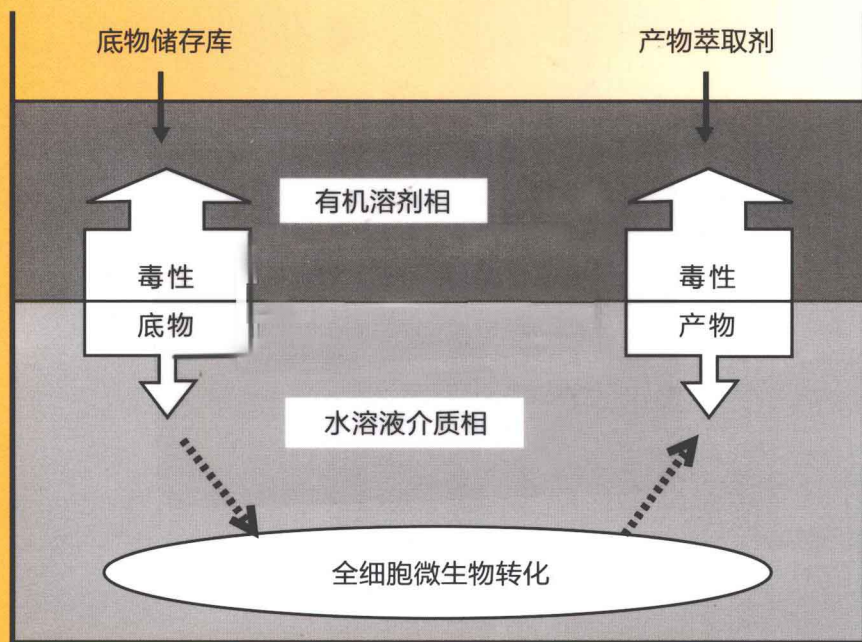


萃取微生物转化

Extractive Microbial Transformation

王志龙 编著

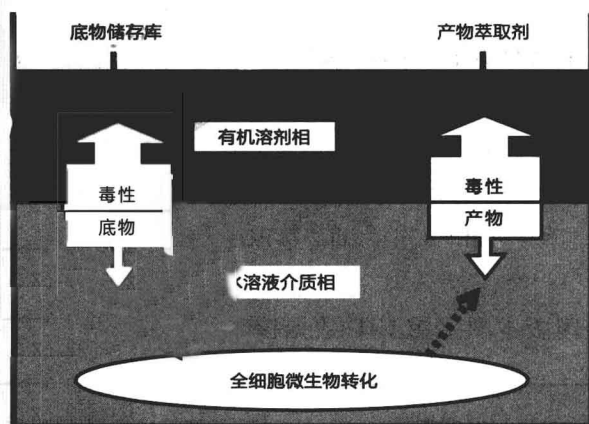


化学工业出版社

萃取微生物转化

Extractive Microbial Transformation

王志龙 编著



化学工业出版社

· 北京 ·

本书以微生物细胞在非水介质中的生物相容性和有机化合物在液-液两相系统中的不均匀分配为主线讨论两相分配系统中的萃取微生物转化。第1章为绪论。在第2、3章中分别介绍有机溶剂对微生物细胞的毒性和有机溶剂耐受性极端微生物。在第4章中介绍有机溶剂-水溶液两相系统中萃取微生物转化的原理及应用有机溶剂进行萃取微生物转化的局限性。在第5~9章中分别介绍了非离子表面活性剂、电中性聚合物、电解质聚合物和离子液体等新型溶剂形成两相系统中的萃取微生物转化。最后在第10章中介绍了3个萃取微生物转化实例,以展示萃取微生物转化的应用潜力和面临的挑战。

图书在版编目(CIP)数据

萃取微生物转化/王志龙编著. —北京:化学工业出版社, 2012.1

ISBN 978-7-122-12716-7

I. 萃… II. 王… III. 萃取-微生物催化作用-研究
IV. O658.2

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第221961号

责任编辑:刘亚军
责任校对:郑捷

文字编辑:丁建华
装帧设计:韩飞

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

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张12 彩插1 字数294千字 2012年4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:39.00元

版权所有 违者必究

前言

生物技术产业的发展经历了医药生物技术和农业生物技术的高潮之后已经进入工业生物技术的新时代。工业生物技术相对于传统的石油化学工业将带来从原料来源到加工工艺的彻底变革。其中高生物催化剂活性、高底物浓度和高产物浓度的生物催化和生物转化是工业生物技术的核心内容。

作者试图以微生物细胞在非水介质中的生物相容性和有机化合物在液-液两相系统中的不均匀分配为主线讨论两相分配系统中的萃取微生物转化。本书第1章为绪论。在第2、3章中分别介绍有机溶剂对微生物细胞的毒性和有机溶剂耐受性极端微生物。在第4章中介绍有机溶剂-水溶液两相系统中萃取微生物转化的原理及应用有机溶剂进行萃取微生物转化的局限性。在第5~9章中分别介绍了非离子表面活性剂、电中性聚合物、电解质聚合物和离子液体等新型溶剂形成两相系统中的萃取微生物转化。最后在第10章中介绍了3个微生物转化实例,以展示萃取微生物转化的应用潜力和面临的挑战。本书是作者在多年研究的基础上梳理和加工国内外相关文献的结果,尽量勾勒出萃取微生物转化的大体轮廓。限于作者的知识和见识,能够抛砖引玉是作者最大的心愿,错讹之处敬请指教。

作者在萃取微生物转化领域所收获的一点认识和成绩得益于上海医药工业研究院陈代杰教授和华东理工大学许建和教授多年的指导和交流,以及在德国 Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ) Hermann J. Heipieper 博士实验室和美国 University of Illinois at Urbana-Champaign (UIUC) Hao Feng 博士实验室的访问研究与交流。书中涉及作者“浊点系统中萃取微生物转化”的相关研究成果得到了国家自然科学基金(No 20676080, 21076123)和上海交通大学晨星青年学者奖励计划(2008~2010)的资助。全国高校素质教育教材研究编审委员会刘思祺老师对本书的出版提供了大力支持和帮助,并获得了该编审委员会出版基金的资助。承蒙华东理工大学严希康教授审阅全文并提出宝贵意见。特此声明并致以诚挚的感谢。

王志龙

2011年10月于上海交通大学

目 录

第1章 绪 论 1

1.1 生物催化的特征	1
1.2 生物催化剂的底物选择性	2
1.3 生物催化剂的反应条件温和性	4
1.4 萃取微生物转化	5
参考文献	7

第2章 有机化合物的细胞毒性 8

2.1 细胞膜的结构	8
2.1.1 细胞膜脂的多样性	8
2.1.2 细胞膜的流动性	10
2.1.3 等黏度适用	12
2.2 有机溶剂对微生物的毒性	12
2.2.1 有机溶剂的疏水性指数	12
2.2.2 有机溶剂的微生物毒性	14
2.2.3 有机溶剂对微生物毒性的 $\log P$ 规则	15
2.3 细胞膜对有机溶剂压力的响应	16
2.3.1 极性头的变化	16
2.3.2 脂肪酸的变化	16
2.4 $\log P$ 规则的两点说明	20
2.4.1 $\log P$ 规则的理论依据	20
2.4.2 $\log P$ 规则应用的局限性	22
参考文献	23

第3章 有机溶剂耐受性微生物 26

3.1 有机溶剂耐受性微生物	26
3.1.1 微生物的溶剂耐受性指数	26
3.1.2 溶剂耐受微生物的筛选	27
3.2 溶剂耐受性微生物的特殊机制	29
3.2.1 生物膜的形成	30
3.2.2 多药排出泵 (multi-drug efflux pumps)	31
3.2.3 微生物代谢有机化合物	33

3.2.4 热激动蛋白和噬菌体激动蛋白·····	33
3.3 溶剂耐受性微生物的应用·····	34
3.3.1 溶剂耐受微生物的代谢工程调节·····	34
3.3.2 溶剂耐受性微生物作为宿主细胞·····	35
3.3.3 改造微生物的溶剂耐受性·····	37
参考文献·····	38

第4章 萃取微生物转化····· 41

4.1 水-有机溶剂两相系统·····	41
4.1.1 有机溶剂-水的互溶度·····	41
4.1.2 有机化合物的分配系数·····	42
4.2 生物利用度·····	43
4.2.1 生物利用度的概念·····	43
4.2.2 生物利用度的测定·····	44
4.3 萃取微生物转化的原理·····	45
4.3.1 微生物在两相系统中的分配·····	45
4.3.2 底物的储存库和产物的萃取剂·····	46
4.3.3 微生物细胞膜的通透剂·····	47
4.3.4 萃取微生物转化的应用范围·····	48
4.4 有机溶剂萃取剂的选择·····	49
4.4.1 水-有机溶剂两相系统的局限性·····	50
4.4.2 选择有机溶剂的策略·····	52
参考文献·····	54

第5章 表面活性剂胶束溶液····· 57

5.1 表面活性剂溶液·····	57
5.1.1 表面活性剂·····	57
5.1.2 聚合物表面活性剂·····	57
5.1.3 表面活性剂溶液性质·····	59
5.2 胶束增溶·····	61
5.2.1 饱和增溶·····	62
5.2.2 不饱和增溶·····	63
5.2.3 增溶有机化合物的生物利用度·····	66
5.3 萃取微生物转化·····	68
5.3.1 非离子表面活性剂的生物毒性·····	68
5.3.2 胶束溶液中的萃取微生物转化·····	71
参考文献·····	76

第6章 浊点系统及结合型相分离····· 78

6.1 浊点系统·····	78
---------------	----

6.1.1 浊点现象	78
6.1.2 浊点与 Kraft 点	81
6.2 结合型相分离	82
6.2.1 结合型与分室型相分离	82
6.2.2 盐溶液中的结合型相分离	84
6.2.3 离子液体中的结合型相分离	85
6.2.4 结合型相分离的理论模型	86
6.3 萃取微生物转化	87
6.3.1 凝聚层相中的增溶	87
6.3.2 浊点相分离与生物相容性	89
6.3.3 浊点系统中的萃取微生物转化	90
6.4 下游分离加工	92
6.4.1 有机溶剂萃取技术	93
6.4.2 离子液体萃取技术	94
参考文献	95

第 7 章 双水相系统及分室型相分离 98

7.1 双水相系统	98
7.1.1 典型聚合物 PEG 的理化性质	98
7.1.2 聚合物溶液的双水相系统	98
7.1.3 表面活性剂与聚合物的分室型相分离系统	100
7.1.4 相图的制备及其理论预测	102
7.2 双水相系统的极性	104
7.2.1 极性的定义	104
7.2.2 相分离与极性的关系	106
7.2.3 相极性差异与分配系数	107
7.3 双水相系统中的萃取微生物转化	110
7.3.1 聚合物的毒性	110
7.3.2 分室型相分离系统中的萃取微生物转化	111
7.4 下游分离加工	115
参考文献	116

第 8 章 离子化合物的萃取微生物转化 118

8.1 离子化合物在分室型相分离系统中的盐效用	118
8.1.1 离子化合物的道南效应	118
8.1.2 盐效应和 pH 调节	119
8.1.3 添加电解质的萃取微生物转化	120
8.2 结合型相分离系统中的盐效应	121
8.2.1 盐效用对分离相极性的影响	122
8.2.2 盐效用应用于蛋白质的分离	123

8.2.3 加盐萃取微生物转化	124
8.2.4 添加螯合剂强化金属离子的分离	127
8.3 电解质聚合物的分室型相分离系统	129
8.3.1 电解质聚合物的相分离	129
8.3.2 分室型相分离系统中的萃取微生物转化	132
参考文献	134

第9章 离子液体 136

9.1 离子液体的基本性质	136
9.1.1 离子液体的表面活性剂特征	137
9.1.2 离子液体的溶剂特征	137
9.2 绿色溶剂与离子液体的生物毒性	145
9.2.1 离子液体的生物毒性	145
9.2.2 生物转化中离子液体的生物相容性	146
9.3 萃取微生物转化	148
9.3.1 有机化合物在水-离子液体两相系统中的分配	148
9.3.2 水-离子液体两相系统中萃取微生物转化	150
9.4 萃取微生物转化的下游加工	152
9.4.1 有机溶剂萃取技术	153
9.4.2 超临界流体萃取技术	153
参考文献	154

第10章 萃取微生物转化实例 157

10.1 甾醇侧链切除的微生物转化	157
10.1.1 甾醇的微生物转化工艺	158
10.1.2 甾醇侧链切除的介质工程策略	160
10.1.3 静息细胞微生物转化	163
10.2 微生物转化合成 L-PAC	165
10.2.1 生物-化学法合成麻黄素	165
10.2.2 萃取微生物转化合成 L-PAC 的策略	167
10.3 丁醇的萃取微生物发酵	173
10.3.1 丁醇的微生物发酵	173
10.3.2 挥发性丁醇的气提技术	175
10.3.3 疏水性丁醇的萃取技术	176
10.3.4 膜选择性渗透蒸发/萃取	179
参考文献	183

第 1 章 绪 论

以化石资源为原料的传统化学工业极大地提高了人们的物质生活水平，然而人们不得不面对快速消耗的不可再生化石资源所带来的资源危机以及传统化学工业在化石资源的加工过程中产生的环境污染。强酸（碱）、高温（压）、有毒有机溶剂等反应条件导致现行化学工业的高能耗、高水耗、高污染，特别是一些化学催化剂的低选择性形成种类繁多的副产物，带来了现行化学工业的低资源利用率、高污染。相反，生物催化的反应条件温和性和生物催化的底物选择性被认为是改造传统化学工业以实现低能耗、低水耗、低污染和高资源利用率的有力工具。化石资源的快速消耗使人们将目光投向可再生的生物质资源，以生物质来源的发酵糖为资源是未来制造生物能源和其他化学品的重要途径。生物催化工业的发展预示着传统化学工业从原料来源到加工工艺的彻底变革。

1.1 生物催化的特征

化学反应是物质和能量的一种转换方式。在这一转换过程中，反应物中的原子重新排列而构成新的分子（产物），同时伴随着能量的释放或吸收。所谓生物催化，就是以酶或微生物等生物活性物质为催化剂的化学反应。狭义上讲，生物转化是指通过一步或者几步酶促反应将一种化合物转化为结构相似的另一种化合物的过程及其结果。生物体内的复杂代谢过程是酶促化学反应的有机组合。广义上讲，生物催化、生物转化和生物体内的新陈代谢是不同的几个概念描述了同一事实。因此，生物催化、生物转化与新陈代谢要在概念上进行严格区分是比较困难的。例如，微生物发酵过程，如乙醇发酵，是微生物新陈代谢的结果，也是广义上的生物催化或生物转化过程。习惯上，从底物与产物的结构差异上讲，生物催化和生物转化强调底物和产物的结构相似性，酶促反应只改变底物的一个或者少数几个官能团的结构。相反，新陈代谢（metabolism）或者发酵（fermentation）的底物与产物在结构上的差异则非常大。生物催化主要强调以酶为催化剂的化学反应过程，而生物转化更强调底物到产物之间的变化结果^[1]。因此，一般以分离纯化的酶为生物催化剂时多使用生物催化（biocatalysis）或酶促催化（enzymatic catalysis）这一术语，而以微生物细胞为生物催化剂时多使用生物转化（bio-transformation, bioconversion）或微生物转化（microbial transformation）。

工业生物催化的基本流程如图 1-1 所示，以酶或微生物细胞等生物活性物质作为催化剂是工业生物催化不同于化学工业的主要特征。生物催化剂不同于化学催化剂的主要特征是在温和条件下选择性地催化化学反应。生物催化工业中的生物催化反应工程和下游加工工程与化学工业的相对应的过程具有类似性。

生物催化剂的底物选择具有相对性，即生物催化剂的底物专一性和底物多能性。一方面生物催化剂的底物专一性导致特定的酶只能催化特定的一个或者一类化学反应。酶的多样性及其筛选是生物催化剂研究的重要内容。另一方面，生物催化剂的多能性导致特定的酶能催化一类或几类特定的化学反应。这一方面扩大了酶促催化的底物谱，但同时也可能失去生物

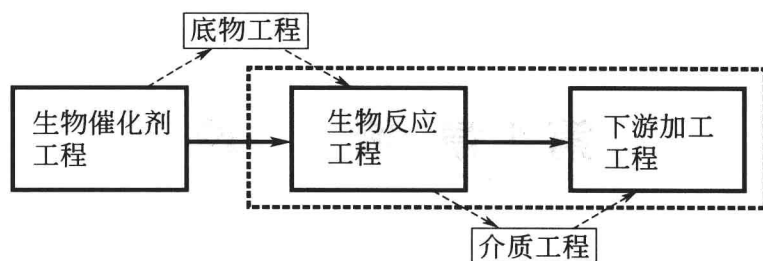


图 1-1 工业生物催化的基本流程

催化剂高选择性的优势。采用底物工程策略以提高酶的立体选择性在手性合成等工业生物催化过程显得尤为重要。

生物催化剂的反应条件温和性一般要求生物催化在水溶液等温和的环境条件下反应。一方面，水溶液介质中生物催化要求生物催化的底物/产物必须控制在较低的浓度范围内。对于水不溶性有机化合物，其在水溶液中的溶解度本来就非常有限，但对于水溶性有机化合物，高浓度有机化合物意味着在非水溶剂中的生物催化反应。底物补料（fed batch）是控制底物浓度的常规策略之一，原位产物去除（*in situ* product removal）的生物反应和分离耦合过程是生物催化工业中解除产物抑制的常用手段。另一方面，生物催化剂的反应条件温和性已经受到挑战，酶在非水溶液中的活性和稳定性不但使非水溶剂中的生物催化成为可能，而且非水溶剂的介质工程方法也是改变酶催化特征的一种有效手段。非水相酶学成为工业生物催化的一个重要分支。液-液两相系统中的萃取生物转化整合了介质工程和生物反应-分离耦合技术的一些优点而成为介质工程研究的重要内容。

1.2 生物催化剂的底物选择性

酶促催化有机化合物的合成与分解，其选择性一般用三点接触模型解释。如图 1-2 所示，有机化合物的中心碳原子与四个相同或不同的基团相连，其中三个基团可以和酶分子以各种物理、化学的作用力而相互接触。当有机化合物的三个基团与酶分子的三个结合位点相互匹配时，酶分子的催化活性中心才能催化有机化合物中特定化学键的断裂或形成。酶分子结合位点的特异性决定了其催化底物的选择性。依据酶分子结合位点对有机化合物中基团匹配的严格程度不同，生物催化剂对底物的选择性具有相对性，即酶促催化底物不但具有专一

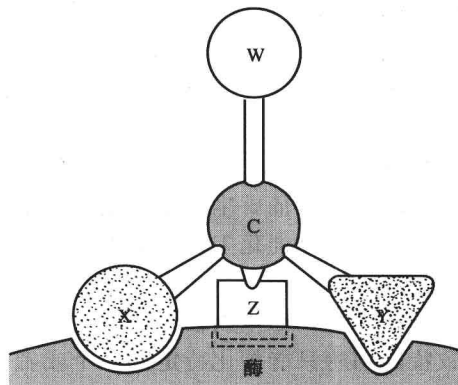


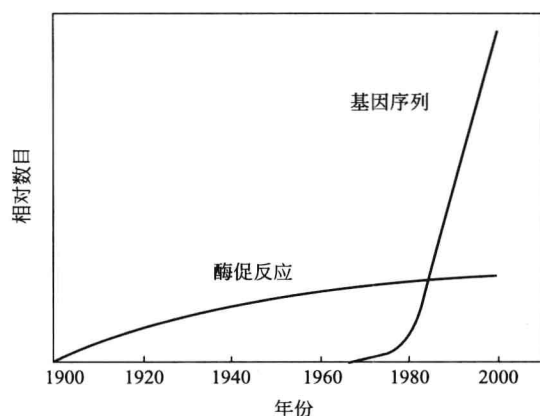
图 1-2 有机化合物与酶分子作用的三点接触模型

性而且具有多能性 (promiscuity)。具体表现为化学选择性、位置选择性和立体选择性等。化学选择性可以进一步分为底物的结构选择性、基团选择性和化学键选择性。酶分子结合位点的立体选择性为有机化合物的基团提供了高度匹配的手性工具, 生物催化成为手性拆分和手性合成的最具潜力的方法之一。

自然界的有机化合物种类繁多。曾经一度被称为“异生素”的芳香族化合物、卤素类有机化合物等人工合成的有机化合物也能在不同地点、时间由特定的生物代谢合成或降解。尤其是真菌、植物等合成的代谢产物的复杂程度往往使合成化学品相形见绌, 如一些天然植物来源的药物、染料, 微生物来源的药物, 和植物的重要成分之一木质素等都具有复杂的结构。尽管这些有机化合物的浓度和产量不一定很大, 但在地球漫长的生命演变过程中形成这些复杂有机化合物的量却是巨大的, 然而至今没有造成这些有机化合物的大量富集。从化合物的多样性可以断定自然界的酶也具有多样性。

一般的生物化学教科书对完成复杂生命过程的葡萄糖分解代谢及其合成代谢都进行了详细的阐述。在自然界的进化过程中, 生命体形成了经济的降解复杂化合物的代谢途径。生命体并非形成一套完整的新陈代谢途径来降解特定的有机化合物, 而是由特定的酶来催化特定的复杂有机化合物以形成常规新陈代谢网络中的代谢中间体, 代谢中间体进入常规代谢网络后利用常规的代谢途径进行进一步的新陈代谢。如 *Pseudomonas putida* 降解芳香族化合物甲苯可以通过氧化酶或者双加氧酶转化为儿茶酚, 儿茶酚进一步被儿茶酚加氧酶转化而进入常规的代谢网络。这一代谢方式使生命体扩大了碳源, 同时经济地消耗能量以合成降解复杂化合物所需的少数酶。另一种更为经济的新陈代谢方式是微生物群落中的不同微生物间通过“接力”来完成复杂有机化合物的降解, 如反刍动物瘤胃中微生物群落降解木质纤维素等。一个研究得比较清楚的例子是微生物群落降解莠去津^[2]。Alvey 等采用富集培养的方法得到了能稳定降解除草剂莠去津的微生物群落, 但其中的任何一种微生物的纯培养都不能降解莠去津。通过 PCR 技术测定了莠去津代谢基因在微生物群落中的分布, 并通过进一步生物化学实验证实: 这个微生物群落中至少包括 *Clavibacter* sp. 负责将莠去津代谢为 *N*-乙基三聚氰酸二酰胺和 *Pseudomonas* CN 完成 *N*-乙基三聚氰酸二酰胺的进一步代谢。这样每一种微生物只需合成一种或很少几种酶, 进一步降低了合成降解复杂化合物所需酶的能量消耗。

目前发现新的酶促反应主要是以选择性培养基为基础的微生物富集纯培养技术^[3]。由于微生物培养环境与自然环境间存在巨大的差异, 纯培养技术很难获得有关丰富多彩的未培养微生物中的酶促反应信息。PCR 技术可以获得微生物群落的相关基因信息, 通过基因比对和克隆技术进一步将有关的新基因转化到宿主细胞后进行培养, 这样可以筛选到全新的酶促反应。这一技术也称为“分子筛选”。分子筛选是获得未培养微生物中有关新酶促反应信息的有力工具。虽然高速发展的基因测序技术为快速、高效地提高已知酶促反应的催化性能创造了有利条件, 但当前基因测序的主要工作是同源性基因的比对和归类。催化同一化学反应的酶的所有基因具有一定的同源性而被归为一类, 反过来利用同源性基因克隆得到的蛋白质大多也能催化这一化学反应。因此, 通过基因的归类与筛选可以获得催化这一化学反应性能更加优越的酶。这一称为“虚拟筛选”的技术受到生物催化工作者的青睐。但具有一定同源性基因的酶能催化的化学反应却可以是不同的, 而不具有同源性基因的酶也有可能催化该化学反应, 这些丰富的信息在虚拟筛选过程中都被“过滤”掉了。因此, 虚拟筛选对发现新的酶促反应的影响非常有限。在基因测序技术发明前的 20 世纪前 50 年, 微生物新陈代谢经历了一个快速发展时期, 不但阐明了中间代谢反应的基本轮廓, 也发现了一些特殊化合物的酶促反应。如图 1-3 所示, 20 世纪后 50 年出现了基因测序技术反而使发现新的酶促反应的步伐放慢了。

图 1-3 20 世纪新发现的基因序列和酶促反应^[1]

如图 1-3 所示,我们对自然界中丰富多彩的酶促反应的了解到目前为止还只是冰山一角,而应用于工业生物催化的酶促反应更是凤毛麟角。一方面,筛选新的酶促反应,尤其是未培养微生物的酶促反应,将是一个永远具有魅力的研究领域。另一方面,应用酶工程技术强化已知酶的生物催化反应是目前工业生物催化中一种有效的手段。常用的手段为改造酶分子本身,如比较成熟的方法有酶固定化技术^[4]、酶的化学修饰^[5]、理性设计和定向进化为主要手段的蛋白质工程技术^[6]等;改变生物催化反应条件的介质工程^[7];改造酶促反应底物以提高底物选择性的底物工程^[8]等。酶工程技术的发展呈现两个明显不同的方向:一方面,强化酶的功能从单纯的固定化技术和化学修饰向深入酶分子本身结构的蛋白质工程发展,工业生物催化的工艺设计从根据酶的性质来设计化学反应的工艺路线向根据化学反应的工艺路线来设计酶的发展方向发展^[6];另一方面,强化酶的功能不但强调酶自身性质的改造,而且需要从酶促反应系统的观点出发,应用底物工程、介质工程方法等全面地考虑底物、反应介质等的影响。

1.3 生物催化剂的反应条件温和性

生物催化剂的一个显著特征是反应条件的温和性。反应条件的温和性指在中等温度、渗透压、pH 和水溶液等温和的环境中酶具有最佳的酶促催化功能。反应条件温和性一直被认为是生物催化环境友好的重要特征之一。但工业生物催化的苛刻反应条件难以满足酶促反应条件温和性的要求。例如,一些有机化合物在水溶液中的溶解度很小从而降低了酶促反应的速率;一些化学反应(如转酯化反应)在水溶液中进行时,水作为反应组分使反应向不利的平衡方向移动;有些底物/产物在水溶液中不稳定而发生水解反应等。类似于化学合成,在有机溶剂中的酶促反应将有可能解决上述困难。但有机溶剂中的酶促反应是与酶促反应反应条件的温和性矛盾的。类似地,酶促反应中温度、压力、pH 等温和性的要求也时常与工业生物催化过程中的苛刻条件冲突。

随着酶和微生物筛选范围的扩大,生物催化剂的反应条件温和性受到了挑战。1984 年,Zaks 和 Klivanov 发现了酶在高温的有机溶剂中具有活性和稳定性^[9]。他们发现脂肪酶干粉在 100℃ 条件下的有机溶剂中具有稳定性,随着有机溶剂中含水率的增加其稳定性快速降低。且脂肪酶在有机溶剂中同样具有活性,在含有微量水(1%左右)的有机溶剂中的活性相对较高,但有机溶剂中酶的活性一般要比在水溶液中低 1~2 个数量级。这一重要

发现直到 1940 年以后才引起人们的重视, 非水相酶学作为一个分支学科蓬勃发展起来^[10]。以非水相酶学为基础的介质工程研究在增加底物溶解度、增加底物/产物稳定性、移动反应平衡、甚至改变酶的催化性质等都有重要的应用。1989 年, Inoue 和 Horikoshi 筛选到了能在高浓度甲苯中存活的微生物 *Pseudomonas*^[11], 各种耐高温、高压、高盐的极端微生物也已经先后被发现^[12]。极端环境微生物和酶的筛选成为 20 世纪 90 年代以来的研究热点。

非水相酶学的发展和极端环境微生物和酶的发现, 极大地拓展了生物催化的应用领域, 但常规酶和微生物的酶促反应仍然是工业生物催化过程的主体。微生物新陈代谢网络中的中间产物涉及各种各样的有机化合物, 受到生命体系中复杂化学反应的平衡控制和精确调节, 生理条件下的酶促反应中有机化合物在水溶液中的浓度一般维持在一个相对很低的水平。即使是早已应用的酿酒酵母对乙醇的耐受浓度一般也在 10% 以下。如图 1-1 所示, 传统化学工业中化学反应工程和下游的产品分离工程可以相对独立, 但工业生物催化中低产物浓度的特征决定了生物产品的分离工程技术必须深入到生物反应工程的过程中, 生物分离工程不再是目标单一的产品分离, 而是把提高生物反应的产物浓度作为生物分离的重要目标之一。这是生物分离工程不同于传统化学工业分离工程的重要特征。

生物反应-分离耦合技术(原位产物去除)就是基于生物分离工程不同于传统化学分离工程的特征而发展起来的。即在生物反应系统中引入分离工程的手段, 在生物反应进行的过程中同时实现产物的分离和浓缩, 以达到解除产物抑制、在后续的分离工程中实现高浓度产物分离的目的。如表 1-1 所示, 根据产品的特征可以采用不同的生物反应-分离耦合策略。其中吸附和萃取两种常规分离技术在生物反应-分离耦合技术中已经广泛研究, 尤其是液-液萃取技术因具有便于管道输送和多目标化工厂设计的优点而已经工业化应用^[13]。

表 1-1 产品特征与相应的分离耦合单元

产物特征	耦合分离单元	实 例
溶解性	结晶与沉淀	酶促水解青霉素
挥发性	蒸发与渗透汽化	乙醇的渗透汽化
荷电性	吸附	乳酸的吸附
疏水性	液-液萃取	2-苯乙醇萃取
分子大小	透析	膜袋中酶促反应

1.4 萃取微生物转化

液-液萃取与生物催化的耦合是一种生物反应-分离耦合技术, 生物催化剂在液-液两相系统中的稳定性和活性等关键问题涉及介质工程的研究内容。虽然酶和微生物作为生物催化剂在生物催化中的应用各有优势。例如, 酶促催化的产品相对单一而有利于下游分离, 酶固定化技术相对成熟而有利于生物催化剂的循环利用; 相反, 微生物细胞作为生物催化剂不需分离等复杂过程而相对简单, 微生物转化有利于多酶催化和需要辅酶循环的生物催化过程等。在非水介质中, 酶和微生物的稳定性和活性机制存在本质差别, 即非水溶剂对酶活性的影响主要为改变蛋白质的立体结构, 而对微生物的影响主要为改变细胞膜的结构和功能最终影响微生物的新陈代谢等生命活动。为区别于萃取酶促催化, 本书内容主要讨论萃取微生物转化, 同时适当介绍一些萃取酶促催化的特征。

液-液萃取微生物转化的关键在于萃取溶剂的选择。一方面, 选择的萃取溶剂是微生物

转化过程中的反应介质。微生物在液-液两相系统中必须满足生物相容性的要求。换一句话说,应该考察微生物作为生物催化剂在液-液两相系统中的稳定性和活性。另一方面,选择的萃取溶剂在液-液两相系统应该对底物/产物具有较强的萃取能力。一般地,大多数微生物细胞具有较强的亲水性而分配于液-液两相系统中的水溶液相或液-液两相的界面上。微生物转化系统中底物/产物在液-液两相系统中的选择性分配是选择萃取溶剂的关键。另外,萃取微生物转化作为一种生物反应-分离耦合的单元操作,所选择的溶剂与产物的下游分离还需满足高效、简单、方便等要求。满足了上述基本条件,在萃取溶剂与水溶液组成的液-液两相系统中进行萃取微生物转化就基本上可以实现。除此之外,所选择的溶剂还应该是安全、绿色和价格低廉的常用溶剂。尤其是微生物转化中常采用通气培养,高挥发性的有机溶剂组成的液-液两相系统中的萃取微生物转化可能存在爆炸等不安全因素。迄今为止,有机溶剂^[11]、离子液体^[14]、聚合物组成的双水相系统^[15]、表面活性剂溶液组成的浊点系统^[16]以及超临界流体^[17]在萃取微生物转化中的应用都有文献报道。但所选择的溶剂实际上很难同时满足上述要求,只有根据具体问题对各因素的影响进行权衡与取舍。

液-液萃取微生物转化作为一种生物反应-分离耦合的单元操作,其设备的结构设计不但与萃取微生物转化的溶剂选择有关,而且与操作单元的设备投资、操作稳定性等紧密相连。图 1-4 是萃取微生物转化单元的几种基本结构类型。

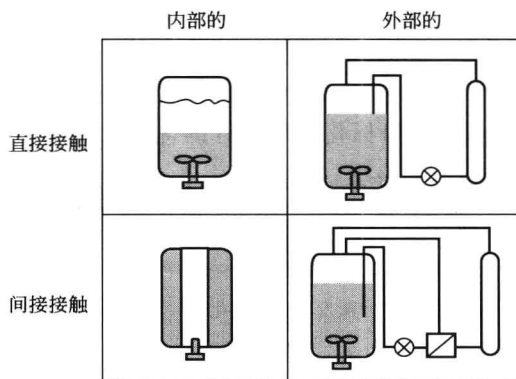


图 1-4 萃取微生物转化的结构设计概念^[18]

如图 1-4 所示,根据微生物反应单元与液-液萃取单元的相对位置可以将萃取微生物转化单元的结构分为外置式和内置式。而根据液-液萃取中所选择的溶剂与微生物的是否接触可以分为直接接触式和间接接触式。内置式直接接触型的结构对设备要求最为简单,除萃取溶剂占据一定反应器空间外,和常规水溶液中的微生物转化在操作上没有本质的差别,这一结构设计形式因满足多目标工厂设计的要求而受到特别重视。但萃取溶剂与微生物直接接触对所选择溶剂的生物相容性要求相对较高。外置式可以使萃取操作在非反应体系中进行,对所选择溶剂的萃取能力和萃取速率要求降低。而间接接触式装置通过膜将微生物细胞与所选择溶剂分离开来,对所选择溶剂的生物相容性的要求降低。间接接触式装置是建立在膜分离技术的基础之上的,膜分离技术的完善是其工业应用的基础和前提。外置式间接接触型的结构对所选择的溶剂的要求明显降低,但对设备要求最高,且结构存在闭合回路流程,任何环节的不稳定性,如膜污染、微生物转化过程导致的液-液两相的性质和结构改变等,都可能导致整个反应-分离耦合过程的破坏。因此,萃取微生物转化中单元设备的结构与关键参数的监测和控制较常规的微生物转化要复杂得多。

参考文献

- [1] [美] 劳伦斯 P. 瓦克特, [美] C. 道格拉斯·赫什伯格著. 生物催化和生物降解——有机化合物的微生物转化. 沈德中主译. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] Alvey S, Crowley DE. Survival and activity of an atrazine mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. *Environ Sci Technol*, 1996, 30: 1596-1603.
- [3] Beijerinck MW. Enrichment culture studies with urea bacteria. *Zentbl Bacteriol Abt*, 1901, 27: 33-61.
- [4] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40 (6): 1451-1463.
- [5] Jene Q, Pearson JC, Lowe C R. Surfactant modified enzymes: solubility and activity of surfactant-modified catalase in organic solvents. *Enzyme Microb Technol*, 1997, 20: 69-74.
- [6] Burton S, Cowan DA, Woodley JM. The search for the ideal biocatalyst. *Nature Biotechnol*, 2002, 20: 37-45.
- [7] Zaks A, Klivanov AM. Enzymatic catalysis in organic solvent at 100°C. *Science*, 1984, 224: 1249-12518.
- [8] Lairson LL, Watts AG, Wakarchuk WW, Withers SG. Using substrate engineering to harness enzymatic promiscuity and expand biological catalysis. *Nature Chem Biol*, 2006, 2 (12): 724-72.
- [9] Zaks A, Klivanov AM. Enzymatic catalysis in organic solvent at 100°C. *Science*, 1984, 224: 1249-1251.
- [10] Klivanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 2001, 409 (11): 241-246.
- [11] Inoue A, Horikoshi K. A *Pseudomonans* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, 1989, 338 (16): 264-266.
- [12] Isken S, de Bont JAM. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, 1998, 2: 229-238.
- [13] Liese A, Seelbach K, Wandrey C. 工业生物转化过程. 欧阳平凯, 林章凛译. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [14] Cull SG, Holbrey JD, Vargas-Mora V, Seddon KR, Lye GJ. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 69 (2): 227-233.
- [15] Kumn I. Alcoholic fermentation in an aqueous two-phase system. *Biotechnol Bioeng*, 1980, 12: 2393-2398.
- [16] Wang Z, Zhao F, Hao X, Chen D, Li D. Microbial transformation of hydrophobic compound in cloud point system. *J Mol Catal B*, 2004, 27: 147-153.
- [17] Sovova H, Zarevucka M. Lipase-catalysed hydrolysis of blackcurrant oil in supercritical carbon dioxide. *Chem Eng Sci*, 2003, 58: 2339-2350.
- [18] Woodley JM, Bisschops M, Straathof AJJ, Ottens M. Perspective future directions for *in-situ* product removal (IS-PR). *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, 83: 121-123.

第 2 章 有机化合物的细胞毒性

细胞膜将细胞质及其胞内细胞器与外部环境分隔开来，细胞膜一方面保护细胞质及其细胞器免受外部环境的影响，另一方面，细胞质及其细胞器等生命活动通过细胞膜与外部环境进行物质和能量交换。有机化合物对微生物的毒性主要表现为对细胞膜的影响并最终导致细胞膜的破裂和细胞生命活动的终止。

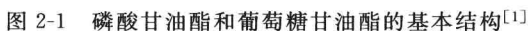
2.1 细胞膜的结构

具有流动性的脂双层分子细胞膜结构模型是被广泛接受的细胞膜结构模型之一。该模型认为具有流动性的脂双层分子构成细胞膜的基本骨架，蛋白质可以位于脂双层分子的表面、镶嵌在脂双层分子中或横跨脂双层分子。一些糖类物质通过与蛋白质或者细胞膜脂相连而伸展在膜的外部空间。非极性有机化合物可以穿透脂双层分子而具有一定的空间分布，其分布的位置和浓度受有机化合物的极性和分子大小的控制。分布在细胞膜中的有机化合物分子可以是细胞的天然组成成分，如固醇类化合物、萜类化合物等，也可以是环境中的有机化合物，如微生物发酵过程中产生的乙醇、丁醇等。脂双层分子是细胞与外部环境物质交换的屏障。脂双层分子的非极性使极性分子和电解质的跨膜传递过程需要消耗能量甚至需要蛋白质分子的主动运输，如葡萄糖、金属离子、有机酸等，而非电解质的小分子物质，如水、二氧化碳、氧气等，则可以自由通过。

2.1.1 细胞膜脂的多样性

脂肪是细胞的主要组成成分之一，脂酰甘油酯是动植物油酯的主要组分，而几乎所有的磷脂都集中在细胞膜中，细菌细胞膜以质量分数计算有 50% 以上为脂类物质。具有甘油分子骨架的极性甘油酯，包括磷酸甘油酯和糖苷甘油酯是细胞膜脂的基本组成成分。甘油是甘油酯的基本骨架，磷酸甘油酯是亲水性的磷酸极性头和亲脂性的两条脂肪酸酰基链由甘油分子连接而组成的两亲性分子。类似地，当糖基取代了极性的磷酸基团时就构成了糖苷甘油酯。极性磷脂/糖脂中磷脂酰基团的分子多样性使细胞膜脂的分子结构变得丰富多彩。

如图 2-1 所示，当甘油分子的第三个羟基是与磷酸分子相连时就构成甘油磷酸酯。在大部分情况下，磷酸分子以醚键或酯键与另一个亲水性的有机醇分子相连构成磷脂分子的极性头。磷脂分子常根据连接的有机醇分子不同而进行分类，如与胆碱相连构成磷脂酰胆碱（卵磷脂，phosphatidylcholine, PC），与乙醇胺相连构成磷脂酰乙醇胺（phosphatidylethanolamine, PE），与甘油相连构成磷脂酰甘油（phosphatidylglycerol, PG），甘油分子与两个磷酸分子相连时构成心磷脂（diphosphatidylglycerol, DPG）等。具有极性头的磷脂分子随所处环境 pH 的变化而改变其带电状况。当甘油分子的第三个羟基是与单糖或多糖分子以糖苷键相连时就构成糖苷甘油酯。甘油糖脂的极性头是非离子的单糖或多糖，如二葡萄糖苷甘油二酯（diglucosyldiglyceride, DGDG），单葡萄糖苷甘油二酯（monoglucosyldiglyceride, MGDG）等。



一般地, Gram⁺ 菌中脂肪酸链以直链和分支结构为主, 如 *Bacillus* 中 50% 以上的脂肪酸为分支结构, 而不饱和脂肪酸的分率相对较少。Gram⁻ 菌中缺少脂肪酸链的分支结构而含有大量的不饱和、饱和、环化脂肪酸链, 如 *Pseudomonas* 中存在大量的 C16:1^{Δ9} 和 C18:1^{Δ11}, 且在各自的双键位置上具有 *trans/cis* (反/顺) 结构的异构体。