

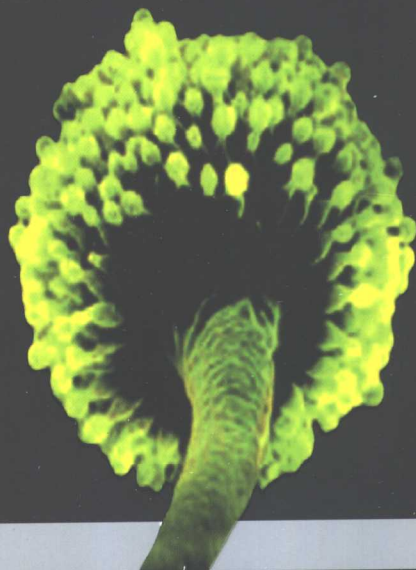


现代微生物技术丛书

微生物酶转化技术

宋欣 主编

Biotransformation



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

现代微生物技术丛书

微生物酶转化技术

宋 欣 主编

化 学 工 业 出 版 社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

微生物酶转化技术/宋欣主编. —北京: 化学工业出版社, 2004. 5

(现代微生物技术丛书)

ISBN 7-5025-5543-9

I. 微… II. 宋… III. 微生物-酶-转化
IV. Q936

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 036845 号

现代微生物技术丛书

微生物酶转化技术

宋欣 主编

责任编辑: 周旭孟嘉

文字编辑: 焦欣渝

责任校对: 顾淑云

封面设计: 潘峰

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 17 1/4 字数 302 千字

2004 年 6 月第 1 版 2004 年 6 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-5543-9/Q·97

定 价: 35.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

《现代微生物技术丛书》编委会

编委会主任 曲音波

编委会成员 (以姓氏汉语拼音为序)

高培基	山东大学微生物技术国家重点实验室	教授
吉爱国	山东大学威海分校海洋生物工程系	教授
孔 健	山东大学微生物技术国家重点实验室	教授
李越中	山东大学微生物技术国家重点实验室	教授
曲音波	山东大学微生物技术国家重点实验室	主任 教授
宋 欣	山东大学微生物技术国家重点实验室	副教授
汪天虹	山东大学微生物技术国家重点实验室	教授
肖 敏	山东大学微生物技术国家重点实验室	教授
许 平	山东大学微生物技术国家重点实验室	教授

本书编写人员

主 编 宋 欣

编 写 人 员 (以姓氏汉语拼音为序)

程显好 崔宏杰 吉爱国 刘珍珍
宋淑亮 宋 欣 张维灿 赵 越

序

生命科学和生物技术是 21 世纪科学技术发展的前沿学科。微生物技术作为其中的主要分支,是生命科学和生物技术发展的重要基础和先导。特别是在解决 21 世纪人类面临的人口健康、资源紧缺、环境污染、粮食危机、生态破坏等严峻挑战方面,微生物技术具有无可替代的重要作用。

其中,资源和环境问题是人类在 21 世纪面临的最主要的挑战。生物质资源是可再生性资源,地球上每年光合作用的产物高达 1500~2000 亿吨,是人类社会赖以生存的基本物质来源,其中 90%以上为木质纤维素类物质。目前这部分资源尚未得到充分的开发利用。随着世界人口迅速增长和矿产资源日渐枯竭,开发高效转化木质纤维素类可再生资源的微生物技术,利用工农业废弃物等发酵生产人类急需的燃料、饲料及化工产品,具有极其重要的意义和发展前景。微生物技术除在生物质资源开发方面大有作为外,在难开采矿产资源(如二次采油后的低产油井、低品位金属矿石和尾矿、海水中的重金属等)的开发、环境污染物(废水、废气和废渣)治理、清洁生产工艺(全封闭、无排放、低能耗工艺)研究、环境友好产品(生物可降解塑料、生物农药、生物肥料、氢能源等)研制等方面都有非常巨大的潜力。我国在纤维素微生物降解、化能自养细菌、石油降解微生物的基础研究,以及生物可降解塑料、生物农药生产等方面都有相当的研究和开发应用基础。随着国家对资源、环境、生态等问题的日益重视,可持续发展战略已被提到与科教兴国战略并列的重要位置。微生物技术工作者对此责无旁贷,有必要投入更多的人力物力,开展关系国计民生长远发展的战略性研究,同时培养和造就一大批优秀的微生物技术人才,为将来实现可持续发展做出应有的贡献。

微生物的应用研究对微生物菌株提出了众多的要求,单靠从自然界中筛选和对菌种随机诱变选育是难以实现上述目标的。研究和开发新的分子生物技术,有目的地改造乃至创造新的生物功能,是开发微生物应

用新技术的必要前提。中国开展基因工程等现代分子生物技术研究已有二十余年的历史，在极端嗜酸化能自养菌——氧化硫硫杆菌的基因转移系统构建和抗砷浸矿用工程菌选育等方面取得过处于国际领先地位的研究成果。近年来，通过加强国际交流与合作，逐步开展了酵母菌和丝状真菌的分子生物技术研究，包括酿酒酵母木糖发酵代谢工程菌构建、构建丝状真菌高效表达载体、利用定向进化技术提高酶的比活力或改善酶学性质（如耐碱、低温下高活性）等研究工作。今后的主要目标应是围绕生物质资源开发、环境污染治理等应用研究的需要，加强高效表达系统构建、代谢途径工程、蛋白质定向进化、高效筛选系统建立等方面的研究，既为技术研究提供优良的工程菌株，又为微生物菌株的分子生物技术改造探索新方法新思路。

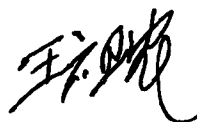
微生物技术的开发仅有优良的菌株还不够，还要研究如何使菌株的生产性能得以充分的发挥。传统的生物科学研究以观察描述为主要研究，酒精发酵和酿造工业虽然早已进入规模化生产，但现代工业技术的应用还较少。20 世纪 40 年代以来，抗生素和氨基酸工业的崛起，使化学工程技术应用于微生物的大规模培养，促进了现代工业微生物技术的建立。而以基因克隆为代表的分子生物学技术的建立进一步促进了生命科学技术快速发展，并在生物制药规模化生产中的应用初现端倪。随着越来越多的生化工程工作者参与到微生物技术的开发研究中来，数量生理学、代谢网络控制理论、代谢流量分布分析、生物过程动力学模型构建、模糊控制和神经网络控制、新型生物反应器开发等研究都得到了飞跃发展。中国逐步建立起了自己的生化工程研究队伍。通过同微生物学专业研究人员的紧密配合，这支年轻的研究队伍已逐步成熟起来，研究活动十分活跃。今后该方向应侧重于开展代谢过程调控的研究，应用代谢流分布分析和代谢网络控制理论，开展代谢系统工程研究，在提高发酵产品的产率 and 生产速率的同时，努力探索代谢调控的一般规律，为其他发酵工艺的开发提供理论指导。

微生物的生理代谢机能多种多样，目前发酵工业中得到应用的仅是其中一小部分，特别是微生物的次生代谢产物还很少被利用。近年来，基因工程、细胞工程、生化工程等技术的迅猛发展，为人们创造生物新机能，开发发酵新菌种、新工艺、新产品提供了新的可能。绿色化学的

兴起、可持续发展战略和循环型社会构建任务的提出，则使可再生性生物物质（能）的转化和利用得到高度重视和广泛应用。

本套丛书包括《微生物技术开发原理》、《微生物分子育种原理与技术》、《资源环境微生物技术》、《药物微生物技术》、《微生物酶转化技术》、《农业微生物技术》6个分册，均由在微生物技术国家重点实验室第一线研究者撰写。丛书概括了上述发展背景，从理论与实践相结合的角度，侧重介绍最新的研究进展和可能的应用技术，通俗易懂，可为广大生物、化学化工、农业及环境资源各学科和行业的工程技术人员参考。

期望本丛书的出版能为推动我国微生物技术的研究开发和产业化做出微薄的贡献。

A stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Wang Jie, the author of the preface.

2004 年 1 月

前 言

20 世纪后叶，科学技术以前所未有的速度迅速发展，信息技术、生物技术、材料技术、空间技术、激光技术等领域的新技术、新成果，异彩纷呈，令人目不暇接，同时还改变了我们的生活方式、行为方式和思维方式。当我们带着对日新月异的现代科技的感叹，疾步跨入 21 世纪的时候，人口膨胀、能源短缺和环境恶化等问题却仍然日益严重地困扰着我们。可持续发展已成为人们不得不认真考虑的首要问题。

在化学领域，绿色化学的观念、准则和方法日渐深入人心；在环境保护和治理方面，生物技术正在成为和必将成为主要的和最终的法宝；在医药领域，生物技术正悄悄地在从药物研究到药物生产、从药物类型到给药方式、从药学模式到医学模式等许多方面，进行着根本性的变革；在食品加工领域，生物来源的与人们日常生活密切相关的各种产品也正在逐步替代纯化学来源的产品，而成为未来发展的必然趋势；在能源领域，许多以生物物质为原料的清洁能源，如氢能、生物柴油等不断地被开发出来。

应用微生物酶或微生物细胞进行的合成技术被称为微生物转化，它们在迅猛发展的化合物的合成和转化方面扮演着越来越重要的角色，而且微生物转化技术普遍具有环境友好、作用条件温和等优势。此外，生物催化剂具有高度的选择性，包括化学选择性、区域选择性、对映体选择性和非对映体选择性等。尤其是其各种立体选择性，这是生物催化剂最突出的优点之一，近年来，手性化合物在医药、农用化学品等领域受到越来越多的重视。微生物酶具有的独特优势，将使得以生物催化剂为核心的生物合成和生物转化技术在未来的各类功能大分子的制备中独领风骚。传统化学合成法将会在某些领域部分或全部地被取代。

就其化学本质来说，生物催化剂是具有催化作用的蛋白质（酶）和核酸（核酶）等生物大分子。就其使用形式来说，生物催化剂可以是游离的或固定化的酶，也可以是游离或固定化的完整细胞或细胞器。

经过多年的发展，微生物技术和酶工程技术在发挥生物催化剂的优

点以及避免和克服其缺点方面取得了巨大的进步。例如，酶和细胞的固定化技术大大提高了生物催化剂的稳定性，为各类生物反应器的研制和工艺研究创造了有利条件；能够耐受各种极端环境的微生物和酶的开发，拓展了生物催化剂的来源和使用条件；各类膜生物反应器的研制和使用，提高了生物催化剂的利用率和工作效率，提高了补料、生物反应、辅因子再生、产物分离等技术单元的集成化；非水环境中生物催化剂的应用研究，大大地扩展了生物催化剂在有机合成领域中的应用范围。

微生物由于具有种类多、繁殖快、易培养、成本低等许多突出的优点而成为生物催化剂的主要来源和使用形式。微生物酶用作生物催化剂可以有游离酶、固定化酶、休止细胞、生长细胞等多种形式。不同的形式具有不同的特点和用途。

虽然生物催化剂的开发应用和生物合成与生物转化技术的发展已经取得了很大的成就，产生了广泛而深远的影响，但是从人们对它的期望及它潜在的巨大作用和目前实际产生的作用来看，这个领域的发展尚处在初级阶段。在基础研究、应用研究和生产实践的各个方面都有大量的和不断产生的难题等待着人们去克服。这是一个生物学、化学、药学、工程学等多学科交叉融合的领域，是一个需要更多的耐心和勤奋、更多的综合和创新能力的领域。

现代科技正在日新月异地全面发展，以微生物酶为主的生物合成和生物转化将得益于现代科技的春风雨露，在医药、农业、食品、环境保护和治理、精细化学品生产等领域展现出美妙的前景。

由于目前微生物酶转化技术的应用广泛，新技术、新方法不断出现，它已经逐渐发展成一门独立的学科，为了让读者全面地了解和把握微生物酶转化技术，本书尽力把近年来的微生物酶转化技术的研究进展及其在各个领域的主要应用展现出来。前三章主要介绍微生物酶转化技术的基础理论，第四章概括性地介绍微生物酶转化技术中的关键技术和前沿进展，第五章到第十章介绍几大类主要的微生物酶在各行业中具体的应用。

本书技术内容主要包括微生物酶的来源与筛选，微生物细胞和酶固定化技术，微生物酶催化的氧化还原反应，微生物脂肪酶在生物转化中

的应用，微生物环氧化物水解酶及其应用，中药和天然活性成分的微生物酶转化，微生物酶在其他诸多领域中的应用等。我们试图从以上几个方面系统地介绍微生物酶生物转化技术近年来的发展状况，为微生物酶生物转化技术的应用提供帮助。

本书共分十章，第一、四、六、九章由宋欣编写，第二章由吉爱国编写，第三章由程显好和赵越编写，第五章由刘珍珍和宋欣编写，第七章由崔宏杰编写，第八章由宋淑亮、吉爱国编写，第十章由张维灿编写。

本书在编写的过程中，得到了山东大学曲音波教授的指导和审阅，他对本书的编写提出了许多宝贵的意见和修改建议，保证了编写工作的顺利进行。并承蒙有关专家、教授的热情支持和帮助，在此表示感谢。山东大学生命学院的硕士刘巧、李建波、亓小宇、万广远承担了文稿核对等工作，在此也一并致谢。

微生物酶转化技术是一个崭新的研究领域，有关的理论和应用研究工作散布于众多中外文期刊、书籍中，涉及面极广，内容繁多。限于能力和资料来源有限，我们尚不能在较短的时间内收集和消化足够量的文献，而且也很难在一本书里囊括所有相关内容，书中难免挂一漏万，留下若干缺憾，真诚地欢迎读者批评指正。

编 者

2004 年 3 月

内 容 提 要

本书是《现代微生物技术丛书》中的一个分册。应用微生物酶或微生物细胞进行的合成技术被称为微生物转化技术，它在化合物合成和转化方面的作用越来越突出，其应用的领域亦不断扩大。

本书系统论述了微生物酶转化技术的理论基础、关键技术及其具体的应用，即反映新技术、新方法和新应用。其首先对微生物新酶的筛选、固定化等酶转化技术的基础进行了介绍，然后详细论述了微生物酶转化技术实际应用时一些特别重要的技术要点和难点，包括非水相和双水相体系、辅因子再生等热点，之后具体介绍了酶转化技术的具体应用，既包括微生物脂肪酶、环氧化物水解酶等重要酶种的应用，又涵盖了微生物酶在中药、抗生素、氨基酸等药物生产以及其他工业领域中的应用实例和进展。

本书在保证其体系完整的同时，相对同类图书更加注重技术的具体应用和要点，以提供给读者更多的应用思路 and 技巧。

本书可供从事生物转化、手性合成等研究的专业技术人员，以及医药、化工、食品、发酵等工业领域的技术人员参考，也可作为大专院校微生物、酶工程、生物技术等相关生命科学专业师生的教学参考书。

目 录

第一章 微生物与酶	1
第一节 微生物酶的产生和发展	1
一、酶的起源、发展和特点	1
二、微生物的特点	3
第二节 微生物酶的生产	4
一、酶的生产菌的筛选	4
二、工业上常用的产酶微生物	7
三、极端环境微生物和可培养微生物的新酶种	8
四、微生物酶的多样性	9
参考文献	10
第二章 新酶的筛选	11
第一节 概述	11
一、酶发现历史的回顾	11
二、生物催化反应对新酶筛选的挑战	12
三、工作流程	14
第二节 微生物酶的来源	14
一、从市场供应的酶库筛选	15
二、微生物培养物资源	16
三、从基因克隆库筛选	17
四、综合利用酶资源	18
第三节 酶的筛选	19
一、几个策略问题	19
二、不同的筛选方法	20
三、发现酶的其他途径	22
第四节 筛选实例：酯酶和脱氢酶	23
一、确定筛选准则	23

二、选择底物	24
三、备选物的分离和定性	26
四、生物催化剂发现和开发的新的快速筛选技术	27
参考文献	28
第三章 微生物细胞和酶固定化技术	30
第一节 微生物酶和细胞的固定化	31
一、固定化酶和固定化细胞的定义	31
二、固定化酶的制备方法	31
(一) 吸附法	32
(二) 包埋法	33
(三) 共价结合法	35
三、固定化酶新方法	38
四、多酶系统的固定化	39
五、固定化细胞的制备方法	40
第二节 酶的共固定化	42
一、辅因子的固定化	43
二、多酶系统的共固定化	45
三、固定化细胞	45
四、固定化酶和固定化细胞的比较	46
第三节 固定化载体和方法的比较与选择	47
一、固定化载体的比较与选择	47
(一) 有机高分子载体材料	47
(二) 无机载体材料	49
(三) 复合载体材料	49
(四) 其他新型载体材料	50
二、固定化方法的比较与选择	51
第四节 固定化酶和固定化细胞的性质	52
一、影响固定化酶和细胞的性质的因素	52
二、固定化后酶的性质变化	52
三、固定化细胞的性质	55

第五节 固定化酶和固定化细胞的形状与生物反应器	56
一、各种形状的固定化生物催化剂及其性质	56
二、生物反应器的类型和特点	56
三、选择生物反应器的依据	58
四、固定化生物催化剂的应用及发展趋势	60
(一) 固定化酶在制药工业上的应用	60
(二) 固定化酶和固定化细胞在医疗上的应用	61
(三) 固定化酶在食品、发酵工业中的应用	61
(四) 固定化细胞在环境保护中处理有机废水方面的 应用	62
(五) 利用固定化细胞生物反应器生产能源	64
(六) 固定化酶在仪器分析中的应用	65
参考文献	66
第四章 微生物酶应用技术	68
第一节 提高对映体选择性的方法	68
一、蛋白质工程方法	69
二、底物和培养基工程	71
三、制备固定化酶	72
四、溶剂系统的选择	72
五、其他方法	73
第二节 辅因子再生	75
一、烟酰胺类辅因子的再生	76
二、酶膜反应器中的辅酶和辅因子再生	80
三、烟酰胺类辅因子的保留	81
第三节 生物反应器	82
一、传统生物反应器	82
二、固定化酶反应器	84
三、酶膜反应器	84
(一) 酶膜反应器的分类	85
(二) 酶膜反应器的应用	86

第四节 非水介质中的生物催化反应	87
一、非水相反应体系的类型	88
二、非水介质中酶反应的特点	88
三、非水介质中影响酶活性的因素	88
四、非水介质在酶催化反应中的应用	90
第五节 双水相反应体系	91
一、双水相体系的特点	91
二、双水相体系的分类	92
三、双水相体系生物反应的影响因素	94
参考文献	97
第五章 微生物醇脱氢酶及其应用	101
第一节 醇脱氢酶的酶学特性及类型	102
一、醇脱氢酶的结构特点及分类	102
二、微生物醇脱氢酶	103
(一) 酵母和常温细菌醇脱氢酶	103
(二) 古细菌和嗜热菌醇脱氢酶	105
第二节 醇脱氢酶在手性合成中的应用	107
一、醇脱氢酶在合成手性伯醇中的应用	107
二、醇脱氢酶在合成手性仲醇中的应用	107
(一) 利用两种微生物合成手性仲醇	108
(二) 利用一种微生物合成手性仲醇	111
三、醇脱氢酶在合成其他手性药性中的应用	119
参考文献	120
第六章 微生物脂肪酶及其应用	123
第一节 概述	123
第二节 脂肪酶的筛选育种及生产	125
一、脂肪酶产生的培养条件优化	125
二、微生物产生的脂肪酶的类型	127
第三节 脂肪酶的酶学特性	127
一、脂肪酶的理化特性	127

二、脂肪酶的催化特性	128
第四节 脂肪酶的催化机制	129
一、活性中心的结构及氨基酸序列	129
二、脂肪酶的底物特异性	131
三、脂肪酶作用的抑制剂	133
(一) 脂肪酶抑制的动力学	133
(二) 可逆的非专一性抑制剂	134
(三) 可逆的专一性抑制剂	136
(四) 作用于活性位点的不可逆抑制剂	136
第五节 非水相介质中的脂肪酶催化	137
一、非水相反应特点	137
二、非水相反应体系类型	138
三、非水相催化的研究进展	142
第六节 脂肪酶的应用	143
一、在乳制品工业中的应用	143
二、在石油化学工业中的应用	143
三、在油脂改性中的应用	144
四、在去垢剂工业中的应用	145
五、在日用化学品合成中的应用	146
六、在手性合成中的应用	146
(一) 2-芳基丙酸类药物的拆分	148
(二) 合成其他的手性药物中间体	148
(三) 合成光学活性农药	148
七、脂肪酶应用新进展	150
参考文献	151
第七章 微生物环氧化物水解酶及其应用	155
第一节 概述	155
一、微生物环氧化物水解酶的特点	157
二、细菌产生的环氧化物水解酶	157
三、真菌产生的环氧化物水解酶	160

第二节 环氧化物水解酶产生菌的筛选	162
一、用于环氧化物水解酶筛选的底物	162
二、环氧化物水解酶的检测方法	164
三、酶源菌种培养和转化条件的选择	164
第三节 环氧化物水解酶的作用机理	165
一、环氧化物水解酶的作用机理	165
二、环氧化物水解酶的结构特点	167
第四节 环氧化物水解酶的应用	167
一、细菌环氧化物水解酶	168
二、真菌环氧化物水解酶	171
参考文献	178
第八章 微生物酶转化在中药研究中的应用	182
第一节 概述	182
第二节 微生物转化与中药现代化	183
一、中药现代化	183
二、我国中药生物技术的发展过程	185
三、微生物技术在中药研究中的作用	186
四、中药微生物技术研究今后发展方向	187
第三节 微生物转化在中药新药研究中的作用	188
一、微生物转化技术将成为提取天然活性成分的有效 途径	189
二、微生物转化为药物设计与结构修饰提供新工具	190
三、微生物转化技术与组合化学相结合为高通量药物 筛选提供捷径	191
四、酶工程是促进天然药物生产的更佳技术手段之一 ...	192
第四节 肠道菌群对中药有效成分的代谢作用	193
一、肠道菌群的代谢特征	194
二、研究概况	195
三、研究应用举例	196
参考文献	197