

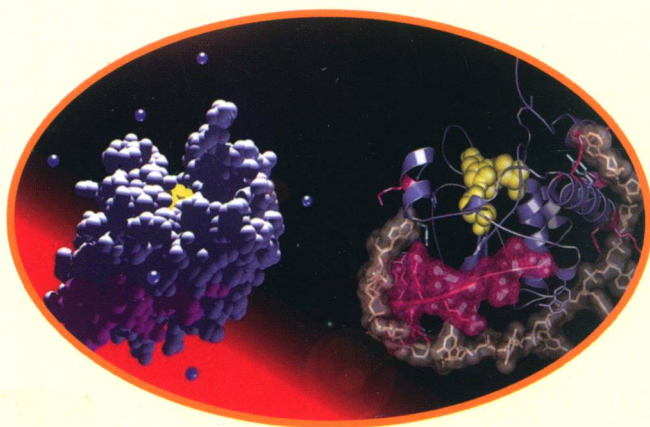
全国普通高等院校
生命科学类“十二五”规划教材



酶工程

杜翠红 方俊 刘越 主编

Enzyme Engineering



华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

酶 工 程

主 编 杜翠红 方 俊 刘 越

副 主 编 (以姓氏拼音排序)

胡永红 金黎明 金明飞

林爱华 徐 伟 薛胜平

编写人员 (以姓氏拼音排序)

陈 琛 陕西理工学院

杜翠红 集美大学

方 俊 湖南农业大学

符晨星 湖南农业大学

耿丽晶 辽宁医学院

胡 超 湖南农业大学

胡永红 南京工业大学

金黎明 大连民族学院

金明飞 华东师范大学

林爱华 中南民族大学

刘 越 中央民族大学

徐 伟 聊城大学

薛胜平 河北经贸大学

华中科技大学出版社

中国·武汉

内 容 简 介

本书是全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材。

本书系统介绍了酶学理论、酶的发酵生产和分离纯化、酶的工业催化过程、新型酶的开发和酶的改性及酶的应用等酶工程所涉及的相关内容。本书共 10 章,内容主要包括:绪论、酶学基础、酶的生产、酶与细胞的固定化、酶的非水相催化、酶反应器、化学酶工程、生物酶工程、核酸类酶及酶的应用。

本书可作为高等院校生物工程、生物制药、生物技术、生物化工等专业学生的教材和参考书,也可供有关专业教师、科研人员及工程技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

酶工程/杜翠红,方俊,刘越主编. —武汉:华中科技大学出版社,2014.5
ISBN 978-7-5609-9695-0

I. ①酶… II. ①杜… ②方… ③刘… 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(2014)第 101457 号

酶工程

杜翠红 方俊 刘越 主编

策划编辑:罗伟

责任编辑:罗伟

封面设计:刘卉

责任校对:李琴

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录排:华中科技大学惠友文印中心

印刷:湖北新华印务有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:18

字数:477千字

版次:2014年10月第1版第1次印刷

定 价:42.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

编委会



主任委员

余龙江 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物工程与生物技术专业教学指导分委员会委员,2013—2017 教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会委员

副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,南京工业大学研究生院副院长

李 钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长

任国栋 河北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物学基础课程教学指导分委员会委员,河北大学学术委员会副主任

王宜磊 菏泽学院教授,2013—2017 教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会委员

杨艳燕 湖北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

曾小龙 广东第二师范学院教授,副校长,学校教学指导委员会主任

张士瑾 中国海洋大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

委员(排名不分先后)

陈爱葵	胡仁火	李学如	刘宗柱	施文正	王元秀	张 峰
程水明	胡位荣	李云玲	陆 胤	石海英	王 云	张 恒
仇雪梅	贾建波	李忠芳	罗 充	舒坤贤	韦鹏霄	张建新
崔韶晖	金松恒	梁士楚	马 宏	宋运贤	卫亚红	张丽霞
段永红	李 峰	刘长海	马金友	孙志宏	吴春红	张 龙
范永山	李朝霞	刘德立	马三梅	涂俊铭	肖厚荣	张美玲
方 俊	李充璧	刘凤珠	马 尧	王端好	徐敬明	张彦文
方尚玲	李 华	刘 虹	马正海	王金亭	薛胜平	郑永良
耿丽晶	李景蕻	刘建福	毛露甜	王伟东	闫春财	周 浓
郭晓农	李 梅	刘 杰	聂呈荣	王秀丽	杨广笑	朱宝长
韩曜平	李 宁	刘静雯	彭明春	王永飞	于丽杰	朱长俊
侯典云	李先文	刘仁荣	屈长青	王有武	余晓丽	朱德艳
侯义龙	李晓莉	刘忠虎	邵 晨	王玉江	曾丽霞	宗宪春

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

组编院校

(排名不分先后)

北京理工大学	华中科技大学	云南大学
广西大学	华中师范大学	西北农林科技大学
广州大学	暨南大学	中央民族大学
哈尔滨工业大学	首都师范大学	郑州大学
华东师范大学	南京工业大学	新疆大学
重庆邮电大学	湖北大学	青岛科技大学
滨州学院	湖北第二师范学院	青岛农业大学
河南师范大学	湖北工程学院	青岛农业大学海都学院
嘉兴学院	湖北工业大学	山西农业大学
武汉轻工大学	湖北科技学院	陕西科技大学
长春工业大学	湖北师范学院	陕西理工学院
长治学院	湖南农业大学	上海海洋大学
常熟理工学院	湖南文理学院	塔里木大学
大连大学	华侨大学	唐山师范学院
大连工业大学	华中科技大学武昌分校	天津师范大学
大连海洋大学	淮北师范大学	天津医科大学
大连民族学院	淮阴工学院	西北民族大学
大庆师范学院	黄冈师范学院	西南交通大学
佛山科学技术学院	惠州学院	新乡医学院
阜阳师范学院	吉林农业科技学院	信阳师范学院
广东第二师范学院	集美大学	延安大学
广东石油化工学院	济南大学	盐城工学院
广西师范大学	佳木斯大学	云南农业大学
贵州师范大学	江汉大学文理学院	肇庆学院
哈尔滨师范大学	江苏大学	浙江农林大学
合肥学院	江西科技师范大学	浙江师范大学
河北大学	荆楚理工学院	浙江树人大学
河北经贸大学	军事经济学院	浙江中医药大学
河北科技大学	辽东学院	郑州轻工业学院
河南科技大学	辽宁医学院	中国海洋大学
河南科技学院	聊城大学	中南民族大学
河南农业大学	聊城大学东昌学院	重庆工商大学
菏泽学院	牡丹江师范学院	重庆三峡学院
贺州学院	内蒙古民族大学	重庆文理学院
黑龙江八一农垦大学	仲恺农业工程学院	

前言

酶工程作为现代生物技术的重要组成部分,它是以研究酶及其应用为主要内容的一门综合性学科,它具有综合性、应用性及发展性等特点。

本书主要是按以下五大模块进行编写的。

第一模块为酶学理论(第1至2章)。主要介绍酶和酶工程的基本概念、发展历程及酶学基础知识。

第二模块为酶的生产(第3章)。主要包括酶的发酵生产、酶的分离纯化和酶制剂的制备及典型酶制剂的生产实例。

第三模块为酶的工业催化过程(第4至6章)。为了使酶能够更好地应用于大规模工业化催化过程,一方面需要将酶或含酶细胞进行固定化,以提高其稳定性和重复利用性(第4章);另一方面可以通过改善酶催化的反应体系(如采用非水相介质),以改善酶的催化特性及扩展其使用范围(第5章),同时设计合理的酶催化反应器,以最大限度地提高酶的催化效率及优化其催化过程(第6章)。

第四模块为酶的改性及新型酶的开发(第7至9章)。主要包括化学酶工程(第7章)、生物酶工程(第8章)及核酸类酶(第9章)。其中,化学酶工程一方面对天然酶进行化学修饰以改善其催化性能,另一方面可根据人们的实际需要设计和合成一些人工酶,从而获得自然界中不存在的新酶;生物酶工程主要介绍基因工程技术在酶工程中的应用,包括酶分子的基因克隆与重组表达、酶分子的改造(酶的定点突变及其定向进化)、抗体酶及杂合酶等;另外,在20世纪80年代,人们发现酶的化学本质除了蛋白质以外,有些核酸或脱氧核酸也具有酶的催化功能,其作为一种新型的酶类也越来越受到人们的关注。

第五模块为酶的应用(第10章)。主要包括酶在医药、食品、轻工、化工、能源及环保方面的应用。

本书作为全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材,在编写过程中主要体现了以下三个特点。

(1)通俗性。在教材编写过程中力求将深奥难懂的抽象概念进行通俗化,尽量列举一些与日常生活密切相关的例子,采用比对或比喻的方式使其更易被学生所理解,尽量避免一些复杂的理论公式的推导。

(2)应用性。酶工程作为生物工程、生物化工、生物制药等专业的主修专业课之一,主要是以工科专业的学生为主,因此,在本书的编写过程中充分体现了工科特色,具有较强的应用性。在编写过程中各位编写人员结合了其所在课题组的科研工作,列举了一些具体的应用实例,从而达到理论与实践相结合的目的。

(3)前沿性。酶工程作为现代生物技术的重要组成部分,近年来,随着现代生物技术的快速发展,酶工程技术也在不断更新,有关新型酶及酶工程的科研成果层出不穷。因此,在本书编写过程中尽量结合近几年国内外发表的高层次的学术论文,将其研究成果融入到本书中,体

现出本书的先进性和前沿性,以提高学生的学习兴趣和培养学生的创新能力。

本书的第1章由方俊编写;第2章由金黎明和刘越编写;第3章由徐伟和金明飞编写;第4章由胡永红编写;第5章由陈琛编写;第6章由耿丽晶编写;第7章由林爱华编写;第8章和第9章由杜翠红编写;第10章由薛胜平和胡超编写;附录由符晨星编写。

由于编者水平有限,书中难免存在不足之处,真诚希望得到广大读者的批评指正。

杜翠红

目录

第1章 绪论 /1

- 1.1 酶概念的形成及其研究历史 /1
- 1.2 酶工程及其发展历程 /2
- 1.3 现代酶工程的发展趋势 /4
- 1.4 酶工程在生物工程中的重要地位 /5
- 1.5 酶工程对国民经济发展的意义 /6

第2章 酶学基础 /8

- 2.1 酶的分类与命名 /8
- 2.2 酶的组成及结构特点 /12
- 2.3 酶的催化原理 /14
- 2.4 酶反应动力学 /24
- 2.5 酶活力的测定 /37

第3章 酶的生产 /43

- 3.1 酶的生产方法概述 /43
- 3.2 微生物发酵产酶 /44
- 3.3 酶的分离纯化 /55
- 3.4 酶制剂的生产 /70

第4章 酶与细胞的固定化 /84

- 4.1 固定化酶与固定化细胞概述 /84
- 4.2 酶与细胞的固定化方法 /88
- 4.3 固定化酶与固定化细胞的性质和表征 /105
- 4.4 固定化酶与固定化细胞的应用 /110

第5章 酶的非水相催化 /120

- 5.1 酶在非水相介质中的催化反应概述 /120
- 5.2 有机介质中酶的催化反应 /123
- 5.3 非水相介质中酶催化反应的应用实例 /130

第6章 酶反应器 /136

- 6.1 酶反应器的类型与特点 /136

6.2 酶反应器的选择与操作 /148

6.3 酶反应器的设计 /151

第7章 化学酶工程 /156

7.1 酶分子的化学修饰 /156

7.2 酶的模拟 /179

第8章 生物酶工程 /195

8.1 酶分子的基因克隆及其定点突变 /195

8.2 酶分子的定向进化 /208

8.3 抗体酶 /214

8.4 杂合酶 /221

第9章 核酸类酶 /230

9.1 核酶的发现及分类 /230

9.2 核酶的结构及催化机理 /232

9.3 脱氧核酶 /243

9.4 核酸类酶的应用 /247

第10章 酶的应用 /254

10.1 工业酶制剂的应用现状 /254

10.2 酶在医药方面的应用 /255

10.3 酶在食品工业上的应用 /259

10.4 酶在轻工、化工方面的应用 /265

10.5 酶在能源、环保方面的应用 /270

附录 中英文名词对照 /275

1.1 酶概念的形成及其研究历史

早在几千年前我们的祖先就曾有酿酒、制醋、做酱的记载,所有这些,实际上都是酶知识的应用。四千多年前的夏禹时代酿酒已盛行,酒是酵母发酵的产物,是细胞内酶作用的结果。约3000年前,周朝就有人利用麦曲含有的淀粉酶将淀粉降解为麦芽糖,制造了饴糖。2500年前,人们就懂得用曲来治疗消化不良等疾病,曲富含酶和维生素,至今仍是常用健胃药。当时漆也已被广为利用,那时所用的漆是漆树的树脂被漆酶作用的氧化产物。

酶的发现来源于人们对发酵机理的逐渐了解。早在18世纪末和19世纪初,人们就认识到食物在胃中被消化,用植物的提取液可以将淀粉转化为糖,但对于其对应的机理则并不了解。真正认识酶的存在和作用是从19世纪30年代开始的,人们对酶的认识经历了一个不断发展、逐步深入的过程。

1833年Payen和Persoz从麦芽的水抽提物中用酒精沉淀得到了一种对热不稳定的活性物质,它可以促进淀粉水解成可溶性糖。他们把这种物质称为淀粉酶制剂(diastase),其意为“分离”,表示可从淀粉中分离出可溶性糖来。虽然现在已知他们当时得到的是一种很粗的淀粉酶制剂,但是由于他们采用了最简单的抽提、沉淀等提纯方法,得到了一个无细胞制剂,并指出了它的催化特性和不稳定性,至少开始触及了酶的一些本质问题,所以有人认为Payen和Persoz首先发现了酶。

到了19世纪中叶,法国科学家Pasteur对蔗糖转化为酒精的发酵过程进行了研究,认为在酵母细胞中存在一种活力物质,命名为“酵素”(ferment)。1878年,德国生理学家Kunne首次提出了“酶”(enzyme)这一概念,“enzyme”这个词来自希腊文,意思是“在酵母中”。随后,酶被用于专指胃蛋白酶等一类非活体物质,而酵素(ferment)则指由活体细胞产生的催化活性物质。

1896年德国学者Buchner兄弟发现了用石英砂磨碎的酵母细胞或无细胞滤液能和酵母细胞一样将葡萄糖转化成酒精,说明了上述化学变化是由溶解于细胞液中的酶引起的。此项发现促进了酶的分离和对其理化性质的探讨,也促进了对有关各种生命过程中酶系统的研究。一般认为酶学研究始于1896年Buchner的发现。这一贡献打开了通向现代酶学与现代生物化学的大门,其本人也因“发现无细胞发酵及相应的生化研究”而获得了1907年度的诺贝尔化学奖,在此之后,酶和酵素两个概念合二为一。

进入20世纪,酶学得到了迅速发展,发现了更多的酶,并注意到某些酶的作用需要有低分

子物质(辅酶)参与。其中,最重要的研究成果是 Michaelis Menton 总结了前人工作,根据中间产物学说于 1913 年提出了酶促反应动力学原理——米氏学说。这一学说的提出,对酶反应机理的研究是一个重要突破。

1926 年,美国生物化学家 Sumner 完成了一个决定性的实验。他首次从刀豆中分离纯化得到尿素酶结晶(这是第一个酶结晶),并证明了尿素酶的化学本质是蛋白质,由此提出了酶本身就是一种蛋白质,但这个观点直到若干年后获得了胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶等结晶后才被普遍接受,而 Sumner 也因此获得了 1946 年度的诺贝尔化学奖。

1982 年 Cech 小组发现,四膜虫的 rRNA 前体能在完全没有蛋白质的情况下进行自我加工,催化得到成熟的 rRNA 产物,由此说明 RNA 具有生物催化功能,并提出了酶并不一定是蛋白质的问题。1983 年,Altman 等也发现核糖核酸酶 P(RNase P)的 RNA 部分 M1RNA 具有催化活性,而该酶的蛋白质部分 C5 蛋白却没有酶活性。1986 年,Cech 将这类具有生物催化功能的 RNA 正式定义为核酶(ribozyme, Rz),它与核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)是两个完全不同的概念。核酶的发现,从根本上推翻了以往只有蛋白质才具有催化功能的观念,使“酶”的化学本质得到了扩展。基于 Cech 和 Altman 的创造性工作,二位共同获得了 1989 年度的诺贝尔化学奖。

此后 20 多年,新发现的核酶越来越多。此外,由于 DNA 与 RNA 具有相似的结构特点,人们便设想是否存在具有催化功能的 DNA 分子。1994 年,Breaker 等利用体外选择技术首次发现了切割 RNA 的单链 DNA 分子,并将其命名为脱氧核酶(deoxyribozyme, DRz)。脱氧核酶的发现进一步延伸了酶的概念。由此引出“酶是具有生物催化功能的生物大分子(蛋白质或核酸类物质)”的新概念。

1.2 酶工程及其发展历程

1.2.1 酶工程的基本概念

简而言之,酶工程就是酶的生产与应用的技术过程。酶工程是将酶或者微生物细胞、动植物细胞及细胞器等在一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。它包括酶的生产、酶的改性、酶生物反应器及酶的应用等方面的内容。其中,酶的生产包括酶的产生和分离纯化,它是酶应用的前提;酶生物反应器是酶发挥其生物催化功能的主要场所;酶的应用是酶工程的最终目标,目前主要集中于食品工业、轻工业、医药工业及环保等方面。在酶的生产和应用过程中,人们发现天然酶具有一些缺陷(如稳定性差、酶的分离纯化工艺复杂及不可重复利用等),因此,有必要对酶进行改性(如酶的固定化、酶的非水相催化体系的建立、酶的分子修饰及酶的定向进化等),以促进酶的优质生产和高效应用。

1.2.2 酶工程的发展历程

酶的应用研究促进了酶工程的形成。1894 年,日本的高峰让吉用米曲霉制备得到淀粉酶,开创了酶技术走向商业化的先例。1908 年,德国的 Rohm 用动物胰脏制得胰蛋白酶,用于

皮革的软化及洗涤。1908年,法国的 Boidin 制备得到细菌淀粉酶,用于纺织品的退浆。1911年,Warlerstein 从木瓜中获得木瓜蛋白酶,用于啤酒的澄清。1917年,法国人将枯草杆菌产生的淀粉酶用作纺织工业上的退浆剂。此后,酶的生产和应用逐步发展。然而在该阶段,酶工程仍停留在从微生物、动物或植物中提取天然酶,并加以利用阶段。但由于天然酶在生物体内含量很低,而且当时生产力落后,使酶的生产工艺较繁杂,酶制剂的生产成本较高,难以进行大规模工业化生产。

1949年,日本采用深层培养法生产 α -淀粉酶获得成功,酶制剂的生产和应用进入工业化阶段。1959年,葡萄糖淀粉酶催化淀粉生产葡萄糖新工艺研究成功,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,并使淀粉得糖率从 80% 上升为 100%,致使日本在 1960年葡萄糖产量猛增 10 倍。这项新工艺改革的成功,大大地促进了酶在工业上的应用。1960年,法国科学家 Jacob 和 Monod 提出的操纵子学说,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控。在酶的发酵生产中,依据操纵子学说,通过酶的诱导和解除阻遏等调节控制,可显著提高酶的产量。从此,酶的大量生产和优质利用得到快速发展。

然而,在酶的生产和应用过程中,人们注意到酶的一些不足之处,如稳定性差、对强酸碱敏感、分离纯化困难及不可重复利用等。解决的方法之一就是酶进行固定化,以提高其稳定性和可重复使用性。采用各种方法,将酶与水不溶性的载体结合,制备固定化酶的过程称为酶的固定化。1916年,Nelson 和 Griffin 发现蔗糖酶吸附到骨炭上仍具催化活性,从此,出现了酶的固定化技术。1969年,日本千佃一郎首次在工业规模上用固定化氨基酰化酶拆分 DL-氨基酸生产 L-氨基酸。1971年,第一届国际酶工程会议在美国 Hennileer 召开,会议的主题是固定化酶。此后,固定化天冬氨酸酶合成 L-天冬氨酸、固定化葡萄糖异构酶生产高果糖浆等的工业化生产取得成功。同时根据酶反应动力学理论,运用化学工程成果建立了多种类型的酶反应器,在此基础上逐渐形成了酶工程。

在固定化酶的基础上又逐渐发展了固定化细胞技术。20世纪70年代开始,大规模开展的微生物和动植物细胞的固定化、酶与辅酶共固定化等研究,使固定化酶的概念进一步扩展为“固定化生物催化剂”。从此,后来居上的固定化细胞技术在实际应用方面已大大超过固定化酶。在工业应用方面,利用固定化酵母细胞发酵生产酒精、啤酒的研究引人注目。日本 Toshio Onaka 等用海藻酸钙凝胶包埋酵母细胞,可在一天内获得质量优良的啤酒。法国 Corriell 等将酵母细胞固定在聚氯乙烯碎片和多孔砖等载体上进行啤酒发酵中型试验,可连续运转 8 个月。中国上海市工业微生物研究所等单位也从 20 世纪 70 年代后期进行过类似的研究工作,用固定化酵母发酵啤酒的规模不断扩大,已正式投入大规模生产。

以往对微生物细胞的固定化多集中在细菌和酵母。然而,很多具有工业生产价值的代谢产物(如酶、抗生素、有机酸和甾体化合物等)都是由丝状真菌生产的。目前用于固定丝状真菌的方法主要是吸附法和包埋法。但包埋法由于限制了足够的氧气供给细胞,使固定化丝状真菌生产代谢产物的效率非常低。另外,许多具有药用价值的细胞因子大多存在于动植物细胞中。1984年,瑞典 Mosbach 等提出一种利用高分子聚合物包埋各种细胞的通用的固定化方法,能固定细菌、酵母、动植物细胞及人工组建的细胞,生产各种代谢产物或细胞因子。如利用琼脂糖凝胶分别包埋杂交瘤细胞 LSP21 和淋巴细胞 MLA144 生产单克隆抗体和白细胞介素,从而使细胞固定化技术的应用范围得到扩展。有关藻类等各种植物细胞和原生动物等各种动物细胞固定化研究也十分活跃。1980年,Lim 和 Sun 报道,用海藻酸钙包埋胰岛细胞可用于大白鼠糖尿病的治疗研究。

20 世纪 70 年代后期以来,由于微生物学、遗传工程及细胞工程的发展为酶工程进一步向纵深发展带来勃勃生机,从酶的制备方法、酶的应用范围到后处理工艺都受到巨大冲击。尽管目前已发现和鉴定的酶有 8 000 多种,但大规模生产和应用的商品酶只有数十种。自然酶在工业应用上受到限制的原因主要有: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,使酶制剂生产成本较高。因此,根据研究和解决上述问题的手段不同把酶工程分为化学酶工程和生物酶工程。前者是指自然酶、化学修饰酶、固定化酶及化学人工酶的研究和应用;后者则是酶学和以基因重组技术为主的现代分子生物学技术相结合的产物,主要包括 3 个方面:①利用基因工程技术大量生产酶(克隆酶);②修饰酶基因产生遗传修饰酶(突变酶);③设计新的酶基因合成自然界不存在的新酶。1980 年,Wagner 等报道,将大肠杆菌 ACTT11105 的青霉素酰化酶基因克隆到质粒上,获得产酶活力更高的大肠杆菌 5K(PHM12)杂交株,并将此大肠杆菌杂交株固定,用于生产青霉素酰化酶,这是基因工程与酶工程相结合的第一例。在第 7 届国际酶工程会议上,以酶分子改造和修饰为主要内容的提高酶稳定性的研究占较大比例,它与基因工程的应用、活细胞的固定化一起,成为 1983 年国际酶工程会议最为活跃的三大领域。通常将改变酶蛋白一级结构的过程称为改造,而将酶蛋白侧链基团的共价变化称为修饰。酶分子经加工改造后,可导致有利于应用的许多重要性质与功能的变化。如美国 Davis 等还利用蛋白质侧链基团的修饰作用,研究降低或解除异体蛋白的抗原性及免疫原性。如以聚乙二醇修饰治疗白血病的特效药 L-天冬酰胺酶,使其抗原性完全解除。

此外,在酶工程研究中,与酶分子本身不直接有关的两项重要内容是酶生物反应器和酶抑制剂的研究,但其与酶的应用直接相关。其中,酶生物反应器往往可以提高催化效率、简化工艺,从而增加经济效益。在固定化技术的基础上,已进一步研制出酶电极、酶膜反应器、免疫传感器及多酶反应器等新技术,这些在化学分析、临床诊断与工业生产过程的监测等方面成为很有价值的应用技术。而酶抑制剂,尤其是微生物来源的酶抑制剂多是重要抗生素。酶抑制剂还可在代谢控制、生物农药、生物除草剂等方面发挥特殊作用,其低毒性备受人们欢迎。酶抑制剂的开发已受到国际产业部门的重视,从酶工程的进展和动态中可以预料,今后将会出现一批基因工程表达的酶抑制剂。而利用酶与酶抑制剂之间的生物亲和作用,亲和层析技术将会广泛应用于酶或酶抑制剂的分离纯化中。同时,基因工程重组表达技术使酶抑制剂的分子改造与修饰成为可能,从而使异体酶的抗原性得到解决。另外,在酶活性的控制方面,酶抑制剂与激活剂仍将受到极大重视,并在临床及工农业生产中发挥重要作用。在化学合成工业中,酶法生产将有重大贡献,模拟酶、突变酶、抗体酶、杂交酶将成为活跃的研究领域。非水系统酶反应技术(反向胶团中的酶促反应,有机溶剂中的酶反应)也仍将是研究热点之一。

1.3 现代酶工程的发展趋势

当前人类社会面临着医疗、环境、能源的压力,可持续发展成为全世界高度关注的问题。酶在制药、食品、纺织、洗涤用品等行业有着广泛深入的用途,已经发展成为全球性的酶工程产业。一方面,随着人们对酶生物合成、结构与催化分子机理的深入了解和现代生物技术的长足进展,酶学与酶工程领域的研究也得到了迅速发展,酶工程在研究内容和手段上与生物物理、基因工程、蛋白质工程、细胞工程、发酵工程等学科相互交融,形成了现代酶工程;另一方面,由

于在工农业生产、生物能源、环境保护与治理、人类健康方面的重大需求,酶工程研究将迎来快速发展的大好时机。“十一五”以来,我国科研投入的力度显著加大,重塑我国酶工程的自主创新能力已具备客观条件,近年来我国在酶工程研究方面取得了较大进步,目前已研究开发了多种较成熟的工业酶制剂。其中,已获批的食品加工助剂用酶制剂达 50 余种;饲料用酶和纺织用酶近几年快速增长;生物能源用酶、石油开采用酶和造纸用酶正在发展。

合成生物学是现代酶工程应用研究的热点之一。其基本原理是在对自然生物体系了解的基础上,将系统生物学理论与酶工程技术相结合,通过对不同代谢途径的关键酶进行合理组合,理性设计人工生物体系,打破自然进化的限制,使重要医药、能源、精细化工产品在人设计的生物体系中高效合成;其核心内容就是利用酶来高效转化各种物质,需要在基因组水平、转录水平、翻译与翻译后修饰水平等不同层次,通过代谢途径的调控和不同途径的协同对酶的活性进行精确控制,从而高效转化和生产所需要的目标产物。由于人工合成体系大多由酶分子组装而成,但酶在异源宿主体系中常常出现表达量低、功能丧失及对非天然底物作用力差等弱点,因此,有必要利用酶分子进化理论和技术对关键催化元件进行设计、改造与组装,最终实现合成生物学所期望的“订制”生物元件功能的目标。正因为如此,合成生物学的兴起给酶工程研究带来了新的机遇与挑战。一方面,酶工程研究从单个酶的结构、功能与调控的研究,转变为在代谢途径,甚至细胞水平上的系统研究;另一方面,在酶工程的应用方面也正经历着从单个或几个酶的酶促降解或转化,到不同酶促反应过程的组合与协同。2010 年,由美国文特研究所克雷格·文特(Craig Venter)带领的研究小组通过人工合成的方法成功创造了一个新的、具有生存能力的细菌物种。该研究是合成生物学的突破性进展,为创造可用于生产药物、生物燃料、化工原料等的人工合成细胞奠定了基础;同时也在全球范围内掀起了合成生物学研究的热潮,甚至还有人乐观地估计,到 2015 年将有 1/5 的化学工业可以依赖合成生物学。

如今已进入后基因组时代,全世界投入大量资金和人力获得了海量的生物信息数据,并且供大家免费使用,这就为我们设计和合成新颖独特的工业用酶,用于高效而廉价合成精细及大宗化学品,提供了非常宝贵的资源和千载难逢的机遇。通过应用多学科交叉技术,基于计算机辅助设计、半理性设计及定向进化等策略,揭示了酶分子作用机制,从不同结构层次解析了蛋白质功能进化的模块性;通过对多种酶的催化活性、底物特异性、热稳定性等进行分子改造,拓展了酶序列空间。研究表明,通过酶分子进化理论和技术创新获得高效酶催化元件的新模式,即从被动的微生物酶基因筛选,发展为主动的新功能酶理性设计,提升新功能酶的产生速度,将极大地促进合成生物学领域的发展。同时,应用非培养技术寻找新酶也成为热点。相信随着酶学与酶工程的深入研究,以及人们对酶生物合成机理的系统而深入的了解,酶工程将在工农业生产、生物能源、环境保护与治理、人类健康方面满足人类社会的需求。

1.4 酶工程在生物工程中的重要地位

生物工程学(biotechnology)也称生物技术或生物工艺学,是 20 世纪 70 年代在分子生物学和细胞生物学基础上发展起来的一个新兴技术领域。酶工程(enzyme engineering)是生物工程的主要内容之一,是随着酶学研究迅速发展,特别是酶的应用推广使酶学和工程学相互渗透结合,发展而成的一门新的技术科学,也是酶学、微生物学的基本原理与化学工程有机结合

而产生的边缘科学技术。酶工程是从应用的目的出发研究酶,是在一定生物反应装置中利用酶的催化性质,将相应原料转化成有用物质的技术,是生物工程的重要组成部分。它和发酵工程、细胞工程、基因工程、蛋白质工程等是相互依存、相互促进的。目前大量生产的酶都是由发酵法生产的产品,酶生产菌种的改良离不开细胞工程和基因工程技术,天然酶催化性能优化的重要手段也要利用基因工程技术,抗体酶的研制开发需要利用细胞工程技术(单克隆抗体技术),许多工程酶的研制开发都要利用蛋白质工程技术去完成。而在基因工程、蛋白质工程、细胞工程和发酵工程中,都要用酶和各种各样的工具酶以及生产用的酶制剂。可以说,没有基因工程工具酶,就没有基因工程和蛋白质工程。

1.5 酶工程对国民经济发展的重大意义

生物技术产业化经历了三个浪潮,即医药生物技术、农业生物技术和工业生物技术。工业生物技术产业的核心是工业生物催化,其主要包括酶的发现、酶的优化和酶催化三个技术平台。世界经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)指出“生物催化技术是工业可持续发展最有希望的技术”。欧、美、日已经不同程度地制定出今后几十年内用生物工程取代化学工程的战略计划。美国政府报告指出,到2020年,通过生物催化技术,实现化学工业的原料、水资源及能量的消耗降低30%,同时酶的发现与获得被列为生物催化与生物转化的重要课题。

现在已知的酶有几千种,但是还远远不能满足人们对酶日益增长的需要。随着科技的发展,人们正在发现更多、更好的酶。其中,引人注目的有核酸类酶、抗体酶、端粒酶、糖生物学和糖基转移酶以及极端环境微生物和不可培养微生物的新酶种。此外,新的固定化、分子修饰和非水相催化等技术越来越受到人们关注。伴随着人类基因组计划取得的巨大成果,基因组学和蛋白质组学的诞生,生物信息学的兴起,以及DNA重组技术的发展,预期在不久的将来,众多新酶的出现将使酶的应用达到前所未有的广度和深度。可以预计,随着各种高新技术的广泛应用及酶工程研究工作的不断深入,酶工程研究和酶制剂工业必将取得更快、更大的发展。利用酶工程,逐步以生物可再生资源取代石化能源为原料,大规模生产所需要的化学品、医药、能源、材料等,是解决能源及环境危机的有效手段,是我国实现21世纪化工行业生产方式变更,产品结构调整与新型清洁高效工业制造的有力保证,也是我国实现可持续发展和21世纪建设全面小康社会的有力保证。

可以相信,将来人们不仅可以构造出各种性能优异的人工合成酶和模拟酶,而且可以采用生物学方法在生物体外构造出性能优良的产酶工程菌为生产和生活服务,酶工程技术必将在工业、医药、农业、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发挥越来越大的作用,为国民经济可持续发展做出更大贡献。

(本章内容由方俊编写、胡永红初审、杜翠红审核)

思考题

1. 简述酶概念的形成过程。

2. 何谓酶工程?
3. 自然酶在工业应用上受限的主要原因是什么?

参考文献

- [1] 查宝萍,郑联合,王莉,等. 固定化脂肪酶催化椰子油制备月桂酸单甘油酯[J]. 中国油脂,2013,38(11):64-67.
- [2] 陈国强. 合成生物学专刊序言[J]. 生物工程学报,2013,29(8):1041-1043.
- [3] 陈宁,王健. 酶工程[M]. 北京:中国轻工业出版社,2011.
- [4] 陈守文. 酶工程[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [5] 郭勇. 酶工程原理与技术[M]. 北京:高等教育出版社,2005.
- [6] 郭勇. 酶工程[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [7] 黄璐琦,高伟,周雍进. 合成生物学在中药资源可持续利用研究中的应用[J]. 药学报,2014,49(1):37-43.
- [8] 金城. 酶工程专刊序言[J]. 生物工程学报,2012,28(4):391-392.
- [9] 居乃琥. 酶工程手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,2011.
- [10] 罗贵民. 酶工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [11] 孙君社. 酶与酶工程及其应用[M]. 北京:化学工业出版社,2006.
- [12] 施巧琴. 酶工程[M]. 北京:科学出版社,2005.
- [13] 王方,王慧媛,陈大明,等. 合成生物学发展的情报分析[J]. 生命的化学,2013,33(2):19-25.
- [14] 汪海林. 蛋白质的同时双重标记[J]. 色谱,2013,32(12):1141-1142.
- [15] 吴士筠,周岩,张凡. 酶工程技术[M]. 武汉:华中师范大学出版社,2009.
- [16] 禹邦超,胡耀星. 酶工程[M]. 2版. 武汉:华中师范大学出版社,2007.
- [17] 由德林. 酶工程原理[M]. 北京:科学出版社,2011.
- [18] 袁勤生,赵健. 酶与酶工程[M]. 上海:华东理工大学出版社,2005.
- [19] 周晓云. 酶学原理与酶工程[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005.

【本章要点】

本章主要讲述酶的分类命名、化学本质、分子组成特点、催化反应原理、反应动力学及酶活力的测定。重点讲述酶的催化机理和酶反应动力学,特别是各种可逆抑制作用的动力学特征,需要了解酶活力的定义及测定的方法。

2.1 酶的分类与命名

目前酶的种类已达几千种,随着生物化学、分子生物学等生命科学的发展,还会发现更多的酶,为了准确识别某一种酶,避免发生混乱和误解,要求每一种酶都有准确的名称和明确的分类。

2.1.1 酶的分类

1. 按酶的化学本质分类

按照化学本质的不同,酶可以分为两大类:一类主要由蛋白质组成的酶,称为蛋白类酶(P酶);另一类主要由核酸类物质(包括 RNA 和 DNA)组成的酶,称为核酸类酶(R酶)。

2. 按酶催化反应类型分类

(1)蛋白类酶的分类 蛋白类酶的分类一开始较为混乱,1961年,由国际生物化学联合会(International Union of Biochemistry, IUB)中的酶学委员会(Enzyme Commission, EC)公布了酶的命名法(enzyme nomenclature)及其分类的报告。1972年、1978年和1984年又三次作了修改、补充,这一系统现在已得到国际上普遍认同。主要是根据目前已知的约3000种酶催化的反应类型和作用的底物,将酶分为六大类(表2-1)。每个酶的编号用三个圆点隔开的数字表示,编号前冠以EC(酶学委员会)的缩写符号。

编号的第一个数字表示这个酶属于哪一大类。

编号的第二个数字表示在此类以下的大组。对于氧化还原酶类来说,这个数字表示氧化反应供体基团的类型;转移酶类表示被转移基团的性质;水解酶类表示被水解键的类型;裂解酶类表示被裂解键的类型;异构酶类表示异构作用的类型;连接酶类表示生成键的类型。

第三个数字表示大组下面的小组,各个数字在不同类别、不同大组中都有不同的含义。

第四个数字是小组中各种酶的流水编号。