

专论与综述

酶 工 程

黄 胜 和

(中国医学科学院基础医学研究所)

酶是最重要的生命物质之一,乃生物体内进行新陈代谢、自我复制、物质的合成、分解及转化所不可缺少的生物催化剂。在常温、常压等温和条件下酶能高度专一地、高效地催化底物发生反应。因此,酶的开发和利用是当代新技术革命中的一个重要课题。最近十多年来,酶在工业和医学上的研究和应用发展非常迅速,现已形成一个专门学科——酶工程^[1,2]。它是酶学基本原理与化学工程技术及基因重组技术有机结合的结果。

酶工程的原始定义主要是指自然酶制剂在工业上的大规模应用^[3]。尽管目前已发现和鉴定的酶约有 2000 种,但大规模生产和应用的商品酶只有 16 种,小批量生产的商品酶仅有 200 种^[4]。自然酶在工业上应用受到限制的主要原因是^[5,6]:(1) 大多数酶脱离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生理环境差别很大;(2) 分离和提纯酶的技术繁琐、复杂,因而酶制剂的成本高、价格昂贵,不利于广泛应用。解决上述问题有两种办法^[1,2]:一种是传统的化学方法,即通过化学修饰或固定化处理,改善酶的性质以提高效率和降低成本,甚至通过化学合成法制造人工酶;另一种是用基因重组技术生产酶以及对酶基因进行遗传修饰或设计新酶基因从而产生性能稳定、催化效率更高的酶。因此,酶工程根据研究和解决问题的手段不同可分为两个部分:化学酶工程和生物酶工程。

一、化学酶工程

化学酶工程亦可称为初级酶工程(primary enzyme engineering),系指自然酶、化学修饰酶、固定化酶及化学人工酶的研究和应用。它主要是由酶学与化学工程技术相互渗透和结合而形成的(图 1)。

(一) 自然酶 从五十年代开始,一些酶由微生物发酵液中分离出来,制成工业酶制剂^[4]。

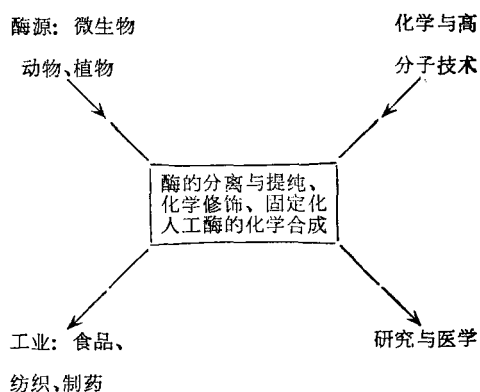


图 1 化学酶工程

这些年来,酶制剂使纺织、食品、医药工业面目一新。例如,化学合成可的松的价格为每克 200 美元,改用酶法合成后降低到每克 46 美分。1978 年四种主要的类固醇激素(可的松、醛固酮、强的松、强的松龙)的世界总产值为 3 亿美元^[7]。目前,随着酶应用范围的扩大及新的具有商品价值的酶的开发,酶制剂的生产每年正以 8% 的速率递增。若依此速度发展,到 80 年代中期,全世界酶制剂的市场销售额将达到 6 亿美元^[8,14]。

工业酶制剂的主要来源是微生物,其次是动物和植物^[1,6,9]。这些未经化学修饰或固定化处理的酶制剂的共同特点是:(1)价格低廉、生产方式简单。大多数酶制剂是由无毒微生物分泌的细胞外酶。这些酶能以部分纯化的形式通过简单过滤从发酵缸中回收,而不需要昂贵的细胞破碎和纯化操作。(2)应用方式不复杂,因为这些酶大多数为粗制剂,性能较稳定,在催化过程中不需要辅助因子参加反应。(3)产品种类少、使用范围窄。国际上酶制剂工业的主要产品是属于水解酶类的蛋白酶和糖酶,前者约占总量的60%,后者接近30%。大约一半的蛋白酶用于食品工业,其余用于制药、制革及酿造工业。按总产值计算,食品工业用酶约占80%^[10]。

(二) 化学修饰酶 这类酶主要用于基础酶学研究和疾病的治疗。治疗用酶制剂往往要求纯度高、性能稳定、低或无免疫原性^[9]。很显然,粗酶制剂不适用于医疗。粗酶制剂经过进一步纯化通常使酶变得愈来愈不稳定。为了使酶达到预想的催化效能,可以通过化学修饰改善酶的性能。常用方法主要有三种^[9]:

1. 修饰酶的功能基 酶分子表面的游离基团如氨基、羧基、羟基等可与某些化学试剂反应从而使酶结构发生改变及酶的性质得到改善。这种化学修饰可消除酶分子中导致变性和催化构象发生改变的不利的静电斥力^[11]。如通过脱氨基作用、酰化或碳化二亚胺反应可修饰抗白血病药物天冬酰胺酶的游离氨基,使该酶在血浆中的稳定性提高若干倍。

2. 交联反应 某些双功能性化合物如二异硫氰酸酯、烷化剂与戊二醛等,可作为交联剂使酶发生分子间或分子内的交联反应。如将人 α -半乳糖苷酶A经交联反应修饰后,其酶活性比自然酶稳定,对热变性与蛋白水解酶的稳定性也明显增加,而酶本身的特性又不丧失。

3. 酶与高分子化合物结合 某些蛋白质、多糖及聚乙二醇等高分子物质与酶结合后,亦可改善酶的性质。例如, α -淀粉酶与葡聚糖结合后热稳定性显著增加。在65℃,结合酶的半

寿期是63分钟,而自然酶的半寿期只有2.5分钟。

(三) 固定化酶 这是一类被束缚在特定的支持物上并能发挥催化作用的酶^[9]。酶的固定化主要有吸附、交联、共价结合及包埋等四种方法。人们对固定化酶的兴趣主要集中在它的生产和分析应用方面,因为它具有一般酶制剂所没有的特点^[6,13]:(1)采用过滤和离心的方法极易将酶与反应液分开,这特别有利于生产上的应用;(2)可以反复使用,在某些情况下甚至可以使用达千次以上,这样极大地节约了成本;(3)稳定性能好。

固定化酶在医药和食品工业上有极大的实用价值,可以改革现有的酶工业和开创新的酶工艺。1969年,日本用固定化氨基酰化酶拆分氨基酸投入工业生产,开创了固定化酶工业应用的新局面^[14]。目前国外已用两个共轭的固定化酶体系把烯烃变成石油化学产品的重要原料环氧烃类,其费用只有化学合成法的一半。日本用酶法生产脂肪酸,已达到了工业生产的规模。固定化酶在食品工业上的最大应用是用固定化的葡萄糖异构酶生产高果糖浆。目前,国外每年用价值4千万美元的固定化葡萄糖异构酶可生产6亿磅高果糖玉米糖浆^[10]。近年来,国内在将固定化酶技术应用于生产的研究上取得了较大的成绩。例如,以固定化酶技术半合成新青霉素已获应用,生产高果糖浆工艺已趋成熟,以固定化酶工艺增产啤酒已显示出其优越性^[12]。

自从六十年代以来,为了检测和调节体液中代谢物质的浓度,应用了附有固定化酶的各种电极,这样的电极称为酶电极^[15]。其中应用的电极部分包括各种离子电极、氧电极和二氧化碳电极等。酶电极既利用了酶的专一性和灵敏性,又利用了电位测定的简单性。目前已有20多种固定化酶用于酶电极中^[6,9]。

国内已有不少关于固定化酶的专著、译著及综述^[6,13,16-18],读者可参阅,本文不赘述。

(四) 人工酶 酶的化学修饰和固定化技术都是在保留自然酶的基本结构的前提下,改善酶的结构和性质以利于它在工业和医学上的

应用。近年来,许多科学家模拟酶的生物催化功能,用化学方法合成了称之为人工酶 (artificial enzyme) 的催化剂。人工酶的制造方法有两种:半合成法^[4]和全合成法^[14,19]。

1. 半合成酶 (semisynthetic enzyme)^[4] 将具有催化活性的金属或金属有机物与有结合特异性的蛋白质相结合,便可形成新的生物催化剂——半合成酶。例如,美国和以色列两位学者 H. Gray 与 R. Margalit 将钌电子传递催化剂 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 与巨头鲸肌红蛋白结合,产生了一种“半合成的无机生物酶”(semisynthetic bioinorganic enzyme)。肌红蛋白可与 O_2 结合,并通过循环系统输送氧气,但没有催化功能。然而,当 3 分子 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 通过肌红蛋白表面的组氨酸残基与之结合之后,形成了能氧化各种有机物(如抗坏血酸)的半合成酶。这种人工酶的催化效率是钌-咪唑复合物的 200 倍,接近于天然的抗坏血酸氧化酶。最近美国洛克菲勒大学 E. T. Kaiser 领导的研究小组成功地合成了一种称为“黄素木瓜蛋白酶”(FP) 的半合成酶。木瓜蛋白酶是从木瓜汁中分离出来的蛋白水解酶。该酶已被详细研究并确定了其空间结构。黄素是一组含氮的三环芳香化合物,能催化许多不同的化学反应。黄素衍生物亦是很多酶反应的辅助因子。实验证明木瓜蛋白酶 25 位半胱氨酸的巯基参与蛋白水解反应。当黄素与此巯基结合后,木瓜蛋白酶丧失了水解活性。Kaiser 等从众多黄素衍生物中制备了多种 FP。其中仅有一种由 8-溴乙酰黄素合成的 FP 效果最佳。此 FP 的催化效率是黄素的一千倍,乃迄今最高效率的半合成酶。它达到了目前已知的、具有最大催化效能的天然黄素氧化还原酶的活性。

2. 全合成酶^[14,19] 这类人工酶不是蛋白质,而是小分子有机物。它们通过并入酶的催化基团与控制空间构象,象自然酶那样能选择性地催化化学反应。例如,由环糊精制成的人工转氨酶能利用 α -酮酸和磷酸吡哆胺特异地合成氨基酸;人工核糖核酸酶可以选择性地水解核糖核酸。目前,这类全合成的人工酶因催化效率低

还不具有实用价值。

二、生物酶工程

生物酶工程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,因此,它亦可称为高级酶工程。自从基因工程技术于七十年代初问世以来,酶学进入了一个十分重要的发展时期:它的基础和应用研究领域正在迅速发生革命性的变化。生物酶工程的诞生充分体现了基因工程对酶学的巨大影响。生物酶工程主要包括三个方面:(1) 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) 设计新酶基因,合成自然界不曾有的新酶。

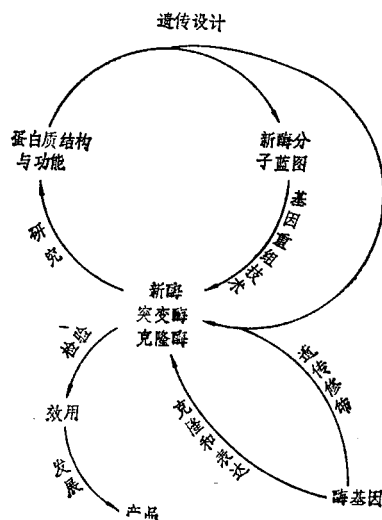


图 2 生物酶工程

(一) 酶基因的克隆和表达 最近十年来,基因工程的发展使我们能轻而易举地克隆各种天然蛋白或酶基因。将克隆的酶基因和适当的调节讯号通过一定的载体(质粒)精确导入便于大量繁殖的微生物中并使之高效表达,然后通过发酵的方法可大量地生产所需要的酶。如前所述,酶在工业和医学上大规模应用受限制的一个重要原因是生产问题。许多酶是细胞内酶,甚至牢固地结合于某些细胞器上。这些酶的分离和提纯比较困难,因而需要很高的成本才能获得酶制剂。某些医用酶制剂来源于人体,如

治疗血栓栓塞病的尿激酶是由人尿提取,治疗溶酶体酶缺陷病的酶必须由人胎盘制备^[9]。因此,这些医用酶制剂的原料来源往往是一个大问题。对于上述制取复杂和来源困难的酶,可用基因工程技术生产。将克隆的酶基因转移到微生物中,同时增加酶基因拷贝数并使之转变为细胞外酶。这种由单一亲本衍生而来的微生物含有大量均一的酶基因,因而它们可作为生物合成工厂,大量提供均一组成的克隆酶。这种克隆技术的简单性和有效性是任何传统的物理化学分离和纯化方法所不能比拟的^[2]。

目前,尿激酶、纤溶酶原激活剂与凝乳酶等的基因均已克隆成功并得到有效的表达,已经或将要投入生产。据文献报道,现已克隆成功的酶基因有一百多种^[8,20,21]。

(二) 酶的遗传性修饰 这是近几年兴起的一个非常活跃的新研究领域^[2,14,22,23]。其实,通过酶基因突变来改变酶活性并非新事物。尤其在制药工业中,借助酶基因的随机突变筛选和改善生产菌株已有很长的历史^[23]。例如,在过去的40年中依靠上述方法已将细菌生产青霉素的工艺改善了一万倍。此例是酶的自然遗传修饰,其性质是随机的。但在酶工程中酶的遗传修饰通常不是随机的,而是研究者按特定目的选择性地修饰酶基因,取代酶分子中的某个或几个氨基酸残基,以改变酶的性质。因此,这一新技术可称为酶的选择性遗传修饰。

为使酶的遗传修饰具有最佳选择性和预见性,必须充分了解酶的结构与功能之间的关系及其规律。首先要弄清酶的一级结构和空间结构以及二者相互关系,其中的关键问题是如何根据一级结构确定空间结构。酶蛋白的氨基酸序列可直接测定或由已知的酶基因核苷酸序列推导。确定蛋白质空间结构的最有力、最常用的工具是X线衍射。目前,尽管依靠现代分析工具确定了许多蛋白质的一级结构和空间结构,并对这两种结构的相互关系作了大量理论研究,但仍不能完全由氨基酸序列预言空间结构^[24]。第二个重要问题是如何由结构推知功能或由功能推知结构。这两方面的理论是指导酶

基因的选择性遗传修饰和设计酶基因蓝图的必要基础^[2,5,25,26]。目前,人们对这两个问题的认识还处于“只见树木不见森林”的阶段。尽管如此,科学家们依据现有的关于蛋白质结构和功能方面的片段知识已揭开了酶蛋白选择性遗传修饰的序幕。

最近,Wilkinson等依据酪氨酰-tRNA合成酶的晶体结构模型成功地完成了该酶的选择性遗传修饰^[22]。酪氨酰-tRNA合成酶(TyrTS)的晶体结构显示第51位苏氨酸残基的侧链羟基与中间底物酪氨酰腺苷酸的AMP部分构成了弱氢键。底物不存在时,该羟基与H₂O形成了有利于酶-底物复合物解离的强氢键。因此,他们对TyrTS的第51位氨基酸进行了选择性遗传修饰,即变该位苏氨酸为丙氨酸(51Thr→51Ala)或脯氨酸(51Thr→51Pro)。结果该位侧链羟基的消除使TyrTS对底物ATP的亲合力显著提高。现将酶选择性遗传修饰的主要进展总结于表1。

表1 酶的选择性遗传修饰^[22]

酶	修饰部位	酶性质的改变
酪氨酰-tRNA合成酶	51Thr→51Ala	对底物ATP的亲合力提高100倍
	51Thr→51Pro	
β -内酰胺酶	70-71 Ser-Thr→ 70-71 Thr-Ser	完全失活
	70-71 Thr-Ser→ 70-71 Ser-Ser	恢复活性
二氢叶酸还原酶	27Asp→27Asn	活性降低为正常酶的0.1%

上述选择性遗传修饰都是由寡核苷酸指导的点突变。此法的基本原理如下^[23]:将连接于质粒上的酶基因去掉DNA的一股链或一小段。用合成的并含选择性取代碱基的寡核苷酸与酶基因位点杂交。然后用DNA聚合酶和连接酶修复第二股DNA链以至酶基因含有突变。最后用常规方法分离出含突变酶基因的质粒。近年来在基因表达和调控的研究中通常应用另一种基因修饰法——基因融合(gene fusion)^[27,28]。例如,将大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因与其他基因的调节序列融合形成杂种基因,由此基因产

生的杂种蛋白仍具有 β -半乳糖苷酶活性。因而它们为检测和控制基因表达提供了一个通用的、酶学上灵敏的遗传学标志。

(三) 酶的遗传设计 DNA合成技术的迅速发展为酶的遗传修饰和遗传设计开创了令人神往的前景。最近,美国两个实验小组用两个月时间成功地合成了长度为500个核苷酸的 γ -干扰素基因,并在大肠杆菌中得到表达^[29]。生长激素、胰岛素及 α -干扰素等小分子蛋白质的基因亦以此法合成并在细菌中获得高效表达。这提示只要有遗传设计图案,就能人工合成酶基因。酶遗传设计的主要目的是创制优质酶,用于高价特殊化学药品和超自然生物制品的生产,以满足人类的其他需要。现在的关键问题在于如何设计超自然的优质酶基因,即如何绘制优质酶基因的遗传设计图案。如前所述,目前尚不能根据蛋白质的氨基酸序列预言其空间结构,但许多学者认为依靠目前的科学技术可以克服这个障碍^[5,23,26]。如实验证明溶液中蛋白质分子的计算机模拟是有发展前途的。实际上,生物大分子的计算机模拟和化学理论已应用于药物设计。随着计算机技术和化学理论的进步,酶或其他生物大分子的模拟在精确度、速度及规模上都会得到改善^[26,30]。这会导致产生有关酶行为的新观点或新理论,并使工程学家能很快地模拟酶及直接观察它们的行为。

三、展 望

在当代日新月异的技术革命中,酶工程具有广阔的发展前景。化学酶工程已在工业和医学领域中产生了巨大的经济效益。固定化酶技术是化学酶工程中具有强大生命力的主干。固定化酶在理论和应用上的潜在作用吸引了生物化学、化学工程、微生物、高分子、医学等各个领域的科研机构及工厂企业科技人员的注意力^[6,9]。它们一旦为工业生产过程所应用,将引起酶工业本身的重大变革。随着固定化酶发展起来的亲和层析已在现代生物化学、分子生物学、医学实验室中广泛应用。这大大促进了基础

理论研究,有利于阐明酶在体内的作用机制。生物体内的重要物质,如蛋白质、核酸、糖、脂类、激素、维生素和抗菌素的合成和转化都依赖于体内的多酶体系,而且这些酶促反应往往需要酶的辅助因子。模拟生物体内的多酶体系,将完成某一组反应的多种酶和辅助因子固定化可制成特定的生物反应器。高效、专一、实用的生物反应器可通过将含酶的微生物、细胞、细胞器固定化制成^[6]。近年来,以固定化微生物组成的生物反应器已获得工业应用。生物反应器的研究不仅具有使生物工业革新的实际意义,而且对推进生物化学、细胞生物学、生理学、仿生学等基础生物科学的研究具有重要的理论意义。

生物酶工程是在化学酶工程的基础上发展起来的,尚处于幼年阶段。前者的主要目的是采用以基因重组技术为主的分子生物学技术改造酶,以期生产满足人类需要的超自然的优质酶。需要改善的酶学性质包括:底物和辅助因子特异性与亲和力;反应的立体化学选择性;反馈抑制;对热、氧化剂及非水溶剂的稳定性;对蛋白水解作用的敏感性;免疫原性;最适pH、离子强度及温度;催化效率;变构效应;多功能性;在纯化或固定化过程中酶的功能和理化性质。酶的化学修饰和遗传修饰将促进酶遗传设计的发展,因为前两者有助于解决关于酶结构与功能关系的长远而又重大的问题^[23,26]。由此得到的经验或理论规律可用于酶的遗传设计。设计酶或蛋白质分子能力的发展将开创从分子水平根据遗传设计书制造超自然生物机器的新时代。

本文承蒙李士谔教授审阅,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Toster, R. L.: *The Nature of Enzymology*, PP. 313—356, Croom Helm, London, 1980.
- [2] Rastetter, W. H.: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 8, 423—436, 1983.
- [3] Chibata, I, et al.: *Enzyme Engineering*, Vol. 6, Pl, Plenum Press, New York, 1982.
- [4] Maugh, T. H.: *Science*, 223, 154—156, 1984.
- [5] Ulmer, K. M.: *Science*, 219, 666—671, 1983.
- [6] 袁中一:《生物科学动态》, 4, 1—19, 1979.
- [7] May, S. W.: and Padgett, S. R.: *Biotechnology*,

可兴奋膜研究中的模型和系统辨识

蔡体导

(中国科学院上海生理研究所)

在线性系统的研究工作中通常可从系统的输入、输出之间的关系中求得动态特性。如图 1a 所示, 当系统输入为 $x(t)$ 时其输出为 $y(t)$, 那末可用

$$\begin{aligned} & a_n y^{(n)}(t) + a_{n-1} y^{(n-1)}(t) + \dots \\ & + a_1 y'(t) + a_0 y(t) \\ & = b_m x^{(m)}(t) + b_{m-1} x^{(m-1)}(t) + \dots \\ & + b_1 x'(t) + b_0 x(t) \end{aligned} \quad (1)$$

这样一个微分方程来表示该系统的动态特性。

常用的脉冲反应函数、阶跃反应函数、传递函数、幅频一相频特性和实频一虚频特性等等实质上都是从输入、输出的关系中求得的系统动态特性。只要系统是线性的, 那末, 经过简单数学运算都可以从其中一个函数推导出另一个函数^[1]。

刺激与反应

从输入输出关系中求得系统动态特性的方法在可兴奋膜的特性研究中早有广泛应用 (图 1b), 只是这里常常使用刺激与反应这样的名词而已! 可兴奋膜, 顾名思义, 就是受到一个脉冲刺激就会引起一个兴奋反应的细胞膜。由此可见, 动作电位实际上就是它的“脉冲反应函数”。在可兴奋膜电生理研究中很早就使用了电压箝方法^[2]。它用负反馈的电子线路将膜电位箝制在实验所希望的一定值上 (即输入), 同时测量膜电流的变化 (即输出), 从电位与电流之比求出膜电导变化。在大多数情况下, 控制电位的变化都采用阶跃方波形式, 所以在这个意义上, 膜电导随时间的变化就是可兴奋膜的

- 1, 677—686, 1983.
- [8] 孙晋武 郭兴华: «微生物学通报», 11, 177—181, 1984.
- [9] 黄胜和 马金鉴: «酶在临床上的应用», 241—272页, 1984年, 天津科学技术出版社, 天津.
- [10] Maugh, T. H.: *Science*, **223**, 474—476, 1984.
- [11] Mozhaev, V. V., and Martinek, K.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 50—59, 1984.
- [12] Maugh, T. H.: *Science*, **223**, 475, 1984.
- [13] [美] G. G. 吉尔鲍特 (缪辉南、陈石根译): «酶法分析手册», 418 页, 1983 年, 上海科学技术出版社, 上海.
- [14] Lee, V.: *Biotechnology*, **2**, 549—551, 1984.
- [15] 毕家正: «世界科学 (World Science)», **4**, 25—26, 1984.
- [16] 吉鑫松: «生命的化学» **4**, 9—10, 1984.
- [17] 袁中一等: «固相酶与亲和层析», 1 页, 1975 年科学出版社, 北京.
- [18] [日] 千畑一郎 (胡宝华 吴雄江译): «固定化酶», 1 页, 1981 年, 河北人民出版社, 石家庄.
- [19] Breslow, R. P. *Science*, **218**, 532—537, 1982.
- [20] Wetzel, R., and Göddel, D. V.: *The Peptides* (Edited by E. Gross and J. Meienhofer), 1983, Vol. 5, PP. 1—64, Academic Press, New York.
- [21] Davies, K. E.: *Genetic Engineering* (Edited by Robert Williamson), 1982, Vol. 3, PP. 143—173, Academic Press, London.
- [22] Wilkinson, A. J. et al.: *Nature*, **307**, 187—188, 1984.
- [23] Maugh, T. H.: *Science*, **223**, 269—274, 1984.
- [24] Hammes, G. G.: *Enzyme Catalysis and Regulation*, 1982, PP. 14—37, Academic Press, New York.
- [25] Pabo, C.: *Nature*, **301**, 200, 1983.
- [26] Drexler, K. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 5275—5278, 1981.
- [27] Dean, D. C. et al.: *Nature*, **305**, 551—554, 1983.
- [28] Casadaban, M. J., and Chou, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 535—539, 1984.
- [29] Abelson, P. H.: *Science*, **219**, 611—613, 1983.
- [30] Wilson, T., and Klausner, A.: *Biotechnology*, **6**, 511—519, 1984.

[本文于 1985 年 4 月 1 日收到]