

肉碱的合成;菌体浓度、菌龄、底物浓度对 L-肉碱的合成都有影响。如大肠杆菌 O44K 74 菌株用好氧培养“增殖转化”的方法,底物转化率为 13.3%,在添加延胡索酸时转化率提高到 21.8%,在添加硝酸钾时转化率降低到 1.8%;而用好氧培养“静止转化”的方法,底物转化率达到 24.4%^[15]。又如大肠杆菌 IF03301 菌株用不诱导好氧培养“静止转化”的方法,底物转化率仅为 2.8%;而用诱导厌氧培养“静止转化”的方法,底物转化率高达 50.4%^[16]。

β -脱氢肉碱 (β -dehydrocarnitine) 的利用: Jean-Paul 从恶臭假单胞菌 T1 (*Pseudomonas putida* T1) 中提取肉碱脱氢酶用于转化 β -脱氢肉碱,获得 95% 的底物转化率和 45 g/L 的 L-肉碱^[17]。Jerome 等人研究了此反应系统的最适离子强度,结果在 0.788mol/L 的离子浓度下底物转化率达到 98%,而在 0.28mol/L 的离子浓度下底物转化率仅为 14%^[18]。Jerome 等人用 868 单位的肉碱脱氢酶转化 1 mol/L β -脱氢肉碱,获得 98% 的底物转化率和 1.67g/(L·h) 的 L-肉碱^[19]。Patrick 报道了用肉碱脱氢酶连续催化生产 L-肉碱的研究,获得 81% 的底物转化率和 48.3g/h/L 的 L-肉碱^[20]。

目前 L-肉碱的生物合成还处在研究阶段,尚未形成工业化生产。上述种种方法各有特点。总的来说用生物酶法生产产量和底物转化率都相对较高,但由于酶和辅酶因子价格昂贵、

反应条件要求严格等原因,还较难商业化生产;用微生物法生产产量和底物转化率都相对较低,需要通过菌株的选育和方法上的改进来加以提高;一些转化底物如各种肉碱酯类衍生物和巴豆甜菜碱由于化学合成比较容易而且价格低廉,因而是很有前途的,但是像丁基甜菜碱那样价格较贵的转化底物就商业上而言并不十分理想。总之,选育高效转化能力的微生物菌株,寻找廉价的转化底物,确立最适转化条件将是今后 L-肉碱生物学法生产的发展方向。

参 考 文 献

- 1 Bremer J. *Physiol Rev*, 1983; **63**: 1420
- 2 Bieber L L. *Ann Rev Biochem*, 1988; **57**: 261
- 3 Siliprandi N *et al. Clinica Chimica Acta*, 1989; **183**: 3
- 4 Hughes R E. *Med Sci Res*, 1988; **15**: 721
- 5 Kleber H P *et al. Arch Microbiol*, 1977; **112**: 201
- 6 Miura-Fraboni J *et al. Fems Microbiol Lett*, 1983; **18**: 113
- 7 Charles S J *et al. PCT Int Appl*, 1985; **WO 85 04**: 900
- 8 Charles S J *et al. U S Pat*, 1988; **US 4**, 751: 182
- 9 Dropsy E P *et al. Biotechnol Bioeng*, 1984; **26**: 911
- 10 河村昌男 *et al. 公開特許公報*, 1987; **昭62**: 118899
- 11 中山清 *et al. Ger Offen*, 1988; **DE3**, 728: 321
- 12 中山清 *et al. Eur Pat Appl*, 1989; **EP319**: 344
- 13 Hans K *et al. Eur Pat Appl*, 1984; **EP158**: 194
- 14 库拉基·卡巴扎. *公開特許公報*, 1982; **昭57**: 39791
- 15 海耳曼·扎衣姆 *et al. 公開特許公報*, 1985; **昭60**: 137295
- 16 河村昌男 *et al. 公開特許公報*, 1986; **昭61**: 234794
- 17 Jean-Paul V *et al. Appl Environ Microbiol*, 1980; **39**: 327
- 18 Jeroms S *et al. Fr Demande*, 1988; **FR2**, 605, 516
- 19 Jerome S *et al. Fr Demande*, 1989; **FR2**, 612, 325
- 20 Patrick C *et al. Fr Demande*, 1989; **FR2**, 623, 520

酶 稳 定 化 研 究 进 展

罗 贵 民

(吉林大学酶工程实验室, 长春130023)

提 要

酶稳定性研究无论对阐明酶结构与功能关系, 还是对酶在生物工程中的应用都

有重要意义。文章概述了迄今开发的酶稳定化方法,并比较了各种方法的优缺点,提出酶稳定化的标准,强调了最近在酶稳定化研究中所取得的进展。

关键词 酶,酶稳定化,稳定化方法

酶的专一性强,在温和条件下有高效催化化学反应的能力,使酶在医药、化工、食品工业及分析服务行业等领域获得了广泛的应用。但酶的明显弱点是稳定性差。各种因素如物理因素(温度、压力、光、磁场),化学因素(氧化、还原、溶剂、金属离子、离子强度、pH)和生物学因素(酶修饰和酶降解),均有可能使酶丧失生物活力。酶的这个弱点常常限制了酶的应用。

酶在体内失活的最普通的形式是酶修饰,特别是蛋白酶的蛋白水解作用^[1]。由于这种作用,注入体内的药用酶的半寿期常相当短(10—20min),因此,临床上要多次连续注射。如能采取措施,使酶能抵抗蛋白水解作用,则可提高医用酶的药效;若能把抗蛋白水解作用和抗低pH作用偶联在一起,则可制成口服医用酶。工业用酶的热稳定性对生产特别重要,如淀粉酶要耐高温。作为洗涤剂成分的蛋白酶和脂肪酶,不仅要耐较高温度,还要耐受漂白剂的氧化作用。用于有机合成的酶还要耐受有机溶剂的变性作用。近年来,酶稳定化研究越来越引起人们的重视。本文概述目前采用的酶稳定化方法,介绍这个领域的某些进展。

1 酶稳定化的方法

1.1 选择法 传统方法是从在极端条件(极端温度、pH、盐浓度等)下生长的微生物中筛选出“天然”存在的稳定的酶。用这种方法已找到数种稳定的酶。然而,严格地说,这不能算是一种稳定酶的“方法”,这种方法的局限性很大:一是微生物在极端条件下表达的有用酶的酶谱较窄;二是表达出的酶的活力和专一性可能发生改变。但是,这种方法可以帮助我们了解酶稳定化的机理。已经发现,酶稳定性增加是与酶分子内部结构的改变(如巯基交联)相关的。其它蛋白质或多胺与酶作用,可增加酶在体内的稳定性,但酶的固有稳定性并不改变^[2]

1.2 人工模拟法 使用这种方法必须对酶的催化作用机理有充分的了解。目前发表的大多数人工酶在模拟底物束缚上相当成功,但催化速度远不及天然酶。然而最近有一相当成功的人工酶,叫作 β -benzyme,可以模拟胰凝乳蛋白酶,其催化效率与天然酶在同一数量级^[3]。这个模拟物由 β -环糊精和催化侧链组成。 β -环糊精具有束缚底物的能力,而其催化侧链正好含有该酶活性部位的三种成分:羟基、咪唑环和羧酸离子,而且各基团所处的位置合适。由于模拟酶不含氨基酸,所以其热稳定性与pH稳定性都大大优于天然酶。

1.3 蛋白质工程法 这个方法大有希望,因为它提供了有目的改变酶的可能性,不仅可以改变酶的结构,也可改变酶的催化活力(专一性)及稳定性。先通过对酶结构的清楚了解,选定突变部位,然后在体外构建具有功能活性的基因结构(重组DNA),再把它们加入到细胞中,通过外源细胞生物合成新酶。新酶的结构与母体分子只有一个或几个氨基酸残基的差别。最近用定点突变与体内随机突变相结合的方法,使枯草杆菌蛋白酶的稳定性大为增加^[4]。显然,蛋白质工程并不简单,使用此法的费用也是相当昂贵的,因此,其它酶稳定化方法仍能成功地与蛋白质工程法相竞争。

1.4 非共价表面修饰法 用适当的口袋包埋酶或使酶微囊化,可使酶在不利环境下有效地起作用。反相胶团最易提供这种微囊化^[5]。反相胶团是由两性化合物在占优势的有机相中形成的。视溶剂和表面活性剂的组成,可在与水不混溶的溶剂中得到微乳化的反相胶团。反相胶团不仅可以保护酶,而且还能提高酶活力,改变酶的专一性^[6]。事实上,在保证酶有效作用所必需的水量的前提下,酶在有机溶剂中的稳定性比在水中更稳定。例如,在干燥的三丁酸甘油酯中的脂肪酶相当稳定,100℃时的半

寿期大于 12h, 而水含量大于 1 % 时, 酶立即失活^[7]。

添加物与酶的非共价相互作用能有效地保护酶。水溶性聚合物(聚乙二醇、右旋糖酐等)既能通过氢键固定在酶表面, 也能通过氢键有效地与外部水相连。其它添加物(如多元醇、多糖、多聚氨基酸等)相信也是通过调节酶的微环境来保护酶活力的。包埋在聚丙烯酸凝胶(浓度大于 30 %)中的胰凝乳蛋白酶, 由于聚丙烯酸的羧基与酶分子形成的静电键和氢键在凝胶中得到加强, 因而酶的热稳定性剧增。凝胶浓度达到 50 % 时, 稳定化效应可增加 10^3 倍^[8]。

1.5 蛋白质间非共价相连 蛋白质间相互作用时, 由于从蛋白质表面相互作用区域排除水, 因而降低自由能, 增加蛋白质的稳定性。有些来自嗜热菌的酶具有较高稳定性, 是由于保护性大分子(如肽和聚胺)发挥作用的结果。酶的多聚体或酶的聚合体的活力和稳定性也常比其单体高^[9]。

最近, 在这方面有了新进展, 就是用抗体来稳定酶。有些抗体可以在蛋白质开始伸展的部位或发生蛋白质水解的部位起作用, 因此, 可以稳定蛋白质。例如 α -淀粉酶与其抗体的复合物在 70℃ 时的半寿期为 16h, 而天然酶的半寿期仅为 5min。抗体保护的酶还有抗氧化、抗有机溶剂、抗低 pH、抗自溶、抗蛋白水解作用^[10]。由于任何一种酶都有它对应的抗体, 制备酶的抗体亦较简单迅速, 所以这种稳定酶的方法具有普遍性。但问题是制备抗体花费较多。解决的办法是用微生物来生产抗体。最近有几个研究小组报告, 已经成功地由大肠杆菌生产具有完整功能的重组抗体片断^[11], 而且出现了用一种微生物既可生产目的蛋白质, 又可生产其抗体的可能性。另一个问题是, 酶-抗体复合物在体内使用时有抗原性。解决的办法一是降低抗体分子的大小, 二是制造嵌合抗体, 即由鼠的可变结构域与人的恒定结构域组成嵌合抗体^[12]。

1.6 固定化法 将酶多点共价连接到支持物的表面, 或用双功能试剂交联酶, 或将酶包埋在支持物里紧密的孔中, 可以使酶构象更加

坚牢, 从而阻止酶构象从折叠态向伸展态过渡。这类固定化有可能使酶的可逆和不可逆热失活及由变性剂引起的可逆伸展, 或寡聚酶解离成活性亚基等过程降低几百倍到几千倍。例如, 固定化的胰蛋白酶的稳定性比游离酶高 1000 倍; 而固定化的脂肪酶与可溶性酶相比, 稳定性提高 140 倍^[13]。

固定化还能保护酶不因蛋白质间相互作用(如自溶或聚合)而失活, 同时也能抑制酶的化学失活。例如, 氢酶固定到多价电解质支持物上时, 由于多价电解质的盐析效应阻止了氧自由扩散到载体上, 因此, 可以高度稳定对氧不稳定的氢酶。选择能与酶竞争失活剂或使失活剂分解的载体, 也能使酶稳定化。例如, 若酶失活是由 H_2O_2 或超氧离子引起, 则可将过氧化氢酶和过氧化物酶(作为分解失活剂的催化剂)一起固定在载体上^[14]。

将可溶性大分子, 如聚乙二醇、右旋糖酐或白蛋白等共价结合到酶分子上, 能增加酶抵抗蛋白水解作用的能力, 因而可延长酶在体内的半寿期, 同时也有降低抗原性的作用^[15]。但是, 这种方法和所有其它需要随机共价偶联的方法一样, 可能会修饰酶的活性部位, 使酶失活。所以, 必须事先了解酶活性部位结构或采取必要的措施, 保护酶活性部位。

1.7 化学修饰法 用小分子共价修饰酶, 可使酶稳定。这里概述几种情况: a. 化学修饰可将酶构象转变成不同于天然酶的更稳定的构象。此法较难, 因为由化学修饰引起的构象变化特征一般是很难预测的。b. 修饰酶的“关键”功能基也会使酶稳定化。例如, 修饰 α -胰凝乳蛋白酶时, 酶的热稳定性并不是随着氨基修饰数目的增加而显著增加。当达到临界值时, 稳定性突然增加。这是因为当修饰程度低时, 即修饰剂刚过量时, 仅修饰酶表面的在结构上非必需的氨基; 如果修饰剂太过量, 则处于蛋白球体内部的氨基也要被修饰。修饰这些残基似乎能改善蛋白质分子内部相互作用的平衡, 从而导致酶稳定。然而, 使用这种方法的问题是, 首先要决定哪一个功能基是关键基团, 这很难根

据蛋白质的三维结构来决定。关键基团要通过蛋白质稳定性对修饰程度的依赖关系来确定。

c. 化学修饰可将极性或带电基团引入到酶分子中, 形成新的氢键或盐桥, 从而使酶稳定性显著增加。但实现这类实验比较困难。首先要测定蛋白质的三维结构, 寻找可以包含在新的静电相互作用中的带电基团, 然后, 在此基团附近, 选择合适的“锚”功能基, 最后, 选择或合成适当的化学试剂, 它带有能与蛋白质的锚功能基专一反应的基团, 同时还要具有一定距离的带电片断。这些实验显然是很费力的。通过化学修饰消除促进酶伸展的和对酶稳定不利的带电基团, 会使酶稳定性显著增加^[6]。不过这也要事先对酶结构有充分了解。

d. 在蛋白质的疏水核内引入非极性分子, 从而增加蛋白球体内部的疏水性, 可以增加酶的稳定性^[9]。此法的要点是, 用强变性剂使待修饰蛋白质处于伸展状态, 然后按下述三种方法之一改变其结构: 第一, 在“非天然”条件下, 让蛋白质重新折叠, 即在浓盐溶液中, 有机溶剂中或较高温度下, 使蛋白重新折叠。蛋白质可能采纳不同于天然酶的另一种构象, 这种构象仍保持酶的催化活力, 但稳定性提高。例如, 让固定化胰蛋白酶伸展, 然后在较高温度下重折叠, 发现 50℃ 甚至更高温度下重折叠的胰蛋白酶比伸展前的起始酶或在正常温度(20—35℃)下重折叠的酶更稳定^[9]; 第二, 蛋白质也可在底物存在下重折叠, 因为底物可与蛋白质多点非共价相互作用。最有希望的是使用非极性和两性化合物。非极性物在重折叠过程中可包埋在蛋白质的疏水核内, 而两性化合物也可加入到蛋白质中, 其非极性部分与蛋白质的疏水面接触, 而极性或带电部分暴露于溶剂; 第三, 可用化学试剂修饰伸展蛋白质, 然后重折叠。目前这种方法正在积极开发之中^[17]。

e. 增加酶表面的亲水性、降低酶表面的疏水性, 可显著提高酶稳定性。用苯四酸酐酰化 α -胰凝乳蛋白酶, 是通过亲水化达到稳定化的很成功的例子^[18]。此试剂主要修饰酶的氨基。修饰酶分子的任一氨基可引入 3 个新的羧基。在酶热失活的微碱性 pH 下, 所有羧基都电离, 酶表面

高度亲水化。在 60℃ 时, 酶稳定化效应提高 1000 倍。这种稳定化效应以前只在酶多点束缚到载体上见过^[19]。用苯四酸酐修饰的 α -胰凝乳蛋白酶的稳定性实际上等于极端嗜热菌蛋白酶的稳定性, 它是目前已知的最稳定的蛋白水解酶。

2 疏水固定化法稳定酶

这是我室最近开发的一种酶稳定化方法。根据 X 射线晶体衍射数据得知, 大约蛋白质表面积的一半是由非极性氨基酸占据着。非极性残基常构成疏水表面簇。这些疏水表面簇对蛋白质在体内发挥生理功能起着重要的作用, 然而从热力学角度看, 疏水表面簇与水接触, 则对体外蛋白质的稳定性是不利的, 会使酶不稳定^[20], 因此, 减少蛋白质的非极性表面积应能稳定蛋白质。要做到这点, 目前有两种方法: 一是用蛋白质工程法对蛋白质表面残基进行突变, 但此法目前仍很复杂; 二是用化学修饰法, 使蛋白质亲水化。此法简单易行。这里又分几种情况: 一是前面提到的将相对亲水的基团(如氨基)转变成亲水性更强的基团; 二是用亲水性试剂修饰非极性表面簇附近的残基, 修饰结果使亲水性试剂能屏蔽住非极性表面簇^[19]; 三是用亲水性试剂直接修饰疏水性氨基酸, 但疏水性氨基酸常带有脂肪族或芳香族侧链, 难于修饰。只有酪氨酸和色氨酸可以进行这种亲水化反应。我们的方法是先将疏水性基团引入可溶性的亲水性载体上, 再与酶混合, 则载体上的疏水基团与酶分子表面的疏水簇发生疏水相互作用。这样, 酶分子的非极性表面簇就被亲水性更强的载体所掩盖, 从而增加酶分子表面的亲水性, 也就提高了酶的稳定性。用 α -萘基右旋糖酐和苄基右旋糖酐可分别稳定糖化酶和 α -淀粉酶, 使其储存稳定性明显提高。目前, 这种酶稳定化方法正在开发之中。

3 各种酶稳定化方法的比较

比较各种不同的酶稳定化方法是困难的, 因为使用的模型系统、稳定化机理及试验条件

不同。而且这些方法尚处于开发的早期阶段,基本上仍是经验性的。有时由于保密原因,有些数据也不完整,但可以制定一些一般的标准来进行比较。这些标准应当包括: a. 稳定性至少要增加 1—3 个数量级; b. 应对各种酶失活因素(物理、化学及生物学因素)都有保护作用; c. 稳定化不应减少酶活力或改变酶的专一性; d. 稳定化方法应适合于各类蛋白质; e. 方法应在体内、体外都适用; f. 从经济角度看,方法应具有放大的潜力。

从这些标准看,随机共价修饰的方法(如将 PEG 连到酶上)显然不能令人满意。蛋白质工程法和选择抗体保护法更符合这些标准,具有普遍性。从难易程度和花费上看,后者显然优于前者。疏水固定化法虽然刚刚用于酶稳定研究,但具有普遍性。固定化对酶活力影响很小,更主要的是,此法简单易行,一般的实验室容易做到。我们相信,增加酶稳定性的新方法和新观念将进一步鼓励旨在这方面研究、并在实践中获得应用。

参 考 文 献

- 1 Tombs M P. *J Appl Biochem*, 1985; 7: 3
- 2 Oshima T. *J Biol Chem*, 1982; 257: 9913
- 3 D'Souza V T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 673
- 4 Bryan P *et al. J Cell Biochem UCLA Symp Mol Cell Biol*, 1989; Suppl. 13A: 66
- 5 Luisi P L. *Angew Chem Int Edn Engl*, 1985; 24: 349
- 6 Srivastava R S. *et al. Biotech Bioeng*, 1987; 29: 901
- 7 Zaks A *et al. Science*, 1984; 224: 1240
- 8 Martinek K *et al. Biochim Biophys Acta*, 1977; 485: 13
- 9 Mozhaev V V *et al. Enzyme Microb Technol*, 1984; 6: 50
- 10 Shami E Y *et al. TIBTECH* 1989; 7: 186
- 11 Wetzel R. *Protein Eng*, 1988; 2: 169
- 12 Cheetham J. *Protein Eng*, 1988; 2: 170
- 13 Otero C *et al. Appl Biochem Biotech*, 1988; 19: 163
- 14 Klivanov A M. *Anal Biochem*, 1979; 93: 1
- 15 Cao S G. *et al. Acta Pharm Sinica*, 1990; 25(10): 732
- 16 Hollecker M *et al. Biochim Biophys Acta*, 1982; 701: 359
- 17 Mozhaev V V *et al. Vestn MGU (Bull. Moscow State Univ.) Ser Khim.* 1986; 27: 304
- 18 Shikshnis V A *et al. Dokl Akad Nauk SSSR*, 1986; 288: 1508
- 19 Mozhaev V V *et al. Eur J Biochem*, 1988; 173: 147
- 20 Martinek K *et al. Adv Enzymol*, 1985; 57: 179

原 核 基 因 工 程 中 的 包 涵 体

徐 明 波 姚 志 建

(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

提 要

包涵体是原核基因工程的特有产物,其中表达的蛋白产物是以无活性、不溶解的形式存在。包涵体特性、蛋白回收及活性恢复是生物工程研究的重要课题。文章对包涵体特性、回收及产物提取、重组蛋白的复性及纯化作了综述。

关键词 包涵体,蛋白复性,基因工程产物

十几年前,人们制备蛋白质的方法还主要依靠从天然组织或细胞中提取。而现在人们可以通过基因工程的方法,在细菌中生产大量有价值的活性蛋白和多肽。然而,许多蛋白质在高表达状态下是以不溶解、无活性的形式存在,它们在细菌胞浆中聚合形成包涵体。对包涵体特性、包涵体蛋白回收以及活性的恢复是生物

工程的重要课题。

1 重组大肠杆菌中包涵体的特性

大肠杆菌中的包涵体由于其密度高,折光性强很容易用相差显微镜或暗视野显微镜观察