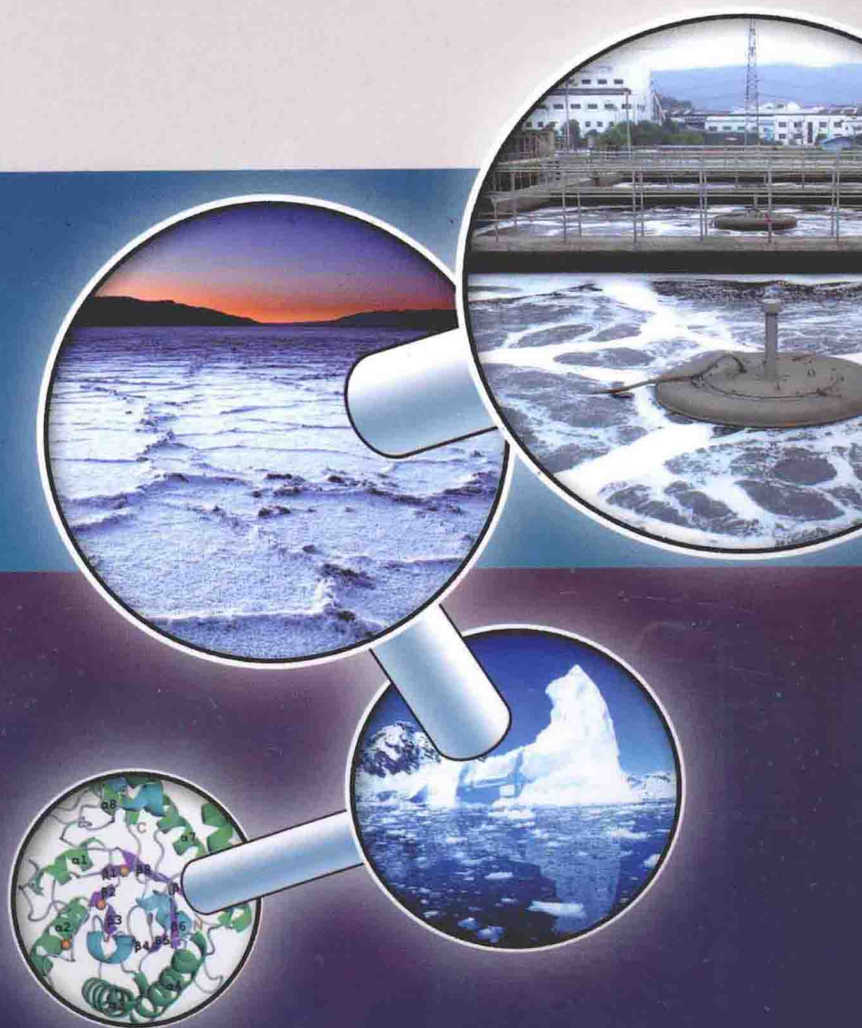


高等院校“十二五”规划教材 / 食品科学与工程系列

极端环境中的酶科学与技术

● 主编 杜 明 苏东海
● 主审 张兰威

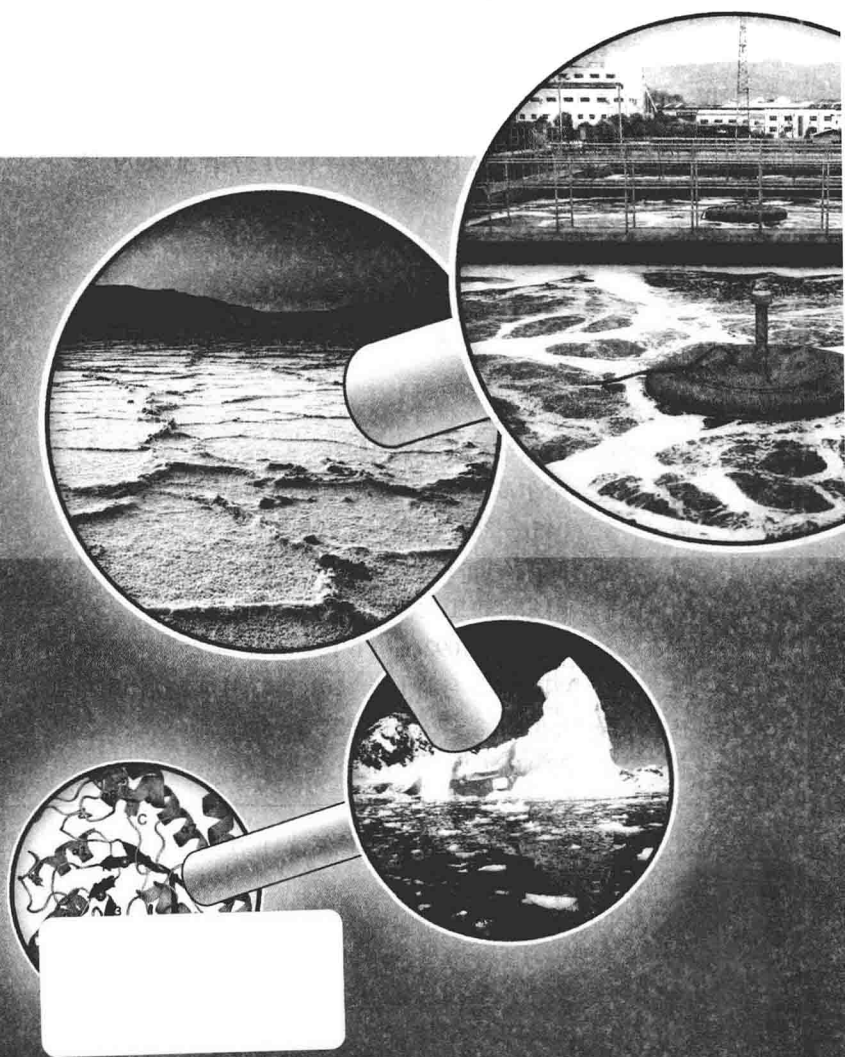


哈尔滨工业大学出版社

高等院校“十二五”规划教材 / 食品科学

极端环境中的酶科学与技术

- 主 编 杜 明 苏东海
- 副主编 廖红梅 张英春
- 参 编 (按照姓氏拼音排序)
曹广丽 郭 丽 宋微
王 聪 余世锋
- 主 审 张兰威



中国轻工业出版社

内 容 简 介

本书以高温环境、低温环境、极端 pH 环境、高盐环境、低水分活度环境以及有机溶剂体系几种主要极端环境为主线,较为系统地阐述了在这些极端环境中的极端酶的来源与分类、理化性质、耐受极端环境的分子机制、制备技术以及在工业中的应用情况等。

本书可作为普通高等院校的食品科学与工程、生物化工、化学工程等专业的研究生教学及实验教材,也可作为其他专业的选修教材,还可作为食品科学、生物科学、医药、农、林、牧业等相关科学技术人员的培训、自修教材。

图书在版编目(CIP)数据

极端环境中的酶科学与技术/杜明,苏东海主编. —哈尔滨:
哈尔滨工业大学出版社,2014.3

ISBN 978-7-5603-3883-5

I. ①极… II. ①杜… ②苏… III. ①酶学-研究
IV. ①Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 300699 号



策划编辑 杜 燕

责任编辑 李长波

出版发行 哈尔滨工业大学出版社

社 址 哈尔滨市南岗区复华四道街 10 号 邮编 150006

传 真 0451-86414749

网 址 <http://hitpress.hit.edu.cn>

印 刷 哈尔滨市工大节能印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 14.25 字数 328 千字

版 次 2014 年 3 月第 1 版 2014 年 3 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5603-3883-5

定 价 29.80 元

(如因印装质量问题影响阅读,我社负责调换)

前 言

极端环境通常是指普通微生物不易生存的环境条件,如高温、低温、低 pH、高 pH、高盐度、高辐射、有机溶剂、低营养等环境条件。酶具有高效的催化能力,反应条件温和,底物专一性高等特点,广泛用于食品、洗涤剂、制药、诊断试剂和精细化学工业中。酶作为大分子的活性物质,在应用过程中常常出现不稳定的现象,尤其在高温、强酸、强碱和高渗等极端环境条件下更容易失活,限制了酶在工业上的应用。近年来,广大研究者在酶工程的研究中逐渐重视了极端酶的研究,希望通过对这些极端酶构效关系等方面的研究,开发新的酶品种,提高酶在极端条件下的活性和稳定性,拓展酶的应用领域。

全书绪论部分主要介绍了极端酶的研究进展和通用技术概况。第 1 章至第 6 章分别叙述了高温环境、低温环境、极端 pH 环境、高盐环境、低水分活度环境、以及有机溶剂体系中的活性酶的来源与分类、理化性质、耐极端环境的分子机制、制备技术进展以及工业中的应用。不同极端环境中的酶均从蛋白酶、酯酶、糖酶、氧化还原酶、溶菌酶这五大类食品工业中常见酶展开,详细介绍了这些酶的分布、性质与结构的特殊性以及在食品与发酵工业、农业、能源工业和化工业中的应用情况。

本书由杜明(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院)和苏东海(北京电子科技职业学院)任主编,廖红梅(江南大学食品学院)、张英春(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院)任副主编,余世锋(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院)、郭丽(绥化学院食品与制药工程学院)、王聪(东北农业大学食品学院)、宋微(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院)、曹广丽(哈尔滨工业大学生命科学与技术学院)参与编写。具体编写分工如下:苏东海负责编写绪论部分;杜明负责编写第 1 章 1.1、1.2 节,第 2 章 2.1、2.2 节;廖红梅负责编写第 1 章 1.3、1.4 节,第 2 章 2.3、2.4 节;余世锋负责编写第 3 章;张英春负责编写第 4 章;郭丽负责编写第 5 章,第 6 章 6.3、6.4 节;宋微负责编写第 6 章 6.1 节(部分)、6.5 节;曹广丽负责编写第 6 章 6.1 节(部分)、6.2 节(部分);王聪负责编写第 6 章 6.2 节(部分);杜明、苏东海、王聪负责全书的统稿工作。

本书出版得到“北京市属高等学校人才强教计划项目 PHR201107151”资助。

本书在编写过程中引用了大量的书籍及研究论文的内容,在此向资助者和相关文献的作者表示感谢和敬意。

由于编写人员知识有限,本书中不妥之处在所难免,敬请广大读者批评指正。

编 者

2013 年 11 月

目 录

第0章 绪 论	1
0.1 极端酶的来源	1
0.2 极端酶的分类	2
0.3 极端酶的制备及鉴定技术	5
0.4 极端酶活性改造技术	11
0.5 极端酶的工业应用前景	11
第1章 高温环境中的活性酶	13
1.1 耐热蛋白酶	13
1.2 高温环境中的活性酯酶	22
1.3 高温环境中的活性糖酶	26
1.4 高温环境中的活性氧化还原酶	49
第2章 低温环境中的活性酶	56
2.1 低温蛋白酶	56
2.2 低温脂肪酶	63
2.3 低温环境中的活性糖酶	72
2.4 低温环境中的活性氧化还原酶	93
第3章 极端 pH 环境中的活性酶	102
3.1 极端 pH 环境中的活性蛋白酶	102
3.2 极端 pH 环境中的活性酯酶	117
3.3 极端 pH 环境中的活性糖酶	121
3.4 极端 pH 环境中的活性氧化还原酶	142
3.5 极端 pH 环境中的活性溶菌酶	150
第4章 高盐环境中的活性酶	156
4.1 高盐环境中的活性蛋白酶	156
4.2 高盐环境中的活性酯酶	160
4.3 高盐环境中的活性糖酶	163
4.4 高盐环境中的活性氧化还原酶	166

第 5 章 低水分活度环境中的活性酶	172
5.1 低水分活度环境中的活性蛋白酶	172
5.2 低水分活度环境中的活性酯酶	180
第 6 章 有机溶剂体系中的活性酶	189
6.1 有机溶剂体系中的活性蛋白酶	190
6.2 有机溶剂体系中的活性酯酶	194
6.3 有机溶剂体系中的氧化还原酶	199
6.4 有机溶剂体系中的溶菌酶	211
6.5 其他耐有机溶剂酶类	216
参考文献	219

第0章 绪 论

酶具有高效的催化能力,反应条件温和,底物专一性和立体选择性高等特点,因此广泛用于食品、洗涤剂、制药、诊断试剂和精细化学工业中。世界酶制剂市场有约 25 亿美元的消耗量,其中食品工业占 50%,洗涤剂工业占 30%,化学工业仅占 5%。目前,自然界中发现的酶超过 3 000 种,在工业中应用较多且常见的酶有蛋白酶、酯酶(脂肪酶)、糖酶、氧化还原酶及溶菌酶等,这些酶大多数来源于动物、植物和微生物。微生物酶因为具有种类多、产量大、易于工业化制备等优势而备受关注。

极端环境是指普通微生物不能生存的环境条件,如高温、低温、低 pH、高 pH、高盐度、高辐射、含抗代谢物、有机溶剂、低营养、重金属及有毒有害物等环境条件。能在这种极端环境中生长的微生物称为极端微生物或嗜极菌。极端微生物由于长期生活在极端的环境条件下,为适应环境,在其细胞内形成了多种具有特殊功能的酶,即极端酶。

酶作为大分子的活性物质,在应用过程中常常出现不稳定的现象,尤其在高温、强酸、强碱和高渗等极端条件下更容易失活。因此,限制了酶在工业上的应用。近年来,生物科学家在酶工程的研究中开拓了一个崭新的领域——极端酶的研究,希望开发新的酶种,使其在极端条件下仍保持高的活性和稳定性,拓展酶的应用前景。

0.1 极端酶的来源

来自极端环境中的极端微生物,性能独特,生命力极强,可以分泌具有特殊功效的生物酶。而利用这种特殊生物酶,可生产出许多新型高效产品,为人类造福。

极端微生物是天然极端酶的主要来源,生活在生命边缘(高温温泉、海底、火山口、南北极、碱湖和盐湖等)的嗜极菌,包括嗜热菌、嗜酸菌、嗜碱菌、嗜盐菌、嗜冷菌、嗜压菌和耐有机溶媒的菌类,体内需要有适应于生存环境的基因、蛋白质和酶类。

海底火山口的温度极高,压力极大,所以,生活在海底火山口附近的极端微生物,既耐高温,又耐高压和高酸。欧洲一些国家的科学家从这种极端微生物中提取出特殊生物酶,添加到食品中,可以帮助食物在胃内的高酸环境中进行消化。这种特殊的生物酶,还能使面粉中的纤维缩短长度,延长面制品的保鲜期。此外,由于这种特殊生物酶耐高温,故在经过热处理的食品中也能生存。从南极冰川中发现的极端微生物,科学家已从其中提取出特殊生物酶,并制成了一种制剂。利用这种制剂,可融化排水管道里淤积的冰冻,以保证排水管道的四季畅通。欧洲科学家还从死海海水中发现一种耐盐力极强的极端微生物。从这种极端微生物中提取的特殊生物酶,可以在盐度较高的条件下,创造出一个非常清洁的环境,因而有助于生产无菌药物。

总之,从极端环境中的极端微生物提取出的特殊生物酶,具有巨大的使用价值。

1994 年美国 RBI 公司直接从极端环境中收集 DNA 样品,随机切割成限制性片段,再插入寄主细胞(*E. coli* 或 *Bacterium* 等)进行表达,并筛选极端酶,目前已经获得 175 种新的极端酶。

0.2 极端酶的分类

极端酶能在各种极端环境中起生物催化作用,它是极端微生物在极其恶劣环境中生存和繁衍的基础,根据极端酶所耐受的环境条件不同,可分为嗜热酶、嗜冷酶、嗜盐酶、嗜碱酶、嗜酸酶、嗜压酶、耐有机溶剂酶、抗代谢物酶及耐重金属酶等。依据其来源,极端酶大致分为 3 种:从生活在非常规条件下的微生物,如某些古细菌中分离得到的酶;某些来源于常规微生物中但也能在极端条件下起催化作用的酶,如目前备受有机化学家青睐,在有机溶剂中产生催化反应的酶;通过人工改良方法或借助人工全合成技术制造出的具有新型催化活力的酶以及由新型材料构成的酶。

1. 高温条件下的活性酶

人们从嗜热菌中已分离得到多种嗜热酶(55 ~ 80 °C)及超嗜热酶(80 ~ 113 °C),包括淀粉酶、蛋白酶、葡萄糖苷酶、木聚糖酶及 DNA 聚合酶等,在 75 ~ 100 °C 之间具有良好的热稳定性。同种嗜热酶与嗜中温酶主要性质基本相同,热稳定性不同主要是由分子内部结构决定的,维持其内部立体结构的化学键和物理键,特别是氢键、二硫键的存在及数量与酶的热稳定性有关。一般认为,当这些键存在及数量增加时,酶的热稳定性增强;这些键断开,则酶的热稳定性降低或丧失。相对分子质量较小的蛋白质一般比相对分子质量较大的蛋白质有更大的热稳定性。例如嗜热栖热菌的 3-磷酸甘油脱氢酶分子量就较小,利于热稳定。在芽孢形成过程中,由于芽孢杆菌的醛缩酶分子中有一部分与酶活性无多大关系的肽链被水解掉,从而使该酶的热稳定性提高。

嗜热酶分子的许多微妙结构很可能与热稳定性有关,例如稍长的螺旋结构、三股链组成的 β -折叠结构、C-端和 N-端氨基酸残基间的离子作用以及较小的表面环等形成了嗜热酶紧密而有韧性的空间结构,提高了热稳定性。高温谷氨酸脱氢酶和柠檬酸合成酶的结构研究表明了离子作用在嗜热酶中的重要性,嗜热酶在离子偶联的数量和程度上胜过嗜温酶,而且柠檬酸合成酶嗜热酶还包括亚单位的相互作用和羧基端氨基酸残基的作用。但是,高温稳定性和离子相互作用的正比关系并不是普遍存在的。

Ca^{2+} 能提高许多热稳定性酶的耐热性,起到类似二硫键样的桥连接作用,对稳定酶分子的三维结构有重要作用;锌离子对某些耐热酶也有热稳定作用,把嗜热脂肪芽孢杆菌编码腺苷酸激酶的基因转染给大肠杆菌,分析所表达的蛋白质,可发现该腺苷酸激酶含有 1 个与 4 个半胱氨酸(Cys)紧密结合的锌离子,形成 1 个锌指结构。如果用 PMPS 或者 EDTA 去除结合状态的锌离子,那么该酶的变性温度从 74.5 °C 降至约 67 °C。至于后者温度仍然比较高,是由于酶中存在大量的 Arg 和 Lys 残基。

嗜热和超嗜热的产甲烷菌体内的钾离子和三阴离子环状二磷酸甘油酯的浓度分别达到 1.0 ~ 2.3 mol/L 和 1.2 mol/L,这些含碳化合物对相应的离体酶具有稳定作用。从嗜热菌中分离出来的酶显示了独特性:具有极高的热稳定性,能抵抗化学变性剂,如表面

活性剂、有机溶剂和高酸高碱环境,其催化功能优于目前在各种工业生产中应用的酶。来自水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)的第一个极端嗜热 DNA 聚合酶(Taq PolII)成功地应用于基因工程、PCR 技术后,促进了分子生物学的发展。超嗜热菌中存在一种逆促旋酶,它能够诱导 DNA 形成正性超螺旋的 typeI - 5' 拓扑异构酶。高热稳定的淀粉酶用于生产葡萄糖和果糖,对改进工业淀粉转化工艺非常有意义。

目前已从嗜热的栖热菌(*Thermotoga*)中分离出一种超级嗜热的木糖异构酶,这种酶能把葡萄糖转化为果糖,这样就能在高温条件下提高果糖的产量。一种高热稳定普鲁兰酶能专一水解支链淀粉形成长链线性多糖;木糖酶用于纸张漂白;蛋白酶用于氨基酸生产、食品加工、洗涤剂、固定化制造天冬甜精;纤维素酶用于钻探操作,促进石油或天然气流入油井孔。嗜热菌有相对高的生长率,代谢快,世代时间短,酶的热稳定性高,用于微生物发酵工程可减少污染、节约能量、降低成本、提高处理效果 and 产品质量。

2. 低温条件下的活性酶

从嗜冷微生物中分离的嗜冷酶具有低温活性并且在常温下失活。例如,来自南极细菌的 α -淀粉酶,枯草杆菌蛋白酶和磷酸丙糖异构酶等。通过对嗜冷酶的蛋白质模型和 X-射线衍射分析的结果表明,酶分子间的作用力减弱,与溶剂的作用加强,具有比常温同功酶更柔软的结构,使酶在低温下容易被底物诱导产生催化作用,温度提高,嗜冷酶的弱键容易被破坏,变性失活。对具有低温活性的柠檬酸合成酶结构分析表明,其活性部位的柔软性来自于酶扩展的表面电荷环和酶表面上脯氨酸残基的减少。

嗜冷菌分泌的低温葡聚糖酶催化亚基上较小的氨基酸可以增加酶的柔韧性,活性与溶液的离子强度有关。较柔软的活性中心可以更容易地进入底物,进行酶反应。另外,嗜冷酶也必须进行结构调整以避免蛋白质的低温变性,通常是通过减少低温下的疏水相互作用。嗜冷菌编码具有低温活性酶的基因也已经成功地表达,在 0~2℃ 范围内产 α -淀粉酶的嗜冷菌(*Alteromonas haloplanktis*)的酶基因已经在大肠杆菌中表达,发现大肠杆菌必须在低于室温(最适温度为 18℃)的条件下培养,才可使酶正确折叠,避免酶的不可逆变性。

嗜冷菌在低温下即可对污染物质进行降解和转化,分离自嗜冷菌的酯酶、蛋白酶及 β -半乳糖苷酶在食品工业和洗涤剂中具有很大潜力。嗜冷碱性蛋白酶应用于洗涤剂工业,可能改变传统的热水洗涤方式,节约能源。嗜冷乳糖酶和淀粉酶为乳品和淀粉加工提供了新的工艺,对保持食品营养和风味起着重要作用,低温发酵也可生产许多风味食品及减少中温菌的污染。从海洋冷适应的微生物中分离的生物活性物质可用于医药、食品等。生命起源于温度很低的海洋,有人提出冷适应的微生物与生命起源相联系。

3. 极端碱性条件下的活性酶

极端嗜碱微生物菌体内部的 pH 接近中性,但是其胞外酶必须在极高的 pH 环境中保持稳定和活力。嗜碱酶中碱性氨基酸的比率较高,尤其在分子表面,利于酶的稳定。日本报道了一种丝氨酸蛋白酶,在最适 pH = 13 的情况下,可能是含酸性氨基酸少,而精氨酸与赖氨酸的比率高,在较高 pH 条件下酶本身仍带静电荷,从而具有稳定性。嗜碱菌纤维素酶 103 的基因克隆到芽孢杆菌中获得成功表达,产物能很好地保持原有的稳定性。其他木聚糖酶、淀粉酶、环状糊精葡萄糖基转移酶、 β -甘露聚糖酶等也能在中性细菌中

加以克隆和表达。嗜碱菌的胞外酶具耐高碱特性,可用于工业酶制剂生产,有降解天然多聚物的能力,用于处理碱性工业污水,将碱性纸浆废液转化为单细胞蛋白。其淀粉酶可用于纺织品退浆及淀粉作为黏结剂时的黏度调节剂。

4. 极端酸性条件下的活性酶

嗜酸菌分泌的胞外酶一般是相应的嗜酸酶。嗜酸菌不能在中性环境生长,可能是由于嗜酸菌细胞含较多酸性氨基酸,有大量 H^+ 环境,在中性 pH 时 H^+ 大量减少,以致造成细胞溶解。与中性酶相比,嗜酸酶在酸性环境下的稳定性是由于酶分子所含的酸性氨基酸的比率高,尤其在酶分子表面。嗜酸菌已广泛用于低品位矿生物沥滤回收贵金属、硫化氢酶系参与原煤脱硫及环境保护等方面。

5. 高盐条件下的活性酶

嗜盐酶多存在于中度嗜盐的古细菌和极度嗜盐的真菌中,从嗜盐微生物中分离的极端酶可以在很高的离子强度下保持稳定性和活性,这对菌体的生长是极为重要的。*Nesterenkonia halo-bia* 是一类中度 G^+ 非运动球菌,这类菌产生一种胞外淀粉酶,依靠二价离子和高浓度 NaCl 和 KCl 保持活性和稳定。1980 年,Onishi 等报道从太平洋腐烂木材上分离的 1 株 G^+ 中度嗜盐菌,该菌产胞外核酸酶,在盐培养基中,形成芽孢,严格好氧。氨基酸序列的分析比较表明,嗜盐酶蛋白质比普通的同功酶含酸性氨基酸更多,过量的酸性氨基酸残基在蛋白表面与溶液中的阳离子形成离子对,对整个蛋白形成负电屏蔽,促进蛋白在高盐环境中的稳定。

X 射线晶体和同源性模拟分析揭示的三维结构表明,这些酶的表面带负电荷的氨基酸,可以结合大量水合离子,形成一个水合层,减少它们表面的疏水性,减少在高盐浓度下的聚合趋势。蛋白表面具有超额的负电荷是嗜盐蛋白的一个显著特性。嗜盐菌利用的碳源十分广泛,其中包括难降解的有机物,加之其对渗透压的调节能力较强,体内嗜盐酶的适应能力较强,故将其应用于海产品、酱制品及化工、制药、石油发酵等工业部门排放的含高浓度无机盐废水以及海水淡化等。海藻嗜盐氧化酶在催化结合卤素进入海藻体内代谢中起重要作用,对化学工业的卤化过程有潜在的价值。同时还具有可利用的胞外核酸酶、淀粉酶、木聚糖酶等。有的菌体内类胡萝卜素、 γ -亚油酸等成分含量较高,可用于食品工业;有的菌体能大量积累聚 β -羟基丁酸酯(PHB),用于可降解生物材料的开发。

6. 含有机溶剂体系中的活性酶

日本 Chiakikato 等从深海分离的耐有机溶剂菌(*Pseudomonas putida*)变种,能耐甲苯体积分数超过 50% 的有机溶剂。迄今发现在有机溶剂中起催化作用的酶有 10 多种,这些酶起催化硝基转移、硝化、硫代硝基转移、酚类的选择性氧化、醇类的氧化作用。酶在有机溶剂中的作用受到载体性质、底物及生成物极性的影响。若将酶从水溶液中沉积到惰性载体上,再在有机溶剂中使用,通常会获得最佳活力。耐有机溶剂菌及其酶不仅能将石化厂废水中的油降解,去除几种有毒化合物,而且还能将胆固醇转化为类固醇激素。

7. 其他极端环境条件下的活性酶

(1) 耐高压酶

极端嗜压菌能耐 70.9 ~ 81.1 MPa 的压力,最高压力达 104.8 MPa。极端嗜压菌的酶

必须将其蛋白质分子进行折叠,使受压力的影响减至最少。研究表明,静压力可以增加酶的活性和稳定性,尤其对酶的热稳定性有明显的促进作用。此外,在高温高压下,底物溶解度增加,溶剂黏度减少,从而提高物质的传输速率和反应速度。高压作用下酶往往有良好的立体专一性,在化学工业上有潜在的应用前景。但是当压力超过一定的范围时,酶的弱键产生破坏,酶的构象解体而失活。

(2) 耐重金属酶

耐重金属的微生物在自然条件下或人工诱导下产生的重金属抗性基因可激活和编码金属硫蛋白、操纵子、金属运输酶和透性酶等。菌体 *Rhizopus orrhizus* 每克干重去除铜达 180 mg 以上,溶于水中的重金属吸附在微生物表面,带入细胞内,耐重金属酶将其进行生物合成。*A. halo-phytica* 能吸附 133 mg/g 的锌到菌体表面。利用微生物对重金属的抗性开发生物吸附剂,处理废水。

(3) 耐辐射酶

耐辐射菌对电离辐射和许多化学诱变剂都具有极强的抗性,认为该菌的辐射抗性源自于其有超常的 DNA 修复系统和特殊酶。

0.3 极端酶的制备及鉴定技术

在筛选得到极端酶的生产菌株之后,要想使极端酶投入工业化应用,还需要进行大规模的细胞培养和酶的大量合成及分泌条件的优化,生化反应设备的设计等工作。因此,各种超高温生化反应器,高静压生化反应器应运而生。尽管如此,要满足嗜极菌的生长及发酵条件,将会对设备和环境提出苛刻的要求,设备腐蚀和破坏率大大提高。为了解决这一难题,科学家把极端酶的基因克隆到嗜温菌中表达。嗜碱纤维素酶 103 的基因被克隆到芽孢杆菌中获得成功表达,产物能很好地保持原有的稳定性,成果被应用于工业化生产,并在洗涤剂工业中使用。

1. 极端酶的制备技术

近几十年来,生物技术的发展非常迅速。运用基因工程、蛋白质工程、发酵工程等生物技术,已能设计和生产人们急需的多种蛋白质。和其他生物产品的生产过程一样,蛋白质的生产过程一般也分为上、中、下游过程。上、中游过程是运用生物技术生产目标产物,下游过程是指对含有目标产物的物料进行处理、分离、纯化和加工(鲍时翔等,1996)。目前,生产蛋白质的上、中游技术如基因突变、基因重组与表达、基因工程菌的大规模培养等技术发展很快,甚至研制成套试剂盒,使基因克隆表达变得越来越容易,而下游蛋白质分离纯化技术却没有得到相应发展。而且,分子生物学的上游工作往往并非的最终目的,分子克隆与表达的关键是要拿到纯的表达产物,以研究其生物学作用,或者大量生产出可用于疾病治疗的生物制品。

相对于上游工作来说,分子克隆的下游工作显得更难,蛋白质纯化工作非常复杂,除了要保证纯度外,蛋白产品还必须保持其生物学活性。纯化工艺必须能够每次都能产生相同数量和质量的蛋白,重复性良好。这就要求应用适应性非常强的方法而不是用能得到纯蛋白的最好方法去纯化蛋白(杨道理等,2004)。

(1) 蛋白质分离纯化的策略

能从成千上万种蛋白质混合物中纯化出一种蛋白质的原因是不同蛋白在它们的许多物理和化学性质上有着极大的不同(朱厚础等,1999)。这些性质是由于蛋白质的氨基酸数目和序列不同造成的。连接在多肽主链上的氨基酸残基可以是荷正电的或荷负电的、极性的或非极性的、亲水性的或疏水性的。此外,多肽可折叠成非常确定的二级结构(α 螺旋、 β 折叠和各种转角)和三级结构,形成独特的大小、形状和残基在蛋白质表面的分布状况。

可以作为纯化依据的蛋白质性质包括大小、形状、电荷、等电点、电荷分布、疏水性、溶解度、密度、配体结合能力、金属结合能力、可逆性缔合、特异性序列或结构、基因工程构建的纯化标记等。

蛋白质纯化要利用不同蛋白质间内在的相似性与差异,利用各种蛋白间的相似性来除去非蛋白物质的污染,而利用各蛋白质的差异将目的蛋白从其他蛋白中纯化出来。

(2) 蛋白质分离纯化常用方法比较

蛋白质分离纯化的方法很多,一般常用的蛋白质分离纯化方法见表0.1,通常需要经过多种技术方法的联合使用,才能得到目标产品。

表0.1 常用的蛋白质分离纯化方法

名称	分离方法	分离机制	应用	优点	缺点
色谱	离子交换	电荷、电荷分布	蛋白质分离	特异性好,有更多的参数可以优化,树脂较便宜	极端 pH 下蛋白会变性失活
	凝胶过滤	分子大小	蛋白质脱盐、纯化	普遍采用,洗脱简单,回收率较高	树脂昂贵,对柱子要求高,有些蛋白可能与树脂有吸附作用,不适于工业化
	亲和 DNA 亲和 外源凝集素亲和 固定化金属亲和 免疫亲和	配体结合位点 DNA 结合位点 糖基类型 金属结合能力 特异抗原位点	抗体、受体分离 蛋白质纯化 蛋白质纯化 金属蛋白纯化 抗原纯化	效果好,特异性好,纯化倍数高	单抗体较昂贵,洗脱条件苛刻,蛋白易失活,蛋白结构可能被破坏,单抗可能混入蛋白
	反相 HPLC	疏水性、大小	肽或蛋白质分离	效果很好,纯化率高	产量比较小
	疏水	疏水力	蛋白质分离	选择性好,纯化率高	洗脱条件较苛刻
	色谱聚焦	等电点	蛋白质分离	选择性好,纯化率高	产量比较小,设备和样品要求高
	正相	表面非特异作用力	蛋白质分离	选择性好,纯化率高	产量小,适用范围窄

续表 0.1

名称	分离方法	分离机制	应用	优点	缺点
电泳	分子筛电泳	分子大小	蛋白质分离	纯化效果极好,可以查看样品蛋白的复杂程度和纯度,样品需要量少	产量相当少,蛋白质失活情况居多,很难工业化
	等电聚焦	等电点差异	蛋白质分离		
	移动界面电泳	电运动性	蛋白质分离		
	连续电泳	电运动性	蛋白质分离		
膜	微过滤	粒度大小	液固分离	基本分离手段	纯化倍数低
	超滤	分子大小、形状	浓缩蛋白质	可以分级,方便快捷	损失率高
	透析	分子大小	缓冲液更换、脱盐	设备简单	损失率高,耗时,蛋白失活可能性大
	电透析	电荷	脱盐	效果好	设备要求高,成本高
离心	离心	密度、大小、沉降速率	液固分离	操作简单易行,常规的粗分离手段	可能需要低温环境,蛋白易变性失活
萃取	双液相萃取	溶解性	蛋白质分离	操作简单,适用性强	纯化倍数低,不适于精分离
	超临界萃取	溶解性	小分子蛋白质分离	分离效果好,产量大,适于工业化	对设备和操作条件要求高
沉淀	硫酸铵	溶解度	蛋白质分离	冷溶液中溶解度大,蛋白质稳定	对钢容器有腐蚀性,纯化倍数低,要脱盐
	丙酮	溶解度	蛋白质分离	保持蛋白活性	纯化倍数低
	聚乙烯亚胺	电荷,大小	蛋白质分离	一定的选择性	纯化倍数低
	等电点	溶解度, pI	蛋白质分离	纯化倍数高	对未知蛋白不太适用

2. 极端酶的鉴定技术

分离纯化蛋白质的目的是多种多样的。研究蛋白质的分子结构、组成和某些物理化学性质,需要纯的、均一的甚至是结晶的蛋白质样品。研究活性蛋白质的生物学功能,需要样品保持它的天然构象,要尽量避免因变性而丢失活性。

蛋白质组研究的两大核心技术就是蛋白质组中蛋白质成分的分离和鉴定。蛋白质组成分通过各种分离技术分离后,必须通过适当技术鉴定,才能知道蛋白质组成分的性质、结构、功能及其各蛋白质间的相互作用关系,从而最终实现蛋白质组的研究。

蛋白质的基本性质的鉴定包括蛋白质的相对分子质量、等电点、氨基酸组成、氨基酸残基序列、低级结构及高级结构等。鉴定技术主要有以质谱为核心的技术、蛋白质微测序、氨基酸组成分析、各种电泳和高效液相色谱等。

1) 质谱及相关技术

随着大规模的基因组测序、生物质谱技术和生物信息学的快速发展,蛋白质鉴定方法已发生了巨大的变化,使大规模蛋白质组研究成为现实。质谱对蛋白质鉴定的贡献主

要是基于质谱软电离技术——基质辅助激光解析电离(MALDI)和电喷雾电离(ESI)的发展和成熟。基于MALDI的肽质量指纹图谱、源后衰变片段离子分析和基于ESI的串联质谱的部分测序技术是质谱鉴定蛋白质的主要方法,它们在鉴定双向电泳分离的蛋白质组成分时已显示出惊人的潜力,可实现蛋白质组研究的高通量、超微量等需求。但质谱不易进行N-端或C-端序列鉴定,要完全鉴定某蛋白质尚需结合传统的鉴定技术以了解N-端和C-端序列信息(郑永红等,2003)。

(1) 基于MALDI的技术

①肽质量指纹技术。肽质量指纹(Peptide Mass Fingerprint, PMF)分析是基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定蛋白质的一个可行而有效的方法。该法特别适宜鉴定2-D电泳分离的蛋白质斑点(Katayama等,2001),或者一维的PAGE的蛋白条带,通常是对蛋白质斑点或者蛋白条带进行胰酶裂解或化学裂解,然后用质谱测定肽片段的精确质量,将实验获得的PMF数据和数据库中对蛋白质进行理论裂解获得的“真实”指纹进行比对,所检索的蛋白质按其匹配的优劣进行排序,其中以检索分数较高者作为候选蛋白。

PMF法具有很多优点,如灵敏度和准确度高、自动化程度高、可耐受测试样品中的微量盐离子和电荷离子、具有许多基于PMF的数据库分析软件作为分析支持。但是PMF分析是将实验获得的肽段质量与库中理论肽质量相比较,其成败强烈依赖于数据库中理论肽质量的获得;当被分析蛋白所属物种的基因组序列数据有限时,则用PMF进行蛋白鉴定的成功率将非常低;PMF分析不能100%地鉴定被测蛋白,还需结合其他序列信息或氨基酸组成分析等技术。

②PSD肽片段的部分测序技术和源内衰变分析。虽然MALDI是一种“软电离”技术,不会破坏被检测的肽或肽段,但在离子化过程之中会形成许多亚稳离子,对于肽(或蛋白)亚稳离子常会发生中性小分子如水和氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)的丢失,甚至不同程度的肽键断裂,于是产生了如下两种鉴定蛋白的方法。

a. 源内衰变(In-Source Decay, ISD)。源内衰变发生在离子源区域内,时间为激光撞击之后几百个纳秒之内,是离子的“即刻片段化”,这些片段离子通过衰减离子取出,能在线性飞行时间质谱中被发现,许多的蛋白和大的肽常在MALDI质谱仪的离子源区域内变成肽离子片段,主要产生含N-端的c-型片断离子和含C-端的y-型片段离子,通过分析这些片段离子谱可鉴定蛋白质。

b. 源后衰变(Post-Source Decay, PSD)。源后衰变较前者需要一个更长的时间跨度,常为微秒,发生在MALDI-反射飞行时间质谱的离子源区域后的第一个无场区域,因不同片段离子和“母离子”保持同样的速度而不能用线性MALDI-MS谱观察到,必须用反射离子镜使离子的飞行路径反向,由于片段离子的动能低于“母离子”而从“母离子”中分离出来,且按表观质量的大小由小到大排列出来,形成片段离子谱,通过设置不同的反射场电压可分离获得足够数量的片段(常需10~15个片段来鉴定蛋白质),一旦用已知质量的肽片段标化,这些分割谱能粘在一起形成PSD谱,得到片段离子的质量,将仅有一个氨基酸质量差异的一系列片段离子排列,可推测出肽片段序列或序列标签,最后用数据库查询工具查询蛋白质或DNA数据库,鉴定被测蛋白质,即称为PSD肽片段部分测序

技术(詹显全,2002)。这是 MALDI - MS 鉴定蛋白的又一重要方法。

PSD 谱主要是酰胺键断裂的结果,以 N - 端 b - 型片段离子和 C - 端 y - 型片段离子为主,但还常含有 N - 端 a₂、c₂、d₂ 型片段和 C - 端 x₂、z₂ 型片段,使 PSD 谱具有高度复杂性,给分析带来一定的困难。

③序列梯子。MALDI - MS 结合特定肽裂解技术形成“序列梯子”(Sequence Ladder),可用于蛋白质的鉴定。常见方法有:

a. 化学法序列梯子。化学法序列梯子主要是基于 Edman 降解,它是在 Edman 序列测定进程中按设计好的耦合和裂解步骤用一定量的序列终止剂,获得一系列 N - 端截断的肽混合物,该混合物再用 MALDI - MS 分析,在获得的谱中连续离子间的质量差异与氨基酸的质量相对应就产生了肽序列。

b. 酶法序列梯子。酶法序列梯子用外肽酶对肽的任一端进行逐渐缩短,产生 C - 端或 N - 端序列梯子,再用 MALDI - MS 进行分析;在外肽酶消化单一肽的过程中,于不同时间点取出少量反应混合物进行 MALDI - MS 分析。

④其他。在特殊情况下,用 MALDI - MS 测定一个蛋白质的总质量也能够鉴定蛋白质,目前有两个主要的方法来测量完整蛋白的质量:一是蛋白被点样或被印迹到一个合成支持膜上来进行 MALDI - MS 分析;二是超薄聚丙烯酰胺凝胶被直接用激光扫描入 MALDI 质谱仪,但该法的分辨率和质量测定的准确性较差,特别对高相对分子质量的蛋白,因此该法用于蛋白鉴定受到限制。

(2) 基于 ESI 的技术

电喷雾质谱(ESI - MS)是鉴定蛋白质的又一重要平台,在蛋白质鉴定中取得了长足进展,特别是 ESI 联合 nano 探针注射和/或高效毛细管液相色谱分离技术(cLC - ESI - MS)可获得极低微量的肽的序列信息,可实现蛋白质组中蛋白质成分的超微量分析,获得的序列信息可用 SEQ uest 软件进行数据库查询,鉴定被测定的蛋白质;同时基于 ESI 的串联质谱可分析蛋白质翻译后的修饰情况。但与 MALDI - MS 相比,ESI - MS 技术的样品制备复杂,在蛋白质组高通量分析上受到一定限制,而 MALDI - MS 可实现从蛋白质组成分分离到鉴定过程的全自动化,达到蛋白质组高通量分析的要求(郑永红等,2003;郑永红等,2004)。然而,目前四极杆飞行时间质谱(Q - TOF - MS)技术的产生和应用(Chalkley 等,2001),对蛋白质微测序和氨基酸残基的修饰分析有着重要的价值。

2) 蛋白质微测序

蛋白质微测序是蛋白质分析鉴定中的一种经典而普通的技术,可提供足够的信息,目前在蛋白质组中蛋白质鉴定上仍有其广泛的用途。特别是双向凝胶电泳与 PVDF 膜电印迹相结合,经过染色、切割,可进行 Edman 微量测序,当然在一维凝胶电泳与转膜电印迹相结合方面也有着广泛而稳定的应用,常用方法有两种:

①放入序列仪中直接进行 N - 端氨基酸测序,可用于亚皮摩尔的鉴定。但测序具有方向性,经常出现 N - 端封闭,阻止进程;当被测序蛋白质的数量很少时,常在低含量的 Ser、Thr、Arg、His 或被修饰的残基处出现间断;速度缓慢,消耗大;被测样品是一次性消耗,不能用相同印迹蛋白重复实验;通常要进行 30 个循环以上才有意义。

②膜上原位裂解策略,即膜上蛋白用特异蛋白酶(如 Trypsin 和 Lys - C 等)消化,大

多数亲水性肽从膜上溶解入消化液中,进行反向高效液相色谱分离,被纯化的肽再行单独测序。该法步骤繁多,不如直接 N-端测序敏感,当膜上蛋白低于 $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时常会失败;但避免了蛋白封闭,对确定蛋白可产生多个内部序列肽段,可选择不同序列片段进行鉴定,从而改善蛋白鉴定分数。另外也可进行胶内原位蛋白质裂解,但常有胶源性或染色剂源性污染物的污染,影响测序。Edman 方法一次只能测定一个蛋白点或肽峰,速度慢,不宜进行复杂蛋白质组的高通量分析,但在简单蛋白质组和特定蛋白的鉴定上仍有其独到用处,根据 Edman 测序结果而开发的数据库查询软件仍是蛋白质组中蛋白鉴定的有力工具。

3) 氨基酸组成分析

氨基酸组成分析有别于肽质量或序列标签,是利用不同蛋白质具有特定的氨基酸组成的特征来鉴定蛋白质。该法可用于鉴定 2-D 电泳分离的蛋白质,应用放射标记的氨基酸来测定蛋白质的氨基酸组成,或将蛋白质转 PVDF 膜,在 155°C 酸性水解,让氨基酸自动衍生后,经色谱分离,获得的数据用 AACompident、ASA、AAC-PI、PROP-SEARCH 等软件进行数据库查询,依据代表两组分间数目差异的分数对数据库中的蛋白质进行排榜,“冠军”蛋白质的可信度较大。但该法的速度较慢,所需蛋白质或肽的量较大,在超微量分析中受到限制;且存在酸性条件下水解不彻底或部分降解而产生氨基酸变异的缺点,故应联合其他的蛋白质属性进行鉴定。

氨基酸组成分析也可以应用高效液相色谱法对酸彻底水解后的蛋白质进行氨基酸组成的测定,获得纯化后蛋白质的基本氨基酸组成信息。当然,每种方法都存在一定的局限性,不可能在同一个条件下,同一次操作中完全测定出所有氨基酸的浓度或质量分数,在水解的过程中,不同的水解方法和时间对个别氨基酸的破坏程度也不一样,这些原因都可能造成测定结果的误差。

4) 图像分析技术

应用蛋白质组阵列技术分离蛋白质组成分,通过染色、荧光显影等方法使之形成“满天星”样的 2-D 电泳图谱,经扫描或摄影等转换为以像素为基础、具有不同灰度强弱和一定边界方向的斑点的图像信号,可用专门的 2-D 电泳图像分析软件包对一系列具有低背景染色和高度重复性的 2-D 电泳凝胶进行图像分析(张晓勤等,2004),其一般过程是图像采集、斑点检测、背景消减、图像内及图像间的比较,另外还可进行相似性、聚类 and 等级分类等统计分析,以检测生理或病理状态下其蛋白质斑点的上调、下调或出现、消失。

由于 2-D 电泳难于实现 100% 的重复,这就必须进行不同凝胶间斑点的配比分析,但该过程还不能实行全自动化,必须借助于肉眼观测,受到人为因素的影响;同时因蛋白质的修饰对匹配造成的影响尚需借助微量测序、质谱、氨基酸组成分析等技术才能鉴定。

目前尚无一个真正完美、脱离肉眼、智能化的 2-D 电泳分析软件,这有待于技术改进以增加图像灵敏度和自动化(詹显全等,2002)。

0.4 极端酶活性改造技术

1. 蛋白质工程

极端酶的构效关系研究表明:分别来源于嗜温和嗜极菌的两个催化功能相似的酶的氨基酸组成是有差异的。比较嗜温和嗜盐菌(*Halobacterium vol - canii*)的二氢叶酸还原酶发现,嗜盐菌的二氢叶酸还原酶中酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)的数量增加,带负电性增大。同样的比较在嗜温酶和嗜热酶间进行,比较的结果得出它们亦有各自的结构特性和同源性,以此作为蛋白质工程中酶蛋白质设计的依据,David 和 Michael 已经成功地利用蛋白质工程提高枯草杆菌蛋白酶在氧化作用、碱性和高温条件下的稳定性。

近 10 年来,人们发现酶在有机相中与水相中方向相反,具有相当高的作用效率,而且可以通过有机溶剂的性质控制酶的对映体和区域的选择性,使非极性底物的溶解度增大。但是,与水溶液相比,酶在有机相中的活性往往有所下降,在极性的有机溶剂中尤为突出。为了改善酶的作用,可以使干酶粉与碳水化合物、聚合物和有机缓冲液混合,或者在非缓冲液盐的存在下加入冻干的酶催化剂。Frances 等人采用蛋白质工程的方法,通过有目的的或随机的突变达到提高酶在有机相中的稳定性,把酶蛋白与有机溶液接触表面的疏水性氨基酸残基换成带电性的氨基酸残基,结果发现:对枯草杆菌蛋白酶的单一突变,使酶在非水相溶剂中的稳定性增加 2~6 倍,而双突变的结果使稳定性增加了 27 倍。

2. 交联酶晶体

交联酶晶体则是人工设计的另一种耐有机溶媒的技术。最近, Nancy 和 Manuel 利用双功能试剂,如戊二醛等交联酶结晶体,大大提高了酶在高温、非水相溶剂和水-有机溶剂体系中的稳定性。由于酶结晶后,酶晶格里蛋白质分子间的相互作用力增加,使酶蛋白对热及其他变性因素的抵抗能力增强,伸展、凝集和裂解作用减少。交联试剂对酶晶体的化学交联作用,进一步增加酶晶体结构的稳定性,对防止酶在反应体系中的溶解,提高稳定性起着积极作用。

交联酶晶体不仅对极端环境有很高的稳定性,还发现有时比游离酶显示出更高的活性,皱褶假丝酵母脂肪酶交联酶晶体在几种重要的药物光学拆分中,表现的活力比游离酶高了 10 倍。由于交联酶晶体不溶于水和有机溶剂,可多次循环使用,其稳定性和活性保持不变,目前已开始应用于医药和化学工业中。美国 Altus 生物公司,1992 年开始对交联酶晶体研究以来,已有近 10 种产品上市,并带来上百万的年利润。

3. 固定化酶技术

在基因工程技术应用于酶工程之前,通过物理吸附或化学键合的方法,把酶固定在不溶性载体上,结果对提高酶的稳定性,增加酶的使用效率等起到了显著促进作用。因此,在工业应用上,固定化酶已经有很多成功的例子。然而,固定化酶最大的缺陷是:体积产量低,通常只有 5% 的固定化酶在起催化作用。因此,需要进一步改善酶的应用技术,适应工业化生产。

0.5 极端酶的工业应用前景

目前日本、美国、欧洲等地区都十分重视极端微生物的研究开发,工作主要集中在:新物种的发现、新产物的研究与生产、极端酶的结构与功能用其基因的克隆表达、适应机