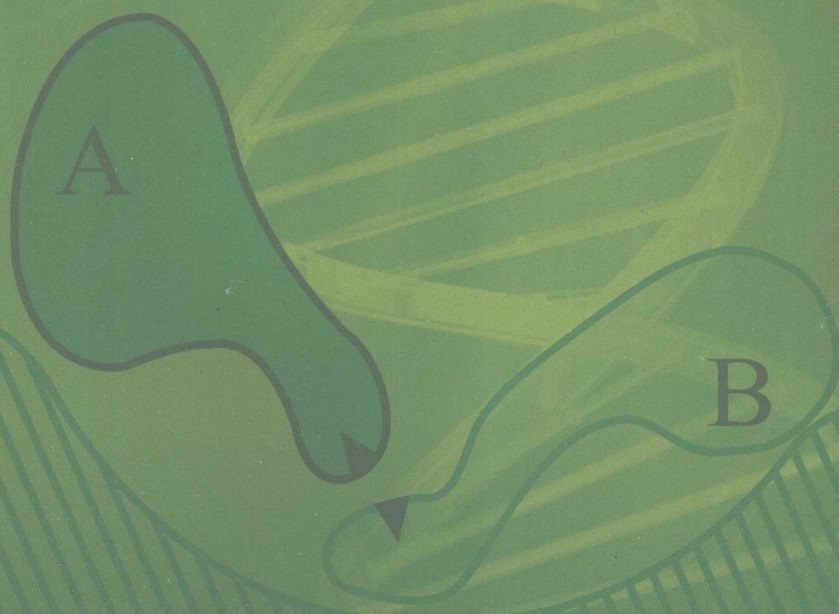


高等学校教材

酶工程

ENZYME ENGINEERING

肖连冬 张彩莹 主编



化学工业出版社

E

高等学校教材

酶 工 程

Enzyme Engineering

肖连冬 张彩莹 主编



化学工业出版社

·北京·

内 容 提 要

全书共分十章,在介绍酶学基础、酶的合成与生产、酶分离纯化基本知识的基础上,重点讲述了酶工程的相关技术及其应用,如酶和细胞的固定化、酶的分子修饰、酶的非水相催化的操作方法。另外,结合酶工程领域的特点,本书介绍了酶的研究进展和酶反应器,力求反映近年来酶工程领域涉及可的新理论、新进展。为突出酶工程技术的实用性,本书最后一章详述了酶工程在各行业领域中的实际应用。本书内容实用、新颖。

本书可作为高等院校生物工程、发酵工程、食品科学与工程等专业的教材,也可供相关专业及行业的技术人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

酶工程/肖连冬,张彩莹主编. —北京:化学工业出版社,2008.11

高等学校教材

ISBN 978-7-122-03653-7

I. 酶… II. ①肖…②张… III. 酶-生物工程-高等学校-教材 IV. Q814

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 140272 号

责任编辑:梁静丽 赵玉清 李植峰
责任校对:战河红

文字编辑:张春娥
装帧设计:张辉

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:北京市彩桥印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张14¼ 字数349千字 2008年9月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 28.00 元

版权所有 违者必究

前 言

酶工程作为生物工程的重要组成部分之一，在生物工程中占据着相当重要的地位。它是酶学和工程学相互渗透结合并伴随着生物工程的发展而产生的一门技术科学。近年来，随着基因工程、蛋白质工程和计算机信息等高新技术的发展，酶工程也得到了迅速的发展，一些新技术、新发明和新成果不断涌现，已经深刻影响了人们的生活和社会经济的发展，也在医药、轻工、能源、环保和生物技术等领域发挥着越来越重要的作用，并展现出了美好的前景。有理由相信，酶工程的未来将更加多姿多彩。

酶工程是许多高等院校生物工程、食品科学及生物科学等专业的主干课，本书就是为适应高等学校生物工程及相关专业的酶工程教学而编写的，同时满足科研和生产需要。本教材在编写过程中，融合了编者多年来关于酶工程课程的教学经验，主要突出以下特点：①注意保持内容的系统性、完整性和合理性，同时又避免与基础知识（如生物化学）和相关专业知识（如生物工程下游技术）的重复；②在注重介绍成熟技术的同时，结合酶工程的特点，融入了最新研究内容，保证教材内容的时效性，力求反映近年来酶工程领域的新知识和新进展；③科学合理地安排有关内容的深度及广度，注重知识的渗透及相关知识的衔接；④突出应用性，重在充实酶工程在多行业领域的应用内容。

本书内容分十章，包括：绪论、酶学基础、酶的生物合成与发酵生产、酶的分离与纯化、酶与细胞的固定化技术、酶的分子修饰、酶的非水相催化、酶工程的最新进展、酶反应器、酶的应用等。在内容安排上，既有最基础的酶学知识，又有酶工程的成熟技术和新的热点研究内容，还对酶工程在各行各业的实际应用进行了介绍。

参加本书编写的人员有南阳理工学院的肖连冬、李彗星，南阳师范学院的张彩莹、柯涛，河南科技学院的张明霞、贾翠英。第1章和第10章由贾翠英、李彗星编写；第2章和第4章由张彩莹编写；第3章和第9章由肖连冬编写；第5章和第7章由张明霞编写；第6章由柯涛编写；第8章由贾翠英编写。肖连冬和张彩莹负责统编全稿。

本书在编写过程中，参考了相关专家、学者的研究成果或文献，在此对这些作者表示衷心感谢！

鉴于编者水平有限，书中疏漏和不足在所难免，恳请有关专家和广大读者朋友批评指正。

编者

2008年7月于南阳

目 录

1 绪论	1
1.1 酶工程是生物技术的重要组成部分	1
1.1.1 酶工程是生物工程的核心	1
1.1.2 酶及酶工程研究的重要意义	2
1.2 酶工程的内容	3
1.3 酶和酶工程的发展	5
1.3.1 酶的应用研究	5
1.3.2 酶的理论研究	7
2 酶学基础	9
2.1 酶的分类、组成和结构特点	9
2.1.1 酶的分类与命名	9
2.1.2 酶的组成和结构特点	11
2.2 酶催化作用机理	12
2.2.1 酶催化作用特点	12
2.2.2 酶的作用机理	15
2.3 酶促反应动力学	18
2.3.1 酶促反应速率	18
2.3.2 影响酶促反应的因素	18
2.4 酶活力及其测定	24
2.4.1 酶活力	24
2.4.2 酶活力的测定	25
3 酶的生物合成与发酵生产	27
3.1 酶发酵生产用微生物菌种	27
3.1.1 酶发酵生产用菌种的要求	28
3.1.2 微生物产酶菌株的获得	28
3.2 酶发酵工艺条件及控制	29
3.2.1 培养基的营养成分	29
3.2.2 发酵条件的控制及对产酶的影响	30
3.2.3 固定化微生物细胞发酵产酶的工艺条件及其控制	32
3.2.4 固定化微生物原生质体发酵产酶的工艺条件及其控制	33
3.3 提高酶产量的方法	33
3.3.1 酶生物合成的调控机制	33
3.3.2 打破酶合成调节机制限制及提高酶产量的方法	37
3.4 酶发酵动力学	39
3.4.1 酶生物合成的模式	39
3.4.2 酶生产过程中的细胞生长动力学	42

3.4.3	产酶动力学	43
3.4.4	固定化细胞生长和产酶动力学	43
3.5	动植物细胞培养产酶	45
3.5.1	动植物细胞的特点	45
3.5.2	植物细胞的培养产酶	46
3.5.3	动物细胞的培养产酶	50
4	酶的分离与纯化	53
4.1	酶的分离纯化策略	53
4.1.1	基本原则	53
4.1.2	酶的分离纯化策略	53
4.1.3	纯化方法的选择	55
4.2	酶液的制备和初分离	56
4.2.1	材料的预处理	56
4.2.2	细胞破碎	56
4.2.3	抽提	58
4.2.4	浓缩	58
4.3	酶的分离纯化方法	59
4.3.1	根据溶解度不同建立的纯化方法	59
4.3.2	按照分子大小不同建立的纯化方法	64
4.3.3	依据电学解离性质不同建立的纯化方法	67
4.3.4	利用亲和作用进行纯化的方法	71
4.3.5	根据稳定性差别建立的纯化方法	72
4.3.6	酶的结晶与干燥	73
4.4	酶纯度的检验	75
5	酶与细胞的固定化技术	77
5.1	酶的固定化	77
5.1.1	酶的固定化方法	78
5.1.2	固定化酶的性质	83
5.1.3	固定化酶的应用	85
5.2	细胞及细胞器的固定化	86
5.2.1	微生物细胞固定化	86
5.2.2	植物细胞固定化	88
5.2.3	动物细胞固定化	90
5.2.4	细胞器的固定化	91
5.3	固定化酶(细胞)的评价指标	92
5.3.1	固定化酶(细胞)的活力	93
5.3.2	偶联率及酶活力回收率的测定	93
5.3.3	相对酶活力的测定	93
5.3.4	固定化酶(细胞)的半衰期	94
6	酶的分子修饰	95
6.1	酶的化学修饰	95

6.1.1	酶化学修饰方法及修饰剂	95
6.1.2	酶分子侧链基团的化学修饰	100
6.1.3	酶的亲和修饰	104
6.1.4	有机大分子对酶的化学修饰	105
6.1.5	修饰酶的性质及特点	108
6.2	酶的分子定向进化	109
6.2.1	定向进化原理	109
6.2.2	分子定向进化策略	112
6.2.3	基因文库的构建与筛选	119
6.2.4	定向进化的应用和展望	128
7	酶的非水相催化	133
7.1	酶非水相催化的研究概况	133
7.1.1	有机介质中的酶催化	134
7.1.2	气相介质中的酶催化	134
7.1.3	超临界流体介质中的酶催化	134
7.1.4	离子液介质中的酶催化	135
7.2	有机介质中水和有机溶剂对酶催化反应的影响	136
7.2.1	有机介质反应体系	136
7.2.2	水对微水介质中酶催化的影响	138
7.2.3	有机溶剂对微水介质中酶催化的影响	141
7.2.4	有机溶剂对酶活性和选择性的调节	144
7.3	酶在有机介质中的催化特性	144
7.3.1	底物专一性	144
7.3.2	对映体选择性	145
7.3.3	区域选择性	145
7.3.4	键选择性	145
7.3.5	热稳定性	146
7.3.6	pH“记忆”与pH“忘记”	146
7.4	反胶束体系的酶学研究	146
7.4.1	反胶束的形成和酶的包覆	147
7.4.2	反胶束酶体系的制备方法	147
7.4.3	反胶束体系的酶催化特性	147
7.5	有机介质中酶催化反应及应用	148
7.5.1	有机介质中酶催化反应的类型	149
7.5.2	有机介质中酶催化反应的应用	149
8	酶工程的最新进展	153
8.1	核酶	153
8.1.1	核酶的结构及催化机理	153
8.1.2	脱氧核酶	158
8.1.3	核酶的应用和最新进展	159
8.1.4	核酶研究中的问题以及对策	160

8.2	模拟酶	161
8.2.1	环糊精模拟酶模型	161
8.2.2	大环聚醚及其模拟酶	163
8.2.3	膜体系及其模拟酶	164
8.2.4	聚合物及其模拟酶	164
8.2.5	金属卟啉及其模拟酶	165
8.2.6	肽酶	165
8.3	抗体酶	166
8.3.1	抗体酶的理论基础	166
8.3.2	抗体酶的制备方法	167
8.3.3	抗体酶的应用	168
8.3.4	抗体酶的研究展望	170
8.4	组合生物催化	171
8.4.1	组合生物催化的理论基础和特点	171
8.4.2	用于组合生物催化反应的酶的特点	172
8.4.3	构建小分子库	174
8.4.4	构建天然产物库	174
8.4.5	结论和展望	176
9	酶反应器	177
9.1	酶的应用形式	177
9.1.1	概述	177
9.1.2	应用形式	177
9.2	酶反应器的类型与特点	178
9.2.1	理想的酶反应器的要求	178
9.2.2	酶反应器的类型与特点	178
9.3	酶反应器的选择与使用	182
9.3.1	根据酶的应用形式选择反应器	183
9.3.2	根据酶反应动力学性质选择反应器	183
9.3.3	根据底物和产物的物理化学性质选择反应器	184
9.4	酶反应器的设计	185
9.4.1	酶反应器类型的确定	185
9.4.2	酶反应器制造材料的确定	185
9.4.3	物料衡算	185
9.4.4	热量衡算	187
9.4.5	反应器数量的计算	187
9.5	酶反应器的操作及注意事项	188
9.5.1	酶反应器操作条件的确定及调控	188
9.5.2	酶反应器使用中应注意的问题	190
10	酶的应用	191
10.1	酶在医药方面的应用	191
10.1.1	酶在疾病诊断方面的应用	192

10.1.2 酶在疾病治疗方面的应用	193
10.1.3 酶在药物制造方面的应用	195
10.2 酶在食品工业中的应用	198
10.2.1 酶在食品生产中的应用	199
10.2.2 酶在食品保鲜和储藏中的应用	202
10.2.3 用酶制剂改善食品风味、品质和产量.....	203
10.3 酶在轻工、化工方面的应用	204
10.3.1 酶在原料处理方面的应用	204
10.3.2 酶在轻工、化工产品制造方面的应用.....	205
10.3.3 加酶增强产品的使用效果	207
10.4 酶在能源、环保方面的应用	208
10.4.1 酶在能源方面的应用	208
10.4.2 酶在环保方面的应用	212
参考文献	215

1 绪 论

酶是由活细胞产生的生物催化剂，生物体内的一切代谢反应都是在酶的催化下进行的，从此意义上讲，没有酶就没有生命。探讨酶的本质和发展问题是酶学研究的内容。

酶工程又称酶技术，它是随着酶学研究的迅速发展，特别是酶的应用推广使酶学和工程学互相渗透、结合而发展成的一门新的科学技术，是酶学、微生物学的基本原理与化学工程有机结合而产生的交叉性学科，是以应用目的为出发点来研究酶，利用酶的催化特性并通过工程化将相应原料转化为目的物质的技术。因此酶工程就是酶的生产和应用技术。其主要任务是通过预先设计，经人工操作而获得大量所需的酶，并利用各种方法使酶发挥其最大的催化功能，为人类和社会服务。

酶工程的应用范围目前已遍及工业、农业、医药卫生、环保、能源开发和生命科学各个领域。近 20 年来，由于基因工程、蛋白质工程和计算机信息等高科技的发展，使酶工程技术得到了迅速的发展和运用，各种新成果、新技术、新发明不断涌现。与此同时，酶工程产业也在快速发展。1998 年，全球工业酶制剂销售额高达 16 亿美元，预计在 2010 年，其销售额将达到 30 亿美元。近年来，美国、欧盟国家和日本，在酶工程研究和酶工程产业方面发展非常迅速，仍然居于领先地位。从世界知名企业产品所占市场份额情况看，如丹麦的 Novo 公司、荷兰的 Gistbrocades 公司是主要的酶制剂制造商，分别占世界酶制剂市场的 55% 与 25%，美国酶制剂公司约占 12%，其他分别为日本、德国等国家。目前我国需要跟踪国际上的最新发展动向，制订发展计划，使我国的酶工程研究和酶工程产业取得更快的发展。

1.1 酶工程是生物技术的重要组成部分

1.1.1 酶工程是生物工程的核心

生物工程（又称生物技术）是 20 世纪 70 年代发展起来的一门新的综合性技术学科。它综合性地运用生物学、化学和工程学（如化学工程和电子计算机等）的技术，以创造物种、改造物种，分离和改造生物体中的某些组分（如酶、蛋白质、核酸、细胞器等），利用生物体的某些特殊机能（如酶的催化功能、抗体的免疫功能等），为工农业生产以及医疗卫生等行业服务。现在，我国已利用生物技术手段生产贵重生化药物，如人胰岛素、干扰素、乙肝疫苗、生长激素等，产生了巨大的经济效益和社会效益。

生物工程主要分为发酵工程（微生物工程）、酶工程、基因工程和细胞工程四部分，它们相互依存、相互促进。其中，酶工程是生物工程的重要组成部分，是生物工程的核心。酶工程与发酵工程、基因工程、细胞工程有着密切的联系（图 1-1），尤其与基因工程和发酵工程的联系更加紧密。

运用基因工程技术和发酵工程技术可改善原有酶的性能，如提高酶的产率、增加酶的稳定性、使其在后提取工艺和应用过程中更容易操作。运用基因工程技术还可以将原来有害

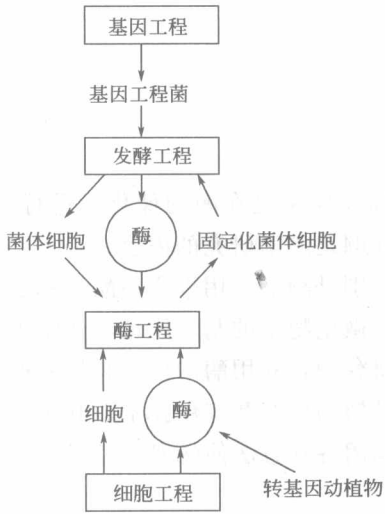


图 1-1 酶工程与发酵工程、基因工程、细胞工程的关系

的、未经批准的微生物产生的酶的基因，或由生长缓慢的、动植物产生的酶的基因，克隆到安全的、生长迅速的、产量很高的微生物体内，改由微生物发酵来生产。运用基因工程技术还可以通过增加编码该酶的基因的拷贝数，来提高微生物发酵产酶的数量。这一原理已成功用于提高大肠杆菌 (*E. coli*) 青霉素 G 酰胺酶的产量。目前，世界上最大的工业酶制剂生产厂商丹麦诺和诺德公司 (NovoNordisk) 生产酶制剂的菌种约有 80% 是基因工程菌。

1.1.2 酶及酶工程研究的重要意义

一切生物的生命活动都是由新陈代谢的正常运转来维持的，而代谢中的各种化学反应是由各种酶的催化来实现的。没有酶，代谢就会停止。因此研究酶的理化性质及其作用机理，对于阐述生命现象的本质具有十分重要的意义。

现代生物科学技术的迅速发展已经深入到分子水平，根据生物大分子的结构与功能关系的研究来探讨生命现象的本质和规律，从酶分子水平探讨酶和生命活动、代谢调节、疾病、生长发育等的关系具有重大意义。个别酶的缺失或者酶的活性受到抑制就会引起代谢受阻或紊乱，从而引发疾病。例如，某些儿童由于缺少苯丙氨酸羟化酶而产生严重的苯基酮尿症，这是因为苯丙氨酸羟化酶的缺乏使得苯丙氨酸正常的降解途径受阻，而改变为另一条降解途径，即苯丙氨酸与 α -酮戊二酸发生转氨反应，产生苯丙酮酸，此物质积累在血液中，最后由尿排出体外。血液中过量的苯丙酮酸妨碍儿童大脑的正常发育，造成严重的智力迟钝。又如：有机磷农药由于能抑制胆碱酯酶活性，而能杀死害虫，并能使人畜中毒死亡。因此，研究酶的结构与功能及其动力学，对于阐明生命的本质和活动规律，以及阐明发病机理，指导诊断治疗，具有极其重要的作用。

对于酶及酶工程的研究还能为药物设计以及疾病的酶法快速诊断及治疗、催化剂设计提供重要的依据和新思想、新概念。在治疗疾病方面，不少酶制剂可以作为治疗疾病的药用酶，有很好的疗效。例如，来自男性尿的尿激酶在治疗各种血栓病方面有特效；天冬酰胺酶能治疗白血病和抗肿瘤；人尿胰蛋白酶抑制剂能使急性胰腺炎患者转危为安；猪、牛凝血酶在外科手术过程中用于止血，效果很好。

疾病诊断的酶法分析具有灵敏、准确、快速、简便等优点，在临床化验和化学分析方面已发挥了越来越大的作用。例如，测定血液中谷丙转氨酶活性，可以为诊断肝炎活动期及病情严重程度提供重要的依据；利用葡萄糖氧化酶电极测定血液和尿中的葡萄糖浓度，可以为糖尿病的诊断提供重要的依据；用辣根过氧化物酶标记乙肝病毒表面抗原或抗体，然后用酶标免疫测定法测定人体血液中乙肝病毒的含量，为诊断乙肝及病情提供重要的依据。

酶作为生物催化剂，与化学催化剂相比，既有共性，又有其特殊性。因此，对酶的研究成果必然能进一步充实和发展催化剂理论。

酶还是生物学研究和生物技术研究的重要工具。正是由于某些专一性酶（工具酶）的发现和研究，使蛋白质、核酸一级结构测定和基因工程研究得以突破。例如，胰蛋白酶、羧肽

酶、氨肽酶等作为测定蛋白质一级结构用酶；限制性内切酶、T₇ DNA 聚合酶、核糖核酸酶、核酸酶等作为测定核酸一级结构用酶；限制性内切酶、DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶等作为基因工程的工具酶。由此可见，利用工具酶进行研究是研究分子生物学的重要手段之一，它在一定程度上推动了分子生物学的发展。

酶工程作为生物技术的组成部分之一，在生物技术中占据相当重要的位置。高效地设计生产酶、有效地改造完善酶、高效地利用酶而为人类造福，已经使酶工程在许多领域起着举足轻重的作用。酶及酶工程不但受到生物化学工作者的重视，也日益受到广大工农业、医药保健及能源环保工作者的重视。

酶及酶工程在工农业生产上日益广泛的应用已经产生了较大的经济效益和社会效益。首先是运用酶技术生产有重要价值的产品。例如，利用固定化氨基酰化酶拆分 DL-酰化氨基酸，自动连续地生产 L-氨基酸；利用固定化青霉素酰化酶合成半合成青霉素；利用固定化木瓜蛋白酶合成高甜度低热量的甜味二肽。其次是利用酶制剂改进生产工艺，提高产品质量和产率，降低生产成本。例如，用酶法代替碱皂法使蚕丝脱胶，提高了丝织物的质量；利用乳糖酶从牛奶中除去乳糖，提高了牛奶的质量；在水果加工过程中加入果胶酶，使果汁易于过滤、澄清，并提高果汁产率。

酶及酶工程就是要通过了解酶的基本特性以及获取的方法和如何应用等，开创性地高效利用酶，服务于人类，造福于社会。

1.2 酶工程的内容

酶工程 (enzyme engineering) 是在 1971 年第一届国际酶工程会议上才得以命名的一项新技术。根据研究和解决问题的手段不同，将酶工程分为化学酶工程和生物酶工程。

化学酶工程也可称为初级酶工程 (primary enzyme engineering)，是指天然酶、化学修饰酶、固定化酶及人工模拟酶的研究和应用。

生物酶工程是酶学和以 DNA 重组技术为主的现代分子生物学技术相结合的产物，也称高级酶工程 (advanced enzyme engineering)。主要包括三方面内容：用基因工程技术大量生产酶 (克隆酶)；对酶基因进行修饰，产生遗传修饰酶 (突变酶)；设计新酶基因，合成自然界不曾有的新酶。

就酶工程本身的发展来说，包括下列主要内容。

(1) 酶的生产及酶生产中基因工程技术的应用 酶制剂的来源有微生物、动物和植物，但主要的来源是微生物。由于微生物比动植物具有更多的优点，因此一般选用优良的产酶菌株，通过发酵来产生酶。为了提高发酵液中的酶浓度，可通过选育优良菌株、构建基因工程菌、优化发酵条件来实现。工业生产需要特殊性能的新型酶，如耐高温的 α -淀粉酶、耐碱性的蛋白酶和脂肪酶等，因此，需要研究、开发生产特殊性能新型酶的菌株。

(2) 酶的分离纯化 酶的分离提纯技术是当前生物下游技术的核心。采用各种分离提纯技术，从微生物细胞及其发酵液，或动植物细胞及其培养液中分离提纯酶，制成高活性的不同纯度的酶制剂，并通过研究新的分离提纯技术来获得能更广泛地应用于国民经济各个方面的高活性、高纯度和高收率的酶制剂。

(3) 酶分子改造 酶分子改造 (又称酶分子修饰) 包括酶的化学方法修饰和生物技术方法修饰。针对酶稳定性差、抗原性强及药用酶在机体内的半衰期较短的缺点，采用各种修饰

方法对酶分子结构进行改造，以便创造出天然酶所不具备的某些优良特性（如较高的稳定性、无抗原性或抗原性较低、抗蛋白酶水解等），以适用于医药的应用及研究工作的要求。甚至于创造出新的酶活性，扩大酶的应用，从而提高酶的应用价值，达到较大的经济效益和社会效益。

目前酶分子改造可从以下两个方面进行。

① 用化学法或酶法直接改造酶蛋白分子的一级结构，或者用化学修饰法对酶分子中的侧链基团进行化学修饰，以改变酶学性质。这类酶在酶学基础研究中及医药方面特别有用。

② 酶分子的定向进化，即用蛋白质工程技术对酶分子结构基因进行改造，以获得一级结构和空间结构较为合理的、具有优良特性的高活性新酶（突变酶）。

(4) 酶和细胞固定化 酶和细胞固定化研究是酶工程的主要任务之一。为了提高分离酶的稳定性、解决酶在水溶液中与底物反应后回收再用及便于产物的分离纯化问题，以及扩大酶制剂的应用范围，采用化学或物理学方法对酶进行固定化，使水溶性酶成为不溶于水的、但仍具有酶活性状态的固定化酶，如固定化葡萄糖异构酶、固定化氨基酰化酶等，测定固定化酶的各种性质，并对固定化酶做各方面的应用与开发研究。

固定化细胞是在固定化酶的基础上发展起来的。通过对微生物细胞、动物细胞和植物细胞进行固定化，制成各种固定化生物细胞。研究固定化细胞的酶学性质，特别是动力学性质，以及研究与开发固定化细胞在各方面的应用，是当今酶工程的一个热门课题。

固定化技术是酶技术现代化的一个重要里程碑，是克服天然酶在工业应用方面的不足之处而又可以发挥酶反应特点的突破性技术。可以说没有固定化技术的开发就没有现代的酶技术。

(5) 酶抑制剂、激活剂的开发及应用研究 许多类型的分子有可能会干扰个别酶的活性，凡能降低酶催化反应速度的物质称抑制剂，而能加快某种酶反应速度的物质称为激活剂。通过酶抑制剂和激活剂的开发应用研究有效阻断不必要或有害的反应，加速有用反应，并通过对一些抑制剂和激活剂对酶的作用机制的探讨，对酶的应用研究特别是对疾病治疗酶学的研究和医疗实践有着十分重要的意义。

(6) 非水相介质中酶的催化 由于酶在有机介质中的催化反应具有许多优点，因此，近年来，对酶在有机介质中的催化反应的研究，已受到许多人的重视，其成为酶工程中的一个新的发展方向。对酶在有机介质中要呈现很高的活性所必须具备的条件以及有机介质对酶性质的影响的研究已取得重要进展。

(7) 酶传感器（又称酶电极） 酶电极是由感受器（如固定化酶）和换能器（如离子选择性电极）所组成的一种分析装置，用于测定混合溶液中某种物质的浓度。其研究内容包括酶电极的种类、结构与原理以及酶电极的制备、性质及其应用等。

(8) 酶反应器研究 酶反应器是完成酶促反应的装置。其研究内容包括酶反应器的类型及特点以及酶反应器的设计、制造及选择等。

(9) 核酶、抗体酶、人工酶和模拟酶 一些核酸分子也可以有酶活性。核酶主要指一类具有生物催化功能的 RNA，也称 RNA 催化剂；其主要研究内容为：核酶的结构、作用机制及应用。抗体酶是一类具有催化活性的抗体，是抗体的高度专一性与酶的高效催化能力二者巧妙结合的产物；其研究内容是：抗体酶的制备、结构、特性、作用机理以及催化反应类型和应用等。人工酶是用人工合成的具有催化活性的多肽或蛋白质。利用有机化学合成的方法合成了一些比酶结构简单得多的具有催化功能的非蛋白质分子，这些物质分子可以模拟酶

对底物的结合和催化过程，既可以达到酶催化的高效率，又能够克服酶的不稳定性，这样的物质分子称为模拟酶；用环糊精已成功地模拟了胰凝乳蛋白酶等多种酶。

(10) 酶技术的应用性开发 即研究与开发酶、固定化酶、固定化细胞等在医药、食品、轻工、化工、能源开发以及环境工程等方面的应用。

1.3 酶和酶工程的发展

由资料记载得知，我国在 4000 多年前的夏禹时代酿酒就已经盛行。酒是酵母菌发酵的产物，是酵母细胞内酶作用的结果。在 3000 年前的周朝，人们就用麦芽粉制造饴糖（麦芽糖）。麦芽糖是麦芽中的淀粉酶水解淀粉的产物。用曲可以治疗消化不良病症也是我国人民的最早发现。曲富含酶和维生素，时至今日其仍然是常用健胃药的主要成分。虽然古人已经利用了酶的催化作用，但是并不了解酶的作用本质。1896 年，德国的巴克纳（Büchner）兄弟从酵母的无细胞抽提液中发现了能将葡萄糖转变成乙醇和 CO_2 的酶，这一重大发现促进了酶的分离提纯、酶的理化性质以及酶促反应动力学等的研究。从此以后，酶学研究主要沿着两个方向发展：一是酶的应用研究，即酶工程技术研究；二是酶的理论研究。

1.3.1 酶的应用研究

1926 年，Sumner 首次从刀豆中制备出脲酶结晶，并证实此结晶能催化尿素水解产生 CO_2 和氨，从而提出酶本身是具有催化能力的蛋白质。此后，人们开展了各种酶的分离提纯的研究，制备了各种不同规格的酶制剂。从 20 世纪 50 年代起，大规模工业生产的酶制剂品种愈来愈多。到目前为止， α -淀粉酶、糖化酶、葡萄糖异构酶、果胶酶、凝乳酶、乳糖酶、脂肪酶以及各种蛋白酶等已经商品化，它们在食品、轻工、化工、医药、能源开发以及环境工程中得到了日益广泛的应用，发挥了重要的作用。

酶工程是在人类应用酶的催化作用的基础上逐渐发展起来的。20 世纪以来，特别是 20 世纪 50 年代以来，酶的应用技术有了很大的进步。

尽管人类在 19 世纪前后才建立起酶的概念，但酶的催化作用却很早就为人们的生活所利用。在人类游牧生活时期，就已会利用动物的胃液来凝固牛乳；如上述，4000 多年前就有的酿酒和制酱技术也是酶作用的结果；秦汉前已将麦芽用于制造饴糖；1908 年罗门等利用胰酶鞣制皮革；1917 年法国人博伊丁和埃芬特将枯草杆菌产生的淀粉酶用作纺织工业的退浆剂。此后酶在工业中应用的研究逐渐深入到很多行业。第二次世界大战以后，随着微生物培养技术、发酵工业和设备的逐渐完善，利用微生物来获得商品化酶制剂已形成规模化产业，并开辟了广阔的市场。1949 年，日本采用深层培养法生产细菌 α -淀粉酶获得成功，使得酶制剂的生产和应用进入工业化阶段。从此，蛋白酶、果胶酶、转化酶等相继投入市场。1959 年，由于采用葡萄糖淀粉酶催化淀粉生产葡聚糖的新工艺研究成功，彻底革新了原来葡萄糖生产中需要高温高压的酸水解工艺，使淀粉得糖率由 80% 提高到 100%，从而使得日本 1960 年的精制葡萄糖产量猛增 10 倍。由于这项改革的成功，极大地促进了酶在工业上应用的发展。

20 世纪 50 年代，尽管酶的应用有了很大的发展，但与酶学研究的进展相比，其发展还是缓慢的，主要原因是酶的生产和应用技术落后。由于酶的分离纯化比较复杂，分离的酶的稳定性显著下降，并且采用在水溶液中分批反应，反应后的酶很难回收，致使成本很高，阻

碍了酶应用技术的进一步发展。

由于酶制剂不稳定，不能重复使用，从 20 世纪 60 年代起，人们曾把注意力集中到酶和细胞的固定化研究上。从应用的目的出发，Crubhofer 和 Schleith 从 1953 年开始研究酶的固定化技术，他们将胃蛋白酶、淀粉酶、羧肽酶和核糖核酸酶等结合在重氮化的树脂上，实现了酶的固定化。1969 年，日本千畑一郎首次应用固定化氨基酰化酶大规模生产 L-氨基酸。从此以后，固定化酶的研究十分活跃，进展很快。现在，已有多种固定化酶用于工业生产。例如，利用固定化葡萄糖异构酶生产高果葡糖浆；利用固定化青霉素酰化酶生产 6-氨基青霉素烷酸；利用固定化乳糖酶生产低乳糖牛奶等。但是，大多数固定化酶的应用研究仍处于实验室研究阶段或中试生产阶段，要用于工业生产上还有待进一步的研究。近年来，国外的研究者在探索酶蛋白的固定化技术方面已寻找到几条途径，使酶蛋白能够以有序方式附着在载体的表面，实现酶的定向固定化，从而使得酶活性损失降低到最低程度。这种有序的定向固定化技术已经用于生物芯片、生物传感器、生物反应器、临床诊断、药物设计、亲和色谱分析以及蛋白质结构和功能的研究中。

从 20 世纪 70 年代初起，人们就直接对微生物细胞进行固定化研究，从而减少了从微生物细胞中分离提纯酶的麻烦，或是有目的地利用微生物细胞内的复合酶系统。1973 年，千畑一郎首次利用固定化大肠杆菌细胞生产 L-天冬氨酸。从此以后微生物细胞的固定化研究十分活跃，其进展很快，愈来愈多的固定化微生物细胞用于工业生产。例如，用卡拉胶包埋固定黄色短杆菌生产 L-苹果酸、用凝胶包埋法固定含天冬氨酸- β -脱羧酶的假单胞菌细胞生产 L-丙氨酸、固定化酿酒酵母细胞生产酒精、固定化增殖细胞用于处理废水等。但是，大多数固定化微生物细胞的应用研究尚处于实验室研究阶段或中试生产阶段，有待进一步研究。

从 20 世纪 80 年代起，人们开始把目光投入到动物细胞和植物细胞的固定化上。动物细胞和植物细胞固定化虽然比微生物细胞固定化难得多，但是它们能产生微生物难以产生的贵重药物，如乙肝病毒表面抗原、单克隆抗体、人参皂苷等。目前，动物细胞和植物细胞的固定化研究也尚处于实验室研究阶段或中试阶段，需要深入研究。

20 世纪 50 年代末到 60 年代，人们致力于用小分子化合物修改酶分子中的氨基酸残基侧链基团，以研究一些酶活性基团的情况，并得到了很有价值的数字。较早用大分子物质修饰酶的是 Katchalsko 等人，他们用 DEAE-右旋糖酐、多肽等修饰酶，使酶的性质得到了改善。从 70 年代开始，随着研究的普遍开展，在修饰剂的选用以及修饰方法上都有了新的发展。现在，有一些酶（如 L-天冬酰胺酶等）用大分子修饰剂修饰之后，其热稳定性得到提高，抗失活因子能力加强，抗原性消除，体内半衰期延长。由此可见，酶化学修饰在一定程度上可以克服天然酶的缺点，使其更适合于工业生产和医疗上的需要。

人工合成酶的研制以及模拟酶的研究也取得了一些进展。人们将人工合成的具有类似酶活性的高聚物称之为人工合成酶。人工合成酶在结构上必须具有两个特殊部位，即一个是底物结合位点，一个是催化位点。已发现构建底物结合位点比较容易，而构建催化位点比较困难，两个位点可以分开设计，但是如果人工合成酶有一个反应过渡态的结合位点，则该位点常常同时具有结合位点和催化位点的功能，如高分子聚合物聚 4-乙烯基吡啶-烷化物。在模拟酶方面，研究的热点主要是对固氮酶的模拟。天然固氮酶由铁蛋白和铁钼蛋白两种组分组成，人们从组成分析出发提出了多种固氮酶模型，由此进一步利用铁、铜、钴等过渡金属络合物模拟过氧化氢酶等。近年来，国际上又发展了一种分子压印技术，又称为生物压印技

术, 该技术可以借助模板在高分子物质上形成特异的识别位点和催化位点。目前此项技术已经获得了广泛应用。

以基因工程为主的现代分子生物技术在酶的生产、改造、设计等方面应用, 促进了生物酶工程的发展。首先, 酶基因克隆和表达技术的应用使得克隆各种天然的蛋白基因或酶基因成为可能。其次, 酶的选择性遗传修饰(酶基因的定点突变)也是近几年兴起的另一个新研究领域。酶工程设计可以采用定点突变和体外分子定向进化两种方式对天然酶分子进行改造, 目前已取得了令人瞩目的成就。其三, 酶的遗传设计技术的研究。现在人们已掌握了遗传设计技术, 所以只要有遗传设计蓝图, 就能人工合成出所设计的酶基因。酶遗传设计的主要目的是创制优质酶, 用于生产昂贵、特殊的药品和超自然的生物制品, 以满足人类的特殊需要。

伴随着固定化酶(或细胞)的研究进展, 人们研究、设计和制造了各种各样的固定化酶反应器。其中, 有一些已应用于工业生产中。目前, 固定化酶反应器的应用尚处于开发的早期阶段, 其最终目标是实现全自动的最佳控制。第二代新型的固定化酶反应器, 例如, 能实现辅因子(辅酶 I 和 ATP 等)再生的酶反应器、两相或多相酶反应器、组合酶反应器等正在研制之中。

自从 1967 年酶电极问世以来, 其研究引起了许多人的极大兴趣。现在, 许多酶电极已经实用化、商品化, 用于测定混合溶液中某种物质的浓度。例如, 用葡萄糖氧化酶电极测定血液、尿、发酵液中的葡萄糖浓度, 用脲酶电极测定血液中的尿素浓度等。酶电极在临床化验、发酵生产、环境监测以及其他化学分析等方面均展示了广阔的前景。近年来, 人们正在研制各种新型的酶电极, 如多功能酶电极、微型酶电极以及抗干扰酶电极等。

酶标免疫分析是 20 世纪 60 年代发展起来的新的免疫测定技术。它是以待测抗原(或抗体)与酶标抗体(或抗原)的专一性反应为基础, 通过酶活力测定来确定抗原(或抗体)含量的一类分析法。现在, 已建立起了各种酶标免疫分析法, 以用于测定血液中的抗原或抗体的含量, 具有很高的灵敏度和准确度。

1.3.2 酶的理论研究

1.3.2.1 酶学研究简史

我国人民几千年前就开始利用酶, 在夏禹时代, 就开始(利用酶)酿酒。1810 年, Jaseph Gaylussac 发现酵母可将糖转化为酒精。1835~1837 年, Berzelius 提出催化作用的概念。1857 年 Pasteur 等人提出酒精发酵是由酵母细胞活动的结果; Liebig 却认为是由溶解于酵母细胞中的酶引起的。1878 年 Kvhne 赋予了酶一个统一的名词, 称之为“enzyme”。1894 年 Fisher 提出酶与底物作用的“锁与钥匙”学说。1903 年 Henri 提出酶与底物作用的中间复合物学说。1913 年 Michaelis 等导出米氏方程, 1925 年 Briggs 等进一步修改米氏方程并提出稳态学说。1926 年 Summer 提取出脲酶的结晶, 1930~1936 年 Northrop 等得到了胃蛋白酶、胰蛋白酶等的结晶, 并证实酶是蛋白质的化学本质。1963 年 Hirs 等测定了 RNase 的氨基酸顺序。1965 年 Phillips 首次用 X 射线晶体衍射技术阐明鸡蛋溶菌酶的三维结构。1969 年 Merrifield 等人工合成具有酶活性的 RNase。20 世纪 80 年代初 Cech 等发现具有催化功能的 RNA——核酶(ribozyme)。1986 年 Schultz 等人研制成了抗体酶(abzyme)。1997 年 Boyer 等人阐明了 ATP 合酶合成和分解 ATP 的分子机制。

1.3.2.2 酶学理论研究主要进展

(1) 新酶的发现和鉴定 自然界中存在的酶的种类繁多, 其中经过鉴定和分类的有 4000 余种, 并达到不同的纯度, 数百种酶得到了结晶, 并且测出其一级结构。而且每年都有新酶被发现, 都有不少酶的一级结构被测定出来。

(2) 酶一级结构与活力的关系 过去主要用化学修饰的方法研究酶的一级结构与活力的关系, 获得了不少信息。近年来, 除了继续用上述技术以外, 还采用下列新技术对此问题作更深入的研究: ①过渡态类似物技术; ②自杀性底物技术; ③基因定位突变技术; ④计算机模拟技术等。

(3) 酶分子高级结构的测定 一部分酶的高级结构已经被测定出来。但是, 还有大多数酶的高级结构尚待测定。对酶分子高级结构的测定, X 射线晶体结构分析法仍然是十分有效的方法。近年来, 二维核磁共振技术的应用愈来愈广, 其可以测定溶液中的酶分子构象及其变化过程。运用上述两种技术必将测得更多的酶分子构象。

(4) 酶活性部位结构及催化机理的研究 这是酶学研究员关注的核心问题。近年来, 运用下列新技术研究酶活性部位结构及催化机理, 并取得了重大的进展。①应用 X 射线晶体结构分析技术研究酶-底物(或底物类似物)复合物结构, 可以确定酶活性部位结构以及酶分子与底物分子的结合情况。②应用二维核磁共振技术可以确定酶活性部位上解离基团的 pK 值以及催化过程中的质子转移情况。③关于酶促反应动力学研究, 现在已用电子计算机编程, 可对酶与底物的作用方式以及底物反应过程中可能存在的酶分子形式作出判断。④应用隧道显微镜技术可以观察到酶催化过程中的质子转移和电子转移情况。

(5) 核酶的发现 过去认为, 酶是由活细胞产生的只有催化作用的蛋白质, 近年来, 发现生物体中的一些 RNA 和 DNA 亦具有催化作用, 且具有酶类似性质, 被称为核酶(ribozyme)。核酶也是生物催化剂, 可切割特异性 RNA 序列的 RNA 分子。这一重大发现对于生命起源和生物进化的研究以及对于基因、病毒和肿瘤的治疗, 具有重大的意义。