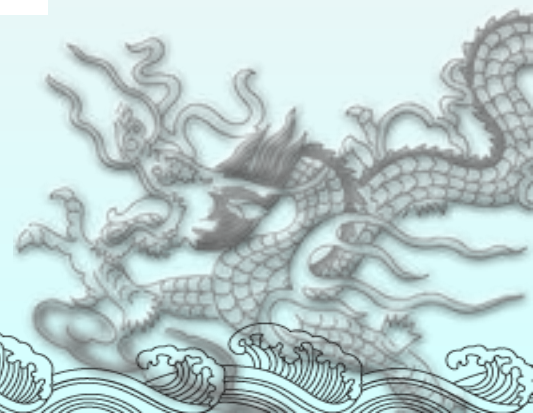
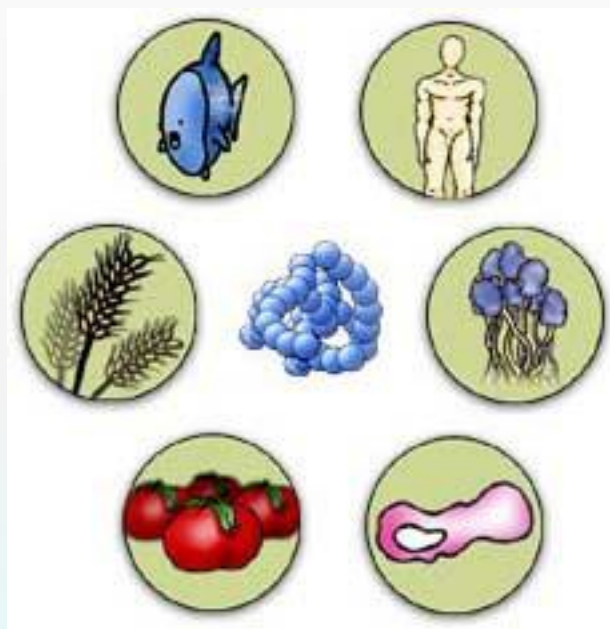


# ◆ 酶的生物学意义

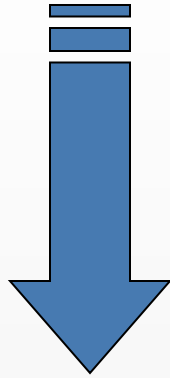


# 1 酶无所不在

从微生物再到植物再到人，酶是所有有机体的组成成分。

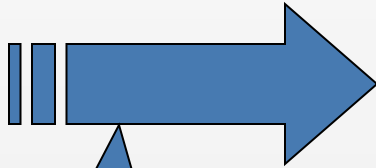


生物体内，组成生命活动的大量生化反应都是在酶的催化作用下得以有序而顺利地进行，进而保证了正常代谢途径的畅通而不发生副反应，几乎所有生物的生理现象都与酶的作用紧密相关

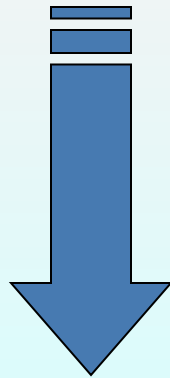


生命活动

可以这样说，没有酶的存在，就没有生物体的一切生命活动

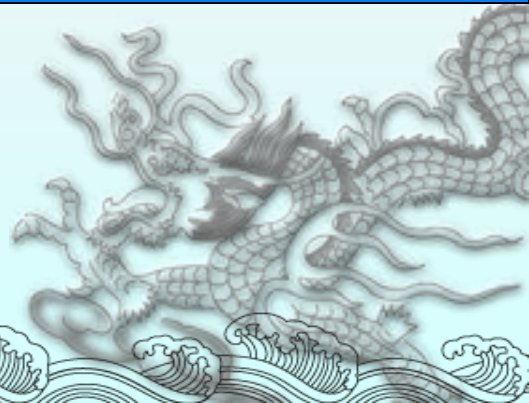


生化反应



在酶的催化作用下

酶是一类生物催化剂





## 2 酶可分解食物

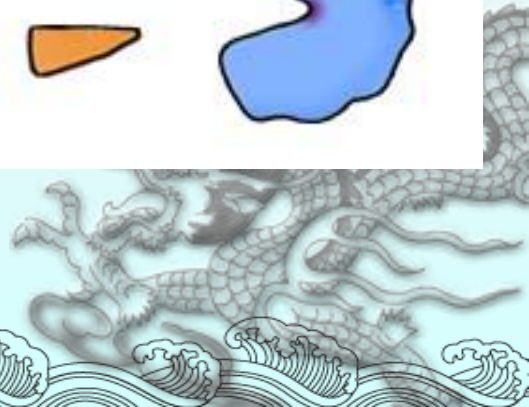
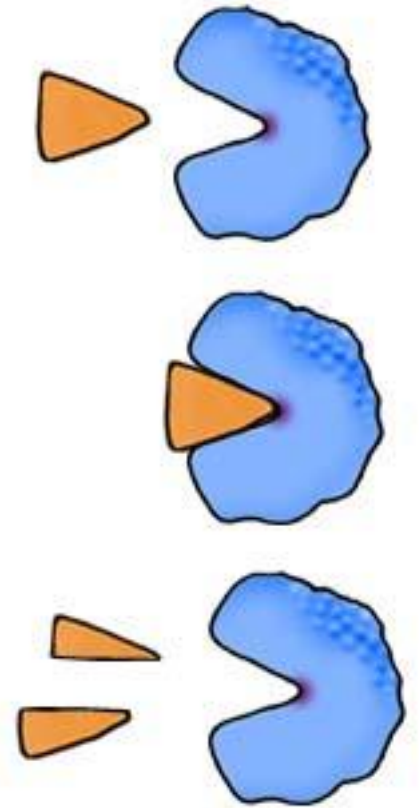
食物从口腔到肠道的过程中，不同的酶作用于食物的不同成分，将其分解。

没有酶，人会饥饿而死。

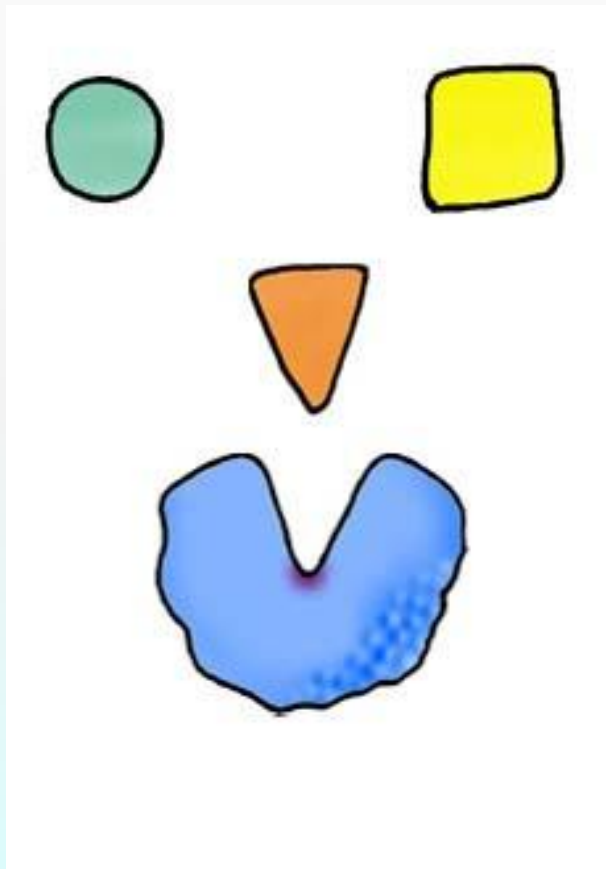


### 3 酶是生物体自身的工程师

酶能将生物物质切割为小的碎片，再将其重新连接起来。这样酶在我们的身体内分解或合成所有生命必需的物质。



## 4 每一种酶都有其特定的功能

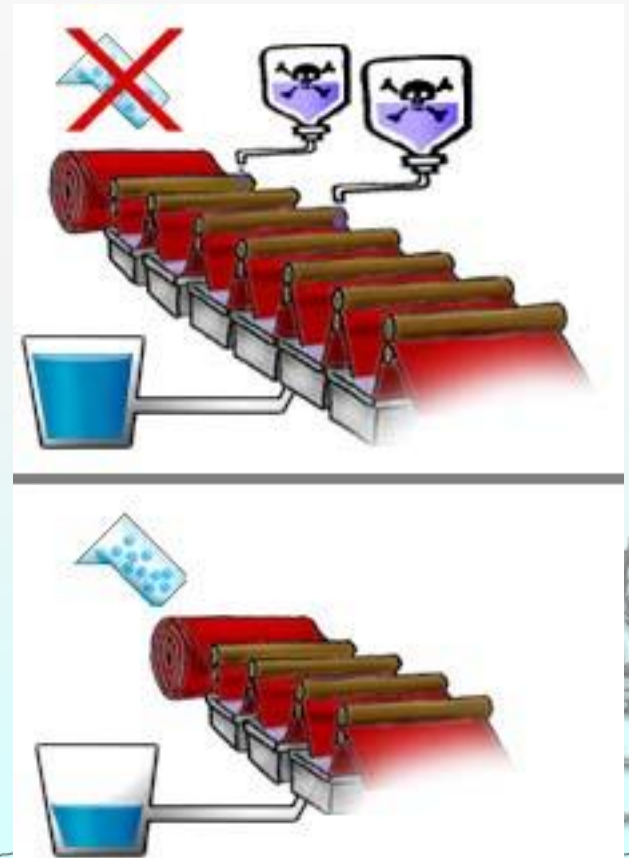


酶的一个很独特的性质是，每种酶只催化一种反应或者其逆反应。

底物与酶象钥匙与锁一样配套。只有当酶找到其合适的底物时，生化反应才会发生。

## 5 酶是工业问题的自然解决方案

化学制剂用于纺织业生产。如果改用酶，就没有化学制剂所带来的危险，而且生产过程中产生的污水更少。



# 6 日常生活离不开酶

在洗涤剂、纺织、食品和饲料工业等许多行业中，酶已经使用了50多年。在这些工业中，酶取代了化学制剂，节约了水、原材料和能源。

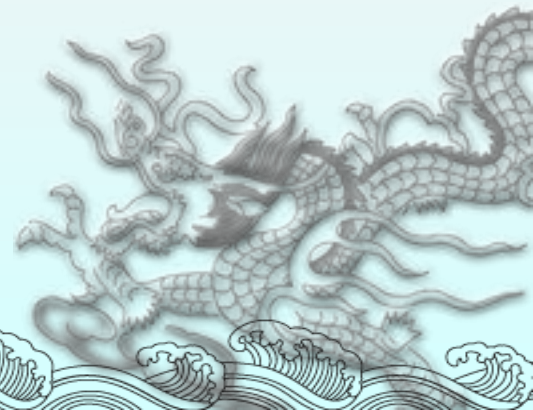


# 人类对酶的化学本质的认识

历史上对酶的化学本质的认识也经历了一个曲折的过程



自从人类对酶的催化作用有了认识以后，一直到上世纪初，对酶的化学本质认识都存在争议，主要是酶的化学本质是什么没有一个统一的认识。



上世纪20年代初，著名学者Richard Willstatter认为酶是蛋白质制备过程中的其他污染物质，而非蛋白质。





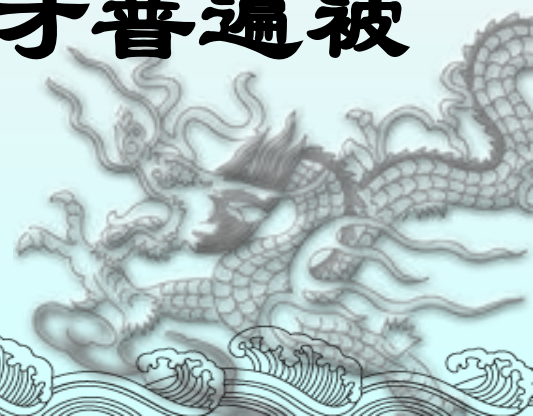
——1926年Sumner第一个通过  
分离和结晶得到了脲酶

提出了酶是由蛋白质组成  
的观点



——直到Northrop和Kunitz得到了胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶的结晶，并用相关的实验方法证实酶是一种蛋白质

此后，酶的蛋白质属性才普遍被人们接受。

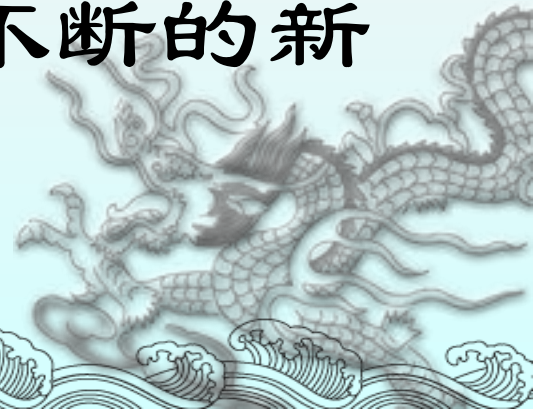


**迄今为止，所发现的酶已经  
超过4000种，而这些酶都是  
由生物体自然产生的具有催化  
能力的是蛋白质**



## 酶的定义：

酶是由活细胞产生的，在细胞内、外一定条件下都能起催化作用的具有高效率 and 高度专一性的一类特殊蛋白质。酶能在机体内十分温和的条件下高效率地起催化作用，使得生物体内的各种物质处于不断的新陈代谢中。



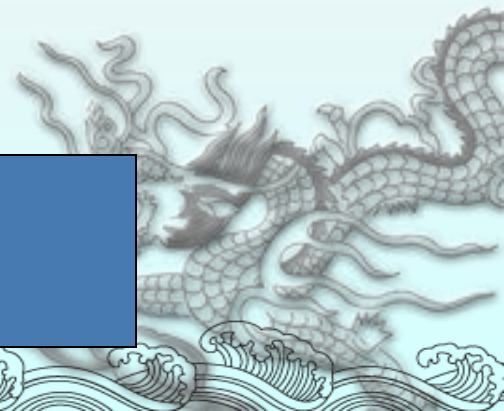
氨基酸

不分枝的一条或  
多条多肽链组成

蛋白质

酶 (酶的化学本质)

酶的  
化学  
本质



## 二、酶的生物催化特性

与一般的化学催化剂相比较，酶既拥有一般催化剂的**共性**，又有**特性**



# 酶催化作用的特点

特性

加快反应速度

降低反应的活化能

不改变反应性质、数量

酶催化作用的特点

催化效率高

专一性强

反应条件温和

共性



# 酶能显著地降低化学反应的活化能

◆  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  过氧化氢的分解反应

◆ 无催化剂时活化能为75.5kJ/mol

◆ 液态钨催化时活化能为48.9kJ/mol

◆ 过氧化氢酶催化时为8.4kJ/mol

◆ 蔗糖  $\rightarrow$  果糖 + 葡萄糖

◆ 无催化剂时活化能为1339.8kJ/mol

◆  $\text{H}^+$  (酸) 催化时活化能为104.7kJ/mol

◆ 蔗糖酶催化时为39.4kJ/mol

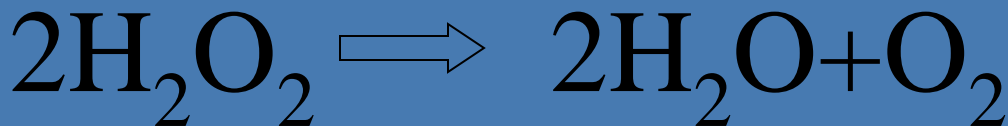


极高的催化效率

酶的催化效率相对其他无机  
或有机催化剂要高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍

例子

$\text{Fe}^{2+}$ 作为催化剂  
催化效率为  
 $6 \times 10^{-4} \text{ mol}/(\text{mol}\cdot\text{s})$



过氧化氢酶，催化效率  
为 $6 \times 10^6 \text{ mol}/(\text{mol}\cdot\text{s})$

过氧化氢酶比 $\text{Fe}^{2+}$   
的催化效率要高出  
 $10^{10}$ 倍

# 高度专一性

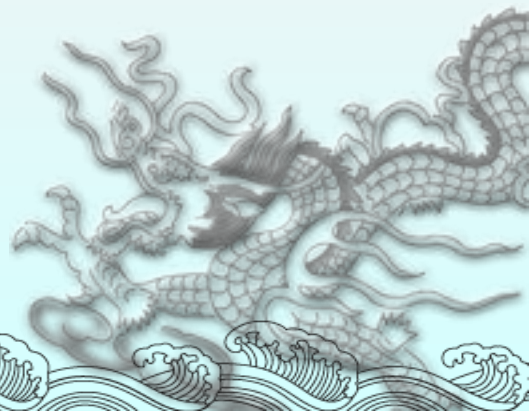
从根本上保证了生物体内为数众多的各种各样的化学反应能有条不紊地协同进行

酶对它所作用的底物有严格的选择性，一种酶只能催化某一类，甚至是某一种物质起化学反应

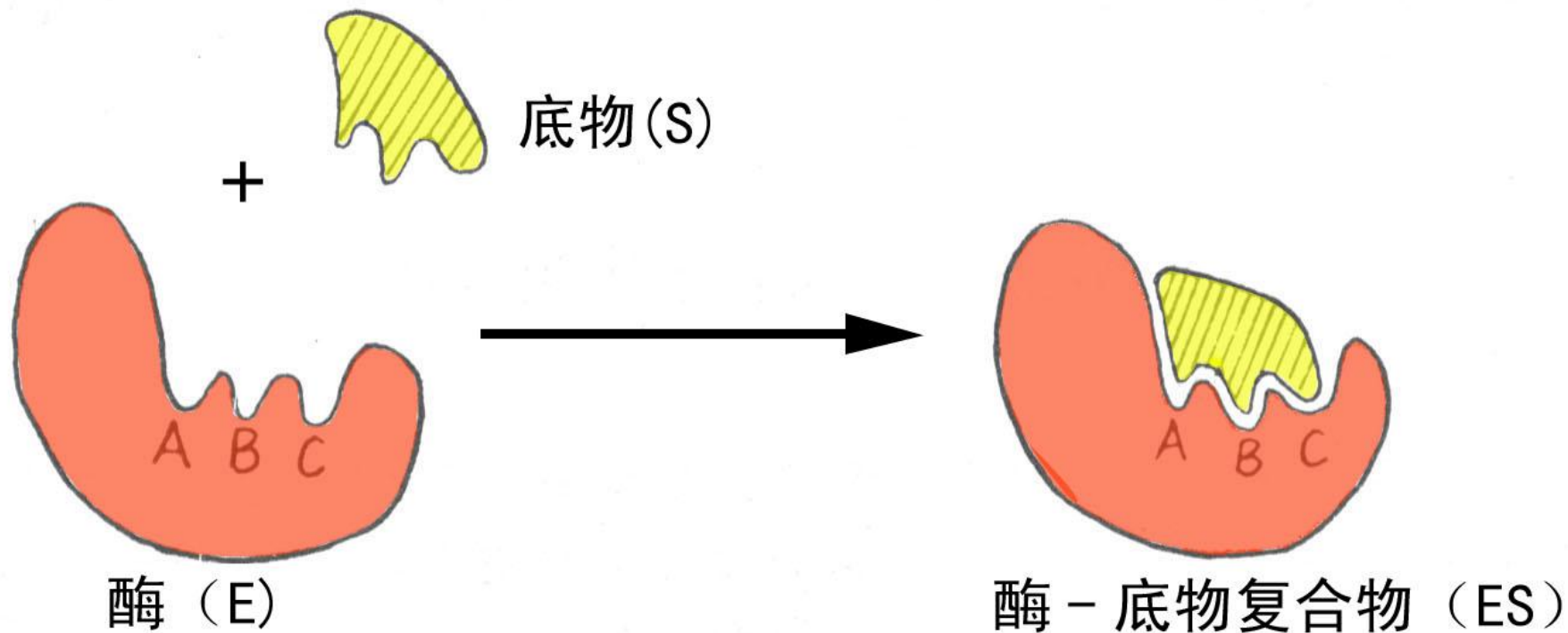
底物专一性

酶的专一性

反应专一性

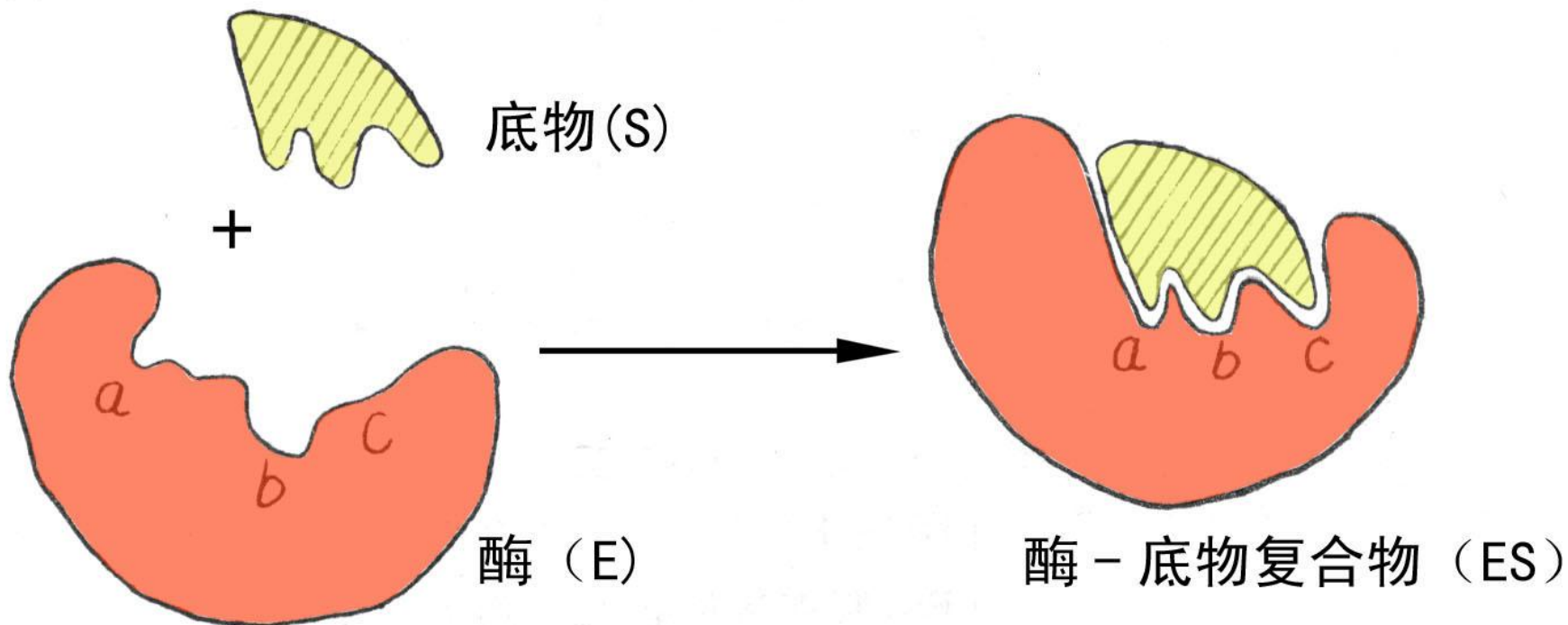


# 高度专一性-锁 钥 学 说



酶与底物严格互补

# 高度专一性-诱导契合学说



酶变形以适合底物

# 反应条件温和

接近中性的pH值

常温

温和的反应条件

常压

不需要耐高温、高压以及耐强酸、强碱的反应器

# 三、酶活力的测定



**酶活力**，也就是酶活性，是指酶催化一定化学反应的能力。

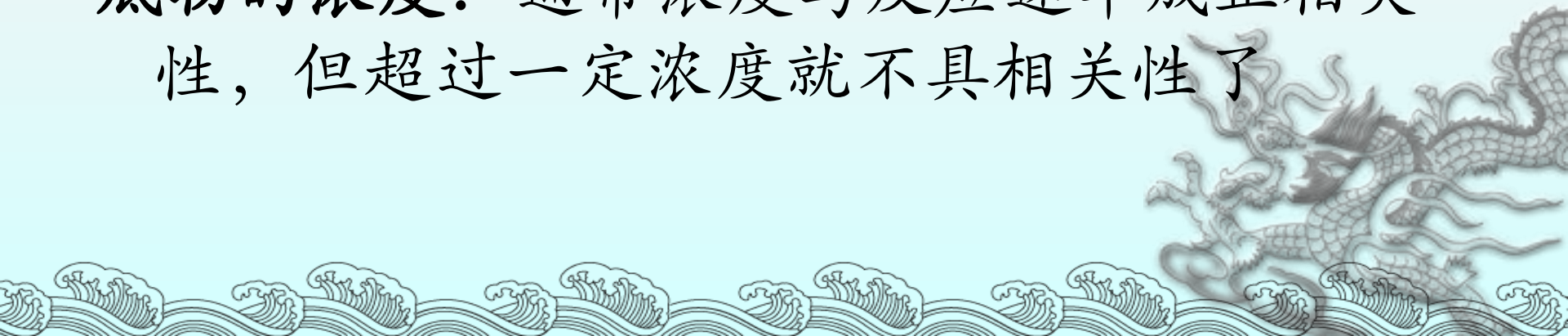


# 影响酶促反应速率的因素

温度：通常为 $25^{\circ}\text{C}$ ， $30^{\circ}\text{C}$ ， $37^{\circ}\text{C}$

**PH值**：选择合适的PH缓冲系统控制PH值

底物的浓度：通常浓度与反应速率成正相关性，但超过一定浓度就不具相关性了



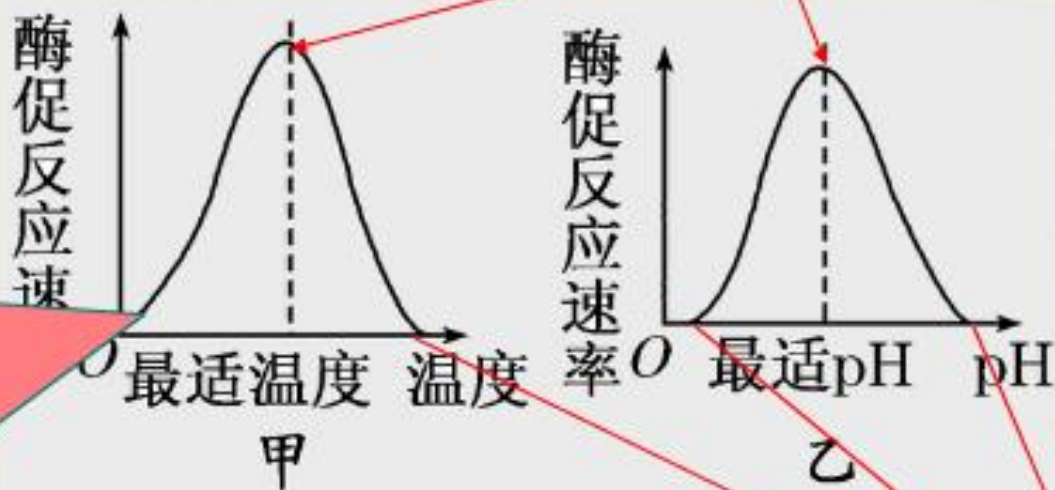


# 【影响酶促反应速率的曲线解读】

## 【典型图示1】

在一定温度(pH)范围内，随温度(pH)的升高，酶的催化作用增强，超过这一范围，酶的催化作用逐渐减弱。

低温只是抑制酶的活性，酶分子结构未被破坏，温度升高可恢复活性。



信息解读

图1 温度和pH对酶促反应速率的影响

温度和pH是通过影响酶活性来影响酶促反应速度的

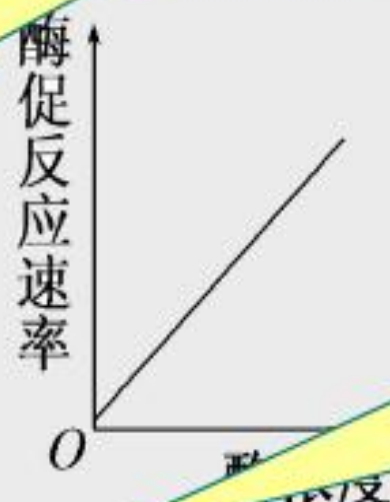
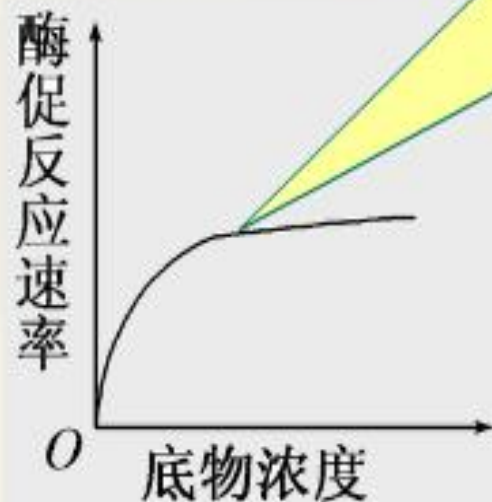
高温、过酸、过碱 都会使酶变性失活

## [典型图示2]

2

当底物达到一定浓度后，受酶数量和酶活性限制，酶促反应速率不再增加

信息解读



在底物充足、其他条件适宜的情况下，酶促反应速率与酶浓度呈正相关。

丁(在底物足量情况下)

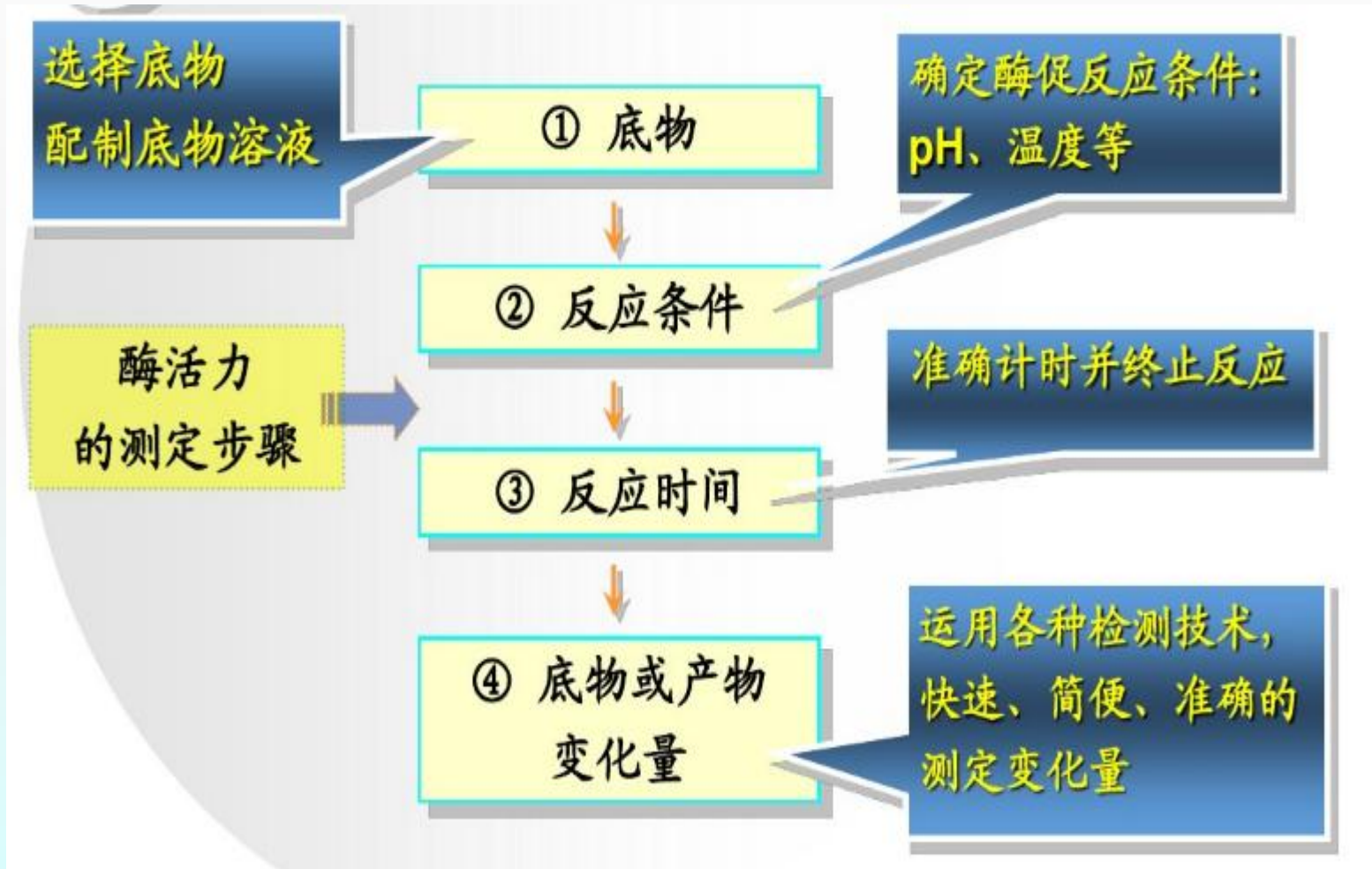
图2 底物浓度和酶浓度对酶促反应速率的影响

丙


1 在其他条件适宜、酶量一定的情况下，酶促反应速率随底物浓度增加而加快

底物浓度和酶浓度是通过影响底物与酶的接触来影响酶促反应速率的，并不影响酶的活性。

# 1、酶活力测定一般步骤



## 2、酶活力测定方法



### 酶活力的测定方法

1.分光光度法

2.荧光法

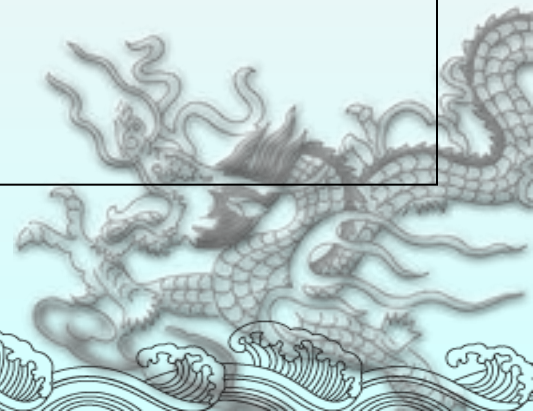
3.同位素测定法

4.电化学方法

5.其他方法

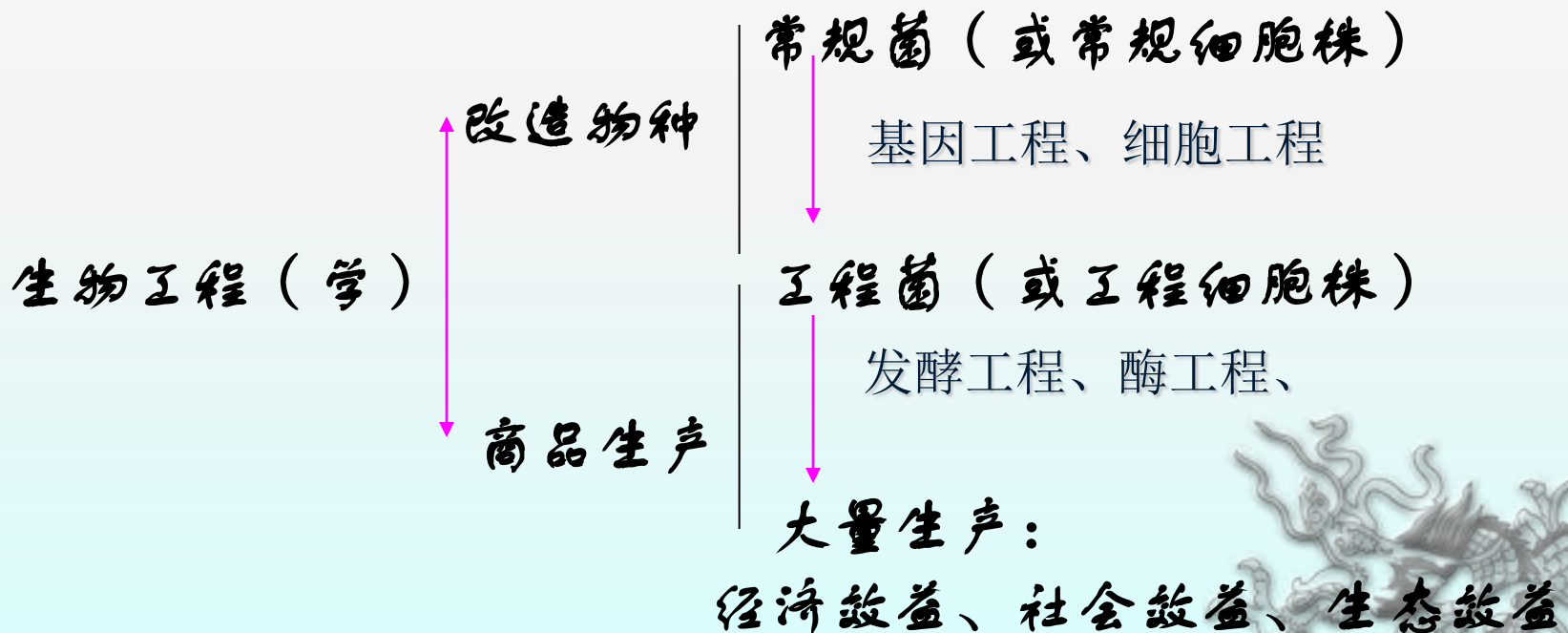
## 第二节 酶工程发展概况

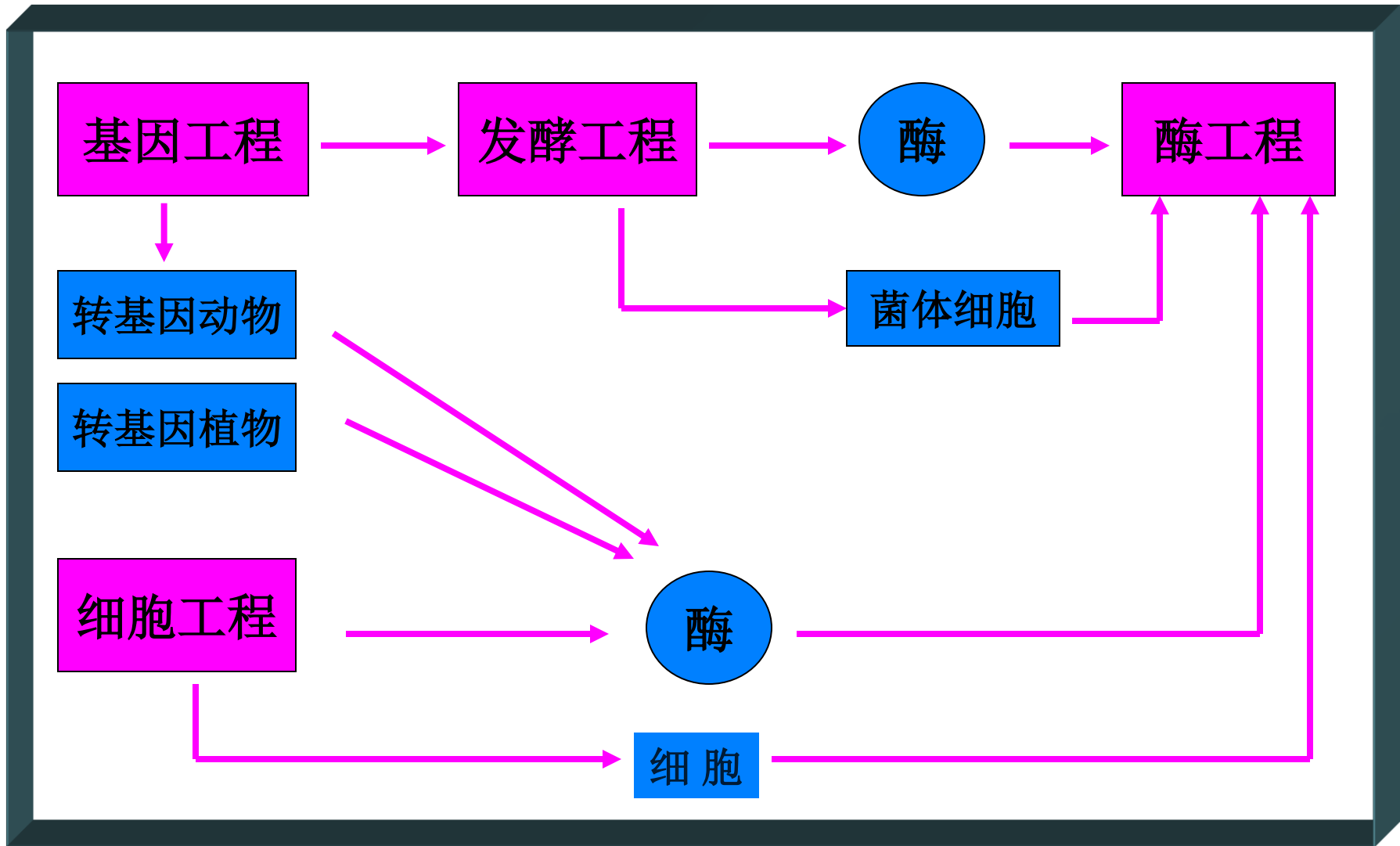
- 一、酶工程是生物工程的重要组成部分
- 二、酶工程的研究内容
- 三、酶和酶工程研究的重要意义
- 四、酶和酶工程研究进展



# 一、酶工程是生物技术的重要组成部分

酶工程与发酵工程、基因工程和细胞工程具有密切的联系，相互依存，相互促进，构成完整的生物工程。

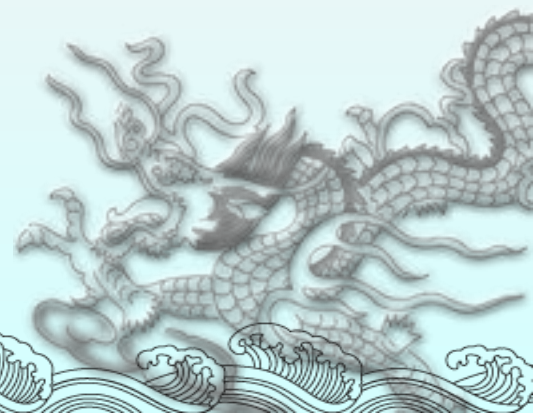




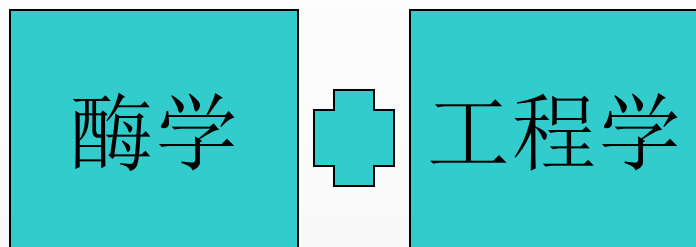
酶工程与发酵工程、基因工程和细胞工程的关系

## 二、酶工程的主要研究内容

酶工程是酶学基本原理与化学工程相结合而形成的一门新兴的技术科学。研究酶制剂大规模生产及应用所涉及的理论与技术方法。







酶工程是酶学与工程学相互渗透、结合并发展而形成的一门新的技术科学

酶工程

从应用的目的出发研究酶、应用酶的特异性催化功能，并通过工程化将相应的原料转化为有用物质的技术

酶工程的定义

## 酶工程的内容

# 酶工程

酶的大批量生产、应用

酶的分离纯化

新酶的开发和应用

遗传修饰酶的研究

酶生产中基因工程

抗体酶、核酸酶的研究

酶的结构与功能关系

模拟酶、合成酶以及酶分子的人工设计

### 三、酶和酶工程研究的重要意义

- ◆ 有助于阐明生命的本质和活动规律；
- ◆ 为催化剂设计，药物设计及疾病诊断治疗提供依据和新思路；
- ◆ 运用酶的发酵技术生产有重要价值的产品；
- ◆ 运用酶技术改进生产工艺，提高产品质量和产率，降低生产成本；



# 第三节 酶的生产方法和应用前景



# 一 酶的来源和生产



# 酶的来源

微生物

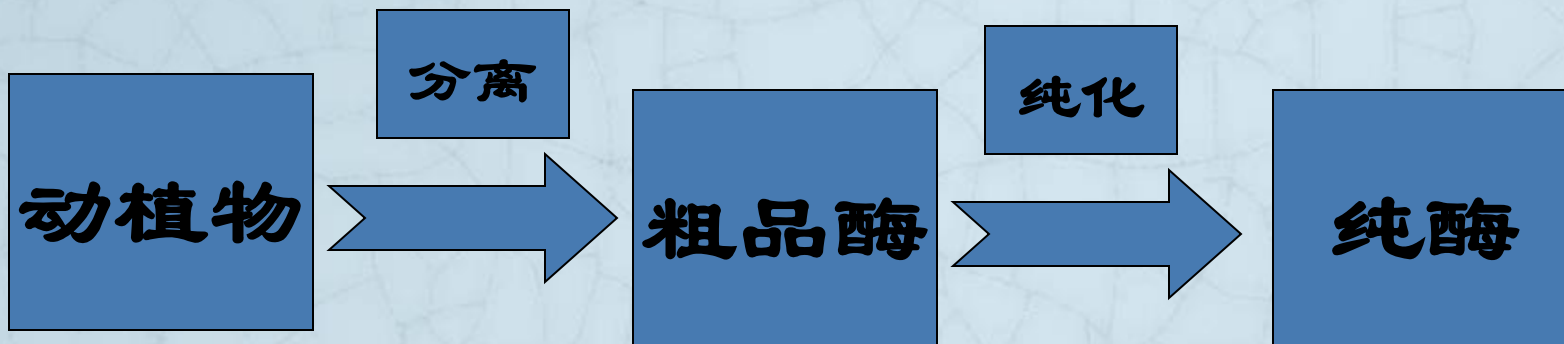
动物

酶

植物

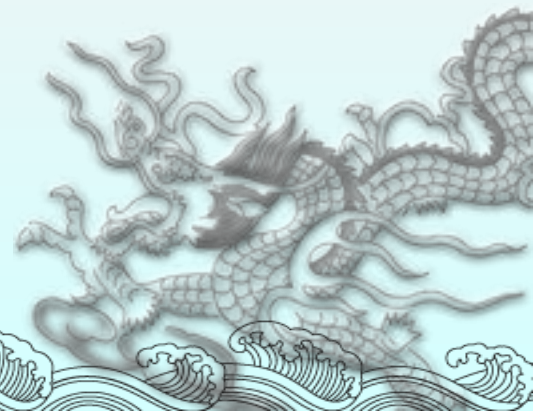


# 早期酶的生产



## 以动植物为原料生产的酶有：

- ◆ 尿激酶（从人尿中提取）
- ◆ 凝血酶（从猪血中提取）
- ◆ 抑肽酶（从牛肺或胰脏中提取）
- ◆ 过氧化氢酶（从动物肝脏中提取）
- ◆ 菠萝蛋白酶（从菠萝中提取）
- ◆ 木瓜蛋白酶（从木瓜中提取）





动植物原料的特点和不足

生产周期长

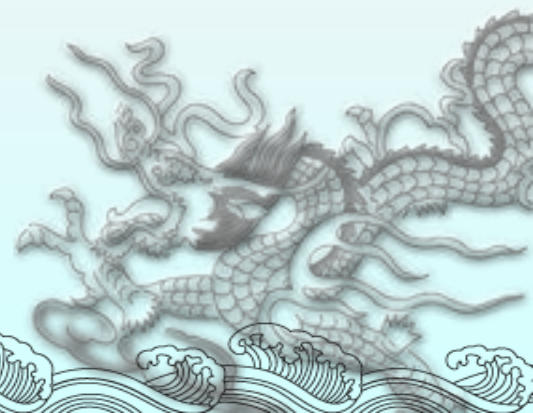
来源有限

地理、气候  
和季节影响

技术、经济  
以及伦理

不能满  
足要求

?



# 酶的化学合成

中国科学家  
1964年

胰岛素

Gutte和  
Merrilield  
1969年

核糖  
核酸酶

化学合  
成法

经济

试剂

设备

可行性?

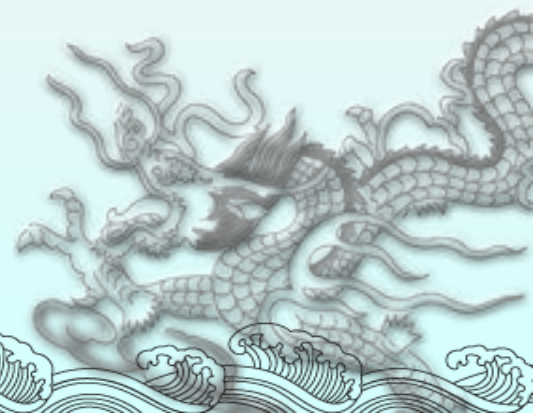


微生物发酵法

商品酶的主要  
生产方法

微生物

酶



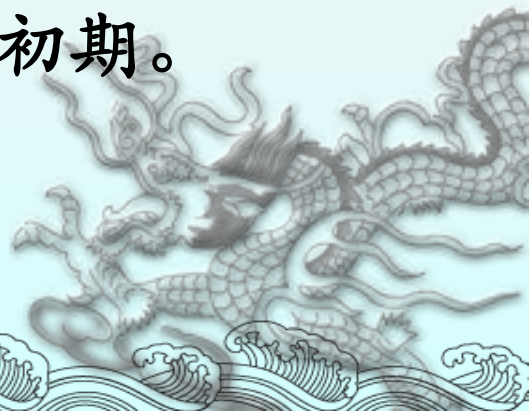
# 利用微生物产酶

## 一 产酶微生物的发现及筛选



# 1. 酶的来源与多样性：

- ◆ 80%以上的新酶来源于微生物，动物与植物来源的只占很少一部分。
- ◆ 微生物的多样性与丰富的资源促成了酶的多样性。
- ◆ 筛选微生物及其酶仍是目前发现新酶的有效和主导的方法，特别是新酶发现的初期。



微生物发酵法

土壤

深海

温泉

火山

森林

自然界

菌种  
保藏  
机构

产酶微生物

研究  
或  
生产  
机构

产酶微生物的来源



# 获取酶源的方式：

- ◆ (1) 可从菌种保藏机构和有关研究部门购买获得

美国模式培养物保藏所 (ATCC)

德国微生物和细胞生产收藏中心 (DSMZ)

大肠杆菌遗传收藏中心 (CGSC)

中国微生物信息网 [sun.im.ac.cn](http://sun.im.ac.cn)

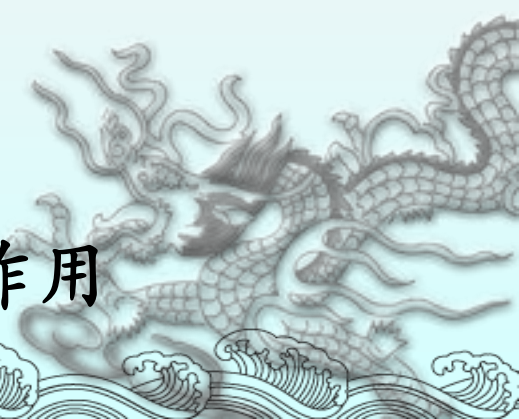
微生物菌种数据网 (MSDN)

世界微生物数据中心 (日本) [wdcm.nig.ac.jp](http://wdcm.nig.ac.jp)

- ◆ (2) 自然界是产酶菌种的主要来源

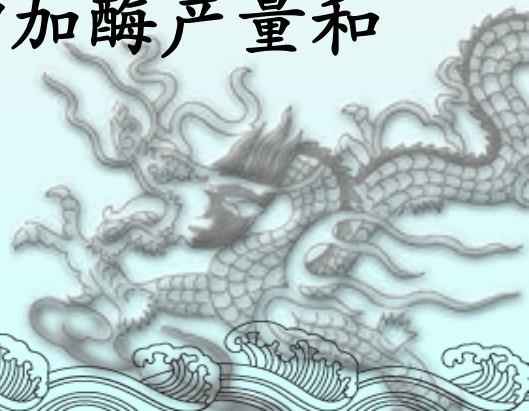
要获得生产某种酶的菌种可从富含该酶作用

底物的场所去采集菌种样品。



## 2. 利用微生物产酶的优点：

- ◆ **种类**多、酶种丰富，而且菌株容易诱变，菌种多样；
- ◆ **生长**繁殖快，容易提取酶；
- ◆ **培养基**来源广泛、价格便宜；
- ◆ **生产效率**可以在线监控酶发酵生产过程，实现连续化、自动化，经济效益高；
- ◆ 可利用基因工程手段，选育菌种、增加酶产量和开发新菌种。





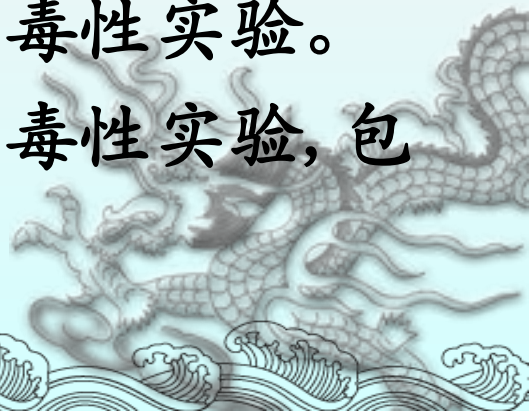
### 3.产酶微生物的筛选策略

- ◆ 产酶微生物的发现通常包括**分离**和**筛选**两个环节。  
**分离**是通过分离技术将目标微生物从其生存的各种环境中分离出来；  
**筛选**是以性能为目标确定合适的菌株。



## (1) 一般产酶微生物的筛选原则:

- ◆ 发酵周期短, 产酶量高;
- ◆ 微生物尽可能地利用便宜和方便的原料生产酶;
- ◆ 所产酶最好具有比较高的专一性, 没有或很少有生产副产物的杂酶;
- ◆ 所用微生物是不产生有害物质的非致病性的安全微生物;
- ◆ 微生物的遗传稳定性高。
- ◆ 由非致病微生物制取的酶, 需作短期毒性实验。
- ◆ 非常见微生物制取的酶, 需做广泛的毒性实验, 包括慢性中毒实验。



## (2) 从极端微生物中筛选酶的策略

- ◇ 极端微生物是开拓商业化新酶的有效资源；
- ◇ 培养极端微生物生产酶的时候要考虑微生物的特点，如多种超高温嗜热菌在培养基中有无机硫的时候，发酵会产生大量 $H_2S$ ，所以不能用一般的不锈钢发酵罐；
- ◇ 极端微生物产酶培养基成分要接近生境。



### (3) 不可培养微生物中酶的发现策略

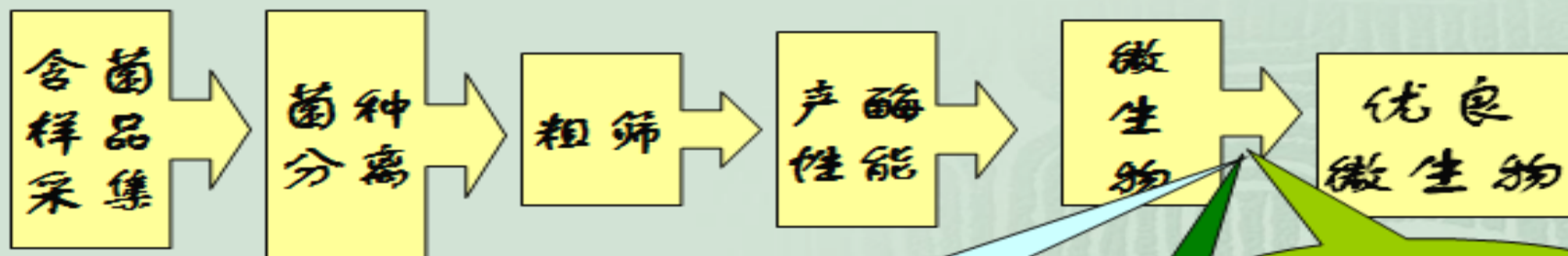
- ◆ 不可培养微生物是地球上最大的尚未开发的自然资源；
- ◆ 采用分子筛选，从元（宏）基因组中筛选酶基因，然后克隆，表达。



# 微生物筛选一般过程

微生物发酵法

微生物的筛选



诱变

基因工程

其它方法

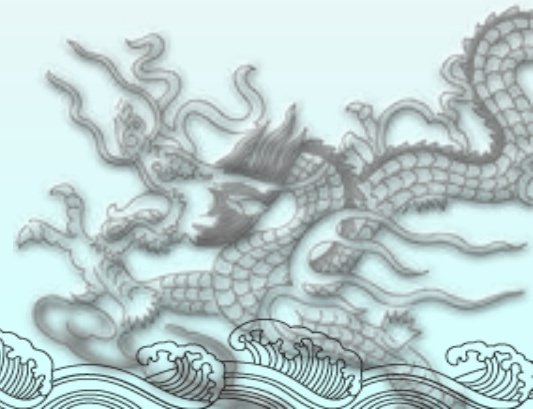
## 二 菌种选育



# 自然选育

基因自发突变为基础选育优良性状菌株的这种方法，是最早应用微生物遗传学原理，进行育种实践的一个实例。

由于微生物体内存在光复活、切补修复、重组修复、紧急呼救修复等修复机制以及DNA聚合酶的校正作用，使得自发突变几率极低，一般为 $10^{-6} \sim 10^{-10}$ 这样低的突变率导致自然选育耗时长、工作量大，影响了育种工作效率。



# 诱变育种

1927年，Miller发现X射线能诱发果蝇基因突变。之后，人们发现其他一些因素也能诱发基因突变，并逐渐弄清了一些诱变发生的机理，为工业微生物诱变育种提供了前提条件。

(1) **物理诱变**：紫外线、X射线、射线、快中子等

(2) **化学诱变**：甲基磺酸乙酯、硫酸二乙酯、亚硝基胍、亚硝基乙基脒、乙烯亚胺





# 基因工程育种（基因重组）



# 杂交育种（基因重组）-原生质体融合技术

1979年，匈牙利的 Pesti 首先采用该技术来提高青霉素的产量，使该技术在工业微生物育种实际工作中得到了应用；



# 三 微生物酶的发酵生产



# 1. 产酶菌

## 目前主要商品酶制剂及其来源

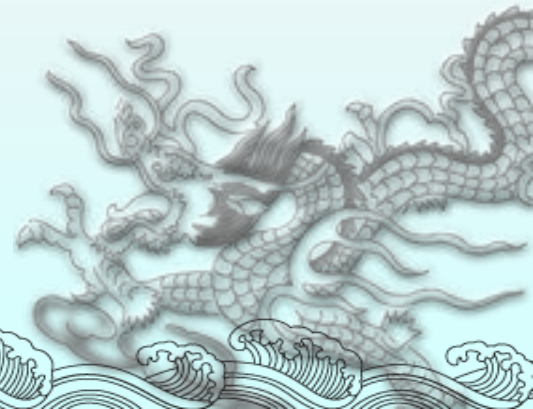
|                 |  |
|-----------------|--|
| 纤维素酶            | 木霉（主要是里氏木霉）、绳状木霉   |
| 右旋糖苷酶           | 淡紫青霉、绳状青霉、毛壳霉  |
| $\alpha$ -半乳糖苷酶 | 葡萄色被孢霉、黑曲霉、米曲霉、假丝酵母、乳酸杆菌等芽孢杆菌                              |
| $\beta$ -葡聚糖酶   | 黑曲霉、曲霉属、枯草杆菌、青霉  |
| 糖化酶             | 黑曲霉、米曲霉、泡盛曲霉、根霉  |
| 葡萄糖异构酶          | 米苏里游动放线菌、二球状节杆菌、凝结芽孢杆菌、树枝状黄杆菌、橄榄色产色链霉菌、白色链霉菌、鼠灰色链霉菌、锈赤色链霉菌 |

## 目前主要商品酶制剂及其来源

|        |  |
|--------|--|
| 葡萄糖氧化酶 | 黑曲霉、生机青霉、尼崎青霉                              |
| 半纤维素酶  | 黑曲霉  |
| 橙皮苷酶   | 黑曲霉  |
| 菊粉酶    | 假丝酵母、曲霉属                                   |
| 脂肪酶    | 黑曲霉、米曲霉、圆柱状假丝酵母、根毛霉、无根毛霉、小球菌、类地青霉、胰脏、山羊舌腺等 |
| 转化酶    | 啤酒酵母、糖化酵母                                  |
| 溶菌酶    | 鸡卵清  |

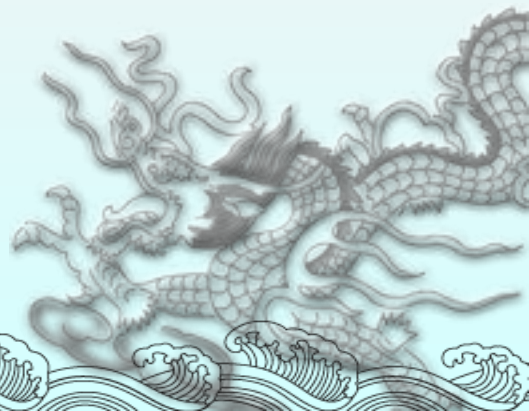
## 2. 产酶菌种的保藏

- 1) **继代保存**：反复继代，但存在变异的可能
- 2) **低温保藏**：霉菌、放线菌及有芽孢的细菌在2-8℃下可保存2—4个月；
- 3) **冷冻干燥保藏**：-80℃冷冻，真空干燥，使微生物代谢处于最不活跃或静止状态。



### 3. 菌种的培养

- ▶ 固体培养法：以麸皮、稻草、米糠等农副产品作为营养源，加少量水，使之呈固体形式的培养基，接种，并在合适的温度下培养，使其生产并形成酶。
- ▶ 液体培养法：用三角瓶装适当的液体培养基，在摇床振荡一定时间。



# 4. 酶的发酵工艺条件与控制

## (1) 培养基

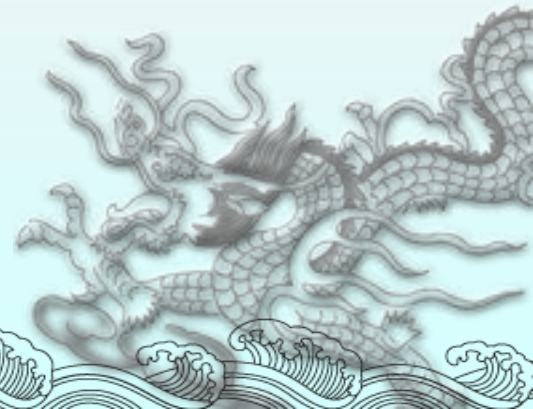
|      | 动物<br>(异养) | 微生物             |             | 绿色植物<br>(自养) |
|------|------------|-----------------|-------------|--------------|
|      |            | 异养              | 自养          |              |
| 碳源   | 糖类、脂肪      | 糖、醇、有机酸等        | 二氧化碳、碳酸盐等   | 二氧化碳         |
| 氮源   | 蛋白质及其降解物   | 蛋白质及其降解物、有机氮化物、 | 无机氮化物、氮     | 无机氮化物        |
| 能源   | 与碳源同       | 与碳源同            | 氧化无机物或利用日光能 | 利用日光能        |
| 生长因子 | 维生素        | 有些需要维生素等生长因子    | 不需要         | 不需要          |
| 无机元素 | 无机盐        | 无机盐             | 无机盐         | 无机盐          |
| 水分   | 水          | 水               | 水           | 水            |



# 培养基的设计原则

- ◆ 1、选择适宜的营养物质
- ◆ 2、营养物的浓度及配比合适
- ◆ 3、物理、化学条件适宜
- ◆ 4、经济节约

培养不同的微生物必须采用不同的培养条件；  
培养目的不同，原料的选择和配比不同；  
不同阶段，培养条件也有所差异。



## 实验室的常用培养基：

细菌： 牛肉膏蛋白胨培养基（或简称普通肉汤培养基）；

放线菌： 高氏1号合成培养基培养；

酵母菌： 麦芽汁培养基；

霉菌： 查氏合成培养基；

例如枯草芽孢杆菌：

一般培养： 肉汤培养基；

自然转化： 基础培养基；

观察芽孢： 生孢子培养基；

**产蛋白酶： 以玉米粉、黄豆饼粉为主的产酶培养基；**



# 水

水是微生物最基本的组成成分（70%—90%）

水是微生物体内和体外的溶剂（吸收营养成分和代谢废物）

水是细胞质组分，直接参与各种代谢活动

调节细胞温度和保持环境温度的稳定（比热高，传热快）

# 碳源

构成细胞物质或代谢产物中碳架

碳源可作能源，为生命活动提供能量

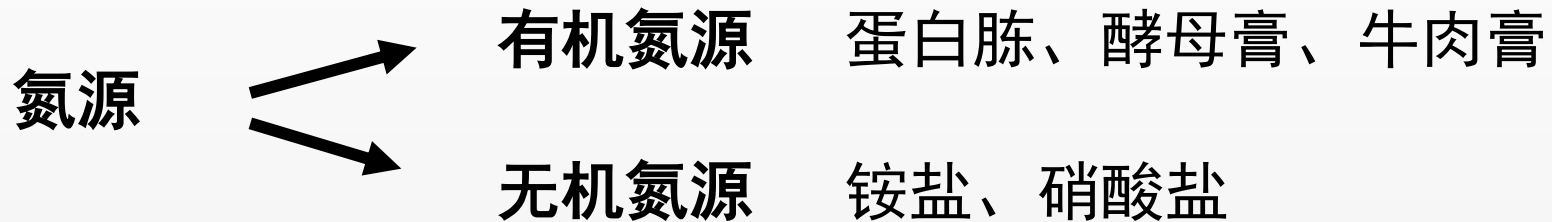
常用碳源：**糖类**、醇类、脂类、有机酸、烃类、蛋白质及其降解物

异养微生物：**糖类**是最好碳源（**葡萄糖**最为通用）

**选择合适碳源，以适应目的酶的合成调节机制**

# 氮源

构成细胞物质和代谢产物中氮素（不能用作能源）



需要注意合适的碳氮比

# 无机盐

参与酶的组成、构成酶活性基、激活酶活性  
维持细胞结构的稳定性  
调节细胞渗透压  
有时可作某些微生物生长的能源物质

常用：硫酸盐、磷酸盐、氯化物以及含有钾、钠、钙、镁、铁等元素的化合物。

## (2) 发酵条件的控制

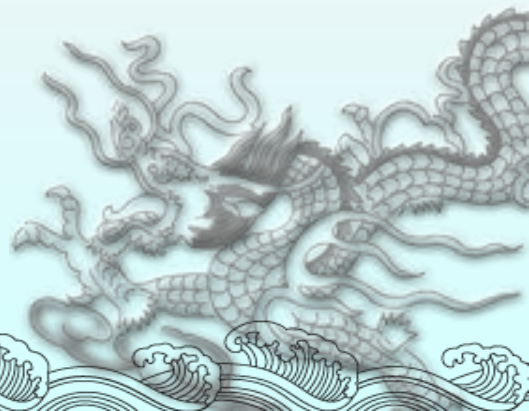
### pH值的控制

培养基的pH必须控制在一定的范围内，以满足不同类型微生物的生长繁殖或产生代谢产物。为了维持培养基pH的相对恒定，通常在培养基中加入pH缓冲剂，或在进行工业发酵时补加酸、碱。

通常培养条件：

细菌与放线菌：中性或碱性范围（pH6.5~8.0）

酵母菌和霉菌：偏酸性(pH4~6)



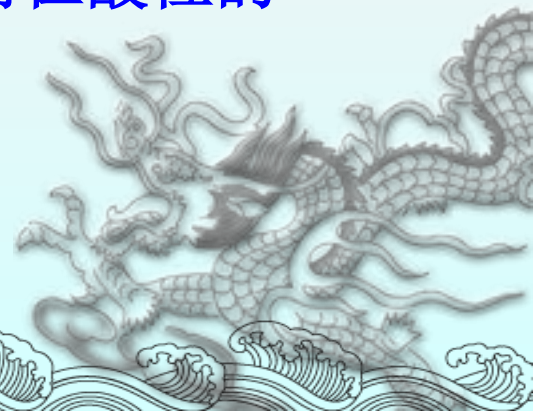
细胞发酵产酶的最适pH值

细胞生长最适pH值

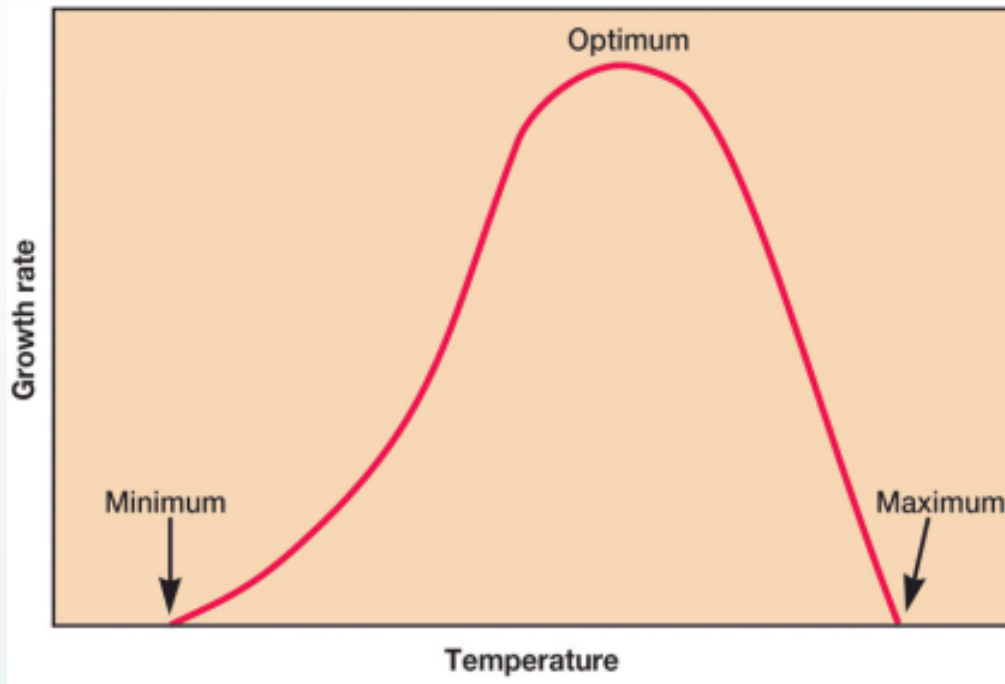
两者不同

细胞生产某种酶的最适pH值通常接近于该酶催化反应的最适pH值。

有些微生物细胞可以同时产生若干种酶，在生产过程中，通过**控制培养基的pH值**，往往可以改变各种酶之间的产量比例。例如，采用米曲霉发酵生产蛋白酶时，当培养基的pH值为碱性时，主要生产碱性蛋白酶；培养基的pH值为中性时，主要生产中性蛋白酶；而在酸性的条件下，则以生产酸性蛋白酶为主。



## 温度的控制



枯草杆菌的最适生长温度为 $34\sim 37^{\circ}\text{C}$

黑曲霉的最适生长温度为 $28\sim 32^{\circ}\text{C}$

通常在生物学范围内每升高 $10^{\circ}\text{C}$ ，生长速度就加快一倍，所以温度直接影响酶反应，对于微生物来说，温度直接影响其生长和合成酶。

## 代谢反应对温度的影响：

发酵过程中，微生物在发育过程中，不断进行合成代谢与分解代谢反应。在发酵初期，合成反应占优势，所以发酵液需要升温。当菌体繁殖旺盛时，分解代谢旺盛会带来大量热量，故发酵液需要降温。

通风及搅拌速度对发酵温度均有影响。





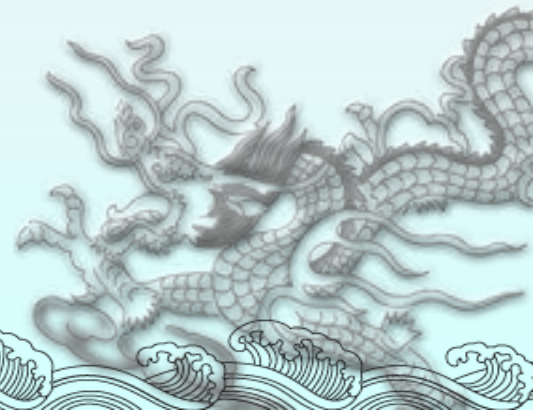
## 溶解氧的控制

在酶的发酵生产过程中，处于不同生长阶段的细胞，其**细胞浓度和细胞呼吸强度各不相同**，致使耗氧速率有很大的差别。因此必须根据耗氧量的不同，不断供给适量的溶解氧。

控制溶解氧方法

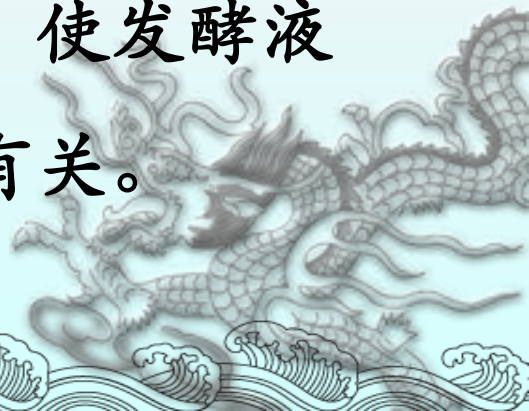


- 调节通气量
- 调节氧的分压
- 调节气液接触时间
- 调节气液接触面积
- 改变培养液的性质



## 搅拌

- (1) 有利于热交换，使营养物质和菌体均匀接触，降低细胞周围的代谢产物，从而有利于新陈代谢；
- (2) 打破空气气泡，增加湍流速度，从而提高溶氧量，增加空气利用。但搅拌易产生切应力，使细胞受损，同时带来一定的热量，使发酵液温度发生变化。搅拌与发酵液粘度有关。



## 泡沫影响

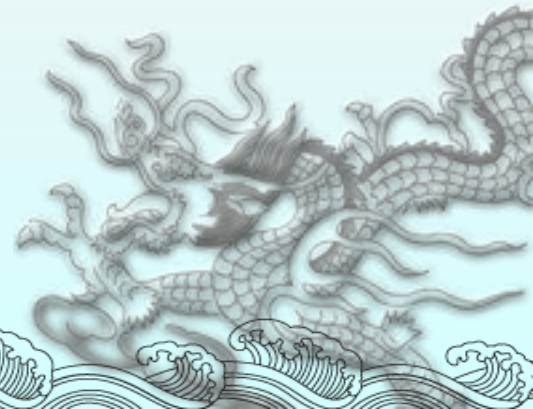
- (1) 阻碍二氧化碳的排除；
- (2) 影响溶氧量；
- (3) 影响添料；
- (4) 发酵液易溢出罐外。

### 消除措施：

- (1) 机械消泡；
- (2) 消泡剂：天然的矿物油、醇类、脂肪酸类、胺类、酰胺类、醚类、硫酸酯类、金属皂类、聚硅氧烷和聚硅酮。其中，以聚甲基硅氧烷最好。

## 5、提高酶产量的措施

- **控制条件：包括添加诱导物和降低阻遏物浓度。**
- **遗传控制：包括基因突变和基因重组。**
- **其他方法：添加表面活性剂和产酶促进剂等。**



## (1) 添加诱导物

对于诱导酶的发酵生产，在发酵过程中的某个适宜的时机，添加适宜的诱导物，可以显著提高酶的产量。

例如，乳糖诱导 $\beta$ -半乳糖苷酶，纤维二糖诱导纤维素酶，蔗糖、甘油、单棕榈酸诱导蔗糖酶的生物合成等。

实验：

- 1.大肠杆菌在葡萄糖为C源培养基中发酵过程中， $\beta$ -半乳糖苷酶不合成，或合成量很低。
- 2.在发酵培养的某一阶段加入乳糖后， $\beta$ -半乳糖苷酶大量合成，而继续发酵培养， $\beta$ -半乳糖苷酶消失或很少合成。

## (2) 控制阻遏物的浓度

**控制阻遏物的浓度是解除阻遏、提高酶产量的有效措施。**

指一些物质经过分解代谢产生的物质会阻遏某些酶生物合成的现象；

当培养基中含有多种能源物质（比如同时存在葡萄糖和乳糖）时，微生物首先利用易于分解利用的能源物质（葡萄糖），而这种首先被利用的物质的分解可以阻碍微生物对另外一种能源物质的利用。

## (3) 其他提高酶产量的方法

◆ 添加表面活性剂

◆ 产酶促进剂



## 添加表面活性剂

表面活性剂可以与细胞膜相互作用，增加细胞的透过性，有利于打破细胞内酶合成的平衡，从而提高酶的产量。

将适量的非离子型表面活性剂，如吐温（Tween）、特里顿（Triton）等添加到培养基中，可以加速胞外酶的分泌，而使酶的产量增加。





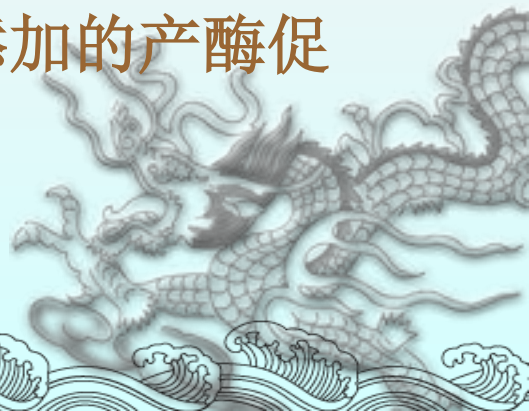
## 添加产酶促进剂

产酶促进剂是指可以促进产酶、但是作用机理未阐明清楚物质。

例如，添加一定量的植酸钙镁，可使霉菌蛋白酶的产量提高1~20倍；

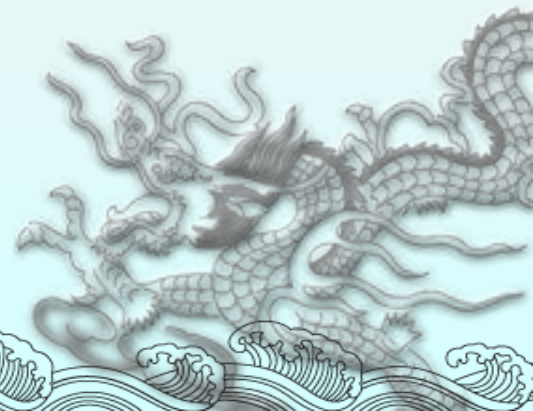
添加聚乙烯醇可以提高糖化酶的产量。

产酶促进剂对不同细胞、不同酶的作用效果各不相同，现在还没有规律可循，要通过试验确定所添加的产酶促进剂的种类和浓度。

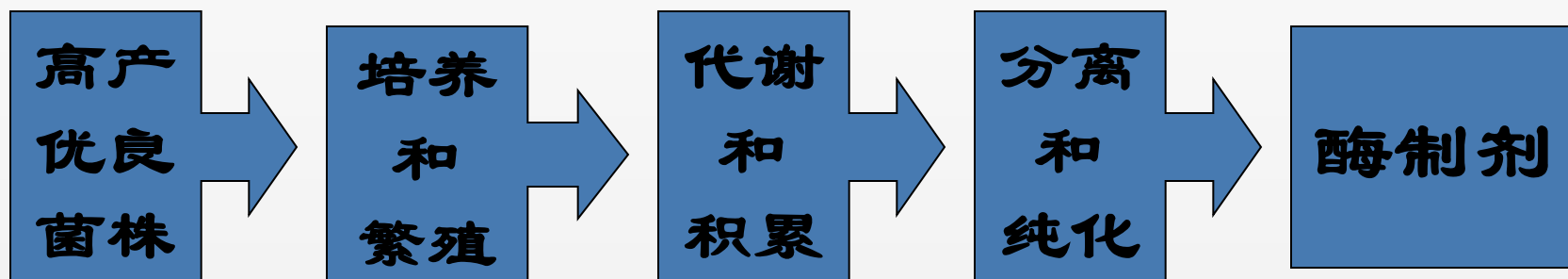


## 6、酶的发酵生产的方式

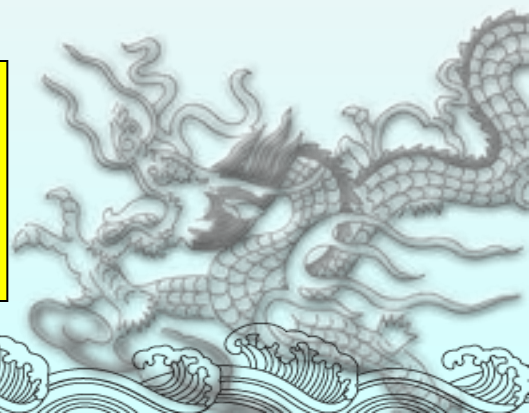
- ◆ 固体培养发酵
- ◆ 液体深层发酵
- ◆ 固定化微生物细胞发酵
- ◆ 固定化微生物原生质体发酵



# 微生物发酵法



**酶的发酵生产基本过程**



## 二 酶工程的应用



# 酶与人类的生活

使用酶生产没有反式脂肪酸的食用油和奶油

酶替代面包中的乳化剂、改善面包质量、延长保鲜期

酶可使清洁燃料的梦想变为现实

食品工业用酶

用酶处理皮革可减少化学品的使用

洗涤剂酶



提高啤酒质量

酶增强牙膏的洁净能力

改善面条的咬劲，增白、增亮、护色，提高面条的耐煮性并降低黏度等

纺织精炼用酶

促进草皮生长的产品

成功的饲料用酶，如植酸酶可减少向环境中排放磷



# 酶工程的应用

酶

酶催化的优点

专一性强

反应条件温和

催化效率高

工艺简单  
生产成本较低

环境污染小

可生产出化学法无法生产的产品

应用范围

工业

农业

环保

医药

食品

纺织

# 酶工程的应用

水解酶

来源

用途

$\alpha$ -淀粉酶

枯草杆菌等

织物退浆、液化淀粉等

葡萄糖  
淀粉酶

根霉、  
黑曲霉等

制造葡萄糖，发酵工业糖化剂

纤维素酶

绿色木霉等

饲料添加剂，水解纤维素制糖

果胶酶

木质壳霉等

果汁澄清、果实榨汁等

脂肪酶

黑曲霉等

洗涤剂、洗衣粉去污等

## 酶工程应用例子

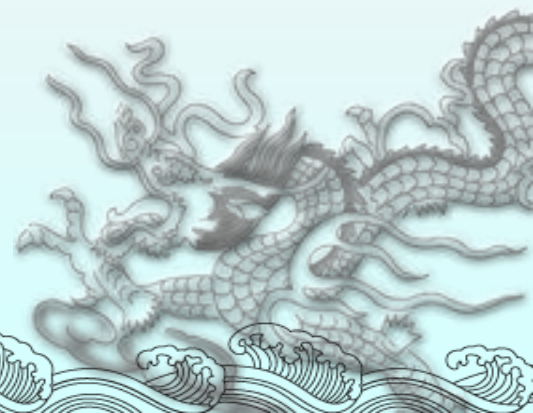
# 果葡糖浆的生产

42%果糖

果葡糖浆  
(高果糖浆)

58%葡萄糖

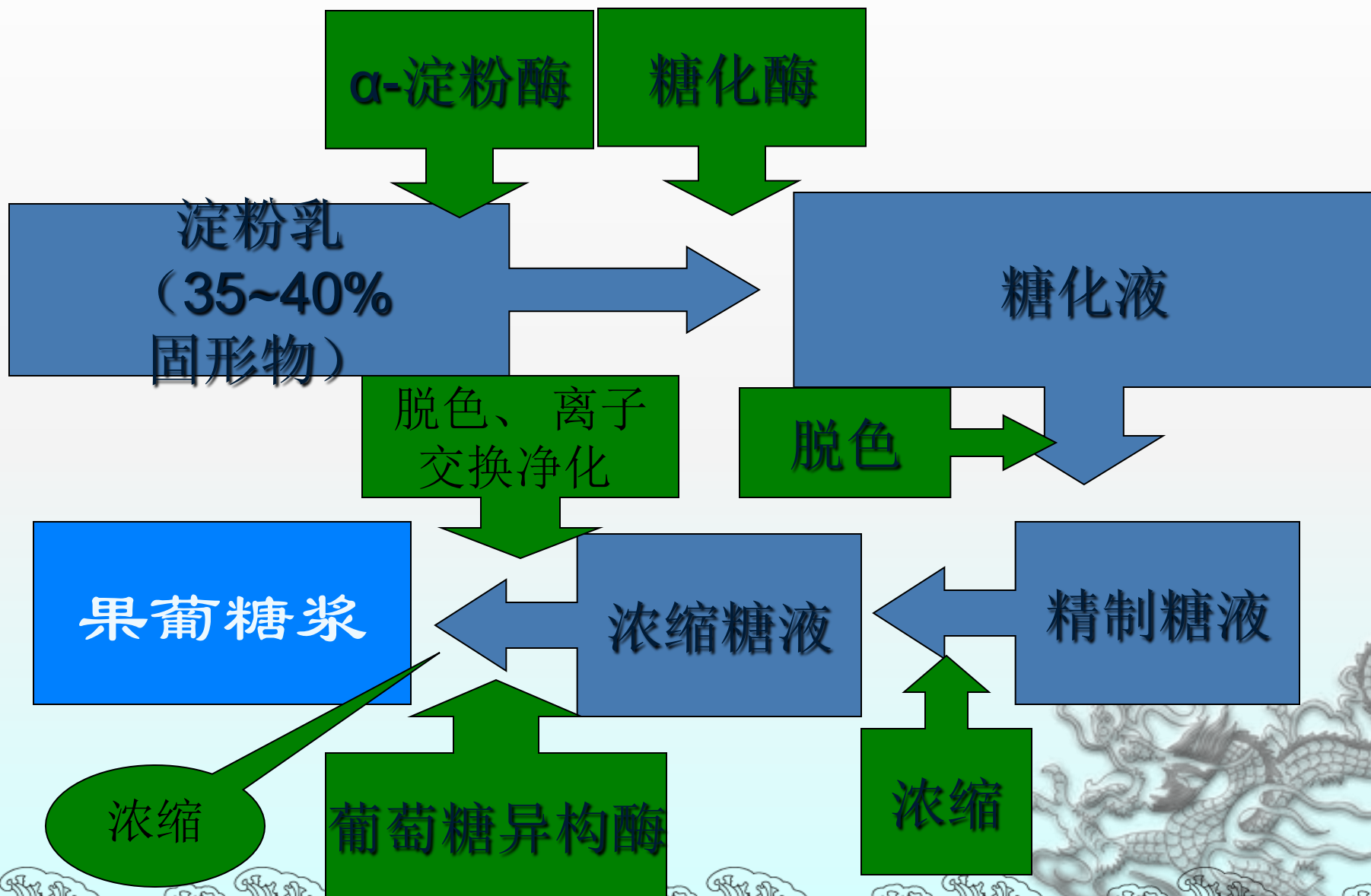
目前产  
量在  
700万  
吨以上





果葡糖浆的生产也是酶工程在工业生产中最成功、规模最大的应用

酶工程应用例子



## 酶工程应用例子

## 诊断和治疗疾病

酶

诊断

可诊断相关疾病

心肌酶

心肌梗死

碳酸酐酶

坏血病、贫血等

谷草、丙转氨酶

肝炎、心肌梗死等

淀粉酶

胰腺炎等

## 酶工程应用例子

## 诊断和治疗疾病

### 治疗

酶

可治疗相关疾病

淀粉酶

消化不良、食欲不振等

蛋白酶

消化不良、食欲不振等

溶菌酶

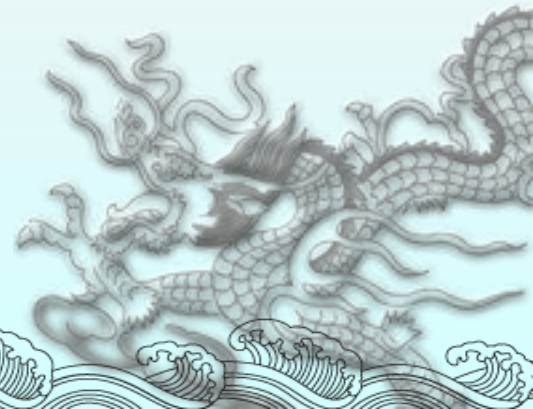
消炎、抗菌、抗病毒等

尿激酶

心肌梗死等

## 思考题：

- 1、名词：酶(enzyme)、酶工程(enzyme engineering)
- 2、什么是酶的专一性？
- 3、简述酶活力测定的步骤。
- 4、酶的生产方法有哪些？
- 5、如何利用微生物进行酶的生产？



# 考试（闭卷，90分钟）

|     |     |
|-----|-----|
| 题型： | 分值  |
| 单选： | 15  |
| 多选： | 5分  |
| 填空： | 15分 |
| 名词： | 15分 |
| 识图： | 10分 |
| 简答： | 30分 |
| 论述： | 10分 |

