

The background of the slide is a vibrant blue gradient. In the upper left, a hand holds a test tube that is glowing with a bright, warm light. In the lower right, a person's hands are shown using a pipette to transfer liquid into a small vial. The background also features a faint, white grid pattern that adds a scientific or technical feel to the overall design.

第 2 章 酶的生产与分离纯化

主要内容:

- 2.1 国内外酶制剂工业生产及应用现状
- 2.2 酶的发酵技术
- 2.3 酶的分离纯化
- 2.4 酶分离、纯化的评价
- 2.5 酶的剂型与保存

The background of the slide is a vibrant blue. In the top left corner, a hand holds a fiber optic cable that is glowing with a bright white light. In the bottom right corner, a hand is shown holding a pen, positioned as if about to write on a surface. A white grid pattern, resembling a wire mesh, is visible in the lower right portion of the image. The overall aesthetic is high-tech and professional.

2.1 国内外酶制剂工业生产及应用现状

2.1.1 . 新技术在生产中的应用:

◆三种方法:

- 组织提取: 木瓜蛋白酶、凝乳蛋白酶
- 微生物发酵: 最大量的来源
- 化学及生物合成: 生物重组

◆高新技术的应用: 酶的修饰、固定化、基因重组、膜分离技术、冷冻干燥、微胶囊



2.1.2. 集中垄断，市场全球化：

- ◆ 规模企业由 20 世纪 80 年代初的 80 多家减少至 20 多家，占市场 90%
- ◆ 丹麦诺和诺得公司（诺维信 novozymes）→ 1978 年进入中国诺维信公司，占 50% 市场（天津）；
- ◆ 美国杰能科公司（Genencor）→ 98 年进入中国，与无锡合资，控股 80%（无锡），两家公司销售额占全球 2/3；
（2005 年杰能科国际公司被丹尼斯克公司收购）；
- ◆ 芬兰科特公司和丹麦丹尼斯克公司酶制剂业务合并，Pfizer，Rhone，SKW，Biosystems，日本天野

2.1.3. 品种、规模不断扩大

- ◆目前 30 多家 600 多个品种，应用于 18 个工业领域。
- ◆我国 2000 年酶制剂产量为 30 万吨，100 家，市场份额仅占 5%，以未经除菌去渣的粗制品粉状酶为主。
- ◆国际以液体、颗粒为主。
- ◆国内糖化酶、 α -淀粉酶、蛋白酶三大类占了 97%，显然不合理。
- ◆重要产品普鲁兰酶、真菌淀粉酶、系列果胶酶、低温碱性蛋白酶，国内尚未投入生产；
- ◆我国有 7 家上市公司介入酶制剂开发生产。



2.1.4. 应用领域不断扩大:

- ◆ 美国酶制剂年产值 6.25 亿美元，食品工业占 62%，拓展饲料工业、洗涤剂工业、化学工业。



2.2 酶的发酵技术

◆利用微生物产酶的优点是：

- (1) 微生物种类多、酶种丰富，且菌株易诱变，菌种多样。
- (2) 微生物生长繁殖快，易提取酶，特别是胞外酶。
- (3) 微生物培养基来源广泛、价格便宜。
- (4) 可以采用微电脑等新技术，控制酶发酵生产过程，生产可连续化、自动化，经济效益高。
- (5) 可以利用以基因工程为主的现代分子生物学技术，选育菌种、增加酶产率和开发新酶种。因此，下面将主要介绍微生物发酵法产酶的一般原理和工艺。



2.2.1 产酶微生物

- ◆ 菌种是发酵生产酶的重要条件。菌种不仅与产酶种类、产量密切相关，而且与发酵条件、工艺等关系密切。已经在自然界中发现的酶有数千种，目前投入工业发酵生产的酶约有 50 ~ 60 种。它们的生产菌种十分广泛，包括细菌、放线菌、酵母菌、霉菌。



2.2.2 酶的发酵技术

◆2.2.2.1 培养基

- 培养基的营养成分是微生物发酵产酶的原料，主要是碳源、氮源，其次是无机盐、生长因子和产酶促进剂等。



（1）碳源

- ◆ 碳素是构成菌体成分的主要元素，也是细胞贮藏物质和生产各种代谢产物的骨架，还是菌体生命活动的能量的主要来源。当前酶制剂生产上使用的菌种大都是只能利用有机碳的异养型微生物。有机碳的主要来源有：一是农副产品中如甘薯、麸皮、玉米、米糠等淀粉质原料；二是野生的如土茯苓、橡子、石蒜等淀粉质原料。此外，以石油产品中 12 ~ 16 碳的成分来作碳源，如以某些嗜石油微生物生产蛋白酶、脂酶，均已获得成功。



- 不同的细胞对各种碳源的利用差异很大，所以在配制培养基时应根据不同细胞的不同要求而选择合适的碳源。另外，选择碳源除考虑营养要求外，还要考虑酶生物合成的诱导作用和是否存在分解代谢物阻遏作用。尽量选用具有诱导作用的碳源，尽量不用或少用有分解代谢物阻遏作用的碳源。
- 例如， α -淀粉酶的发酵生产中，应该选用有诱导作用的淀粉作为碳源，而不用对该酶有分解代谢物阻遏作用的果糖作为碳源。

◆ (2) 氮源

- 氮是生物体内各种含氮物质，如氨基酸、蛋白质、核苷酸、核酸等的组成成分。酶制剂生产中的氮源主要有有机氮源和无机氮源两种，常用的有机氮源有：豆饼、花生饼、菜籽饼、鱼粉、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、多肽、氨基酸等；无机氮源有： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、尿素等。

- 不同的细胞对各种氮源的要求各不相同，应根据要求进行选择和配制。一般来说，动物细胞要求有机氮，植物细胞主要要求无机氮。多数情况下将有机氮源和无机氮源配合使用才能取得较好的效果。例如黑曲霉酸性蛋白酶生产，只用铵盐或硝酸盐为氮源时，酶产量仅为有脲时的 30%。只用有机氮源而不用无机氮源时产量也低，故一般除使用高浓度有机氮源外尚需添加 1%~3% 的无机氮源。

◆ (3) 碳氮比

- 在微生物酶生产培养基中碳源与氮源的比例是随生产的酶类、生产菌株的性质和培养阶段的不同而改变的。
- 一般蛋白酶（包括酸性、中性和碱性蛋白酶）生产采用碳氮比低的培养基比较有利，例如黑曲霉 3.350 酸性蛋白酶生产采用由豆饼粉 3.75%、玉米粉 0.625%、鱼粉 0.625%。 NH_4Cl 1%、 CaCl_2 0.5%、 Na_2HPO_4 0.2%、豆饼石灰水解液 10% 组成的培养基；

- 淀粉酶 (包括 α - 淀粉酶、糖化酶、 β - 淀粉酶等) 生产的碳氮比一般比蛋白酶生产略高, 例如枯草杆菌 TUD127 α - 淀粉酶生产采用由豆饼粉 4 %、玉米粉 8 %、 Na_2HPO_4 0.8%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%、 CaCl_2 0.2% 组成的培养基。而在淀粉酶生产中糖化酶生产培养基的碳氮比是最高的。以上是蛋白酶和淀粉酶生产培养基碳氮比的一般规律, 但是由于菌种很多而其性质各异。很难说都是符合上述规律的。

- 在微生物酶生产过程中，培养基的碳氮比也因培养过程不同而异。例如种子培养时，为了适应菌体生长繁殖的需要，要求提供合成细胞蛋白质的氮多些，容易利用的氮源的比例大些，种子培养基的碳氮比一般要比发酵培养基低些。发酵时，不同发酵阶段要求的碳氮比也是不同的。例如在枯草杆菌 BF — 7658 生产 α — 淀粉酶的发酵过程中，发酵前期要求培养基的碳氮比适当降低，以利菌体生长繁殖，发酵中后期要求培养基的碳氮比适当提高，以促进淀粉酶的生成。

◆ (4) 无机盐

- 微生物酶生产和其他微生物产品生产一样，培养基中需要有磷酸盐及硫、钾、钠、钙、镁等元素存在。在酶生产中常以磷酸二氢钾、磷酸氢二钾等磷酸盐作为磷源，以硫酸镁为硫源和镁源。钙离子对淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等多种酶的活性有十分重要的稳定作用，例如在无 Ca^{2+} 存在时灰色链霉菌中性蛋白酶只在 $\text{pH}7\sim7.5$ 很小范围内稳定，当有 Ca^{2+} 存在时稳定 pH 范围可以扩大到 $5\sim7$ 。钠离子有控制细胞渗透压使酶产量增加的作用，酶生产的培养基中有时以磷酸氢二钠及硝酸钠等形式加入，例如米曲霉 α -淀粉酶生产，添加适量的硝酸钠以促进酶生产。
- 在天然培养基中，一般微量元素不必另外加入，但也有一些例外。如玉米粉、豆粉为碳源时，添加 100 ppm Co^{2+} 和 Zn^{2+} ，放线菌 166 蛋白酶活力可增加 $70\%\sim80\%$ 。



◆ (5) 生长因子

- 微生物还需一些微量的像维生素一类的物质，才能正常生长发育，这类物质统称生长因子(或生长素)。其中包括某些氨基酸、维生素、嘌呤或嘧啶等。酶制剂生产中所需的生长因子，大多是由天然原料提供，如玉米浆、麦芽汁、豆芽汁、酵母膏、麸皮、米糠等。玉米浆中一般含有生长素 $32\sim 128\text{mg} / \text{mL}$ 。

◆ (6) 产酶促进剂

- 产酶促进剂是指在培养基中添加某种少量物质，能显著提高酶的产率，这类物质称为产酶促进剂。产酶促进剂大体上分为两种：一是诱导物，二是表面活性剂。表面活性剂，如吐温—80 的浓度为 0.1 % 时能增加许多酶的产量。表面活性剂能增加细胞的通透性，处在气—液界面改善了氧的传递速度，还可以保护酶的活性。生产上常采用非离子型表面活性剂，如聚乙二醇、聚乙烯醇衍生物、植酸类、焦糖、羧甲基纤维素、苯乙醇等。离子型的表面活性剂对微生物有害。用于食品、医药的酶的生产中所用的表面活性剂还须对人、畜无害。此外各种产酶促进剂的效果还受到菌种，种龄、培养基组成的影响。

2.2.2.3 液体深层发酵的工艺控制

◆ 酶的发酵生产中发酵效果除了受到菌种产酶性能的影响外，还受到发酵温度、pH、溶氧量等条件的影响。

◆ (1) 温度对产酶的影响

- 发酵温度的变化主要随着微生物代谢反应、发酵中通风、搅拌速度的变化而变化的。微生物在生长发育中，不断地吸收培养基营养成分来合成菌体的细胞物质和酶时的生化反应都是吸热反应；培养基中的营养物质被大量分解时的生化反应都是放热反应。发酵初期合成反应吸收的热量大于分解反应放出的热量，发酵液需要升温。当菌体繁殖旺盛时，情况则相反，发酵液温度就自行上升，加上通风搅拌所带来的热量，这时，发酵液必须降温，以保持微生物生长繁殖和产酶所需的适宜温度。



- 微生物生长繁殖和产酶的最适温度随着菌种和酶的性质不同而异，生长繁殖和产酶的最适温度往往不一致。一般细菌为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，霉菌和放线菌为 $28\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，一些嗜热微生物需在 $40\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下生长繁殖，如红曲霉生长温度 $35\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，而生产糖化酶的最适温度为 $37\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 在酶生产中，为了有利于菌体生长和酶的合成，也有进行变温生产的。例如以枯草杆菌 AS1.398 进行中性蛋白酶生产时，培养温度必须从 $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 逐渐升温至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，然后再降温到 $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行培养，蛋白酶产量比不升温者高 66%。据报道，酶生产的温度对酶活力的稳定性有影响，例如用嗜热芽孢杆菌进行 α -淀粉酶生产时，在 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养所产生的酶的稳定性比 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 好。

◆(2) pH 对产酶的影响

- 种子培养基和发酵培养基的 pH 直接影响酶的产量和质量。在发酵过程中，微生物不断分解和同化营养物质，同时排出代谢产物。由于这些产物都与 pH 有直接关系，因此发酵液 pH 在不断发生变化。生产上根据 pH 的变化情况常作为生产控制的根据。
- 一般来说，培养基成分中碳 / 氮 (C/N) 比高，发酵液倾向于酸性，pH 低；C/N 低，发酵液倾向于碱性，pH 高。pH 的这些变化情况，常常引起细胞生长和产酶环境的变化，对产酶带来不利的影响。因此生产中常采用一些控制 pH 的方法，通常有：添加缓冲液维持一定的 pH；调节通风量维持发酵液的氧化还原电位于一定范围；调节培养基的初始 pH，保持一定的 C / N 比；当发酵液 pH 过高时用糖或淀粉来调节，pH 过低时，通过氮调节。

◆(3) 通风量对产酶的影响

- 其实通风量的多少应根据培养基中的溶解氧而定。一般来说，在发酵初期，虽然幼细胞呼吸强度大，耗氧多，但由于菌体少，相对通风量可以少些；菌体生长繁殖旺盛期时，耗氧多，要求通风量大些；产酶旺盛时的通风量因菌种和酶种而异，一般需要强烈通风；但也有例外，通风量过多反而抑制酶的生成。因此，菌种、酶种、培养时期、培养基和设备性能都能影响通风量，从而影响酶的产量。目前用于酶制剂生产的微生物都为好气性微生物，生产上普遍采用自动测定和记录溶解氧的仪表。

◆(4) 搅拌的影响

- 对于好气性微生物的深层发酵，除了需要通气外，还需要搅拌。搅拌有利于热交换、营养物质与菌体均匀接触，降低细胞周围的代谢产物，从而有利于新陈代谢。同时可打破空气气泡，使发酵液形成湍流，增加湍流速度，从而提高溶氧量，增加空气利用。但搅拌速度主要因菌体大小而异，由于搅拌产生剪切力，易使细胞受损。同时搅拌也带来一定机械热，易使发酵液温度发生变化。搅拌速度还与发酵液黏度有关。



◆(5) 泡沫的影响

- 发酵中往往产生较多的泡沫。泡沫的存在阻碍了 CO_2 的排除，影响溶氧量，同时泡沫过多影响补料，也易使发酵液溢出罐外造成跑料。因此，生产上必须采用消泡措施。一般除了机械消泡外，还可利用消泡剂。消泡剂主要是一些天然的矿物油类、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。我国常用聚氧丙烯甘油醚或泡敌（聚环氧丙环氧乙烷甘油醚）。理想的消泡剂，其表面相互作用力应低，而且应难溶于水，还不能影响氧的传递速率和微生物的正常代谢。

◆(6) 湿度

- 用固体培养基生产酶制剂时，一般前期湿度低些，培养后期湿度大些，有利于产酶。



2.3 酶的分离纯化

酶的分离纯化工作，是酶学研究的基础。酶的纯化过程，就目前而言，还是一门实验科学。一个特定酶的提纯往往需要通过许多次小实验进行摸索，没有通用的规律可循。酶的纯化过程与一般的蛋白质纯化过程相比，又有其本身独有的特点：一是特定的一种酶在细胞中的含量很少，二是酶可以通过测定活力的方法加以跟踪，前者给纯化带来了困难，而后者却能使我们迅速找出纯化过程的关键所在。



2.3.1 酶原料的选择

◆一般来说，为了使纯化过程容易进行，总是选择目的酶含量最多的生物组织为原料来进行提取纯化的。当然，也要考虑原料的来源、取材方便、经济等因素。在分离纯化动物 Cu，Zn - SOD(超氧化物歧化酶)时，一般就以含 Cu，Zn - SOD 很高的动物血球为原材料。Mn - SOD 主要存在于线粒体中，所以，龙虾、灵芝草、人体组织适宜于作为提取 Mn - SOD 的原材料。但龙虾、灵芝草等非常昂贵，人体组织也很难得到，因而，除非是特殊目的的纯化，一般不选用这些材料提取酶。

◆ 目前，利用动、植物细胞体外大规模培养技术，可以大量获得以前极为珍贵的原材料（例如人参细胞、某些昆虫细胞等），用于酶的分离纯化。利用基因工程重组 DNA 技术，能够使某些在细胞中含量极微的酶的纯化成为可能。例如，大肠杆菌胞内芳香族氨基酸的合成需要 EPSP 合成酶（丙酮酰莽草酸磷酸合成酶）的参与。现已分离出这种酶的基因并重组入多拷贝质粒 pAT153，将此质粒转化大肠杆菌，产生一种比野生型大肠杆菌株高 100 倍 EPSP 合成酶含量的新菌株。从 18g 新菌株的菌体中，可纯化得 4.8 mgEPSP 合成酶。

A hand holding a lit matchstick is visible in the upper left corner, with a bright flame. The background is a deep blue with a subtle wire mesh pattern. In the lower right, a person's arm is visible, holding a blue object, possibly a pipette or a small container. The overall scene suggests a laboratory or scientific setting.

2.3.2 酶的提取

2.3.2.1 生物组织的破碎

◆各种生物组织的细胞有着不同的特点，在考虑破碎方法时，要根据细胞性质、处理量及酶的性质，采用合适的方法。

◆(1) 机械（匀浆）法

- 利用机械力的搅拌、剪切、研碎细胞。常用的有高速组织捣碎机，高压匀浆泵、玻璃或 Teflon 加研棒匀浆器高速球磨机或直接用研钵研磨等。

◆(2) 超声波法

- 超声波是破碎细胞或细胞器的一种有效手段。经过足够时间的超声波处理，细菌和酵母细胞都能得到很好的破碎。超声处理的主要问题是超声空穴局部过热引起酶活性丧失，所以超声振荡处理的时间应尽可能短，容器周围以冰浴冷却处理，尽量减小热效应引起的酶的失活。

◆(3) 冻融法

- 生物组织经冰冻后，细胞胞液结成冰晶，使细胞壁胀破。冻融法所需设备简单，普通家用冰箱的冷冻室即可进行冻融。一般需在冻融液中加入蛋白酶抑制剂，如 PMSF(苯甲基磺酰氟)、络合剂 EDTA、还原剂 DT T (二硫苏糖醇) 等以防破坏目的酶。

◆(4) 渗透压法

- 渗透破碎是破碎细胞最温和的方法之一。细胞在低渗溶液中由于渗透压的作用，溶胀破碎。如红血球在纯水中会发生破壁溶血现象。但这种方法对具有坚韧的多糖细胞壁的细胞，如植物、细菌和霉菌不太适用，除非用其他方法先除去这些细胞外层坚韧的细胞壁。



◆(5) 酶消化法

- 利用溶菌酶、蛋白水解酶、糖苷酶对细胞膜或细胞壁的酶解作用，使细胞崩解破碎。将革兰氏阳性菌（如枯草杆菌）与溶菌酶一起温育，就能得到易破碎的原生质体，用 EDTA 与革兰氏阴性菌（如大肠杆菌）一起温育，也可制得相应的原生质体。几丁质酶和 3-葡聚糖酶则常用于水解曲霉、面包霉等的细胞壁。

◆(6) 化学破碎法

- 化学破碎法是应用各种化学试剂与细胞膜作用，使细胞膜的结构改变或破坏的方法。
- 常用的化学试剂可分为有机溶剂和表面活性剂两大类。



■ ① 有机溶剂处理

- ◆ 常用的有机溶剂有甲苯、丙酮、丁醇、氯仿等。
- ◆ 有机溶剂可使细胞膜的磷脂结构破坏，从而改变细胞膜的透过性，再经提取可使膜结合酶或胞内酶等释出胞外。例如，将细胞悬浮在 10 倍体积的预冷至 -20°C 的丙酮之中，搅拌均匀，待自然沉降后弃上清液，抽滤得细胞，再用 2.5 倍体积的 -20°C 丙酮洗涤，抽干后，把得到的细胞立即放入真空干燥器中，除去残余的丙酮，得到细胞干粉，可长期保存，使用时再用水或缓冲液把胞内的酶提取出来。

■ ② 表面活性剂处理

- ◆ 表面活性剂可以和细胞膜中的磷脂及脂蛋白相互作用使细胞膜结构破坏，增加膜的透过性。



2.3.2.2 酶的提取

◆酶的提取是指在一定条件下，用适当的溶剂处理含酶原料，使酶充分溶解到溶剂中的过程，也称作酶的抽提。酶提取时首先应根据酶的结构和溶解性质，选择适当的溶剂。大多数酶能溶解于水，可用水或稀酸、稀碱、稀盐溶液提取；有些酶与脂质结合或含较多的非极性基团，则可用有机溶剂提取。为了提高酶的提取率并防止酶的变性失活，在提取过程中，要注意控制好温度、pH 值等各种条件。破碎生物组织一般在适当的缓冲液中进行。典型的抽提液由以下几部分组成：



◆ 抽提液 = 离子强度调节剂 + pH 缓冲剂 + 温度效应剂

(KCl、NaCl、蔗糖) (各种缓冲液) (甘油、二甲基亚砷)

+ 蛋白酶抑制剂 + 抗氧化剂 + 重金属络合剂 + 增溶剂

(PM3F、DIFP) (DTT 巯基乙醇) (EDTA、柠檬酸) (TritonX — 100)

◆ 根据酶提取时所采用的溶剂或溶液的不同，酶的提取方法主要有盐溶液提取、酸溶液提取、碱溶液提取和有机溶剂提取等。

◆(1) 盐溶液提取

- 大多数酶溶于水，而且在一定浓度的盐存在条件下，酶的溶解度增加，这称之为盐溶现象，然而酶浓度不能太高，否则溶解度反而降低，出现盐析现象。所以一般采用稀盐溶液进行酶的提取，盐浓度一般控制在 0.02~0.5 mol/L 的范围内。例如，用固体发酵生产的麸曲中的 α -淀粉酶、糖化酶、蛋白酶等胞外酶，用 0.15 mol/L 的氯化钠溶液或 0.02~0.05 mol/L 的磷酸缓冲液提取；酵母醇脱氢酶用 0.5~0.6 mol/L 的磷酸氢二钠溶液提取；6-磷酸葡萄糖脱氢酶用 0.1 mol/L 的碳酸钠提取；枯草杆菌碱性磷酸酶用 0.1 mol/L 的氯化镁提取等。有少数酶，如霉菌产生的脂肪酶，用清水提取比盐溶液提取的效果较好。

◆(2) 酸溶液提取

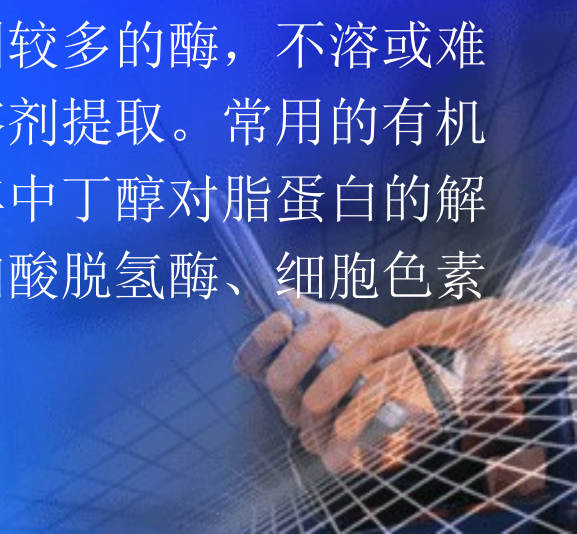
- 有些酶在酸性条件下溶解度较大且稳定性较好宜用酸溶液提取。例如从胰脏中提取胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶，采用 0.12 mol/L 的硫酸溶液进行提取。

◆(3) 碱溶液提取

- 有些在碱性条件下溶解度较大且稳定性较好的酶，应采用碱溶液提取。例如，细菌 L-天门冬酰胺酶的提取是将含酶菌体悬浮在 pH 11~12.5 的碱溶液中，振荡 20 min，即达到显著的提取效果。

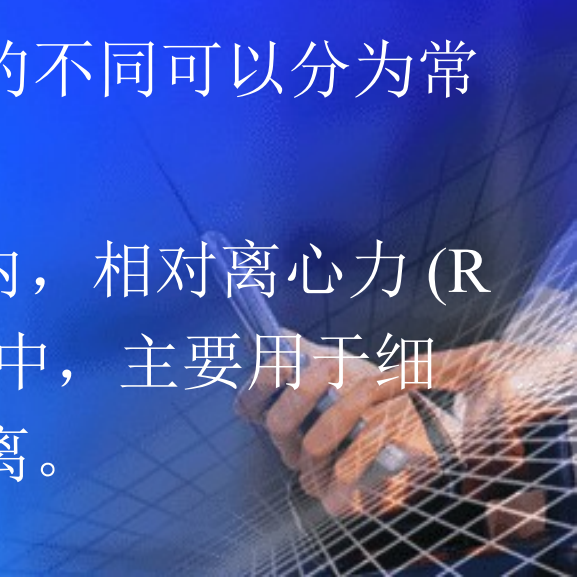
◆(4) 有机溶剂提取

- 有些与脂质结合比较牢固或分子中含非极性基团较多的酶，不溶或难溶于水、稀酸、稀碱和稀盐溶液中，需用有机溶剂提取。常用的有机溶剂是与水能够混溶的乙醇、丙酮、丁醇等。其中丁醇对脂蛋白的解离能力较强，提取效果较好，已成功地用于琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶、胆碱酯酶等的提取。



2.3.2.3 离心分离

- ◆离心是借助于离心机旋转所产生的离心力，使不同大小和不同密度的物质分离的技术，在酶的提取和分离纯化过程中，细胞的收集、细胞碎片和沉淀的分离以及酶的纯化等往往要使用离心分离。在离心分离时，要根据欲分离物质以及杂质的大小、密度和特性的不同，选择适当的离心机、离心方法和离心条件。
- ◆离心机多种多样，按照离心机的最大转速的不同可以分为常速（低速）、高速和超速三种。
- ◆常速离心机的最大转速在 8000 r/min 以内，相对离心力 (RCF) 在 1×10^4g 以内，在酶的分离纯化过程中，主要用于细胞、细胞碎片和培养基残渣等固形物的分离。

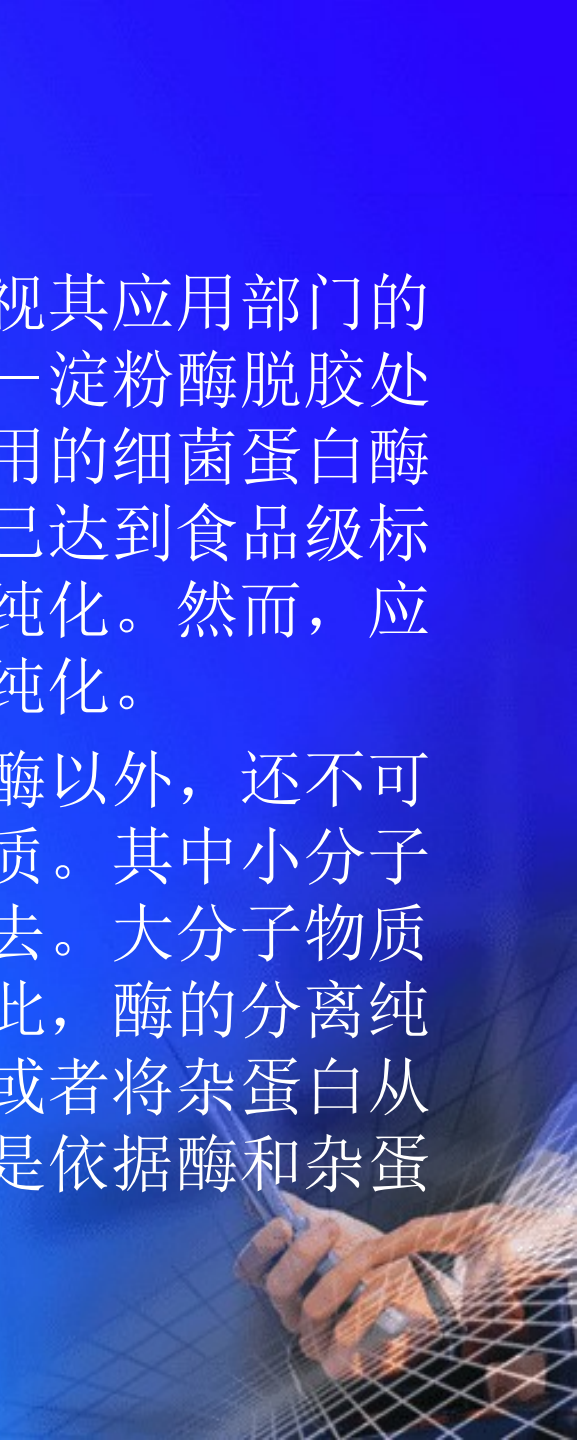


- ◆高速离心机的最大转速为 $1 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^4 \text{ r / min}$ ，相对离心力达到 $1 \times 10^4 \text{ g} \sim 1 \times 10^5 \text{ g}$ ，在酶的分离中主要用于沉淀、细胞碎片和细胞器等的分离。
- ◆超速离心机的最大转速达 $2.5 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4 \text{ r / min}$ ，相对离心力可以高达 $5 \times 10^5 \text{ g}$ 。超速离心可以采用差速离心、密度梯度离心或等密梯度离心等方法。超速离心可用于酶分子的分离纯化。在离心过程中，应该根据需要，选择好离心力（或离心速度）和离心时间，并且控制好温度和 pH 值等条件。



2.3.3 酶的纯化

- ◆ 抽提的酶液是否需要进一步经过纯化，要视其应用部门的要求。一般工业的酶，如纺织工业应用 α -淀粉酶脱胶处理，往往采用液体粗酶便可；皮革工业应用的细菌蛋白酶也是如此。食品工业应用的酶如果粗酶液已达到食品级标准要求，特别是卫生指标，也无需进一步纯化。然而，应用于医药、化学试剂级的酶液必须进一步纯化。
- ◆ 在浓缩液或发酵液中，除含有我们需要的酶以外，还不可避免地存在着其他大分子物质和小分子物质。其中小分子物质在以后的纯化步骤中会自然而然的除去。大分子物质中包括核酸、粘多糖及其他蛋白质等。因此，酶的分离纯化工作主要是，将酶从杂蛋白中分离出来或者将杂蛋白从酶溶液中除去。现有酶的分离纯化方法都是依据酶和杂蛋白在性质上的差异而建立的。



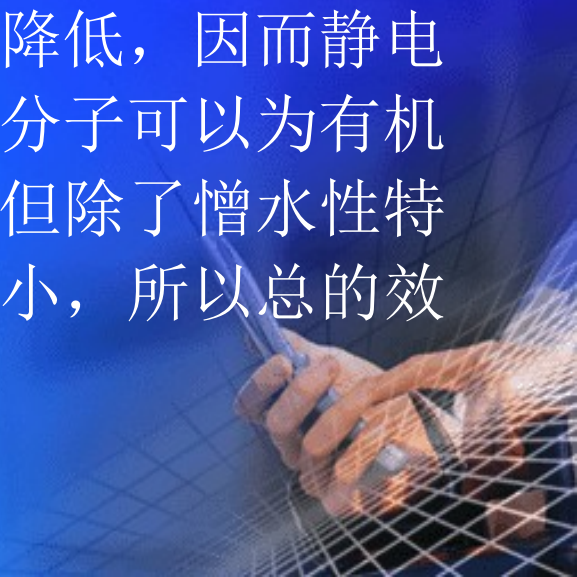
酶的纯化方法:

◆ 酶和杂蛋白的性质差异大体有以下几个方面，它们的分离方法根据这个基础分为：

- (1) 根据分子大小而设计的方法。如离心分离法、筛膜分离法、凝胶过滤法等。
- (2) 根据溶解度大小分离的方法、如盐析法、有机溶剂沉淀法、共沉淀法、选择性沉淀法、等电点沉淀法等。
- (3) 按分子所带正负电荷多少分离的方法，如离子交换分离法、电泳分离法、聚焦层析法等。
- (4) 按稳定性差异建立的分离方法，如选择性热变性法、选择性酸碱变性法、选择性表面变性法等。
- (5) 按亲和作用的差异建立的分离方法，如亲和层析法、亲和电泳法等。

有机溶剂沉淀法

- ◆ 利用和水互溶的有机溶剂使酶沉淀的方法很早就用来纯化酶。在工业上也很重要，例如血浆蛋白质的分离纯化，至今仍采用本法。由于本法的机理和盐析法不同，可作为盐析法的补充。
- ◆ 加入有机溶剂于酶溶液中产生多种效应，这些效应结合起来，使酶沉淀。其中主要效应是水的活度的降低。当有机溶剂浓度增大时，水对酶分子表面上荷电基团或亲水基团的水化程度降低，或者说溶剂的介电常数降低，因而静电吸力增大。在憎水区域附近有序排列的水分子可以为有机溶剂所取代，使这些区域的溶解性增大。但除了憎水性特别强的酶外，对多数酶来说，后者影响较小，所以总的效果是导致酶分子聚集而沉淀。



◆ 有机溶剂沉淀法的优点是溶剂容易蒸发除去，不会残留在成品中，因此适用于制备食品级酶。而且有机溶剂密度低，与沉淀物密度差大，便于离心分离。有机溶剂沉淀法的缺点是，容易使酶变性失活，且有机溶剂易燃、易爆、安全要求较高。



凝胶过滤 (gel filtration chromatography)

- ◆ 凝胶过滤有多种名称，又称凝胶排阻层析、分子筛层析法、凝胶层析法等。是根据溶质分子的大小进行分离的方法。它具有一系列的优点：操作方便，不会使物质变性，层析介质不需再生，可反复使用等；因而在酶纯化中占有重要位置。由于凝胶层析剂的容量比较低，所以在生物大分子物质的分离纯化中，一般不作为第一步的分离方法，而往往在最后的处理中被使用。它的应用主要包括脱盐，生物大分子按分子大小分级分离以及分子量测定等。

(1) 基本原理

◆在显微镜下，可观察到凝胶过滤层析介质具有海绵状结构。将凝胶装于层析柱中，加入混合液，内含不同分子量的物质，小分子溶质能在凝胶海绵状网格内，即凝胶内部空间全都能为小分子溶质所达到，凝胶内外小分子溶质浓度一致。在向下移动的过程中，它从一个凝胶颗粒内部扩散到胶粒孔隙后再进入另一凝胶颗粒，如此不断地进入与流出，使流程增长，移动速率慢故最后流出层析柱。而中等大小的分子，它们也能在凝胶颗粒内外分布，部分送入凝胶颗粒，从而在大分子与小分子物质之间被洗脱。大分子溶质不能透入凝胶内，而只能沿着凝胶颗粒间隙流运动，因此流程短，下移速度较小分子溶质快而首先流出层析柱。因而样品通过定距离的层析柱后，不同大小的分子将按先后顺序依次流出，彼此分开。

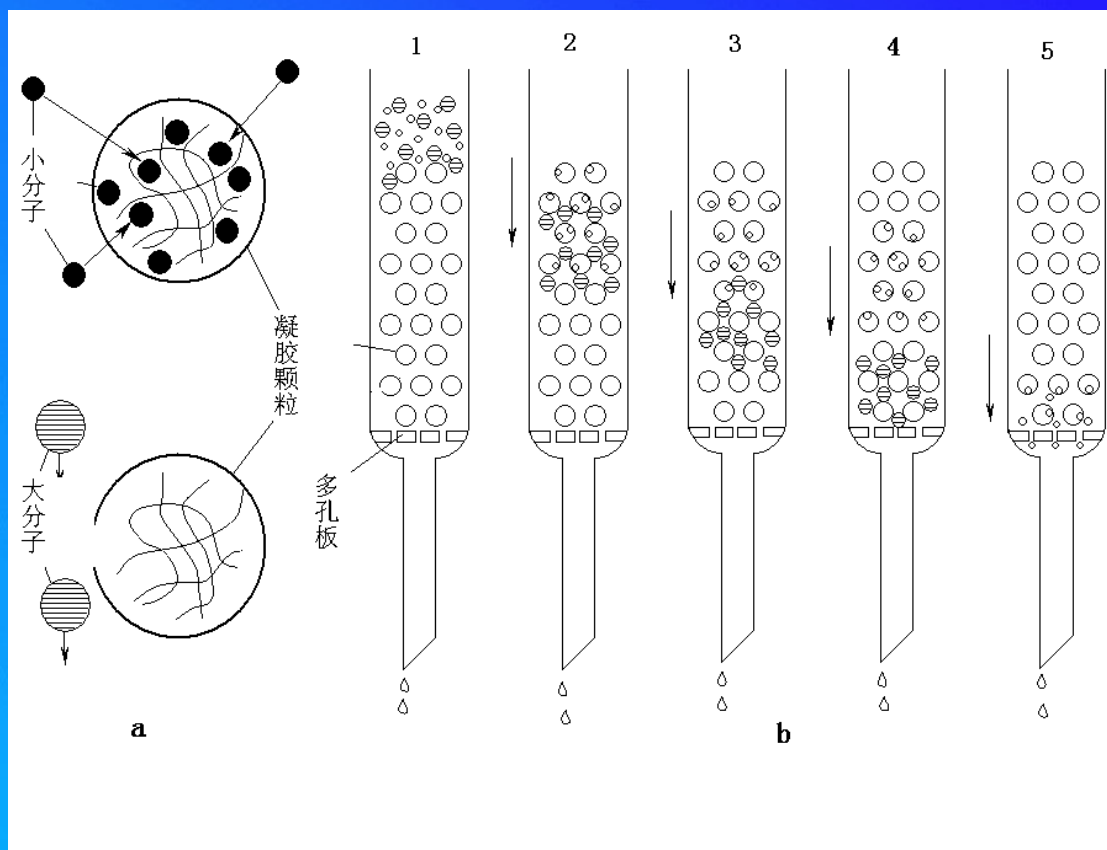


图 2 — 4 凝胶过滤层析的原理

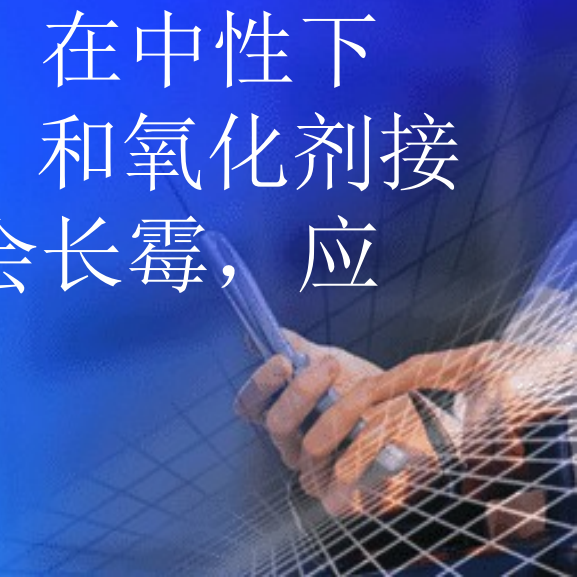
a. 小分子由于扩散作用进入凝胶内部被截留；大分子被排阻在颗粒外，在颗粒间迅速通过。 **b. 1.** 蛋白质混合物上柱， **2.** 洗脱开始，小分子扩散进入凝胶颗粒内大分子被排阻在颗粒外， **3.** 小分子被截留，大分子向下移动，大小分子分开， **4.** 大小分子完全分开， **5.** 大分子行程较短，已洗脱出层析柱，小分子尚在行进中。

(2) 凝胶种类



- ◆① 葡聚糖凝胶 是分子量几万到几十万的葡聚糖凝胶通过环氧氯丙烷交联而成的网状结构物质，可分离分子量从1 000~500 000 的分子。其商品名是 Sephadex G，有各种型号(表2—3)，G后的数字表示每g干胶吸水量(即吸水值)的10倍。其特性如表2—3所示，另外还有一种为 Sephacryl—S，通过N，N—甲叉双丙烯酰胺交联的烯丙基葡聚糖，可适用于水、有机溶剂及高浓度解离试剂存在的系统。另一类 Sephadex—LH，适用于脂类化合物的分离。

◆葡聚糖凝胶在干燥状态是坚硬的白色粉末，不溶于水和盐类溶液。因具有大量的羟基，故有很大的亲水性，在水中即显膨胀，吸水后机械强度大大降低。它对碱和弱酸（pH 2~12）稳定。在强酸溶液中，特别是在高温下，糖苷键会水解。在中性下，可在 120℃ 加压消毒保存。和氧化剂接触会分解。长久不用时，有时会长霉，应加防腐剂。



◆② 聚丙烯酰胺凝胶 是以丙烯酰胺为单体，通过 N，N - 甲叉双丙烯酰胺为交联剂共聚而成的凝胶物质。商品名是 Bio - Gel P，有各种型号，P 后的数字乘以 1 000 表示其分离的最大分子量（即排阻分子量）。



◆③ 琼脂糖凝胶 琼脂糖是琼脂抽去琼脂胶等之后所得 D 一半乳糖和 3, 6-脱水半乳糖，自动缔合而成的网眼结构物质，孔径大小由胶的浓度决定。以商品 Sepharose 为例，有 2B、4B 和 6B 等规格，B 前面数字表示胶百分浓度。这类凝胶孔径都比较大，适于分离较大的物质，如病毒、细胞颗粒和 DNA 等。

其他纯化方法

◆亲和层析法

- 利用生物体内存在的特异性相互作用分子对而设计的层析方法

◆染料层析法

- 具有亲和配基的染料可以吸附酶，由于配基的结构类似某些酶的底物。

◆疏水层析

- 将疏水性基团如丁烷、辛烷、苯固定化到介质上，这些基团会与蛋白质生物大分子上的疏水区亲和。

◆电泳

- 靠溶质在电场移动中移动速度不同而分离的方法。



2.4 酶分离、纯化的评价

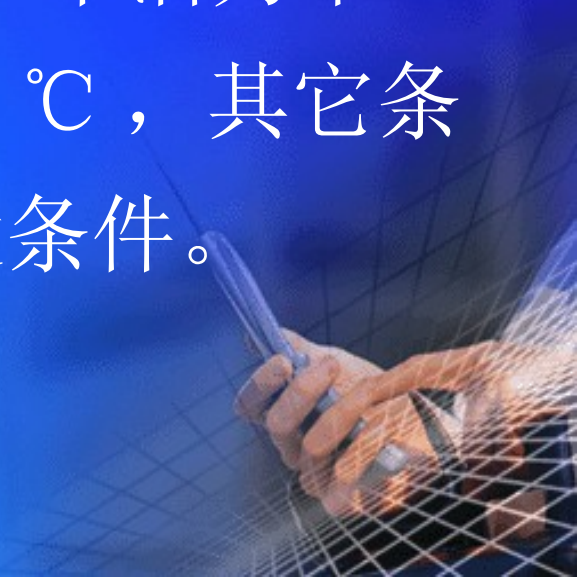
◆酶经分离、纯化后要确定该纯化步骤是否适宜，必须经过对有关参数的测定及计算才能确定。酶的产量是以活力单位表示，因此在整个分离过程中每一步始终贯穿比活力和总活力的检测、比较。



基本概念 1

重要

◆酶活力 (Enzyme activity)：酶活力是指酶催化反应的能力，它表示样品中酶的含量。1961 年国际酶学会规定，1 min 催化 $1\mu\text{mol}$ 分子底物转化的酶量为该酶的一个活力单位（国际单位），温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，其它条件（pH、离子强度）采用最适条件。



◆酶的总活力为样品的全部酶活力。

总活力 = 酶活力 × 总体
积 (mL)

或 = 酶活力 ×
总质量 (g)



◆比活力 (Specific activity) : 比活力是指单位蛋白质 (毫克蛋白质或毫克蛋白氮) 所含有的酶活力 (单位 / 毫克蛋白) 。比活力是酶纯度指标, 比活力愈高表示酶愈纯, 即表示单位蛋白质中酶催化反应的能力愈大。但是, 比活力仍然是个相对酶纯度指标。要了解酶的实际纯度, 尚需采用电泳等测定方法。



◆回收率 (Yield percent) : 回收率是指提纯前与提纯后酶的总活力之比。它表示提纯过程中酶的损失程度, 回收率愈高, 其损失愈少。

◆提纯倍数: 提纯倍数是指提纯前后两者比活力之比。它表示提纯过程中酶纯度提高的程度, 提纯倍数愈大, 提纯效果愈佳。



酶纯化评价实例

表 2-6 过氧化物酶纯化表

分离方法	总的酶活力 (单位)	产量 (%)	总的蛋白质 (mg)	比活力 (酶单位/mg 蛋白质)	纯化 倍数
粗萃取液	33652	100	4982	6.8	1.0
30%(NH ₄) ₂ SO ₄ 饱和 度, 上清液	32200	96	3300	9.8	1.4
Bio-Gel P-60 柱	25560	76	1474	17.3	2.5
DEAE-Sephadex 柱	17253	51	308	56.0	8.2
ConA-Sepharose 柱	4614	14	5.9	782.0	115.0
Phenyl-Sepharose CL-4B 柱	2300	7	1.7	1352.9	199.0
DEAE-Sephadex 柱	1410	4	0.33	4272.7	628.4

2.5 酶的剂型与保存

◆酶制剂通常有下列四种剂型：

- 液体酶制剂
- 固体粗酶制剂
- 纯酶制剂
- 固定化酶制剂（见书中第五章）



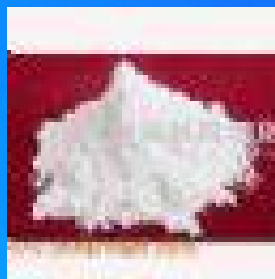
2.5.1 液体酶制剂

- ◆包括稀酶液和浓缩酶液。一般除去固体杂质后，不再纯化而直接制成，或加以浓缩而成，一般需要加稳定剂。这种酶制剂不稳定，且成分复杂，只用于某些工业生产。



2.5.2 固体粗酶制剂

- ◆ 发酵液经杀菌后直接浓缩或喷雾干燥制成。有的加入淀粉等填充料，用于工业生产。有的经初步纯化后制成，如用于洗涤剂、药物生产。用于加工或生产某种产品时，务须除去起干扰作用的杂酶，才不会影响质量。固体酶制剂适于运输和短期保存，成本也不高。



2.5.3 纯酶制剂

- ◆ 包括结晶酶，通常用作分析试剂和医疗药物。要求较高的纯度和一定的活力单位数。用作分析工具酶时，除了要求没有干扰作用的杂酶存在外，还要求单位质量的酶制剂中酶活力达到一定的单位数。用作基因工程的工具酶要求不含非专一性的核酸酶，或完全不含核酸酶，



酶的保存方法

- ◆(1) 温度。
- ◆(2) pH 与缓冲液。
- ◆(3) 酶蛋白浓度。
- ◆(4) 氧。
- ◆(5) 为提高酶稳定性，常加入下列稳定剂：
 - ① 底物、抑制剂和辅酶，它们的作用可能是通过降低局部的能级水平，使酶蛋白处于不稳定状态的扭曲部分转入稳定状态。
 - ② 对巯基酶，可加入—SH 保护剂。如二巯基乙醇、GSH(谷胱甘肽)、DTT(二硫苏糖醇) 等。
 - ③ 其他如 Ca^{2+} 能保护 α —淀粉酶， Mn^{2+} 能稳定溶菌酶， Cl^- 能稳定透明质酸酶。



基本概念 2

重要

◆酶分子修饰:

- 通过各种方法使酶分子的结构发生某些改变，从而改变酶的某些特性和功能的技术过程。如金属离子交换法、大分子修饰法
- 例如，Bender 和 Kosland 成功地利用化学修饰法将枯草杆菌蛋白酶活性中心的丝氨酸转换为半胱氨酸，修饰后，该酶失去对蛋白质和多肽的水解能力，却出现了催化硝基苯酯等底物水解的活性。

酶分子的修饰方法

重要

- ◆ **化学法**又可分为：金属离子置换法、大分子修饰法、肽链有限水解法、蛋白侧链基团的小分子修饰法等。
- ◆ **生物法**是通过基因工程的手段改变蛋白质，即基于核酸水平对蛋白质进行改造，利用基因操作技术对 DNA 或 mRNA 进行改造和修饰以期获得化学结构更为合理的蛋白质。
- ◆ **物理修饰法**的特点是不改变酶的组成和基团，酶分子的共价键不发生变化。

酶原:

重要

- 酶是在活细胞中合成的，但不是所有新合成的酶都具有催化活力，这种新合成酶的前体（无催化活力）称为酶原（Proenzyme）。就生命现象而言，酶原是酶结构一种潜在的存在形式，如果没有这种形式，生命就会停止。
 - ◆ 例如，哺乳动物的胰脏分泌到消化系统中的胰蛋白酶原和胰凝乳蛋白酶原，每种酶原都是由二硫键交联的单一多肽链组成，它们在到达十二指肠以前，一直是十分稳定的，而到达十二指肠后则被另一种蛋白质水解酶所活化，这种活化过程是从无活力酶原转变成有活力酶的过程。该种酶原往往由该种酶所激活，称为酶原的自我激活。

◆酶的多形性与同工酶

- 1975 年 H. Harris 提出酶的多形性概念，认为很多酶可催化相同的反应，但其结构和物理化学性质有所不同，这种现象称为酶的多形性。根据其来源可分为异源同工酶和同工酶 (Isoenzyme)，前者是不同来源的同工酶。



- 例如，酵母菌中醇脱氢酶和动物肝脏中的醇脱氢酶，而后者是指来自同一生物体同一生活细胞的酶，能催化同一反应，但由于结构基因不同，因而酶的一级结构、物理化学性质以及其它性质有所差别，称为同工酶。测定同工酶最常用的方法是电泳法，此法对样品纯度要求不严格，分辨力强，而且简便快速。



- 例如乳酸脱氢酶有 5 种同工酶：LDH1、LDH2、LDH3、LDH4 和 LDH5，天冬氨酸激酶 (AK) 有三种同工酶：AK1、AK2、AK3，磷酸葡萄糖变位酶有 50 种以上的同工酶。



The background is a vibrant blue gradient. In the top left, a hand holds a lit matchstick, with a bright flame and lens flare effects. In the bottom right, a hand holds a pen, poised to write on a white grid pattern that recedes into the distance. The overall composition suggests themes of technology, innovation, and precision.

谢谢！

◆ 1、分离纯化酶有哪些常用方法，根据什么？

