



酶工程的新成就与发展潜力

孟广震

(中国科学院微生物研究所, 北京)

人类对酶的利用源远流长,可上溯到数千年以前。当然,酶的工业化大生产则是第二次世界大战以后的事情,酶工程的发展历史从那时算起,至今已经三十多个年头了。几十年来酶制剂的品种和应用不断扩大,六十年代后,由于固定化酶、固定化细胞及固定化活细胞的崛起,使酶制剂的应用技术面貌一新。七十年代后期以来,由于分子生物学、遗传工程及细胞工程的发展又为酶工程的发展带来了新的机会。从酶的制备方法、酶的应用范围到后处理工艺都受到巨大冲击。上述发展趋势在1984年的国际生物工程会议上得到比较充分的反映。本文拟概述酶工程几个比较活跃的方面。

一、酶制剂应用的新领域

酶促反应在温和条件下仍能保持很高的反应效率,并且反应的专一性极高。基于上述两个重要优点,经近些年的努力已有相当一批酶投入工业或临床使用。除为人所共知的一些酶制剂外,近年又有一些新品种问世。如:1. 甘油激酶(Glycerokinase)。该酶被广泛用于测定血清中的甘油三脂,这在诊断脂代谢紊乱及动脉硬化中有重要临床意义。从假丝酵母及大肠杆菌所获得的该酶不够稳定,而从嗜热脂肪芽孢杆菌NCA 1503所获得的该酶则十

分稳定^[1]。2. 羧肽酶G₂(Carboxypeptidase)。氮甲喋呤是一种抗癌药物,服用过量会造成肾脏严重中毒。从假单胞菌ATCC 25301获得的羧肽酶G₂能催化该化合物切下一个谷氨酸残基,从而可被用于诊断及治疗氮甲喋呤中毒症^[2]。可惜该酶产量不高,后来用遗传工程的方法,使该酶基因在大肠杆菌中得到表达,产酶量可达大肠杆菌胞内可溶性蛋白的4%^[3]。3. 芳香酰胺酶(Aryl acylamidase)。醋氨酚是一种常用的止痛药,据统计在英国因服用过量而中毒者,每年超过2万例,造成肝脏和肾脏的严重损害。荧光假单胞菌能产生一种芳香酰胺酶,它能把醋氨酚分解成对-氨基苯酚和醋酸^[4],故该酶可用于快速临床诊断,现已投入市场。4. 苯丙氨酸氨裂解酶(Phenylalanine ammonialyase)。苯丙氨酸是人类食物的正常构成成份,但苯丙酮尿患者则不能食用。从酵母菌所获得的苯丙氨酸氨裂解酶能分解苯丙氨酸,并对消化液的破坏作用有很高的抗性。5. 血纤维蛋白水解酶类(Fibrinolytic enzymes),从人的乳房上皮细胞及豚鼠皮肤组织培养细胞系中获得一种血纤维蛋白溶酶原的活化因子,可用于诊断及治疗血管栓塞,正在进行扩大试验。

从酶工程的发展现状分析,在制造高价特殊化学制品、药物、食品添加剂、分

析试剂以及那些非酶催化剂在成本上站不住脚的应用部门,酶制剂仍拥有巨大优势。也应当注意到,迄今被开发的酶制剂,绝大多数为水解酶,而六大酶类之一的氧化还原酶被应用者,特别是大规模应用者寥寥可数。众所周知,大量的化学反应属于氧化还原反应,所以从逻辑上讲氧化还原酶是一群开发潜力极大的酶。本节将着重说明加氧酶、脱氢酶及氧化酶的应用潜力以及与此相关的辅酶再生等问题。

1. 加氧酶 (Oxygenases)。该酶能高效率而专一地把分子氧加到有机化合物中。通过这类反应可以把烷转化为醇;把烯烃转化为环氧化物;把硫化物氧化;使芳香族化合物开环;脱除N-甲基及O-甲基以及完成单环或多环烃的羟化反应等。

加氧酶分双加氧酶和单加氧酶两类,顾名思义双加氧酶可以把分子氧的两个原子全部加到有机物中,而单加氧酶则仅能加入一个氧原子,另一个氧原子则在消耗某些还原性物质(如NAD(P)H等)后被还原成水。双加氧酶曾被考虑用作芳烃转化反应的催化剂,但与链烃相比,芳烃的工业开发较慢^[5]。

单加氧酶能催化烃的加氧反应。这类酶中知之最详的是食油假单胞菌的 ω -羟化酶系,该酶系以辛烷为底物活力最高,产生辛醇。最初以为该酶是末端专一性的羟化酶,但后来证明烯烃的环氧化作用也很容易发生,它可以把1,7-辛二烯氧化成7,8-环氧-1-辛烯,这个反应甚至比辛烷的羟化反应更快^[6]。令人鼓舞的是环氧化反应有极高的立体专一性,能获得有光学活性的产品,相比之下,化学环氧化试剂则望尘莫及。

哺乳动物的多巴胺- β -单加氧酶(DBM)是一种含铜的金属酶,在体内能催化多巴胺羟化形成去甲基肾上腺素,该产

物在神经介质的转化及肾上腺素的形成方面起关键作用^[7]。后来证明该酶也能催化硫化物、烯烃等底物的加氧反应。

细菌甲烷加氧酶,能羟化甲烷形成甲醇,Dalton^[8]曾在活细胞、无细胞提取液及纯酶的水平上对该酶作了详尽的研究。值得注意的是这个酶能催化广泛不同的产物发生类似反应。与氧化还原酶有关的另一个例子是用酶法或微生物法生产4,4'-二羟基联苯,该产物是合成工程多聚体的重要单体^[9]。当然还应该提到甾体的转化,这是氧化还原酶工业应用的一大门类,传统上用全细胞发酵法转化,应用固定化细胞的可能性正在探索中^[10,11]。

2. 脱氢酶(Dehydrogenase),按其对于辅酶的依赖性可分成依赖NAD(P)以及依赖黄素辅酶的两类脱氢酶。

在羰/醇氧化还原反应中,醇脱氢酶(ADH)占中心地位,反应通式为 $H^+ + NADH + >C=O \rightleftharpoons -CH_2OH + NAD^+$ 。其中了解较多的是马肝醇脱氢酶(HLADH),该酶可催化无环、单环、双环乃至多环(如甾体)等不同结构的有机化合物的氧化还原反应,获得有光学活性的产物,如从(±)-顺-2(2'-羟乙基)-3'-环戊烷-1-醇制备前列腺素时,HLADH仅氧化1R,2S镜像异构体,而另一种未经氧化的1S,2R异构体被分离出来之后,可以被加工成所期望的内脂^[12]。

氢化酶(Hydrogenase),也称氢脱氢酶(Hydrogen dehydrogenase),该酶能用分子氢还原电子受体,可被用于氢的贮存以及从二氧化碳和氢生产有机化合物^[13]。从真养产碱菌分离到的氢化酶,在水溶液中不稳定^[14],固定多孔玻璃上稳定性则显著提高,直接把含该酶的细胞固定化,即可避免分离所造成的活力丢失,又可克服纯酶的不稳定性。

3. 氧化酶(Oxidases), 包括黄素蛋白氧化酶(如氨基酸氧化酶, 葡萄糖氧化酶等), 金属黄素氧化酶(如黄嘌呤氧化酶), 以及血红蛋白氧化酶(如过氧化氢酶、过氧化物酶等)。

作为食品抗氧化剂的葡萄糖氧化酶是唯一应用于大宗制造业的氧化还原酶制剂。此外, 如果用苯醌代替氧作为电子受体, 在厌氧条件下可以生成氢醌^[15]。

氨基酸氧化酶可以催化把氨基酸转化为酮酸的反应, 利用富含该酶及过氧化氢酶的固定化细胞, 可以在制备规模上, 实现九种酮酸的生产^[16]。副产物能引起细胞失活, 加入活性碳与细胞共同固定化, 能在一定程度上克服这种损害。

辣根过氧化物酶能清除煤炭加工废水中的苯酚^[17]。而卤过氧化物(Haloperoxidases), 在过氧化氢和卤离子存在下催化底物分子形成碳卤键。该酶也能催化烯、炔的卤化作用。美国的 Cetus 公司利用卤过氧化物酶从链烯生产卤代醇, 再从卤代醇出发, 生产各种链烯氧化物, 这些氧化物在合成聚合物等工业中有广泛的用途^[18,19]。用微生物法或酶法生产乙烯或丙烯的氧化物被认为是很有希望的, 甚至有人预计到80年代末至少酶法生产氧化丙烯是可以工业化的。

4. 辅酶的再生, 据统计约 1/3 的酶的催化功能要求一种腺嘌呤辅酶(NAD、NADP、ATP、FAD或辅酶A), 氧化还原酶更是如此。因此, 解决辅酶再生问题, 是打开氧化还原酶工业应用的前提条件之一。

Wandrey等^[20]把固定化技术用于辅酶再生中, 先以分子量一万到四万的聚乙二醇为载体制成固定化NAD⁻¹, 然后再与亮氨酸脱氢酶, 甲酸脱氢酶一起包在超滤膜中, 利用上述固定化系统, α -酮异己酸由

亮氨酸脱氢酶催化转化为亮氨酸, 并伴有NAD⁺的形成; 在另一个酶促反应中, 甲酸脱氢酶催化甲酸氧化成二氧化碳, 并伴有NADH的形成, 两个反应偶联起来便构成了NAD的再生系统。

固定化辅酶的缺点是活力大幅度下降, 许多情况下固定化后仅剩余百分之几的活力。后来Wong和Whitesides^[21]发展了一种可溶的辅酶再生系统, 该系统基于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶所催化的氧化还原反应。

关于辅酶再生的化学法, 以醇脱氢酶催化乙醇氧化为乙醛反应为例, 该反应所形成的NADH通过氧化还原介质吩嗪硫酸甲脂把电子传递到受体2,6-二氯酚吲哚酚分子上, 从而完成辅酶的再生^[22], 显然, 这种再生方法的前提是所使用的化学介质能比较容易地从反应混合物中清除出去。

由此可见, 目前对氧化还原酶的研究十分活跃, 少数酶在工业应用中已初显身手, 预计随着这方面研究的深入开展, 人们将会发现这些酶有更多的实际用途。

二、固定化技术的新扩展

自从固定化酶技术问世以来, 已在很大程度上改变了酶工程的面貌, 固定化微生物细胞又因其制备简单, 成本低廉以及有一套现成可用的多酶系统, 在许多情况下显示了比固定化酶有更大的优越性。近年随着分子生物学及生物工程的发展, 该技术又向动物细胞、植物细胞、杂交瘤细胞以及其他工程细胞扩展, 同时也对该技术的发展提出许多新的要求。

固定化细胞与游离的天然细胞相比有以下几个优点: (1) 固定化细胞体积较大, 易操作, 装柱后可用于连续化生产; (2) 细胞被束缚在载体上, 易于同催化

产物分离；（3）支持物的化学组成可以改善细胞所处的微环境的性质，例如支持物的疏水性及电荷情况常可以在底物与产物的分隔中起重要作用；（4）固定化细胞可以反复使用，这对于生长缓慢的动植物细胞尤为重要。

制备固定化细胞的方法大体分吸附法、共价结合法、交联法、胶囊法及包埋法等五种。其中包埋法是最成功、应用最广泛的方法，其优点如下：（1）方法简便，把细胞悬浮物与多聚体或其单体混合，成胶后即可；（2）固定化条件温和，因此经常可以获得高活力的固定化细胞；（3）细胞不漏出；（4）对机械破坏有保护作用；（5）固定化容量大。

在制备固定化细胞时，有多种固定化载体可选择，如合成高分子中有聚丙烯酰胺、环氧树脂及聚氨脂；碳水化合物中有纤维素、琼脂、琼脂糖。k-角叉菜聚糖及海藻酸盐等；蛋白质中有胶原蛋白、明胶及血纤维蛋白等。其中琼脂糖具有无毒、大孔、无电荷、不影响细胞生长等优点，可以被广泛用于制备固定化微生物、动物和植物细胞（表1），但包埋法也有局限性，扩散限制是其一，胞内产物的回收是其二。

1. 扩散限制：用包埋法制备的固定化细胞常限制了底物及产物的自由扩散作用，当底物或产物分子太大时，或溶解度太低时（如氧）尤其严重。

对高分子量物质的扩散限制，随包埋载体多聚物的结构而变化。用琼脂糖包埋，可以允许分子量为15万的大分子顺利通透，而其他多聚体允许通透的分子量常低于这个数字，所以选择适当的载体多聚物可以改善大分子物质的扩散性能。

氧在水中的溶解度很低，某些反应需要氧气。有两个提供氧气的途径：第一种

表 1 用包埋于珠状琼脂糖的各种细胞生产的生化产品

种	产 物	参考 文献
细菌细胞		
分枝杆菌	$\Delta 1,4$ 雄甾二烯-3,17-二酮	23
氧化葡萄糖杆菌 与恶臭假单胞菌	2-酮古龙酸	23
酵母细胞		
酿酒酵母	乙醇	23
植物细胞		
长春花	阿玛碱	24
藻类细胞		
小球藻	氧	25
动物细胞		
MLA ₁₄₄ (淋巴母细胞)	白细胞间介素-2	26
LSP21 (杂交瘤)	单克隆抗体	26
遗传工程细胞		
枯草杆菌	大鼠胰岛素原	27

是把产生氧气的藻类细胞与细菌供包埋，可以解决细菌对氧气的需要^[25,28]。第二种是当被包埋的细菌含有高活力的过氧化氢酶时，在底物溶液中添加足量过氧化氢，便可就地被分解释放出氧气。

2. 胞内产物的回收。有些细胞产物不分泌到胞外，而贮存于细胞之内。众所周知植物细胞能产生许多有用的药物和其他化学物质，如抗癌药物长春碱、麻醉药吗啡因、香料蔷薇油等。但植物细胞总是倾向于把这些次生产物贮存在原生质或液泡之中，这迫使人们不得不用有机溶剂等把这些产物从植物细胞中抽提出来，这样一来，固定化细胞的连续生产的优越性就无法发挥了。

后来发现，有些试剂（如有机溶剂、抗生素、去污剂等）有改善细胞通透性的作用。如二甲基砒(DMSO)就有显著提高植物细胞通透性的作用，用5%的DMSO处理长春花(*Catharantus roseus*)或用10%的DMSO处理野胡萝卜(*Daucns carota*)

可使细胞完全通透，但这种处理并未引起细胞膜不可逆的改变，移除这些试剂之后，把细胞放回适当培养条件下仍能生长。利用这种特性可以设计一个用固定化植物细胞生产生物化学物质的一般流程（图 1）。一个典型的例子是从前体色胺和

Secologanine 生产阿玛碱(Ajmalicin)，包埋用的载体为琼脂糖，作三次通透处理，如图 2 所示，每个处理周期完成之后，阿玛碱的产量递增，其原因可能是每个生长期之后，被包埋的生物量有所增加之故。

3. 固定化动物细胞与植物、微生物细胞不同。动物细胞有两种不同的培养方法，第一种必须附着在固体表面上，生长形成单层细胞。第二种则为悬浮培养。

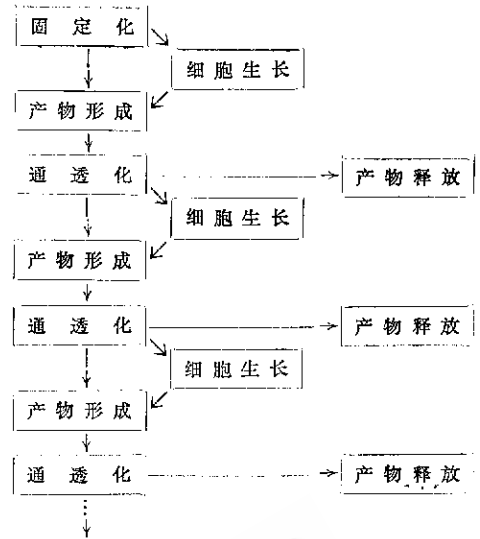


图 1 固定化细胞以间歇产物释放的方式生产化产品的图解

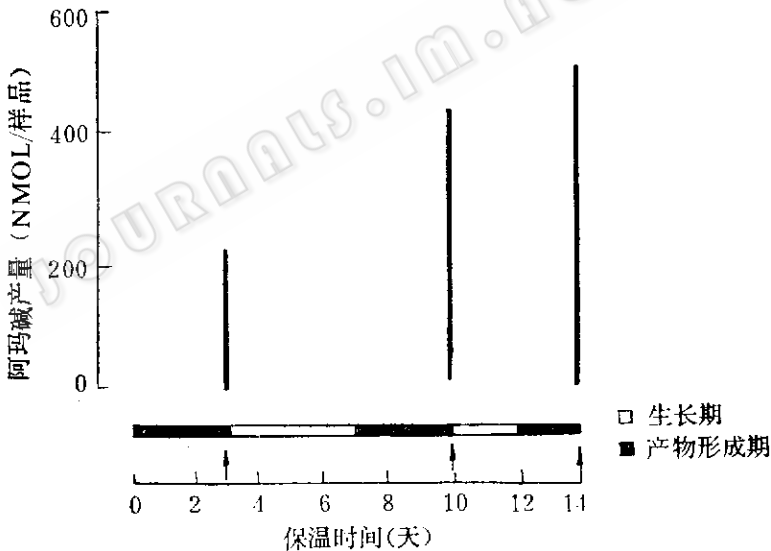


图 2 用琼脂糖包埋的长春花细胞生产阿玛碱（箭头表示间歇通透化处理）

第一种所谓“锚地依赖性” (Anchorage dependant) 细胞,不能在诸如k-角又菜聚糖、海藻酸盐及琼脂糖等载体的聚合物的网状结构上生长,但能在血纤维蛋白上附着和生长。血纤维蛋白是在凝血酶的作用下,由血纤维蛋白原转化形成的,它在动物细胞的培养中起着类似“微载体”的作用。

第二种为悬浮培养,不要求固体表面,可以在培养液中自由生长。琼脂糖等可以用作这种细胞的包埋载体。表 1 中列有两种这类固定化细胞,一个是用固定化淋巴母细胞 MLA₁₄₄ 生产白细胞间介素-2 (Interleukin-2)。另一个是用固定化杂交瘤细胞生产单克隆抗体。结果表明两种产物的产量与自由细胞系统生产的产量相

当。而且镜检发现这些细胞可以在珠状载体内部生长，因而延长了这些生物催化剂的寿命。此外，当高浓度的细胞被固定化时，一方面能提高反应器的效率，另一方面也提高了产物的浓度。

综上所述，由于固定化技术向动物细胞、植物细胞、杂交瘤细胞及工程细胞的延伸，不但大大扩展了固定化技术的应用范围，同时也促进了固定化技术本身的变革与提高。

三、生产酶的新途径

酶的传统来源是动物脏器和植物的种子等。后来，随着发酵工程的发展，微生物来源的酶逐渐取而代之，但仍还有许多不足之处。近年由于遗传工程兴起，使人工构建酶的高产菌株成为可能。在此形势下，新一代的酶制剂似乎正在酝酿形成，这新一代酶制剂的特点在于：（1）来源于非微生物的酶；来源于生长缓慢的微生物的酶，或者产量极低的酶，均可用微生物发酵的方法大规模生产。（2）选择适当受体微生物，可以有效控制杂蛋白的种类、数量和毒性。（3）可以创造出自然界尚未发现的新酶，通过对结构基因部位指向性的诱变，可以获得各种生化性能更佳的新酶品种。本节拟通过几个实际例子说明重组 DNA、重组 RNA 以及蛋白质工程在酶学领域中的应用前景。

1. 重组 DNA。许多酶的基因已克隆成功，其中不乏有实际应用价值者。牛凝乳酶专一地水解 K-酪蛋白某些肽键致使牛乳凝结，这是生产干酪的第一步。该酶水解的专一性对保持干酪的特有风味十分重要。此外，该酶对热敏感性高，升温后很易停止反应，这有利于副产物乳清不致因过分水解而破坏。目前还没有任何其他

来源的凝乳酶代用品能在这些性能上与牛凝乳酶相媲美，但牛凝乳酶的来源，仅限小牛的第四胃（皱胃）。为开辟凝乳酶的新来源，显然借助遗传工程手段，用微生物生产这个酶是非常理想的。

凝乳酶主要用于食品工业，而面包酵母则是人类食物构成成分之一，无细胞毒性之虑。此外，人类有大规模生产面包酵母的经验，每升培养基可获得 50g 干酵母。基于上述考虑，合乎逻辑地选择面包酵母为遗传工程的受体菌。

从牛胃分离得到凝乳酶的 mRNA，经反转录作用获得该酶的基因拷贝^[20]。从 cDNA 的分析中得知，蛋白质是以“前凝乳酶原”的形式被合成的，在该酶蛋白质的 N 端有一个典型的疏水性的信号肽。有三种可能的终产物，即前凝乳酶原、凝乳酶原和凝乳酶。比较研究发现，前凝乳酶原不易活化，凝乳酶不甚稳定，而凝乳酶原较稳定，易活化，又是市售凝乳酶的主要成份，所以用酵母生产凝乳酶原是很合宜的^[30]。

Moir 等^[31]通过 2μ 质粒把牛凝乳酶的基因克隆到面包酵母中，加上强有力的酵母磷酸甘油酸激酶的启动子，便可在酵母中产生占可溶性蛋白的 5% 的凝乳酶原。但可被活化的部分却仅占该酶原的 0.1%。加之，许多转译产物不易溶解，估计这是因为肽链未能正确地折叠，也未能形成正确的二硫键。而这一情况与分泌过程密切相关，为此，检验了不同分泌信号序列的作用。结果表明，牛的分泌系统在酵母凝乳酶分泌中无效，而酵母蔗糖酶的分泌信号肽有助于凝乳酶肽链获得正确的折叠及充分的生物学活力。

纤维素酶的基因工程是另一项很有意义的工作。纤维素是非常丰富的可更新的资源。依靠内葡聚糖酶、纤维二糖水解酶

及 β -葡萄糖苷酶的协同作用,天然纤维素可被水解成葡萄糖。这种纤维素酶的复合物,可以由木霉 (*Trichoderma reesei*) 产生^[32]。

木霉编码纤维素二糖水解酶的基因 (CBH1) 和内葡聚糖酶的基因 (EG1) 已分别在酵母细胞中克隆并表达^[33], 酶活力与被分泌蛋白质总量成正比。比较天然的CBH1 (来自木霉) 和重组CBH1 (来自酵母) 的转译产物, 发现两者都是糖蛋白, N末端均被焦谷氨酸封闭, 近N末端一级结构相同。但重组者分子量较大, 比活力稍低, 含有O-和N-连结的糖基, 而来自天然的CBH1的产物则仅含O-连结的糖基。当然, 这方面的研究水平离商业应用还相差甚远, 但纤维素酶基因在酵母菌中克隆和表达成功, 意味着有可能为酵母菌提供了一个取之不尽的可同化的碳源, 其应用前景和经济意义是不可限量的。

2. 重组RNA。遗传工程的常规操作先是重组DNA的构建, 然后顺序通过转录和转译步骤表达为蛋白质。最近美国Miele等^[34]别开生面地建立了重组RNA技术, 并初步显示了诱人的应用前景。

在RNA噬菌体 Q_{β} 体内发现一种RNA复制酶, 该酶在体外能以单链RNA为模板合成互补的RNA。两股链解开后又分别成为下次复制的新模板, 依靠这种“自动催化反应机制”, RNA链的数量呈指数关系迅速增加, 10min即可增加十万倍。一份1ml的反应液, 12h内即可合成5mg RNA。这样的效率是任何转录体系所远远不及的。

Q_{β} 复制酶稳定性很好, 但专一性太高, 这为复制外源RNA造成巨大障碍。 Q_{β} 复制酶模板MDV-1(+)RNA由221个核苷酸组成。该RNA分子上有两个结构区域对 Q_{β} 复制酶的功能是至关重要的, 一

个是 Q_{β} 复制酶的识别结构序列, 另一个是单链RNA的3'末端富含胞苷酸的复制起点。以MDV-1(+)RNA为运载体时, 外源RNA的插入部位必需远离上述两个区域。后来发现在MDV-1(+)RNA一个发卡环状结构可以发生突变, 而不影响 Q_{β} 酶的识别与复制作用, 因此这个区域成为插入外源RNA的理想部位。

可以从DNA序列获得重组RNA分子, 这首先要构建一个质粒, 用作体外转录形成重组RNA的模板, 也可以直接把外源RNA插入MDV-1(+)RNA适当的部位上获得重组RNA分子, 第一个重组RNA的分子是在MDV-1(+)RNA第63和64位核苷酸之间直接插入了由10个腺苷酸组成的片段, 形成一个由231个核苷酸构成的重组RNA, 该重组RNA分子能被 Q_{β} 复制酶快速复制。从马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTV) 的cDNA转录获得的RNA与MDV-1-RNA构成的重组体, 既具有PSTV-RNA感染马铃薯致病的能力, 又保留MDV-1-RNA在体外被 Q_{β} 复制酶复制的能力。这种所谓“双功能重组体”已被用于类病毒的复制及致病机制的研究^[35]。

可以想象, 如果把一个为十分难得的蛋白质 (或酶) 编码的mRNA插入到MDV-1-RNA序列中, 就能构成一个非常有用的重组RNA, 短时间内既可复制出大量mRNA, 进而能通过体外转译系统便可合成大量相当纯净的所期望的蛋白质 (或酶)。以上构想, 目前虽尚未见诸公开报道, 但据认为这已是预料中的事了。

3. 蛋白质工程。无论重组DNA技术, 或是重组RNA技术, 其目的均在于高效率地表达某些已知的蛋白质。而蛋白质工程 (或称部位专一性诱变) 则是通过

结构基因的改造达到修饰蛋白质分子结构及创造自然界中尚未发现的新蛋白质分子的目的。

枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin BPN)是来自解淀粉芽孢杆菌的一种丝氨酸蛋白酶。欲修饰这个酶,首先要选择一个在催化功能上具有重要作用的氨基酸残基作靶子。幸好对该酶的一级结构、空间结构、作用机制及与抑制剂和产物之间相互作用均已知之甚详。这个蛋白酶的底物专一性与凝乳酶相似,优先水解芳香族氨基酸及疏水性氨基酸。酶的结合部位是由三个肽段构成的大裂缝^[3,6],该裂缝的一侧为Ser125-Leu126-Gly127,另一侧为Ala152-Ala153-Gly154,裂缝的顶部为Val165-Gly166-Tyr167-Pro168。于166位的Gly之侧链伸向裂缝内部,预计取代这个氨基酸后,酶的性质会有较大改变。

枯草杆菌蛋白酶的结构基因在质粒上,取代Gly166的战略是先找到一个缺失包括Gly166密码子在内的13个碱基对的突变体,然后用突变的办法在靠近缺失部位两侧创造Sac I和Xma I两个内切酶

识别序列,切开后形成Sac I/Xma I切口,最后用连接酶把预先合成的寡核苷酸插到这个切口上,得到的产物,除Gly166的密码子被其他19种氨基酸的密码子取代之外均与野生型的DNA序列相同^[3,7,38]。

枯草杆菌蛋白酶的Gly 166被取代之后,生化性质发生了戏剧性的改变。如用Asp或Glu取代后,对含Phe的小分子底物的催化效率分别降低了100倍或10倍,但对含Arg的小分子底物的催化效率则分别提高了25倍或35倍,而被Asn或Gln取代者影响不大,这显然与取代氨基酸Asp及Gln的负电荷引入有关。

上述蛋白质工程不仅为研究酶的结构与功能提供了强有力的手段,而且为修饰已知酶,创造新酶开辟了一条可行的途径。在这方面,Genencor和Genentech公司的科学家们已经获得很大成功,用此技术不但改变了酶的底物专一性,提高了催化活力,而且改变了酶的作用pH曲线,增加了对物理、化学因素的稳定性,从而为酶的工业应用展示了光明的前景。

参 考 文 献

- [1] Comer, M.J., et al.: *J. Appl. Biochem.*, 1:259-270, 1979.
- [2] Atkinson, T.: *Industrial and Diagnostic Enzyme*, (Ed. by Hartley, B.S. et al.) pp 399-410, Royal Society, London, 1983.
- [3] Minton, N., et al.: *Proc. Am. Soc. Microbiol.*, August 1983, Boston, U.S.A.
- [4] Hammond, P.M., et al.: *Lancet*, 1:391, 1981.
- [5] Cain, R.B.: *Hydrocarbons in Biotechnology*, (Ed. by Harrison, D.E.F. et al.) pp.79-84, Heyden and Son Ltd., London, 1980.
- [6] May, S.W.: *Enz. Microb. Technol.*, 1:15-22, 1979.
- [7] May, S.W., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 110:161-168, 1983.
- [8] Dalton, H.: *Hydrocarbons in Biotechnology*, (Ed. by Harrison, D.E.F. et al.) pp. 85-97, Heyden and Son Ltd., London, 1980.
- [9] Schwartz, R.D., et al.: *Enz. Microb. Technol.*, 3:361-363, 1981.
- [10] Koshcheyenko, K. A., et al.: *Enz. Microb. Technol.*, 5: 14-21, 1983.
- [11] Demain, A.L.: *Science*, 214:987-995, 1981.
- [12] Irwin, A.J. and Jones, J.B.: *J. Am. Chem. Soc.*, 99:1625-1630, 1977.
- [13] Klibanov, A.M., et al.: *Biotech. Bioeng.*, 24: 25-36, 1982.
- [14] Schneider, K. and H.G.: Schegel, *Biochim. Biophys. Acta*, 452, 66-82, 1976.
- [15] Alberti, B.N. and A.M.: Klibanov, *Enz. Microb. Technol.* 4: 47-49, 1982.
- [16] Szwajcer, E., et al.: *Enz. Microb. Technol.*, 4: 409-413, 1982.

(下转第13页)

- [17] Klibanov, A.M., et al.: *Science*, 221, 259—260, 1983.
- [18] Neidleman, S.L., et al.: U.S. patent, 4, 247, 641, 1981.
- [19] Eveleigh, D.E.: *Sci. Am.* 245: 155—178, 1981.
- [20] Wandrey, C., et al.: *Enzyme Engineering*, Vol. 6, (Ed. by Chibata, I. et al.), Plenum press, New York, 1982.
- [21] Wong, C.H. and Whitesides, G.M.: *J. Am. Chem. Soc.*, 103:4890—4899, 1981.
- [22] Campbell, J. and T.M.S., Chang: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 385:562—569, 1976.
- [23] Nilsson, K. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17:319, 1983.
- [24] Brodelius, P., et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17:275, 1983.
- [25] Wikstrom, P. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 4:153, 1982.
- [26] Nilsson, K., et al.: *Nature*, 302:629, 1983.
- [27] Mosbach, K., et al.: *Nature*, 302:543, 1983.
- [28] Adlercreutz, P., et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 4:385, 1982.
- [29] Moir, D., et al.: *Gene*, 19:127—138, 1982.
- [30] Goff, C.G., et al.: *Gene*, 27:35—46, 1984.
- [31] Moir, D., et al.: *The World Biotech Report 1984*, 2:189—197, Online, 1984.
- [32] Mandelo, M., : *Ann. Reports Ferm. Proc.*, 5 (35) :35—78, 1981.
- [33] Shoemaker, S.P.: *The World Biotech Report 1984*, 2: 593—600, Online, 1984.
- [34] Miele, E.A., et al.: *J. Mol. Biol.*, 171:281—295, 1983.
- [35] Kramer, F.R., et al.: *The World Biotech. Report 1984*, 2:347—356, Online, 1984.
- [36] Kraut, J., et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 36:117—123, 1971.
- [37] Wells, J.A., et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11:7911—7924, 1982.
- [38] Estell, D. A., et al.: *The World Biotech. Report 1984*, 2:181—187, Online, 1984.
- [39] Pitcher, W.H.: *The world Biotech Report 1984*, 2:211—216, Online, 1984.