

酶工程

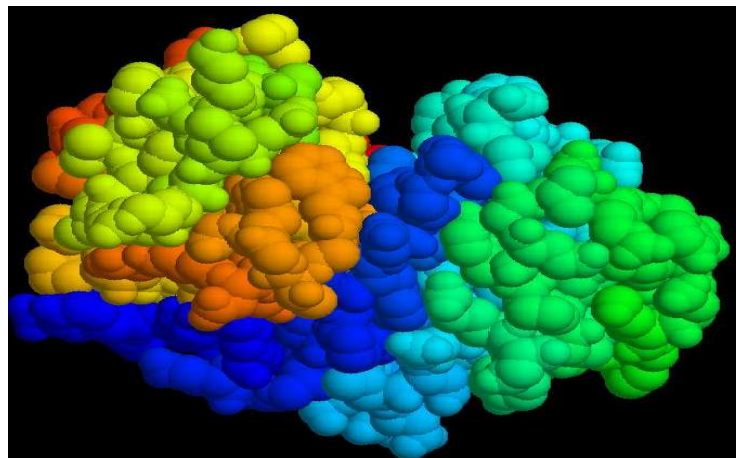
郑丽沙

生物与医学工程学院

lishazheng@buaa.edu.cn

什么是酶？

- * 酶是具有高度特异性的高效生物催化剂。几乎所有发生在活细胞中的化学反应 能都是由酶类(enzymes)催化与控制的。
- * 而在自然界已发现的酶类总量就有1万种左右。所有的酶类都具有生物催化剂 (biological catalyst)的作用，即在几乎不改变其自身结构的情况下将底物转变为别的产物。

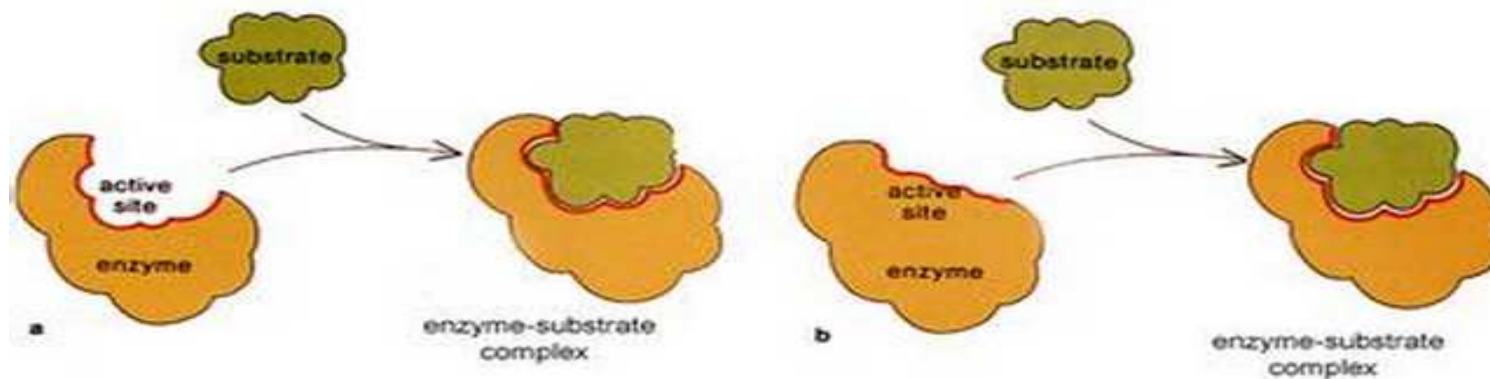


- * 酶的作用使生化反应更快地达到平衡水平，某个特定的反应因子甚至可以将这一过程加速到 10^{12} 倍。正是酶的这种特殊性质，才使生命得以存在。在酵母细胞中，酶只需要几秒钟时间就能将糖类转变为酒精和水化合物，而如果没有酶的参与，这一过程将花费几千年甚至更久的时间。由此可见，酶是相当高效、高产的生物催化剂。



还没有反应完？

- * 在细胞十分之一到千分之一毫米的极小范围内，每秒钟都会有成千上万并且互相关联的酶促反应发生。不过，只有当这些催化剂分子从细胞内数以千计的化合物中识别出其特异的底物(substrate)后，酶促酶反应才能够发生，底物才能转变为特异的产物。这一过程称为生物催化作用，它发生于酶的活性中心(active site)。

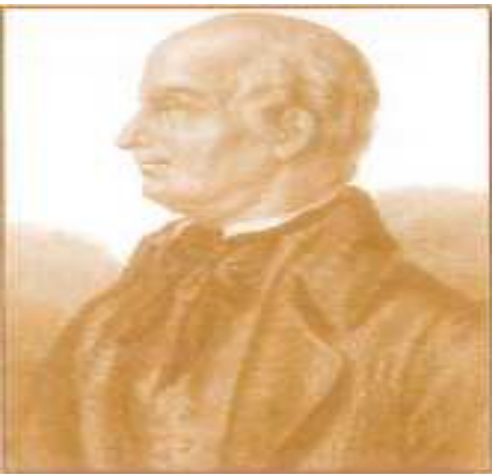


酶的发现

- * 在人类历史初期，酶促反应就已经发现并加以利用了。希腊诗人荷马解释了当往牛奶中加入无花果汁（无花果蛋白酶）时，牛奶是如何变质的。从胃中分离的凝乳酶被用于奶酪的制作，在加入凝乳后，很短的时间内就可以使奶酪变得美味可口。然而，对于酶的深入研究则是开始于18世纪末期。



- * 刚开始，任何化合物的降解现象曾被统称为发酵。1780年，意大利科学家 Lazzaro Spallanzani (1729-1799) 赞同法国人 Antoine Ferchault de Reaumur 的观点，即在鸟类的胃中，是消化液将肉类转变成了液体。




Lazzaro Spallanzani
(1729~1799)




Antoine Ferchault de
Réaumur
(1683~1757)



- 
- * 在19世纪初，人们普遍认为发酵是一种被称为**酵素**的特殊化合物导致的化学反应。
 - * 1814年，圣彼得堡科学院的院士——德国科学家Gottlieb Sigismund 、Constantin Kirchhoff (1764-1833)的研究表明，发酵的谷物中存在一种物质，使淀粉可以转化为糖类。
 - * Anselme Payen (1795-1871)是巴黎一家造糖厂的董事，他发现了纤维素。他和同事Jean Francois Persoz(1805-1865)从萌芽的大麦中分离出了淀粉液化物质，后来的研究发现，该物质的一些特性是所有酶类共有的。

- * 只需要极少量的这类物质，就可以将大量的淀粉转化为液体。但是，这种发酵功能在高温环境中会失效。从溶液分离出的这种活性化合物（呈粉末）被再次溶解到水中后，就会恢复原来的活性。这种化合物被命名为淀粉酶（diastase，希腊语“diastasis”意为“分离”），它是第一种在实验室里被研究并纯化的植物酶。



- 
- * 三年后，Theodor Schwann (1810-1882)，细胞学的奠基人之一，成功地分离出了纯净的动物消化酶--胃蛋白酶(pepsin)，并致力于对其的研究。
 - * 著名的瑞士化学家Jons Jakob Berzelius (1779-1848)曾提出“**发酵反应是一种催化过程**”这一跨越时代的超前观点。他认为：催化剂的少量存在诱发了化学反应的产生，当催化剂不存在，反应也就无法发生了。凭着这种先知一般的洞察力，他于1836年写道：“**我们有理由假设在活的动植物体内，有成千上万的催化反应在它们的组织与体液中进行着。**”

- * 后来的发现却使通往真理的道路变得曲折起来，尤其是“发酵”(ferment)这个定义造成了很多混淆。
- * 直到1897年，爱德华·毕希纳(Eduard Buchner)想知道发酵反应是否可以不发生在活的细胞中，于是便将酵母细胞用白捣碎，并在大研钵里加入了石英与岩藻土，然后用强韧的帆布将这团混合物包裹起来，加水对其进行挤压，这些不再具有任何细胞，但包含了所有酵母细胞内含物的混合物随即被加入到浓缩糖溶液中，培养过夜。尽管没有足够长的时间来发挥发酵作用的强大功效，但仍然有二氧化碳产生了！

- * 这是第一次在没有活酵母细胞存在的情况下研究酒精发酵反应，这个酿酒酶(zymase)的重要突破让Eduard Buchner赢得了1907年的诺贝尔奖。



爱德华·毕希纳
(Eduard Buchner,
1860~1917) 于
1907 年获得诺贝
尔化学奖。



- * 接下来的发现则引起了更大的轰动：酶可以被结晶。康奈尔大学的 James B. Sumner (1887-1955) 于1926年首次从杰克豆中提取出尿素酶结晶，并证明了这种酶具有蛋白质的性质。



James B. Sumner (1887~1955) 尽管失去了一只手臂，但作为一位杰出的实验者，他成功提取出尿素酶结晶。

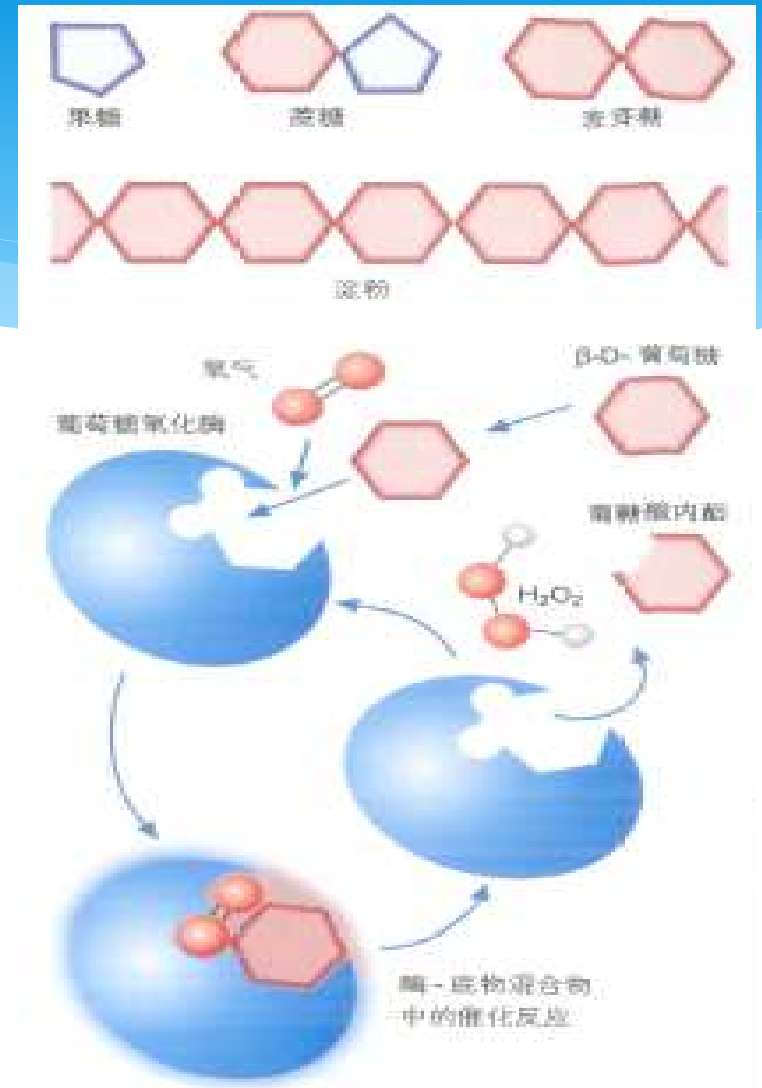
- * 在1930 - 1933年间，纽约洛克菲勒医学研究所的John H. Northrop(1891-1975)结晶出了消化酶，经过长时间的探讨，人们得出了酶是蛋白质这一结论。1946年，Sumner与Northrop共同获得了诺贝尔化学奖。



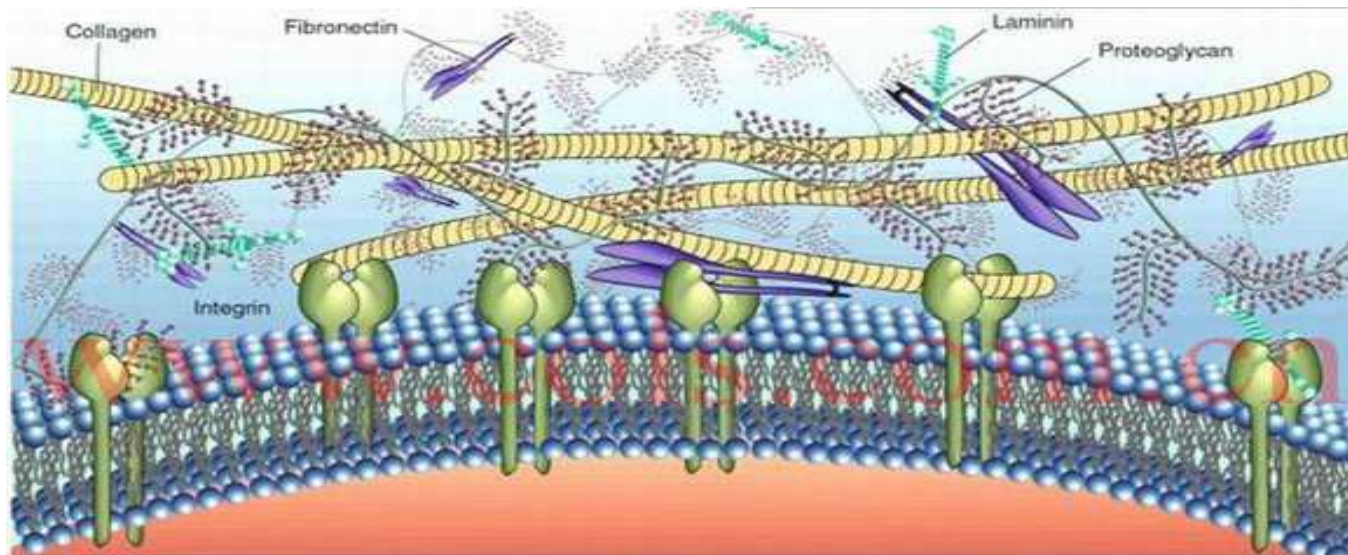
图 2.2 John H. Northrop (1891~1975)，在1930~1933年间成功地获得胰蛋白酶和胃蛋白酶这两种消化酶的结晶，并证明了它们的成分只有蛋白质。这一发现之后，科学界才接受了Sumner的结论，两人于1946年共同获得诺贝尔奖。

- * 如何通过实验证明酶的特异性呢？
- * 一个简单的生化实验就可以说明酶的特异性 (specificity)。

像**葡萄糖氧化酶**这样的酶必须具有高度的底物特异性 (highly substrate-specific)，正因为如此，才不会使最微小的细胞机制发生混乱，是一种高水平的安全保障。



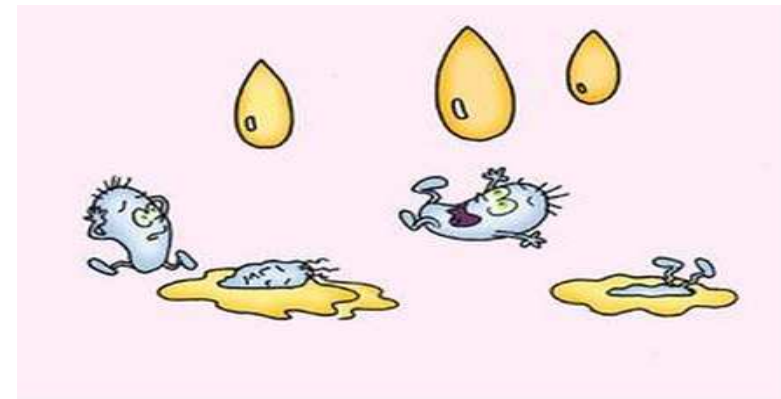
- * 另一方面，像蛋白质裂解酶（蛋白酶）或是淀粉降解酶（淀粉酶）这类胞外酶(extracellular enzyme)的特异性则远没有那么高，否则就需要特异的降解酶降解相应的蛋白质或多糖，这对生物体而言是相当浪费的。



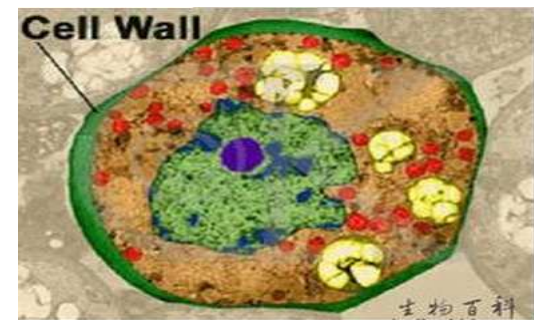
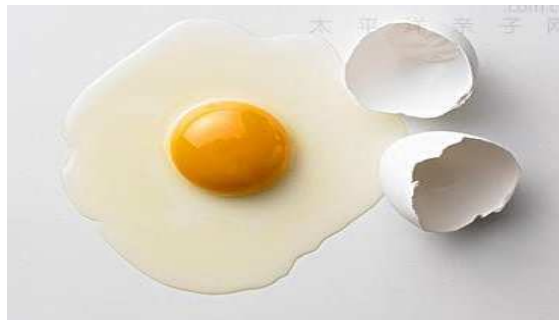
溶菌酶：在微小分子水平上最早被了解其结构和功能的酶类

* 弗莱明的感冒与酶学研究

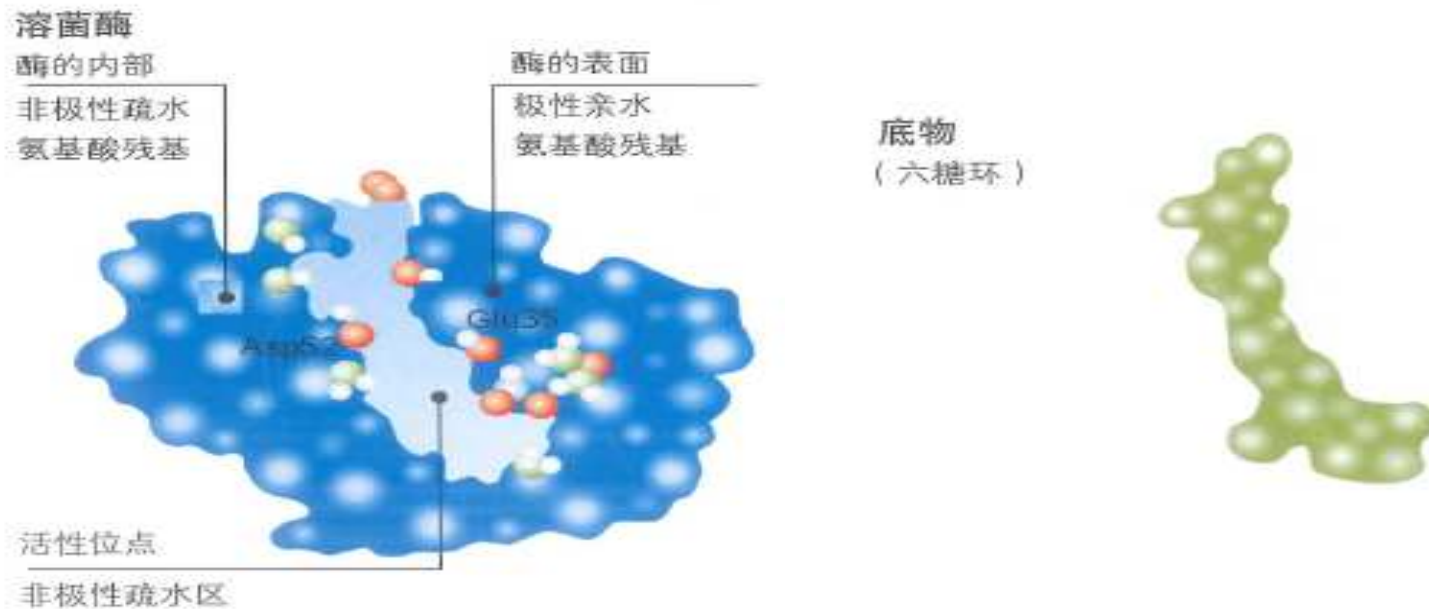
- * 1922年的一天，亚历山大·弗莱明(Alexander Fleming, 1881-1955)患了感冒，他从鼻子中取出一些黏液涂在了细菌培养基上。令他感到困惑的是，几天后，他发现黏液中的某些物质杀死了培养基上的细菌，这可能是其中的某种微生物所有的酶造成的，因此，他将这种酶命名为溶菌酶。很快，弗莱明便从身体的种体液中检测到了溶菌酶的存在，譬如眼泪。



* 这件事很快就被他的同事和学生知道了，后来连来访者都表示愿意提供眼泪给弗莱明进行研究。鸡蛋的蛋白中也富含溶菌酶，这是其自身所具有的防止微生物入侵的保护机制。不过，尽管溶菌酶能够效杀死有害细菌，但对病原体却毫无作用。溶菌酶注定在现代生物学历史上将占有一席之地，因为它是第一个从空间结构上被仔细研究的酶，它的成分也已经在原子水平上得到了分析。溶菌酶的底物是一个包含了**乙酰胞壁酸**和**乙酰葡萄糖胺**的糖环组成的分子，由于它参与了细胞壁的形成，因此也叫**黏多糖**。



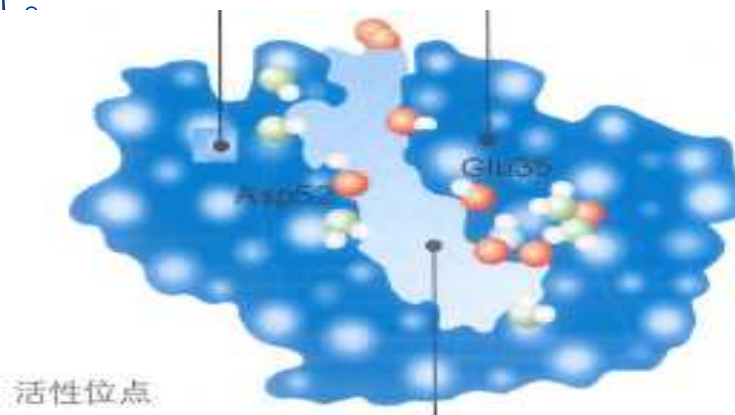
- * 当溶菌酶将底物切开后，细菌细胞的通透性会大大增加，液体会不断地流细胞中，最后使细胞因内部的巨大渗透压而破裂。



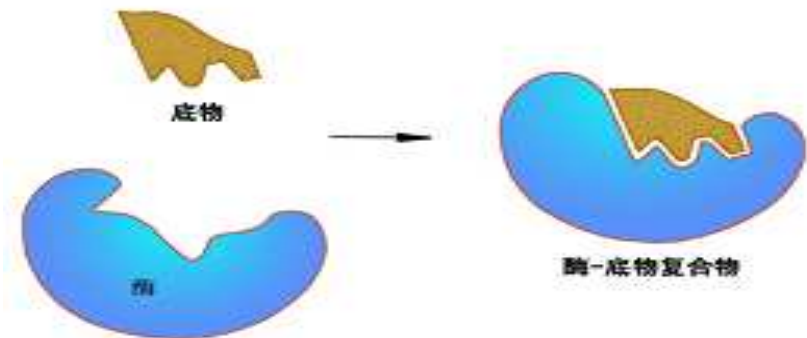
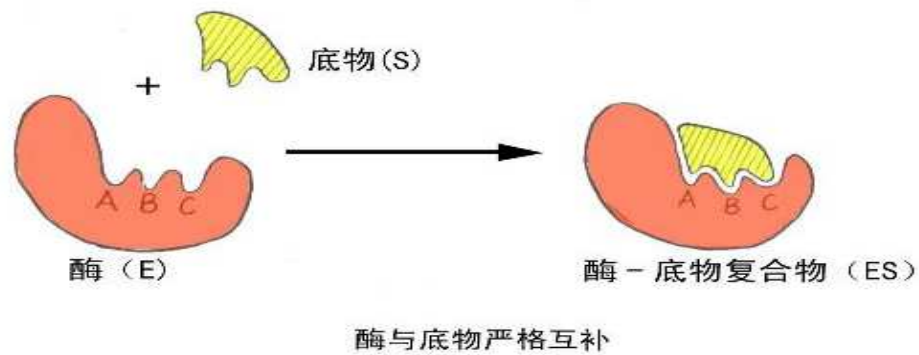
- * 1963年，从鸡蛋清中提取出的溶菌酶的氨基酸残基数目与顺序（一级结构）自定了下来。
- * 直到有了X光结构分析(X-ray structural analysis)方法，人们才得以了解溶菌酶的三维(3D)结构。



- * 1960年,David Philipps(1924~1999)与他在伦敦的英国皇家学会的同事开始了对溶菌酶的空间结构研究。他们先得到了溶菌酶的蛋白结晶,然后在1965年的春季,构建完成溶菌酶的首个3D模型,它并不是一个长长的伸展开的分子,而是具有一条裂缝的紧凑结构。这条明显的缝隙应该是活性位点的所在之处——这是酶的活性位点第一次通过X光结构析展现在人们面前。



* 同时，从溶菌酶的模型上还可以看到另一个现象。基于Emil Fischer的锁钥假说(lock-and-key hypothesis)，底物应该可以完美地嵌入酶的活性位点。但事实，底物经过形态结构的改变后才能嵌入活性位点，并且改变形态的不只是底物分子，X光结构分析发现酶上的裂缝为了与底物相结合而变得更深。这就好比橡皮匙与橡皮锁之间的关系，或者更精确地说是手与手套之间的**诱导契合**现象。



太空中的溶菌酶

- * 1985年，美国航空和宇宙航天局(NASA)与欧洲航天局(ESA)把溶菌酶带到太空中进行实验，将其作为一个底物模型来对处于微重力下的蛋白质晶体生长情况做定量测定。哥伦比亚航天飞船于1994年7月8日载着国际微重力实验室(IML-2)发射升空，在出色地完成任务后，于7月23日安全返回。这也是微重力研究史上的一个里程碑。




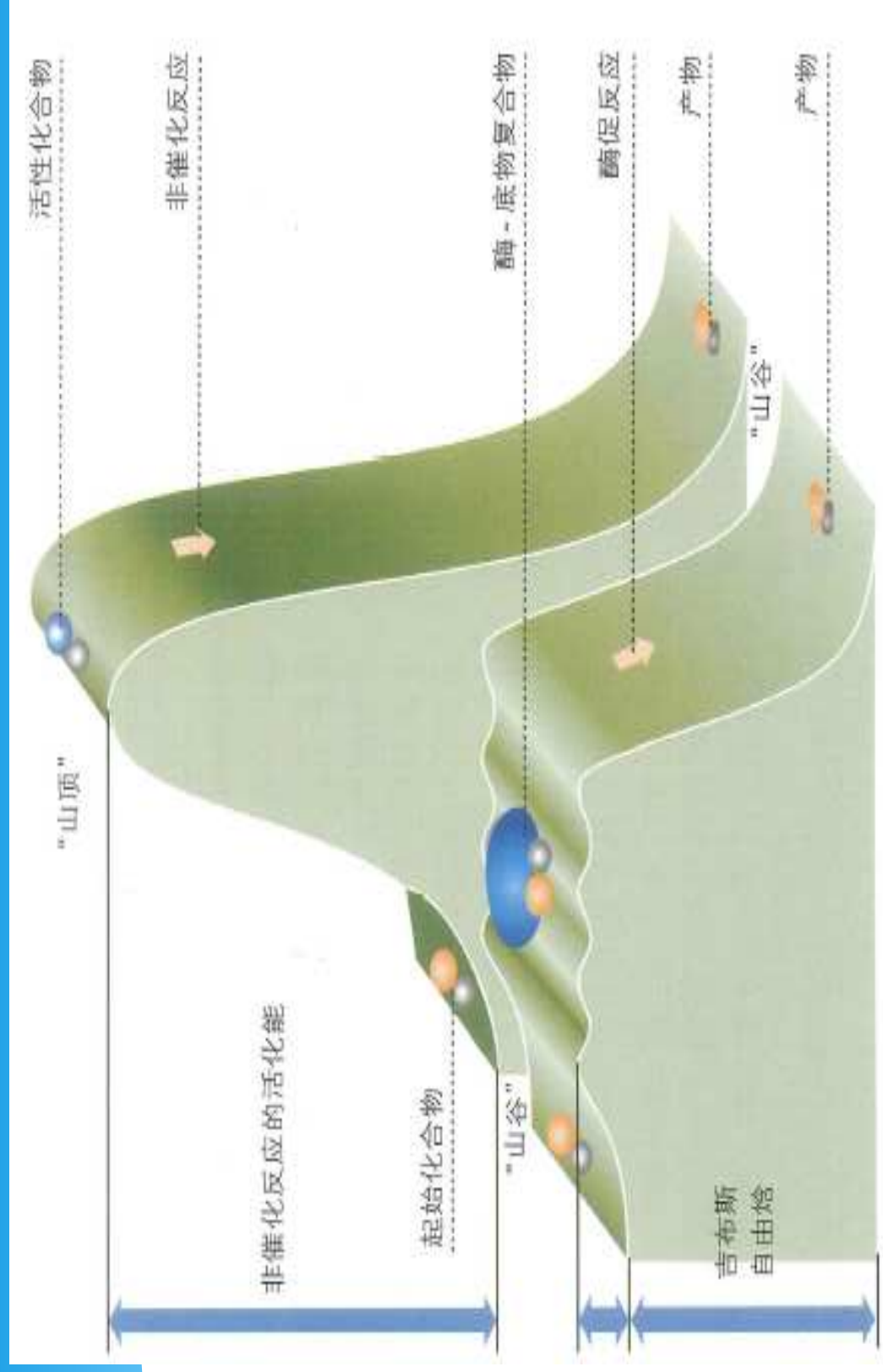
酶是如何工作的

- * 一开始，人们认为溶菌酶模型可以应用于所有的酶促反应，并且酶总是由相应的形态来决定合适的底物，但是酶的高效催化行为却说明原因绝非如此简单。
- * 那么，酶是如何工作的？

- * 酶可以将化学反应的速度提高1亿-1万亿倍，假设酶促反应在一秒钟内完成，那么就理论上而言，一个相同的化学反应不经过酶的催化作用将会历时3000年。当然，这只是一个计算结果，有机体内如果缺少了酶，大多数新陈代谢反应都将减慢到毫无意义的程度。所说，生命的存在得益于酶的活动。



- 
- * 如果物质之间要相互作用，它们首先要具有活性，也就是说，要处于活性状态。反应所需要的能量称为活化能(activation energy)。如果把化学反应能量的曲线画成一座山（见下图），那么起始化合物（starting compound）就像山脚下的那些石头。它们若想翻越山脊到达另一侧的山谷（即转化为产物，product），就需要活化能将其推到山顶。活化能可以通过温度或压力的上升来提供，但这会杀死所有的活细胞。一般来说，所有的催化剂都能降低反应所需的活化能。



- * 酶的加入并不会改变反应的平衡位点（否则就改变了槽地与山谷的深度），但它会使反应更迅速地达到平衡状态。酶的作用只是加快反应，在没有酶存在的情况下，反应虽然也会进行，但会变非常的慢，甚至慢到无法用数字来衡量。

平衡

- * 酶催化功能的作用机理仍然困扰着学研究者们，而且所有的酶促反应是无法仅靠一种解释就可以概括的。从溶菌酶的反应过程中，我们发现了一种可能的机理：酶使底物结构改变，通过其内部结构的拉紧与扭曲（中间状态）从而与酶相结合。
- * 底物结合到酶活性中心的过程中释放出了反应所需要的大量能量。在溶液中，反应物之间的接触往往是偶然的，而酶则会使它们最大程度地靠近彼此的活性位点，因此大大提高了反应的发生机率。

- * 在活性位点处，高效活性功能基团 (highly reactive functional group) 通常集中在非常小的空间内，在底物诱导下达有利于与底物结合的变化，从而稳定地对底物进行修饰。活性位点主要由非极性基团构成，因此它很类似非极性的有机溶剂。与极性水溶剂相比，有机反应的速度在非极性有机溶剂中通常会被加快。
- * 酶将众多的侧链基团折叠起来，在特定的时间和部位排列成需要的活性基团形态。酶分子本并非始终保持固定的形态，而是灵活可变的。



酶类的来源：动物、植物以及微生物

- * 随着19世纪消化酶的发现，人们已经发明了多种方法从屠宰动物中获取这类酶。即使今天，我们仍然是从猪和牛的胃中获取胃蛋白酶，从小牛胃中获取凝乳酶，而酶制剂则包括了从猪胰腺中提取的胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、脂肪酶，以及淀粉酶。我们从药店买回的胃蛋白酶含有从猪胃中提取的胃蛋白酶。随着生物体器官中周而复始的新陈代谢，如肌肉、肝脏、脾、肾、心脏，以及小肠，它们都可以提供具有科学分析和药用价值的各种酶类，这些酶只需经过纯化便可达到一个较高的水平。



- * 研究表明，植物也可以作为工业用酶的来源。谷物经过浸泡与发芽后，会变成含有淀粉酶（淀粉降解酶）和蛋白酶的麦芽，传统食品行业中，它们被用于啤酒的酿和酒精的蒸馏。19世纪，人们找到了一种简单的方法，可以从热带植物的体液中获得大量的蛋白酶，例如从番木瓜树中提木瓜蛋白酶和木瓜凝乳蛋白酶，无花果树中提取无花果蛋白酶，以及从菠萝茎中提取菠萝蛋白酶等，这些酶现在仍然被用于软化肉类以便于消化，被用来清洗隐形眼镜。



图2.18 从番木瓜中提取的木瓜蛋白酶，作为消化药用。

- * 但是在欧洲，从植物中提取酶仍然是异常困难的，由于季节的变化，酶的产量与浓度也变化不定，而要进行大量的植物种植也是一项劳动密集型工作。由于动物酶可以为肉类生产的副产品来获得，而植物酶则求大量的植物种植为基础。不过，这两种来源的酶产量仍然无法满足现代酶生产的巨大要求，于是，微生物因其易操作、高产出的特性，成为酶制造工业的新成员。





- 
- * 微生物制酶 (microbially produced enzymes)的工业应用开始于1894年，在美国皮奥里亚(Peoria)工作的日本生物化学家高峰让吉取得了高（峰氏）淀粉酶生产方法的专利权。他用于培养真菌的出水式培养基(emersed culture)既简便又独特，营养质和矿物质被加到小麦秸秆中，然后在秸秆上接种米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*)的孢子囊，接着将秸秆放置到培养室的箱中。一旦真菌长到合适的数量，就将麦秆放到盐溶液中洗涤，使真菌分泌的酶分子（淀粉酶、蛋白酶）从细胞中析出。到第二次世界大战结束后，美国已经有了好几家用“真菌麦秆模型”日产酶量超过10吨的工厂，直到1950年这种方法才被液体培养所替代。



图 2.13 高峰让吉 (Jokichi Takamine, 1854~1922) 是第一个将微生物酶应用到工业消化酶领域的 人，他所制造的酶被称为高（峰氏）淀粉酶（Takadiastase）。

- 
- * 使用微生物作为产酶来源有着显而易见的优势，因为这样能以较低的成本生产出大量的产物，除了地域的限制，酶的生产也不会受到季节变化的影响。利用突变体，还可以经过诱导和筛选过程优化产物，甚可以用基因工程学和蛋白质设计来制造特定的酶。

- * 除了工业应用所需要的大量产物，酶还必须保持相当的**稳定性**。由于许多微生物可以在极端环境中存活，它们生产出的酶也就相应地具有高度稳定性。譬如在美国黄石自然公园和堪察加半岛（俄罗斯远东地区）上的热泉中发现的嗜热微生物(thermophilic microorganism)能够制造出热稳定的酶，否则它们就无法在那样的环境中生存下去。从嗜热水生菌中获得的DNA聚合酶-Taq酶(Taq polymerase)已经成为现代基因技术中不可或缺的工具酶。





infzm.com

- * 在咸水湖中栖息着各种嗜盐菌(halophilic bacteria)，从中可以提取出耐高盐环境的酶；同样，生活在南极的微生物也可以为我们提供嗜冷酶(psychrophilic enzyme)。




*



zyme), 譬
按这样的
更地利用
降解成小
列如蜘

蛛被内开腿入
身完

全作用使它成为美味的食物。



* 目前，酶工业将注意力集中到细胞外酶类，这并不会令人感到惊讶，因为细胞外酶类很容易从培养基中提取，在花费上也相当便宜，甚至不需要进行细胞破碎和酶纯化的程序——这两个过程的成本和劳动力耗费极高。一个细菌细胞中包含了一千多种不同的酶类，所有的胞外酶都需要从别的酶以及细胞结构上分离下来。而蛋白质的两种特性可以达到这种分离目的——分子聚合与电荷分离。

酶的应用

- * 酶作为一种生物催化剂，由于其反应条件温和，高效，专一性强，在工业上已有广泛的应用。目前，酶在工业上主要用于食品发酵、淀粉加工、纺织、制革、洗涤剂及医药等方面，但可以预计今后在有机合成、环境保护上也将发挥重要的作用。
- * 目前在世界上有影响的酶制剂厂主要有丹麦的Novo公司、荷兰的Cist-Brocades公司、美国的enencor公司、芬兰的Alko有限公司、德国的Bayer AG公司、芬兰的Cultor公司、比利时的Sovay公司、日本的田野制药和长濑产业等。前三家酶制剂厂是世界上最具有影响的酶制剂厂，其产品占整个市场的74.3%。

用于酿酒、烘焙以及退浆的淀粉酶

- * 1516年，巴伐利亚的威廉公爵四世颁布了酒类的纯度标准，规定“只有麦、啤酒花和水才能用来酿造啤酒。”这项法案在德国一直延续至今，而其他许多国家出于经济上的考虑已将麦芽换成未发芽的谷粒、玉米或是大米。但是这些农作物难以保证酿酒所需的酶类，因此人们从真菌或细菌中提取出淀粉酶、葡聚糖酶和蛋白酶，将它们的现成酶合剂直接作为酿酒加入其中。



- * 谷物中的淀粉被酶降解为单糖，然后被酵母发酵为酒精。淀粉是植物细胞内的储能化合物，也是动物与人类的主要营养来源之一。麦芽中含有多种能降解淀粉的淀粉酶，它们可以通过不同的途径从淀粉分子上切下葡萄糖残基，形成不同大小的单糖或寡糖分子。尽管麦芽中的淀粉酶占不到其总体积的0.5%-1%，却是全世界酶生产的最重要供应者。为了获取葡萄糖，土豆和玉米中的淀粉需要降解得越彻底越好，通常是在升温的酸环境中进行酸水解。

- * 近二十年来，淀粉酶逐渐取代了酸水解的地位。首先，淀粉可以从80 °C 加热到105 °C，在 α -淀粉酶（ α -amylase）作用下降解成短片段，再转变为稀溶液。形成的糊精混合物继续被葡糖淀粉酶(glucoamylase)降解为基本的结构化合物——葡萄糖，经过结晶最后形成纯净的右旋葡萄糖。

- * 面包的烘焙过程中，也普遍开始加入酶。通过酶加快淀粉的降解，使生面团中糖分含量大大提高，从而加快发酵过程。加入蛋白酶降解生面团中的“黏蛋白”（麸质），麸质与水部分结合，形成一种高胶状黏稠物，利用从真菌中提取的蛋白酶其降解，可以提高生面团的延伸性，并增强它保持气泡的能力。添加酶制剂大大加快了面包的发酵速度。



- * 在纺织工业如牛仔裤的生产中，用淀粉处理斜纹布纤维可以使纤维粘合在一起，从而增强它们在编织过程中的强韧性和弹性。布料编织好以后，需要进行退浆处理，即用淀粉酶除去上面的淀粉。过去习惯使用从麦芽或动物胰脏中提取的淀粉酶，不过现在一般是从细菌中提取。由于淀粉的热稳定性，因此可以在提高反应温度加快退浆的同时进行漂白处理。



用于增加蔬果汁产量的果胶酶

- * 蔬果汁已经成为现代健康生活的一部分。在蔬果榨汁的过程中，高分子胶质的存在会降低汁液的产量。相信每个家庭主妇都知道果胶，它存在于苹果核里，做果酱和果冻时可以用来凝胶。而在榨取蔬果汁时，这种凝胶作用会大大影响产率。



- * 从曲霉菌(*Aspergillus*)和根霉菌(*Rhizopus*)中提取的果胶酶(pectinase)可以通过深层培养来生产，全世界的果胶酶产量高达100吨。将蔬果切碎，然后加入果胶酶降解长链果胶，使汁液的黏度降低，这样有助于过滤和提高产量。婴儿食品是果胶酶应用的另一个主要领域，酶将水果和软化，使它们易于食用。



- * 水果酸乳酪(fruit yoghurt)和浓果汁的制作也常常借助于生物技术。生产胡萝卜汁或是胡萝卜浓汤时，除了果胶酶，还要人从真菌中提取的纤维素酶用来降解细胞壁。



生物清洁剂：应用最广泛的水解酶

- * 衣服等物品上的污渍中由于含有蛋白质（如牛奶、蛋黄、血迹或可可）而难以清除，因为蛋白质不易溶解于水。在高温下，蛋白质会凝固到织物的纤维上，使得清洗更加困难。脏衣服上可能会有泥土、煤灰，以及脂肪、蛋白质、糖、色素等有机物，而床单、内衣上的脂肪类和蛋白类污渍更是像胶水那样顽固难洗。



- * 在衣物的洗涤过程中，清洁剂将脂肪类污渍从织物上分离下来，使它溶于水溶剂，而蛋白类污渍仍然粘在衣物上。Otto Rohm(1876-1939)发明了用于清洗衣物的酶。



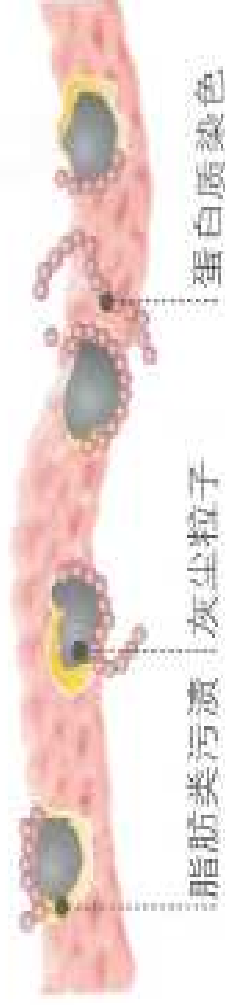
图2.14 20世纪初，德国实业家、Plexiglas®的发明者 Otto Röhm (1876~1939) 曾是 Eduard Buchner 的学生，他提出用胰腺中提取的酶稀释液来清洗衣服，他的工厂生产了一种含胰蛋白酶的产品，用于洗衣前的浸泡，名为 Burnus。



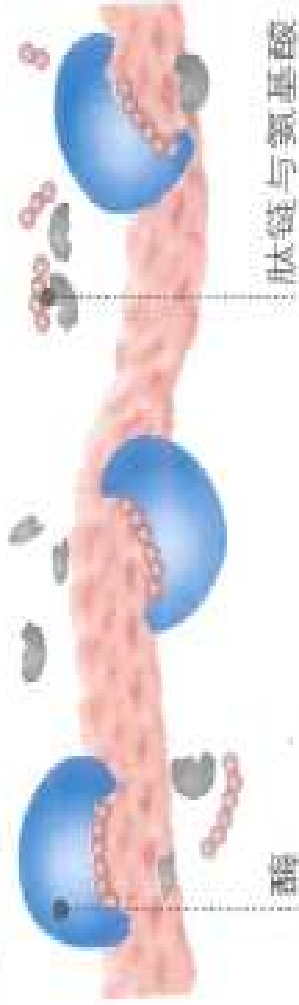
- * 但在最初，胰腺酶类的使用既不稳定又造价昂贵，这种生物清洁剂也不适合大批量的生产。直到1960年，人们从地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）中提取出枯杆菌蛋白酶，这种酶在碱性环境中具有活性。
- * 今天，生物清洁剂的应用已经相当广，其中的蛋白酶比例为1: 50，这是它们清洗过程中的最佳活性含量。由于较低的底物特异性，蛋白酶成为理想的“杂食动物”，可以将多种顽固蛋白污渍降解为氨基酸和短链肽链并易被水冲洗干净。



带污渍的纤维



生物洗涤剂



洗涤活性

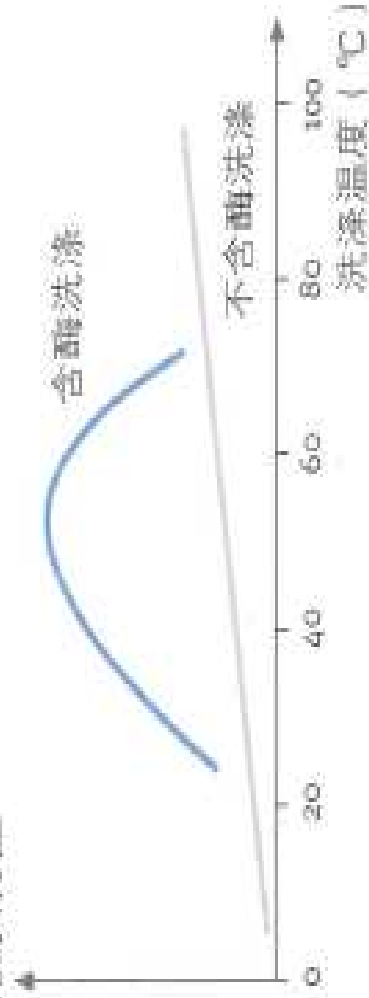
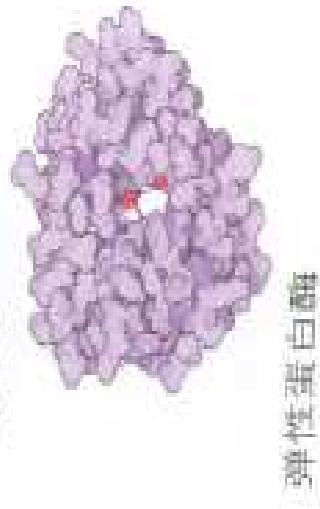
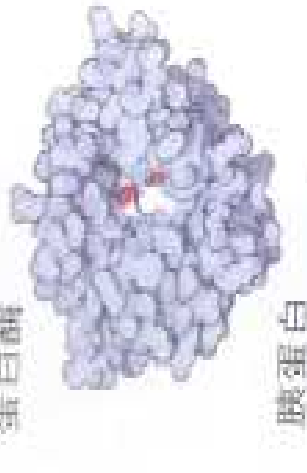
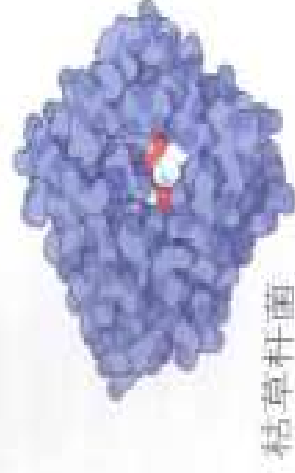


图2.17 生物清洗剂的作用示意图(左图)。丝氨酸蛋白酶(下图),由活性位点的一个特殊丝氨酸残基命名的蛋白酶。



- * 20世纪60年代中期，美国、西欧和日本就开始广泛地销售生物清洁剂。最初，清洁剂生产过程中产生的粉尘让工人们患上了过敏症，在用粒化处理后这一问题很快解决了，人们用蜡将微尘粒包裹起来。液洁剂和片状固体清洁剂的形成也避免了过敏的问题。



怎样制造清洁剂中的酶

- * 用于制酶的细胞要在不断搅拌的培养基（1-10万升）中培养。培养基中需加入用于预降解的淀粉(5%-15%)作为糖源和营养源，2%-3%的大豆粉以及2%的乳蛋白或明胶作为成本低廉的蛋白质和氮源，再加入磷酸盐稳定pH值。培养基置于121℃下进行20-30分钟的高温蒸汽灭菌，然后让温度降低到30-60℃的培养温度，pH值为中性，同时也要保证培养环境具有良好的透气性。



* 起始培养基是用来培养特别筛选的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)菌株的纯培养基。首先，将摇床培养的长颈瓶中的培养基接种到含有营养物质的中间介质中，使其成为小型生物反应器（10-50升）的接种体。通常情况下，500-1000升的培养基中，在获得终产物之前会先产生另一种中间反应物。细菌先消耗掉培养基中最易获得的营养来源，10-20个小时之后，就可以从培养基中测得它们分泌的一种蛋白酶——枯草杆菌蛋白酶。由于淀粉的降解作用非常短暂，因而细菌产生淀粉酶的时间也比较短；相比之下，只要培养基中的蛋白质一直存在，蛋白酶的生产就会一直持续下去。



- * 为了避免其他微生物在培养基中生长并破坏产物，需要将这些生物反应器迅速降温到 5°C ，杆菌细胞（大约100克/升）通过离心或过滤从培养基中分离出将上清液用超滤法浓缩，超滤膜上的孔非常小，即使是溶解的蛋白酶分子也无法通过，而水分子和其他溶于水中的盐分子等小分子则可以毫无障碍地通过，这样就可以得到十倍于原浓度的蛋白酶了。





生物清洁剂的作用步骤。



日本的洗衣机并没有加热程序、因为十几年来，日本人一直使用生物清洁剂。

- * 酶的干燥制备可以通过沉淀作用或者喷雾干燥法来获得。将含有酶的溶液喷入热空气气流中，使水分得以快速蒸发，所形成的酶微粒的大小在0.5-2微米之间。再将它们用惰性金属粒包裹起来，或是（用制药丸机）将它们包裹在类脂物质中，譬如聚乙烯乙二醇。

- * 近年来，节约能源成为生物清洁剂的另一个特征。清洁剂所含的酶在 $50-60^{\circ}\text{C}$ 时达到最适反应温度，这样一来，脏衣物就不需要再进行煮沸洗涤，因此极大地节约了能源。将淀粉酶和脂肪酶加入到蛋白酶中有助于降解淀粉残基和脂肪。
- * 在棉布生产过程中，加入纤维素酶 (cellulase) 可以降解粘在布上的微纤维，使棉布更柔软，染色效果更艳丽。餐具清洁剂越来越多地用到淀粉酶 (amylase) 和脂肪酶 (lipase)。



- * 酶促除污剂(enzymatic stain remover) 中含有蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶，不仅可以溶解像红酒、青草汁、水果汁、咖啡和茶渍这样的顽固污渍，还能去除许多常见的复合污渍。水果冰淇淋、酸奶还有番茄沙司中不仅含有色素，还有蛋白质和脂肪；肉汁、调味番茄酱这些做好了的食物中也含有色素、蛋白质、脂肪和淀粉。在清洗上述这些污渍的过程中就需要酶促除污剂了。



- * 清洁剂和除污剂中也含有会破坏酶的氧化漂白成分，但是研究者们利用蛋白质工程(protein engineering)解决了这个难题。他们对洗涤过程中用到的杆菌蛋白酶了微小的改变：在用于提取蛋白酶的草杆菌基因组中，对氧化作用敏感的一个氨基酸残基（第222位的蛋氨酸）用另一个更稳定的残基替代，再从枯草杆菌变种(subtilisin variants)中提取所需的蛋白酶。每年，这种经过优化的蛋白酶可以生产上千吨。
- * 这些酶在pH10和60 °C 的条件下仍然可以保持稳定的活性，同时不受到表面活性剂、复杂因子（硬水软化剂）以及氧化剂的影响。

软化肉类与皮革的蛋白酶

- * 西班牙人占领了墨西哥后，他们发现地人总是将肉裹在番木瓜树 (papayatree, *Carica papaya*) 的树叶里煮或是煎，时也会用一片番木瓜的果实来反复摩擦要食用的肉。这看起来可能有些不可思议，但的确是个好方法——番木瓜中含有的高浓度蛋白酶和凝乳蛋白酶可以降解肉类中结缔组织，使肉变得易于咀嚼，更为可口。



- * 在美国，每年有几百吨的番木瓜蛋白酶(papain)用于肉类嫩化，其他一些蛋白酶，例如从无花果树上提取的无花果蛋白酶，以及从菠萝中提取的菠萝蛋白酶也有同样的用途。现在，世界各地都可以买到含有各种蛋白酶的嫩肉粉(tenderizing powders)，将其揉进肉类然后在室温下放置几小时，这期间，植物蛋白酶不断地降解像胶原质和弹性蛋白这样的结缔组织蛋白，须加快肉类的自然成熟。正如我们知道的，好东西需要时间的酝酿才会变得美味可口。在动物体内，其自身的蛋白酶（胶原蛋白酶）在成熟过程中也是如此运作的。



- * 在皮革制造业中，微生物蛋白酶具有相当高的利用价值。把毛发去除后，皮料在制革前需要经过一个软化(bating)过程。较典型的方法就是将皮革浸泡到含有发酵过的狗（或鸟）粪的水溶液中。
- * 1911年，Otto Rohm获得了一项专利权——在制革过程前用动物胰腺酶类软化皮革。



图 2.20 Otto Röhm (右) 正在鞣皮（制革的一项工艺）。



图2.21 Oropo®是第一种工业化生产的皮革软化制品。




* 酶取代了用狗粪软化皮革的传统方法，这种传统方法并不能增添皮革的光泽度。不过，我们现在当然明白了为何狗粪可以到软化的目的——粪便是软化皮革的多，蛋白酶乐于生长的温床。



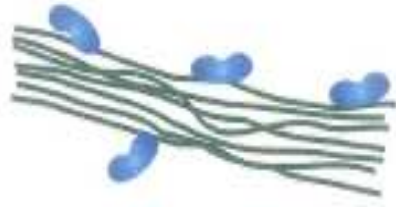
固定：酶类的重复使用

- * 上面提到的那些酶制造工程广泛应用于工业化生产的前提条件是：酶的价格必须很低廉，这样就无需考虑它在使用后是还存在活性。这一条件主要是针对胞外水解酶(extracellular hydrolase)而言，如蛋白酶，淀粉酶以及脂肪酶这类稳定并且不需要辅因子的酶类。
- * 相比胞外水解酶，用同样的方法分离和使用胞内酶就太花费财力和人力了，我们必须找到合适的方法增强酶的稳定性并使它能够被反复使用。在许多应用中，例如制药，其终产物必须完全独立于酶残基，以避免免疫反应。因此，需要寻找可以将酶与其终产物分离开的方法，比如将酶固定在载体物质上，也就是酶的固定。

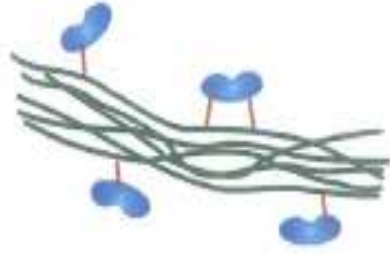


- 
- * 固定化的意义在于酶可以被重复使用，它们同大载体相结合，从而可以用肉眼所见并便于从反应液中机械分离出来（例如过滤）。
 - * 一大批酶固定技术得到迅速发展。现在，已经可以通过化学（共价结合）或物理（吸附或静电力）方法将酶结合到它们的载体上去。
 - * 特殊的反应试剂可以用于交联结合酶分子，或者用凝胶或中空的纤维力学诱捕酶分子。

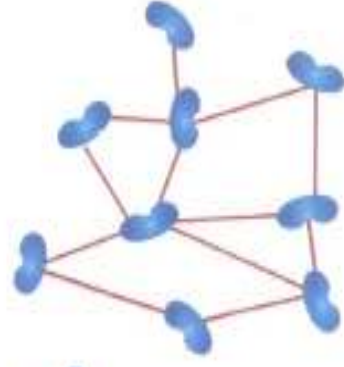
吸附



共价键



交联



凝胶包埋




微量封装



压缩于真空纤维中

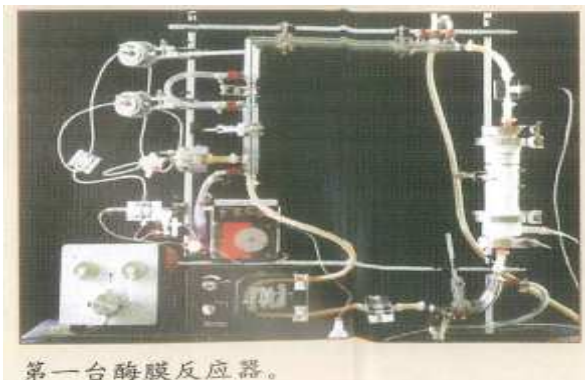


- 
- * 相比液态酶，固态酶的优点显而易见：首先，可以重复使用；其次，具有反应所需要的化学和物理成分；第三，在宽的pH范围和较高的温度下可以保持稳定性。而且，固态酶的终产物都是与酶残基分离的。

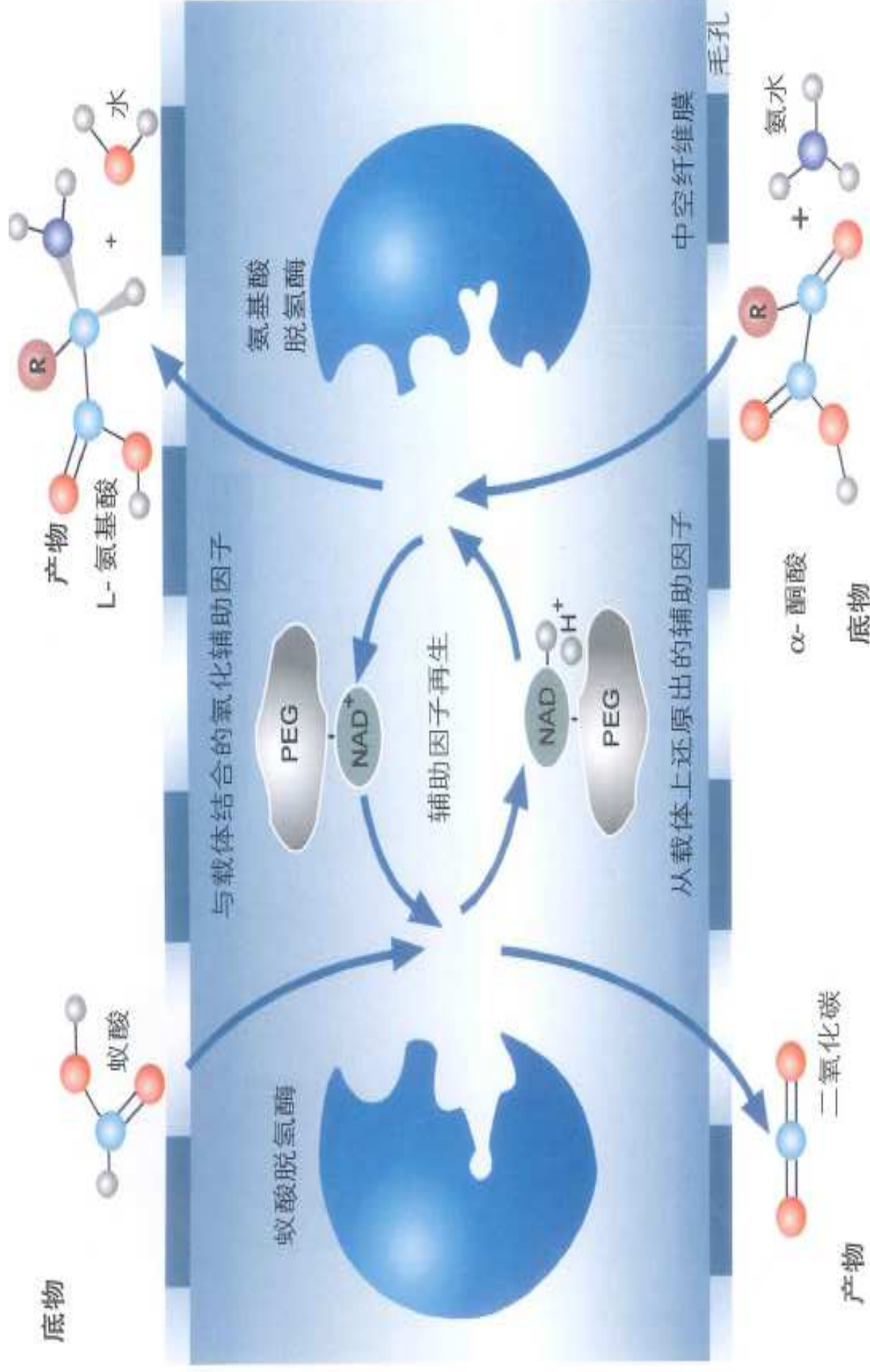
酶膜反应器：辅助因子再生性的应用

- * 酶膜反应器(enzyme membrane reactor, MR)的发展开启了酶应用的新天地，这种技术需要使用辅因子依赖性的酶。将使用完毕后的辅因子替换掉需要极高的成本，因此，一种持续性酶促再生辅因子的方法应运而生。

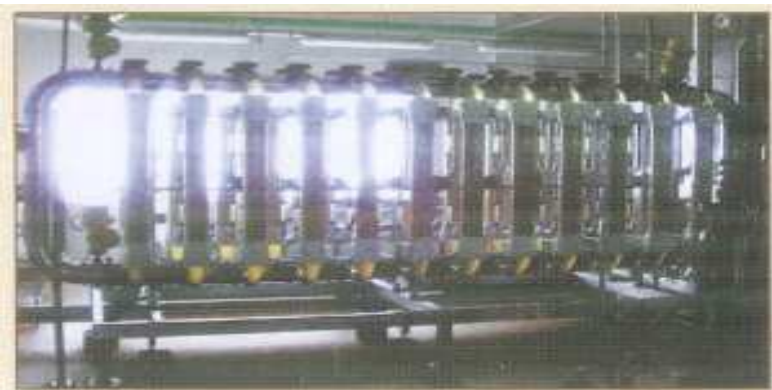
- * 当时，酶的固定化已经非常流行，酶通过交叉连接、共价结合或是嵌入到凝胶中。而唯一的困难就是它们很容易在固定过程中失去活性。一种截然不同的实验方法解决了这个难题。由于膜结构的使用，我们不需要干扰酶的活性，就能够将酶与产物分隔开。于是，酶膜反应器(EMR)问世了。
- * 与固态酶相比，EMR还有一个优点——反应器中可以用酶填满。



- * 在膜反应器中，辅因子依赖性(NADH)氨基酸脱氢酶和甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH, 用于辅因子的再生)并排在位于底物溶液将要通过的超滤膜之间，而酶分子则无法从膜上穿过；为了防止低分子的重辅因子离开反应空间，需要将它们与聚合载体(polymer carrier, 此处为聚乙烯二醇, PEG)相结合，由于它们的分子体积较大，因而可以保留下来。在辅因子的参与下，氨基酸脱氢酶将酮酸转变为可以通过膜扩散的L氨基酸。
- * 利用酶膜反应器使辅因子得以再生的想法，在超过90天的周期中，生物反应器中的每种酶在NAD⁺存在的条件下可以再生70-90万次。



- * 1981年，第一台EMR在德国康士坦茨(Konstanz)-投入市场。德国 Degussa公司在中国南宁启动了一台EMR，仅2005年一年就生产了500吨L-甲硫氨酸。
- * 可能有人会问：为什么L-甲硫氨酸能通过发酵产生呢？这是因为含硫氨基酸的生物合成过程太复杂了。



德国Degussa公司在中国南宁的酶膜反应器。

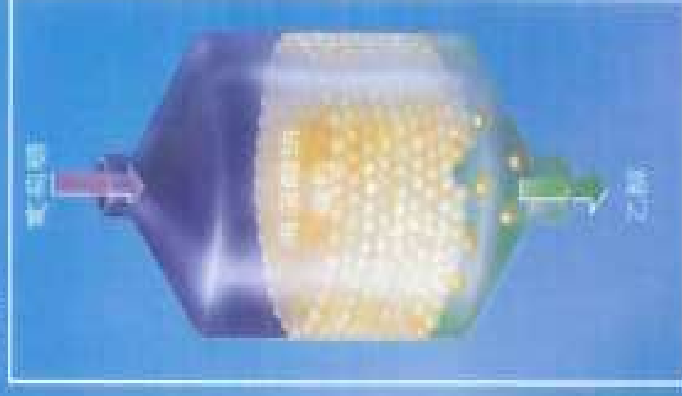
固定细胞

- * 不只是酶，整个细胞也同样可以被固定。日本在这一领域已经开始了开创性的研究。在田边制药有限公司工作的千烟一郎和土佐哲也，他们于1973年发明了细胞固定的方法。
- * 这种方法将不易存活的大肠杆菌细胞封入凝胶中，与从反丁烯二酸中提取的600吨氨基酸相混合。120天后，大肠杆菌活性只损失了一半，而可以自由活动的菌群在10天内就会损失一半活性。细胞固定化比使用自由细胞节省了60%的成本，用于催化剂的花费也从使用自由细胞的30%降低到了3%，劳动力和能量投入也降低了15%。一个1000升的反应堆每天大概可以提供两吨的L—天冬氨酸。

- * 日本协和发酵工业株式会社(KyowaHakko Kogyo Co.)于1982年开始了一个试验项目，他们运作五个反应柱，每个反应柱容量四立方米，可以从甘蔗糖浆中连续生产8.5%的乙醇。反应堆将活酵母细胞封闭到藻酸盐小球(alginate bead)中。藻酸盐是从海藻中获得的，它也可以用作食品工业中的凝胶添加剂。这个世界领先水平的工厂每天可以制造2400升纯酒精。



图2.40 利用固态酵母来生产乙醇的当代日本工厂。



在每根催化剂管中
固定着许多催化剂

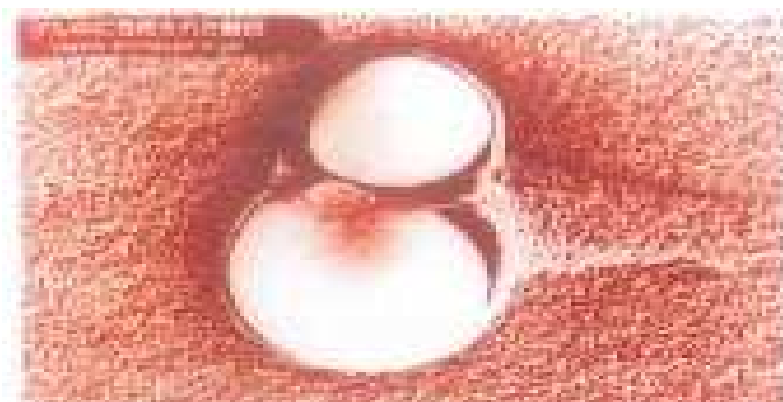


氢气

形成醇类

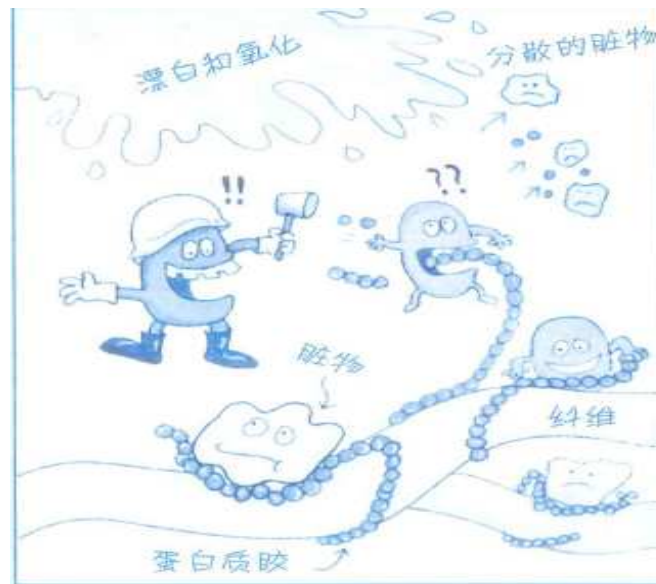
催化剂


- * 与传统工业相比，固态细胞在工业应用中的优点显而易见。其生产力几乎比传统工业高了20倍。从细胞固定化过程可以持续运作开始，它的生产就实现了自动化和电脑控制化，因此降低了劳动力成本。这种乙醇生产工厂已经成为更加完备的合成工业的典范。



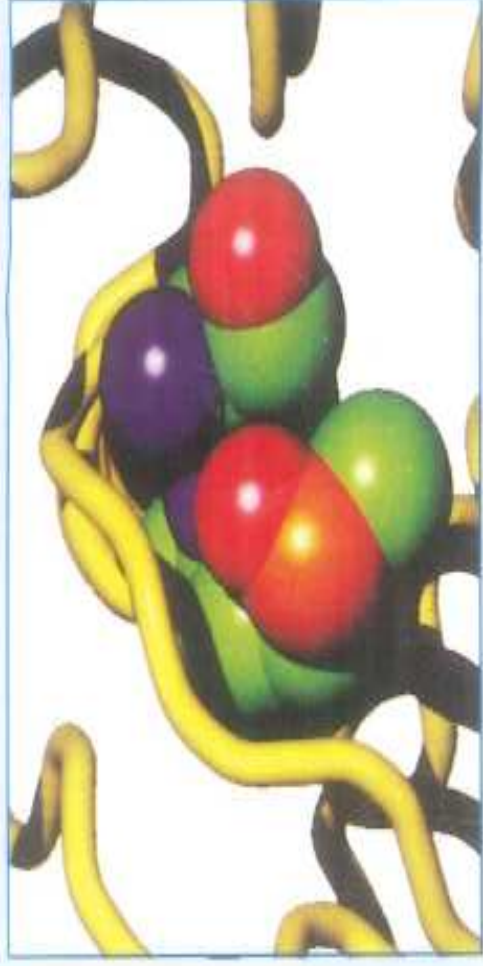
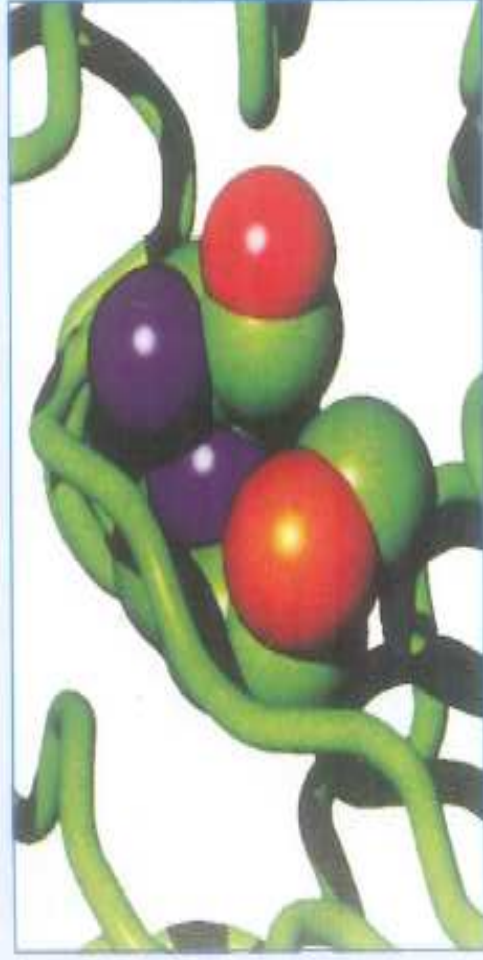
蛋白质工程——酶的定制

- * 蛋白质设计师对某种野生型酶进行各种修改，然后分子生物学家按照设计在某种宿主细胞中培养这种经过改的酶，之后再由生物化学家对几种突变酶进行测试，从中筛选出最适合于工业化生产的酶。



- 
- * 清洁剂配方中的漂白剂(bleaching wagents)会使酶损失一部分活性，因为像氧化氢或高酸一类的漂白剂是用来做氧化剂的，它们会使酶在洗涤过程中损80%的活性。这就是为什么用它来清洁蛋白质污渍时效果会变差。为了证实一假设，研究人员在酶培养物中加入过氧化氢，结果发现酶的活性确实降低了80%。最终，他们分离并结晶出了氧化型枯草杆菌蛋白酶，并与普通的（非氧化型）枯草杆菌蛋白酶进行了比较。

- * 第222位的甲硫氨酸残基的硫原子上有一个额外的氧原子，甲硫氨酸残基的旁边紧靠着活性位点——第221位的丝氨酸。在氧化型酶中，丝氨酸的侧链（红色球体表示氧原子）位置有细微的不同。这一细微的移位由第222位的甲硫氨酸残基的亚砷基（氧化硫）和第221位的丝氨酸残基的醇羟基作用形成的氢键所造成，就是催化效果降低的原因。
- * 当用其他19种氨基酸中的一种来取代甲硫氨酸时，所得的变种酶就会对漂白剂产生抗性(bleach-resistant)。因而相比于野生型，这种具有抗性的变种酶在有漂白剂的清洁剂中仍然具有良好的污效果。其他清洁剂相关的酶也可以用类似的方法处理，由此便产生了具有漂白剂抗性的 α -淀粉酶（用于降解淀粉）。



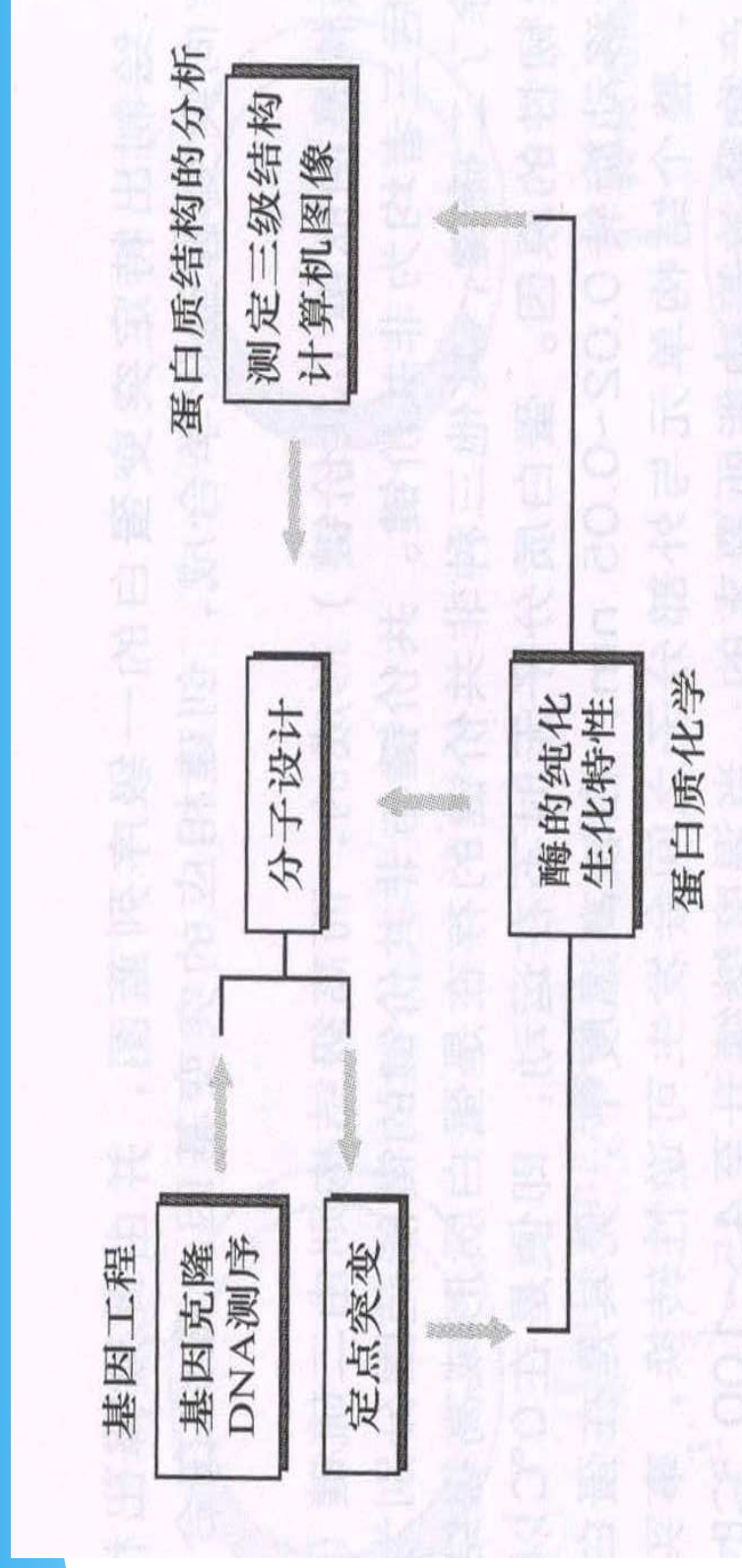
酶的活性位点模式图。左图为野生型枯草杆菌蛋白酶 (PDB 编号: 1CSE) 的活性位点, 右图
为氧化型枯草杆菌蛋白酶 (PDB 编号: 1ST2) 的活性位点。第211位和第222位氨基酸残基表
示为球形。

蛋白质工程分子理性设计战略

- * 克隆一个酶或功能蛋白的结构基因；
- * 确定其核苷酸编码序列；
- * 演绎出相应的氨基酸序列；
- * 确定蛋白质的生物学性质；
- * 建立蛋白质的三维空间结构；
- * 设计工程蛋白的分子蓝图；
- * 借助于DNA定点突变技术更换密码子；
- * 分析突变蛋白的生物学和化学特性；
- * 确立蛋白质序列-结构-功能三者之间的对应关系；
- * 将此对应关系反馈至第6步，并进行下一轮操作，直到构建所期望的工程蛋白质。

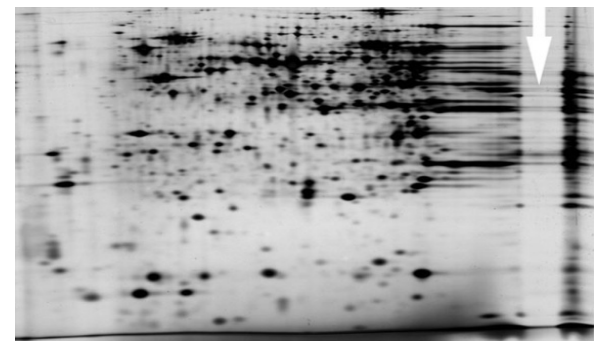


蛋白质工程分子理性设计战略



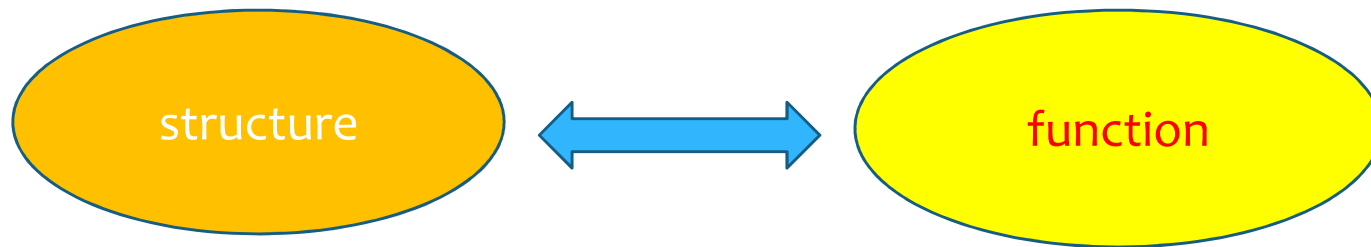
蛋白质工程的研究内容及应用

- 蛋白质在催化、构成、运动、识别、运输、调控等各个生命环节均起着不可替代的作用。
- * 因此，在人类基因组计划飞速推进的今天，一个旨在揭示生命世界蛋白质信息谱、结构谱、能谱的崭新学科——蛋白质组学应运而生。
- * 对大多数复杂蛋白质尤其是高等哺乳动物蛋白质而言，其生物功能的发挥还依赖于构成它的若干独立结构域或功能域的有序作用。
- * 蛋白质工程实际上是一种位点特异性的体外精细打靶技术。



蛋白质工程实施的必要条件

前提条件是必须了解蛋白质结构与功能的对应关系。



基因的体外定向突变

- * 在DNA水平上产生多肽编码顺序的特异性改变称为基因的定向诱变。利用这项技术一方面可对某些天然蛋白质进行定位改造，另一方面还可以确定多肽链中某个氨基酸残基在蛋白质结构及功能上的作用，以收集有关氨基酸残基线性序列与其空间构象及生物活性之间的对应关系，为设计制作新型的突变蛋白提供理论依据。

基因的体外定向进化

- * 基因分子定向进化的主要目标是在**短时间**内获取任何期望的突变基因及其编码产物，它的基本战略是在体外对特定基因实施**随机**突变，然后借助于适当的**高通量筛选**程序准确、迅速地获得所需要的突变基因。

* 分子定向进化的主要过程包括：

- * ①通过随机突变或(和)基因重组，创造一个靶基因或一群家族基因的多样性文本，建立相应的突变文库；
- * ②将上述基因的突变文库在适当的受体生物中转换成对应的蛋白变体库；
- * ③采用高通量筛选程序，检出由氨基酸置换而引起的变体蛋白的性状变化，确定该氨基酸在蛋白分子中的重要作用。

易错PCR

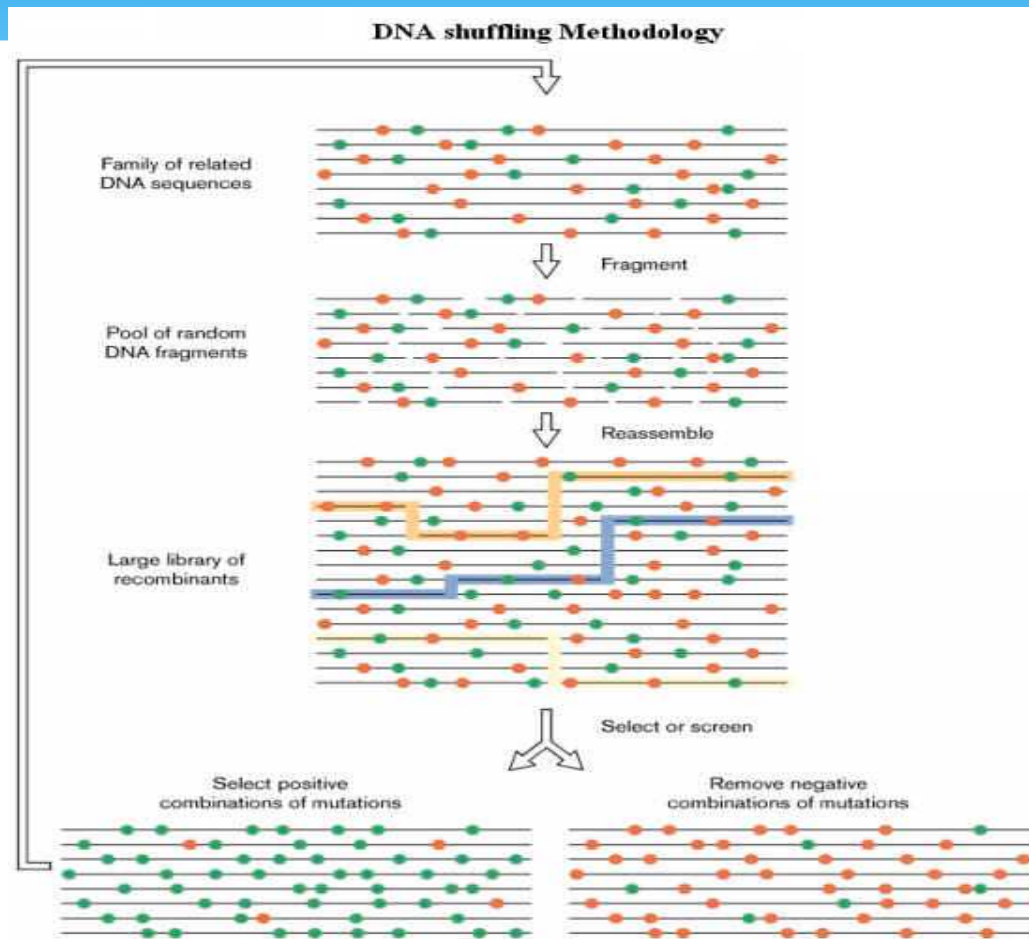
- * 易错PCR是一种简便快速地在DNA序列中随机制造突变的方法，其基本原理是通过改变传统PCR反应体系中某些组分的浓度，或使用低保真度的DNA聚合酶，使碱基在一定程度上随机误引入而创造基因序列多样性文库。
- * 易错PCR技术的关键在于选择适当的突变频率，一般为每个基因2-5个碱基替换。PCR扩增反应最常用的Taq DNA聚合酶是所有已知DNA聚合酶中掺入错误碱基概率最高的，每扩增一轮其错误率在 0.1×10^{-4} _ 2×10^{-4} 之间，PCR反应经20-25次循环，积累的错误率可积累达 10^{-3} /碱基。


- * Taq DNA聚合酶在一般条件下的错误掺入具有一定的碱基倾向性，即由AT碱基对转变成GC碱基对。
- * 但这种突变率仍然不够，特别是对DNA小片段，更难获得理想的突变数量。改进的方法包括：
 - * 提高 $MgCl_2$ 的浓度，以稳定非互补碱基对的存在；
 - * 自调节dNTP的比例，以促进错误碱基掺入的概率；
 - * 添加 $MnCl_2$ ，以降低DNA聚合酶对模板的特异性；
 - * 增加DNA聚合酶的用量；
 - * 连续扩增操作，将一次扩增得到的有用突变基因作为下一次PCR的模板，反复进行随机突变，以积累重要的有益突变。

DNA改组

- * DNA改组方法是在随机诱变的基础之上发展而来的。首先对一组序列相关的DNA序列（经随机诱变得到的的一组有益突变体，或天然存在的基因家族），经过超声波处理或用DNA酶I消化产生一系列随机切割的DNA片段。然后，在没有引物的情况下，采用有性PCR（DNA改组）方法进行合成。随着循环数的增加，PCR产物将越来越接近切割前的目的基因的长度。最后，用基因两侧的引物合成全长的基因。该基因已经包含了不同突变体发生的突变。在DNA改组中，包括基因重新组装的过程，正是这一点，DNA改组与以往的诱变技术有根本的不同。

DNA Shuffling



- 
- * 目前，已建立起多种形式的DNA改组程序，包括基因组改组 (genome shuffling)、家族基因改组(family shuffling)、单基因改组(single gene shuffling)、外显子改组(exon shuffling)等，后者可用于建立各种大小的随机多肽库。
 - * 这些DNA改组方法已广泛地用于改良酶和蛋白药物的活性、热稳定性、底物特异性、对映体选择性，可溶性表达、表达水平等方面，取得了令人瞩目的成果

- * DNA改组的奠基人Stemmer当年就是采用该技术，在大肠杆菌中使 β -内酰胺酶(由TEM-1基因编码)的抗生素抑制活性(MIC)从0.02 pg/mL增至640 μ g/mL，提高了32 000倍。

表 7-1 应用 DNA 改组技术取得成效的酶和操纵子

突变酶	研究目的	研究结果
三嗪杂苯水解酶	改进酶特性	取得三个突变体，磷脂酶活力在 50% DMSO 中明显提高，半衰期提高 4 倍
β -内酰胺酶	改进酶活性	提高活性 270 倍
天冬酰胺转移酶	改进酶活性	提高活性，表明 6 个氨基酸残基与活性相关
头孢菌素酶	改进酶活性	提高酶活性 540 倍
β -半乳糖苷酶	改进酶特性	获得一个新酶，果糖苷酶活力提高了 10 倍，而半乳糖苷酶活力下降了 40 倍
胡萝卜素合成酶	构建创新的工程菌	构建成功生产四种不同胡萝卜素衍生物的工程菌
TEM-1 β -内酰胺酶	改进酶活性	酶活提高 32 000 倍
β -内酰胺酶家族	改进酶活性	酶活提高 270~540 倍
β -半乳糖苷酶	改进酶活性和特性	岩藻糖苷酶活提高 66 倍；底物专一性提高 1 000 倍
突变酶	研究目的	研究结果
绿色荧光蛋白	改进酶特性	蛋白折叠提高 45 倍（大肠杆菌和哺乳动物细胞）
抗体（scFv）	改进酶活性	酶活提高 400 倍
抗体（scFv）	改进酶特性	表达水平提高 100 倍
硝酸盐代谢操纵子	改进酶活性	硝酸盐抗性提高 40 倍
莨去津降解系统	改进酶特性	莨去津降解效率提高 80 倍
烷基转移酶	改进酶特性	DNA 修复能力提高 10 倍
苯甲基酯酶	改进酶特性	抗生素去保护能力降低 150 倍
tRNA 生物合成酶	改进酶特性	工程化 tRNA 结合力提高 180 倍

Thank you