

氢酶在生物工程上的应用

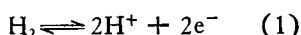
毛先枝 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所)

提 要

本文概述了氢酶的稳定和固相化方面的进展,对氢酶在水的脱氢和重水的生产、制备性有机合成、环境保护、太阳能转换和生物固氮上的应用进行了综述,且对有关问题进行了讨论,指出了氢酶应用研究的意义和有关的研究途径。

氢酶 (EC1.12, EC1.18) 是催化最简单的分子 H_2 的可逆性氧化作用的酶,即:



虽然直到 1931 年 Stephenson 和 Stickland 才给细菌中能活化 H_2 的酶取名为“氢酶”,但事实上早在本世纪初人们就已知多种微生物能产 H_2 或耗 H_2 了^[1,2]。自 1971 年 LeGall 等^[3]、Nakos 和 Mortenson^[4]、Haschke 和 Campbell^[5] 分别得到均一状态的氢酶以来,人们对氢酶的研究愈来愈深广。在当今已经发现和鉴定的 2000 多种酶中,仅有很少几种酶具有与氢酶相当的在生物工程上多方面应用潜力。关于氢酶的基本特性已有人作过介绍^[1,2],本文拟就氢酶在生物工程上的应用作一简要综述。

一、氢酶的稳定与固相化

首先,要实际应用氢酶得使其足够稳定。最主要的是要解决氢酶的氧敏感性问题,可以通过如下途径: 1. 将氢酶固定在离子性介质(如离子交换剂)上。这是因为高电荷区域具有排氧性的缘故,当固化在离子性介质上后,酶分子所处的微环境中氧气的浓度较溶液中的低得多。因此,当氢酶被固化后,其抗氧能力相对增高。例如,梭菌的氢酶固定在聚乙烯亚胺纤维素上后,它在空气中的半寿期增加了 3000 倍^[6]。

已经证明,在这方面多种离子性介质都是有效的^[7]。2. 加入络合剂。因为络合剂能使一些小分子含硫化合物的抗氧性增强,这是由于它们络合了进行氧化作用所必需的过渡金属元素。原理上络合剂也可以增强氢酶的抗氧性。有人发现一些络合剂(如 EDTA、络合树脂等)能大大提高氢酶的抗氧性^[8]。某些情况下,一些电子受体(如 MV 等)也可以提高氢酶的抗氧能力^[9],这可能是由于它们先结合了氢酶的活性中心所致。3. 我们认为,理论上可以通过遗传工程、蛋白质工程、酶学的方法创造出抗氧的氢酶来解决氢酶的氧敏感性问题,这个路子目前尚无人探讨,有待研究。

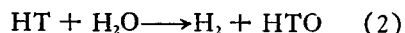
其次,利用氢酶还得使之变成可以实际应用的稳态酶。主要方法是使之固相化,这样不仅可以使氢酶变成非均质的催化剂,而且还可以大大提高其抗氧性,增强其抵抗微生物、蛋白酶的水解作用的能力,增加其对机械变性和表面张力的抗性。固相化还可以使氢酶的适宜的温度范围、耐酸耐碱范围增大。迄今为止,分离出的氢酶已被固定在下列支持介质上: 1. 多孔玻璃珠和/或硅胶, 2. 离子交换剂, 3. 琼脂糖衍生物, 4. 聚丙烯酰胺凝胶, 5. 半导体性多聚物, 6. 聚乙烯醇胶片。此外,含氢酶的整细胞也已被成功地固定在: 1. 琼脂胶, 2. 聚丙烯酰胺凝

胶, 3. 硅酸钙, 4. κ -鹿角菜等介质上。

二、氢酶与水的脱氘和重水的生产

氢之同位素的制备性分离在核能生产中是非常重要的。这里包括两个主要方面: 1. 从氢中分离 D, 这是生产 D_2O 的基础, 而 D_2O 是铀裂变反应堆中的快中子的慢化剂, 对控制核反应至关重要。2. 将 T 从氢中分离, T 是铀裂变产生的, 因此, 任何一种水冷却反应器和燃料回收系统中的废水里都含有 HTO 。为了防止 T 扩散, 回收 T 是必要的。

分离 H、D、T 是基于其本身以及它们的化合物的理化性质的差异, 最可取的是化学交换分离法, 尤其是氢-水催化交换法。本法的第一步是电解含有 T 的水。由于 HTO 的电解较 H_2O 的电解慢得多, 随着电解作用的进行, HTO 就会被富集在电解室内。然而, 由于 HTO 也有一定量的电解, 因此, 需要从电解产生的 HT 中回收 T。这可以采用下面的交换催化剂催化的反应来完成:

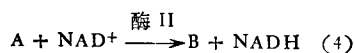
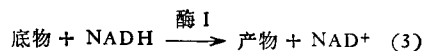


这样, 电解产生出来的 HT 变成 HTO 后就回到了电解室而继续被富集起来。传统上都是使用铂作催化剂, 但这有几大不足: 1. 昂贵; 2. 铂在水中催化活性很低; 3. 铂对毒物很敏感。因此, 需要寻找其它催化剂来代替铂。固化的氢酶是很理想的催化剂。1981 年, Klibanov 和 Huber^[10] 报道了利用氢酶替代铂的实验。他们发现, 无论在分批处理系统还是在连续的柱式处理器中, 固化氢酶都能有效地催化 H-T 交换反应。此外, 固化的真氧产碱菌的适宜 pH 和温度范围都较宽, 它们对氢酶的抑制剂 (如 O_2 和 CO 等) 也具有很大的抗性。从催化效率上计算, 1 克 PtO_2 约相当于 10 克细胞 (湿重)。与铂相比, 固化细胞便宜得多, 在水中的催化活性也高得多, 对 CO 和 O_2 等的抗性也较大。这充分显示了氢酶的优越性。

值得注意的是, 国外有人正在研究用固化氢酶替代铂生产重水, 我国也应开展这方面的研究。

三、氢酶在有机合成中的应用

许多氧化还原酶需要还原型的吡啶核苷作为辅因子, 但这些辅因子很贵, 再生它们具有较大的经济效益。酶法再生效率较高。原理是:



上述系统中如果酶 II 是氢酶, 则 A、B 分别是 H_2 和质子, 不存在产物分离方面的困难。据报道, 固化的真氧产碱菌已被成功地用来再生 $NADH$ 、 $FMNH_2$ 和还原型的氧化还原染料^[11]。

利用 H_2 作为最终还原剂的构想是非常诱人的 (因为 H_2 便宜, 还原力强且无副产物), 也是可行的。如果某种酶能利用还原型辅因子产生有用的化合物, 那么, 该酶就可以同固化氢酶偶联, 上述过程就可以在 H_2 存在下连续进行。此系统中 H_2 是唯一被消耗的还原剂, 也只需催化量的辅因子。例如, A. van Berkel-Arts 等^[12] 用从真氧产碱菌 H16 菌株分离到的一种酶—— H_2 - NAD^+ 氧化还原酶与 20- β -羟类固醇脱氢酶 (HSDH) 偶联转化类固醇, 效果很好 (图 1)。

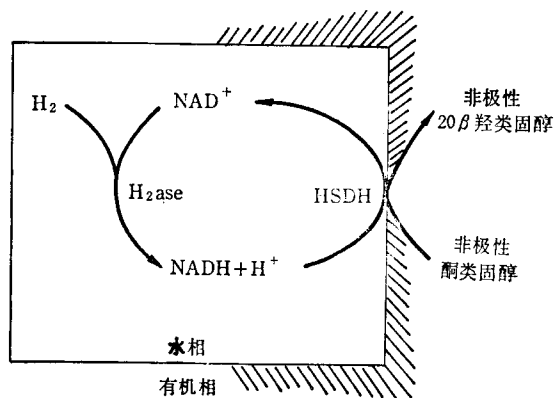
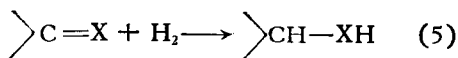


图 1 反向胶体粒子介质中 H_2 驱动的 $NADH$ 再生和与之偶联的非极性类固醇还原作用示意图

为清楚起见, 系统中所有水溶性组分都示意于同一个胶体粒子中, 实际上, 所有的组分均分布在所有的胶体粒子中, 胶体粒子间发生着快速交换反应。H2ase: H_2 - NAD^+ 氧化还原酶; HSDH: 20- β -羟类固醇脱氢酶

这种方法还可以用来对各种不饱和有机物进行氢化还原



该法在向非手性分子中引入不对称中心而制备一些特殊的化学物质时特别有价值,因为在一般的有机合成中这是很难奏效的。如果反应是在 D_2O 或 T_2O 中进行,则可制得一些带标记的化合物,它们在生物医学上颇有用途。总之,氢酶在有机合成中具有广泛的应用价值。

四、氢酶在污水处理、废物利用上的应用

早在 30 年代人们就已发现许多细菌在对有机物(如各种糖)进行代谢的过程中能产生 H_2 。这启示我们利用微生物发酵代谢产生 H_2 。比如,利用植物细胞壁物质作原料,在微生物的作用下产 H_2 ,这是利用农业生产中的废物产能的一条捷径。

含氢酶的细菌不仅能利用糖,也能利用一些简单的有机物产氢,而这些有机物却常常是工业废水中的成份之一。例如,有人利用固化的丁酸梭菌从乙醇产氢,这已被用来从生产乙醇的工厂的废水中产生 H_2 ^[43]。有人甚至还提出了利用氢酶在非光化学反应中产氢的设想^[44],不过要实现这一设想,还有许多工作要做。

五、氢酶在太阳能转换方面的应用

氢气作为燃料的研究早已受到人们的重视,这主要是因为氢气作燃料不会污染环境。产氢的方法很多,但特别重要的是水的光解,尤其是水的生物光解作用。在自然界,水的光解主要是由植物、藻类和光合细菌在它们的叶绿体或类似机构中进行。该过程主要是固定 CO_2 ,产生有机物和 O_2 。在有合适的电子受体存在而又缺乏 CO_2 时,产生有机物的过程即会被还原电子受体的反应所替代。适当偶联叶绿体、氢酶和电子受体,则可以利用太阳能光解水产生 H_2 和 O_2 。例如, Packer^[45] 报道了一种人工产氢系统(图 2)。

另一条利用光解水产氢的途径是从有机物中制取 H_2 (理想情况是以废水为原料)。这种

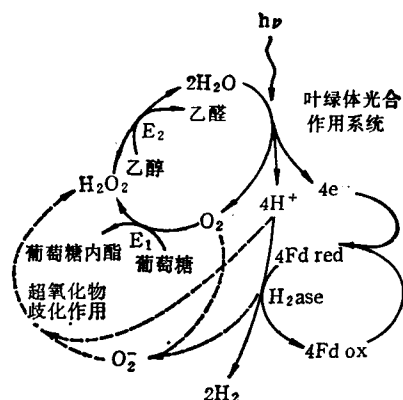


图 2 叶绿体、铁氧还蛋白和氢酶组成的重组系统产氢作用示意图

实线表示氧陷阱(葡萄糖+葡萄糖氧化酶)能完全除去与光系统 II 产氢时同时产生的所有 O_2 时的情形。此时,每释放 1 分子 O_2 即产生 2 分子 H_2 ,前者被转化成乙醇和过氧化氢。虚线表示低能电子导致铁氧还蛋白自动氧化并产生出 O_2 ,这样就会引起产氢率降低,而过氧化氢和乙醇的产率增大。

H2ase: 氢酶; E1: 葡萄糖氧化酶; E2: 过氧化氢酶。

系统应包括如下几个部分: 1. 光敏剂(如原黄素、二氨基吡啶等), 2. 电子供体(有机物), 3. 电子载体(如 MV 等), 4. 氢酶。其机制是在光敏剂的作用下,电子从有机物传给 MV,再由氢酶催化使处于还原态的电子载体产生 H_2 。这里,电子供体包括各种不同的有机物,如氨基酸、羧酸、乙醇、脲衍生物和硫化物等,而这些有机物常常是废水的主要成份之一。因此,氢酶在太阳能利用和环境保护两大领域间起到了桥梁作用。Hilhorst 等^[46]报道过这类光化学产氢系统。

六、氢酶在生物固氮中的应用

生物固氮是一种高耗能过程。研究表明:固氮酶每传递一对电子即需要 4—5 个 ATP 分子,在体内,总有一部分电子被用来还原质子并产生 H_2 。显然,固氮酶催化的放氢作用一方面消耗了能量;另一方面,产生出的 H_2 也会竞争性地抑制固氮酶催化的 N_2 还原作用。然而,并不是所有固氮微生物都会全部损失这部分能量的,许多有机体在长期的进化过程中产生了适应机制,其物质基础的主要成份即是具有吸氢功能的氢酶^[47]。吸氢氢酶与生物固氮的关系是

密切的,它能提高能量利用率,并提高生物固氮的效率。

因此,人们对氢酶与生物固氮的联系机理进行着愈来愈深入的研究,一部分工作围绕氢酶的结构与功能的研究,另一部分工作是对氢酶基因进行分子生物学研究,如构建氢酶基因文库,利用所获基因向有重要意义的受体菌进行转化或转导以期获得性能更优的菌种等。例如, Cantrell 等^[8]已成功地完成了大豆根瘤菌 (*Rhizobium japonicum*) 氢酶基因的克隆, Hom 等^[19]应用基因融合技术成功地分离到了 Nif/Hup Cosmids 基因簇,我们也获得了 His/Nif/Hup Cosmid 基因簇(待发表),这为生物固氮基因工程菌的构建打下了基础。

综上所述,氢酶是一类具有重要意义的酶,它在生物工程上有多方面的应用潜力,很可能成为一类重要的工具酶。

参 考 文 献

- [1] Adams, M. W. W. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 594, 105.
- [2] 朱长喜,宋鸿遇:《生物化学与生物物理进展》, 1985, (3), 8.
- [3] LeGall, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 234, 525.
- [4] Nakos, G. and Mortenson, L. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 277, 576.
- [5] Haschke, R. H. and Campbell, L. L.: *J. Bacteriol.*, 1971, 105, 294.
- [6] Klivanov, A. M. and Barta, T. E.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1981, 6, 201.
- [7] Klivanov, A. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 3640.
- [8] Klivanov, A. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 547, 411.
- [9] Khan, S. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 659, 457.
- [10] Klivanov, A. M. and Huber, J.: *Bioelectron. Bioeng.*, 1981, 23, 1537.
- [11] Klivanov, A. M. and Puglisi, A. V.: *Biotechnol. Lett.*, 1980, 2, 445.
- [12] A. van Berkel-Arts et al.: *Biochimie*, 1986, 68, 201.
- [13] Suzuki, S. et al.: *Biochimie*, 1980, 62, 353.
- [14] Klivanov, M.: *Process Biochemistry*, 1983, 18, 13.
- [15] Packer, L.: *Methods in Enzymology*, V. 69, part C, Photosynthesis and Nitrogen Fixation, Acad. Press, Inc. (London) LTD, 1980, 625—630.
- [16] Hilhorst, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 3927.
- [17] 王子芳:《微生物学通报》, 1985, 12, 127.
- [18] Cantrell, M. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 181.
- [19] Hom, S. S. M. et al.: *J. Bacteriol.*, 1985, 161, 882.

[本文于 1987 年 7 月 25 日收到]

会议简讯

北京国际视觉信息加工讨论会征文通知

由中国自然科学基金会,中国科协,中国科学院,联合国教科文组织(UNESCO)和国际脑研究组织(IBRO)资助,中国生物物理学会和中科院生物物理所联合主办的 Beijing Symposium on visual Information Processing 定于 1989 年 8 月 21—25 日在北京举行。组织委员会由王书荣郭爱克和刁云程等人组成。会议将由全体会议,两个平行的分组会和大字报展讲三部分组成。拟邀请约 10 位科学家在全体会议上作专题报告。两个分组会的内容分别是:

1. 视觉系统的功能和结构; 2. 视觉系统的理论和模型。欢迎国内外视觉科学家参加。此外,为了给国内有兴趣者提供交流机会,也欢迎在其它感官及脑模型领域的实验和理论研究结果参加大字报交流。

论文中文摘要限 1000 字以内,英文摘要限 A₄ 复印纸一页,要求打印字迹清楚,勿折叠。请于 1989 年 2 月 1 日前寄北京中关村,生物物理研究所吕克定收。有关事宜请与中国生物物理学会联系,(地址:北京中关村生物物理研究所。电话: 2566757)