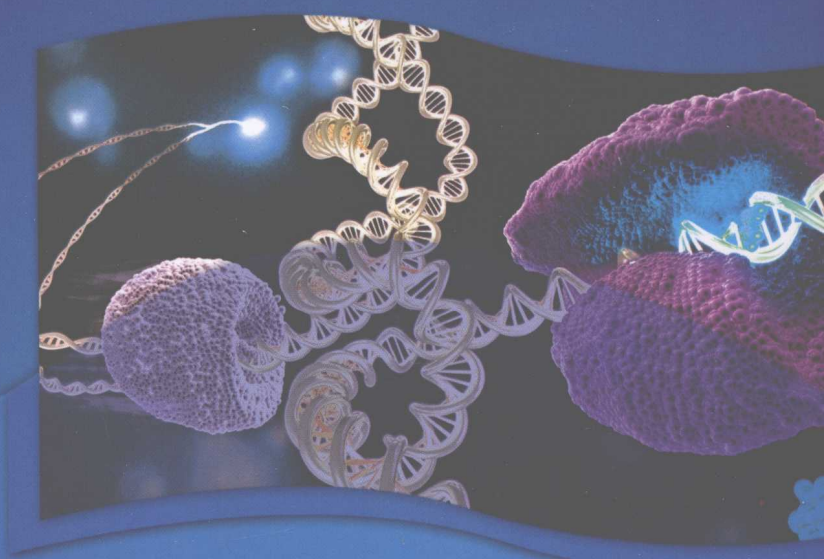




普通高等教育“十一五”规划教材

酶工程

陈守文 主编



科学出版社
www.sciencep.com

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,全面系统地介绍酶的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。全书共十一章,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、核酶、非水相酶催化、酶反应器和酶传感器、酶抑制剂以及酶的应用。

本书可作为高等农林院校研究生及高年级本科生和其他院校相关专业学生的教材,也可供有关专业教师、中学生物教师、科学技术工作者及工程技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

酶工程/陈守文主编. —北京:科学出版社,2008
(普通高等教育“十一五”规划教材)
ISBN 978-7-03-020813-2

I. 酶… II. 陈… 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 016299 号

责任编辑:甄文全 / 责任校对:宋玲玲
责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

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>

北京市农林印务有限公司 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

2008 年 2 月第一次印刷 印张:17 1/4

印数:1—5 000 字数:450 000

定价:28.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈农林〉)

《酶工程》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 (以姓氏拼音排序)

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)

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，同时于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）。第二章是酶的发酵工程，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；第三章是酶的分离工程，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）。第四章是固定化酶固定化细胞，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；第五章是化学酶工程，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。第六章是生物酶工程，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。第七章是核酶，介绍核酶的种类及应用。第八章是非水相酶催化，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）。第九章是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

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室

2007年12月于武汉

目 录

前言

第一章 酶工程基础	1
第一节 酶工程概述	1
一、酶及酶工程研究的意义	1
二、酶的研究简史	2
第二节 酶的催化特点以及影响因素	6
一、酶的催化特点	6
二、影响酶催化作用的因素	7
第三节 酶的活力测定	9
一、酶活力单位	9
二、酶的比活力	10
三、酶的转换数和催化周期	10
四、酶活力的测定方法	10
第四节 酶反应动力学	12
一、米氏方程	12
二、米氏方程的意义	12
三、动力学常数 K_m 和 V_m 的求取	13
思考题	14
补充读物	14
第二章 酶的发酵工程	16
第一节 酶生物合成的调节机制	16
一、原核生物中酶生物合成的调节	16
二、真核生物中酶生物合成的调节	20
三、酶生物合成调节作用机理的实际应用	21
第二节 酶的发酵技术	22
一、酶的生产菌种	22
二、培养基和培养条件对产酶的影响与调节	26
三、发酵方法	30
四、提高产酶的措施	32
第三节 酶发酵动力学	33
一、酶生物合成的模式	33
二、细胞生长动力学	36
三、产酶动力学	37
思考题	38

补充读物	38
第三章 酶的分离工程	39
第一节 预处理	39
一、发酵液的预处理	39
二、细胞破碎	40
第二节 酶的提取	41
一、酶的提取方法	42
二、影响酶提取的主要因素	42
第三节 酶的分离纯化	43
一、离心分离	44
二、沉淀分离	45
三、过滤与膜分离	48
四、萃取分离	49
五、层析分离	52
六、电泳分离	61
第四节 酶的浓缩、干燥与结晶	63
一、酶的浓缩	63
二、酶的干燥	65
三、酶的结晶	66
思考题	67
补充读物	68
第四章 固定化酶与固定化细胞	69
第一节 酶的固定化	70
一、酶的固定化方法	70
二、固定化酶的评价	84
三、固定化酶的性质和影响因素	85
第二节 细胞的固定化	89
第三节 辅酶的固定化	94
思考题	97
补充读物	98
第五章 化学酶工程	100
第一节 酶分子的化学修饰	100
一、概述	100
二、酶化学修饰的原理、方法及修饰剂	101
第二节 模拟酶	116
一、概述	116
二、模拟酶的理论基础	117
三、模拟酶的分类	118
四、环糊精模拟酶	119
五、大环聚醚及其模拟酶	122

六、杯芳烃及其模拟酶	124
七、金属卟啉及其模拟酶	125
八、肽酶	125
第三节 抗体酶	126
一、抗体酶的催化特性	126
二、抗体酶的催化作用机制	128
三、抗体酶的催化反应类型	128
四、抗体酶的制备方法	131
五、抗体酶的应用前景	134
第四节 印迹酶	134
一、分子印迹的原理	134
二、分子印迹技术的分类	135
三、分子印迹聚合物的制备	137
四、分子印迹酶	138
思考题	139
补充读物	140
第六章 生物酶工程	141
第一节 酶基因的克隆和表达	141
一、酶基因的克隆	141
二、酶的异源表达	144
第二节 酶分子的改造	146
一、酶的定点突变	146
二、酶分子定向进化	148
第三节 融合酶	155
一、融合酶简介	155
二、融合酶的应用	156
思考题	160
补充读物	160
第七章 核酶	162
第一节 核酶	162
一、剪接型核酶	163
二、剪切型核酶	166
第二节 脱氧核酶	170
一、具有水解酶活性的脱氧核酶	171
二、具有 <i>N</i> -糖基化酶活性的脱氧核酶	171
三、具有连接酶活性的脱氧核酶	171
四、具有其他酶活性的脱氧核酶	172
第三节 核酶的应用	173
一、抗 HIV 感染	173
二、抗肝炎病毒感染	174

三、肿瘤治疗	174
四、其他	175
思考题	175
补充读物	176
第八章 非水相酶催化	178
第一节 非水酶学概述	178
一、酶催化反应的介质	178
二、非水介质酶催化反应的特点	179
第二节 有机介质中的酶促反应	180
一、酶促反应的有机介质体系	180
二、有机介质中酶促反应的影响因素	182
第三节 有机介质中酶的性质	189
一、有机介质体系中酶活性的变化	189
二、酶的稳定性的变化	190
三、pH 记忆和分子印记	190
四、底物专一性的改变	191
五、反应平衡方向的移动	193
六、酶促动力学变化	194
第四节 气相和超临界介质的酶促反应和应用	194
一、气相介质中酶促反应的特点和应用	194
二、超临界介质中酶促反应的特点和应用	195
思考题	196
补充读物	197
第九章 酶反应器和酶传感器	199
第一节 酶反应器	199
一、酶反应器的类型与特点	199
二、酶反应器的选型与设计	202
三、酶反应器的操作	206
第二节 酶传感器	208
一、生物传感器概述	208
二、酶传感器	210
思考题	215
补充读物	216
第十章 酶抑制剂	217
第一节 酶的抑制剂及抑制作用	217
一、酶的抑制作用及酶抑制剂的概念	217
二、酶的抑制作用的类型及特点	218
第二节 酶抑制剂的设计与筛选	219
一、酶抑制剂的设计方法	219
二、酶抑制剂的筛选	220

三、酶抑制剂的设计实例	220
第三节 酶抑制剂的应用	222
一、在医学领域中的应用	222
二、在农业及畜牧业领域中的应用	223
思考题	225
补充读物	226
第十一章 酶的应用	227
第一节 酶在医药领域中的应用	227
一、在分析检测及疾病诊断方面的应用	227
二、在疾病治疗方面的应用	230
三、在药物生产方面的应用	231
第二节 酶在农业领域中的应用	231
一、在农产品的保鲜与加工方面的应用	231
二、在农产品质量检测方面的应用	232
三、在饲料生产方面的应用	233
四、在抗性作物新品种培育中的应用	237
第三节 酶在轻化工领域中的应用	238
一、在轻化原料处理方面的应用	238
二、在轻化工产品生产方面的应用	240
三、在加酶日用工业产品方面的应用	242
第四节 酶在食品领域中的应用	243
一、在食品保鲜方面的应用	244
二、在食品加工与生产方面的应用	245
三、在食品添加剂生产方面的应用	251
四、在食品质量检测方面的应用	252
第五节 酶在环保及能源开发领域中的应用	253
一、在环境监测与治理方面的应用	253
二、在能源开发领域中的应用	255
三、在可生物降解高分子材料开发方面的应用	256
第六节 酶在生物技术研究领域中的应用	257
一、酶在除去细胞壁方面的应用	257
二、酶在大分子切割方面的应用	257
三、酶在分子拼接方面的应用	258
思考题	259
补充读物	259
主要参考文献	261

第一章 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、酶活力测定方法以及酶反应动力学。

第一节 酶工程概述

一、酶及酶工程研究的意义

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，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，直至 20 世纪 80 年代初期，已发现的酶逾 3000 种，这些酶都是由生物体产生的具有催化功能的蛋白质。近 20 年来，随着核酶、抗体酶、模拟酶以及印迹酶的出现，扩展了人们对酶的认识。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、遗传疾病以及生长发育的关系，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明，其中两大发明就直接与酶相关，即限制性核酸内切酶、DNA 连接酶，逆转录酶，以及 *Taq* DNA 聚合酶的发现。1985 年美国 PE-Cetus 公司人类遗传研究室的 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 反应广泛运用于生命科学各个领域。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。现代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、酶工程以及发酵工程，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，固定化酶与固定化细胞，化学酶工程，生物酶工程，酶反应器及传感器，酶的非水相催化，酶抑制剂以及酶的应用。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。酶工程的研究涉及生物化学、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、分析化学以及仿生学等多学科。酶工程的应用遍及人类社会的各个领域，日益受到重视。

二、酶的研究简史

(一) 酶的原始利用

中国古代对酶の利用可以追溯到 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, 其原理主要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, 那时所用的漆是漆树的树汁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。

(二) 酶的发现和发展

科学研究中的很多发现表面上看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 Chemie et de Physique* 期刊上, Payen 和 Persoz 描述了从大麦的麦芽中分离淀粉酶的过程, 并将之命名为淀粉酶。和麦芽一样, 该产物将糊化淀粉转变成糖——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一个能产生震荡的分解物质: 蔗糖原子经过重排, 变为酒精和二氧化碳。另一方面, 酒精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理的分歧, 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。后来德国化学家巴克纳兄弟 (Eduard Buchner 和 Hans Buchner) 于 1897 年发现酵母细胞提取物可以使酒精发酵, 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酒精和二氧化碳。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。巴克纳由此获得 1907 年的诺贝尔奖, 这是酶学研究史上的第一次诺贝尔奖。酶的命名是 1876 年库尼 (Kühne) 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。可见, 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, 即测定氮的含量的方法。自蛋白质被确定是由含氮的氨基酸组成的高分子物质后,

这一方法是定量酶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钥匙-锁理论，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）。Koshland认为“钥匙与锁”理论在真实的生命体系中会导致灾难性的副反应，1953年提出了“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。1961年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）在巴黎得出结论：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-底物复合物（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（图1-1）。1925年，布立格兹（Briggs）和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也是有效的，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）做出了开创性的工作。1926年，他从刀豆中分离并结晶了脲酶，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Lindstroem-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）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。1965年，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及推定它对基质的反应机理。而Kendrew和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。有关蛋白质酶结构的近期研究成果获得2002年的诺贝尔化学奖，得主是美国科学家芬恩（Fenn），日本科学家田中耕一（Koichi Tanaka）以及瑞士科学家维特里希（Kurt Wuthrich）。主要成果是“发明了对生物大分子进行确认和结构分析的方法”，“对生物大分子的质谱分析法”，以及“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'末端切除某些核苷酸片段，形成成熟的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观念，拓展了对酶的定义。为此，切克和阿尔特曼也获得了1989年的诺贝尔奖。1995年，Cue-

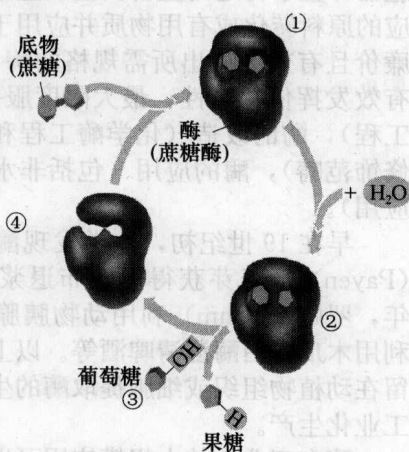


图 1-1 蔗糖酶的催化过程

①底物与酶结合形成酶底物复合物；②底物转变成产物；③产物释放；④酶暴露活性中心用于接纳另一个底物

noud 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,为生命起源提供了新的视角。

(三) 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生产出所需规格的酶,以及如何有效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(包括非水相酶学、酶反应器、酶传感器、酶抑制剂以及酶的应用)。

早在 19 世纪初,人类发现酶之后,就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等。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动植物组织或细胞提取酶的生产工艺。这种生产方式原料有限,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。霉菌以蒸过的稻米为培养基进行固体发酵,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 酒曲即高效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发酵生产的新局面。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)和莫诺德(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,为指导工艺优化酶的发酵生产奠定理论基础。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,传统的提取工艺主要采用破碎动植物器官和组织,浸提以及沉淀干燥获得粗酶。酶的规模化大生产之后,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、细分级分离技术及以制剂化成为酶制剂工业的常规技术手段。目前,分子生物学技术、免疫学以及材料学科的发展,新分离手段层出不穷,对提高酶蛋白分离效率、收得率以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 3000 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原因的限制：①大多数酶脱离其生理环境后极不稳定，而酶在生产和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。

化学酶工程主要有化学修饰酶、固定化酶和固定化细胞以及化学人工酶。通过化学方法改造酶蛋白一级结构，提高酶的稳定性、活力以及降低抗原性等。酶的固定化作为化学修饰的重要内容，其系统化研究则是从 20 世纪 50 年代开始的。1953 年，德国科学家首先将聚氨基苯乙烯树脂重氮化，然后将淀粉酶、胃蛋白酶等与这种载体共价结合，制成了固定化酶。1969 年，日本科学家千畑一郎，首先在工业上应用固定化氨基酰化酶拆分 D,L-酰化氨基酸，生产 L-氨基酸。同年，各国科学家开始使用“酶工程”这一名称来代表生产和使用酶制剂这一新兴的科学技术领域。1971 年，第一次国际酶工程学术会议在美国召开，会议的主题就是固定化酶的研制和应用。1967 年，Uptdike 对葡萄糖酶电极的成功开发标志着固定化酶产业进一步向分析化学领域的拓展。70 年代后期，酶工程领域又出现了固定化细胞（固定化活细胞或固定化增殖细胞）技术，并推动微生物传感器的发展。酶蛋白固定化的同时，载体造成了对酶空间构象的改变和活性的损失。近年来，酶的定向固定化技术可使酶蛋白能够以有序方式附着在载体的表面，酶活性的损失降低到最小程度。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、亲和层析以及蛋白质结构和功能的研究中。

天然酶作为化学反应催化剂，由于它的蛋白质特性使其容易受到多种物理、化学因素的影响而失活。根据酶作用原理，用人工方法合成的具有活性中心和催化作用的非蛋白质结构的化合物即模拟酶，它们一般都具高效和高适应性的特点，在结构上比天然酶简单，同时由于不含氨基酸，其热稳定性与 pH 稳定性都大大优于天然酶。它是 20 世纪 60 年代发展起来的一个新的研究领域，是仿生高分子的一个重要的内容。按照模拟酶的属性可将其分为：①主-客体酶模型，包括环糊精、冠醚、穴醚、杂环大环化合物和卟啉类等；②分子印迹酶；③抗体酶；④胶束酶模型；⑤肽酶；⑥半合成酶。其中，1986 年 Lerner 和 Schultz 首次制备出催化酯水解反应的单克隆抗体——抗体酶，它具有较高程度上的底物专一性、立体专一性和催化效率高等特点。抗体酶的应用前景非常诱人，抗体酶已经用于酶作用机理的研究，手性药物的合成和拆分，抗癌药物的制备。它将是本世纪新酶研究开发的重要领域。

1973 年，美国科恩发明了 DNA 重组技术，从此拉开了基因工程时代的大幕。科恩本人也以 DNA 重组技术发明人的身份向美国专利局申报了世界上第一个基因工程的技术专利。DNA 重组技术的逐步成熟和发展对生命科学的许多领域产生了革命性的影响，成为 20 世纪以来发展最快的学科之一。DNA 重组技术的发展，使人们能通过克隆获得许多种天然的酶基因，并在异源微生物受体中高效表达。自 1984 年诺维信公司成功开发了第一个用于淀粉工业的由基因修饰微生物产生的酶——生麦芽糖淀粉酶（商品名 Maltogenase）以来，该公司现在生产的酶制剂产品的 80% 以上已为基因工程产品，而且酶蛋白异源高效表达技术已普及成为国际酶制剂工业常规技术手段。随着 DNA 重组技术的发展，改造天然酶蛋白是商业化开发的重要措施，包括酶分子的理性设计和酶分子的非理性设计。自 1995 年诺维信科学家利用计算机模拟将酶分子三维结构和 DNA 序列结合起来，利用定点突变技术成功获得抗漂白剂的碱性蛋白酶（商品名 Everlase），酶蛋白的体外进化技术已能够在短时间内完成酶蛋白几百万年的进化历程，同时融合蛋白技术创造了自然界不存在的新酶品种。近年来国际上又提出蛋白质全新设计（protein de novo design）的概念，这一新技术可以用于组建自然界原先并不存在的、结构和功能全新的酶蛋白。

长期以来人们一直认为酶作为生物催化剂,在体外只能在水溶液环境才保持活性,而有机溶剂中酶则往往发生变性或失活。直到1966年,普莱斯(Price)等发现凝乳胰蛋白酶与黄嘌呤氧化酶可在有机溶剂中保持催化活性。克立巴诺夫(Klibanov)等(1977)、马蒂内克(Martinek)等(1978)、库尔(Kuhl)等(1980)分别在有机溶剂体系开展酶的催化工作。1984年,克立巴诺夫在*Science*上发表了关于非水介质脂肪酶催化行为和热稳定性的研究报告,引起了酶学研究领域的广泛重视,酶学领域迅速形成了一个全新的分支——非水酶学。近些年非水酶学的发展异常迅速,已在多肽合成、聚合物合成、药物合成以及立体异构体拆分等领域显示出蓬勃的生命力。

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、农业、工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、选型和操作,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。

酶工程的终极目标是为了充分发挥酶在人类生活中的催化潜能。当前酶的应用已渗透到人类生活的各个领域,包括医药领域、轻化工业、农业、能源环保业等。其中,20世纪60年代初期,用双酶水解法工业化生产葡萄糖,标志着酶制剂已扛起了挑战化学催化剂的大旗。60年代中期,细菌碱性蛋白酶规模化投放市场,宣告了酶制剂应用产业化的重大突破。此后,现代生物技术的出现,带动酶制剂应用产业的蓬勃发展。可以相信,将来化学家可以用化学的方法设计出各种性能优异的人工模拟酶,生物学家和生物工程专家采用生物学方法体外设计所需性状的并可以廉价发酵生产的生物酶,各行各业的酶产业应用工程师则挥舞着神奇的“魔术棍”,点石成金,创造美好的生活。

第二节 酶的催化特点以及影响因素

一、酶的催化特点

酶作为生物催化剂,其作用与一般的无机催化剂或有机催化剂相比,具有显著的特点。

(1) 极高的催化效率。酶可催化正向及逆向反应,在37℃或更低的温度下,酶的催化速率是没有催化剂催化的化学反应速率的 $10^{12} \sim 10^{20}$ 倍,比一般催化剂催化反应的速率高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍,如脲酶水解尿素的反应效率比酸水解尿素高 7×10^{12} 倍左右。任何

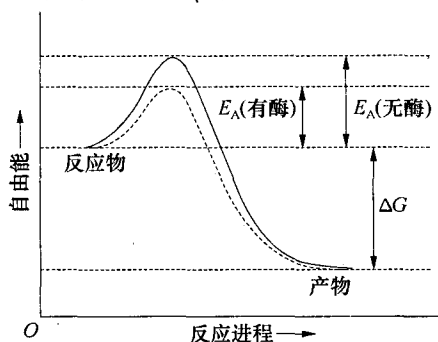


图 1-2 酶与非酶催化反应所需的活化能

化学反应都有一个过渡态状态,底物的过渡态化学结构是不稳定和瞬间存在的。酶的作用就是能降低过渡态的自由能,在温和的温度条件下就可以使得底物到达过渡态,酶通过降低能阈(E_A)来加速化学反应,酶并不会改变自由能 ΔG (图 1-2)。

(2) 高度的专一性。酶对它所作用的底物有严格的选择性,一种酶只作用于一类化合物或特定的化学键,这种现象称为酶的特异性或专一性(specificity)。

酶的专一性分为结构专一性和立体异构专

一性。其中,结构专一性包括:①绝对专一性,酶只作用于一种底物,称为绝对专一性,如脲酶(urease),只能催化尿素水解成 NH_3 和 CO_2 ;②相对专一性,一种酶可作用于一类化合物或一种化学键,这种不太严格的专一性称为相对专一性,包括键专一性和基团专一性。键专一性的酶能够作用于具有相同化学键的一类底物,如脂肪酶(lipase)水解脂肪以及酯类的酯键。基团专一性的酶则要求底物含有某种相同的基团,如胰蛋白酶选择性水解含有赖氨酰或精氨酰的羧基肽键。

立体异构专一性包括旋光异构专一性和几何异构专一性。例如,L-乳酸脱氢酶(L-lactic acid dehydrogenase)具有旋光异构专一性特点,其底物只能是L型乳酸,而不是D型乳酸;延胡索酸水化酶只能催化反丁烯二酸水合成苹果酸,对其几何异构体——顺丁烯二酸无催化作用。

(3)活性的可调节性。酶是生物体的组成成分,和体内其他物质一样,不断在体内进行新陈代谢,酶的催化活性也受多方面的调控。例如,酶的生物合成的诱导和阻遏、酶的化学修饰、抑制剂和激活剂的调节作用、代谢物对酶的反馈调节和别构调节以及神经体液因素的调节等,这些调控保证酶在体内新陈代谢中发挥其恰如其分的催化作用,使生命活动中的种种化学反应都能够有条不紊、协调一致地进行。同时,依据酶生物合成以及催化反应的调节机制,可人为地调控细胞或酶,提高酶的表达或酶的催化效率。

(4)活性的不稳定性。酶是蛋白质,酶促反应要求一定的pH、温度等温和的条件,强酸、强碱、有机溶剂、重金属盐、高温、紫外线、剧烈震荡等任何使蛋白质变性的理化因素都可能使酶变性而失去其催化活性。

二、影响酶催化作用的因素

酶的催化作用受到底物浓度、产物浓度、酶浓度、温度、pH、激活剂浓度、抑制剂浓度等多种因素的影响。在酶的应用过程中,影响酶催化反应的因素是重要的控制参数,在优化的环境条件下,才能发挥酶的催化效率。

1. 底物浓度的影响

1902年, Henri 在研究蔗糖酶催化蔗糖水解反应时发现底物浓度是决定酶催化反应速度的主要因素,即在酶浓度不变的情况下,底物浓度对反应速度影响的作用呈现矩形双曲线(rectangular hyperbola)(图1-3)。双曲线大致分为三段:第一段,在底物浓度很低时,反应速度随底物浓度的增加而急剧加快,两者呈正比关系,表现为一级反应。随着底物浓度的升高,反应速度不再呈正比例加快,反应速度增加的幅度不断下降,表现为一级反应和零级反应之间的混合反应。如果继续加大底物浓度,反应速度不再增加,达到最大反应速度,表现为零级反应。但有些酶在高底物浓度下,速度反而下降,这种现象称为底物抑制。这可能是底物浓度很高时,两个或者多个底物分子分别占据了部分活性位点,这样它们都无法按照正常的方式接受酶的催化,从而表现出高底物浓度抑制的现象,如过量的丁酰乙酯可抑制羊肝的酯酶。

2. 产物浓度的影响

在生物代谢过程中,许多代谢途径的中间产物或终产物是酶的变构剂,使酶变构从

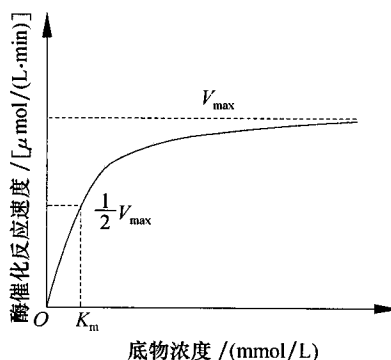


图1-3 底物浓度与酶催化反应速度的关系