



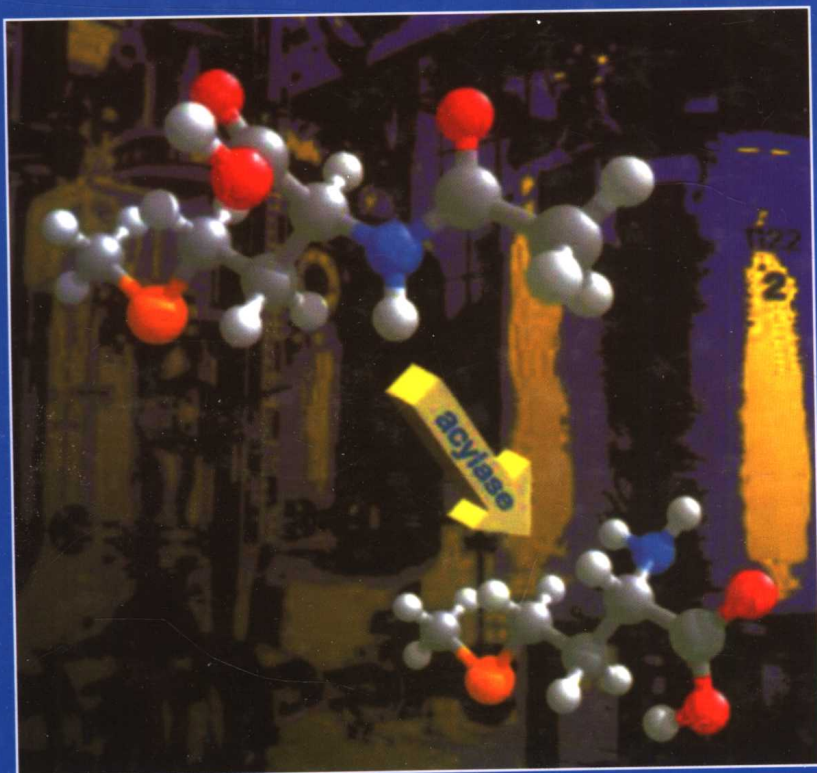
国外优秀科技著作出版专项基金资助

工业生物转化过程

Industrial Biotransformations

[德] 安吉斯·李斯 卡斯滕·希尔贝克 克里斯汀·温椎 著
A. Liese K. Seelbach C. Wandrey

欧阳平凯 南京工业大学 译
林章凛 清华大学



化学工业出版社



国外优秀科技著作出版专项基金资助

83

工业生物转化过程

[德] 安吉斯·李斯 卡斯滕·希尔贝克 克里斯汀·温椎 著
A. Liese K. Seelbach C. Wandrey

欧阳平凯 南京工业大学
林章凜 清华大学 译



化学工业出版社

·北京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

工业生物转化过程/[德]李斯(Liese, A.)等著;欧阳平凯,林章凛译.——北京:化学工业出版社,2005.5

书名原文:Industrial Biotransformations

ISBN 7-5025-6990-1

I. 工… II. ①李…②欧…③林… III. 生物工程 IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 038517 号

Industrial Biotransformations/by Andreas Liese, Karsten Seelbach, Christian Wandrey.

ISBN 3-527-30094-5

Copyright©2000 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. kGaA, Weinheim. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. kGaA, Weinheim.

本书中文简体字版由 Wiley-VCH 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:01-2004-6126

工业生物转化过程

安吉斯·李斯

[德] 卡斯滕·希尔贝克 著

克里斯汀·温椎

欧阳平凯 南京工业大学 译

林章凛 清华大学

责任编辑:赵玉清

· 责任校对:郑捷

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

三河市前程装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 26 $\frac{1}{4}$ 字数 513 千字

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6990-1

定 价: 78.00 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

译 序

生物催化和生物转化是利用生物体系如细胞或酶作为催化剂实现物质转化的途径。人类利用生物催化和转化进行物质加工的实践具有悠久的历史。公元前，人类就已经利用天然的微生物（酶）生产奶酪和酒。进入工业革命时代之后，人们开始对天然微生物进行筛选和诱变，生产某些简单的代谢物，如氨基酸、有机酸和维生素。20世纪60年代开始进入到若干大宗化学品和精细化学品的生产，但应用范围仍比较狭窄。进入21世纪后，化石资源与能源的短缺和对环境的关注促进了生物催化和转化的重新崛起。同时，微生物多样性的研究，基因组学、基因工程、代谢工程的快速发展，以及现代过程工程原理和手段对生物催化和转化领域的渗透，为人类利用生物酶和合成途径来生产化学品创造了前所未有的机会。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，将是生物技术的第三次重大应用。

生物催化与生物转化研究已成为发达国家的重要科技与产业发展战略。欧美日本已不同程度制定出了在今后几十年内用生物过程取代化学过程的战略计划。OECD提出：“生物催化技术是工业可持续发展最有希望的技术”。美国的一份政府资助的报告则提出，到2020年通过生物催化技术实现化学工业的原料、水资源及能量的消耗降低30%，污染物排放和污染扩散减少30%。这将对包括传统化学工业、医药工业及农业在内的各产业带来极其深远的影响。美国能源部2002年开始大规模资助微生物网络的应用基础研究。生物催化和转化也已成为国外著名生物技术公司以及化学品公司（尤其是欧洲公司）的争夺热点。我国则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973项目的组织过程中，我们注意到了这本由德国的几位著名专家编写的“*industrial biotransformations*”。国际上，生物催化和生物转化的应用研究大多是在以赢利为目的的公司里进行的。传统上欧洲公司在该领域占主导地位。该书是迄今为止世界上第一部汇集工业生物转化过程（*biotransformations*）的权威著作，包括了一百多个案例的详尽资料，涉及很多高附加值药物和化学品的生物制造。如作者在其序言中提到的，由于商业上保护机密和产权的缘故，很多的内容以前没有公开发表过。作者经过不懈的努力，通过各种合法的渠道，包括个人的渠道，收集到了这些工业化的过程。我们认为，这本书将为我国的生物催化和

生物转化的研究者提供非常宝贵的参考素材，推动我国的生物催化和生物转化的产业化工作，因此，于2003年着手翻译这本书。原先设想是只供973项目组内部使用，后在化工出版社编辑的建议和支持下决定出版译稿。

南京工业大学的韦萍，卢定强，周华和贾红华参加了本书的文字翻译和大量图表的绘制。清华大学的李盼、蔡真、陈博和陈勇参与了书稿的校对以及索引工作。

感谢我们的家人在该书翻译过程中的支持和细心照顾。

欧阳平凯

林章凛

2005.3

内 容 提 要

本书汇集了120多种工业生物转化过程 (biotransformations), 涉及药物、精细化学品、农药、大宗化学品等的生物法制造。作者在第一章(引言)简要介绍了写本书的目的和生物转化过程的收集方法, 在接下来的三章中, 分别回顾了生物转化的历史、酶的标准分类和酶反应工程的基本概念, 为理解后面的转化过程提供了良好的基础。第五章按生物转化过程所涉及的酶的标准分类顺序逐一阐述收集到的转化过程, 包括相应的酶、反应条件、流程图、过程参数、产品应用和有关公司的信息。

本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性著作, 资料详尽, 涉及很多高附加值药物和化学品的生物制造。由于涉及商业机密和产权的缘故, 很多内容以前没有公开发表过。作者经过不懈的努力, 通过各种合法的渠道, 包括个人的渠道, 收集到了这些过程, 条理清楚, 易于检索。本书可供生物转化领域的研究和开发人员以及管理决策和咨询人员参考。

本书可作为研究生教学用书, 尤其是适合案例分析教学, 也可供政府机关高科技领域管理人员参考使用。

目 录

1. 引言	1
2. 工业生物转化的历史——梦想与现实	3
2.1 从“醋花”(flower of vinegar)到重组 <i>E. coli</i> ——微生物生物转化的历史	3
2.2 从胃液到淀粉糖化酶 T——酶促生物转化 (enzymatic biotransformations) 的历史	10
2.3 生物转化相比较于传统化学的优势	22
参考文献	23
3. 酶的分类	28
3.1 酶的命名	28
3.2 酶的分类	30
EC 1 氧化还原酶 (oxidoreductases)	31
EC 2 转移酶 (transferases)	34
EC 3 水解酶 (hydrolases)	36
EC 4 裂合酶 (lyases)	39
EC 5 异构酶 (isomerases)	41
EC 6 连接酶 (ligases)	43
参考文献	44
4. 生物反应工程基础	46
4.1 定义	46
4.2 生物催化剂的生物合成与固定化	51
4.3 各类酶的特性	65
4.4 动力学	68
4.5 反应器的基本类型及操作方式	71
参考文献	75
5. 生物转化过程	78
索引	370
酶索引	370
菌株索引	377
公司索引	383
起始材料索引	390
产品索引	403

1. 引言

写这本书的主要动力来自于想收集有关工业上重要的一步完成的生物转化过程的信息。在本书，我们想显示，远多于潜在的使用者所意识到的，很多的酶催化过程在实际应用上正变得日益重要。现在依然有种偏见，认为生物转化只有在那些经典的化学合成失败的地方才有用武之地。而且有一种普遍的看法认为，有关的生物催化剂得不到，即使能得到，也太昂贵，不稳定，而且只能在水溶液中使用。我们希望，本书汇集的工业生物转化过程在将来能影响合成研发的决策，考虑合成的方案时结合使用一步完成的生物转化。

因此，我们下了很大的工夫明确描述我们收集的转化过程中使用的底物、催化剂、产物以及尽可能多的反应条件。当流程图可以得到、或者可以从反应细节推导的时候，我们就会给出这些流程图。有些转化过程的参数还不完全，因为这些信息是很难获得的。然而，我们坚信，给出的反应细节应该足够可以让大家对相应的过程参数有大体的把握。最后，描述了产品的用途，也给出了一些与过程有关的参考文献。

我们就不一一感谢所有那些好意地给我们提供实例的人，否则我们会超出这个序言的范围了。当然，我们只写可以公开发表的结果（包括专利文献），或者征得相关同行同意的由个人渠道得到的结果。我们知道，实际存在的生物转化过程远远多于我们在这里表述的，而且，当本书出版时，很多的过程细节会变得过时。然而，我们相信，本书以综述为目的汇集，是能达到前述提高对生物转化的认识的目的。如果我们的读者能够利用他或她的经验，提供建议来改进本书提到的某一过程，或者在将来加入新的工业化的生物转化过程，这种认识就能够得到进一步的发扬。

请求我们的工业界的合作伙伴更开放地透露生物转化过程的方案和参数，并不是一件令他们愉快的事情。即使这样，我们还是一再地请我们的伙伴比以前任何时候都更多地公开相关的信息。在很多时候，我们因此得到了远多于公开报道的关于工业化的生物转化过程的知识。我们的目标是能够利用这些“众所周知的秘密”。我们感谢那些提供给我们与过程紧密相关的信息的同行们。我们也感谢那些没有完全地拒绝我们的请求，至少补偿性地为我们提供了图片的同行们。

这本书首先对工业生物转化进行了一个历史性的回顾。因为我们汇集的过程是依据酶的命名体系来组织的，因此对酶的命名做了详细的描述。我们也写了一章关于反应工程的内容，以便读者更容易对书中的转化过程进行评估。本书的主

要部分，如读者可以想像的，是工业生物转化过程的汇集。书后的全面的索引将方便读者按底物、酶和产品进行检索。

我们真诚地希望本书对学术界和工业界有所帮助，以便于人们对工业生物转化过程有深刻的了解。我们会非常感激任何的修改建议、评论或者新内容的贡献。至少，我们希望看到我们的努力能有一种引发作用，使得读者、作者和编辑们认为有价值准备本书的新版。

我们感谢数位同事帮助我们查找文献、收集数据，尤其感谢 Jürgen Haberland, Doris Hahn, Marianne Hess, Wolfgang Lanfers, Monika lauer, Christian Litterscheid, Nagaraj Rao, Durba Vasic-Rachi, Murillo Villela Filho, Philomena Volkmann and Andrea Weckbecker.

我们特别地感谢 Uta Seelbach 为我们加夜班绘制绝大部分的图片，以及 Nagaraj Rao 和酶组的成员 (Nils Brinkmann, Lasse Grenier, Jürgen Haberland, Christoph Hoh, David Kihumbu, Stephan Laue, Thomas Stillger 和 Murillo Villela Filho)。

最后，但不是最次要的是，感谢我们的家庭在写这本书的过程中给我们的支持和宽容。

2. 工业生物转化的历史——梦想与现实

纵览人类历史，微生物一直以来都具有极大的社会重要性和经济重要性。历史上，早在尚未意识到微生物的存在以前，人类就已经会用微生物来生产食物和饮料。据《创世纪》中有关酿酒方面的记载，早在公元前 6000 年以前，苏美尔人和巴比伦人已经会酿造啤酒；埃及人会用酵母菌发酵面包。然而，用发酵法生产乙醇、有机酸等化学产品的历史并不很久，到 19 世纪后期才有文献报道。乳酸很可能是工业上用发酵法生产的第一种光学活性化合物，于 1880 年在美国得到实现^[1]。1921 年，查普曼对大量早期有机化合物工业发酵过程进行了综述^[2]。

随着时间的推移，人们发现微生物能够通过简单的化学反应，明确的酶促作用来修饰某些化合物。现今，这样的过程被称为“生物转化”（biotransformations）。发酵与生物转化的本质区别在于，发酵过程从底物到产物之间有多个催化步骤，而在生物转化中仅需一步或两步。另外，生物转化的底物与产物化学结构相似，但对发酵来说却未必如此。

2.1 从“醋花”（flower of vinegar）到重组 *E. coli*——微生物生物转化的历史

微生物生物转化（microbial biotransformations）的历史可以追溯到公元前 2000 年左右，与制醋有密切的关系。

制醋也许是有关微生物氧化作用的最古老、最熟知的例子，可以说明活细胞生物转化领域的某些重要进展（图 1）。

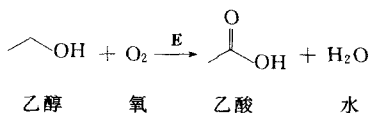


图 1 制醋（E=生物催化剂）

从 17 世纪开始，法国就有固定化细菌的反应器原型（prototype bioreactor）。用来固定微生物的最古老的生物反应器，即所谓的发生器（generator），出现于 1823 年^[3,4]。甚至在今天，对乙醇溶液进行氧化发酵所获得的乙酸依然被称为醋^[5]。

1858 年，巴斯德^[6]首次证明了酒石酸的微生物拆分（microbial resolution）。

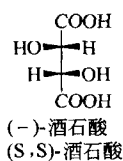


图2 巴斯德的首次拆分反应产物

他进行了由真菌灰绿青霉 (*Penicillium glaucum*) 介导的外消旋酒石酸铵盐的发酵。发酵产生了左旋 (-)-酒石酸 [(-)-tartaric acid](图2)。

这也是首次用某种方法通过微生物降解外消旋化合物中的一种对映异构体,完整地留下另一种对映异构体。

1862年,巴斯德 (Pasteur)^[7]研究了乙醇到醋的转化,推断出他称之为“醋花”的薄层膜 (penllicle) 所起的作用是将空气中的氧传递给多种有机底物。

1886年, Brown证实了巴斯德的发现,将制醋的引发剂 (causative agent) 称为 *Bacterium xylinum*。他还发现这种引发剂能够将丙醇氧化为丙酸,或将甘露醇氧化为果糖 (图3)^[8]。

1897年, Buchner^[9]报道了用砂子研磨酵母细胞制备的无细胞抽提物在不存在活细胞的情况下,能够催化乙醇发酵。从此开始了休眠态细胞 (resting cell) 生物转化的历史。

1921年, Neuberg 和 Hirsch^[10]发现有酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 存在时苯甲醛 (benzaldehyde) 与乙醛 (acetaldehyde) 缩合形成光学活性 1-羟基-1-苯基-2-丙酮 (1-hydroxy-1-phenyl-2-propanone)(图4)。

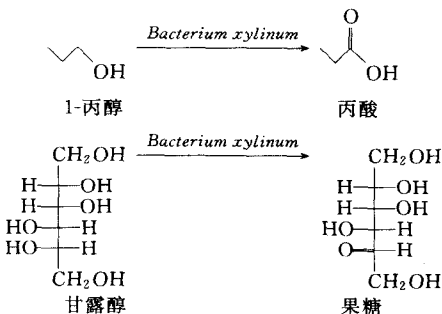


图3 制醋的生物催化剂 *Bacterium xylinum* 催化的反应

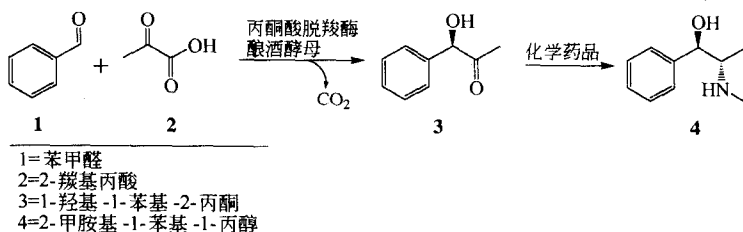


图4 L-麻黄素的生产

1930年,德国路德维希港市的 Knoll AG 公司将 1-羟基-1-苯基-2-丙酮进一步化学转化为 D-(-)-麻黄素 [D-(-)-ephedrine](图5)^[11]。

1923年,醋杆菌 (*Acetobacter suboxydans*) 被分离出来^[12]。由于它具有弱氧化性,被用于从 D-山梨醇 (D-sorbitol) 高效制备 L-山梨糖 (L-sorbose) 的过程中 (图6)。

L-山梨糖是用 Reichstein-Grussner 法合成 L-抗坏血酸的中间化合物。因此,



ABGEGEBEN AM
13. APRIL 1930

REICHSPATENTAMT
PATENTSCHRIFT

NR 548 459

KLASSE 12 q GRUPPE 32 / 61

12 q K 17, 30

Tag der Bekanntmachung über die Erteilung des Patents: 29. März 1930

Knoll A.-G. Chemische Fabriken in Ludwigshafen a. Rh.,
Dr. Gustav Hildebrandt und Dr. Wilfried Klavohn in Mannheim

Verfahren zur Herstellung von 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol
Patentamt in Deutsches Reich am 9. April 1930 ab

Reactions of 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol can be carried out with various methods as described in the literature (e.g. Z.B. Nagai u. Kano, Annen 426 [1926], S. 12; Festschrift 466 [29]; Saita u. Kaji, Ber. 65 [1930], S. 1141 ff.; Festschrift 542 [30]).

The reaction of 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol (e.g. Nagai u. Kano, Annen 426 [1926], S. 12; Festschrift 466 [29]; Saita u. Kaji, Ber. 65 [1930], S. 1141 ff.) is identical with the synthetic method and is accordingly therapeutically successful.

It is known from the literature that the synthesis of 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol is carried out, for example, by the reaction of 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol with 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol, which is carried out in a similar manner to the synthesis of 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol.

It was found, however, that the synthesis of 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol is carried out, for example, by the reaction of 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol with 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol, which is carried out in a similar manner to the synthesis of 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol.

Die Erhaltung der optischen Aktivität war nach dem oben erwähnten Verfahren auf Grund der Neubeobachtung (Böcher, Zetschrift 128 [1927], S. 643) 1-Phenyl-2-methylamino-3-ol in der Lösung in kurzer Zeit racemisiert. Da bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung die Reduktion in alkalischer Lösung stattfindet, war vorzuziehen mit der Bildung von racemischen Basen zu rechnen.

Das Verfahren stellt eine neue Methode dar, um das links drehende Phenylamino-3-ol in Form von 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol darzustellen zu verfahren.

Diese asymmetrische Synthese des 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol hat keinen Zweck, da kein stereotyper Verlauf des 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol an sich, wie es bei den bekannten Syntheseverfahren der Racemikopten der Fall ist.

Beispiel 1

100 g des durch Abtrennung gewonnenen phenylpropandialdehyds (Gegenwert 100 g des Natriums, Zetschrift 129 [1927], S. 668 ff.) läßt man ohne weitere Reinigung in einer Lösung von 10 g Methylamin in 100 ccm Äther in Gegenwart von 20 g aniontischen Aluminium unter Rühren im Verlaufe von 2 Stunden unterkühlen. Gleichzeitig läßt man 20 bis 30 g Wasser tropfenweise zutreten. Die sofort heftig einsetzende Umsetzung wird allmählich durch Kühlung gestoppt. Nach heftiger Reduktion wird der überstehenden Lösung die entsprechende optisch aktive Base mit verdünnter Säure zugesetzt. Die Aufarbeitung erfolgt in bekannter Weise.

Man erhält das Hydrochlorid des 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol als vom F. 214°, welches bei der Literatur bekannte Löslichkeit zeigt. Die Ausbeute beträgt je nach Art des verwendeten Ausgangsmaterials 25 bis 45 g Hydrochlorid.

Beispiel 2

100 g des in Beispiel 1 verwendeten phenylpropandialdehyds (Gegenwert 100 g des Natriums, Zetschrift 129 [1927], S. 668 ff.) werden unter vermindertem Druck destilliert. 100 g des bei 100 bis 130° unter 12 mm Druck übergehenden Fraktion werden in Gegenwart von solidem Platin (20 ccm 1% Lösung) mit 85 g 35%iger Methylaminlösung der katalytischen Reduktion unterworfen. Es ist vorzuziehen, etwas Äther zuzusetzen. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme wird

Das Verfahren stellt eine neue Methode dar, um das links drehende Phenylamino-3-ol in Form von 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol darzustellen zu verfahren.

Diese asymmetrische Synthese des 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol hat keinen Zweck, da kein stereotyper Verlauf des 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol an sich, wie es bei den bekannten Syntheseverfahren der Racemikopten der Fall ist.

Beispiel 1

100 g des durch Abtrennung gewonnenen phenylpropandialdehyds (Gegenwert 100 g des Natriums, Zetschrift 129 [1927], S. 668 ff.) läßt man ohne weitere Reinigung in einer Lösung von 10 g Methylamin in 100 ccm Äther in Gegenwart von 20 g aniontischen Aluminium unter Rühren im Verlaufe von 2 Stunden unterkühlen. Gleichzeitig läßt man 20 bis 30 g Wasser tropfenweise zutreten. Die sofort heftig einsetzende Umsetzung wird allmählich durch Kühlung gestoppt. Nach heftiger Reduktion wird der überstehenden Lösung die entsprechende optisch aktive Base mit verdünnter Säure zugesetzt. Die Aufarbeitung erfolgt in bekannter Weise.

Man erhält das Hydrochlorid des 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol als vom F. 214°, welches bei der Literatur bekannte Löslichkeit zeigt. Die Ausbeute beträgt je nach Art des verwendeten Ausgangsmaterials 25 bis 45 g Hydrochlorid.

Beispiel 2

100 g des in Beispiel 1 verwendeten phenylpropandialdehyds (Gegenwert 100 g des Natriums, Zetschrift 129 [1927], S. 668 ff.) werden unter vermindertem Druck destilliert. 100 g des bei 100 bis 130° unter 12 mm Druck übergehenden Fraktion werden in Gegenwart von solidem Platin (20 ccm 1% Lösung) mit 85 g 35%iger Methylaminlösung der katalytischen Reduktion unterworfen. Es ist vorzuziehen, etwas Äther zuzusetzen. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme wird

die ätherische Lösung mit Salzsäure angesäuert und das 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol in bekannter Weise abgetrennt. Das Hydrochlorid schmilzt bei 214° und zeigt die aus der Literatur bekannte Löslichkeit. Die Ausbeute an Hydrochlorid beträgt 210 g.

Beispiel 3

100 g nach Neuberg (Biochem. Zeitschrift 128 [1927], S. 643) abgetrenntes 1-Phenylpropyl-2-ol-2-ol werden in 200 ccm Äther gelöst, mit 75 g 35%iger Methylaminlösung versetzt und etwa zwei Stunden lang geschüttelt. Hierbei findet unter Wasserabgabe Kondensation statt. Anschließend wird in Gegenwart von 20 ccm 1%iger solidem Platinlösung mit Wasserstoff reduziert.

Die Aufarbeitung geschieht nach Beispiel 2. Das Hydrochlorid des 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol kristallisiert aus Alkohol in einem Prismen von F. 214 bis 216°. Der F. der freien Base liegt bei 20°.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Darstellung von 1-1-Phenyl-2-methylamino-3-ol, dadurch gekennzeichnet, daß man links drehendes 1-Phenylpropandialdehyd mit Methylenamin katalysiert und die Kondensationsprodukte gleichzeitig oder nachträglich mit Methylamin, wie oben angegeben, in Gegenwart eines Wasserstoffkatalysators, behandelt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man... unter Umgehung der Beibehaltung des 1-Phenylpropandialdehyds... Destillieren oder Ausfrieren des 1-Phenylpropandialdehyds... erhaltenden Fraktion verwendet, wie aus z. B. bei der Verglebung von Zuckern oder von anderen halbfesten Substanzen in Gegenwart von Benzoldestillat entsteht.

图 5 1930 年 Knoll 的专利

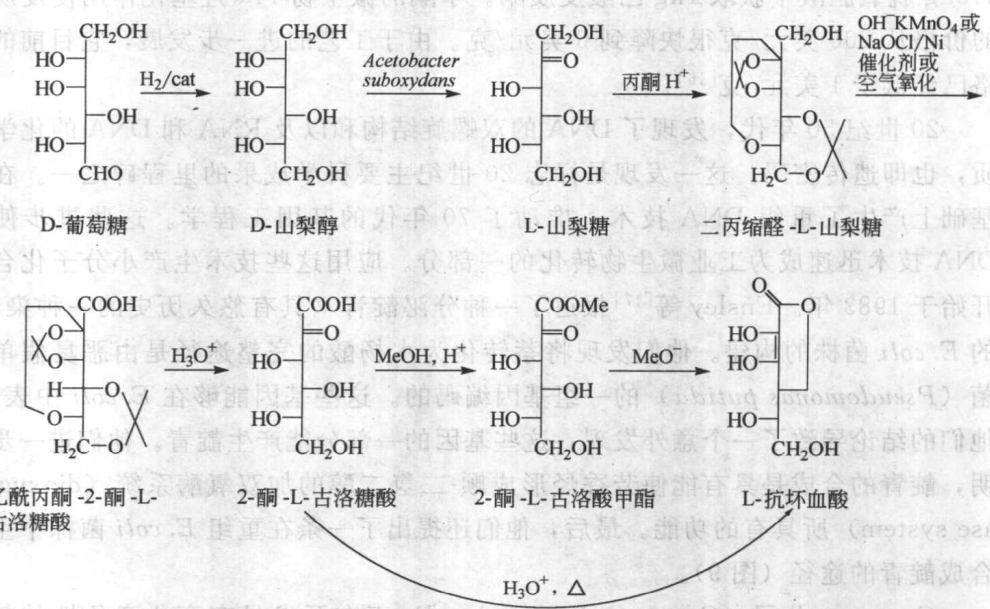


图 6 维生素 C [L-抗坏血酸 (L-ascorbic acid)] 的 Reichstein-Grüssner 合成法

20 世纪 30 年代中期，它成为一种重要的化合物^[13]。

1953 年，Peterson 等^[14]报道了根霉菌 (*Rhizopus arrhizus*) 能够将孕酮 (progesterone) 转化为 11 α -羟基孕酮 (11 α -hydroxyprogesterone) (图 7)。11 α -羟基孕酮是皮质酮 (cortisone) 合成的一种中间化合物。

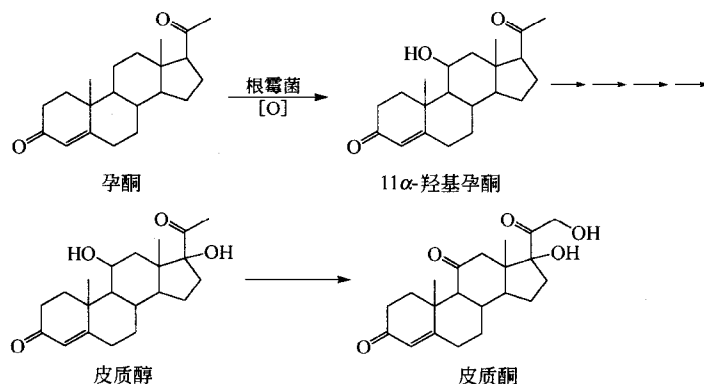


图 7 孕酮的微生物 11 α -羟基化作用

这种微生物羟基化作用简化并极大地改进了多步化学合成皮质甾类激素及其衍生物的效率。尽管德国人 Merck 提出的由脱氧胆酸进行化学合成的方法 (图 8) 也是可行的^[15]，但是这种方法既复杂又不经济：必须经过 31 步才能从 615kg 脱氧胆酸中获取 1kg 乙酸皮质酮。孕酮的微生物 11 α -羟基化作用使皮质酮的价格从 200 美元/克很快降到 6 美元/克。由于工艺的进一步发展，它目前的价格已经低于 1 美元/克^[16]。

20 世纪 50 年代，发现了 DNA 的双螺旋结构和以及 RNA 和 DNA 的化学本质，也即遗传密码。这一发现是标志 20 世纪主要科学成果的里程碑之一。在此基础上产生了重组 DNA 技术，推动了 70 年代的基因工程学。这些进步使 r-DNA 技术迅速成为工业微生物转化的一部分。应用这些技术生产小分子化合物开始于 1983 年。Ensley 等^[17]报道了一种分泌靛青 (具有悠久历史的一种染料) 的 *E. coli* 菌株的构建。他们发现将萘转化为水杨酸的完整途径是由恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的一组基因编码的。这些基因能够在 *E. coli* 中表达。他们的结论导致了一个意外发现：这些基因的一部分能产生靛青。他们进一步证明，靛青的合成是具有能使芳香烃形成顺-二氢二醇的加双氧酶系统 (dioxygenase system) 所具有的功能。最后，他们还提出了一条在重组 *E. coli* 菌株中生物合成靛青的途径 (图 9)。

Genencor 公司 (Genencor International) 正在开发具有商业竞争性的靛青 (indigo) 生物合成途径，用重组 *E. coli* 将葡萄糖直接合成靛青^[18]。1985 年，

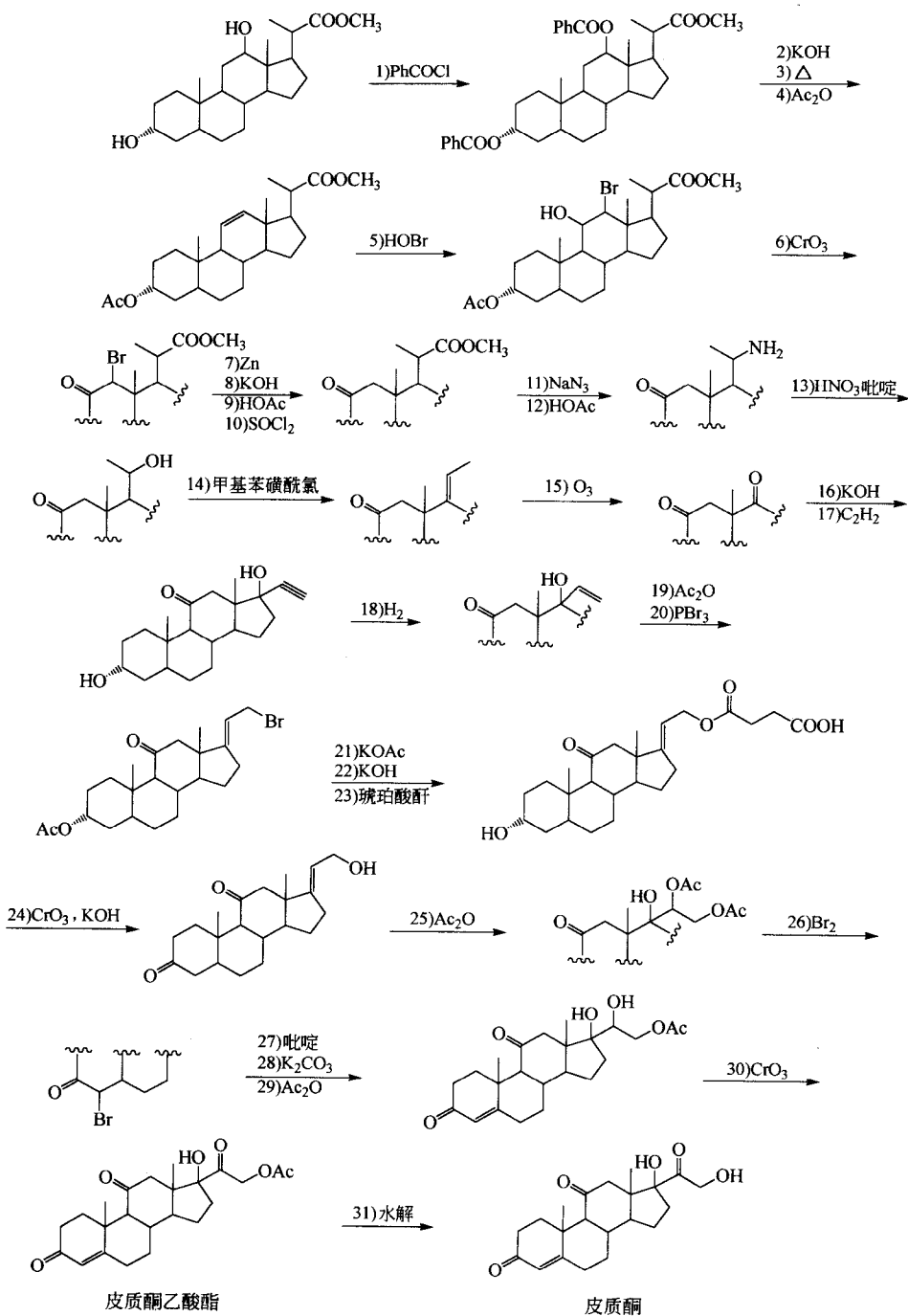


图 8 化学合成皮质酮

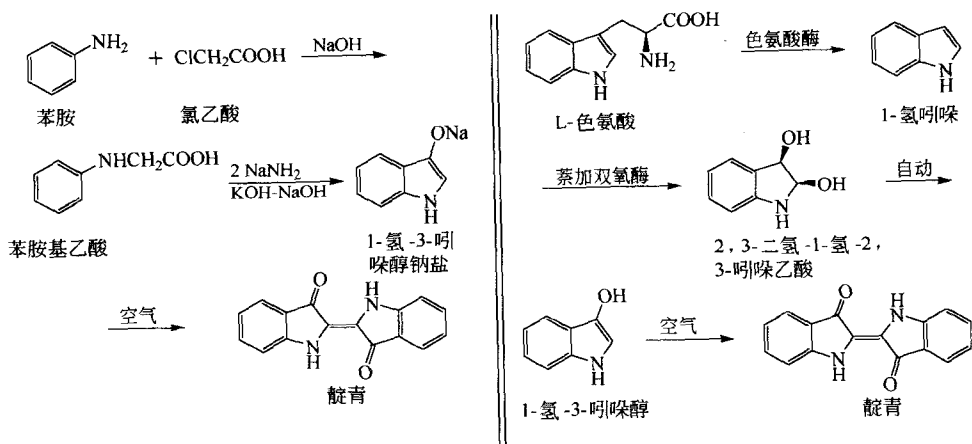


图 9 合成靛青的化学途径与生物途径比较

Anderson 等^[19]报道已构建了一种能合成 2-酮-L-古洛糖酸 (2-keto-L-gulonic acid) (图 10) 的代谢工程菌株。2-酮-L-古洛糖酸是生产 L-抗坏血酸的一个重要中间化合物。

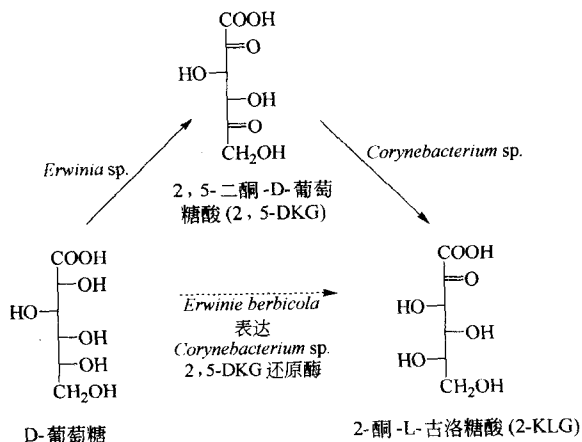


图 10 生物合成 2-酮-L-古洛糖酸

BASF, Merck 和 Cerestar 公司打算在德国的 Krefeld 构建一种产 2-酮-L-古洛糖酸的植物。这一工作预计从 1999 年开始。他们开发出一条直接从山梨醇到酮古洛糖酸的新发酵途径^[20]。这种方法可能与 1966 年描述的方法相似^[21]。

1980 年, 美国加州伯克利市的 Cetus 公司开发了将烯烃转化为烯烃氧化物的生物过程^[22]。由于它可能取代耗能的石油化学过程, 这个生物过程引起人们极大的关注。

重组 DNA 技术的发展有望加速技术进步。但是，在工业化生产价格低廉的化学品变为可行以前，生物过程的开发和应用方面尚有许多未完成的工作^[23]。然而，目前甚至像 Dow Chemical、DuPont、Degussa Hüls AG 等传统的化学公司，由于受到投资者及技术进步方面的压力，正试图将微生物转化或酶转化用于生产。他们之所以这样做是想知道自然界的可再生原料（feedstock）能否比原油更能带来利益。只需比较一桶原油与一桶玉米淀粉的成本，就可以发现后者确实便宜得多。

丙烯酰胺（acrylamide）是最重要的日用化学品之一。它的全球消耗量大约为每年 200000t。丙烯酰胺被用在多种聚合物的生产中，后者作为凝聚剂、添加剂或用于石油回收。传统的丙烯酰胺化学合成使用铜盐作为腈水合作用的催化剂。然而，催化剂的制备十分复杂，因此使用这种方法相当不方便。此外，催化剂的再生以及丙烯酰胺的分离和纯化也很困难。由于丙烯酰胺易于聚合，因此温和条件下的合成有利于减少聚合，更有吸引力。酶法生产丙烯酰胺被证明是比较简单和经济的。与传统化学过程相比，因为酶促水合过程的转化率和收率几乎达到 100%，所以无需回收未反应的丙烯腈（acrylonitrile），也不必从产物中去除铜离子。这个酶促过程

在低于 10℃ 的温和反应条件下进行，无需特殊能量来源。反复使用固定化细胞，可以得到非常纯的产品。这个 1985 年才首次实现的酶促过程，现在每年

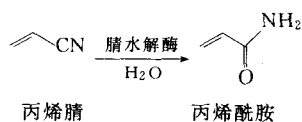


图 11 丙烯酰胺的合成

为 Nitto 公司生产大约 6000t 丙烯酰胺^[24,25]。利用生物催化剂生产丙烯酰胺也许并非首次将生物转化作为生物技术的一部分用于石油化学工业。可这却是将工业生物转化过程引入大宗化学品制造的第一个成功的例子（图 11）。

表 1 列出了一些典型工业微生物转化过程。

表 1 一些典型工业微生物转化过程

产 品	生物催化剂	开始年份/年	公 司
醋 (vinegar)	细菌 (bacteria)	1823	许多公司
L-2-氨基-1-苯基丙醇 (L-2-methylamino-1-phenylpropan-ol)	酵母 (yeast)	1930	德国 Knoll AG 公司
L-山梨糖 (L-sorbose)	弱氧化醋杆菌 (<i>Acetobacter suboxydans</i>)	1934	不同公司
脱氢皮质 (甾)醇 (prednisolone)	简单节杆菌 (<i>Arthrobacter simplex</i>)	1955	德国 Schering AG 公司
L-天冬氨酸 (L-aspartic acid)	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	1958	日本 Tanabe Seiyaku 公司
7-ADCA	巨大芽胞杆菌 (<i>Bacillus megaterium</i>)	1970	日本 Asahi 化学工业公司

续表

产 品	生物催化剂	开始年份/年	公 司
L-苹果酸(L-malic acid)	产氨短杆菌 (<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>)	1974	日本 Tanabe Seiyaku 公司
D-对羟基苯甘氨酸 (D- <i>p</i> -hydroxyphenylglycine)	假单胞菌 (<i>Pseudomonas striata</i>)	1983	日本 Kanegafuchi 化学公司
丙烯酰胺 (acrylamide)	红球菌 (<i>Rhodococcus</i> sp.)	1985	日本 Nitto 化学公司
D-天冬氨酸和 L-丙氨酸 (D-aspartic acid, L-alanine)	假单胞菌 (<i>Pseudomonas daciahae</i>)	1988	日本 Tanabe Seiyaku 公司
L-肉(毒)碱(L-carnitine)	土壤杆菌 (<i>Agrobacterium</i> sp.)	1993	捷克 Lonza 公司
2-酮-L-古洛糖酸 (2-keto-L-gulonic acid)	醋杆菌 (<i>Acetobacter</i> sp.)	1999	德国 BASF, Merck, Cerestar 公司

2.2 从胃液到淀粉糖化酶 T——酶促生物转化 (enzymatic biotransformations) 的历史

在人们逐渐理解酶的本质以前,酶已经为人类服务了数千年。没有人确切知道在制造奶酪的过程中首次使用牛胃作为催化剂是什么时候。

早在 1783 年, Spallanzani 指出由细胞分泌的胃液能够在体外消化肉制品。1836 年, Schwan 把这种活性物质称为胃蛋白酶 (pepsin)^[26]。1876 年, Kühne (图 12) 向海德尔堡的 Natur-Historischen und Medizinischen Verein 机构递交了一份论文, 建议这种“非组织酵素”应命名为“酶”(enzymes)^[27]。当时开始有两个术语在使用: 一个是由 Buchner 提出的“组织酵素”(organized ferment), 例如无细胞的酵母抽提物; 另一个就是“非组织酵素”(unorganized ferment), 例如上述由细胞分泌的胃液。今天则采用“细胞内”(intracellular) 和“细胞外”(extracellular) 两个术语。Kuhne 也从他的胰蛋白酶 (trypsin) 实验中提出了一些有趣的结果。“enzyme”一词源自希腊语“in yeast”(意为“在酵母中”)或“leavened”(意为“发酵的”)^[28]。

微生物合成大量的酶, 每一种酶都有自身的功能。胞内酶在细胞内受保护的高度结构化的环境中起作用; 胞外酶被分泌到细胞外, 因而在微生物的介质环境中起作用。

胞外酶的工业化开始于在 1890 年左右。这应归功于日本企业家 Takamine。他定居在美国, 创办了一家基于日本技术的酶工厂。主要产品称为塔卡淀粉糖化酶 (takadiastase)。这是一种通过培养米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 制备的淀粉酶和蛋白酶的混合物。1913 年, 法国的 Boidin 和 Effront 开发了一种细菌酶。他们发现枯