



生命科学核心课程系列教材

# 酶工程

Enzyme Engineering

聂国兴 主编



科学出版社

生命科学核心课程系列教材

# 酶 工 程

主 编 聂国兴  
副主编 明 红 李文均

科 学 出 版 社

## 内 容 简 介

本书是生命科学核心课程系列教材之一。全书共分9章,主要包括酶与酶工程基础、酶的生产、酶的提取与分离纯化、酶与细胞的固定化、化学酶工程、生物酶工程、酶的非水相催化、酶反应器与酶传感器、酶的应用。本书力求采用通俗的语言、灵活的方式将学科逸闻趣事、最新进展纳入编写体系,使教材内容在具备科学性、系统性和趣味性的同时,兼具简明性、先进性和前沿性。

本书可作为高等院校生物技术、生物工程、生物制药、生物科学、食品科学及农、林、医相关专业的本科生教材,也可作为高等院校非生物专业学生素质教育的教材,并可供相关专业教师、科研人员、研究生、工程技术人员及其他有兴趣者阅读参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

---

酶工程/聂国兴主编. —北京:科学出版社, 2013

生命科学核心课程系列教材

ISBN 978-7-03-037503-2

I. ①酶… II. ①聂… 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(2013)第103370号

---

责任编辑:席 慧/ 责任校对:张小霞

责任印制:阎 磊 / 封面设计:迷底书装

**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>

**新科印刷有限公司**印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2013年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013年6月第一次印刷 印张:22

字数:561 000

定价:45.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

## 《酶工程》编委会名单

主 编 聂国兴

副主编 明 红 李文均

编写人员 (以姓氏笔画为序)

王 丽 王俊丽 刘 凯

李文均 李东霄 吴艳丽

明 红 聂国兴 曹香林

程彦伟

# 前 言

酶工程与微生物学、生物化学、细胞生物学、化学和工程学等学科有着密切的联系，是一门理论和实践紧密结合的应用性学科。“酶工程”这一术语出现在 20 世纪 60 年代末，1971 年召开了第一次国际酶工程会议。20 世纪 70 年代以后，伴随着固定化酶及其相关技术的产生，酶工程真正登上了历史舞台。之后，作为生物技术产业的重要成员，伴随着基因工程、发酵工程、细胞工程等现代生物技术的兴起，酶工程得以迅速发展。

酶工程是高等院校生物技术、生物工程、生物制药、生物科学、食品科学等专业的主干课程，旨在传授酶学基本理论、基本知识和基本技能，培养具有良好的科学素养、较强的创新意识和实践能力的酶工程专业人才。和其他教材一样，酶工程教材琳琅满目，编写体系各具特色，阅读对象各不相同。本书编者召开多次编委会议，研讨同类教材的内容和编写体系，在总结多年教学和科研实践的基础上，广泛收集国内外文献资料，在前人大量工作的基础上编写了本教材。本书力求采用通俗的语言、灵活的方式将学科逸闻趣事、最新进展纳入编写体系，使教材内容在具备科学性、系统性和趣味性的同时，兼具简明性、先进性和前沿性。

本书共分 9 章，由河南师范大学、云南大学、新乡医学院、河南科技学院、洛阳师范学院、商丘师范学院、许昌职业技术学院等院校的老师 and 科研工作者共同编写。采用的是集体讨论、分别执笔的方式。主编负责全书内容的规划和统稿。

值本书付梓之际，谨向关心、支持我们工作的专家、同行及科学出版社的编辑们表示衷心的感谢，并向编写过程中所选用资料的原作（著）者表示诚挚的敬意。

酶学研究成果日新月异，酶工程新技术如雨后春笋。鉴于编者水平有限，书中难免存在错漏或不当之处，恳请广大师生、同行和读者不吝批评指正，以便日后修订完善。

编 者

2013 年 4 月

# 目 录

## 前言

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 第 1 章 酶与酶工程基础         | 1  |
| 1.1 酶的基本概念与本质         | 1  |
| 1.1.1 酶的基本概念          | 1  |
| 1.1.2 酶的本质——酶是生物催化剂   | 1  |
| 1.2 酶的发展历史            | 2  |
| 1.2.1 酶的发现与发展         | 2  |
| 1.2.2 酶工程研究的现状与展望     | 5  |
| 1.3 酶的分类与命名           | 9  |
| 1.3.1 国际系统分类法和国际系统命名法 | 9  |
| 1.3.2 酶的多形性与同工酶       | 11 |
| 1.3.3 核酶              | 13 |
| 1.4 酶的催化特点及影响因素       | 13 |
| 1.4.1 酶的催化特点          | 13 |
| 1.4.2 酶的活性部位          | 14 |
| 1.4.3 酶的催化机理          | 15 |
| 1.4.4 影响酶催化作用的因素      | 17 |
| 1.5 酶的活力测定            | 19 |
| 1.5.1 酶活力单位           | 19 |
| 1.5.2 酶的比活力           | 19 |
| 1.5.3 酶活力的测定方法        | 19 |
| 1.6 酶反应动力学            | 27 |
| 1.6.1 单底物酶反应动力学(米氏方程) | 27 |
| 1.6.2 多底物反应的酶催化反应动力学  | 33 |
| 1.6.3 反应条件对酶催化反应速率的影响 | 34 |
| 复习题                   | 36 |
| 第 2 章 酶的生产            | 37 |
| 2.1 酶的生产方法            | 37 |
| 2.1.1 提取分离法           | 37 |
| 2.1.2 化学合成法           | 38 |
| 2.1.3 生物合成法           | 38 |
| 2.2 微生物酶的生产           | 39 |
| 2.2.1 产酶微生物的获取        | 40 |
| 2.2.2 微生物酶制剂的发酵       | 43 |
| 2.2.3 微生物产酶的调控机制      | 49 |

|              |                        |            |
|--------------|------------------------|------------|
| 2.2.4        | 酶发酵动力学 .....           | 53         |
| 2.2.5        | 提高酶产量的措施 .....         | 58         |
| 2.3          | 植物酶和动物酶的生产 .....       | 60         |
| 2.3.1        | 植物细胞培养产酶 .....         | 61         |
| 2.3.2        | 动物细胞培养产酶 .....         | 65         |
|              | 复习题 .....              | 69         |
| <b>第 3 章</b> | <b>酶的提取与分离纯化</b> ..... | <b>70</b>  |
| 3.1          | 酶的提取 .....             | 70         |
| 3.1.1        | 发酵液的固液分离 .....         | 70         |
| 3.1.2        | 细胞破碎 .....             | 70         |
| 3.1.3        | 酶的提取方法及影响因素 .....      | 72         |
| 3.2          | 酶的分离纯化策略 .....         | 73         |
| 3.2.1        | 分离纯化的基本原则 .....        | 73         |
| 3.2.2        | 分离纯化方法与策略 .....        | 73         |
| 3.2.3        | 纯度鉴定 .....             | 74         |
| 3.3          | 酶的分离纯化 .....           | 74         |
| 3.3.1        | 沉淀分离 .....             | 74         |
| 3.3.2        | 离心分离 .....             | 76         |
| 3.3.3        | 过滤与膜分离 .....           | 79         |
| 3.3.4        | 层析分离 .....             | 81         |
| 3.3.5        | 电泳分离 .....             | 88         |
| 3.3.6        | 萃取分离 .....             | 93         |
| 3.4          | 酶的浓缩、干燥与结晶 .....       | 95         |
| 3.4.1        | 酶的浓缩 .....             | 96         |
| 3.4.2        | 酶的干燥 .....             | 96         |
| 3.4.3        | 酶的结晶 .....             | 97         |
| 3.5          | 酶的剂型与保存 .....          | 98         |
| 3.5.1        | 酶的剂型 .....             | 98         |
| 3.5.2        | 酶的保存 .....             | 99         |
|              | 复习题 .....              | 99         |
| <b>第 4 章</b> | <b>酶与细胞的固定化</b> .....  | <b>100</b> |
| 4.1          | 酶的固定化 .....            | 101        |
| 4.1.1        | 固定化酶概述 .....           | 101        |
| 4.1.2        | 酶的固定化方法 .....          | 103        |
| 4.1.3        | 固定化酶的性质及反应动力学 .....    | 116        |
| 4.2          | 细胞的固定化 .....           | 123        |
| 4.2.1        | 固定化细胞概述 .....          | 123        |
| 4.2.2        | 细胞的固定化方法 .....         | 124        |
| 4.2.3        | 固定化细胞的特点与制备 .....      | 128        |
| 4.3          | 固定化技术的应用 .....         | 132        |
| 4.3.1        | 固定化酶的应用 .....          | 132        |

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| 4.3.2 固定化细胞的应用·····   | 139        |
| 复习题·····              | 143        |
| <b>第5章 化学酶工程·····</b> | <b>144</b> |
| 5.1 酶分子化学修饰·····      | 145        |
| 5.1.1 酶分子化学修饰的原理····· | 145        |
| 5.1.2 酶分子化学修饰的方法····· | 145        |
| 5.1.3 修饰酶的性质及特点·····  | 162        |
| 5.1.4 酶分子化学修饰的应用····· | 166        |
| 5.2 酶的人工模拟·····       | 167        |
| 5.2.1 模拟酶的概念·····     | 167        |
| 5.2.2 模拟酶的理论基础·····   | 168        |
| 5.2.3 模拟酶的分类·····     | 169        |
| 5.2.4 常见的模拟酶·····     | 169        |
| 5.3 抗体酶·····          | 178        |
| 5.3.1 抗体酶的概念·····     | 178        |
| 5.3.2 抗体酶的催化特性·····   | 178        |
| 5.3.3 抗体酶的催化机制·····   | 179        |
| 5.3.4 抗体酶的催化类型·····   | 179        |
| 5.3.5 抗体酶的制备方法·····   | 182        |
| 5.3.6 抗体酶的应用·····     | 187        |
| 5.4 印迹酶·····          | 194        |
| 5.4.1 分子印迹的原理·····    | 194        |
| 5.4.2 分子印迹技术·····     | 195        |
| 5.4.3 分子印迹酶·····      | 196        |
| 5.4.4 生物印迹酶·····      | 199        |
| 复习题·····              | 202        |
| <b>第6章 生物酶工程·····</b> | <b>203</b> |
| 6.1 酶基因的克隆与表达·····    | 203        |
| 6.1.1 酶基因的克隆·····     | 203        |
| 6.1.2 酶的异源表达·····     | 204        |
| 6.1.3 酶蛋白修饰·····      | 205        |
| 6.2 酶分子的定向进化·····     | 206        |
| 6.2.1 定向进化的基本原理·····  | 206        |
| 6.2.2 定向进化的历史·····    | 206        |
| 6.2.3 定向进化的策略·····    | 207        |
| 6.2.4 定向进化的应用·····    | 210        |
| 6.2.5 定向进化技术展望·····   | 210        |
| 6.3 核酶·····           | 211        |
| 6.3.1 核酶·····         | 211        |
| 6.3.2 核酶的催化类型·····    | 212        |
| 6.3.3 脱氧核酶·····       | 216        |
| 复习题·····              | 219        |



|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| <b>第 7 章 酶的非水相催化</b> .....     | 220 |
| 7.1 酶非水相催化的研究概况 .....          | 220 |
| 7.1.1 非水相催化反应的介质 .....         | 221 |
| 7.1.2 非水介质酶催化的反应类型 .....       | 222 |
| 7.2 有机介质中的酶促反应 .....           | 224 |
| 7.2.1 酶促反应的有机介质体系 .....        | 224 |
| 7.2.2 有机介质中酶的结构 .....          | 226 |
| 7.2.3 有机介质酶促反应的影响因素 .....      | 227 |
| 7.2.4 有机介质中酶的催化特性 .....        | 230 |
| 7.2.5 有机介质中酶催化反应的条件及其控制 .....  | 235 |
| 7.3 气相介质中的酶促反应 .....           | 237 |
| 7.4 超临界流体介质中的酶促反应 .....        | 238 |
| 7.4.1 超临界流体的选择 .....           | 238 |
| 7.4.2 酶的选择和固定化 .....           | 239 |
| 7.4.3 超临界流体介质酶催化的特点 .....      | 239 |
| 7.4.4 超临界流体介质中酶促反应条件及其控制 ..... | 239 |
| 7.5 离子液介质中的酶促反应 .....          | 240 |
| 7.5.1 离子液的种类和制备 .....          | 240 |
| 7.5.2 离子液的性质和选择 .....          | 241 |
| 7.5.3 离子液介质酶催化的特性 .....        | 241 |
| 7.5.4 离子液介质酶催化的反应体系及其应用 .....  | 242 |
| 7.6 酶非水相催化的应用 .....            | 243 |
| 7.6.1 手性化合物的制备 .....           | 244 |
| 7.6.2 功能高分子聚合物的合成 .....        | 245 |
| 7.6.3 食品添加剂的生产 .....           | 246 |
| 7.6.4 生物柴油的生产 .....            | 248 |
| 复习题 .....                      | 249 |
| <b>第 8 章 酶反应器与酶传感器</b> .....   | 250 |
| 8.1 酶反应器 .....                 | 250 |
| 8.1.1 酶反应器的类型与特点 .....         | 251 |
| 8.1.2 酶反应器的选择 .....            | 256 |
| 8.1.3 酶反应器的设计 .....            | 260 |
| 8.1.4 酶反应器的操作 .....            | 264 |
| 8.1.5 酶反应器的发展 .....            | 268 |
| 8.2 酶传感器 .....                 | 273 |
| 8.2.1 生物传感器 .....              | 273 |
| 8.2.2 酶传感器 .....               | 276 |
| 复习题 .....                      | 284 |
| <b>第 9 章 酶的应用</b> .....        | 285 |
| 9.1 酶在轻工业领域的应用 .....           | 285 |
| 9.1.1 饲料工业 .....               | 285 |
| 9.1.2 纺织品加工 .....              | 287 |

---

|        |                  |     |
|--------|------------------|-----|
| 9.1.3  | 造纸工业             | 288 |
| 9.1.4  | 制革工业             | 289 |
| 9.1.5  | 洗涤剂工业            | 290 |
| 9.2    | 酶在食品工业领域的应用      | 291 |
| 9.2.1  | 制糖工业             | 291 |
| 9.2.2  | 啤酒酿造             | 292 |
| 9.2.3  | 蛋白制品             | 294 |
| 9.2.4  | 水果与蔬菜加工          | 295 |
| 9.2.5  | 乳品工业             | 297 |
| 9.2.6  | 肉类加工             | 298 |
| 9.2.7  | 鱼类加工             | 299 |
| 9.2.8  | 蛋品加工             | 301 |
| 9.2.9  | 面包烘焙             | 301 |
| 9.2.10 | 食品保藏             | 303 |
| 9.2.11 | 食品检测             | 304 |
| 9.3    | 酶在医学中的应用         | 305 |
| 9.3.1  | 酶在疾病诊断方面的应用      | 305 |
| 9.3.2  | 酶在疾病治疗方面的应用      | 307 |
| 9.3.3  | 在药物生产方面的应用       | 312 |
| 9.3.4  | 现代酶工程技术在制药工作中的应用 | 315 |
| 9.3.5  | 酶在分析检测方面的应用      | 315 |
| 9.3.6  | 酶与生物医学工程         | 318 |
| 9.4    | 酶在环境保护领域的应用      | 320 |
| 9.4.1  | 水净化              | 321 |
| 9.4.2  | 石油和工业废油          | 322 |
| 9.4.3  | 白色污染             | 323 |
| 9.4.4  | 环境监测             | 324 |
| 9.5    | 酶在能源开发方面的应用      | 324 |
| 9.5.1  | 乙醇生产             | 325 |
| 9.5.2  | 生物柴油             | 326 |
| 9.5.3  | 氢气               | 327 |
| 9.5.4  | 生物电池             | 328 |
| 9.5.5  | 沼气的生产            | 329 |
| 9.6    | 酶在生物技术方面的应用      | 329 |
| 9.6.1  | 分子切割酶            | 329 |
| 9.6.2  | DNA 连接酶          | 333 |
|        | 复习题              | 336 |
|        | 主要参考文献           | 337 |

(3) 酶的化学本质是蛋白质, 表现为以下几点。

a. 酶是高分子亲水性胶体物质, 而且是两性电解质, 在电场中酶能像其他蛋白质一样泳动, 酶活性-pH 曲线和两性离子的解离曲线相似, 有确定的等电点 (pI);

b. 导致蛋白质变性的物理因素 (如加热、紫外线照射) 和化学因素 (如酸、碱、有机溶剂、重金属盐及其他蛋白质变性剂) 也往往能使酶失效;

c. 酶通常都能被蛋白水解酶水解而丧失活性, 水解生成的终产物也为氨基酸;

d. 对所有已经高度纯化, 而且达到均一程度的酶进行组成分析, 都表明它们都是单纯的蛋白质, 或者是蛋白质与小分子物质构成的复合物;

e. 酶分子具有一级结构、二级结构、三级结构和四级结构;

f. 根据核酸酶 (RNase) 的一级结构, 人们已从氨基酸开始, 人工合成了具有相同催化活性的蛋白质产物。

由此可见, 酶具有催化剂的共性, 是生物催化剂。只要有少量酶存在时即可大大加快反应的速率。酶能使反应迅速达到平衡, 但不改变反应的平衡点。有时酶也参与反应, 但在反应前后本身无变化, 因此可重复使用。

## 1.2 酶的发展历史

### 1.2.1 酶的发现与发展

#### 1.2.1.1 酶的发现

早在几千年前, 人类已开始利用微生物酶来制造食品和饮料。最早利用酶的人类活动是酿酒。据龙山遗址的考证, 我国早在 4000 年以前就掌握了酿酒技术; 夏禹时代, 酒的酿制较为流行。希腊、古埃及都有制造麦酒和葡萄酒的历史记载, 欧洲有葡萄酒是神制造的神话传说。

真正认识到酶的存在与作用, 是从科学家发现生物材料具有催化作用开始的。1684 年, Van Helment 发现了酿酒过程中有一种气体产生, 他把发酵中引起物质发生变化的因素称为酵素。他还指出, 在食物消化中也有酵素参加, 不同器官中存在着不同的酵素。但当时对酵素的性质一无所知。1783 年, 意大利科学家 Spallanzani 通过实验发现, 鹰的胃液能将肉类分解消化, 这可能是最早的酶催化实验。

1810 年, 药物学家 Planche 在植物的根中发现了一种物质, 能使愈创木酚氧化变蓝, 他还分离出了这种耐热且水溶性的物质。当时他未说明此物为酶, 后来有人把他看成是酶的最早发现者。随后在 1814 年, 俄国的 Kirchoff 研究了水解现象, 证实了酶有水解作用。他发现淀粉经稀酸加热水解为葡萄糖, 而某些谷物种子在发酵时也能生成还原糖。若把种子发芽时的水提取物加到泡在水里的谷物中, 也能发生相同的水解反应。很显然, 活的谷物种子的水解能力取决于包含在其中的水溶性物质, 这种水溶性物质脱离了生物体后仍能发挥作用。这是第一次比较详细地研究生物材料的催化作用, 从而发现了淀粉酶。

在以上研究的基础上, 1826 年 Mitscherlich 提出了两个概念: 一是活的种子或麦芽为生物酵素 (organized ferment, 指整个微生物细胞); 二是谷物种子提取液中的可溶性物质为非生物酵素 (unorganized ferment, 指从有机体得到的抽提物)。酵素作为酶的最早名称也由此开始, 目前有些国家如日本、德国, 仍然还把酶称为酵素。1833 年 Payen 和 Persoz

用酒精处理麦芽的水抽提物，沉淀得到一种热不稳定的活性物质，这种白色无定形粉末，能溶于水和稀酒精，但不溶于浓酒精，它可促使淀粉水解成可溶性的糖。他们把这种物质称为淀粉酶（diastase），这可以说是最早的酶制剂，他们采用了最简单的提纯方法，得到了一种无细胞酶制剂，并指出了它的催化特性和热不稳定性，开始涉及酶的一些本质性问题。1878年Kühne第一次提出“酶”（enzyme）的概念，这个词来自希腊文，意为“在酵母中”（in yeast）。1898年，Duelaux提出引用diastase的最后三个字母“ase”作为酶命名的词根。例如，oxide（氧化物）——oxidase（氧化酶），pectin（果胶）——pectinase（果胶酶）。

### 1.2.1.2 酶的发展

19世纪中叶是酶发展的一个重要时期，不仅新发现了一批来源于动物和植物的酶，并开始将酶应用于工业生产，同时开展了有关酶的性质研究。当时存在有两种观点：一种认为酶的作用和生命活动有关；另一种是把酶看成与化学催化剂完全相同的物质，二者之间没有明显界限。这就是酶的发展史上众所周知的德国农业化学家Liebig（坚持第二种观点）和法国微生物学家Pasteur（巴斯德，坚持第一种观点）之间围绕着发酵机制的争论，持续了数十年。第一种观点是由胃蛋白酶的发现者Schwann提出来的，Pasteur对该观点进行了实验验证。

艰苦的论战一直持续到巴斯德去世后的第三年（1897年）才由于Büchner兄弟的发现而终止。他们用石英砂磨碎酵母细胞，然后压榨出汁液来，制备出了不含酵母细胞的抽提液，用它能使蔗糖发酵，生成酒精和二氧化碳，从而阐明了发酵是酶的作用的化学本质。他们的成功为20世纪酶学和酶工程学的发展揭开了序幕。Büchner也因此获得了1907年诺贝尔化学奖。



#### 延伸阅读：Pasteur的验证实验

Pasteur把葡萄糖溶液封闭在无菌容器内，溶液不发生任何变化。当敞开口皿，让空气进入后，发酵就开始。Pasteur认为，这是微生物和空气一起进入葡萄糖溶液而引起的。于是他把发酵和某些特殊微生物的活动联系起来，将发酵中引起物质变化的酵素称为“有组织的酵素”；同时，把存在于肠、胃液中的酵素称为“无组织的酵素”；并指出酵母中存在一种使葡萄糖转化为酒精的物质，这对发酵工业的发展有重大贡献。但Pasteur对发酵过程的认识也有错误的地方：他认为只有活的酵母细胞才能进行发酵。

20世纪初，酶学得到了迅速发展。一方面发现了很多的酶；另一方面，在物理、化学技术发展的影响下，各种有关酶促反应原理学说的提出，对酶反应机理的研究是一个重大突破。1894年，Fisher提出了酶与底物作用的锁钥学说，用来解释酶作用的专一性。该学说认为，酶与底物分子或底物分子的一部分之间，在结构上有严格的互补关系。当底物契合到酶蛋白的活性中心时，很像一把钥匙插入一把锁中，因而使底物发生催化反应。

1903年，Henri提出了中间复合物学说。他在研究蔗糖酶水解蔗糖的反应时发现，酶与底物之间的作用是通过酶与底物生成复合物而进行的。1913年，Michaelis和Menten在前人工作的基础上，根据酶反应的中间复合物学说，采用“快速平衡”解析方法导出了描述酶催化反应动力学的著名方程——Michaelis-Menten方程（米氏方程）。1925年，Briggs和Haldane对米氏方程引入了更为普遍的假设——“拟稳态”假设，对米氏方程进行了重要修正，形成了我们现在所说的米氏方程。

1958年, Koshland提出了诱导契合学说。该学说认为, 酶分子的构象与底物原来并非恰当契合, 只有当底物分子与酶分子相碰撞时, 可诱导酶的构象发生变化, 从而能与底物结合形成中间络合物, 进而引起底物分子发生相应的化学变化。

上述这些科学家是酶动力学的开拓者, 这些学说为酶学研究奠定了理论基础。

然而, 人类对酶化学本质的认识也是曲折的。在20世纪20年代初, 德国著名化学家Willstätter认为, 酶不一定是蛋白质。由于受当时蛋白质检测水平的限制, 他将过氧化物酶纯化达12 000倍后, 高活性的酶制剂却检测不到蛋白质。由此他认为酶是由活动中心与胶质载体组成, 活动中心决定酶的催化能力及专一性, 胶质载体的作用在于保护活动中心, 蛋白质只是保护胶质载体的物质, 以此来解释酶纯度越高越不稳定的实验事实。由于他的权威地位, 这种观点当时较为流行。直到1926年, 美国化学家Sumner首次从刀豆提取液中分离得到脲酶结晶, 并证实这种结晶催化尿素水解, 产生二氧化碳和氨, 提出酶的化学本质是蛋白质的观点。但是一直到1936年, 由Northrop等得到了胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的结晶, 并用相似的方法证实了酶是一种蛋白质以后, Sumner的上述观点才普遍地被接受, 他因此而获得1947年的诺贝尔化学奖。1956年以来先后阐明了多种酶的一级结构和高级结构, 确定了酶的结构与功能关系。现已发现生物体内存在的酶有8000多种, 而且每年都有新酶发现。迄今为止, 数百种酶已纯化达到了均一纯度, 大约有200多种酶得到了结晶。由于蛋白质分析分离技术的飞速发展, 特别是在运用X射线衍射分析等方法后, 人们相继弄清了溶菌酶(129个氨基酸残基)、胰凝乳蛋白酶(245个氨基酸残基)、羧肽酶(307个氨基酸残基)、多元淀粉酶A(460个氨基酸残基)等的结构和作用机理。

随着分子生物学的发展, 酶的发现与研究得到了飞速发展。1960年, Jacob和Monod提出了操纵子学说, 阐明了酶生物合成的基本调节机制。1982年, Cech等发现四膜虫(*Tetrahymena*)细胞的26S rRNA前体具有自我剪接功能(self-splicing)。该RNA前体约有6400个核苷酸, 含有1个内含子(intron)和2个外显子(exon), 在成熟过程中, 通过自我催化作用, 将内含子切除, 使2个外显子连接成为成熟的RNA, 这个过程称为剪接。Cech将之称为自我剪接反应, 认为RNA也具有催化活性, 并将这种具有催化活性的RNA称为核酸类酶。1983年, Altman等研究发现, 核糖核酸酶P(RNase P)由RNA和蛋白质组成, 其RNA部分可在高浓度镁离子的存在条件下, 单独催化tRNA前体从5'端切除某些核苷酸片段, 成为成熟的tRNA, 显示出该RNA组分具有核糖核酸酶P的催化活性, 而该酶的蛋白质部分C5蛋白却没有酶活性。RNA具有生物催化活性这一发现, 改变了有关酶的概念, 被认为是最近20多年来生物科学领域最令人鼓舞的发现之一。为此, Cech和Altman共同获得1989年度的诺贝尔化学奖。

20多年来, 新发现的核酸类酶越来越多。目前可知, 核酸类酶具有自我剪接、自我剪切和催化分子间反应等多种功能, 酶作用底物包括有RNA、DNA、糖类、氨基酸酯等。研究表明, 核酸类酶具有完整的空间结构和活性中心, 有独特的催化机制, 具有很高的底物专一性, 其反应动力学也符合米氏方程的规律。可见, 核酸类酶具有生物催化剂的所有特性, 是一类由RNA组成的酶。由此引出“酶是具有生物催化功能的生物大分子(蛋白质或RNA)”的新概念。也就是说酶有两大类: 一类主要由蛋白质组成, 称为蛋白类酶(P酶); 另一类主要由核糖核酸组成, 称为核酸类酶(R酶)。

## 1.2.2 酶工程研究的现状与展望

酶工程 (enzyme engineering) 是将酶、细胞或细胞器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产的一门科学技术。酶工程的核心问题是如何廉价而又有效地生产出所需要的酶, 以及通过有效的化学或生物手段来改造酶, 使酶更为有效地发挥催化作用, 更好地服务于人类。

### 1.2.2.1 酶工程研究的现状

#### 1. 固定化酶与固定化酶反应器

在酶的应用过程中, 发现了酶存在的一些不足之处: 大多数酶不能耐受高温、强酸、强碱、有机溶剂, 稳定性较差; 酶通常在水溶液中与底物作用, 且只能作用一次; 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, 寻找解决方法, 以便更好地发挥酶的催化功能, 满足人们对酶使用的要求。其方法之一就是固定化酶的研究。

固定化酶是于 20 世纪 50 年代发展起来的一项新技术。最初是将水溶性酶与不溶性载体结合起来, 成为不溶于水的衍生物, 称为水不溶性酶和固相酶。后来研究发现, 将酶包埋在凝胶内或置于超滤装置内, 高分子底物与酶在超滤膜的一边, 反应产物可以透过膜而逸出, 在这种情况下, 酶仍然处于溶解状态, 但被固定在一个有限的空间内不能自由流动, 此时再用水不溶性酶或固相酶已不适于描述该类型的酶。1969 年, 固定化氨基酰化酶在工业生产中被正式应用, 成功开辟了固定化酶应用的新时代。从此学者们开始用“酶工程”这个名词来代表酶的生产 and 应用的科学技术领域。在 1971 年的第一届国际酶工程会议上, 正式采用固定化酶这一概念。人们也研制出了用于固定化酶生产的各种固定化酶反应器。固定化酶的工业应用和酶反应器的出现是酶工程发展的新标志。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  $\alpha$ -淀粉酶成功。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, 为工、农、医的发展提供了新方法和新工具。

#### 2. 动、植物细胞培养产酶

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如同微生物细胞一样, 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。近年来, 已报道的植物细胞发酵产物超过 100 种, 其中通过植物细胞培养生产的酶约 10 种; 动物细胞培养技术已在疫苗、激素、多肽药物、单克隆抗体、酶等人体组织、器官的功能性蛋白质生产中广泛应用。

#### 3. 酶的化学修饰

为了更好地发挥酶的催化功能, 研究者开始进行酶分子修饰研究, 即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。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。酶的固定化技术也属于酶分子修饰技术的一种。通过酶分子修饰, 可以提高酶活力, 增加酶的稳定性, 消除或降低酶的抗原性等。因此, 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为广阔的前景。

#### 4. 酶抑制剂的开发与使用

酶抑制剂的概念由日本科学家梅泽滨夫提出, 而 Umezawa 于 20 世纪 60 年代首次从微生物代谢产物中获得酶抑制剂。从传统的抗生素的研究开发转到从微生物的代谢产物中寻找具有酶抑制剂这一类具有生理活性物质的研究, 从而将抗生素的研究扩大到酶抑制剂的新领域, 拓展了新抗生素筛选的思路, 导致了許多新的筛选模型与方法的建立, 其贡献是划时代的, 开创了微生物药物的新纪元。有人将这个研究领域称为第三代的酶学研究。

#### 5. 基因工程酶

以基因手段改进酶的特性及设计新酶种是一个革命性导向, 这依赖于对自然酶精确的静态及动态结构与催化功能的深入认识, 也依赖于基因模板分子结构与蛋白质合成机制的大量了解, 但人类对这一关键问题的研究并未深化, 在实验研究设计中往往带来很大的盲目性、片面性和偶然性。因而必须首先对功能基因组充分了解, 阐明酶催化的分子机理、酶分子结构与构象变化的关系、结构与立体专一性、稳定性与变状态、体内多酶系统的定位及高效率催化等。对重要实用性的酶进行基因突变、重组、克隆与高效表达, 构建优良的工程菌, 以及酶的分子设计与定点突变化学修饰, 以改造酶的结构组分、活性、稳定性、特异性及催化功能等, 开辟酶的新用途, 这是目前生物技术发展的主流方向。开发工业用基因工程酶, 如美国 Procter&Gamble 公司用重组 DNA 技术发展高稳定性、高活力的脂肪酶应用于去污工业。丹麦 Novozymes 公司克隆  $\alpha$ -淀粉酶基因重组工程菌 LA297 使产酶速度提高 20 倍, 产酶量超过 4 倍, 活力达 1.3 万 Novo 单位/ml。此外, 还构建了耐热的  $\beta$ -淀粉酶、脂肪酶工程菌用于工业生产。

我国已开展的研究有适合于乙醇发酵的  $\alpha$ -淀粉酶基因工程菌, 将  $\alpha$ -淀粉酶基因克隆到枯草杆菌中得到表达。此外, 用 DNA 重组技术使葡萄糖异构酶在 *E. coli* 中表达, 热稳定性提高到 50% 以上, 在细胞中酶蛋白含量为 40%。我国还开展了多聚糖酶、青霉素酰化酶、尿激酶原(单链尿激酶)、葡激酶、链激酶、超氧化物歧化酶、凝乳酶、聚酮合成酶、色氨酸合成酶、硫霉素生物合成酶、溶菌酶等的研究工作。在 21 世纪, 我们应认真选择一些具有重大应用前景、酶源少又有特殊用途的酶进行基因改良, 使其在环境治理、药物合成等方面发挥作用。

从 20 世纪 80 年代以后, 基因工程被广泛应用于产酶菌种的改良, 现在酶制剂工业已经成为国民经济的一门重要的高科技产业。各国均十分重视酶制剂的发展, 目前国际上知名的酶制剂公司主要有丹麦的 Novozymes 公司、美国的 Genencor 公司、德国的 AB 酶制剂公司和比利时的 BELDEM 公司等。

#### 6. 酶的蛋白质工程构建

用定点突变、化学修饰技术改进工业、医药、环境用酶的催化特性与功能是不容忽视的研究领域, 已引起人们的极大关注。例如, Liu 等 (2006) 研究表明, GH11 家族木聚糖酶热稳定性与肽链的顺序与组成有关, 在 Ser/Thr 表面上引入精氨酸, 热稳定性显著升高。Georis 等 (2000) 建立了木聚糖酶 Xyl1 和 TfxA 的分子模型, 并将 TfxA 中的嗜热结构用定点突变法引入 Xyl1 酶中, 以提高其最适反应温度和热稳定性。将 Xyl1 第 11 位的苏氨酸

残基突变为酪氨酸 (T11Y), 结果突变酶的最适温度由原来的 60℃ 提高到 70℃, 57℃ 条件下, 酶的稳定性比原来提高了 6 倍。Turunen 等 (2001) 报道将里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 产木聚糖酶 II 一个  $\alpha$  螺旋中 110 位的丝氨酸和 154 位的天冬氨酸分别突变为半胱氨酸, 从而在 110 位和 154 位之间建立了一个二硫键, 结果 65℃ 时木聚糖酶活力的半衰期从不到 1min 增加到 14min。近年来, 我国开展了医用蛋白质工程与酶工程研究, 主要研究对象包括: 胰岛素、尿激酶原、天花粉蛋白、胰蛋白酶及抑制剂、枯草杆菌蛋白酶、凝乳酶、葡萄糖异构酶及金属硫蛋白。

定点突变技术只对某些氨基酸进行替换、删除、添加或修饰, 但并不能够从根本上动摇酶的高级结构, 这种位点突变对酶功能的改造存在一定局限性。以基因组为出发点, 进行基因位点突变并通过多代遗传后, 将会构建出非天然的全新设计功能酶和蛋白质。目前分子生物学技术已经发展到可对整个生物体基因组进行测序与分析, 如中国深圳的华大基因先后完成了国际人类基因组计划“中国部分”(1%)、国际人类单体型图计划(10%)、水稻基因组计划、家蚕基因组计划、家鸡基因组计划、抗 SARS 研究、炎黄一号等多项具有国际先进水平的科研工作, 已经完成多个微生物种类的基因组测定, 这对我们通过对全基因组筛选或构建出具有新功能的酶类提供了重要的基础。当然也可以用 PCR 扩增进行任意无序突变、重组筛选和传代获得全新结构的功能酶, 如在非水溶剂中催化的工程酶, 这是 21 世纪人类对自然的艰巨挑战。

### 7. 新酶构建——模拟酶

早在 20 世纪中叶, 人们就已认识到研究和模拟生物体系是开辟新技术的途径之一, 通过对生物体系的结构与功能的研究, 为设计和建造新的技术提供新思想、新原理、新方法和新途径。酶是自然界经过长期进化而产生的生物催化剂, 它能在温和条件下高效、专一地催化某些化学反应。设计一种像酶那样的高效催化剂是科学家们一直追求的目标, 而对酶功能的模拟是当今自然科学领域中的前沿课题之一。

酶是高效的催化剂, 它的应用日趋广泛。但是, 酶对热敏感、稳定性差和来源有限等缺点限制了它的规模开发和利用。于是, 新的催化剂——模拟酶就逐渐被研制和开发了。模拟酶又称人工酶或酶模型, 它是生物有机化学的一个分支。由于天然酶的种类繁多, 模拟的途径、方法、原理和目的不同, 对模拟酶至今没有一个公认的定义。一般来说, 它的研究就是吸收酶中那些起主导作用的因素, 利用有机化学、生物化学等方法设计和合成一些较天然酶简单的非蛋白质分子或蛋白质分子, 以这些分子作为模型来模拟酶对其作用底物的结合和催化过程, 也就是说, 模拟酶是在分子水平上模拟酶活性部位的形状、大小及其微环境等结构特征, 以及酶的作用机理和立体化学等特性的一门科学。可见, 模拟酶是从分子水平上模拟生物功能的一门边缘科学。模拟酶的研制, 一是它具有更为广阔的应用前景, 二是模拟酶的化学模型有助于对酶的作用机制的研究。研究发现, 在生物体内, 模拟酶的研究使酶催化的许多反应得到详细的解释。

20 世纪 70 年代以来, 由于蛋白质结晶学、X 射线衍射技术及光谱技术的发展, 人们对许多酶的结构有了更为深入的了解, 可在分子水平上解释酶的结构及其作用机理。动力学方法的发展及对酶的活性中心、酶抑制剂复合物和催化反应过渡态等结构的描述促进了酶作用机制的研究进展, 从而利于人工模拟酶的发展。目前, 较为理想的小分子仿酶体系有环糊精、冠醚、环番、环芳烃和卟啉等大环化合物等; 大分子仿酶体系有聚合物酶模型、分子印



迹酶模型和胶束酶模型等。此外，科学家们利用化学修饰、基因突变等手段改造天然酶，产生了具有新的催化活性的半合成人工酶。而抗体酶和印迹酶的出现及快速发展为酶的人工模拟又开辟了一条新的道路。

### 1.2.2.2 酶工程研究的几个热点

酶工程是生物技术的一个重要组成部分。酶工程的应用范围已遍及工业、医药、化学分析、环境保护、能源开发和生命科学理论研究等各个方面。近年来，美国、欧盟国家和日本，在酶工程研究和应用方面发展非常迅速，继续在酶工程领域居于领先地位。下面简要介绍国际上酶工程的几个研究热点。

#### 1. 非水介质中酶的催化

在无水或含微水 ( $<1\%$ ) 的有机溶剂中，许多酶不仅能催化特殊反应，而且反应稳定性会显著提高。由于酶的反应介质的改变，使酶具备了不少水相中所不具备的特点，主要包括利于疏水性底物的反应、提高酶的热稳定性、易于实现固定化和产物回收、避免产物和底物的抑制作用及微生物污染等。目前已证实在非水介质中酶可催化 C—O 和 C—N 键的形成、氧化反应、异构化反应等。由于有机相酶催化反应的诸多特点，故受到研究人员的广泛关注。目前已有不少比较成熟的工业应用，如脂肪酶/酯酶用于生产精细化工产品，有机相中用酶法拆分生产手性药物等。

#### 2. 组合生物催化

组合生物催化 (combinatorial biocatalysis) 是酶催化、化学催化和微生物转化在组合化学中的应用，即通过生物催化技术对先导化合物的生物转化，从而建立起高质量的化合物文库，然后从文库中筛选出活性更高或性能更佳的化合物。组合生物催化技术的应用大大加快了产生新化合物的速度，经过良好设计的组合化学文库还可以大大提高化合物结构的多样性。

#### 3. 酶法拆分

手性化合物因分子内含有一个或多个不对称碳原子而具有不同的性质，有时同一药物的两个对映体的药效和毒性甚至可相差几十到几百倍。鉴于此，美国 FDA 申明：外消旋药物不得作为单一化合物对待，新药上市要尽可能以单一手性异构体形式出售，消旋药物申请时需要同时提供两个对映体的全部数据。这一政策极大地促进了手性药物的发展。生物催化最重要的特性是专一性 (包括立体专一性) 强，因此酶工程将在手性药物合成和手性拆分方面大有用武之地。

#### 4. 寻找酶生物转化合成新途径

酶或微生物细胞作为催化剂用于手性药物及有机物的合成工业已初见成效。酶合成的专一性及选择性较化学合成具有明显优势，是有机合成化学领域的一个重大进展。酶或微生物催化的立体异构性，如羟化、环氧化、水解、对映体拆分、药物中间体合成，其中一些反应用化学法是难以进行的。已实现工业化或准工业化的酶法或微生物法合成包括：类固醇合成、类萜合成、生物碱合成、半合成抗生素合成、核苷酸类合成、胺及日用化学品合成等。例如，高特异性脱氢酶用于酮对映体的选择性还原；氯过氧化物酶用于合成手性过氧化物及醇等。此外，酶法修饰的蛋白质、多肽、脂蛋白、多糖、糖酯类及多核苷酸等药用生物大分子具有很高的医疗保健价值，酶法合成亦已渗透到非天然物质的合成与转化，应用于化学和电子工业。