

M EI GONGCHENG JISHU

MEI GONGCHENG JISHU

酶

工程技术 及应用探析

姜 华 著



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

MEI GONGCHENG JISHU
JI YINGYONG TANXI

酶工程技术 及应用探析

姜 华 著



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

内 容 提 要

全书主要包括:绪论,酶的生物合成法,酶的分离和纯化方法,酶的定点突变,酶分子的定向进化,酶的化学修饰,有机介质中水和有机溶剂对酶催化反应的影响,有机介质中酶催化反应的类型条件及其控制,酶非水相催化的应用,酶反应器的类型与特点,酶反应器的选择与设计,酶反应器的操作分析,酶反应器的发展,酶的应用探析和酶的安全性及管理。

图书在版编目(CIP)数据

酶工程技术及应用探析 / 姜华著. -- 北京: 中国水利水电出版社, 2014. 9
ISBN 978-7-5170-2564-1

I. ①酶… II. ①姜… III. ①酶工程 IV. ①Q814

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第220824号

策划编辑:杨庆川 责任编辑:杨元泓 封面设计:马静静

书 名	酶工程技术及应用探析
作 者	姜 华 著
出版发行	中国水利水电出版社 (北京市海淀区玉渊潭南路1号D座100038) 网址:www.waterpub.com.cn E-mail:mchannel@263.net(万水) sales@waterpub.com.cn
经 售	电话:(010)68367658(发行部)、82562819(万水) 北京科水图书销售中心(零售) 电话:(010)88383994、63202643、68545874 全国各地新华书店和相关出版物销售网点
排 版	北京鑫海胜蓝数码科技有限公司
印 刷	三河市天润建兴印务有限公司
规 格	170mm×240mm 16开本 19.5印张 349千字
版 次	2015年5月第1版 2015年5月第1次印刷
印 数	0001—3000册
定 价	59.00元

凡购买我社图书,如有缺页、倒页、脱页的,本社发行部负责调换

版权所有·侵权必究

前 言

酶工程作为生物工程的重要组成部分之一,在生物工程中所占据的地位非同一般。酶工程是指以酶学原理与化工技术相结合而形成的应用技术领域,即在一定的生物反应装置里,利用酶的催化作用,将相应的原料转化为有关物质的技术。近年来,随着基因工程、蛋白质工程和电子信息技术等高新技术的发展,酶工程也得到了迅速的发展,一些新技术、新发明和新成果如雨后春笋般涌出,已经对人们的生活和社会经济的发展产生了非同一般的影响,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,并展现出令人憧憬的前景。

酶工程的主要内容包括酶的生产、酶的改性和酶的应用三大部分。

酶的生产(enzyme production)是通过各种方法获得人们所需的酶的技术过程,酶的生产方法可以分为酶的生物合成法和酶的分离和纯化等。

酶的改性(enzyme improving)是通过各种方法改进酶的催化特性的技术过程。酶改性是基于酶的结构及其与催化特性的关系,实现酶分子的改造和修饰。

酶具有专一性强、催化效率高、作用条件温和等显著特点。在酶的应用过程中,人们也发现酶具有稳定性较差、抗原性高、半衰期短等弱点。为了克服酶在使用过程中的不足,人们经过不断深入研究,开发出各种酶的特性改进技术,主要包括酶分子的改造和修饰、酶的非水相催化以及酶反应器分析等。近几年来,相继出现的 DNA 重排(DNA shuffling)技术、高通量筛选(high throughput screening)技术、易错 PCR(error-prone PCR)技术定向进化(directed evolution)技术等新技术,酶分子侧链修饰技术、大分子结合技术等酶的化学修饰技术,为酶催化特性的进一步改进提供了强有力的手段,对酶工程的发展有强大的推动作用。

酶的应用(enzyme application)是在特定的条件下通过酶的催化作用,获得人们所需的产物、除去不良物质或者获得所需信息的技术过程。

酶的催化特性以及酶催化作用动力学是酶应用的基本理论。通过酶的催化作用,可以得到人们所需要的物质或者将不需要的甚至有害的物质除去,以利于人体的健康、环境的保护、经济的发展和社会的进步。目前,酶已经在食品、环境保护、医药、生物技术、饲料生产等领域广泛应用。在酶的应用过程中,酶反应器的设计非常重要,有助于控制好酶催化反应的各种条

件,使酶最大程度地发挥其催化功能,以达到预期的效果。

本书内容分 7 章,包括:绪论、酶的生产方法、酶分子的改造和修饰、酶的非水相催化、酶反应器分析、酶的应用探析和酶的安全性和管理。

作者在撰写此书过程中,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的感谢!

由于酶工程技术的发展非常迅速,许多新技术、新成果尚来不及消化吸收,加上作者水平有限,错误和不妥之处在所难免,恳请广大读者朋友们批评指正。

作者于齐鲁工业大学
2014 年 5 月

目 录

前言	1
第 1 章 绪论	1
1.1 酶及酶工程研究的意义	1
1.2 酶工程的内容	4
1.3 酶工程发展概况及展望	6
第 2 章 酶的生产方法	14
2.1 酶的生物合成法	14
2.2 酶的分离和纯化方法	58
第 3 章 酶分子的改造与修饰	81
3.1 酶的定点突变	81
3.2 酶分子的定向进化	85
3.3 酶的化学修饰	109
第 4 章 酶的非水相催化	139
4.1 概述	139
4.2 有机介质中水和有机溶剂对酶催化反应的影响	141
4.3 有机介质中酶催化反应的类型、条件及控制	160
4.4 酶非水相催化的应用	166
第 5 章 酶反应器分析	175
5.1 酶反应器的类型与特点	175
5.2 酶反应器的选择与设计	194
5.3 酶反应器的操作分析	202
5.4 酶反应器的发展	210
第 6 章 酶的应用探析	216
6.1 工业用酶的应用	216

6.2 非工业用酶的应用	255
第7章 酶的安全性和管理	293
7.1 酶的安全性	293
7.2 酶的管理	297
参考文献	306

第 1 章 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,是以应用为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。

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技术的发展,使酶工程技术得到了迅速的发展和应用,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。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 Gist-brocades 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 125,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 酶及酶工程研究的意义

生物工程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

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。^①

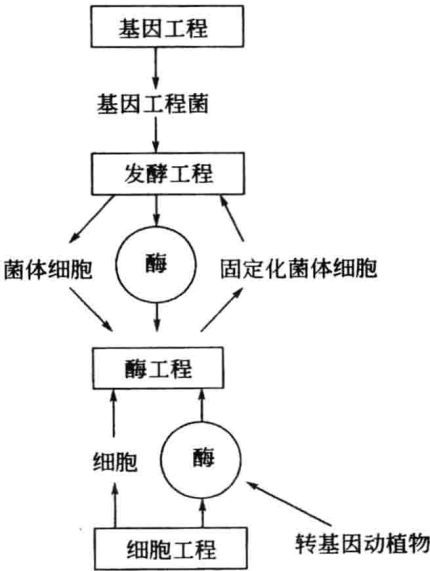


图 1-1 酶工程与发酵工程、基因工程、细胞工程的关系

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、使其在之后的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由有害的、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。这一原理已成功地用于提高大肠杆菌(*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。

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

^① 肖连东,张彩莹. 酶制剂技术. 北京:化学工业出版社,2008:1-5

讨论酶和生命活动、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。

酶还是生物科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、 T_7 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、性能稳定、催化效率更高的新酶。

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,因为微生物比动植物具有更多的优点。为了提高发酵液浓度,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。

(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、固定化酶以及固定化细胞等在食品、环境保护以及医药等方面的应用。

1.3 酶工程发展概况及展望

1.3.1 酶工程发展概况

化学工业生产大量的化工产品,极大地丰富了人们的生活,为人类社会的发展做出了重要贡献。但是随着化学工业的发展,也越来越暴露出它的弊端。在生产人类有用产品的同时,也产生了大量有害的物质,污染了环境,破坏了自然界的生态平衡,甚至危及人类的健康和生命安全。同时,化

学工业在生产中常常需要高温高压,这必然要耗费大量的能源及需大量的设备投资。由于石油、煤炭等能源储量都是有限的,为了改变未来的资源和能源结构,除了积极开发新的能源外,必须采用节能而且效率高的生产技术。由于人们对酶的研究和认识的不断发展,预示了酶的应用可能为改造和发展现有化学工业开辟一条有效的途径。因为工业上的大多数化学反应能用化学催化剂催化,同时亦几乎都可以用一种或多种酶催化,显而易见,工业上许多化学催化的反应可用酶催化来代替。酶作为生物催化剂,具有大多数化学催化剂所不具备的优点:酶的催化活性极高,催化作用具有专一性,反应的副产物少,能在温和的条件下如常温常压和水溶液中起催化反应,耗能少。因此,酶的应用正好能够克服化学工业出现的弊端。如果酶能在工业上广泛应用,充分发挥它的特点,就可达到简化工艺、降低能源消耗、节省设备投资和减少环境污染的目的,使工业面貌发生明显改观。因此积极探索和研究酶的应用技术已受到世界各国尤其是发达国家的重视,推动了酶工程的迅速发展。

酶工程是在酶的生产和应用过程中逐步形成并发展起来的学科。我国劳动人民早在 4000 年前就已掌握了酿酒技术,商朝的酿酒业已相当发达。酒是酵母发酵的产物,是细胞内酶作用的结果。公元 10 世纪左右,我国已能用豆类做酱。豆酱是在霉菌蛋白酶作用下,豆类蛋白质水解所得到的产品。秦汉前已利用麦曲含有的淀粉酶将淀粉降解为麦芽糖,用于制造饴糖等等。酶作为商品生产已有 100 多年历史,早在 1833 年还没出现“酶”的定义之前,已有人用酒精沉淀出麦芽淀粉酶,叫 diastase,可使 2000 倍淀粉液化而用于棉布退浆。但是直到 19 世纪人们才逐渐建立起“酶”的概念。^①

19 世纪 30 年代德国科学家 Schwann 发现了胃蛋白酶,化学家 Patou 等发现了淀粉酶,19 世纪 90 年代 E. Büchner 从得到的纯净酵母液中发现了多种酶。

1894 年,日本的高峰让吉首先从米曲霉中制备得到高峰淀粉酶,用作消化剂,开创了近代酶的生产和应用的先例;1908 年,德国的罗姆(Rohm)从动物胰脏中制得胰酶,用于皮革的软化;1908 年,法国的波伊定(Roidin)制备得到细菌淀粉酶,用于纺织品的褪浆;1911 年,华勒斯坦(Wallerstein)从木瓜中获得木瓜蛋白酶,用于啤酒的澄清。1917 年,法国的 Boidin 将用枯草杆菌产生的淀粉酶,用作纺织工业上的退浆剂。20 世纪 20 年代,美国科学家 J. Summer 从刀豆中提取出一种结晶形的新物质,弄清了酶就是蛋白质,为此获得了诺贝尔化学奖。从此,人们才意识到酶的重要作用,现代

^① 陈宁. 酶工程. 北京:中国轻工业出版社,2014:3-6

微生物酶技术才真正起步。此后,酶在工业上应用的研究逐渐深入到很多领域,酶的生产和应用逐步发展。然而,在近半个世纪的时间里,都是停留在从动物、植物或微生物细胞中提取酶并加以应用的阶段。这种方法由于受到原料来源的制约,加上受到分离纯化技术的限制,大规模的工业化生产受到一定限制。

1949年,日本开始采用微生物液体深层培养方法进行细菌 α -淀粉酶的发酵生产,揭开了现代酶制剂工业的序幕。20世纪50年代以后,随着发酵工程技术的发展,许多酶制剂都采用微生物发酵方法生产。由于微生物种类繁多,生长繁殖迅速,能在人工控制条件的生物反应器中进行生产,使酶的生产得以大规模发展。

1959年,采用葡萄糖淀粉酶催化淀粉生产葡萄糖的新工艺研究获得成功,彻底革除了原来葡萄糖生产中需要高温高压的酸水解工艺,使得淀粉得糖率由80%提高到100%,致使日本1960年的精制葡萄糖产量猛增10倍。由于这项改革的成功,大大促进了酶在工业上应用的发展,先后出现了不少成功的应用实例。例如将5f-磷酸二酯酶用于5'-核苷酸的生产,用青霉素酰胺酶制备6-氨基青霉烷酸(6-APA),用氨基酰化酶拆分DL-氨基酸,用 β -酪氨酸酶催化生产L-多巴等等。

1960年,法国的雅各(Jacob)和莫诺德(Monod)提出操纵子学说,阐明了酶生物合成的调节机制,使酶的生物合成可以按照人们的意愿加以调节控制。在酶的发酵生产中,依据操纵子学说,进行诱导和解除阻遏等调节控制,就有可能显著提高酶的产率。

20世纪80年代迅速发展起来的动植物细胞培养技术,继微生物发酵生产酶之后,已成为酶生产的又一种途径。植物细胞和动物细胞都可以同微生物细胞一样,在人工控制条件的生物反应器中进行培养,通过细胞的生命活动,得到人们所需的各种产物,其中包括各种酶。例如,通过植物细胞培养可以获得超氧化物歧化酶(SOD)、木瓜蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、过氧化物酶、糖苷酶、糖化酶等。通过动物细胞培养可以获得血纤维蛋白溶酶原活化剂、胶原酶等。

随着酶生产的发展,酶的应用越来越广泛。由于酶具有专一性强、催化效率高、作用条件温和等显著特点,在食品、环境保护和医药等领域广泛应用。

在酶的应用过程中,人们注意到酶的一些不足之处。例如,大多数酶不能耐受高温、强酸、强碱、有机溶剂等作用,稳定性较差;酶通常在水溶液中与底物作用,只能作用一次;酶在反应液中与反应产物混在一起,使产物的分离纯化较为困难等。针对这些不足,人们从多方面进行研究,寻找各种方

法对酶的催化特性进行改进,以便更好地发挥酶的催化功能,满足人们对酶使用的要求。

通过各种方法改进酶的催化特性的技术过程称为酶的改性(enzyme improving)。酶的改性技术主要有酶分子修饰(enzyme molecule modification)、酶固定化(enzyme immobilization)、酶非水相催化(enzyme catalysis in non-aqueous phase)、酶定向进化(enzyme directed evolution)等。

1916年,美国的奈尔森(Nelson)和格里芬(Griffin)发现蔗糖酶吸附在骨炭上后,该酶仍然显示出催化活性。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,日本的千烟一郎首次在工业上应用固定化氨基酰化酶进行DL-氨基酸拆分而生产L-氨基酸,从此学者们开始用“酶工程”这个名词来代表酶的生产和应用的科学技术领域。1971年,在美国举行了第一届国际酶工程学术会议,会议的主题是固定化酶。

为了省去酶分离纯化的过程,出现了固定在菌体中的固定化酶(又称为固定化死细胞或固定化静止细胞)技术。固定化酶具有稳定性提高、可以反复使用或连续使用较长的一段时间、易于与产物分离等显著特点,但是固定化技术较为繁杂,而且用于固定化的酶要首先经过分离纯化。1973年,日本成功地利用固定在大肠杆菌菌体中的天冬氨酸酶,由反丁烯二酸连续生产L-天冬氨酸。现在已经有多种固定化酶用于大规模工业化生产。例如,利用固定化葡萄糖异构酶由葡萄糖生产果葡糖浆,利用固定化青霉素酰化酶生产半合成青霉素或头孢霉素,利用固定化延胡索酸酶由反丁烯二酸生成L-苹果酸,利用固定化 β -半乳糖苷酶生产低乳糖奶,利用固定化天冬氨酸- β -脱羧酶由天冬氨酸生产L-丙氨酸等。

在固定化酶的基础上,又发展了固定化细胞(固定化活细胞或固定化增殖细胞)技术。1978年,日本的铃木等用固定化细胞生产 α -淀粉酶研究成功。此后,采用固定化细胞生产蛋白酶、糖化酶、果胶酶、溶菌酶、天冬酰胺酶等的研究相继取得进展。1983年,Altman等人发现核糖核酸酶P(RNase P)的RNA部分具有核糖核酸酶的催化活性,而该酶的蛋白质部分(C5蛋白)却没有催化活性。RNA具有催化活性这一现象的发现,改变了有关酶的概念,被认为是近年来生物学领域最令人鼓舞的发现之一,为此,Cech和Altman共同获得了1989年度的诺贝尔奖。

在固定化生产 α -淀粉酶、糖化酶、果胶酶等的研究方面取得可喜成果。

固定化细胞可以反复或连续用于酶的发酵生产,有利于提高酶的产率,

缩短发酵周期,然而只能用于生产胞外酶等容易分泌到细胞外的产物。

胞内酶等许多胞内产物之所以不能分泌到细胞外,原因是多方面的,其中细胞壁作为扩散障碍是阻止胞内产物向外分泌的主要原因之一。因此,如果能除去细胞壁这一扩散障碍,就有可能使较多的胞内产物分泌到细胞外。为此,进行固定化原生质体技术的研究。1986年开始,华南理工大学生物工程研究所采用固定化原生质体生产碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、谷氨酸脱氢酶等的研究相继取得成功,为胞内酶的连续生产开辟新途径。

在酶工程领域中,存在着与酶分子本身没有直接关系的两个重要研究方向:酶抑制剂和酶生物反应器。20世纪60年代初,梅泽滨夫(Umezawa)提出了酶抑制剂的概念,从而将抗生素的研究扩大到酶抑制剂的新领域,开创了从微生物代谢产物中寻找其他生理活性物质的新时代。自此,酶抑制剂在医药和农业领域获得广泛的应用开发。其中,临床疾病治疗、新药的筛选与开发、新型农药的设计、抗病虫植物新品种培育、肥料及饲料的添加剂等方面,是当前酶抑制剂研究的热点。酶生物反应器的正确设计、选择和操作,往往可以提高酶催化效率,简化工艺流程,从而产生良好的经济效益,也是酶应用开发过程中必须重视的重要课题。

酶的性质和催化功能是由酶分子的特定结构决定的。如果酶分子的结构发生改变,就可能引起酶的性质和催化功能的改变。为了更好地发挥酶的催化功能,根本的办法是进行酶分子修饰。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称为酶分子修饰。20世纪80年代以来,酶分子修饰技术发展很快,修饰方法主要有:酶分子主链修饰、酶分子侧链基团修饰、酶分子组成单位置换修饰、酶分子中金属离子置换修饰和物理修饰等。广义来说,酶的固定化技术也属于酶分子修饰技术的一种。两者的主要区别在于固定化酶是水不溶性的,而修饰酶则是水溶性的。通过酶分子修饰,可以提高酶的催化效率,增加酶的稳定性,消除或降低酶的抗原性等。故此,酶分子修饰技术已经成为酶工程中具有重要意义和广阔应用前景的研究、开发领域。尤其是20世纪80年代中期发展起来的蛋白质工程,已把酶分子修饰与基因工程技术结合在一起。通过基因定位突变技术,可把酶分子修饰后的信息储存于DNA之中,经过基因克隆和表达,就可以通过生物合成的方法不断获得具有新的特性和功能的酶,使酶分子修饰展现出更广阔的前景。

1984年,克利巴诺夫(Klibanov)等进行了有机介质中酶的催化作用的研究,发现脂肪酶在有机介质中不但具有催化活性,而且还具有很高的热稳定性,改变了酶只能在水溶液中进行催化的传统观念。此后,有机介质中酶的催化作用的研究迅速发展。与水溶液中酶的催化相比,酶在有机介质中