



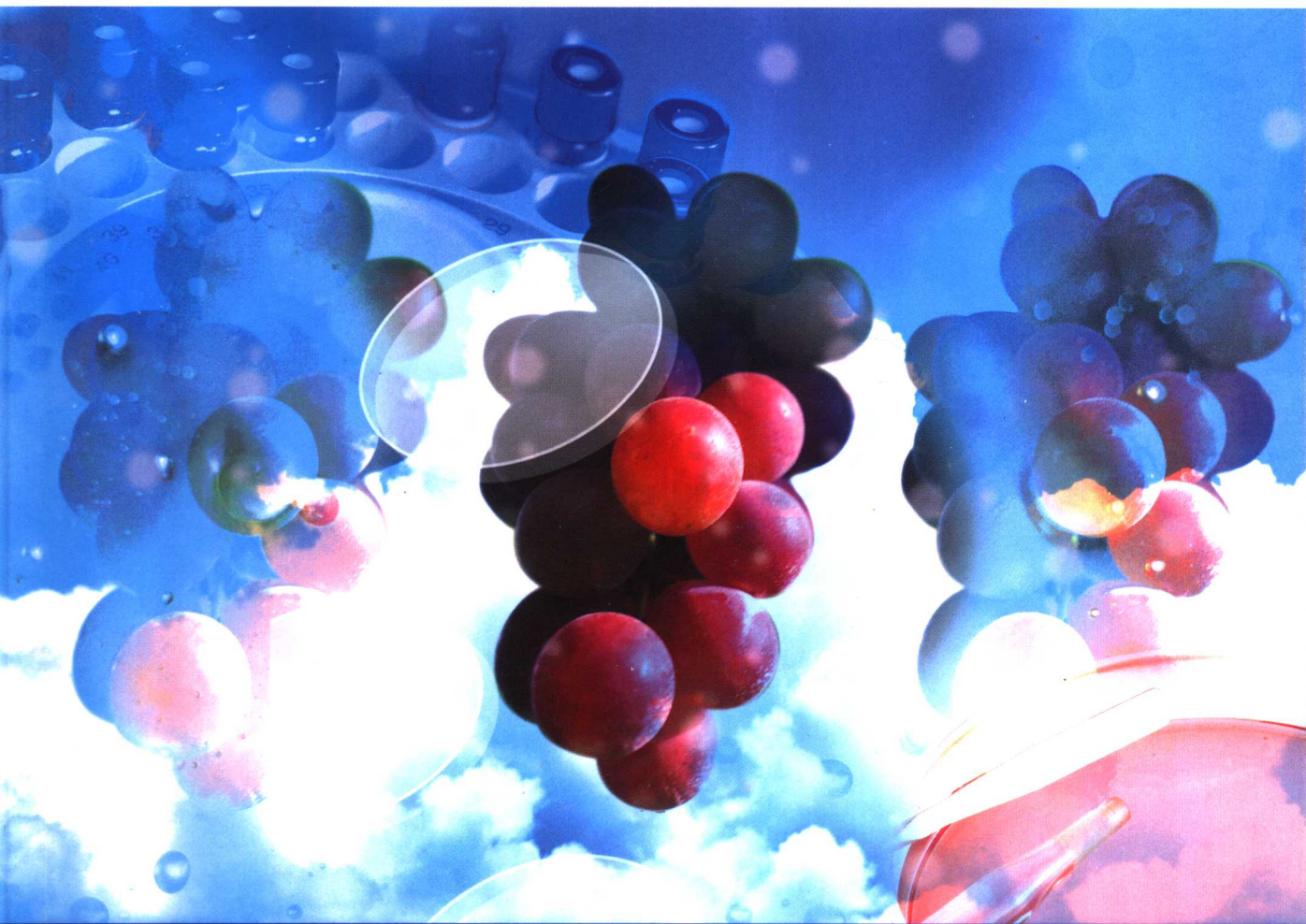
GAODENG XUEXIAO ZHUANYE JIAOCAI

• 高等学校专业教材 •

酶 工 程

m e i g o n g c h e n g

陈 宁 主编



中国轻工业出版社

ZHONGGUO QINGGONGYE CHUBANSHE

高等学校专业教材

酶 工 程

陈 宁 主编

编写人员（以姓氏笔画为序）

王 健 怀丽华 周昌平 陈 宁

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

酶工程/陈宁主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2005. 8
高等学校专业教材
ISBN 7-5019-4979-4

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 (2005) 第 073202 号

责任编辑: 白 洁 责任终审: 滕炎福 封面设计: 刘 鹏
版式设计: 马金路 责任校对: 燕 杰 责任监印: 胡 兵

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 北京公大印刷厂

经 销: 各地新华书店

版 次: 2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月第 1 次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 22

字 数: 507 千字

书 号: ISBN 7-5019-4979-4/TS · 2878 定价: 34.00 元

读者服务部邮购热线电话: 010—65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010—65141375 65128898

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

41262J4X101ZBW

前 言

生物工程亦称生物技术或生物工艺学，主要包括四大技术体系：基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程，作为 20 世纪 70 年代初发展起来的一个新兴技术领域，生物工程已成为世界新技术革命的重要组成部分。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。酶工程是研究酶的生产和应用的一门新兴学科，其应用范围已遍及食品、轻工、化工、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，对传统化学工业的改造和三废处理等亦具有很大潜力。

可以看出，酶工程是生物技术的基础和重要组成部分，是生物技术产业化的重要环节。《酶工程》课程是生物工程专业必修的一门专业课程，通过本课程的学习，使学生掌握酶工程的基本理论，解决酶工程产业化过程中出现的主要问题，并为从事新产品和新工艺的研究与开发奠定应有的理论基础。

本书是作者在多年科研的基础上参考国内外最新出版的教科书及科技资料编写而成的，系统、详细地介绍了酶工程的基本理论、研究方法以及应用，涉及面较宽，并有一定的深度，既可作为大专院校生物工程专业研究生及本科生教材，亦可供从事生物工程研究的有关人员参考。

本书由天津科技大学陈宁及周昌平、吉林大学王健和天津商学院怀丽华共同编写。其中陈宁编写第一章全部及第二、第九章部分内容，王健编写第三章、第七章全部及第五、第八、第九章部分内容，怀丽华编写第六章全部及第八、第九章部分内容，周昌平编写第四章全部及第二、第五、第九章部分内容。天津科技大学生物工程学院研究生寇广会为本书提供了大量参考资料及进行了录入工作。天津科技大学、吉林大学、天津商学院的领导和专家亦给予了大力的支持。另外，本书在编写过程中参考了同行专家、学者的研究成果或著作，在此一并表示感谢。

由于生物技术的发展非常迅速，许多酶工程的新技术、新成果尚来不及消化吸收编入本教材，加上作者水平有限，错误及不妥之处在所难免，恳请读者批评指正。

陈 宁
于天津科技大学

目 录

第一章 绪论	1
第一节 酶工程的定义	1
第二节 酶工程发展历史	3
第三节 酶工程的研究概况及发展前景	5
一、新酶的研究与开发	6
二、化学酶工程	8
三、生物酶工程	10
四、酶的优化生产	12
五、酶的高效应用	13
第四节 我国酶制剂工业现状及发展对策	14
一、我国酶制剂工业发展现状	14
二、我国酶制剂工业存在的主要问题	15
三、我国酶制剂工业的发展对策	16
主要参考文献	17
第二章 酶的概述	19
第一节 酶的基本概念	19
一、酶的催化特性	19
二、酶的分类	21
三、酶的命名	22
第二节 酶的活力测定	24
一、酶活力	24
二、酶活力的测定方法	26
第三节 酶生物合成的基本理论	29
一、RNA 的生物合成——转录	29
二、蛋白质的生物合成——翻译	31
三、酶生物合成的调节	34
第四节 酶分子的结构与功能	36
一、酶分子的组成	36
二、酶的活性中心与调节中心	39
三、酶蛋白的结构与功能	42
第五节 酶促反应动力学	44
一、单底物酶促反应动力学	44
二、多底物酶促反应动力学	48
三、别构酶及其动力学	49
四、温度对酶反应速度的影响	51
五、pH 对酶反应速度的影响	52
六、抑制剂对酶反应速度的影响	53
七、激活剂对酶反应速度的影响	56

第六节 酶的生产方法	56
一、提取法	57
二、发酵法	57
三、化学合成法	57
主要参考文献	57
第三章 酶的活性调节与分子修饰	59
第一节 酶的活性调节	59
一、通过共价结构改变酶的活性调节	59
二、激活剂和抑制剂对酶活性的调节	62
三、别构酶的活性调节	63
四、通过聚合解离和结合解离进行的调节	67
五、代谢途径中酶活性的调节	69
第二节 酶的分子修饰	73
一、金属离子置换修饰	75
二、大分子结合修饰	76
三、肽链有限水解修饰	78
四、酶蛋白侧链基团修饰	79
五、氨基酸置换修饰	82
六、核苷酸链剪切/置换修饰	83
七、物理修饰	84
八、基因水平的修饰	84
九、定点突变与化学修饰结合法	85
十、生物酶工程	85
十一、酶分子修饰的应用实例	89
主要参考文献	90
第四章 酶的分离与纯化	92
第一节 酶制剂的制备过程	92
一、材料的选择	92
二、材料预处理	92
三、初步探索酶性质	96
四、制定酶的分离程序	97
五、酶的纯度检验	98
第二节 酶的分离与提取	98
一、沉淀法	98
二、层析法	101
三、电泳法	107
四、离心法	113
五、过滤与膜分离法	117
六、萃取法	120
第三节 酶的纯化与精制	126
一、酶纯化与精制的原则	126
二、酶纯化与精制的方法	127
三、酶制剂的保存	130
主要参考文献	131

第五章 酶的固定化	132
第一节 固定化酶和细胞中应用的载体	133
一、有机高分子载体材料	133
二、无机载体材料	136
三、复合载体材料	137
第二节 酶固定化的方法	138
一、吸附法	139
二、载体偶联法(键合法)	141
三、交联法	144
四、包埋法	145
五、酶的定向固定化	147
六、辅酶的固定化	152
第三节 固定化酶的性质	152
一、稳定性	152
二、最适 pH	153
三、“相对活力”的改变	154
四、作用的最适温度	155
五、抑制剂对固定化酶的影响	155
第四节 细胞的固定化	156
一、固定化细胞分类、形态特征和生理状态	156
二、固定化细胞的制备	157
三、固定化细胞载体	160
四、固定化基因工程菌细胞的性质	160
第五节 固定化酶反应动力学	161
一、固定化对酶反应系统的影响	161
二、固定化酶反应动力学	163
主要参考文献	172
第六章 酶反应器	173
第一节 酶反应器的类型与特点	173
一、游离酶反应器	174
二、固定化酶反应器	177
第二节 酶反应器的设计与选型	185
一、酶反应器的设计	185
二、酶反应器的选型	188
三、酶反应器的性能评价	190
第三节 酶反应器的操作	192
一、酶反应器中流动状态的控制	192
二、酶反应器恒定生产能力的控制	193
三、酶反应器的稳定性	193
四、酶反应器的微生物污染	194
主要参考文献	194
第七章 酶的人工模拟	196
第一节 模拟酶	196
一、模拟酶的概念	196

二、模拟酶的分类·····	196
第二节 抗体酶·····	205
一、抗体酶概述·····	205
二、抗体酶的制备与筛选·····	205
三、抗体酶的应用·····	206
第三节 印迹酶·····	209
一、分子印迹技术概述·····	209
二、分子印迹酶·····	214
三、生物印迹酶·····	218
主要参考文献·····	220
第八章 酶的发酵生产·····	221
第一节 酶的生产方式·····	221
第二节 动物细胞培养生产酶·····	221
一、动物细胞的特性及培养特点·····	222
二、动物细胞的培养方式·····	223
三、动物细胞培养的工艺条件及其控制·····	224
四、动物细胞培养产酶的工艺过程·····	226
第三节 植物细胞培养生产酶·····	227
一、植物细胞的特性及培养特点·····	228
二、植物细胞培养生产天然产物的特点·····	228
三、植物细胞培养的工艺条件及其控制·····	229
四、植物细胞培养产酶的工艺过程·····	233
第四节 微生物发酵生产酶·····	234
一、菌种的获得·····	234
二、微生物发酵法生产酶的方式·····	238
三、微生物发酵法生产酶的工艺及控制·····	241
第五节 酶发酵动力学·····	247
一、酶生物合成的模式·····	247
二、细胞生长动力学·····	251
三、产酶动力学·····	252
第六节 蛋白酶的发酵生产·····	255
一、酸性蛋白酶的生产·····	255
二、中性蛋白酶的生产·····	256
三、碱性蛋白酶的生产·····	258
第七节 淀粉酶的发酵生产·····	259
一、 α -淀粉酶的生产·····	260
二、 β -淀粉酶的生产·····	264
第八节 脂肪酶的发酵生产·····	265
主要参考文献·····	267
第九章 酶的应用·····	268
第一节 酶在发酵工业中的应用·····	268
一、生产葡萄糖·····	268
二、生产氨基酸·····	269
三、生产核苷酸·····	278

四、生产生物柴油·····	279
五、生产抗生素·····	282
六、生产有机酸·····	283
七、生产甾体激素·····	286
第二节 酶在医药领域中的应用·····	287
一、酶在疾病诊断方面的应用·····	287
二、酶在疾病治疗方面的应用·····	289
三、酶在药物制造方面的应用·····	295
第三节 酶在分析检测方面的应用·····	300
一、酶试纸·····	300
二、酶柱和酶管·····	301
三、酶传感器·····	303
第四节 酶在基础理论研究方面的应用·····	314
一、阐明酶反应的机制·····	315
二、酶在生物工程中的应用·····	318
第五节 酶在环境保护领域中的应用·····	323
一、环境监测·····	323
二、三废处理·····	326
三、生物脱墨·····	327
第六节 酶在其它方面的应用·····	329
一、酶在洗涤剂工业中的应用·····	329
二、酶在酿酒工业中的应用·····	330
三、酶在乳制品工业中的应用·····	333
四、酶在肉制品加工中的应用·····	335
五、酶在饼干中的应用·····	335
六、麦芽糖及饴糖的制造·····	336
七、酶在纺织工业中的应用·····	336
八、酶在制革工业中的应用·····	338
九、酶在化妆品生产中的应用·····	339
十、酶在饲料工业中的应用·····	340
十一、油脂水解·····	341
主要参考文献·····	341

第一章 绪 论

回顾 20 世纪，生物科学与生物工程在全球崛起并迅速发展，已经从整体水平发展到细胞水平和分子水平，在基础与应用研究领域取得了举世瞩目的成果。生物工程亦称生物技术或生物工艺学，是 20 世纪 70 年代初发展起来的一个新兴技术领域，已成为世界新技术革命的重要组成部分。

生物工程主要包括四大技术体系：基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。基因工程本身并不是一种独立的生产技术，通过基因工程可以改变生物的产酶量和酶系，真正发挥工业效益还是要靠发酵工程和酶工程来实现。因此，从某种意义上讲，酶工程在工业生产上的作用更直接一些，容易获得近期的效益。所以，重视酶工程的研究和开发，是完全符合生物工程发展不平衡的实际情况的。

酶工程又称酶工艺学，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。酶工程现已广泛应用于轻工业、食品工业、医药工业和临床诊断等方面，对传统化学工业的改造和三废处理等亦具有很大潜力。

第一节 酶工程的定义

酶是由生物体产生的具有催化剂活性的生物大分子，能特定地促成某个化学反应而其本身却不参与反应，且具有反应效率高、反应条件温和、反应产物污染小、能耗低、反应容易控制等特点，这些特点相对于传统的化学反应来说具有较大的优越性。随着酶学研究的迅速发展，特别是酶应用的推广，使酶学和工程学相互渗透和结合，发展成一门新的技术科学——酶工程。酶工程是工业上有目的地设计一定的反应器和反应条件，利用酶的催化功能，在常温常压下催化化学反应，生产人类需要的产品或服务于其它目的的一门应用技术。

“酶工程”这一术语出现在 20 世纪 60 年代末和 70 年代初，1971 年召开了第一次国际酶工程会议。在当时，其范围大致包括酶的生产（包括微生物酶的发酵和提取以及从动植物中提取酶的技术）、酶的固定化技术、酶的化学修饰、酶动力学研究、酶反应器的设计 and 应用以及酶在医学、工业、农业、食品等方面的应用等内容。近年来，随着酶技术研究的深入以及相邻学科的发展，酶工程亦增添了不少新内容。

(1) 酶的化学修饰：为提高酶的活性、改变其作用专一性或最适反应条件、增加其稳定性、消除其抗原性（指某些酶能在体内诱导产生抗体而失活）等，而对酶进行化学修饰，即在分子水平上用化学方法对酶进行改造。常用的改造方法是酶的侧链与一些具有生物相容性的大分子（如右旋糖苷、人血清白蛋白、聚乙二醇等）进行共价连接。

(2) 模拟酶 (mimic enzyme)：根据酶的作用原理，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。它们一般具有高效、高适应性等特点，在结构上比

天然酶相对简单。

(3) 抗体酶 (abzyme): 由于抗体和酶均属蛋白质, 两者都有求于互补性物质, 故而有其相似性; 所不同的是前者的结合是直接的, 后者的结合是过渡态的。抗体酶是将类似酶反应中过渡态的结合物注入动物体内后所诱发出来的一种抗体, 它兼有酶和抗体的特性, 因此在体内具有导向性, 并能催化专一的反应。

(4) 核酸酶: 核酸酶是一种近年才发现的具有催化活性的 RNA 分子而不是蛋白质, 因此被称为第二类生物催化剂。

(5) 有机相酶反应: 这是一种在极端条件 (逆性环境) 下进行的酶反应, 它可以改变某些酶的性质, 如某些水解酶在逆性环境下具有催化合成反应的能力。常用的有机相酶反应有两种方式: 一是在水-水不溶有机溶剂双相体系中进行, 要求底物在水和有机溶剂中的溶解度要大, 而产物在有机溶剂中的溶解度要大, 可进行氧化-还原、环氧化、异构化、酯交换、肽和脂的合成等反应; 二是采用形成反胶束方式进行, 即将酶的水溶液在表面活性剂的作用下在有机相中形成“油包水”的乳浊液, 底物要求是能溶于有机相, 此时酶的催化作用将发生逆转, 但此法常不够稳定。

(6) 酶标免疫分析: 这是一种以待测抗原或酶标抗原与相应抗体之间的专一结合为基础, 并通过酶活力的测定来测定待测抗原含量的分析方法。其中常用的是酶标免疫吸附分析法。具体方法之一是用两组抗原溶液 (一组是待测抗原与酶标抗原的混合液, 另一组是仅含酶标抗原液) 分别与固定在载体上的抗体进行反应, 随后再分别与定量的酶底物反应。由于待测抗原不含酶, 不能与底物反应, 故两组中底物降解量之差即为待测抗原量。

(7) 酶传感器: 这是生物传感器中最重要的一类。一般包括两个组成部分, 一是固定化酶膜, 膜允许被测小分子物质进入膜内, 而固定在膜内侧的酶则不能漏泄到膜外; 另一部分是基本传感器, 酶膜即覆盖在其上。当小分子被测物质作为底物被酶催化进行反应时, 会引起 pH 或 O_2 的变化或形成简单的产物, 如 NH_3 、 H_2O_2 、 CO_2 、 CN^- 等, 因此可用相应的基本传感器加以检测。

酶工程与微生物学、生物化学、化学和工程学等学科有着密切的联系, 是一门综合性科学。它主要涉及工业、医学等方面有应用价值的酶类和具有特殊性质的酶类的开发和生产, 包括提高在工业上有重要用途的酶的生产水平。酶工程中开发生产的酶主要有六大类, 即氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂解酶类、连接酶类和异构酶类, 其中以水解酶的种类最多, 占 85%。

酶工程的主要任务是: 通过预先设计, 经过人工操作控制而获得大量所需的酶, 并通过各种方法使酶发挥其最大的催化功能。

酶工程主要采用两种方法。一是化学酶工程, 即通过对酶的化学修饰或固定化处理, 改善酶的性质以提高酶的效率和降低成本, 甚至通过化学合成法制造人工酶; 另一种是生物酶工程, 即用基因工程技术生产酶以及对酶基因进行修饰或设计性能稳定、具有新的生物活性及催化效率更高的酶。化学酶工程也可称为初级酶工程, 是指天然酶、化学修饰酶、固定化酶 (immobilized enzyme) 及人工模拟酶的研究与应用。生物酶工程是在化学酶工程基础上发展起来的, 是酶学和以重组 DNA 技术为主的现代分子生物学技术相结合的产物, 因此它亦可称为高级酶工程。生物酶工程主要包括三个方面: ①用重组 DNA 技术 (即基因工程技术) 大量地生产酶 (克隆酶); ②对酶基因进行修饰, 产生遗传修饰酶

(突变酶)；③设计新的酶基因，合成自然界不曾有过的、性能稳定、催化效率更高的新酶。

酶工程是研究酶的生产和应用的一门新兴学科，其应用范围已遍及食品、轻工、化工、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。

第二节 酶工程发展历史

化学工业生产大量的化工产品，极大地丰富了人们的生活，为人类社会的发展作出了重要贡献。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，远远超过一般化学催化剂；酶的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，充分发挥它的高效、专一、节能的特点，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，从而推动了酶工程的迅速发展。

酶工程是在人类原始的应用酶的催化作用的基础上逐渐发展起来的。酶的应用已有几千年的历史。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。

19 世纪 30 年代德国科学家 Schwann 发现了胃蛋白酶 (pepsin)，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。微生物酶的生产是 1884 年日本人 Takamine 首先开发的。Takamine 首先从米曲霉中制得高峰淀粉酶，后来在美国开设制药厂生产高峰淀粉酶用于棉布退浆和用作消化剂，开创了有目的地进行酶的生产 and 应用的先河。

1908 年，德国的 Rohm 等人利用胰腺制得胰酶，用于皮革的软化。1911 年美国的 Wallerstein 制得木瓜蛋白酶，用于除去啤酒中的蛋白质浑浊。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. Sumner 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, 人们才逐步认清“庐山真面目”, 意识到酶的重要作用, 现代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起来。然而在近半个世纪的时间内, 仍旧停留在从动物、植物或微生物细胞和组织中提取酶并加以利用的阶段。这种方法工艺较繁杂, 加上当时生产力落后, 所以难以进行大规模的工业化生产。

1949 年, 日本采用液体深层培养法进行细菌 α -淀粉酶的发酵生产, 揭开了近代酶工业的序幕, 使酶制剂的生产和应用进入了工业化阶段。从此, 蛋白酶、果胶酶 (pectic enzyme 或 pectinase)、转化酶等相继投入市场。

20 世纪 50 年代以来, 酶的应用技术有了很大的进步。20 世纪 50 年代酶制剂的生产有了迅速发展, 这一时期主要是溶液酶的应用; 20 世纪 50 年代以后, 随着生化工程的发展, 大多数酶制剂的生产已转向微生物液体深层发酵的方法。由于微生物种类繁多, 生长繁殖迅速, 可在任何季节、任何地理环境下进行生产, 从而使酶的生产得到大规模的发展。

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 5'-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。

20 世纪 50 年代, 尽管酶的应用有了很大发展, 但与酶学研究的进展相比, 其发展还是缓慢的, 主要原因是由于酶的生产和应用技术落后。由于酶的分离纯化比较复杂, 分离的酶稳定性显著下降, 并且采用在水溶液中进行分批反应, 反应后的酶很难回收, 致使成本很高, 因此阻碍了酶应用的进一步发展。

1960 年, 法国的 Jacob 和 Monod 提出了操纵子学说, 从而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。通过酶的诱导和去阻遏, 可以显著地提高酶的产量。

20 世纪 60 年代, 固定化酶技术的工业应用是酶工程发展的重要转折点。作为生物催化剂, 酶具有大多数化学催化剂所不具备的优点。但在酶的应用过程中, 人们注意到酶的一些不足之处。例如, 酶的稳定性较差, 对热、强酸、强碱、有机溶剂等不稳定; 通常是在水溶液中与底物作用, 所以酶只能使用一次, 同时酶蛋白在反应液中与产物混在一起, 也使产物的分离纯化较为复杂。对此, 为了更好地发挥酶的催化功能, 人们尝试了各种方法, 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, 以满足人们对酶使用的要求。方法之一就是固定化酶的研究。固定化酶就是采用化学或物理的方法将酶与高分子材料等载体结合, 使酶性能稳定, 是一种使用方便的酶制品。酶经过固定化后具有许多优点, 如提高了稳定性; 在反应后容易将酶和底物、产物分开; 不仅使酶可以在较长时间内反复使用, 而且还可以采用装柱等连续反应的方法应用于生产; 反应终点容易控制, 从而使生产工艺实现自动化和连续化, 大大提高了酶的使用效率。其实早在 1916 年, Nelson 和 Griffin 就发现了蔗糖酶结合于骨炭末上仍具有蔗糖酶的活力, 但并未引起人们的

注意,而有效地进行酶固定化的研究是从 20 世纪 50 年代开始的。1953 年,Grubhofer 和 Schleith 将一些酶(如羧基肽酶、淀粉糖化酶、胃蛋白酶和核糖核酸酶)用重氮化聚氨基聚苯乙烯树脂进行固定化。但 20 世纪 60 年代以前,有关固定化酶的研究报告没有超过十篇。直到 1969 年千畑一郎首先在工业上应用固定化氨基酰化酶拆分 DL-氨基酸(amino acid)制造 L-氨基酸,各国科学家才对固定化酶给予广泛的注意并进行积极的研究。

1971 年,在美国召开了第一届国际酶工程会议,使固定化技术在 20 世纪 70 年代迅速发展起来。固定化细胞技术沿用了固定化酶的方法,是工业应用酶或酶系的一条新捷径。固定化细胞技术适用于胞内酶,可免去破碎细胞提取酶的步骤;酶在细胞内保持原始状态,稳定性比较好;反应的范围较广,可用于多酶反应;此外,亦具有连续使用等优点。1973 年,千畑一郎等首先成功地在工业上应用固定化细胞连续生产 L-天冬氨酸。此后研究范围日益扩大,应用固定化细胞由延胡索酸生产 L-苹果酸。此外,由葡萄糖生产高果糖浆亦实现了工业化生产,从而带动了淀粉深加工工业的兴起,工业用酶开始大量需要,使酶制剂工业出现重大转机。1978 年,日本的 Suzuki 等人用固定化细胞生产 α -淀粉酶获得成功。此后,用固定化细胞生产蛋白酶、糖化酶、溶菌酶、天冬酰胺酶、果胶酶等的研究亦蓬勃展开。

由于固定化细胞只能用于生产胞外酶等容易分泌到细胞外的产物,对于胞内酶及其它胞内产物的生产则必须采用 20 世纪 80 年代中期才发展起来的固定化原生质体技术。因为细胞中许多物质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其主要原因之一。因此,若能除去细胞壁这一扩散障碍,就有可能使较多的胞内物质分泌到胞外。从 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发酵生产磁性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、谷氨酸脱氢酶等相继取得成功,为胞内酶的连续生产开辟了新的途径,同时还对固定化增殖细胞、包括辅助因子(cofactor)再生的固定化多酶反应体系进行了研究。

1982 年,Cech 等人发现四膜虫细胞的 26s rRNA 前体具有自我剪接功能。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科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。

第三节 酶工程的研究概况及发展前景

近年来,酶工程的基础研究和产业应用发展得非常迅速,正在或即将改变人们的生活和生产方式。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物理化学技术的长足发展,特别是由于蛋白质工程、基因工程和计算机信息技术等的发展,酶工程技术得到了迅速发展和应用,各种新成果、新技术、新发明不断涌现,酶工程已成为生物工程的重要方面。

近年来,酶工程的基础研究取得了长足的发展,开发了相当多的极端环境微生物;开发了许多关于酶化学和遗传修饰的切实可行的新方法和新理论,极大地推动了人工模拟酶和合成酶的研制;在酶的固定化方面,不仅新载体和新方法层出不穷,而且也提出了许多

酶固定化的新机理,发展了细胞固定化技术和原生质体固定化技术;酶基因的克隆与表达成果迭出;酶的遗传设计理论也逐渐成熟;各种酶的应用技术不断拓展,使酶工程不断向广度和深度发展,显示出广阔而诱人的前景。在此,仅就目前酶工程研究领域的“热点”和前沿课题作一概述。

一、新酶的研究与开发

随着酶工程的发展,目前已知的酶已不能满足人们的需要,研究和开发新酶已成为酶工程发展的前沿课题。新酶的研究与开发,除采用常用技术外,还可借助基因组学和蛋白质组学的最新知识,借助 DNA 重排和细胞、噬菌体表面展示技术等。目前最令人瞩目的新酶有核酸类酶、抗体酶和端粒酶等。

1. 自然酶的开发

据估计,自然界中存在着 7000 多种自然酶,目前已经发现和鉴定的有 3000 余种,小批量生产的商品酶有几百种,大规模生产的有几十种。目前已应用于工业生产的主要是水解酶、凝乳酶、果胶酶、糖苷酶、氧化酶、转移酶及异构酶等。当前与生产密切相关的酶的研究备受关注,主要包括以下几个方面。

(1) 糖生物工业:目前研究的热点是功能性低聚糖的开发,而在此领域内各种低聚糖水解酶的开发已成为关键因素,如催化水解菊粉生产果糖的菊粉酶的研究备受关注,据报道,中国农科院王建华等已筛选到一株高产菊粉酶的菌株。

(2) 能源工业:由于纤维素类可再生资源的广阔利用前景,从而导致对纤维素酶、漆酶和木素酶的大规模研究,目前已开发出了里氏木霉、白腐真菌等优良的产酶菌株。

(3) 饲料工业:有广阔应用前景、能水解植酸的磷酸酶类是此领域的研究热点,特别是植酸酶,其作为一种新型的动物饲料添加剂用酶制剂,对提高饲料中磷的利用率和减轻环境污染有着重大意义。最近的研究主要集中在高酶源、高热稳定性的菌株筛选等方面。

(4) 医药行业:药用酶、抗体酶和酶标药物的研究开发及新型的溶栓酶、艾滋病毒蛋白酶等的研究备受关注。例如,南京农业大学董明盛筛选到一种新型的溶栓酶——纳豆激酶高活力菌株。另外,位于真核细胞染色体末端由重复 DNA 序列和蛋白质组成的端粒与细胞的寿命和癌变有密切关系,端粒酶(telomerase)在端粒中起着重要的催化作用,有关端粒的结构和端粒酶的催化机制的研究已经成为自然酶的研究热点之一。

目前,自然酶开发的宝藏是极端环境微生物和不可培养微生物。在极端环境下存在许多嗜极菌(extremophiles),具有特殊的生理功能。例如嗜热菌(hyperthermophiles)的生长温度最高可达 300℃,嗜冷菌(psychrophiles)的最适生长温度为-10~0℃,嗜盐菌(halophiles)生长于饱和盐水中,嗜酸菌(acidophiles)、嗜碱菌(alkaliphiles)能生长在 pH1 以下和 pH11 以上,嗜压菌(barophiles)的生长压力最高可达 104.88MPa 等。另外,有些嗜极菌生长于含有一种以上环境参数的极端环境下。迄今为止已发现 60 多种嗜热的细菌和古细菌。这些微生物的代谢过程和特殊的生物学功能是由极端条件下的酶和蛋白质的功能所决定的。从这些极端微生物中分离出来的酶显示了独特的特性,具有极高的耐热、耐酸、耐碱、耐盐、耐有机溶剂及耐表面活性剂性能,这些酶称为极端酶(extremozymes),其催化性能优于目前在工业生产中采用的各种酶,因此可将这些酶作为设计和构造工业上具有新特性的蛋白质模型而加以应用。

2. 核酸类酶的研究与开发

核酸类酶的研究与开发也越来越受到人们的重视。核酸类酶是一类由核糖核酸(RNA)组成的酶。它是一种多功能的生物催化剂,不仅可以作用于RNA和DNA,而且还可以作用于多糖、氨基酸酯等底物。核酸酶还可以同时具有信使编码功能和催化功能,以实现遗传信息的复制、转录和翻译,是生命过程中最简单、最经济、最原始的催化核酸自身复制和加工的方式。核酸酶具有核酸序列的高度特异性,这种特异性使核酸酶具有很大的应用价值。只要知道某种核酸酶的核苷酸序列,就可以设计合成催化其自我切割和断裂的核酸组成。根据这些基因组的全部序列,就可设计并合成出防治由这些病毒引起的人、畜和植物病毒病的核酸酶,如能够防治流感、肝炎、艾滋病和烟草花叶病等。核酸酶也可以用来治疗某些遗传病和癌症,以及用作研究核酸图谱和基因表达的工具。

据研究报道,一种发夹型核酸类酶,可使艾滋病毒(HIV)在受感染细胞中的复制率降低90%,在牛血清病毒(BLV)感染的蝙蝠肺细胞中也观察到核酸类酶具有抑制病毒复制的效果。这些研究表明,适宜的核酸类酶或经过人工修饰的核酸类酶可以阻断某些不良基因的表达,有可能发展成为基因治疗药物或治疗艾滋病等病毒性疾病的药物。

人类对核酸类酶的研究历史不长,现有研究都还处于其酶学特性的探索阶段,有关其生产和应用的研究还是空白。

3. 抗体酶的研究与开发

抗体酶又称为催化性抗体(catalyzed antibodies),是一类具有生物催化功能的抗体分子。抗体是由抗原诱导产生的,能与抗原特异性结合的蛋白质。预计人体的免疫系统具有产生10万种抗体的能力。只要在抗体与抗原的结合部位赋予酶的催化特性,抗体就有可能成为具有催化活性的抗体酶,其中有些是原本在自然界不存在的新酶。

抗体酶可以采用诱导法,也可采用修饰法获得。修饰法是采用分子修饰技术,将抗体结合部位的结构改变成为酶分子的活性中心,从而产生有催化活性的抗体的方法。诱导法可以采用某种酶为抗原,诱导生成该酶的抗体,再以该酶的抗体为抗原,诱导抗抗体的产生。这样,抗抗体的结合部位与作为抗原的酶的活性中心具有相同的构象,就有可能筛选得到抗体酶;也可以采用某种化合物为半抗原,将它与蛋白质相结合后作为抗原,诱导抗体酶的产生。

目前,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、抗癌药物的制备等。人们正致力于进一步提高抗体酶的催化效率,期望在深入了解酶的作用机理以及抗体和酶的结构和功能的基础上,能够真正按照人们的意愿,构建出具有特定催化活性和专一性、催化效率高、能满足各种用途需要的抗体酶。

抗体酶将成为本世纪新酶研究开发的重要方面。

4. 端粒酶的研究与开发

端粒酶(telomerase)是催化端粒(telomere)合成和延长的酶,与细胞的衰老及癌症的发生有很大关系。端粒能保护真核生物染色体DNA免遭破坏。由于细胞中存在各种破坏染色体DNA的不良因素,加上真核生物中存在的“末端复制问题”,即复制酶在每一次复制后都在DNA的5'-末端留下一段空隙(RNA引物降解后留下的空隙),若细胞无法填补这些空隙,染色体DNA就将随每一次细胞分裂而缩短,直至DNA被破坏而引起细胞凋亡。端粒的存在不但可以避免外界因素对DNA的破坏,而且还可在复制过程

中,通过牺牲自我而保护染色体 DNA 的完整。自一出生,人的正常体细胞内就有很长的端粒,但却检测不到端粒酶的活性(生殖细胞和干细胞除外),所以正常体细胞的端粒不能延长,只会不断缩短,直至生命结束。可见端粒酶与人的衰老有密切关系,端粒酶的研究对延缓衰老有重要意义。在各种癌细胞中都可检测到很强的端粒酶活性,因此癌细胞能不断分裂而不会自然凋亡。研究、开发端粒酶的抑制剂,将在癌症治疗方面开创崭新的局面。

另外,也可以绕开菌种分离、纯化等步骤,应用最新分子生物学方法,直接从采用常规培养方法培养不出来的微生物中,探索、寻找有开发价值的、新的微生物基因和新的酶种。

二、化学酶工程

1. 酶的化学修饰

酶的化学修饰是指利用化学手段将某些化学物质或基团结合到酶分子上,或将酶分子的某部分删除或置换,以改变酶的理化性质,最终达到改变酶的催化性质的目的。随着基因工程、分子生物学、蛋白质工程、有机合成等技术的飞速发展,酶的大分子物质化学修饰技术也发展起来,并且在修饰剂的选用和修饰方法上有了较大进展。酶的化学修饰方法主要有以下几种。

(1) 修饰酶的功能基团:如修饰酶分子中的氨基、羟基、咪唑基等可离解基团,由此发展出酰化法、烷基化法、丹磺酰氯法等。

(2) 酶分子内或分子间交联:应用某些双功能试剂分子两端的功能基团(如醛基等)可使酶分子内或分子间肽链的两个游离氨基分别发生交联,主要有右旋糖苷溴化氰法、羰二亚胺法、戊二醛法等。

(3) 酶与高分子化合物结合:酶与高分子化合物结合的方法主要有聚乙烯醇法、聚顺丁烯二酸酐法等。酶与高分子化合物结合后,可以增加酶的稳定性。例如 α -淀粉酶在65℃时的半衰期为2.5min,当其与葡萄糖结合后,半衰期延长至63min。常用修饰剂主要有乙酸酐、氮芥类、磷氧酰氯、环氧丙烷、重氮盐类、羟胺等,其中连四硫酸钠(钾)作为温和的氧化修饰剂,吸引了大量学者对连四硫酸盐类修饰剂的研究。

由于化学合成和化工过程几乎都在有机溶剂中进行,而有机溶剂往往被认为会引起酶的失活,但利用化学修饰技术改造酶,就能使其催化有机相中的反应。对此,人们展开了大量研究,已涉及到众多类型的反应,如碳氮、碳氧及磷氧键等的断裂、合成、氧化、异构化及分子重组等。特别是在对映体选择降解、非对映体裂解和手性化合物的合成与拆分等方面,化学修饰酶显示了巨大的威力。酶的有机合成在生产上的作用越来越突出,如非水介质中酶的构象、反常介质中酶与底物的结合与催化等。

2. 酶的固定化

近年来,在酶固定化的基础上,细胞固定化技术、固定化多酶技术及反应器、固定化微生物多酶反应系统、固定化酶-微生物复合物等技术相继发展起来。以往报道酶的固定化方法有几百种,切实可行的主要有吸附法、包埋法、交联法、微胶囊法等。酶固定化的进展主要体现在以下几个方面。

(1) 新载体:新载体的研制异常活跃,如纤维素、淀粉、黄原胶、几丁质、海藻酸