

酶工程的研究进展

黎海彬, 郭宝江

(华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631)

摘要:酶工程是现代生物技术的重要组成部分,它作为一项高新技术将为工业的发展起重要推动作用。介绍了自然酶的开发、酶的化学和遗传修饰、酶的固定化、人工合成酶、酶基因的克隆和表达、酶的遗传设计等方面的理论和技术研究的最新进展。

关键词:酶工程;人工合成酶;酶基因的克隆和表达;固定化;遗传修饰

中图分类号:Q814

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2006)S1-0040-04

Advance in research on enzyme engineering

LI Hai-bin, GUO Bao-jiang

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Enzyme engineering is an important part of modern bio-technology, it will give an impetus to the industries as a new hi-technology. The new advance in enzyme engineering research such as development of natural enzymes, chemical and genetic modification of enzymes, immobilization of enzymes, synzymes, cloning and expression of enzyme genes and genetic design of enzymes are introduced.

Key words: enzyme engineering; synzymes; cloning and expression of enzyme genes; immobilization; genetic modification

酶的生产和应用的技术过程称为酶工程,其主要任务是通过预先设计,经人工操作而获得大量所需的酶,并利用各种方法使酶发挥其最大的催化功能^[1],它的应用范围已遍及工业、农业、医药卫生行业、环保、能源开发和生命科学等各个方面。近 20 年来,由于蛋白质工程、基因工程和计算机信息等新兴高科技的发展,使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^[2]。本文对酶工程的研究进展进行了综述。

1 化学酶工程

化学酶工程亦称为初级酶工程,它主要由酶学与化学工程技术相结合而形成^[3]。

1.1 自然酶制剂的开发与应用

据估计自然界中存在的酶有 7 000 种左右,其中经过鉴定和分类的有 2 000 余种,但大规模生产和应用的商品酶只有数十种,小批量生产的商品酶约数百种。目前,已应用于工业生产的酶主要有水解酶、凝乳酶、果胶酶、糖苷酶、氧化酶、转移及异构酶等^[4],当前酶的应用研究备受关注,主要有以下几个方面:①食品工业中的应用^[5]。酶在食品工业中最大的用途是淀粉加工,其次是乳品加工、果汁加工、食品烘烤及啤酒发酵。与之有关的各种酶如淀

粉酶、葡萄糖异构酶、乳糖酶、凝乳酶、蛋白酶等占酶制剂市场的一半以上。②轻化工业中的应用^[6]。酶工程在轻化工业中的用途主要包括:洗涤剂制造(增强去垢能力)、毛皮工业、明胶制造、胶原纤维制造(粘接剂)、牙膏和化妆品的生产、造纸、感光材料生产、废水废物处理和饲料加工等。③能源开发上的应用^[6]。在全世界开发新能源的大趋势下,利用微生物或酶工程技术从生物体中生产燃料也是人们正在探寻的一条新路。例如,利用植物、农作物、林业产物废物中的纤维素及半纤维素等原料制造甲烷等气体燃料以及乙醇和甲醇等液体燃料。另外,在石油资源的开发中,利用微生物作为石油勘探、二次采油、石油精炼等手段也是近年来国内外普遍关注的课题。④环境工程上的应用^[6]。在现有的废水净化方法中,生物净化常常是成本最低而且最可行的。微生物的新陈代谢过程可以利用废水中的某些有机物质作为所需的营养来源,因此利用微生物体中酶的作用,可以将废水中的有机物质转变成可利用的小分子物质,同时达到净化废水的目的。⑤医药行业上的应用。药用酶、抗体酶和酶标药物的研究开发及新型的溶栓酶、艾滋病病毒蛋白酶等的研究备受关注。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^[7]。

自然界蕴藏着巨大的微生物资源,据测算,1 g土壤中含有1亿个微生物。近来,人们从生产实践的需要出发,非常重视开发新的酶种。但迄今为止,人们对极端环境微生物(extreme mophiles)和不可培养微生物的研究还很不够,这2个资源宝库值得人们好好开发^[8-12]。

人们首先注意从极端环境条件下生长的微生物内筛选新的酶种,其中主要研究了嗜热微生物(thermophiles)、嗜冷微生物(psychrophiles)、嗜盐微生物(halophiles)、嗜酸微生物(acidophiles)、嗜碱微生物(alkalophiles)、嗜压微生物(barophiles)等。目前,人们已经发现能够在250~350℃条件下生长的嗜热微生物,能够在-10~0℃条件下生长的嗜冷微生物,能够在pH 2.5条件下生长的嗜酸微生物,能够在pH 11条件下生长的嗜碱微生物,能够在饱和食盐溶液(含盐质量分数32%或盐浓度5.2 mol/L)中生长的嗜盐微生物,能够在100 MPa条件下生长的嗜压微生物以及在高温(105℃)和高压(40 MPa)条件下生长的嗜热嗜压微生物等,这就为新酶种和酶的新功能的开发提供了广阔的空间。例如,武波等^[13]从新疆等盐碱地中筛选到一株耐高温、耐碱和耐盐的蛋白酶菌株。

所谓不可培养微生物是指在实验室内采用常规培养方法培养不出的微生物,而这类微生物约占全部微生物的99%。目前,研究人员完全可以绕开菌种分离、纯化步骤,应用最新分子生物学方法,直接从这类微生物中探索、寻找有开发价值的、新的微生物基因和新的酶种。

1.2 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去除或置换,改变酶的理化性质,最终达到改变酶的催化性能的目的。

酶的化学修饰主要有以下几种方法:①修饰酶的功能基团,如氨基、羟基、咪唑基等可离解基团,由此发展起来的方法有酰化法、烷基化法、丹磺酰氯法等。例如,抗白血病药物天冬酰胺酶^[14]经修饰后,可使其在血浆中的稳定性提高数倍。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2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。例如,交联后的 α -半乳糖苷酶A,其热稳定性和抗蛋白酶的性能都有明显提高^[15]。③酶与高分子化合物结合,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℃时半衰期为2.5 min,当其与葡萄糖结合后,半衰期延长至63 min^[16]。

酶的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,但经化学修饰的酶能催化有机相中的反应,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,成为酶工程领域内的一个研究热点,特别是此领域内的基础研究,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^[17]。

1.3 酶的固定化

固定化酶是指被结合到特定的支持物上并能发挥作用的一类酶,是化学酶工程中具有强大生命力的主干。它在理论上和应用上的巨大潜力吸引了生物化学、微生物学、医学、化学工程、高分子等各个领域研究人员的注意力。酶的固定化技术包括吸附、交联、共价结合及包埋4种方法。

固定化酶在工业、临床、分析和环境保护等方面有着广泛的应用,但是在大多数情况下,酶固定化以后会部分甚至全部失去活性。一般认为,酶活性的失去是由于酶蛋白通过几种氨基酸残基在固定化载体上的附着造成的。由于酶蛋白多点附着在载体上,引起了固定化酶蛋白无序的定向和结构变形的增加。近年来,国外的研究者在探索酶蛋白的固定化技术方面已寻找到几条途径,使酶蛋白能够以有序方式附着在载体的表面,实现酶的定向固定化,而使酶活性的损失降低到最小程度^[18]。这种有序的、定向固定化技术已经用于生物芯片、生物传感器、生物反应器、临床诊断、药物设计、亲和层析以及蛋白质结构和功能的研究中^[19]。

1.4 人工合成酶的研制和模拟酶^[20-22]

人们将人工合成的具有类似酶活性的高聚物称之为人工合成酶(synzymes)。人工合成酶在结构上必须具有2个特殊部位,即一个是底物结合位点,一个是催化位点。业已发现,构建底物结合位点比较容易,而构建催化位点比较困难,2个位点可以分开设计,但是如果人工合成酶有一个反应过渡态的结合位点,则该位点常常同时具有结合位点和催化位

点的功能,如高分子聚合物聚-4-乙烯基吡啶-烷化物。

在模拟酶方面,研究的热点主要是对固氮酶的模拟。天然固氮酶由铁蛋白和铁钼蛋白 2 种组分组成,人们从组成分析出发提出了多种固氮酶模型,由此进一步利用铁、铜、钴等过渡金属络合物模拟过氧化氢酶等。

近年来,国际上又发展了一种分子压印技术,又称为生物压印技术,该技术可以借助模板在高分子物质上形成特异的识别位点和催化位点。目前,此项技术已经获得广泛应用,例如,模拟酶可用于催化反应、分子压印的聚合物可用作特制的分离材料及生物传感器的识别单元、抗体和受体结合位点的模拟物可用于识别和检测系统等。

2 生物酶工程

生物酶工程是在化学酶工程基础上发展起来的,是以酶学和 DNA 重组技术为主的现代分子生物学技术相结合的产物,也可称为高级酶工程^[3]。

2.1 酶基因的克隆和表达

酶基因的克隆和表达技术的应用使克隆各种天然的蛋白基因或酶基因成为可能,其步骤是:先在特定的酶的结构基因前加上高效的启动基因序列和必要的调控序列,再将此片段克隆到一定的载体中,然后将带有特定酶基因的上述杂交表达载体转化到适当的受体细菌中,经培养繁殖,再从收集的菌体中分离得到大量的表达产物。一些来自于人体的酶制剂,如治疗血栓栓塞病的尿激酶原,就可以用此法从大量的人尿中提取^[23]。此外还有组织纤溶酶原激活剂(TPA)与凝乳酶等 100 多种酶基因已经克隆成功,其中一些还进行了高效的表达。

对各种酶基因的克隆和表达,大部分是基于多聚合酶链式反应(PCR)技术、组织培养技术和蛋白质组学的发展。PCR 技术自从 1985 年问世以来已成为基因工程中最重要技术,它具有高度的专一性和灵敏度,能快速简便地扩增特定的 DNA 片段。目前 PCR 技术与其他技术相结合的研究异常活跃,特别是其与差异表达基因克隆技术的结合,产生了一批高效酶基因克隆与表达技术,如消减杂交、代表性差异分析、表达量差异分析、抑制性扣除杂交、order 差异分析等。其在分离克隆新出现的表达基因方面具有明显优势,但仍存在一些缺点,近些年针对这些缺点出现了较大改进,并提出了新的策略与方法。近几年,由于长距离 PCR 扩增技术与消减杂交

技术结合,使此技术获得了较大进展,产生了差异表达基因消减杂交技术、基于 c-DNA 文库减法杂交基础上的 LD-PCR 技术和基于 LD-PCR 基础上的减法杂交克隆技术^[24]。随着 PCR 技术的优化和基因工程的发展,酶基因克隆与表达技术将不断发展,而且将会获得更多新酶工程菌。

2.2 酶的遗传修饰

近几年兴起的另一个新研究领域是酶的选择性遗传修饰,即酶基因的定点突变,酶工程设计可以采用定点突变和体外分子定向进化 2 种方式对天然酶分子进行改造。定点突变需要知道酶蛋白的一级结构及编码序列,并根据蛋白质空间结构知识来设计突变位点。体外分子定向进化是近几年新兴的一种蛋白质改造策略,可以在尚不知道蛋白质的空间结构或者根据现有的蛋白质结构知识尚不能进行有效的定点突变时,借鉴实验室手段在体外模拟自然进化的过程(随机突变、重组和选择),使基因发生大量变异,并定向选择出所需性质或功能,从而使几百万年的自然进化过程在短期内得以实现。

利用定点突变技术对天然酶蛋白的催化性质、底物特异性和热稳定性等进行改造已有很多成功的实例^[25-28],但定点突变技术只能对天然酶蛋白中少数的氨基酸残基进行替换,酶蛋白的高级结构基本维持不变,因而对酶功能的改造较为有限。同时,由于已有的结构与功能相互关系的信息远远不能满足当今人们对蛋白质新功能的要求,因此目前采用体外分子定向进化的方法来改造酶蛋白的研究越来越多,并已在短短几年内取得了令人瞩目的成就,易错 PCR(error prone PCR)和 DNA 改组(DNA shuffling)就是其中的 2 种方法。

易错 PCR 是一种相对简单、快速、廉价的随机突变方法,它通过改变 PCR 反应条件,如降低一种 dNTP 的量(降至 5%~10%),以 dITP 来代替被减少的 dNTP 等,使碱基在一定程度上随机错配而引入多点突变。Chen 等^[29]通过易错 PCR 对枯草杆菌蛋白酶 E 进行了系列体外进化研究,经筛选得到几个在高浓度二甲基甲酰胺(DMF)中酶活力明显提高的突变株。DNA 改组则是 1994 年由美国的 Stemmer^[30]提出的,这种方法不仅可以对从随机突变文库中筛选出来的一组突变基因人为进化,还可以将具有结构同源性的几种基因进行体外重组,共同进化出一种新的蛋白质。通过这种方法产生的多样性文库可以有效积累有益突变,排除有害突变和中性突变,同时也可实现目的蛋白质多种特性的共进化。

2.3 酶的遗传设计

现在人们已掌握遗传设计技术,所以只要有遗传设计蓝图,就能人工合成出所设计的酶基因。酶遗传设计的主要目的是创制优质酶,用于生产昂贵特殊的药品和超自然的生物制品,以满足人类的特殊需要。目前的关键问题在于如何设计超自然的优质酶基因,即如何给出优质酶基因的遗传设计蓝图。现在还不可能根据酶的氨基酸序列预言其空间结构,但随着计算机技术和化学理论的发展,酶或其他大分子的模拟在精确度、速度及规模上都会得到改善,这将导致有关酶行为的新观点或新理论的产生,酶的化学修饰及遗传修饰也将提供更多的实验依据及数据,有助于解决关于酶的结构与功能的关系,因而将促进酶的遗传设计的发展^[8]。

3 结语

可以预计,随着各种高新技术的广泛应用及酶工程研究工作的不断深入,酶工程研究和酶制剂工业必将取得更快、更大的发展^[31]。可以相信,将来人们可以用化学的方法随心所欲地构造出各种性能优异的人工合成酶和模拟酶,而且还可以采用生物学方法在生物体外构造出性能优良的产酶工程菌为生产和生活服务,酶工程技术必将在工业、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发挥越来越大的作用。

参考文献

- [1] 郭勇. 酶工程[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.
- [2] 马晓聿,白净,任珂,等. 酶工程研究的新进展[J]. 化工进展, 2003,22(8):813-817.
- [3] 沈同. 生物化学(下册)[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,2000.
- [4] 童海宝. 生物化工[M]. 北京:化学工业出版社,2001.
- [5] 陈文伟,刘晶. 酶工程在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂,2004(6):98-101.
- [6] 郭勇. 酶的生产与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [7] 陈新荣,林爱星,陈永福. 端粒酶的研究进展[J]. 生物技术通报,2001(4):5-8.
- [8] 居乃璇. 酶工程研究与酶工程产业的新进展[J]. 食品与发酵工业,2000,26(3):54-62.
- [9] 王建华,刘艳艳,姚斌,等. 高产菊粉酶酵母筛选、发酵和酶学性质研究[J]. 生物工程学报,2000,16(1):60-64.
- [10] Voet D, Voet J G. Biochemistry[M]. 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons, 1995.
- [11] Dugas H. Bioorganic Chemistry[M]. 3rd Ed. Berlin: Springer, 1995.
- [12] Adams M W W. Enzymes and proteins from hyperthermophilic microorganisms, in advances in protein chemistry Vol 48[M]. New York: Academic Press, 1996.
- [13] 武波,蒋承建,陈以涛,等. 一株耐高温碱性蛋白酶菌株的筛选[J]. 食品与发酵工业,2001,27(6):16-20.
- [14] 王正祥,刘吉泉,诸葛健. 微生物酶的分子改性和人工进化的研究进展[J]. 生物工程学报,2000,16(3):301-303.
- [15] Dalboge H, Lange L. Plastic antibodies: Developments and applications[J]. Trends Biotechnol, 1998,16(3):363-367.
- [16] 王元. 现代酶工程技术的新进展[J]. 中国食品,2000,21(7):22-23.
- [17] 韩树波,朱敏,袁倬斌. 以 β -环糊精聚合物的超分子包结物为固定化介质的安培型过氧化氢传感器的研究[J]. 高等学校化学学报,1999,20(7):1036-1039.
- [18] Masse L, Kennedy K J, Chou S P. Use of polymers with enzyme analogous structure for the resolution[J]. J Chem Technol, 2001,76(10):933-939.
- [19] 董春华,何志敏. 酶膜反应器的应用及展望[J]. 化学工程,2001,29(4):25-29.
- [20] Mosbach K. Program of enzyme engineering[C]. Beijing, 1998:30-36.
- [21] Thomas D, Friboulet A. Program of enzyme engineering[C]. Beijing, 1998:36-39.
- [22] Wandrey C. Program of Enzyme Engineering[C]. Beijing, 1998:3-4.
- [23] 甄朱. 蛋白质组学进展[J]. 生物工程学报,2001,17(5):491-493.
- [24] Couto S R, Ratto M, Dominguez A, et al. Enzymatic enantioselective esterification of ketoprofen in organic solvent[J]. Process Biochem, 2001,36(6):995-999.
- [25] 朱国萍,腾脉坤,全传金,等. G138P 定点突变对葡萄糖异构酶热稳定性的改善[J]. 生物化学与生物物理学报,1998,30(6):607-609.
- [26] Mn Y F, Evans D E. Mutations of barley beta-amylase that improve substrate-binding affinity and thermo stability[J]. Mol Genet Genomics, 2001,266(3):345-347.
- [27] Huang C Y, Chang A K. Site-directed mutagenesis of the ionizable groups in the active site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase: Effect on activity and pH dependence[J]. Eur J Biochem, 2001,268(12):3558-3560.
- [28] Aikawa J, Park Y N. Replacements of amino acid properties of *Rhizomu corpusillus* pepsin, an aspartic proteinase from *Rhizomu corpusillus*[J]. J Bio Chem, 2001,129(5):791-794.
- [29] Chen K Q, Arnold F H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential andomnuta genesis of subtitles in E for catalysis in dimethyl for manmade[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993,90(12):5618-5619.
- [30] Stemmer W P C. DNA shuffling by random fragmentation and resemble: In vitro recombination for molecular evolution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,91(22):10747-10749.
- [31] 居乃璇. 21世纪酶工程研究的新动向[J]. 工业微生物,2001,31(1):37-45. ■