

生物催化反应与 转化原理

龚大春 主编



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

生物催化反应与 转化原理

龚大春 主编



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

内 容 提 要

本书较系统介绍了生物催化反应与转化的基本原理及其在重要化合物(氨基酸、香草醛、2-芳基丙酸等)制备中的应用。基本原理以生物催化与转化的定义、生物催化的立体化学基础、生物催化反应类型、生物催化反应机理为基础,重点介绍了生物催化反应的介质工程理论和生物催化剂的制备方法。

本书可供有机化学、药物化学、化学生物学、精细化工和生物工程等专业大学本科高年级学生和研究生学习,也可供教师、科研人员及从事生物化工、生物技术和相关专业工作的科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物催化反应与转化原理/龚大春主编. —北京:中国水利水电出版社, 2006

ISBN 7-5084-4195-8

I. 生... II. 龚... III. 生物—催化 IV. Q814

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第155767号

书 名	生物催化反应与转化原理
作 者	龚大春 主编
出版 发行	中国水利水电出版社(北京市三里河路6号 100044) 网址: www.waterpub.com.cn E-mail: sales @ waterpub.com.cn 电话: (010) 63202266 (总机)、68331835 (营销中心)
经 售	北京科水图书销售中心(零售) 电话: (010) 88383994、63202643 全国各地新华书店和相关出版物销售网点
排 版	中国水利水电出版社微机排版中心
印 刷	北京市兴怀印刷厂
规 格	850mm×1168mm 32开本 5.75印张 155千字
版 次	2006年12月第1版 2006年12月第1次印刷
印 数	0001—1300册
定 价	19.00元

凡购买我社图书,如有缺页、倒页、脱页的,本社营销中心负责调换

版权所有·侵权必究

《生物催化反应与转化原理》

编 撰 人 员

主 审 邹 坤 (三峡大学化学与生命科学学院 教授)

副主审 黄 和 (南京工业大学 教授)

主 编 龚大春 (三峡大学化学与生命科学学院 副教授)

副主编 周 华 (南京工业大学 副教授)

主要参编人员

涂志英 (三峡大学化学与生命科学学院 讲师)

龚美珍 (三峡大学化学与生命科学学院 副教授)

田毅红 (三峡大学化学与生命科学学院 讲师)

李德莹 (三峡大学化学与生命科学学院 讲师)

前 言



随着化石资源（石油、天然气和煤等）的日益减少，再生资源的研究与利用越来越受到重视。如利用玉米、薯类等通过生物转化过程制备车用乙醇，已进入工业化的开发阶段。再生资源的利用方式主要依赖于生物催化与转化技术。同时手性药物的使用越来越多，手性药物的开发和利用对人类的健康越来越重要。而生物立体选择性催化正是手性药物合成的主要方法。因此，生物催化与转化已成为国外著名生物技术公司、化学品公司、高等学校、科研机构的研究热点。我国在政府和同行专家的大力支持下，于 2003 年批准了第一个由南京工业大学欧阳平凯院士主持的生物催化与生物转化的国家 973 项目。这正推动着我国在生物能源和手性药物等领域的快速发展。

随着生物能源和手性药物等高新技术产业的发展，对生物催化与转化的专业人才的需求也将不断增大。但是生物催化与转化原理对于生物工程专业的大学生而言，还缺乏系统的认识。目前这方面教材很少，仅有由江南大学孙志浩教授编写的《生物催化工艺学》可以供学生参考。但书中内容过多，不适宜本科教学。因此，我们有了编写“生物催化反应与转化原理”教材的想法，主要供生物工程和化学生物专业大学高年级学生

和研究生学习使用。

本书主要包括生物催化与转化的定义、生物催化的立体化学基础、生物催化反应类型、生物催化反应机理、生物催化剂的制备、生物催化反应介质工程、生物催化反应与生物转化的应用等 7 个部分。为了便于学习，本书在每章后设计了一些思考题，供同学们学习时参考。

本书在编写过程中得到三峡大学化学与生命科学学院黄应平教授和土木水电学院许文年教授的大力支持，在此表示衷心感谢！

由于编者水平有限，不足之处在所难免，恳请读者批评指正。

编 者

2006 年 11 月

目 录

前 言

1 绪论	1
1.1 生物催化、生物转化的基本概念	1
1.1.1 生物催化与转化的定义	1
1.1.2 生物催化与转化过程与发酵过程的关系	1
1.1.3 生物催化与化学催化学科的关系	2
1.2 生物催化反应的发展与酶学、酶工程的关系	2
1.2.1 生物催化与酶学	2
1.2.2 生物催化反应工程与酶工程、基因工程、 蛋白质工程	4
1.3 生物催化反应与转化研究的范畴	5
1.3.1 生物催化反应的类型	5
1.3.2 生物催化反应特性（机理和介质工程） 的研究	5
1.3.3 生物催化剂的构建	6
1.3.4 生物催化工程基础的研究	6
思考题	6
参考文献	7
2 生物催化反应的立体化学基础	8
2.1 手性及对映体概念	8
2.2 手性的意义	10
2.2.1 对映体的不同作用行为	10
2.2.2 单一对映体手性化合物的重要意义	10
2.3 有机分子的异构体与立体结构	11
2.3.1 构造异构体	11

2.3.2	构象异构体	11
2.3.3	构型异构体	12
2.4	手性化合物的检测表征	15
2.4.1	对映体过量	15
2.4.2	旋光法	16
2.4.3	手性色谱法	16
2.4.4	手性化合物的绝对构型的测定	18
	思考题	21
	参考文献	21
3	生物催化反应类型	22
3.1	生物催化的水解反应	22
3.1.1	作用于酯键的反应	22
3.1.2	作用于糖苷键的水解反应	22
3.1.3	作用于醚键的水解	23
3.1.4	作用于肽键的水解	24
3.1.5	作用于非肽键的碳-氮键 (酰氨键、腈基) 的水解	24
3.2	生物催化的氧化还原反应	24
3.2.1	脱氢酶催化的醇脱氢反应	25
3.2.2	醇脱氢催化的烃基脱氢反应	25
3.2.3	加氧酶催化的氧化反应	25
3.2.4	脱氢酶催化的醛和酮还原反应	26
3.2.5	脱氢酶催化的碳-碳双键还原反应	26
3.3	生物催化的缩合反应	27
3.3.1	醛缩酶催化的裂解反应	27
3.3.2	醛缩酶催化缩合反应	27
3.4	生物催化的加成反应	28
3.4.1	碳-碳的双键加成	28
3.4.2	羰基的加成反应	29
3.5	生物催化的卤化反应或脱卤反应	30

3.5.1	卤化反应	30
3.5.2	生物催化的脱卤素反应	30
	思考题	31
	参考文献	31
4	生物催化反应机理	32
4.1	还原反应	32
4.1.1	还原反应的机理	32
4.1.2	辅酶的循环使用	33
4.2	氧化反应	38
4.2.1	单加氧酶催化的氧化反应	38
4.2.2	双氧酶催化的氧化反应	41
4.2.3	氧化酶和脱氢酶催化反应	44
4.3	水解反应	44
4.4	转移和裂合反应	46
4.4.1	氨基转移酶	47
4.4.2	糖基转移酶	48
4.4.3	糖苷酶	49
4.4.4	磷酸化酶	52
	思考题	55
	参考文献	55
5	生物催化剂的制备	56
5.1	丰富多彩的微生物细胞——生物催化剂的 第一来源	56
5.2	高性能生物催化剂的获取途径和方法	56
5.3	微生物细胞(酶)催化剂的筛选策略	57
5.3.1	采样	57
5.3.2	富集、分离	58
5.3.3	筛选	59
5.3.4	筛选分析方法	60

5.3.5	复杂的生物催化剂的筛选设计	61
5.3.6	从极端微生物中筛选极端酶(生物催化剂)的策略	62
5.3.7	未培养生物催化剂的发现策略	63
5.3.8	环境中微生物基因组 DNA 筛选酶的方法	65
5.3.9	生物催化剂的高效筛选	67
5.4	生物催化剂(微生物细胞或酶)的改造	70
5.4.1	微生物细胞——优秀生物催化剂的评价标准	70
5.4.2	优良菌种选育	70
5.5	生物催化剂的理性设计、非理性设计与制备	78
5.5.1	生物催化剂的化学修饰	78
5.5.2	生物催化剂的理性设计改造	79
5.5.3	生物催化剂的定向进化——非理性设计	81
	思考题	85
	参考文献	86
6	生物催化反应中的介质工程	87
6.1	有机溶剂中的酶学性质	87
6.1.1	水与酶的相互作用	87
6.1.2	酶在有机溶剂中保持催化活性的基本条件	87
6.1.3	有机溶剂中生物催化剂的特性	88
6.2	生物催化反应的有机溶剂体系	89
6.2.1	与水互溶的有机溶剂-水单相体系	89
6.2.2	非极性有机溶剂-水两相体系	89
6.2.3	非极性有机溶剂-酶悬浮体系	90
6.2.4	反相胶束体系	91
6.2.5	超临界流体体系	92
6.3	非水介质的生物催化活性的研究方法	93
6.3.1	水活度与生物催化剂活性	93
6.3.2	溶剂的极性	96
6.3.3	溶剂的 pH 值	98

6.3.4	酶的形态	99
6.3.5	生物催化剂的稳定性	99
6.3.6	生物催化反应的选择性	100
思考题		101
参考文献		101
7	生物催化反应与生物转化的应用	103
7.1	酶法制备 D-氨基酸	103
7.1.1	D-氨基酸的研究意义	103
7.1.2	酶催化拆分法	104
7.1.3	D-氨基酸转氨酶法	107
7.1.4	海因酶法	108
7.1.5	海因酶法生产工艺	110
7.2	微生物转化法生产香草醛	116
7.2.1	概述	116
7.2.2	生物法生产香兰素方法与国内外研究概况	121
7.2.3	两步法生物转化阿魏酸生成香草醛	126
7.2.4	黑曲霉转化阿魏酸生成香草酸	130
7.2.5	香兰素的应用	135
7.3	生物催化法制备手性 2-芳基丙酸	137
7.3.1	2-芳基丙酸概述	137
7.3.2	酶法拆分工艺	140
7.3.3	色谱分析	150
7.3.4	萘普生	154
7.3.5	布洛芬	160
7.3.6	酮洛芬	164
7.3.7	其他 2-芳基丙酸	168
思考题		170
参考文献		170

1 绪 论

20 世纪 80 年代以来, 生物技术的发展已经经历了两个重要的产业化阶段: 1982 年重组人胰岛素的上市, 标志着医药生物技术的产业化浪潮的到来; 1996 年转基因大豆、玉米、油菜等相继上市, 标志着农业生物技术的产业化浪潮的到来。而在 21 世纪之初, 随着生物能源 (燃料乙醇、生物柴油等)、生物材料 (聚交酯、聚谷氨酸等)、手性精细化学品 (D-氨基酸、2-芳基丙酸等) 的相继上市, 标志着生物技术正迎来了第三次浪潮的到来, 即工业生物技术的产业化浪潮。而这次浪潮的到来需要生物催化与转化过程从分子水平到细胞水平, 最后到反应器水平的系列研究作支撑。为此, 生物工程专业的人才必须利用现代生物技术的手段, 掌握生物催化与转化的原理和方法。

在本章节中重点阐述生物催化与转化的概念和产生、发展过程。

1.1 生物催化、生物转化的基本概念

1.1.1 生物催化与转化的定义

生物催化 (biocatalysis) 反应是利用酶或微生物作为生物催化剂, 在一定介质条件下通过提高反应速度得到新物质的一类有机化学反应。生物转化 (biotransformation 或 bioconversion) 是利用微生物代谢过程中某个酶或一组酶对底物进行催化反应的物质加工方式。前者突出酶的催化特性, 与化学催化相对应; 后者突出物质加工特点, 与化学转化相对应。但由于生物体中的化学反应都是利用酶来完成, 因此两者就没有太大的本质区别。生物转化过程常常包括多个生物催化反应。

1.1.2 生物催化与转化过程与发酵过程的关系

发酵过程是一个从头合成的生物过程, 涉及多种酶的参与,



其原料主要是廉价的碳源、氮源和少量无机盐。

生物催化与转化过程是指用一个或几个酶催化步骤将底物转化成产物的过程。根据生化反应步骤的数目和底物的复杂程度，可对生物催化与转化进行以下分类：

(1) 发酵过程。用活细胞将原材料（如糖、淀粉或纤维素等）转化成目标产物。

(2) 前体发酵。发酵过程中添加前体物质（小分子的有机底物），并由活细胞将其转化成目标产物。

(3) 生物转化过程。用酶或静息细胞经过一系列步骤，将前体转化成目标产物。

(4) 酶催化。提取粗酶或部分纯化的酶，将前体转化成目标产物。

从生物催化过程与发酵过程看，生物催化过程涵盖了发酵过程。从本质上讲都是利用酶进行催化反应，但是其过程起始反应物可能有所不同，而终点的目标产物可能相同。也就是说，一个目标物质可能由发酵过程来完成，也可能由生物催化（酶催化）来完成。比如 L-苯丙氨酸的合成，可以用发酵法来完成，也可用酶法（生物催化）来完成，但起始物质不同。

1.1.3 生物催化与化学催化学科的关系

生物催化具有反应条件温和、环境友好、效率高和立体选择性强特点，因此它是化学催化的延伸和重要补充。它不仅涉及化学工程的催化、物质传递、反应工程及反应器的基本理论，更需要有机化学基本知识，以及生物学的微生物学、生物化学、分子生物学、酶工程和蛋白质工程等知识作支撑。

1.2 生物催化反应的发展与酶学、酶工程的关系

1.2.1 生物催化与酶学

1. 酶的认识

早在 4500~8000 年前，人类已发明了麦芽啤酒及制曲酿酒工艺，对生物催化就有了自觉认识。约在 3000 年前，人类开始



利用麦曲含有的淀粉酶将淀粉降解为麦芽糖，制造了饴糖。在2500年前的春秋战国时代，我国已能制酱、制醋。在酿酒工艺中，利用麦芽糖或霉菌的淀粉（曲）对谷物淀粉进行糖化，然后利用酵母菌进行酒精发酵，这是典型的生物催化反应技术。

2. 近代酶学的产生

1867年，德国人库内Kuhne使用酶(Enzyme)这一术语表述催化活性。Enzyme来自希腊文，原意为“在酵母中”(酵素)，中文译为“酶”。1896年，德国Buchner兄弟发现酵母的无细胞提取物和酵母细胞一样能将1分子葡萄糖转化成2分子乙醇和2分子 CO_2 ，这些工作为近代酶学的研究奠定了基础。

3. 现代酶学的建立和生物催化反应原理

在物理、化学技术(催化理论)发展的影响下，Michaelis和Menton在前人的工作基础上，根据中间产物学说于1913年提出了酶促反应动力学原理——米氏学说。米氏方程的建立对酶由定性到定量的研究以及作用机制的探讨，提供了方法。1926年，Sumner从刀豆中得到脲酶结晶(这是第一个酶结晶)，并证实这种结晶能催化尿素水解，产生 CO_2 和 NH_3 ，提出酶本身是一种蛋白质。脲酶结晶的获得，为现代酶学、蛋白质化学的产生奠定了基础。后来相继获得了胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶的结晶。“酶是一种蛋白质”这个观点被普遍接受，Sumner因此获得了1947年的诺贝尔奖。20世纪50~60年代，发现酶有相当的柔性，Koshland因此提出了“诱导契合”理论，以结合酶的催化机理和专一性，同时也搞清了某些酶的催化活性与生理条件变化有关，使人们对酶有了更深的了解。1961年，Monod及其同事提出了“变构模型”，用以定量解释酶的活性可以通过结合小分子物质(效应物)进行调节，提供了认识细胞中许多酶和一般化学催化剂一样更能加快反应的速度。1982年，Cech研究小组发现，四膜虫的rRNA(核糖体核糖核酸前体)能在完全没有蛋白质的情况下进行自我加工，催化得到成熟的rRNA产物。就是说，RNA本身是生物催化剂，称其为核酶



(ribozyme)，这对酶的传统概念是个严重挑战，提出了酶并不一定都是蛋白质的问题。1986 年，Schultz 和 Learner 的两个研究小组同时报道获得了具有催化活性的抗体，即抗体酶(abzyme)。这一重要突破为酶的结构功能研究和抗体与酶的应用开辟了新的研究领域。

1.2.2 生物催化反应工程与酶工程、基因工程、蛋白质工程

20 世纪，酶学、酶工程的发展为生物催化反应学科的形成提供了基础。一方面发现了更多的酶，并注意到某些酶的作用需要有低分子物质（辅酶）参加；另一方面发现，除了“经典”酶以外，某些生物分子也具有催化活性。

20 世纪 80 年代以来，基因工程技术用于酶学研究得到了重视。应用 DNA 重组技术可以生产出高效能、高质量的酶产品，用定点突变法在指定位点突变，可以改变酶的催化活性与专一性，这有助于认识酶的作用机理，并为设计特定需要的酶奠定基础，如乳酸脱氢酶可以通过在活性部位引入 3 个特点的氨基酸侧链突变成为苹果酸脱氢酶。定向进化技术（directed evolution）的发展可以在分子水平构建所需要的生物催化剂，通过增强基因改变蛋白质的某种特性（耐温、耐酸碱），使其更有利于生物催化反应。

现代科学技术的发展使人们能够在极端环境下（高温、高压、高盐、低盐及酸碱、有机溶剂环境等）收集到新酶，从而带动生物催化技术的进一步发展。

生物催化反应的应用促进了酶工程的形成。1906 年，瓦尔堡采用肝脏提取物水解消旋体亮氨酸酯制备 L-亮氨酸。1908 年，罗森贝格用杏仁（D-羟氰化酶）作为催化剂合成具有光学活性的氰醇。1936 年，彼得逊发展脂肪酶在有机溶剂苯存在的条件下能改进酶催化的酯合成。1949 年，日本采用深层培养获得羟甲基淀粉酶，使酶制剂生产应用进入工业化。1959 年，由于用葡萄糖淀粉酶催化淀粉生产葡萄糖的新工艺研究成功，彻底废除了原来葡萄糖需要高温高压的酸水解工艺，并使淀粉的产糖



率从 80% 达到 100%，大大促进了酶在工业上的应用。最近，来源于基因重组微生物的新型转基因糖化酶，在美洲、欧洲、亚洲等世界各地得到应用。1960 年，诺华公司通过对地衣芽孢杆菌研究培养发酵大规模制备了蛋白酶，酶的商业化生产进入新的阶段。

20 世纪 80 年代以后，许多研究发现大多数酶在非水介质中也比较稳定，具有相当高的催化活性，因此许多合成过程中以生物催化剂（酶）代替传统的化学催化剂获得了成功。1984 年以来，美国麻省理工学院 Zaks 和 Klibanow 教授为首的研究小组，一直从事非水相酶促反应的研究，取得瞩目的成绩。随着非水相酶学进一步发展，生物催化的介质工程等生物催化新技术在化学工业、医药工业和聚合物工业等领域得到应用。

生物信息学和代谢工程的发展为生物催化剂的构建提供了分子水平的平台。各种生物体的基因组学和蛋白质组学的快速发展，不仅为人类开发治疗新药和改良物种提供了分子水平的基础，而且为生物催化技术应用于生产化学品提供了前所未有的特殊机遇。微生物代谢工程选育菌种，获得新型高效的生物催化剂已进入商业化阶段。

1.3 生物催化反应与转化研究的范畴

1.3.1 生物催化反应的类型

在所有的生物催化剂中，起关键作用的仍然是酶。因此在讨论生物催化反应的类型时，我们将以酶的类型来进行讨论。生物催化反应主要有由氧化还原酶催化的氧化还原反应、由转移酶催化的取代或加成反应、由水解酶催化的各种水解反应或其逆过程（酯化、酰化等反应）、由裂合酶催化的分子内消去反应或脱羧反应、由异构酶催化改变分子构型的异构反应第五大类。

1.3.2 生物催化反应特性（机理和介质工程）的研究

生物催化剂在天然环境和非天然环境下所表现的催化特点有



许多不同,因此对不同生物催化反应在不同条件下均需要讨论。生物催化反应与化学催化反应有很大不同,酶或微生物随温度、pH 值非常敏感,在不同的反应介质下催化效率也有很大差别,催化剂的活性也会随不同的底物而不同。因此生物催化反应能否高效完成也是生物催化反应最为关注的问题。

1.3.3 生物催化剂的构建

生物催化剂与化学催化剂的作用一样,也是催化化学反应,提高反应速度,但来源不同。生物催化剂来源于生物,主要形式有游离酶、固定化酶、静态细胞、生长细胞和固定化细胞。从生物分类有植物、动物和微生物细胞。使用最多的是微生物细胞。如何获取高效低廉的生物催化剂是生物催化反应与转化过程研究的重要内容。

1.3.4 生物催化工程基础的研究

生物催化工程技术 (biocatalysis technology), 是工业生物技术 (industrial biotechnology) 的一个主要方面,也是生物工程的重要内容之一。它是随着生物科学与生物技术研究的发展,特别是酶学研究和酶工程的迅速发展,以及有机化学、生物化学、微生物学的基本原理与化学工程的有机结合和相互渗透,发展而成的一门新的边缘技术科学。由于孙志浩教授已编写了《生物催化工艺学》一书,这里重点从酶法、微生物法转化过程阐述生物催化过程的应用方法。

思考题

1. 什么是生物催化?它与生物转化、发酵过程及化学催化的关系是怎样的?
2. 生物催化的研究内容是什么?
3. 如何学习好生物催化与生物转化的专业知识?
4. 生物催化与转化的研究前沿有哪些?