

实用 酶技术丛书

SHIYONG MEIJI SHU CONGSHU

# 化学工业酶技术



林影 韩双艳编著

四大化工领域的酶技术

- ◆ 精细化工
- ◆ 能源化工
- ◆ 材料化工
- ◆ 环境化工



化学工业出版社  
生物·医药出版分社

TQ  
4462  
2

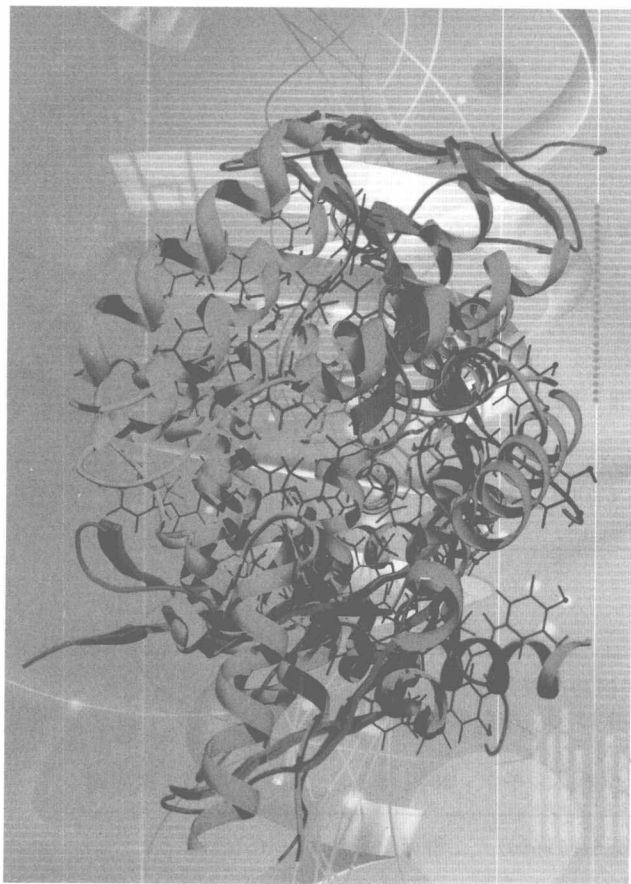
实用 酶技术丛书

SHIYONG MEIJISHU CONGSHU

# 化学工业酶技术



林影 韩双艳 编著



化学工业出版社

生物·医药出版分社

·北京·

工业生物技术是实现化工绿色制造的关键技术，生物催化已在化学工业的某些领域获得成功的应用。本书通过国内外酶在化学工业研究和应用的实例，介绍精细化工、能源化工、材料化工和环境化工等领域的酶技术应用方法与理论，为酶制剂的生产和应用研究与实践提供了新的思路。

本书可供生物化工相关企业和科研单位研究与技术人员使用，亦可作为生物工程、化学与化工相关专业的在校学生的参考用书。

#### 图书在版编目 (CIP) 数据

化学工业酶技术/林影, 韩双艳编著. —北京: 化学工业出版社, 2009. 1

(实用酶技术丛书)

ISBN 978-7-122-03701-5

I. 化… II. ①林…②韩… III. 酶-应用-化学工业  
IV. TQ

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 136980 号

---

责任编辑: 孟 嘉 邵桂林  
责任校对: 陈 静

文字编辑: 焦欣渝  
装帧设计: 张 辉

---

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社  
(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 北京云浩印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 14 字数 246 千字 2009 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 38.00 元

版权所有 违者必究

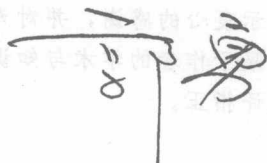
# 言序

20世纪后期，生物高新技术的发展，开创了生命科学的新纪元，为我国医药、农业、工业、环境和能源领域带来了新的机遇，推动了新兴产业的发展，创造出巨大的社会财富。但我国在高速发展的经济建设中也遇到了一些严重的问题，如资源短缺、能源短缺和环境污染，制约了我国经济和社会的发展；相对落后的工业过程技术使我国生物技术药物产业的规模难以扩大，竞争力难以提高；传统化工业仍不能摆脱高耗能、高耗材、高污染的困境；并且存在一系列食品安全问题。

全方位推动酶工程技术的发展和應用是解决这些问题的的重要手段之一。与传统工业过程所不同的是，以酶催化为基础的工业过程具有高效率、高选择性、低能耗、环境友好和可再生的特性。酶工程技术不但可以在一定程度上解决资源和能源的可持续发展问题，也为医药生物技术产业化、农业生物技术产业化提供支撑，有利于化工、材料、食品加工、纺织、造纸、冶金和环境保护等多个产业领域国际竞争力的提升。

本丛书的编写宗旨是以实用技术为特色，以酶在轻纺、化工、环保、饲料、能源等领域的应用为主线，理论与实际紧密结合。各分册均由有实践经验的专家编写，在简明介绍酶工程技术基本理论的基础上，重点阐述酶在各行业中应用的最新进展和发展趋势。

毋庸讳言，我国的酶工程技术虽然已经取得了长足的进步，但是在很多方面与国际先进水平还有很大的差距。只要我们不断努力，相信一定能够不断缩小这个差距，希望本丛书的出版对我国酶工程技术的研究、开发及产业化应用能够起到积极的推动作用。



2007年11月26日

# 前言

随着社会经济高速发展，当今中国工业化进程正处于资源消耗的高峰期，资源匮乏、能源短缺、环境污染已成为中国经济可持续发展的严重障碍。以生物催化为核心的工业生物技术具有反应条件温和、环境污染少、可再生资源的利用效率高等特点，可以在很大程度上解决资源和能源的可持续发展问题。

近年来，工业生物技术在化学工业的应用已呈现上升的势头，生物催化过程在不同化学品市场被利用的速率是不同的。生物催化包括微生物和酶的应用，利用微生物与酶的生物转化产品包括：糖、维生素、有机酸、手性化合物等，这些生化产品主要分为精细化学品和大宗化学品。此外，还有废弃物的降解等。将酶生物技术有效地应用于化学工业，是一种新的挑战。酶的动力学特性和稳定性是工业催化的必要条件。除了具有高度的选择性，高的活力是酶在工业上应用所期待的。已可以利用分子生物学的手段对酶的有机溶液耐性、底物多样性和温度稳定性进行改造。因此，为酶在绿色化工的应用提供了广泛的前景。

本书主要介绍酶在化学合成与转化的应用，内容涉及精细化工、能源化工、材料化工和环境化工等领域的酶技术，书中通过国内外酶在化学工业应用的实例，介绍酶在化学工业相关领域的应用技术，试图为酶制剂生产与应用研究、实践提供新的思路。

本书由林影、韩双艳主编，其中第一、二章由林影编写，第三、四章由韩双艳编写。全书在撰写过程中由潘志友、陈青、陈宏运、朱怡、梁书利、徐苏炜、郑泓和叶茂等做了大量的资料整理和收集工作。

书稿中参考了国内外众多专家学者最新的研究成果，在此对所有作者的贡献表示衷心的感谢，并对为本书出版付出辛勤劳动的编辑表示衷心的感谢。

限于作者的学术与知识水平的不足，书中不当之处在所难免，敬请广大读者批评指正。

华南理工大学  
林影 韩双艳  
2008年11月

# 目 录

第一章 化学产品生产中的酶技术	1
第一节 手性化合物的酶法合成	2
一、全细胞催化合成手性化合物	3
二、酶法合成手性化合物	8
三、手性化合物的酶法光学拆分	12
第二节 有机酸的酶法生产	16
一、有机酸	16
二、氨基酸及其衍生物	22
第三节 维生素的酶法生产	29
一、泛酸	30
二、维生素 A	31
三、维生素 E	31
第四节 生物法丙烯酰胺、烟酰胺和烟酸生产中酶的应用	33
一、丙烯酰胺	33
二、烟酰胺和烟酸	35
第五节 表面活性剂与芳香酯生产的酶技术	36
一、生物表面活性剂	36
二、功能性油脂	44
三、芳香性物质	47
参考文献	56
第二章 能源化工中的酶技术	57
第一节 燃料酒精生产中酶的应用	58
一、淀粉酶	58
二、纤维素酶	71
三、木聚糖酶	81
四、木糖代谢相关酶	84
第二节 生物柴油生产中酶的应用	87
一、脂肪酶的应用	88

二、植物油脂的转酯化生产生物柴油 .....	96
三、烹调废油、餐饮废弃动物油脂生产生物柴油 .....	99
四、废活性脱色污泥生产生物柴油 .....	104
五、来自藻类原料的生物柴油 .....	107
参考文献 .....	110
<b>第三章 材料化工中的酶技术 .....</b>	<b>112</b>
<b>第一节 生物可降解材料中的酶技术 .....</b>	<b>112</b>
一、生物可降解材料 .....	112
二、生物可降解材料的降解性能及其评价 .....	114
三、聚乳酸 .....	115
四、直链淀粉制品 .....	117
五、聚酯 .....	121
<b>第二节 高分子材料合成的酶技术 .....</b>	<b>126</b>
一、氧化还原酶催化合成聚酚 .....	126
二、加氧酶合成顺, 顺-己二烯二酸 .....	133
三、胍水合酶和酰胺酶催化生产甲基丙烯酸和丙烯酸 .....	135
<b>第三节 生物传感器中的酶技术 .....</b>	<b>139</b>
一、固定化酶 .....	139
二、生物传感器 .....	141
三、生物传感器中的材料学 .....	142
<b>第四节 纺织工业材料中的酶技术 .....</b>	<b>146</b>
一、纺织工业中酶的分类及其应用 .....	147
二、耐温耐碱淀粉酶与退浆 .....	150
三、纤维素酶与织物的整理 .....	152
四、脂肪酶与去脂改性 .....	154
参考文献 .....	157
<b>第四章 环境化工中的酶技术 .....</b>	<b>159</b>
<b>第一节 酶在废水处理中的应用 .....</b>	<b>160</b>
一、含酚废水处理 .....	160
二、造纸废水处理 .....	170
三、含氰废水处理 .....	174
四、食品加工废水处理 .....	176
五、含油废水处理 .....	180
六、其他废水处理 .....	182

七、极端酶在工业废水处理中的应用 .....	187
第二节 酶在农药降解中的应用 .....	189
一、对硫磷水解酶 .....	190
二、酯酶 .....	192
三、漆酶 .....	194
四、其他酶类 .....	195
第三节 酶在环境监测中的应用 .....	196
一、酶传感器 .....	196
二、非酶传感器检测法 .....	206
三、酶作为环境污染监测的指标 .....	209
参考文献 .....	212



# 第一章 化学产品生产 中的酶技术

21 世纪，随着化石资源与能源危机、环境污染的日益加剧，人类需要对传统的基于化学过程的物质加工模式（化学加工或化学制造）进行思考，以生物可再生资源为原料、基于生物过程的环境友好的高效的物质加工模式逐步受到重视，以生物经济逐步取代化石经济将成为一种趋势。生物经济的核心技术是工业生物技术。

工业生物技术是利用微生物或酶为催化剂进行物质转化，可以实现大规模生产人类所需的精细化学品、医药、能源、材料等，是解决人类目前面临的资源、能源及环境危机的重要手段。以生物催化与生物转化为核心的工业生物技术已逐步成为目前化学工业的基本工具之一。微生物物种的多样性及其基因改造的巨大潜力，与精细代谢工程和化学工程技术结合，为人类提供了新的机遇。工业生物技术在支撑新世纪社会进步与经济发展的技术体系中的地位已经被提到空前的战略高度。世界经合组织指出：“工业生物技术是工业可持续发展最有希望的技术。”欧洲各国、美国、日本已不同程度地制订出在今后几十年内用生物过程取代化学过程的战略计划。预计到 2020 年，将有 50% 的有机化学品和材料由生物原料生产，而工业生物技术将起重要的作用。工业生物技术作为一种战略先导技术，对中国社会、经济的发展具有重大战略意义。

以生物催化和生物转化为特征的工业生物技术，加速了以生物能源、生物基化学品、生物材料和生物加工制造业为代表的庞大的现代新兴工业的发展，正在全球范围内掀起一场新的现代工业技术革命。生物催化（即酶催化）已成为实现工业生物技术的核心。

目前，已分离纯化的酶有 3000 多种，其中有 800 多种开发成商品。1998 年全球工业酶制剂销售额为 13 亿美元，预计 2010 年将增长到 30 亿美元，每年以 6.5% 的速率增长。酶工程技术包括：酶源开发、酶制剂生产、酶分离提纯和固定化技术、酶反应器与酶的应用。目前国内为产业化配套而开发的酶制剂主要有：日用化工用酶制剂；造纸工业和皮革及纺织用酶制剂；食品、饲料工业用酶制剂；非水相酶促反应在医药、精细化工和食品等工业中的应用。此外，酶工程技术的应用将进一步促进生物基化学产品生产。

酶在化学工业的应用中, 每一步生物催化过程的经济价值与效益是成功的关键。生物催化的过程必定要与传统有机合成进行比较, 生物催化通常要通过高的选择性、低的加工价格才能取胜。而且, 目标不能只锚定在取代单一的化学步骤, 应该对合成路线进行总体设计, 甚至将化学与生物催化步骤进行有机的组合。DSM 公司的头孢氨苄的合成就是典型的例子, 生产原料来源于产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*) 发酵产品青霉素 G, 通过八步化学合成得到最后的头孢氨苄是传统的合成途径。目前的生产工艺中, 传统过程已被两步生物催化和一步化学催化取代。进一步的头孢氨苄合成设计, 可以直接由微生物发酵碳水化合物生成, 合成代谢过程中三步转化在细胞发酵工程一气呵成, 包括一步延伸酶和两步酰化酶的作用, 这一工艺已经体现了巨大的经济优势。

在酶的工业化应用中, 酶的动力学特性和稳定性是工业催化的必要条件, 除了具有高度的选择性, 高的活力是酶在工业上应用所期待的, 已可以利用分子生物学的手段, 对酶的有机耐性、底物多样性和温度稳定性进行改造。将生物催化有效地应用于化学合成, 对人们来说是一种新的挑战, 需要考虑各种各样的因素。

工业生物转化通常趋向于天然化合物或其衍生物的生产, 然而自然界中生物转化没有一种天然的化合物占有优势。有效的工业过程必须依赖于生物催化过程的控制, 生物转化生成的碳水化合物及脂肪衍生物已应用于食品工业, 而其余的大部分在医药行业和农业中应用, 尤其在医药工业上, 生物合成与转化的药物日益增加。很少生物催化应用于大宗化合物的生产, 而目前大部分的应用集中于有价值的精细化工产品的生产。但是在新的工业生物技术驱动下, 目前生物催化在大宗化合物生产的应用中已取得了重要的进展, 尤其在可再生资源的领域中具有重要的作用。

## 第一节 手性化合物的酶法合成

利用生物催化合成化学品不但具有条件温和、转化率高的优点, 而且可以合成手性化合物及高分子化合物。应用手性技术最多的是制药领域, 包括手性药物制剂、手性原料和手性中间体。此外, 手性材料及其特性的研究也是当代科技前沿的研究热点。不断开发新的生物催化剂, 将为手性化合物生物合成技术的顺利发展提供保证。

手性化合物是一种重要的天然化合物, 大多数对映体的纯品来源于其前体

化合物。目前对映体拆分只有少部分借助了生物催化的合成方法，主要包括动力学拆分与光学合成。大部分的动力学拆分应用水解酶的作用，光学合成则包括氧化还原酶和裂解酶的作用。由于氧化还原酶主要存在于细胞代谢的关键步骤，因此全细胞催化被应用于多步催化反应，将减少细胞破碎与纯化带来的成本。

理论上，手性中心的合成途径主要有两种：不对称合成和手性拆分。从反应工程的观点看，主要的不同是最大反应产量的区别。不对称合成中，酶具有完全的对映体选择性，若原料底物转化率可以达到 100% 的话，对映体单体产物的收率则为 100%，反应包括手性氧化反应和手性 C—C 耦联。然而，典型的动力学拆分与手性合成相反，手性拆分从外消旋体开始，最理想的状态为底物转化率 100% 时，对映体单体的收率只有 50%。当然，反应路线的选择取决于反应底物的来源和价格，以及催化剂的立体选择性。

### 一、全细胞催化合成手性化合物

细胞可以按反应的顺序，高选择性地合成化合物，并形成良好的调节方式。中间产物可以由酶催化进一步转化，没有中间产物的过量积累及其对细胞的抑制。所有反应遵循吕·查德里原理，产物的转化或除去导致新的产物合成。如果最终产物不除去或进一步转化，新的产物将无法合成，整个合成过程停止并达到平衡。

#### 1. 手性顺丁烯二酸的生物合成

顺丁烯二酸的生产是一个典型的酶法合成的例子。可以通过顺丁烯二酸酶和延胡索酸酶的互补作用合成两个纯的对映体，顺丁烯二酸酶 (EC 4.2.1.31) 属裂解酶，存在于细菌、酵母和真菌中，在动植物中不含这种酶。DSM 公司利用类产碱假单胞杆菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) 生产 D-羟基丁二酸，如图 1-1 所示。

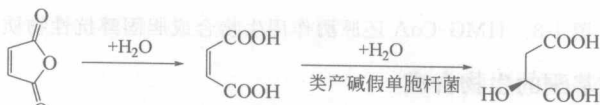


图 1-1 D-苹果酸 (羟基丁二酸) 工业化合成路线

#### 2. 手性己二醇的生物合成

利用以 NAD(P)H 为辅基的氧化还原酶设计经济的工业化工艺路线，从廉价的混合底物生产容易分离的混合产物。在以 2,5-己二酮生产 (2R,5R)-己二醇的例子中，利用开菲尔乳酸杆菌 (*Lactobacillus kefir*) 全细胞，所使用的催化剂是未经基因修饰的野生型微生物，以来源于双烯酮的 2,5-己二酮为

起始底物，产物 (2R,5R)-己二醇不仅是有机合成的辅料，而且是一种重要的手性配基料 (图 1-2)。此外，非对映异构体 (2S,5S)-己烷二醇可以通过面包酵母催化合成 2,5-己烷酯。

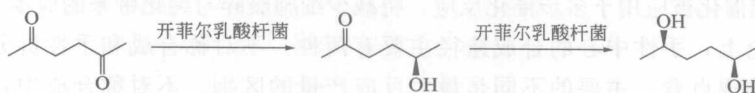


图 1-2 (2R,5R)-己二醇生物合成途径

### 3. 手性氯乙醇的生物合成

Kaneka 公司利用细胞中的脱氢酶，以对映体纯的  $\alpha$ -环醇为起始原料生产 (R)-氧化苯乙烯和 (S)-氧化苯乙烯。Bristol Meyers Squibb 等由甲基-(3S)-3,4-环氧丁酸制备氯乙醇，生产数千克的 (S)-氯乙醇纯度可达 99% (ee<sup>①</sup>)。利用白地霉 *Geotrichum candidum* 细胞中的脱氢酶作用，还原甲基-4-氯-3-氧丁烷。这一工艺通过细胞代谢，保证了 NADPH 辅酶的再生，通过羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶作用合成 (S)-4-氯-3-羟基丁酸甲酯，用作手性骨架合成胆固醇抗性物质 (图 1-3)。

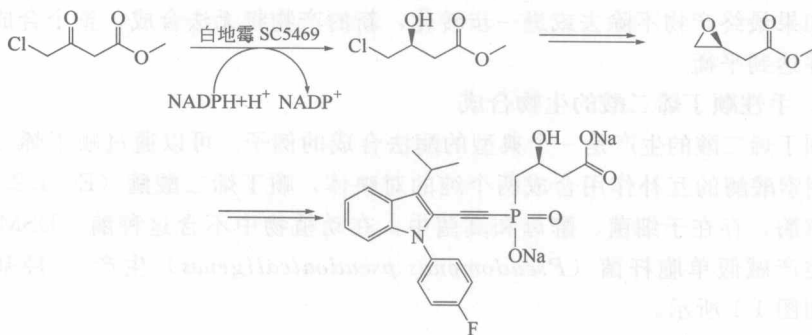


图 1-3 HMG-CoA 还原酶作用生物合成胆固醇抗性物质

### 4. 手性羟基酮的生物合成

与化学催化聚醛作用相比，利用裂解酶生物催化合成可以获得高的光学纯化合物。例如：丙酮酸脱羧酶 (EC 4.1.1.1) 存在于酵母、霉菌、植物和部分细菌中，以硫胺二磷酸和镁离子作为辅酶，催化两个醛分子进行立体选择性聚醛作用生成 2-羟基酮。乙醛和苯甲醛的聚醛作用是最早的工业规模的生物转化作用。这种立体选择的酮醇聚合成 (R)-羟基-1-苯甲酮是类交感神经剂

① ee, 即对映体过量值。

(1R,2S)-麻黄碱和(1R,2S)-伪麻黄碱合成的一部分。(R)-羟基-1-苯丙酮是一种重要的精细化学品合成的骨架。生物技术和化学合成组合能生产各种药物,具有 $\alpha$ -肾上腺素和 $\beta$ -肾上腺素性质物质,如麻黄碱、降肾上腺素和假肾上腺素。通过(R)-羟基-1-苯丙酮还原甲基叠层作用建立肾上腺素和假肾上腺素合成途径,使得从天然材料中提取(1R,2S)-麻黄碱失去了与生物技术和化学合成相比的优势。BASF公司和Krebs生化工业公司主要通过酵母细胞批式发酵生产。

在酵母发酵过程中,丙酮酸脱羧酶催化苯甲醛和内生乙醛立体选择酮醇聚合形成(R)-1-羟基-1-苯丙酮。与全细胞生物转化过程不同,通过分离丙酮酸脱羧酶的生物加工方法可以减少副产物的形成,若加工过程中酶活力不足,可能造成产量低。酶法生物转化使生产(R)-L-羟基-1-苯丙酮酸浓度最大达100g/L。

富士化学工业公司利用不同的微生物进行生物反应,化学合成2-氨基-1-苯丙酮酸,通过光学选择还原为伪麻黄碱,经动力学拆分,对未转化的对映体原位进行外消旋化。

### 5. 加氧酶催化合成手性环氧化物

细菌单加氧酶或双加氧酶用于催化羟基化作用,在氧原子和非活性的碳原子间形成化学键,这种羟基化作用于局部区域而不是立体选择。为了提供羟基羧酸,利用微生物的羟基化作用,顺序进行 $\alpha,\beta$ -脱水与水解作用步骤。

终端和中间产物烯烃环氧化作用是一个工业化烯烃单加氧酶应用的例子,利用来源于诺卡菌 *Nocardia corralina* B276 加氧氧化还原酶的立体专一性的环氧化作用生产优势的(R)-对映体化合物,并且可以通过传统的发酵体系进行生产。依据C链的长短将底物分为三类:

① 短链( $C_3 \sim C_5$ )的气体环氧化物对细胞具有强烈的毒性,产物回收复杂。发酵过程中提升通气速度,以抽提短链的毒性环氧化物,需要通过专门的介质抽提体系回收气相中的低含量的环氧化物。

② 利用 $C_6 \sim C_{12}$ 烯烃,这是一种非毒性的两相体系。这种添加的溶液具有双效性:第一,抑制环氧化物的浓度较低;第二,产物可以连续抽提。

③  $C_{13} \sim C_{18}$ 烯烃,因为产品在静止细胞上应用的毒性比短链的环氧化物小,将其应用于生长细胞中,在细胞生长过程中将长链的烯烃限制性地添加到培养基中,体现了它的优势。

利用假单胞菌 *Pseudomonas* sp. OS-K-29 选择性同化(R)-2,3-二氯-1-丙醇生成(S)-对映体。利用产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. DS-K-S38 降解(S)-对映体可以得到(R)-对映体。基于这些条件生成手性氯醇。可以通过类似的方法

生成 3-氯丙醇，随后转化为 (R)-环氧丙醇和 (S)-环氧丙醇，这一例子说明不仅可以通过合成获得光学活性的纯品，而且可以通过选择性降解不需要的对映体得到纯品。

**6. 手性羟基氨基酸的生物合成**  
 外消旋体 6-羟基正己氨酸由 5-(4-羟丁基)乙内酰脲商品水解得到，2-酮-6-羟基己酸通过氨基酸脱氢酶 (EC 1.4.1.2) 和牛肝谷氨酸脱氢酶 (EC 1.4.1.5) 进一步转化为 L-6-羟基正己氨酸，在这个过程中 D-氨基酸氧化酶转化 D-氨基酸为酮酸，L-对映体不能被转化。化学上形成的副产物  $H_2O_2$  被过氧化氢酶降解，防止 D-氨基酸氧化酶的失活。通过离子交换色谱分离对映体 L-6-羟基正己氨酸。L-6-羟基正己氨酸是合成血管肽酶抑制剂的手性中间产物。此外，作为合成 C-7 的骨架结构以一种中间体生产其他抗高血压金属蛋白酶抑制剂来替代吡嗪酮。

Kaneka 反应显示了在全细胞催化过程中通过系列反应的生化转化过程。三步反应由 2-甲基丙酸脱氢，生成  $\alpha, \beta$ -不饱和脂肪酸，接着形成  $\alpha, \beta$ -不饱和脂肪酸的立体选择酰化和水解生成 (R)- $\beta$ -羟基异丁酸，(R)- $\beta$ -羟基异丁酸用作一种血管紧张素转化酶抑制剂 Captopril 的合成骨架。

**7. 腈为前体的手性化合物的生物合成**  
 近几年来，由于腈化合物及其光学活性产品的多样性容易获得，腈的手性生物转化逐渐受到人们的关注。到目前为止，用腈转化酶对外消旋腈的几种经典的动态分解的研究已经精确到了每一个步骤，例如  $\alpha$ -烷基腈、 $\alpha$ -羟基腈、 $\alpha$ -酰氧基腈、 $\alpha$ -氨基腈和  $\beta$ -乙酸基腈。还有一些对 3-戊二腈同系物的不对称性的报道。

红球菌 *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497 菌株能够将  $\alpha$ -芳香乙腈同系物转变成具有光学活性的  $\alpha$ -苯基-乙酰胺和良好对映体选择性的  $\alpha$ -芳香乙酸的同系物，同时可以将  $\beta$ -羟基腈转化成具有高活性和稳定的对映体选择性  $\beta$ -羟基酰胺化合物和  $\alpha$ -羟基酸。例如手性  $\alpha, \alpha$ -双取代腈的不对称水解，在去对称化后，这种不对称水解可以提供许多有生理活性复合物和手性基础物质的重要前体物，例如： $\beta$ -内酰胺取代的琥珀酸，尤其是对映体纯  $\alpha, \alpha$ -二羟基- $\alpha$ -氨基酸。这组氨基酸在结合生成肽时引起强烈的构象变化。这些肽可作为酶的抑制剂和其他生物制剂的骨架。

用红球菌 *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497 全细胞催化作用，通过水解  $\alpha, \alpha$ -双取代二腈，生成具有光学活性的丙二酰胺产物，但是这个反应所用的时间比较长。明显这个反应关键是用酶对两组氰基的对映体选择性区分，不管这些产物是氰基酰胺、氰基酸还是酰胺酸，它们都可以被转换成氨基酸。如果氰基酰

胺或氰基酸具有高对映体选择性，那么这个反应就可以加快速度，并更具有实用性。

中国科学院上海有机化学研究所报道了一种新的酶转化脘的应用，即利用红球菌 *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497 的全细胞催化  $\alpha, \alpha$ -双取代丙二脘，合成具有光学活性的  $\alpha, \alpha$ -二取代- $\alpha$ -氰乙酰胺。获得的产品对映体的光学纯度大于 99%，产率也超过 53%。产品是非常有用的手性中间物，尤其是对于  $\alpha, \alpha$ -二取代氨基酸的合成，但是至今仍然没有用化学方法或生物酶法将其直接合成的报道。

### 8. 手性羟基丁酸乙酯的生物合成

酵母细胞是一种常用的微生物，其细胞中的脱氢酶可以在辅助底物乙醇和/或葡萄糖的参与下催化 3-羧基丁酸乙酯 (EOB) 不对称还原生成 (S)-(+)-羟基丁酸乙酯 [(S)-(+)-3-EHB]，后者是薰衣草醇、食菌甲诱醇、核球壳菌、格哈菌素和灰绿霉素前体等天然产物的手性源，因而其合成受到广泛重视，人们用不同方法对 (S)-(+)-羟基丁酸乙酯的合成进行了较详细的研究。由于细胞中酶的立体选择性易受高浓度底物的影响，故前人所采用的主要方法是在反应过程中控制底物浓度或对细胞进行包埋，所得产物的对映体过量值 (ee) 可高达 99%，但产率不超过 50%~70%。其主要原因是，在数十小时的催化还原反应中，底物和产物都发生了部分蒸发和水解。为此，Chin-Joe 等用休眠的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞悬浮液在连续反应器中对 EOB 催化还原进行了研究，发现在保持较低底物浓度的条件下，体积产率为 4.8mmol/(L·h)，在反应进程中的前 24h，ee>98%，24h 后降至 89%~92%。但采用二次进料法催化还原 EOB，在反应 80h 后，产物 (S)-(+)-3-EHB 的浓度达 350mmol/L，ee 值由最初的 100% 下降到约 75%，由此可见，既要提高产物的 ee 值，又要增大产率，还需作进一步研究。

利用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 透性化酿酒酵母细胞中高活性的脱氢酶，借助于辅助底物乙醇和葡萄糖，对 3-羧基丁酸乙酯 (EOB) 不对称还原合成 (S)-(+)-3-羟基丁酸乙酯，透性化酵母细胞中的醇脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性分别比未经处理的酵母细胞高 482 倍和 6.5 倍。在相同条件下，CTAB 透性化细胞对 EOB 的还原比未经处理的酵母细胞快，细胞浓度对反应有明显影响。当透性化酵母细胞浓度 < 90mg/mL 时，(S)-(+)-3-羟基丁酸乙酯的产率和 ee 值都较低；当酵母细胞浓度  $\geq$  90mg/mL，在最佳进料速率、最适温度和 pH 条件下，振摇速度为 125r/min 时，(S)-(+)-3-羟基丁酸乙酯的浓度达到最大值 314mmol/L，在反应开始的 6h 内，(S)-(+)-3-羟基丁酸乙酯的产率可达 94%，ee  $\geq$  98%，但 24h 后产率和 ee 值分别降低到 85%



和 91%。

3-羰基丁酸乙酯经酿酒酵母细胞不对称催化还原成(S)-(+)-3-羟基丁酸乙酯能取得高产率和高 ee 值,关键在于酿酒酵母经 CTAB 透性化处理后,消除了细胞的天然屏障,底物能顺利地进入细胞与酶作用,使酶的活性大大提高。另外,在酿酒酵母催化 EOB 不对称还原反应体系中加入辅助底物乙醇和 6-磷酸葡萄糖,有利于 NAD(P)<sup>+</sup> 与 NAD(P)H 的循环再生,加快 EOB 的还原,缩短酶催化反应进程,从而有利于酶活性和选择性的稳定,防止产物的蒸发和水解,有效地提高产率和 ee 值。实验中用的酿酒酵母是啤酒厂生产啤酒后的废弃物,该方法的有效利用将有助于(S)-(+)-3-羟基丁酸乙酯的工业生产。

## 二、酶法合成手性化合物

很多物质可以从天然原料中提取,或通过生物或化学催化的方法合成,还可通过发酵的方法得到。如利用葡萄糖或糖蜜等廉价的工业产品作为碳源生产羧酸,每年产出上千吨的有机酸。

然而,通常底物、产物或溶剂对细胞产生毒性,在全细胞生物转化中产物的浓度要求相当低。如果使用重组微生物,需要仔细观察培养过程中的遗传稳定性。如果利用纯化的酶制剂,纯化过程可能引起附加的成本,与生化特征相比,不一定需要纯化得到单一的蛋白。相反,部分纯化的酶蛋白有利于增加其稳定性。纯酶的优点在于可以避免副反应和底物对细胞的毒性,特别有利于在底物不能进入细胞时的生物转化反应。

### 1. 手性羟基羧酸的酶法合成

氧化还原酶属于催化氧化还原反应酶类,被氧化的底物作为氢的供体,如 NAD<sup>+</sup>。系统命名法通常基于供体的名称,接着是氧化还原酶终端受体的名称,而普通的名称是脱氢酶或还原酶,氧化酶只适用在以氧为受体的时候。

(R)-3-(4-氟苯)-2-羟基丙酸的化学合成显示了低的产量和低的立体专一性。利用来自乳酸杆菌 *Leuconostoc mesenteroides* 的 D-乳酸脱氢酶(EC 1.1.1.28)催化的生产工艺(图 1-4)产率高达 88%,ee 值高于 99.9%。起始底物 3-(4-氟苯)-2-氧丙酮酸钠由氟苯甲醛乙内酰胺浓缩和皂化合成,辅酶 NAD<sup>+</sup> 由假丝酵母 *Candida boidinii* 的甲酸脱氢酶氧化甲酸生成 CO<sub>2</sub> 再生,这是一个典型的通过酶的耦联在线辅酶再生的例子。接着光学纯的羟基甲基化与蛋白酶抑制剂的化学合成整合,产物是鼻病毒蛋白酶抑制剂 Rupintrivir 合成的基础。

利用酮还原酶的氧化还原反应合成乙烷-(S)-4-氯-3-羟基丁酸, NADP<sup>+</sup> 通



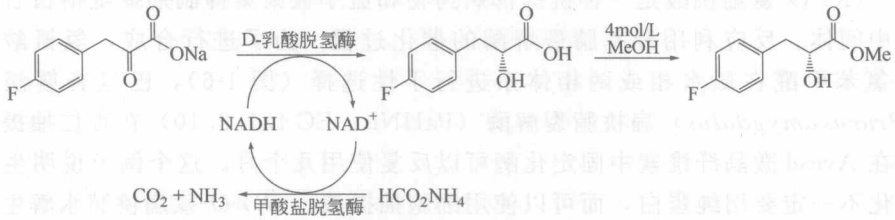


图 1-4 (R)-3-(4-氟苯)-2-羟基丙酸的生物合成途径

过葡萄糖脱氢酶的再生转化，将葡萄糖转化生成葡萄糖酸，反应产物的 ee 值超过 99.9%，是 Codexis 公司合成包括乙烷-(R)-4-氟-3-羟基丁酸在内的化合物的第一步。第二步是氰化作用，利用卤代醇脱卤化酶。用基因体外重组技术，使酶的反应速度、稳定性和对产物的耐受性都有显著的提高，显示了利用分子生物学手段促进酶改性的诱人前景。获得的产物 ee 值大于 99.9%，产量大于 90%。羟基腈烷基-(R)-4-氟-3-羟基丁酸是阿伐他汀钙生产的重要基料，其生物合成途径见图 1-5。

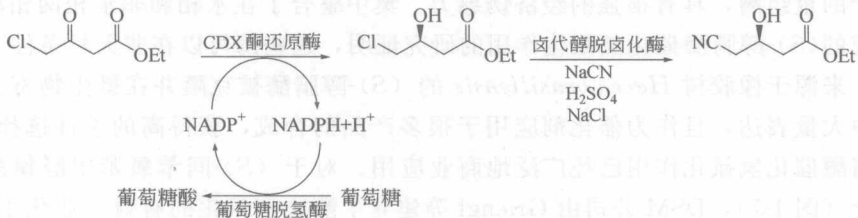


图 1-5 羟基腈烷基-(R)-4-氟-3-羟基丁酸的生物合成途径

6-苄氧基-(3R,5S)-二羟基己酸乙烷酯是一种重要的手性物的原料，用作抗胆固醇药物，抑制羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶的作用。反应途径可以为通过氯乙醇的化学合成和酰氧基团的选择性水解，化学合成最后蒸馏结果产量只有 41%，生物催化转化率达 92%。生物还原可以通过全细胞催化以及细胞抽提物的作用，在反应液中通过添加葡萄糖脱氢酶、葡萄糖和 NAD<sup>+</sup> 实现辅酶的再生。

羟基腈裂解酶催化立体选择性添加氢化氰到乙醛和酮中，氰化醇裂解也是利用相应反应条件一个潜在的催化步骤， $\alpha$ -羟基羧酸通过盐酸水解手性的氰化醇生产，而反应策略使乙醛转化为产物。裂解 HCN 能力是部分植物的抗性防御系统，该裂解途径已被应用于合成手性羟基腈。利用羟基腈裂解酶工业化合成一些手性芳香  $\alpha$ -羟基羧酸，手性扁桃酸的衍生物作为多种合成物的基料和外消旋溶剂。