



普通高等教育“十二五”规划教材

陈守文◎主编

酶工程 (第二版)

ENZYME ENGINEERING



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

酶 工 程

(第二版)

陈守文 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书根据酶工程学科的最新研究进展,结合作者的教学实践和科研成果,全面系统地介绍了关于酶生产和应用的基本理论、基本技术及其最新进展和发展趋势。全书共九章,内容包括酶工程基础、酶的发酵工程、酶的分离工程、固定化酶与固定化细胞、化学酶工程、生物酶工程、非水相酶催化、酶反应器和酶传感器、酶及酶抑制剂的应用。

本书可作为高等农林院校高年级本科生及研究生和其他院校相关专业学生的酶工程教材,也可作为有关专业教师、中学生物教师、科学技术工作者及工程技术人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

酶工程/陈守文主编. —2版. —北京:科学出版社,2015

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-044921-4

I. ①酶… II. ①陈… III. ①酶工程-高等学校-教材 IV. ①Q814

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 126924 号

责任编辑:丛楠文 苗 / 责任校对:蒋萍

责任印制:赵博 / 封面设计:铭轩堂

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

大厂书文印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008年2月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2015年6月第 二 版 印张:15 1/2

2015年6月第一次印刷 字数:396 000

定价:38.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《酶工程》(第二版)编委会名单

主 编 陈守文

副 主 编 陈 鹏 林善枝 汪世华 张吉斌

编写人员 (按姓氏拼音排序)

陈 鹏(西北农林科技大学)

陈守文(湖北大学)

冯 亮(中国地质大学)

韩毅强(黑龙江八一农垦大学)

黄碧芳(福建农林大学)

林善枝(北京林业大学)

潘秋红(中国农业大学)

阮丽芳(华中农业大学)

宋发军(中南民族大学)

汪世华(福建农林大学)

王常高(湖北工业大学)

谢 苗(福建农林大学)

杨 松(青岛农业大学)

张吉斌(华中农业大学)

《酶工程》(第一版)编委会名单

主 编 陈 守 文

副 主 编 陈 鹏 林善枝 汪世华 张吉斌

编写人员 (按姓氏拼音排序)

陈 鹏(西北农林科技大学)

陈守文(华中农业大学)

冯 亮(中国地质大学)

黄碧芳(福建农林大学)

黄遵锡(云南师范大学)

林善枝(北京林业大学)

潘秋红(中国农业大学)

阮丽芳(华中农业大学)

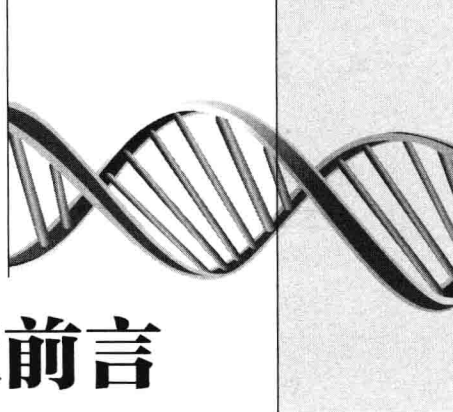
宋发军(中南民族大学)

汪世华(福建农林大学)

王常高(湖北工业大学)

谢 苗(福建农林大学)

张吉斌(华中农业大学)



第二版前言

酶工程是生物工程的核心内容,伴随着现代生物工程技术学科的突飞猛进,生物工程产业在我国蓬勃发展,酶工程学科日新月异。鉴于酶工程学科的重要性、综合性及知识更新快等特点,我们在《酶工程》第一版的基础上,参考了国内外相关酶工程教材及大量有关酶工程的科研文章,补充了新知识,并将酶抑制剂和核酶相关内容合并至酶的应用章节之中。同时,在书后补充了推荐学生课外阅读的最新文章目录,供学有余力的学生自学,以扩大专业视野和提高专业能力。

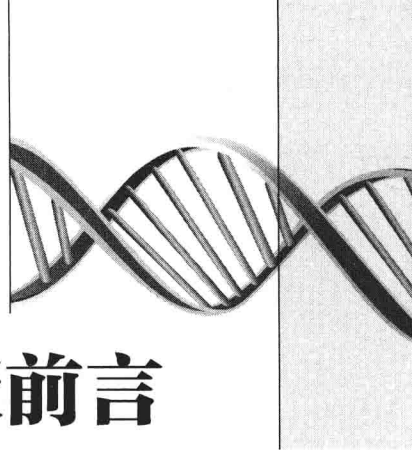
本书内容分为 5 个部分。第一部分即第一章,酶工程基础。第二部分是有关酶的发酵工程和分离工程的知识,包括第二章和第三章。第三部分是有关酶的修饰改造及酶催化反应体系的相关知识,包括第四至第七章,分别介绍固定化酶与固定化细胞、化学酶工程、生物酶工程、非水相酶催化。第四部分介绍酶反应器和酶传感器,即第八章。第五部分即第九章,介绍酶及酶抑制剂的应用。

本书在第一版教材原班人马的基础上,为进一步提高教材教学实用性,特邀请青岛农业大学杨松教授负责教材思考题答案的编写,黑龙江八一农垦大学韩毅强老师负责教材 PPT 的制作。读者可登陆网页 www.sciencep.com,点击“教学服务”→“资源下载”→“高等教育”,在其下的“课件”栏和“答案”栏中选择“更多”,按页面提示分别下载本书的课件及思考题答案。

由于编者水平有限和涉及的内容广泛,书中难免存在不足之处,诚请广大读者批评指正。

陈守文

2015 年 3 月于武汉



第一版前言

酶是生命活动中的“催化剂”，主宰着生命活动的进程，是人类左右生命活动的工具。酶工程是以研究开发酶及其应用为主要对象的独立学科，通过有效获取酶、改造酶，并利用酶的催化特性，定向加速自然环境和人工环境的物质化学反应。酶的应用已遍及工业、农业、医药业、环境保护、能源开发、化学分析以及生命科学理论研究等领域。随着现代科学技术的飞速发展，酶工程学科日新月异，其影响已涉及人类各个领域。

鉴于酶工程学科的重要性、综合性以及知识更新快等特点，我们参考了国内外相关酶工程教材以及大量有关酶工程的科研文章，按照酶工程基础、酶的发酵生产、酶的改造以及酶的应用为线索编写本书，同时每章之后提供思考题以及补充读物，以便学生复习和扩大学习视野。

本书内容具体分为 5 个部分。第一部分即第一章，酶工程基础，简单介绍了酶学和酶工程的发展和相关的基础知识。

第二部分是有关酶的发酵生产知识，包括两章(第二章和第三章)。第二章酶的发酵工程，以微生物产酶为核心对象，介绍微生物产酶的代谢调节机制、发酵工艺和发酵动力学；第三章酶的分离工程，介绍酶的提取纯化系列单元操作方法原理。

第三部分是有关酶的修饰改造、核酶以及酶催化反应体系的相关知识，包括五章(第四章至第八章)。第四章固定化酶和固定化细胞，为化学酶工程的主要组成部分，介绍酶及细胞的固定化技术、固定化对酶性质的影响；第五章化学酶工程，介绍酶分子的化学修饰、模拟酶、抗体酶和印迹酶等四个方面的基本知识、基本技术和一般方法。第六章生物酶工程，介绍基因工程在酶工程中的应用，包括酶的异源表达，酶分子改造以及融合酶。第七章核酶，介绍核酶的种类及应用。第八章非水相酶催化，介绍酶的非水介质反应体系、非水相酶催化的影响因素、非水介质对酶的影响及其非水相酶催化的应用。

第四部分是与酶本身无直接关系的两项重要内容：酶反应器和酶传感器和酶抑制剂，包括两章(第九章和第十章)。第九章酶反应器和酶传感器，介绍酶反应器类型、选型与设计以及操作调控，同时介绍不同类型酶传感器工作原理及其应用；第十章是酶抑制剂，介绍酶抑制剂的机制、设计方法和有关应用。

第五部分即第十一章，酶的应用，详细介绍酶在各行各业中的相关应用，希望能对感兴趣的读者有所帮助。

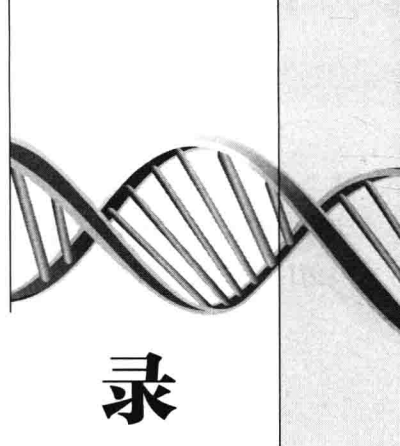
本书的第一章由华中农业大学的陈守文和阮丽芳编写；第二章由陈守文、黄遵锡(云南师范大学)和冯亮(中国地质大学)编写；第三章由张吉斌(华中农业大学)编写；第四章、第八章由陈鹏(西北农林科技大学)编写；第五章由宋发军(中南民族大学)编写；第六章由福建农林大学的汪世华和黄碧芳编写；第七章由福建农林大学的谢苗和汪世华编写；第九章由王常高(湖北



工业大学)编写;第十章由林善枝(北京林业大学)编写;第十一章由林善枝和潘秋红(中国农业大学)编写。由于时间仓促,加上编者水平有限和涉及的内容广泛,书中难免会出现不足之处,诚请广大读者批评指正。

陈守文

2007年12月于武汉



目 录

第二版前言

第一版前言

1 酶工程基础	1
1.1 酶工程概述	1
1.1.1 酶及酶工程研究的意义及内容	1
1.1.2 酶的研究简史	2
1.2 酶的催化特点及影响因素	6
1.2.1 酶的催化特点	6
1.2.2 影响酶催化作用的因素	7
1.3 酶的活力测定	9
1.3.1 酶活力单位	10
1.3.2 酶的比活力	10
1.3.3 酶的转换数和催化周期	10
1.3.4 酶活力的测定方法	10
1.4 酶反应动力学	12
1.4.1 米氏方程	12
1.4.2 米氏方程的意义	12
1.4.3 动力学常数 K_m 和 V_m 的求取	13
思考题	14
补充读物	14
2 酶的发酵工程	16
2.1 酶生物合成的调节机制	16
2.1.1 原核生物中酶生物合成的调节	16
2.1.2 真核生物中酶生物合成的调节	20
2.1.3 酶生物合成调节作用机制的实际应用	22
2.2 酶的微生物发酵技术	22
2.2.1 酶的生产菌种	23
2.2.2 培养基和培养条件对产酶的影响与调节	27
2.2.3 发酵方法	30
2.2.4 提高产酶的措施	33
2.3 酶发酵动力学	34



2.3.1 细胞生长动力学	34
2.3.2 产酶动力学	35
思考题	36
补充读物	36
3 酶的分离工程	37
3.1 预处理	37
3.1.1 发酵液的预处理	37
3.1.2 细胞破碎	38
3.2 酶的提取	40
3.2.1 酶的提取方法	40
3.2.2 影响酶提取的主要因素	41
3.3 酶的分离纯化	41
3.3.1 离心分离	42
3.3.2 沉淀分离	43
3.3.3 过滤与膜分离	46
3.3.4 萃取分离	48
3.3.5 层析分离	50
3.3.6 电泳分离	59
3.4 酶的浓缩、干燥与结晶	61
3.4.1 酶的浓缩	62
3.4.2 酶的干燥	63
3.4.3 酶的结晶	64
思考题	65
补充读物	66
4 固定化酶与固定化细胞	67
4.1 酶的固定化	68
4.1.1 酶的固定化方法	68
4.1.2 固定化酶的评价	81
4.1.3 固定化酶的性质和影响因素	83
4.2 细胞的固定化	88
4.2.1 吸附法	88
4.2.2 共价交联法	89
4.2.3 包埋法	89
4.2.4 无载体固定化	91
4.3 辅酶的固定化	91
4.3.1 辅基的固定化	92
4.3.2 辅酶的固定化	92
4.3.3 辅酶的再生	94
思考题	95
补充读物	95

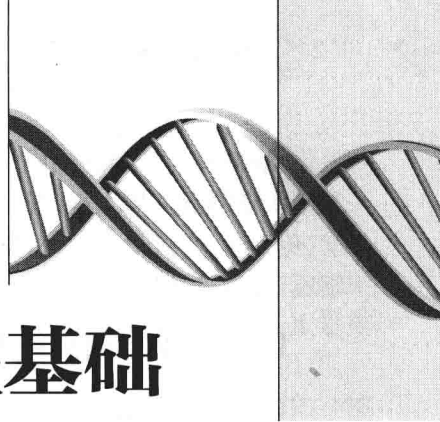
5 化学酶工程	98
5.1 酶分子的化学修饰	98
5.1.1 概述	98
5.1.2 酶化学修饰的原理、方法及修饰剂	99
5.1.3 修饰酶的性质	110
5.2 模拟酶	113
5.2.1 概述	113
5.2.2 模拟酶的理论基础	115
5.2.3 模拟酶的分类	116
5.2.4 环糊精模拟酶	116
5.2.5 大环聚醚及其模拟酶	120
5.2.6 杯芳烃及其模拟酶	121
5.2.7 金属卟啉及其模拟酶	122
5.2.8 肽酶	123
5.3 抗体酶	123
5.3.1 抗体酶的催化特性	124
5.3.2 抗体酶的催化作用机制	125
5.3.3 抗体酶的催化反应类型	126
5.3.4 抗体酶的制备方法	128
5.3.5 抗体酶的应用前景	131
5.4 印迹酶	132
5.4.1 分子印迹的原理	132
5.4.2 分子印迹技术的分类	133
5.4.3 分子印迹聚合物的制备	135
5.4.4 分子印迹酶	136
思考题	137
补充读物	137
6 生物酶工程	139
6.1 酶基因的克隆和表达	139
6.1.1 酶基因的克隆	139
6.1.2 酶的异源表达	142
6.2 酶分子的改造	144
6.2.1 酶的定点突变	144
6.2.2 酶分子定向进化	146
6.3 融合酶	152
6.3.1 融合酶简介	153
6.3.2 融合酶的应用	153
思考题	156
补充读物	157
7 非水相酶催化	158



7.1 非水酶学概述	158
7.1.1 酶催化反应的介质	158
7.1.2 非水介质酶催化反应的特点	159
7.2 有机介质中的酶促反应	160
7.2.1 酶促反应的有机介质体系	160
7.2.2 有机介质中酶促反应的影响因素	161
7.3 有机介质中酶的性质	169
7.3.1 有机介质体系中酶活性的变化	169
7.3.2 酶的稳定性的变化	170
7.3.3 pH 记忆和分子印记	170
7.3.4 底物专一性的改变	171
7.3.5 反应平衡方向的移动	173
7.3.6 酶促动力学变化	174
7.4 气相和超临界介质的酶促反应和应用	174
7.4.1 气相介质中酶促反应的特点和应用	174
7.4.2 超临界介质中酶促反应的特点和应用	175
思考题	177
补充读物	177
8 酶反应器和酶传感器	180
8.1 酶反应器	180
8.1.1 酶反应器的类型与特点	180
8.1.2 酶反应器的选型与设计	183
8.1.3 酶反应器的操作	186
8.2 酶传感器	188
8.2.1 生物传感器概述	188
8.2.2 酶传感器	190
思考题	196
补充读物	196
9 酶及酶抑制剂的应用	198
9.1 酶在医药领域中的应用	198
9.1.1 在分析检测及疾病诊断方面的应用	198
9.1.2 在疾病治疗方面的应用	201
9.1.3 在药物生产方面的应用	202
9.2 酶在农业领域中的应用	202
9.2.1 在农产品的保鲜与加工方面的应用	202
9.2.2 在农产品质量检测方面的应用	203
9.2.3 在饲料生产方面的应用	204
9.2.4 在抗性作物新品种培育中的应用	206
9.3 酶在食品领域中的应用	207
9.3.1 在食品保鲜方面的应用	208



9.3.2	在食品加工与生产方面的应用	209
9.3.3	在食品添加剂生产方面的应用	213
9.3.4	在食品质量检测方面的应用	214
9.4	酶在轻化工领域中的应用	214
9.4.1	酶在轻化原料处理方面的应用	214
9.4.2	酶在轻化工产品生产方面的应用	216
9.4.3	酶在加酶日用工业产品方面的应用	218
9.5	酶在环保及能源开发领域中的应用	219
9.5.1	酶在环境监测与治理方面的应用	219
9.5.2	酶在能源开发领域中的应用	220
9.5.3	在可生物降解高分子材料开发方面的应用	221
9.6	酶在分子生物技术研究领域中的应用	221
9.6.1	酶在除去细胞壁方面的应用	221
9.6.2	酶在大分子切割方面的应用	222
9.6.3	酶在分子拼接方面的应用	223
9.7	核酶的应用	224
9.7.1	抗 HIV 感染	224
9.7.2	抗肝炎病毒感染	225
9.7.3	肿瘤治疗	225
9.7.4	其他	226
9.8	酶抑制剂的应用	226
9.8.1	酶抑制剂在医学领域中的应用	226
9.8.2	酶抑制剂在农业及畜牧业领域中的应用	228
思考题		230
补充读物		230
参考文献		232



1 酶工程基础

【内容提要】 本章主要讲授:①重点介绍酶和酶工程的研究简史和发展概况;②简要回顾酶催化特点、影响酶活性的因素、酶活力测定方法及酶反应动力学。

1.1 酶工程概述

1.1.1 酶及酶工程研究的意义及内容

生命依赖于一系列有条不紊的化学反应。然而化学反应的速度太慢以至于无法维持生命活动,因此生命系统进化出加快化学反应的物质——酶。酶是具有特殊作用的蛋白质,能够在生命体内(包括动物、植物和微生物)催化一切化学反应,维持生命特征。从 1833 年法国的帕耶恩(Payen)和珀索兹(Personz)发现第一个酶(淀粉酶)起,至今已发现的酶逾 5000 种,这些酶都是由生物体自然产生的具有催化功能的蛋白质。有关酶的研究内容主要包括酶的结构和功能、生产和改造,以及应用等领域。近 40 年以来,随着核酶、抗体酶、模拟酶及印迹酶的出现,扩展了人们对酶的认识。随着 20 世纪 70 年代 DNA 重组技术的出现,对酶的研究深入到分子水平,包括研究酶的编码基因、酶的表达和调节,进一步通过蛋白质工程对酶分子进行改造。美国能源部于 2002 年斥资 3.5 亿美元启动了“从基因组到生命(GTL)”的五年计划,利用系统生物学的研究方法对生命现象进行研究,从分子水平来探讨酶与生命活动、代谢调节、遗传疾病及生长发育的关系,对阐明生命现象的本质具有重要的意义。

酶不仅是研究的重要对象,也是重要的研究工具。DNA 重组技术的实现和发展得益于技术上的三大发现,其中两大发现就直接与酶相关,即限制性核酸内切酶的发现和 DNA 连接酶及反转录酶的发现。1985 年,美国 PE-Cetus 公司人类遗传研究室的穆利斯(Mullis)等发明了具有划时代意义的聚合酶链式反应(PCR),此后几年时间该研究小组致力于 DNA 聚合酶的研究,直到 1988 年 *Taq* DNA 聚合酶的发现,才使得 PCR 反应广泛运用于各个领域。分子生物学的这一重要发现改变了整个生命科学研究的方式。可以毫不夸张地说,没有酶就没有基因工程。

现代生物技术、航天技术、信息技术、激光技术、自动化技术、新能源技术和新材料技术是世界七大高新技术,其中生物技术列在首位。生物技术之所以令世界各国如此重视,不仅是因为它在解决人类所面临的诸如食物短缺、人类健康、环境污染和资源匮乏等重大问题上有着不可比拟的优越性,还因为它与理、工、农、医等科技的发展,与伦理道德、法律等社会问题都有着密切的关系。生物技术主要包括基因工程、细胞工程、酶工程及发酵工程,酶是基因工程、细胞工程和发酵工程的重要研究对象和工具。酶工程的研究可以促进基因工程、细胞工程和发酵工程的发展。因此,酶工程是生物技术研究的核心内容。酶工程研究的主要内容包括酶的发酵工程、酶的分离工程、酶的固定化、化学酶工程、生物酶工程、酶反应器和传感器、酶的非水相

催化、酶抑制剂及酶的应用。酶工程研究的最终目的就是为了获得大量所需要的酶,并能高效利用所得的酶。酶工程的研究包括生物化学、分子生物学、基因工程、细胞工程、发酵工程、医学、免疫学、有机化学、分析化学及仿生学等多学科交叉。酶工程的应用遍及人类社会的各个领域,日益受到重视。

1.1.2 酶的研究简史

1.1.2.1 酶的原始利用

中国古代对酶的利用可以追溯到 4000 年前的夏禹时代,当时的酿酒技术就是利用存在于酒曲中微生物的淀粉酶系和酒化酶系。公元前 10 世纪左右,利用豆类制造豆酱是我国民间盛行的技术,其原理就是利用霉菌产生的蛋白酶水解豆类蛋白。2700 年前的周代,人们利用麦芽中含有的 β -淀粉酶制造麦芽糖,至今这种传统的制糖技术依然盛行。由于酒曲中含有丰富的维生素和淀粉酶,早在 2500 年前,人们就知道利用酒曲治疗消化疾病。春秋战国时期,漆已经被广为利用,那时所用的漆即为漆树的树脂被漆酶作用的氧化产物。

西方最早有关酶利用的记载是约 6000 年前,古巴比伦人利用麦芽酿酒。在古埃及时代的绘画中就详细描述了使用酵母发酵面包的过程,公元前 2575 年建造的 Giza 金字塔群附近就挖掘出面包房遗址,大英博物馆陈列着公元前 2100 年的面包样品。以上这些事例都是人们对酶的原始利用。

1.1.2.2 酶的发展

科学研究中的很多发现表面上看似似乎都是一些偶然的事件,仔细分析就会认识到这些发现实质上都是偶然中的必然。正如法国微生物学家、化学家巴斯德(Pasteur)所说:“在观察的领域中,幸运只偏袒有准备的头脑”。酶的现代史可以追溯到 1833 年。在 *Annales de Chimie et de Physique* 期刊上帕耶恩和珀索兹描述了从大麦的麦芽中分离淀粉酶多聚体的过程,并将其命名为淀粉酶。和麦芽一样,该产物将糊化淀粉转变成糖,主要是麦芽糖。1835 年,瑞典的贝采里乌斯(Berzelius)首次证明了麦芽提取物能够比硫酸更有效地降解淀粉,并将这一过程称为催化。这是首次在植物中发现酶的存在并且初步验证了它的功能。1836 年,德国生理学家施旺(Schwann)在研究消化过程时,分离出一种在胃内消化蛋白质的物质,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。酵母在发酵过程中的作用是什么?这一问题被激烈地争论了 60 年。1839 年,杰出的德国化学家李比希(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是一个能产生震荡的分解物质:蔗糖原子经过重排,变为乙醇和二氧化碳。另外,乙醇发酵一直被认为是自发的过程。到 1858 年,巴斯德用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——巴斯德视其为一种生理活动。这种对酵母在发酵过程中作用机制的分歧,引发了李比希和巴斯德之间的激烈争论。李比希和巴斯德先后于 1873 年和 1895 年去世,但争论并没有结束。后来德国化学家爱德华·巴克纳(Eduard Buchner)和汉斯·巴克纳(Hans Buchner)于 1897 年发现酵母细胞提取物可以使乙醇发酵,即酵母细胞产生一种酶,这种酶引起发酵。李比希和巴斯德之间的争论就这样最终得到解决。巴克纳兄弟由此奠定了现代生物化学的基石,他们证明酵母细胞提取物可以像活体酵母细胞一样将葡萄糖转变为乙醇和二氧化碳。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。巴克纳兄弟由此获得 1907 年的诺贝尔化学奖,这是酶学研究史上第一次获得诺贝尔奖。酶的命名是 1876 年库尼(Kuhne)提议



的,用酶来表示未统一名称的已知的各种酵素,如从活体组织中提取的酵素等。enzyme 本身的意思是“在酵母中”,起源于希腊语,其中 en 表示“在之内”,zyme 表示酵母或酵素。真正意义上的酶学研究应该始于巴克纳兄弟的发现。

1883 年,丹麦化学家基耶达(Kjeldahl)建立了一套检测有机物中—3 价氮的方法,即测定氮含量的方法。自蛋白质被确定是由含氮的氨基酸组成的高分子物质后,这一方法是定量化学和普通生物技术发展的基础。这种测定蛋白质含量的方法即凯氏定氮法,至今还在沿用。

1894 年,德国化学家费歇尔(Fisher)根据糖化酶的特点建立了“锁钥学说”,提出酶的功能由底物分子的立体结构决定(如原子间的位置关系)。科什兰(Koshland)认为“锁钥学说”理论在真实的生命体系中会导致灾难性的副反应,1953 年,他提出了“诱导契合”假说,解释了酶的其他许多现象,如荷尔蒙作用、反馈抑制和受体功能等。1963 年,莫诺(Monod)及其同事提出了“变构模型”,用以定量解释有些酶的活性可以通过结合小分子进行调节,从而提供了认识细胞中许多酶调控作用的理论基础。

酶动力学研究可以追溯到 1902 年,亨利(Henri)认为酶与底物结合成酶-底物中间复合物是酶催化作用的基本步骤。在此基础上,德国的米彻利斯(Michaelis)和加拿大的曼吞(Menten)在 1913 年数学化地表述了酶作用的普通理论,即米氏方程。他们假定酶(E)首先和底物(S)结合,成为酶-底物中间复合体(ES),这是一个较快的可逆过程;然后复合物(ES)在下一个较慢的反应中分解成为产物(P)和游离的酶。1925 年,布立格兹(Briggs)和何尔登(Handane)修正了米氏方程,提出了稳态学说。经过近百年的验证,米氏方程已经被证明能够精确描述数千种不同酶类的整体动力学行为。在 2006 年 2 月出版的《自然——化学生物学》上,研究人员描述米氏方程实际上在单分子水平上同样有效的,这也强调了酶分子的个性特征。

在蛋白质酶结构研究领域,萨姆纳(Sumner)作出了开创性的工作。1926 年,他从刀豆分离并结晶了脲酶,证明了酶的本质是蛋白质。并由此获得了 1946 年诺贝尔化学奖,这是酶学研究史上的第二次诺贝尔奖。同年,丹麦科学家 Lindestroem-Lang 在哥本哈根的 Carlsberg 实验室研究了多种蛋白质的重要化学性质。他于 1924 年出版的《酶的分离》一书奠定了酶生产的理论基础。Lang 的理论仍是第一近似法,在解决一些分子结构未知的问题上得到应用。继萨姆纳在 1926 年证实酶是蛋白质之后,桑格(Sanger)利用纸电泳及层析技术于 1953 年首次阐明胰岛素的一级结构,开创了蛋白质序列分析的先河。肯德鲁(Kendrew)和佩鲁兹(Perutz)利用 X 射线衍射技术解析了肌红蛋白及血红蛋白的三维结构,论证了这些蛋白质在输送分子氧过程中的特殊作用,成为研究生物大分子空间立体构型的先驱(1962 年诺贝尔化学奖)。1965 年,菲利普斯(Phillips)等研究了溶菌酶的三维空间结构,从而阐明了酶的活性中心并推定了它对基质的反应机制。2002 年诺贝尔化学奖授与美国的科学家芬恩(Fenn)、日本科学家田中耕一(Koichi Tanaka)及瑞士科学家维特里希(Kurt Wuthrich)。芬恩和田中耕一发明了“对生物大分子进行确认和结构分析的方法”和“对生物大分子的质谱分析法”,维特里希开创了“利用核磁共振测定溶液中生物大分子三维结构的方法”。

1982 年,切克(Cech)等在四膜虫 RNA 中发现核酶,26S rRNA 前体能够进行内含子的自我剪切,形成成熟的 26S rRNA。1983 年,阿尔特曼(Altman)等发现,核糖核酸酶 P 中的 RNA 催化前体 tRNA 从 tRNA 5' 端切除某些核苷酸片段,而成为成熟的 tRNA。核酶的发现,从根本上改变了以往只有蛋白质才具有催化功能的概念,拓展了对酶的定义。切克和阿尔特曼也因此获得了 1989 年的诺贝尔奖。1995 年,Cuenoud 发现某些 DNA 分子也具有催化功能,这就彻底改变了酶是蛋白质的传统观念,也为先有核酸后有蛋白质提供了进化的证据。2007 年,美国加州大学圣克鲁兹分校化学和生物化学副教授威廉·斯科特确定了核糖核酸酶

晶体结构,为生命起源提供新的视角。

1.1.2.3 酶工程的发展概况

酶的开发和利用是当代新技术革命中的一个重要课题。酶工程就是将酶、细胞或细胞器等置于特定的生物反应装置中,利用酶所具有的生物催化功能,借助工程手段将相应的原料转化成有用物质并应用于社会生活的一门科学技术。酶工程的核心问题是如何廉价且有效地生产出所需规格的酶,以及如何有效地通过化学或生物手段改造酶,并使之有效发挥催化特性,最大限度服务于人类。其内容包括:酶的生产(发酵工程和分离工程)、酶的改造(化学酶工程和生物酶工程,其中酶和细胞的固定化技术属于化学修饰范畴)、酶的应用(非水相酶学、酶反应器、酶传感器、酶抑制剂及酶的应用)。

早在 19 世纪初,已开展酶的提取和应用工作。1833 年,佩恩(Payen)从麦芽获得了棉布退浆酶;1874 年,汉森(Hansen)利用牛胃凝乳酶生产奶酪;1908 年,罗姆(Rohm)利用动物胰腺提取物软化皮革;1911 年,华勒斯坦(Wallerstein)利用木瓜蛋白酶澄清啤酒。以上酶制剂早期应用简史告诉我们,酶制剂的生产一直停留在从动植物组织或细胞中提取酶的生产工艺。这种生产方式不仅工艺比较落后,而且原料有限,所以很难进行大规模的工业化生产。

酶在工业上的大规模应用可以追溯到 19 世纪。霉菌以蒸煮的大米为原料进行固体发酵,得到的酒曲用于酿酒工业。这类形成酒曲的过程成为建立工业化生产真菌淀粉酶的基础。1891 年,高峰让吉在美国、英国、法国、比利时、加拿大和德国申请了 Taka 酒曲(即高峰淀粉酶)及其制造方法的专利,这是微生物酶产品的首项专利。由高峰让吉建立的表面培养或称半固体培养的发酵方法,现在还用于某些酶的生产。1917 年,Boidin 和 Effront 开创了利用枯草芽孢杆菌生产 α -淀粉酶的制造先河,取代麦芽浸出液用作淀粉浆退浆剂。

20 世纪 40 年代,液体深层通风发酵技术的成功开发,揭开了好氧微生物工业化规模生产的新局面。1949 年,科学家成功应用液体深层发酵法生产出了细菌 α -淀粉酶,从此揭开了近代酶工业的序幕。1960 年,雅各布(Jacob)和莫诺(Monod)提出乳糖操纵子学说,阐明了酶生物合成的转录水平调节机制,为优化酶的发酵生产工艺奠定理论基础。当今,通过人工改造酶蛋白基因的启动子,可定向控制酶蛋白的表达调节;通过向酶蛋白细胞表达体系引入特定营养物的分解酶系,可人工控制微生物的营养选择性,从而人为预先设计培养基主体营养成分等。总而言之,可人工设计和改造细胞表达体系,以模式生物为细胞工厂,程序化控制生产任何酶蛋白,这一指导思路将是未来酶蛋白发酵技术的发展方向。

酶普遍存在于生物体内和微生物发酵液中,传统酶的提取工艺主要采用破碎动植物器官和组织,浸提及沉淀干燥获得粗酶。酶的规模化生产之后,化学工程技术和生化分离技术进入酶制剂行业,发酵液预处理技术、膜分离浓缩、细分级分离技术及制剂化成为酶制剂工业的常规技术手段。目前,随着分子生物技术、免疫学及材料学科的发展,新分离手段层出不穷,对提高酶蛋白分离效率、收得率及简化分离步骤来说,是十分重要的实用技术和研究课题。

据估计自然界中存在的酶有 7000 种左右,其中经过鉴定和分类的有 2000 余种,但大规模生产和应用的商品酶只有数十种,小批量生产的商品酶约数百种。自然酶在工业应用上受到以下几个因素的限制:①大多数酶脱离其生理环境后极不稳定,而酶在生产 and 应用过程中的条件往往与其生理环境相去甚远;②酶的分离纯化工艺复杂;③酶制剂成本较高。为解决上述问题,有必要通过化学酶工程和生物酶工程修饰改造酶。

化学酶工程主要涉及化学修饰酶、固定化酶和化学人工酶,通过化学方法改造酶蛋白的一级结构,提高酶的稳定性和活力及降低抗原性等。酶的固定化作为化学修饰的重要内容,其系