

工业生物技术译著系列

生物催化——基础与应用

Biocatalysis: Fundamentals and Applications

[德] 安德列亚斯 S. 博马留斯

Andreas S. Bommarius

贝蒂娜 R. 里贝尔 著

Bettina R. Riebel

孙志浩 许建和 译



化学工业出版社

工业生物技术译著系列

生 物 催 化

—— 基 础 与 应 用

Biocatalysis

Fundamentals and Applications

[德] 安德列亚斯 S. 博马留斯 贝蒂娜 R. 里贝尔 著

Andreas S. Bommarius Bettina R. Riebel

孙志浩 许建和 译



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

生物催化——基础与应用/[德]博马留斯(Bommarius, A. S.), 里贝尔(Riebel, B. R.)著; 孙志浩, 许建和译. —北京: 化学工业出版社, 2006. 2

(工业生物技术译著系列)

书名原文: Biocatalysis: Fundamentals and Applications

ISBN 7-5025-8279-7

I. 生… II. ①博…②里…③孙…④许… III. 生物催化 IV. Q814

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 011859 号

Biocatalysis: Fundamentals and Applications/by Andreas S. Bommarius, Bettina R. Riebel

ISBN 3-527-30344-8

Copyright © 2004 by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

本书中文简体字版由 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2005-0866

工业生物技术译著系列

生物催化

——基础与应用

[德] 安德列亚斯 S. 博马留斯 贝蒂娜 R. 里贝尔 著

孙志浩 许建和 译

责任编辑: 李晓红 梁 虹

责任校对: 王素芹

封面设计: 潘 峰

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

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

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市万龙印装有限责任公司装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 32 字数 650 千字

2006 年 5 月第 1 版 2006 年 5 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8279-7

定 价: 68.00 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

《工业生物技术译著系列》前言

生物技术在 20 世纪 80 年代与 90 年代分别为生物医药与农业带来了革命性的飞跃。以生物催化与生物转化为主要内容的工业生物技术，被视为生物技术的第三次重大应用，已成为发达国家的重要科技与产业发展战略。我国在政府和同行专家的大力支持下于 2003 年批准了第一个生物催化和生物转化的国家 973 项目。在该 973 项目的组织过程中，我们首先注意到了一本由德国几位著名专家编写的《Industrial Biotransformations》。该书是迄今为止世界上第一部汇集工业生物转化过程的权威著作。因此，着手翻译了这本书，以供 973 项目组内部使用，并在化学工业出版社的建议和支持下于 2005 年 8 月公开出版该书。在此期间，我们又陆续看到国外出版的一些非常好的工业生物技术图书（主要是 Wiley 出版社），逐步产生了做一个《工业生物技术译著系列》的想法，以介绍国外该领域的工作经验和最新进展，为我国的工业生物技术的发展做些贡献。

《工业生物技术译著系列》得到了杨胜利院士和同行们的大力支持。该系列丛书由化学工业出版社出版。我们非常欢迎国内外同行推荐该领域的好书。原版书出版社不限于 Wiley。原则上，选择这些书的条件是：内容符合工业生物技术、水平较高、互相之间没有太多重叠、有较宽泛的读者群。

杨胜利

傅幸珍

2005 年 8 月 28 日

序

我们很高兴能够为《生物催化——基础与应用》的中文版作序。该书的中文版是它的第一个外文版本，我们的兴奋不亚于其原版在 Wiley-VCH 的出版。我们很骄傲地看到中国的学者、学生和从业者能够读到该书的中文版本。中国不仅是地球上人口最多的国家，而且也拥有古老文明和现代科学的发展。

两年前本书的英文原版中关于生物催化状况的描述在现在看来依然很确切。生物催化是一个跨学科的领域，主要由化学、生物和工程等学科构成，反过来也向这些学科提供新发现和新观点。随着生物和计算的发展，以及在各种应用（包括从利用可再生非石油原料的环境友好生产到能够治疗越来越多疾病的光学纯药物）的推动下，生物催化领域的发展已经到达了一个突破点。

我们希望本书的中文版能够和原版一样推动生物催化的发展和实现。愿读者喜爱本书并从中获得他（她）自己的有关生物催化的观点。

Andreas Bommarius

Bettina Riebel

于美国佐治亚州，亚特兰大，2005 年 12 月

译者序

生物催化是一个由化学、生物学和过程工程学等多学科交叉的研究领域。生物催化技术与产业实践表明，它将传统的化学化工原理与现代生物技术完美地融为一体，具有条件温和、高效专一、环境友好等鲜明特征。生物催化技术已被看作是对传统生物发酵与化学化工产业改造极为重要的、很有吸引力的技术之一，它向精细化学品、大宗化学品、能源、材料等领域的渗透日趋明显，并将担当起实现绿色生物制造和有效解决资源环境问题的重要责任。同时，成功的生物催化技术应用也已产生显著的经济效益和社会效益。生物催化和转化已成为世界各大公司竞相追逐与研发的热点之一，生物催化技术被认为是工业可持续发展最有希望的技术。以可再生生物资源为原料，微生物或酶为生物催化剂进行物质转化和合成，大规模生产人类所需的物质，是解决人类目前面临的健康、环境及资源、能源危机的有效手段之一，已引起了人们广泛的兴趣和很高的期望。美国国家研究委员会预测，到2020年，将有50%的有机化学品和材料产自生物质，而生物制造将起核心作用。

在最近十多年间，生命科学，尤其是生物技术、生物催化发展极为迅猛，日新月异。这不仅表现在研究内容的深入与拓宽，而且在概念上也有相应的更替和创新，即使美国等发达国家的研究人员与学生，也深感生物催化的跨学科和覆盖面广的特点，深感他们缺少一本完整体系的教科书。

《生物催化——基础与应用》(Biocatalysis Fundamentals and Applications)，是美国2004年出版的一本专著，主要内容既包括了与生物催化相关的反应、产品与过程，还详细涉及生物催化剂的特性与筛选，生物催化的分子生物学工具，分子定向进化，蛋白质工程，酶反应工程，非传统介质中的生物催化，生物催化过程设计，生物催化在化工、轻工、制药中的应用等，几乎涵盖了从基本概念、理论基础、实践应用以及未来前景等生物催化领域的全部内容。

本书分为三个部分：第一部分包括第1~7章，主要是讲述与生物催化相关的基本知识，但提供了一些新的观点；第二部分包括第8~14章，详述一些深入的生物催化的“高级”概念和工具；第三部分为第15~20章，论述以上章节中各种知识的应用，不仅包括生物催化的工业规模应用，而且也包括生物催化技术中新的知识前沿。

该书内容新，知识面广，而且有相当的深度，充分反映了世界发展动态，体现了新兴生物催化领域的当前最高水平。该书的出版为世界各国从事生物催化研究与教学的科研人员、教师、学生，提供了一本很好的参考书和教科书，促进了新兴生

物催化领域的发展,受到业界同行的欢迎。

近年来,随着世界生物技术的第三次浪潮,市场经济的发展和生物催化产业的兴起,我国生物催化领域的研究、开发和应用也非常热门,而对科研人员真正有参考价值的书却很难找到,更缺乏相应的教材。国内一些高校相关专业的研究生和高年级本科生已经开设了“生物催化”或类似的课程,一般以原版专著、综述、研究论文为参考资料,国内缺少有关“生物催化”领域的基础理论、反应原理及应用以及关于该领域发展动态、最新进展的教科书。

本书主要由江南大学生物工程学院生物催化研究室与华东理工大学生物工程学院生物催化研究室合作翻译。他们是国内较早建立的专业从事生物催化研究与教学的研究室,有多年的经验与丰富的专业知识,也承担过一些与生物催化相关的国家自然科学基金、973计划、863计划及国家攻关课题,取得一些成果,在国内外有一定影响。负责翻译的是这两个研究室的主任孙志浩教授、许建和教授。翻译过程中江南大学与华东理工大学生物催化研究室的老师和学生们,特别是胡中桥、郑璞、徐毅、潘江等老师以及博士生赵丽菁、柳志强、何军邀、刘宇鹏,硕士生冷咏、俞洪峰、郑丽蓉、韩丽、朱蕾蕾、钱嘉南等协助本书的翻译、整理、校对等工作。

十分荣幸的是本书翻译得到国内外同行专家的帮助,特别要感谢的是美国弗吉尼亚大学(Virginia Commonwealth University)倪晔博士,她对全书的大部分章节进行了认真校改,并负责翻译了原作者为中译本所作的序。还要诚挚地感谢山东大学的曲音波教授、吉林大学的冯雁教授、中国科学院上海植物生理生态所杨晟博士、中国林业科学研究院林产化学工业研究所(南京林化所)沈兆邦研究员、中国农业科学院张伟博士、华东理工大学的储炬教授、杭海峰博士、江南大学的史仲平教授、郑志永博士、严群博士等,他们在百忙之中抽出很多时间对本书相关专业的章节进行了认真的、一丝不苟的审改,提出了不少非常有见地的、宝贵的意见,使本书的翻译质量得以进一步提高。

特别感谢原著作者欣然为本中译本作序,为本书增光添色。感谢化工出版社的各位编辑,是他们的鼓励和帮助才使本书能顺利问世。

本书要感谢国家重点基础研究发展计划(973计划)“生物催化和生物转化中关键问题的基础研究”《非水相不对称生物催化》项目(2003CB716008)与国家自然科学基金“生物催化不对称还原合成的关键科学技术问题”项目(0476039)的资助,还要感谢众多关心和支持本书出版的业内同仁与朋友们。

由于译者水平有限,加上原著涉及的学科内容广、专业面宽、知识前沿,书中不妥之处敬请专家同仁和广大读者批评指正。

孙志浩 许建和

2006年1月

前言

生物催化领域正处在十字路口。一方面，研究的前沿受到数据库支持的序列结构分析和基因蛋白质设计的发展而跑在前面。而且，生物催化剂的“设计规则”已经由起初的模糊图像变得清晰得多。另一方面，来自于其他领域经验丰富的研究者和越来越多的学生进入此领域，获取生物催化的知识来推进自己的事业。但是，他们都发现这个快速发展的领域缺乏研究一线的指导和导向原理的构架。在这种情况下，希望本书能填补在研究一线与一些基础课程，像生物化学，有机合成，分子生物学，动力学和反应工程学之间的缺口。学生和研究者常常都是独自搭建基础课本和原始研究文章之间的桥梁；本书试图覆盖这一中间领域。

本书的另一个挑战是努力展现生物催化领域跨学科成果。生物催化是化学、生物学、化学工程学和生物工程学的结合，但大多数学生和研究者进入这个领域时都只限于掌握一种或最多两种相关方面的知识。然而，生物催化和目前的大多数研究基本都是属于各个领域之间跨学科交叠的内容。因此，希望本书能帮助读者将他们先前的知识和本书中的内容和方法结合，形成一个完整体系。

本书分为三个部分：

- 第1~7章包括基本工具。很多读者可能以前已经接触过一些章节的有关内容，但是，我们希望能提供一些与时俱进和新鲜的观点。

- 第8~14章详述高级工具。虽然为了跟上生物催化发展掌握这些高级概念是必不可少的，但并不是所有该领域的研究者都必须掌握这些概念和工具，特别是当他们的研究课题与那些概念毫不相关时。

- 第15~20章论述以上章节中各种工具的应用。这里的“应用”不仅包括生物催化的工业规模应用，而且也包括生物学催化中新的知识前沿，它可能用现有技术，如迅速扩大的DNA数据库，或对许多酶全面覆盖的三维结构分析。

在本书前部分的几章中，相当清楚地强调了化学，生物学或化学工程学。如关于微生物分离（第3章）、分子生物学工具（第4章）、蛋白质工程（第10章）、定向进化（第11章）的章节偏向于生物学。关于酶作为产品的应用（第6章）、大宗或精细化学品（第7章）、制药（第13章）的章节中，其主题是化学。以化学工程概念为主的包括生物催化工程（第5章）和酶生产过程（第8章）。其他章节则从生物化学/酶学或信息学角度提出了看法，如生物催化剂的特点（第2章）、蛋白质研究方法（第9章）、生物信息学（第14章）。

最后，介绍一下写这本书的过程：本工作的想法最初是由作者之一（A. S. B.）在任讲师期间提出的，当时他在德国 Degussa 公司（Wolfgang, Germany）工作，

他在亚琛 Rheinisch-Westfälische 技术学院 (Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, RWTH) 担任了 9 年的兼职教员。每一次教学中他都发现, 学生们很乐于接受生物催化跨学科和覆盖面广的特点, 但是他们缺少那些他们各自专业没有提供的基本知识, 比如化学、生物学、或者化学工程学。在美国亚特兰大佐治亚工学院 (Georgia Institute of Technology) 讲授生物催化或相关课程时也有类似情况出现。本书的目的之一是使读者重新获得经常遗忘的科学基础知识, 使他们能发现和得到从多角度理解自然的快乐。虽然科学基础理论可以给人带来很大的满足, 但是在日常生活中有影响的 application 也很重要。今天人类面临的两个最大的挑战 (并不是工业社会所特有的) 是维护、改善人类健康和维护、改善环境。生物催化辅助实现的第一个目标, 是通过其选择性进行复杂药用活性分子的生产, 第二个目标是开发基础或功能性化学品生产的新技术路线, 使达到持续发展的目的。

我们希望你能够喜欢这本书。我们欢迎你与我们联系, 表达你对这本书的意见、不满和鼓励, 进行讨论, 指出错误和含糊的地方, 提出改进建议或者让我们知道你的想法。最简单的方式是通过 email 与我们联系。

我们的 email 地址是: bommariu @ bellsouth. net; andreas. bommarius @ alum. mit. edu。

祝你们阅读愉快。

Andreas S. Bommarius & Bettina R. Riebel

于美国佐治亚州亚特兰大市

2003 年 12 月

目 录

1 生物催化绪论	1
1.1 21 世纪初的生物催化概况	2
1.1.1 生物催化的接受程度	2
1.1.2 生物催化的优缺点	3
1.1.2.1 生物催化剂的优点	3
1.1.2.2 生物催化剂的缺点	4
1.2 生物催化技术的特点	5
1.2.1 相关学科和应用领域	5
1.2.2 生物催化转化的特点	5
1.2.2.1 生物催化与其他催化的比较	6
1.2.3 生物催化的工业应用	7
1.2.3.1 未来的化学工业：环境友好、绿色化学、可持续发展	7
1.2.3.2 对映体纯药物或药物中间体（APIs）	8
1.3 生物催化的发展由来	8
1.3.1 酶催化的历史	8
1.3.2 生物催化技术的现状	9
1.4 生物催化的学科范畴	10
1.4.1 酶的命名	10
1.4.2 生物催化与有机化学	11
2 生物催化剂的特点	15
2.1 酶催化的特点	16
2.1.1 酶基本知识：什么是酶催化？	16
2.1.1.1 酶反应的反应坐标图	16
2.1.2 酶结合和催化动力学的发展	17
2.2 酶作为催化剂活性的起源及理由	18
2.2.1 关于酶活性最重要理论的年表	18
2.2.2 酶活的由来：Kurz 方程的推导	19
2.2.3 Kurz 方程的推论	20
2.2.4 酶催化的有效性：超出 Pauling 假设的部分	22
2.3 催化剂、工艺和工艺路线的性能指标	23
2.3.1 催化剂的性能指标：活性、选择性和稳定性	23
2.3.1.1 活性	24

2.3.1.2 选择性	24
2.3.1.3 稳定性	25
2.3.2 工艺性能指标	25
2.3.2.1 产品收率	26
2.3.2.2 生物催化剂生产率	26
2.3.2.3 生物催化剂的稳定性	27
2.3.2.4 反应器的生产能力	27
2.3.3 酶反应参数之间的关系	28
2.3.3.1 速率加快程度	28
2.3.3.2 催化速率常数 k_{cat} 和失活速率常数 k_d 的比值	29
2.3.3.3 失活速率常数 k_d 和总转换数 TTN 之间的关系	29
2.3.4 工艺、原子经济和环境熵的性能评价标准	30
3 微生物的分离与制备	35
3.1 引言	35
3.2 新酶的筛选	37
3.2.1 自然生长速度	37
3.2.2 微生物生态学的方法	38
3.3 菌种开发	38
3.3.1 微生物生产的工业产品	39
3.3.2 菌种改良	40
3.4 极端微生物	41
3.4.1 工业用极端微生物	42
3.5 生物催化剂的快速筛选	43
4 生物催化中的分子生物学工具	48
4.1 分子生物学基础：蛋白质水平与 DNA 水平	49
4.2 DNA 的分离和纯化	51
4.2.1 DNA/RNA 的定量	52
4.3 基因的分离、检测和确认	52
4.3.1 聚合酶链反应 (PCR)	53
4.3.2 PCR 反应的优化	53
4.3.3 特殊 PCR 技术	55
4.3.3.1 嵌套 PCR 技术	55
4.3.3.2 反向 PCR 技术	56
4.3.3.3 RACE: cDNA 末端的快速扩增	56
4.3.4 Southern 杂交	57
4.3.4.1 探针的设计和标记	58
4.3.4.2 杂交	59
4.3.4.3 检测	60

4.3.5 DNA 测序	60
4.4 克隆技术	60
4.4.1 限制性酶切图谱	61
4.4.2 载体	61
4.4.3 连接	63
4.5 宿主菌中酶的过量表达	64
4.5.1 表达系统的选择	64
4.5.2 大肠杆菌中基因的翻译和密码子偏好	64
4.5.3 载体的选择	65
4.5.3.1 包涵体的形成	66
4.5.3.2 融合蛋白的表达	67
4.5.3.3 表面表达	67
4.5.4 真核基因在酵母中的表达	68
5 酶反应工程	71
5.1 动力学模型：基本原理和目标	71
5.2 理想状态：理想动力学和理想反应器	73
5.2.1 经典案例：米氏方程	73
5.2.2 理想反应器的设计	74
5.2.3 理想反应器中的积分式米氏方程	75
5.2.3.1 案例 1：无抑制	75
5.3 存在不利性结合的酶：抑制作用	76
5.3.1 抑制剂的种类	76
5.3.2 底物和产物抑制的积分式米氏方程	76
5.3.2.1 案例 2：存在底物抑制剂的积分式米氏方程	77
5.3.2.2 案例 3：存在抑制剂的积分式米氏方程	77
5.3.3 $K_i - [I]_{50}$ 的关系：机理性理解的另一个应用	80
5.4 反应器工程	81
5.4.1 酶反应器的构型	81
5.4.1.1 反应器设计的无因次特征参数	83
5.4.2 固定化酶反应器（活塞流固定床反应器）	84
5.4.2.1 反应器设计方程	84
5.4.2.2 固定化	84
5.4.2.3 固定化反应器的最优条件	85
5.4.3 膜式酶反应器（连续搅拌罐反应器，CSTR）	85
5.4.3.1 设计方程式：反应器方程与停留时间	85
5.4.3.2 膜式酶反应器的分类	86
5.4.4 反应参数和反应器的选择原则	87
5.5 不完全质量传递的酶反应：固定化的影响	88

5.5.1 外部扩散(膜扩散)	88
5.5.2 内部扩散(孔扩散)	88
5.5.3 测定质量传递限制的方法	90
5.5.4 质量传递对反应参数的影响	91
5.6 不完全稳定的酶:失活动力学	92
5.6.1 静态稳定性	92
5.6.2 操作稳定性	93
5.6.3 静态稳定性与操作稳定性的比较	94
5.6.4 针对连续反应器中酶失活而添加新鲜酶的策略	95
5.7 具有不完全选择性的酶: E 值及其优化	97
5.7.1 E 值的推导	97
5.7.2 通过转化率选择来优化消旋体拆分	98
5.7.2.1 不可逆反应的优化	98
5.7.2.2 平衡反应的对映选择性	99
5.7.2.3 从转化-时间图确定对映体纯度	100
5.7.3 通过温度选择优化对映体选择率 E	100
5.7.3.1 等转化温度的推导	100
5.7.3.2 通过温度选择优化对映选择性的例子	100
6 酶作为大宗活性物质的应用	104
6.1 酶在衣用洗涤剂中的应用	104
6.1.1 概述	104
6.1.2 去除血渍和蛋渍的蛋白酶	106
6.1.3 去除油渍的脂肪酶	107
6.1.4 去除草渍和淀粉渍的淀粉酶	107
6.1.5 纤维素酶	107
6.1.6 漂白酶	107
6.2 酶在纺织工业中的应用:石洗粗斜纹棉布和抛光棉布表面	108
6.2.1 纺织工业用酶制剂及其作用方式	108
6.2.2 纤维素酶:使表观更光洁	109
6.2.3 石洗:牛仔布的生物石洗——返旧外表	110
6.2.4 过氧化物酶	110
6.3 酶在纸浆和造纸工业中的应用:用木聚糖酶或漆酶漂白纸浆	111
6.3.1 概述	111
6.3.2 木材	112
6.3.2.1 纤维素	112
6.3.2.2 半纤维素	113
6.3.2.3 木质素	113
6.3.3 造纸:硫酸盐制浆	114

6.3.4 纸浆和造纸工业中酶的研究	115
6.3.4.1 漆酶	115
6.3.4.2 木聚糖酶	116
6.3.4.3 造纸过程中的纤维素酶	116
6.4 用于动物饲料的植酸酶：磷的利用	116
6.4.1 畜牧业和环境	116
6.4.2 植酸酶	117
6.4.3 植酸酶的作用：磷的减少	118
6.4.4 植酸酶的作用：对其他营养物的作用	119
7 酶作为催化剂的应用	122
7.1 酶作为基础化学品工业催化剂	123
7.1.1 腈水合酶	123
7.1.1.1 由丙烯腈制备丙烯酰胺	123
7.1.1.2 由 3-氰基吡啶制备烟酰胺	124
7.1.1.3 由己二腈制备 5-氰基戊酰胺	124
7.1.2 腈水解酶：由 2-甲基戊二腈制备 1,5-二甲基-2-哌啶酮	125
7.1.3 甲苯双加氧酶：由顺式二氢二醇制备靛蓝或前列腺素	125
7.1.4 醇腈酶（羟腈裂解酶，HNL）：由醛制备氰醇	128
7.2 酶作为精细化学品工业催化剂	129
7.2.1 手性、Cahn-Ingold-Prelog 与 Pfeiffer 规则	130
7.2.2 对映异构纯氨基酸	131
7.2.2.1 氨基酸酰化酶	131
7.2.2.2 酰胺酶	133
7.2.2.3 海因酶/氨甲酰酶	134
7.2.2.4 酮酸的还原性胺化（以 L-叔亮氨酸为例）	135
7.2.2.5 天门冬氨酸酶	137
7.2.2.6 L-天门冬氨酸- β -脱羧酶	138
7.2.2.7 L-2-氨基丁酸	138
7.2.3 对映异构纯的羟基酸、醇和胺类	139
7.2.3.1 富马酸酶	139
7.2.3.2 用脂肪酶合成对映异构纯胺	139
7.2.3.3 通过转氨作用合成对映异构纯胺	139
7.2.3.4 用羰基还原酶制备羟基酯	140
7.2.3.5 醇类和醇脱氢酶（ADH）	141
7.3 酶作为食品工业催化剂	142
7.3.1 高果糖浆（HFCS）和葡萄糖异构酶（GI）	142
7.3.2 阿斯巴甜：通过酶法合成的非天然肽类甜味剂	143
7.3.3 乳糖水解	146

7.3.4 “营养素”: L-肉碱作为运动员营养和精力恢复剂	146
7.3.5 脱羧酶改善啤酒风味	148
7.4 酶作为催化剂用于农作物保护化学品的合成	148
7.4.1 除草剂中间体: (R)-2-(4-羟基苯氧基)丙酸 (HPOPS)	148
7.4.2 转氨酶在生产农作物保护剂中的应用	149
7.5 酶在大规模生产医药中间体中的应用	150
7.5.1 青霉素 G (或 V) 酰胺酶 (PGA, PVA): β 内酰胺前体, 半合成的 β 内酰胺	150
7.5.2 麻黄素	152
8 酶制造的生物技术加工步骤	162
8.1 蛋白质的分离和纯化简介	162
8.2 发酵基础	164
8.2.1 培养基	164
8.2.2 灭菌	165
8.2.3 发酵周期	165
8.2.4 发酵模型	166
8.2.5 生长模型	166
8.2.6 补料分批培养	167
8.3 发酵及其主要难题: 氧的传递	168
8.3.1 细胞需氧量的确定	168
8.3.2 发酵液中氧传递的计算	169
8.3.3 k_L , a 和 $k_L a$ 的确定	170
8.3.3.1 体积传氧系数 $k_L a$ 的测定方法	170
8.4 下游加工: 蛋白质的粗纯化	171
8.4.1 分离 (离心)	171
8.4.2 匀浆破壁	173
8.4.3 沉淀	173
8.4.3.1 用水溶性有机溶剂进行沉淀	175
8.4.3.2 为 Hofmeister 系列与 Cohn-Edsall 和 Setschenow 方程建立定量模型	175
8.4.4 两水相萃取	176
8.5 下游加工: 蛋白质的浓缩和纯化	177
8.5.1 透析 (超滤)	177
8.5.2 色谱	178
8.5.2.1 色谱理论	179
8.5.2.2 色谱类型	180
8.5.3 干燥: 喷雾干燥、冷冻干燥, 储存稳定性	181
8.6 生物催化剂纯化的例子	181
8.6.1 例 1: 醇脱氢酶 [来自 <i>L. brevis</i> 的 (R)-ADH (Riebel, 1997)]	181

8.6.2 例2: 来自 <i>Rhodococcus opacus</i> 的 L-氨基酸氧化酶 (Geueke 2002a, b)	182
8.6.3 例3: 来自耐热厌氧菌 JW/SL-YS489 的木糖异构酶	183
9 蛋白质研究方法	187
9.1 酶机制的相关性	188
9.2 研究酶机制的实验方法	188
9.2.1 产物的分布 (Curtin-Hammett 法则)	188
9.2.2 酶动力学的稳态方法	189
9.2.3 线性自由焓关系 (LFERs): Brønsted 和 Hammett 效应	190
9.2.4 动力学同位素效应	191
9.2.5 酶动力学的非稳态方法: 活性部位滴定	192
9.2.5.1 确定活性部位浓度	192
9.2.6 酶反应机制的应用: 过渡态类似物抑制剂	192
9.3 酶测定方法	194
9.3.1 蛋白质定量	194
9.3.2 等电点的测定	195
9.3.3 蛋白质单体分子质量的测定: SDS-PAGE	195
9.3.4 寡聚体蛋白质的质量: 排阻凝胶色谱 (SEC)	196
9.3.5 分子量的测定: 质谱法 (MS)	197
9.3.6 氨基酸序列测定: 胰蛋白酶降解法或酸、化学、酶消化法	198
9.4 酶学机制: 广义的酸-碱催化	198
9.4.1 碳酸酐酶 II	198
9.4.2 含钒卤过氧化物酶	200
9.5 亲核催化	201
9.5.1 丝氨酸蛋白酶	201
9.5.2 半胱氨酸的亲核进攻	204
9.5.3 脂肪酶, 另一催化三元体机制	204
9.5.4 金属蛋白酶	206
9.6 亲电催化	207
9.6.1 金属离子的利用: ADH, 一种不同的催化三元体	207
9.6.1.1 一种中长链醇脱氢酶 (马肝醇脱氢酶) 的催化机制	207
9.6.1.2 一种短链脱氢酶, 果蝇 ADH 的催化反应机制	208
9.6.2 席夫碱的生成, 第一部分: 乙酰乙酸脱羧酶, 醛缩酶	211
9.6.3 带有磷酸吡哆醛 (PLP) 席夫碱的生成: 丙氨酸消旋酶, 氨基转移酶	211
9.6.4 焦磷酸硫胺素 (TPP) 的利用: 转酮酶	212
10 蛋白质工程	218
10.1 简介: 蛋白质工程的要素	218
10.2 蛋白质工程的方法	219

10.2.1	融合 PCR	220
10.2.2	Kunkel 方法	221
10.2.3	用 Stratagene 的 QuikChange 试剂盒进行位点特异性突变	222
10.2.4	组合链式反应 (CCR)	223
10.3	葡萄糖 (木糖) 异构酶 (GI) 与葡萄糖淀粉酶: 耐热稳定性的提高	224
10.3.1	葡萄糖异构酶 (GI) 热稳定性的提高	224
10.3.2	葡萄糖异构酶 (GI) 的反应机理: 扩散限制性葡萄糖异构酶?	227
10.4	提高蛋白酶的抗氧化和抗热失活稳定性	228
10.4.1	枯草杆菌蛋白酶氧化稳定性的提高	228
10.4.2	枯草杆菌蛋白酶的热稳定性	230
10.5	用蛋白质工程创造新酶	230
10.5.1	乳酸脱氢酶的重新设计	230
10.5.2	过氧化酶的人工合成	231
10.6	改变脱氢酶的辅因子专一性	232
10.7	氧化酶	234
10.8	用定点突变改变对映异构选择性	235
10.9	不同蛋白质工程技术的结合	236
10.9.1	化学修饰突变体, 化学修饰与蛋白质工程的结合	236
10.9.2	用蛋白质工程与定向进化扩大底物专一性	237
11	重组 DNA 技术的应用: 定向进化	242
11.1	蛋白质进化的背景	243
11.1.1	定向进化的目的	243
11.1.2	进化和可能性	244
11.1.3	进化: 保持基本的结构成分	245
11.2	定向进化的步骤: 产生多样性和检验目标物	246
11.2.1	DNA 文库中产生多样性	247
11.2.2	阳性目的物检出: 筛选与选择	249
11.3	定向进化实验操作指南	249
11.3.1	产生多样性: 诱变方法	249
11.3.2	产生多样性: 重组方法	250
11.3.2.1	DNA 改组 (DNA Shuffling)	250
11.3.2.2	交错延伸过程 (StEP)	250
11.3.2.3	瞬时模板随机嵌合技术 (RACHITT)	251
11.3.3	目的物的检出: 筛选方法	252
11.3.4	目的物的检出: 选择过程	253
11.3.5	定向进化的其他技术	253
11.4	定向进化应用的成功例子	254
11.4.1	易错 PCR 的应用: 在 DMF 中枯草杆菌蛋白酶的活性	254