

## 生化代谢物工业生产的一种新方法——细胞酶系转化法

范培昌\*

(中山大学生物系生物化学教研室, 广州)

近年来, 微生物发酵工业中出现了一种新方法, 即直接利用微生物细胞以某种原料为底物进行转化的方法, 作者称作细胞酶系转化法。此法产率高、反应时间短、所需设备简单、条件易控制。尤其是它可以利用发酵工业中的废弃菌体。因此, 为发酵工厂的综合利用开辟了新的途径。

### 细胞酶系转化法的由来

1967年, Tochikura 等人利用面包酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*) 细胞作为酶源, 由 5'-AMP 转化为 ATP, 反应液中生成的 ATP 浓度可高达 10 微克分子/毫升以上<sup>[1]</sup>。此种能完成多步酶促反应的方法应用于 ATP 的工业生产, 引起了人们的重视, 除了进一步研究用该法合成 ATP 的种种条件以提高转化率外, 又将该法推广到了其他生化代谢物的工业生产中。迄今用细胞酶系转化法相继投产的生化代谢物有: ATP<sup>[1]</sup>、UTP<sup>[2]</sup>、GTP<sup>[1-4]</sup>、CTP<sup>[1,3-6]</sup>、CDP-MMEA 和 CDP-MEEA<sup>[6]</sup>、CDP-DMEA 和 CDP-DEEA<sup>[6,7]</sup>、CDP-Ch<sup>[4-13]</sup>、CDP-EA<sup>[14,15]</sup>、UDPGal<sup>[16,17]</sup>、UDPAG<sup>[18,19]</sup>、UDPG<sup>[20]</sup>、GDPG<sup>[21]</sup>、GDPM<sup>[22-24]</sup>、CoA<sup>[25-31]</sup>、4'-磷酸泛酸和 4'-磷酸泛酸硫氢乙胺<sup>[32]</sup>、肉桂酸<sup>[33,34]</sup>、维生素 B<sub>6</sub> 葡萄糖苷<sup>[35]</sup>、L-色氨酸<sup>[36]</sup>、DL-丙氨酸<sup>[37]</sup>、DL-缬氨酸<sup>[37,38]</sup>、L-亮氨酸和 L-苯丙氨酸<sup>[38]</sup>、L-酪氨酸和 L-多巴<sup>[39-44]</sup>、3-(3,4-二甲氧苯基)-L-丙氨酸和 3-(3,4-甲氧二羟苯基)-L-丙氨酸<sup>[45]</sup>、氢化可的松<sup>[46]</sup>等。虽说产品种类还不很多, 但它包含了氨基酸、核苷酸、维生素、糖和激素等各类小分子生化代谢

物。近来, 又有把上述微生物细胞制成可以反复使用的固定化细胞进行生产的报告<sup>[47-49]</sup>, 使细胞酶系转化法有了更广阔的发展前途。

长期以来, 人们就曾在加有微生物细胞的反应系统中, 观察底物在特定条件下的转化现象, 借此研究代谢物的生物合成途径, 确定细胞中某些酶的存在。例如, 1954年 Pierpoint 等人在研究 CoA 生物合成过程中, 就发现阿拉伯聚糖乳杆菌 (*Lactobacillus arabinosum*) 的细胞, 能在加有泛酸或 4'-磷酸泛酸的葡萄糖溶液中合成一定量的 CoA<sup>[50,51]</sup>。但在当时这类方法并未用到生产中。

由于细胞酶系转化法用于工业生产为时不久, 因此被称为发酵生产<sup>[7]</sup>、酶促生产<sup>[52]</sup>、生物制备<sup>[13]</sup>、微生物合成<sup>[21]</sup>等。概念上与现有的发酵法、酶促合成法等混淆不清。作者认为, 本法系用细胞作多酶源, 不像通常所称的酶促合成法那样需把特定的酶制成粗酶或均质酶制剂后再进行反应; 也不需要先使微生物迅速生长和繁殖。此外, 本法所用细胞具有维持其生命活动的完整的多酶系统, 各种酶又基本上保持着原有生活细胞所处的状态和特定位置, 因此能迅速地完成多步酶促反应, 这是本法很重要的

\* 现在工作单位: 上海师范大学生物系生物化学教研室。

本文所用简写符号, 除以下几条外, 均按科学出版社出版的《英汉生物化学词汇》。CDP-MMEA: 胞苷二磷酸单甲基乙醇胺; CDP-MEEA: 胞苷二磷酸单乙基乙醇胺; CDP-DMEA: 胞苷二磷酸二甲基乙醇胺; CDP-DEEA: 胞苷二磷酸二乙基乙醇胺; CDP-Ch: 胞苷二磷酸胆碱; CDP-EA: 胞苷二磷酸乙醇胺; UDPAG: 尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺; GDPG: 鸟苷二磷酸葡萄糖; GDPM: 鸟苷二磷酸甘露糖; CoA: 辅酶 A。

特点,也是现有代谢物工业生产中的其他方法(包括尚在研究中的多酶反应器在内)所不能比拟的优点。基于上述理由,本法称为细胞酶系转化法似乎更能反映方法的本质。

## 微生物的选择与细胞的处理

细胞酶系转化法的操作十分简便,只需选择一种合适的微生物,将其细胞置于加有合适底物的溶液中,在控制一定酸碱度和温度等条件下,静置或振荡反应一段时间后即能在反应液中合成所需产物。当反应液中产物浓度达最高值时,可用热处理等方法使细胞酶系失活,离心除去细胞后,即可按常规方法分离提纯产物。

### 一、微生物的选择

现有资料表明,在细胞酶系转化法中采用的多酶体系均来自微生物细胞,选择适当微生物的途径有四:

1. 从发酵工厂现有生产菌的产物来判断 例如用米曲霉(*Aspergillus oryzae*) TDA-1生产酰化酶,此酶能将N-乙酰-DL-多巴不对称地水解为L-多巴和N-乙酰-D-多巴<sup>[44]</sup>。因此生产酰化酶后的菌丝体作为细胞转化法的酶源即能生产L-多巴及其衍生物。

2. 从现有由微生物菌体中提取的产品来判断 例如由面包酵母细胞中,可提取出CoA,据此可以断定面包酵母细胞中必含有能合成CoA的多酶系统,用它作为多酶源就能用细胞酶系转化法生产CoA<sup>[25-27]</sup>。

3. 从一些以微生物为材料研究生化代谢途径或酶促机制的文献中判断 例如Brown在研究CoA的生物合成途径时,测定并证实了大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酵母菌和摩氏变形菌(*Proteus morgani*)中含有大量的泛酸激酶、4'-磷酸泛酸半胱氨酸连接酶和磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶<sup>[53]</sup>。以后他又研究了许多微生物中泛酸,磷酸泛酸,脱磷辅酶A和辅酶A的分布,发现鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)等多种菌的每克丙酮干燥细胞中含CoA达1千毫克分子以上<sup>[54]</sup>。显然,上述微生物均能作为合

成CoA及其中间产物的多酶源。

4. 根据筛选实验来判断 即通过测定各种微生物细胞,由某种底物合成产物的能力来作出判断。这种测定方法操作简便、准确,可同时比较数十种微生物。目前,在细胞酶系转化法中所用的微生物细胞不少是用此法选得的<sup>[9,11,21,26,35,36,39,55]</sup>。并且证明同类或同属的微生物往往具有合成同种产物的能力。例如Nakazawa等人试验了1138株细菌,发现属于肠杆菌科的菌株均能由氨和吡啶合成L-色氨酸<sup>[36]</sup>。

### 二、细胞的处理

微生物细胞可用各种方法处理。经水洗后,直接用于反应的称为完整细胞<sup>[39]</sup>或湿细胞<sup>[28,35,44,53,56]</sup>;水洗后于室温下风干24小时,置于装有P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>的真空干燥器中减压干燥24—36小时后,贮于-5℃下备用的称为空气干燥细胞或风干细胞<sup>[4-12,16-19,21-27]</sup>;水洗后用冷丙酮处理几次后贮于-5℃下备用的叫丙酮干燥细胞<sup>[33,34]</sup>;若用冰冻干燥法代替丙酮干燥法所得细胞叫冰冻干燥细胞。这些处理后的细胞经磨碎后再用于反应的叫磨碎细胞<sup>[1,20]</sup>。目前以完整细胞和风干细胞应用最多。

不论用何种方法处理,均应以不损伤细胞转化所需产物的酶系统及保持细胞具有合成所需产品的最大能力为前提,否则不但不能合成所需产品,甚至会得出不完整的结论。例如Ogata等人指出:用酵母和细菌[如产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*)]的空气干燥细胞自AMP、半胱氨酸、泛酸等底物合成CoA时,AMP磷酸化的产物ATP对CoA的合成是必须的,在酵母中它可以通过糖酵解途径而形成,但用细菌时,看到CoA的积累只是在加入ATP后才能进行,而加AMP时是不能合成的<sup>[26]</sup>。后来,Ogata等人又用面包酵母丙酮干燥细胞重复上述试验,并用腺嘌呤代替AMP,得出的结论是用腺嘌呤代替AMP时既不磷酸化成ATP,也不能生成CoA<sup>[27]</sup>。但是,作者所在实验室用产氨短杆菌完整细胞作为多酶源,在和Ogata等人的相

似条件下(反应系统中加有表面活性剂),以腺嘌呤为底物时却合成了221微克/毫升的CoA,而用丙酮干燥细胞的同一试验中只能得到不足40微克/毫升的CoA。作者所在实验室的另一工作中,发现用啤酒酵母完整细胞也可使腺嘌呤转化为ATP<sup>[31]</sup>。显然,在风干或丙酮处理细胞时失去了一部份酶。Kimura曾证明,空气干燥细胞失去了激酶系统的活力<sup>[20]</sup>。Matsushima等人在比较了用各种方法处理的细胞合成L-多巴中间物的能力后也指出,不同处理的细胞对底物的透析性及所具有的酶系统不一样<sup>[45]</sup>,认为完整细胞往往因为底物无法透入而不能合成所需产物,其他处理的细胞虽然解决了细胞透性问题,但往往又失去了某些酶活。事实上,Ogata等人就在得出前述结论的同一篇报道中<sup>[27]</sup>,也比较了不同处理的细胞合成CoA的能力。他们也发现完整细胞合成CoA的能力只有其他处理细胞合成CoA能力的一半,认为只有损伤的细胞才能合成CoA。但当他们在反应系统中加入表面活性剂时,又发现完整细胞合成CoA的能力和其他处理的细胞完全一样了<sup>[27]</sup>。表面活性剂一般可以增强细胞透性而使物质容易透入或外泄<sup>[4,21,28]</sup>。上述情况表明,如果不是为了贮藏的方便,在注意到细胞透性的前提下,使用完整细胞似乎更为有利。尤其是用细胞酶系转化法试制新产品时,为了保持酶系在细胞内的原有状态,防止某些酶的失活,更要采用完整细胞作为酶源。

处理前的细胞年龄和处理后的细胞含水量,对合成产物的产量有一定影响。例如Kawaguchi等人用加氏汉森酵母(*Hansenula jadinii*) IFO 0987的空气干燥细胞生产GDPM时证明,用对数生长期的细胞制成空气干燥细胞时合成GDPM的能力最强,而稳定期的细胞制剂合成GDPM的能力急剧下降<sup>[24]</sup>。除此,Tochikura等人用面包酵母空气干燥细胞转化UDPAG,发现细胞含水量为4.9%时合成UDPAG的能力比含水量为12%时几乎高一倍<sup>[19]</sup>。类似的例子还可举出一些<sup>[10,24]</sup>。显然,细胞年龄与酶的种类、数量及酶活力有关,细胞含水量又关系到酶

在细胞器上的状态,这些因素对细胞酶系转化法也必然会产生一定影响。

## 底物的选择

从目前有关细胞酶系转化法生产代谢物的资料分析,其反应方式可归为三类。第一类是把结构较简单的几种化合物(即底物)合成结构较复杂的产物。例如,以泛酸,半胱氨酸和腺一磷为底物,合成CoA<sup>[25-31]</sup>。第二类是用结构较复杂的物质作为底物,分解为结构较简单的产物。例如,以L(D)-酪氨酸为底物用细胞酶系转化法使之产生丙酮酸<sup>[40]</sup>。第三类是使底物组份上的某基团发生改变而生成与底物结构类似的产物。例如,用DL-d-羟基异己酸和谷氨酸为底物,使之发生羟基与氨基的置换生成L-亮氨酸<sup>[38]</sup>。由于第二、三类反应往往只是应用细胞多酶系统中某一特定的酶,不难根据酶促反应性质的现有知识选准底物。关于第一类涉及多酶系统反应的底物选择,似乎必须是所需合成产物上的结构组份。也即是选择欲生产的代谢物在合成途径中的前体或其类似物。从附表所列实例中,几乎毫无例外地符合这一观点。值得提出的是,由于细胞酶系转化法具有的特点使该多酶体系催化活力之高为其他离体的酶所不能比拟,所以底物的选择不必局限于所需合成物的直接前体<sup>[36]</sup>。例如,用细胞酶系合成ATP时既可选用AMP<sup>[11]</sup>,又可选用腺苷<sup>[52]</sup>、也可选用腺嘌呤<sup>[56]</sup>等作为底物。又如用细胞酶系合成胞二磷胆碱时,底物既可选用磷酸胆碱<sup>[5]</sup>,也可选用氯化胆碱<sup>[11,12]</sup>。当然,所选底物的化学结构越接近产物,由于减少了中间反应的步骤,产物的收率较高,反应也较迅速<sup>[57]</sup>。

在细胞酶系转化法中,底物与产物的关系也是选择合适底物时需要重视的问题,它涉及到许多酶学理论。现把有关报道中底物与产物的关系综述如下:

### 一、在相同反应条件下,不同底物可合成不同产物

例如,Kariya等人用加氏汉森酵母IFO0987

的空气干燥细胞作为多酶源,又以一系列的胆碱类似物替代原有反应系统(见表1)中的胆碱,在相同的反应条件下,结果生成了一系列相应的胞二磷胆碱衍生物<sup>[6,7]</sup>。Kawai 等人也发现,在相同的反应条件下,用同一种微生物细胞,加入半乳糖(或乳糖)时合成的产物是 GDPGal,加入葡萄糖时则合成了 GDPG<sup>[7]</sup>。显然,这种现象与细胞多酶系统中某些酶的特异性有关。

## 二、在相同反应条件下,不同底物可合成同一产物

例如,Shimizu 等人<sup>[28]</sup>用产氨短杆菌 IFO 12071 的空气干燥细胞生产 CoA 时,曾在同一条件下用 CoA 生物合成途径中的各种前体进行试验,发现泛酸、磷酸泛酸、泛酰氨基乙硫醇、脱磷辅酶 A 等分别作为底物时都能生成 CoA,且生成 CoA 量的顺序是:

泛酸 < 泛酰氨基乙硫醇 < 磷酸泛酸 < 脱磷辅酶 A = 2051 < 2480 < 3978 < 6997 (微克/毫升)。

这一结果不仅证明了细胞中有完整的多酶系统,而且也证实了关于底物结构越接近产物,产物产量越高的论点。

## 三、在相同条件下,同种底物可合成多种产物

例如,在转化 ATP 的反应液中,可以同时分离出 ADP、AMP、IMP、肌苷、6-磷酸葡萄糖等<sup>[4]</sup>。因为所用细胞具有多酶系统,多步的酶促反应必然产生一系列的中间化合物,因此底物与所需合成产物的化学结构相差越大,越需多步反应才能完成,产生的中间物也将越多。就近代分离技术而言,是不难把各物质分别分离提纯从而获得各种产品的。

但是,反应液中中间产物会影响到主要产物的产量,在实际应用中往往采取下述三种办法来控制所需主要产物的收率。

(1) 控制底物浓度: 实验证明,底物浓度影响合成方向。例如 Kimura 等人用面包酵母空气干燥细胞生产 CDP-Ch 时发现,作为底物之一的 5'-CMP 浓度在 20 微克分子/毫升时,约有

80—100% 的 CMP 转化为 CDP-Ch; 当 5'-CMP 浓度超过此值时,CDP-Ch 的产量并不增加,而在反应液中出现了胞苷、尿苷、尿嘧啶等,它们的浓度随 5'-CMP 浓度的增大而增大,当 5'-CMP 浓度达到 200 微克分子/毫升时,反应液中尿嘧啶衍生物总量竟达 50 微克分子/毫升以上<sup>[30]</sup>。Kimura 等人根据这一试验结果巧妙地用流加法来保持反应液在反应进程中 5'-CMP 的最适浓度,从而使 CDP-Ch 的产量猛增到 33—35 微克分子/毫升,其他产物此时很少生成<sup>[30]</sup>。

(2) 控制反应时间 不同时间终止反应往往可得不同产物。Tochikura 等人用酵母空气干燥细胞生产 CDP-Ch 时指出,反应系统中所加 5'-CMP 量随着反应的进行逐渐消耗,两小时后反应液中出现了 CDP 和 CTP。随着反应的继续进行,CDP 和 CTP 又逐渐消失,形成了 CDP-Ch,并在 12 小时后趋于稳定<sup>[8]</sup>。

(3) 控制细胞量 Tochikura 等人在用细胞酶系合成 UTP 的试验中指出,若加入的空气干燥酵母细胞的量为 100 毫克/毫升,反应 10—13 小时能生成 90—95 微克分子/毫升的 UTP,由于此产物能稳定一段时间,对实际生产来说是安全的;如果所加酵母细胞量增至 200—300 毫克/毫升时,促进了 UTP 的脱磷反应,UTP 迅速分解为各种尿苷衍生物<sup>[4]</sup>。

显然,上述三种控制办法都涉及到反应时间,选择一种能快速测定所需产物的方法是十分重要的。

## 反应条件的控制

细胞酶系转化法中,反应条件可区别为主要条件和辅助条件。前者包括温度、酸碱度和通气条件等,它们决定了反应进行的速度;后者包括控制酶反应速度的激活剂和抑制剂、影响细胞透性的表面活性剂以及促使所需反应产物保持下来的稳定剂等,它们一般不妨碍反应的进行,但关系到所需产物产量的高低。

关于主要反应条件的控制,除个别极特殊的例子外<sup>[5]</sup>,可归为两种情况。一是反应只是利用了细胞多酶系统中某一特定酶的反应,此

时所选反应条件应是该酶促反应的最适温度和酸碱度。例如, H. Kumagai 等人曾经从中间艾希氏菌 (*Escherichia intermedia*) 和草生欧文氏菌 (*Erwinia herbicola*) 的细胞中提取出酪氨酸酚解酶的结晶, 并确定了此酶催化从 L-丝氨酸和酚 (或磷苯二酚) 通过  $\beta$ -取代反应生成 L-酪氨酸 (或 L-多巴) 的反应条件<sup>[58, 59]</sup>, 以后 Enei 等人用草生欧文氏菌 ATCC 21434 完整细胞作酶源进行同样的试验, 发现二者所需酸碱度和温度基本一致<sup>[41]</sup>。二是利用细胞多酶系统进行多步酶促反应进行生产时, 似乎可以认为, 所选温度、酸碱度及通气条件, 应是该菌正常生活时的条件。从本文附表可以看出, 这类反应的温度一般在 28—42℃, 酸碱度一般在 pH 6—8。通气条件则视所用菌株属厌氧菌抑或好气菌而定。但是, 通气与否是相对的, 例如 Watanabe 和 Takeda 对利用烃类的假丝酵母 (*Candida* sp.) N-25-2 细胞 (它能厌氧地由糖产生 CO<sub>2</sub> 和乙醇) 和不能利用烃类的白色球拟酵母 (*Torulopsis candida*) IFO 0768 细胞 (它不能由糖厌氧地产生 CO<sub>2</sub>) 进行了细胞酶系转化 ATP 的比较试验。把这两株菌在装有 30 毫升和 150 毫升培养基的 500 毫升锥形瓶中, 振荡培养 40 小时, 收获细胞, 在相同条件下反应, 发现取自装 30 毫升培养基的两株菌的细胞由 AMP 合成 ATP 的能力均很弱, 尤其是假丝酵母在此条件下会把 AMP 强烈地降解为腺苷。然而, 来自装 150 毫升培养基的两株菌细胞均能由 AMP 合成 ATP, 而不会分解为腺苷。当然, 厌氧菌假丝酵母合成 ATP 的产量比白色球拟酵母要高<sup>[57]</sup>。

关于反应辅助条件的选择, 应考虑到产品化学性质、所用菌株类别、底物浓度及化学结构等多种因素。前面已经提及, 当使用完整细胞作酶源时, 为了增加细胞透性加入一定量合适的表面活性剂是必要的<sup>[4, 21, 27, 28, 36]</sup>。关于酶系激活剂和抑制剂, 一般说来需视合成产物在代谢途径中有关酶系的性质而定。例如 Mg<sup>2+</sup> 是磷酸激酶的激活剂, 它有利于 ATP 的形成<sup>[57]</sup>。但更多的需视具体情况而定, 例如 CTP 能抑制 CDP-Ch 形成<sup>[6]</sup>; NaF 有利于 UTP 合成, 而 Mg<sup>2+</sup>、

Zn<sup>2+</sup> 刺激 UTP 还原为 UDPG<sup>[21]</sup>。Kawaguchi 等人指出, 浓度为 20 微克分子/毫升的 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 只有在反应初期加入才能促进 GDPM 的形成, 当反应 12 小时后再加入, 即使其浓度增加到 60 微克分子/毫升, GDPM 的产量也不会增加。相反, 更高浓度的 MgSO<sub>4</sub> (80—100 微克分子/毫升) 会抑制反应的进行<sup>[24]</sup>。尽管情况是复杂的, 由于抑制剂和激活剂一般只需微量即能影响反应, 对细胞来说, 细胞内往往已经具有一定的此类物质 (这与通常的酶促反应不同, 也是本文把它列为辅助条件的理由之一)。正如 Enei<sup>[41]</sup> 等人指出的那样, 某些物质对代谢物的生成是必须的, 但反应系统中加该物质时增产效果不大, 说明细胞已有此类物质存在 (他称为内源性物质), 因此, 在新产品试制初期, 这类物质并不显得重要, 尤其是反应系统用自来水作溶剂的话更是如此。但当试验已经取得一定成效后, 调整这类物质的浓度, 往往能促使产物增加。

关于产物稳定剂的选择, 更需视产物的不同性质来决定, 有时还需采取一系列特殊的措施, 例如, 用细胞酶系合成 L-多巴时, 为了防止合成后的多巴在反应期间氧化分解, 在反应液中加入还原剂亚硫酸钠和螯合剂 EDTA<sup>[41]</sup>。又如 Enei 等人用邻苯二酚和 DL-丝氨酸为底物合成 L-多巴时, 发现邻苯二酚浓度大于 1% 会抑制 L-多巴之形成, 因为此浓度的邻苯二酚可使蛋白质变性。为了提高产量, 他们用流加法使邻苯二酚的浓度始终保持在 0.7%<sup>[41]</sup>。后来, 他们又把邻苯二酚制成溴酸复合物, 这样即使在高浓度时也不会使酶蛋白变性, 从而获得了 L-多巴的更高产量<sup>[43]</sup>。

## 操作中的一些有效措施

### 一、酶的诱导

为了提高产物得率, 不少报告提出对微生物细胞进行诱导培养的方法。例如 Enei 等人为了使得草生欧文氏菌 ATCC 21434 细胞具有高活力的酪氨酸酚解酶, 在培养基中加入适量的 L-酪氨酸作为该酶的诱导物。还证明同时

加入适量的吡哆醛、甘油、琥珀酸、某些氨基酸和金属离子等对该酶被 L-酪氨酸的诱导作用有增效的效果<sup>[42]</sup>。Watanabe 和 Takeda 也指出,以乙酸或乙醇作为碳源培养的假丝酵母 N-25-2 细胞几乎能把所有被试验的单核苷酸 (AMP、UMP、GMP 和 CMP) 磷酸化,但以烃类作为碳源培养的同种细胞,虽有很强的发酵活力却不能在相同条件下把相同的单核苷酸磷酸化,除非在反应系统中补加 1,6-二磷酸果糖<sup>[57]</sup>。但是,除非为生产某种特殊且贵重的产品而培养菌体细胞外,直接利用发酵工厂废弃之活菌体,仍是一个重要途径。事实上发酵工厂废弃之活菌体的某些酶也往往已经在培养过程中被诱导了,问题在于了解它们适合生产哪种产品。

## 二、两种细胞的反应

Tochikura 等人用细胞酶系转化法生产 6-磷酸葡萄糖酸盐 (6-PG) 时发现,反应体系由两个偶联的反应环所组成,即通过糖酵解使腺苷磷酸化形成 ATP 的反应和通过葡糖酸激酶系统使葡糖酸磷酸化的反应相偶联。据此,他们在反应系统中同时加入了具有糖酵解活力的酵母空气干燥细胞和具有葡糖酸激酶活性的产气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*) 的空气干燥细胞,经反应 5 小时后得到了 121—158 微克分子/毫升的 G-6-P<sup>[4]</sup>。我们曾用细胞酶系转化法自腺嘌呤生产 ATP,并指出此过程需采用两步反应法<sup>[56]</sup>。这种方法在生产中取得了缩短反应时间,降低成本的效果。就目前资料看,细胞酶系转化法中,在同一反应系统内使用两种细胞(或细胞和酶制剂混合使用<sup>[4]</sup>)的方法,还较新颖。这是一种可以互相补充酶源的好方法,尤其在须经许多酶反应才能获得产物的情况下,更是如此。

## 三、与发酵法结合的反应

Shimizu 等人按照一般的发酵法把产氨短杆菌接种于含有碳、氮源的常用发酵培养液中,当发酵进行三天后,向培养基上添加细胞酶系合成法所用的反应液,即加入泛酸钙、半胱氨酸

以及表面活性剂等,再继续培养 2—4 天,结果得到了每毫升反应液含 3 毫克 CoA<sup>[29]</sup>。这种措施给了我们一种启示,是否可在现有用发酵法生产属于小分子代谢产物(如谷氨酸、井冈霉素等)的过程中,于后期添加此产品的前体及表面活性剂以提高产物积聚量,然后再取菌体用细胞酶系转化法生产其他产品呢?这是值得一试的。

## 四、固定化微生物细胞

固定化微生物细胞是细胞酶系转化法用于工业生产的必然发展结果,把细胞固定化使之反复使用,这对工业生产是十分有利的。Shimizu 等人用产氨短杆菌空气干燥细胞进行了细胞酶系转化 CoA 的一系列研究<sup>[25, 26, 29]</sup>,于 1975 年把该菌的风干细胞用聚丙烯酰胺包埋法固定化,贮于 0—4℃ 下达 45 天仍然稳定<sup>[48]</sup>。由于这方面的工作国内已有资料综述<sup>[49]</sup>,这里不再重复。

## 细胞酶系转化法的应用

应用细胞酶系转化法目前已能生产数十种小分子的代谢物。根据前述原理,可以预期一些结构清楚,代谢途径已经明确的代谢物,如青霉素、 $\alpha$ -酮戊二酸等也可能应用细胞酶系转化法来生产。

目前已知,仅用啤酒厂废弃的啤酒酵母泥已能合成 ATP、GDPG、CDP-Ch 等十多种产品,这是用细胞酶系转化法进行综合利用的极好例证。

细胞酶系转化法的另一重要用途是,它可以方便而又安全地得到由各种放射性同位素标记的小分子的生化代谢物。例如 Kariya 等人自含有 <sup>32</sup>P 的无机磷缓冲液等的反应液中制得 CMP-<sup>32</sup>P-氨乙醇;由 <sup>14</sup>C 标记的氨乙醇和 CMP 制得了 <sup>14</sup>CDP;由 <sup>32</sup>P-无机磷缓冲液及 <sup>14</sup>C-氨乙醇等合成了 CMP-<sup>32</sup>P-<sup>14</sup>C-氨乙醇的双标记制剂<sup>[7]</sup>。

细胞酶系转化法亦可以直接用于许多生化和微生物的理论问题的研究,例如菌株诱变<sup>[5]</sup>、

表 用细胞酶系转化法生产的某些代谢物

菌种	细胞处理	反 应 系 统	反应条件	产 物	文 献
面包酵母	磨碎细胞或丙酮干燥细胞	5'-AMP 15 微克分子/3毫升 葡萄糖 167 微克分子/3毫升 Pi-K(pH7.0) - 333 微克分子/3毫升 <sup>1)</sup> 细胞 50 毫克/3毫升	37°C, 静止 反应 3 小时	ATP ADP	[1]
假丝酵母 N-25-2 或白色球拟酵母 IFO 0768	冰冻干燥细胞	5'-AMP (或 GMP, CMP, UMP) <sup>2)</sup> 20 毫克分子 葡萄糖 200 毫克分子 MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O 10 毫克分子 Pi-K(pH7.0) 200 毫克分子 甲苯 5% (体积/体积) 细胞 5% (重量/体积)	37°C, 静止 反应 3 小时	ATP, 腺苷 (或 GTP, GDPM, CTP, UTP, UDPG)	[57]
啤酒酵母	湿细胞	5'-AMP 10 克 葡萄糖 100 克 10%KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 150 毫升 10%K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 376 毫升 10%MgCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O 10 毫升 细胞 800 克 总体积 1000 毫升	32°C, 静止 反应 3 小时	ATP	[60] [61]
假丝酵母 N-25-2	冰冻干燥细胞	5'-UMP 20 毫克分子 葡萄糖 400 毫克分子 MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 15 毫克分子 Pi-K(pH7.0) 200 毫克分子 甲苯 2% (体积/体积) 细胞 6% (重量/体积)	30°C, 振荡 反应 4—6 小时	UTP, UDPG, UDPM, (或胞二磷胆碱) <sup>3)</sup>	[2]
啤酒酵母及产气气杆菌	空气干燥细胞	葡萄糖 600 微克分子/毫升 葡萄糖酸钠 200 微克分子/毫升 Pi-K(pH7.4) 600 微克分子/毫升 ATP 5 微克分子/毫升 MgSO <sub>4</sub> 20 微克分子/毫升 NAD 50 微克/毫升 TPP 50 微克/毫升 酵母干细胞 50 毫克/毫升 产气气杆菌干细胞 40 毫克/毫升	37°C, 静止 反应 5 小时	6-PG	[4]
加氏汉森酵母 IFO0987	空气干燥细胞	5'-CMP 20 微克分子/毫升 磷酸胆碱 50 微克分子/毫升 葡萄糖 600 微克分子/毫升 Pi-K(pH8.0) 300 微克分子/毫升 MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 30 微克分子/毫升 细胞 100 毫克/毫升	28°C, 振荡 反应 4 至 8 小时	胞二磷胆碱 <sup>4)</sup>	[6] [7]
面包酵母	磨碎细胞	5'-UMP 20 微克分子/毫升 葡萄糖 400 微克分子/毫升 Pi-K(pH7.0) 90 微克分子/毫升 MgSO <sub>4</sub> 12 微克分子/毫升 细胞 60 毫克/毫升	28°C, 振荡 7 小时	UDPG	[20]
白色球拟酵母 IFO 0768	空气干燥细胞	5'-UMP 50 微克分子/毫升 半乳糖 500 微克分子/毫升 Pi-K(pH7.4) 500 微克分子/毫升 MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O 25 微克分子/毫升 细胞 250 毫克/毫升	30°C, 振荡 反应 6 小时	UDP-Gal	[16] [17]

续 表

菌 种	细胞处理	反 应 系 统	反应条件	产 物	文 献
面包酵母类球形德巴利酵母 ( <i>Debaryomyces subglobosus</i> ) IFO 0794 或球形德巴利酵母 ( <i>D. slobo-sus</i> )	空气干燥细胞	5'-UMP 50 微克分子/3毫升 D-葡萄糖 HCl 50 微克分子/3毫升 D 果糖 200 微克分子/3毫升 Pi-K(pH 7.0) 500 微克分子/3毫升 CaCl <sub>2</sub> 10 微克分子/3毫升 细胞 300 毫克/3 毫升	28℃, 振荡 反应12小时	UDP-N-乙 酰葡萄糖胺	[18] [19]
链霉菌 ( <i>Streptomyces</i> sp.) AKU 2801	空气干燥细胞	GTP·(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> 20 微克分子/毫升 1-磷酸葡萄糖 100 微克分子/毫升 Pi-K(pH 7.0) 270 微克分子/毫升 MgSO <sub>4</sub> 20 微克分子/毫升 细胞 100 毫克/毫升	28℃, 振荡 反应 4 小时	GDPG	[21]
面包酵母或加氏汉森酵母 IFO 0987	空气干燥细胞	GMP·Na <sub>2</sub> 20 微克分子/毫升 葡萄糖 800 微克分子/毫升 Pi-K(pH 7.0) 270 微克分子/毫升 MgSO <sub>4</sub> 20 微克分子/毫升 细胞 100 毫克/毫升	28℃, 振荡 反应 8—12 小时	GDPM	[22—24]
产氨短杆菌 IFO 12071	空气干燥细胞	葡萄糖 35 毫克分子 泛酸钠 3 毫克分子 半胱氨酸 6 毫克分子 ATP 6 毫克分子 Pi-K(pH 6.0) 45 毫克分子 十二烷基苯磺酸钠 600 毫克 细胞 30 克 总体积 300 毫升	37℃, 振荡 反应10小时	CoA 脱磷 CoA, 4'-磷 酸泛酸	[25—27]
产氨短杆菌 IFO 12071	空气干燥细胞	泛酸钠 3.4 毫克分子 ATP 5.1 毫克分子 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 3.4 毫克分子 Pi-K(pH 6.0) 34 毫克分子 十二烷基硫酸钠 680 毫克 细胞 20.4 克 总体积 340 毫升	37℃, 振荡 8 小时	4'-磷酸泛酸	[32]
<i>Rhodotorula glutinis</i> IFO 0389	湿细胞或空气干燥或丙酮干燥细胞	L-苯丙氨酸 40 微克分子 Tris-HCl(pH 8.5) 200 微克分子 细胞 20 毫克 总体积 4 毫升	37℃, 振荡 反应 1 小时	反式肉桂酸	[33]
<i>Rhodotorula texensis</i> IFO 0932	丙酮干燥细胞	L-苯丙氨酸 10 微克分子/毫升 Tris-HCl(pH 8.5) 400 微克分子/毫升 细胞 80 毫克/毫升	37℃, 振荡 反应 1 小时	反式香豆酸, 反式肉桂酸	[34]
微球菌 ( <i>Micrococcus</i> sp.) No431	湿细胞	蔗糖 30 微克分子/毫升 维生素 B <sub>6</sub> 25 微克分子/毫升 Pi-K(pH 8.0) 100 微克分子/毫升 细胞 43 毫克/毫升	37℃, 振荡 反应20小时	维生素 B <sub>6</sub> 葡 糖苷	[35]
雷氏变形菌 ( <i>Proteus retigeri</i> ) Aj 2770	湿细胞	丙酮酸钠 20 毫克/毫升 吡啶 20 毫克/毫升 乙酸钠 50 毫克/毫升 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 毫克/毫升 EDTA 3 毫克/毫升 维生素 B <sub>6</sub> 磷酸 0.1 毫克/毫升 细胞 4 毫克/毫升	37℃, pH 9.0 保温反应 16 小时	L-色氨酸	[36]



续 表

菌 种	细胞处理	反 应 系 统	反应条件	产 物	文 献
玫瑰色产氨短杆菌( <i>Brevibacterium roseum</i> ) ATCC 13825	湿细胞	DL- $\alpha$ -羟基异己酸(用氨水中中和到 pH7.0) 10 克/升 谷氨酸钠 30 克/升 收获自 1 升培养液之湿细胞	30°C, 保温 48 小时	L-亮氨酸(L-苯丙氨酸, L-缬氨酸) <sup>1)</sup>	[38]
草生欧文氏菌 ATCC 21434	湿细胞	L(D)-半胱氨酸 10 毫克 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 毫克 EDTA 10 毫克 NH <sub>4</sub> Cl 50 毫克 细胞 100 毫克 总体积 10 毫升 用氨水调至 pH 8.0	30°C, 保温 反应 4 小时	丙酮酸	[40]
同上	湿细胞	DL-丝氨酸 4 克 酚 1 克 乙酸铵 1 克 细胞 10 克 总体积 100 毫升 氨水调至 pH 8.0	37°C, 反应 16 小时	L-酪氨酸	[41] [42]
同上	湿细胞	DL-丝氨酸 2 克 邻苯二酚 0.7 克 乙酸铵 1 克 Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> 0.2 克 EDTA 0.1 克 细胞 10 克 总体积 100 毫升 氨水调至 pH 8.0	22°C, 反应 48 小时	L-多巴	[41] [42]
粪产碱菌( <i>Alcaligenes faecalis</i> ) IAM 1015	湿细胞	3,4-二甲基内酮酸 30 毫克 L-谷氨酸 30 毫克 L-天门冬氨酸 30 毫克 细胞 50—70 毫克 总体积 4 毫升 用 KOH 调至 pH 7.5	30°C, 充氮 气下反应 <sup>2)</sup> 24 小时	3,4-二甲苯基-L-丙氨酸(DMPA)	[44]
淡紫梨头霉( <i>Abisidia orchidis</i> )	湿细胞	化合物“S” 0.3 克 NaCl 0.15 克 乙酸镁 0.1 克 KNO <sub>3</sub> 0.1 克 对氯苯双胍己烷 10 <sup>-2</sup> (即洗必泰) 50 微克 细胞 10 克 总体积 100 毫升	28°C, 振荡 反应 20 小时	氢化可的松	[46]

注: 1) Pi-K(pH 7.0) 表示磷酸钾缓冲液 (pH 7.0)。

2) 当 5'-AMP 分别被括号中的核苷酸替代时, 可分别生成产物项下括号内相应的物质。

3) 若需得 CDP-Ch 时, 只需在此反应液中加入 40 毫克分子磷酸胆碱或 150 毫克分子氯化胆碱即可。

4) 用浓度为 80 微克分子/毫升的一系列胆碱衍生物, 如乙醇胺, 二甲基乙醇胺等替代反应系统中的磷酸胆碱时, 就可得到一系列相应的胞二磷胆碱衍生物。

5) 反应系统中之 DL- $\alpha$ -羟基异己酸若用 DL- $\beta$ -苯基乳酸或 DL- $\alpha$ -羟基戊酸替代时, 可分别生成 L-苯丙氨酸和 L-缬氨酸。

诱导酶的机理<sup>[33]</sup>、酶促机制<sup>[4,7,40,57]</sup>、代谢物的生物合成途径<sup>[2,17,61]</sup>、能量转化<sup>[24,27]</sup>、细胞透性与代谢物的关系<sup>[45]</sup>等。

细胞酶系转化法有一定的局限性，一是只能用于小分子代谢物的工业生产（实验室中已有用完整细胞合成蛋白质等）；二是反应后出现多种产品使提纯工艺复杂化；三是细胞有完整的多酶系统，控制不当往往合成不需要的产物，或者把已合成的产物进一步转化为无益的物质。

### 参 考 文 献

- [1] Tochikura, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 45: 511, 1967.
- [2] Shirota, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 35: 325, 1971.
- [3] Tanaka, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 32: 721, 1968.
- [4] Tochikura, T. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 29: 59, 1974.
- [5] Kimura, A. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 40: 93, 1976.
- [6] Kariya, Y. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 29: 75, 1974.
- [7] Kariya, Y. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 53: 599, 1975.
- [8] Tochikura, T. et al.: *ibid.*, 48: 763, 1970.
- [9] Tochikura, T. et al.: *ibid.*, 48: 769, 1970.
- [10] Kimura, A. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 35: 1955, 1971.
- [11] Tochikura, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 52: 637, 1974.
- [12] Kariya, Y. et al.: *ibid.*, 53: 278, 1975.
- [13] 上海师范大学生物系、上海味精厂: 生物化学与生物物理学报, 8:199, 1976。
- [14] Tochikura, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 49: 1005, 1971.
- [15] Tochikura, T. et al.: *ibid.*, 50: 178, 1972.
- [16] Tochikura, T. et al.: *ibid.*, 46: 970, 1968.
- [17] Kawai, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 35: 1578, 1971.
- [18] Tochikura, T. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 22: 38, 1970.
- [19] Tochikura, T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 35: 163, 1971.
- [20] Tochikura, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 46: 975, 1968.
- [21] Tani, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37: 75, 1973.
- [22] Tochikura, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 47: 564, 1969.
- [23] Kawaguchi, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 34: 908, 1970.
- [24] Kawaguchi, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 49: 195, 1971.
- [25] Ogata, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 34: 1757, 1970.
- [26] Ogata, K. et al.: *ibid.*, 36: 84, 1972.
- [27] Ogata, K. et al.: *ibid.*, 36: 93, 1972.
- [28] Shimizu, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36: 370, 1972.
- [29] Shimizu, S. et al.: *ibid.*, 37: 607, 1973.
- [30] Shimizu, S. et al.: *ibid.*, 37: 615, 1973.
- [31] Nishimura, N. et al.: *Appl. Microbiol.*, 28: 117, 1974.
- [32] Shimizu, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37: 875, 1973.
- [33] Ogata, K. et al.: *ibid.*, 31: 200, 1967.
- [34] Kawaguchi, K. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 49: 222, 1971.
- [35] Kawai, F. et al.: *ibid.*, 35: 184, 1971.
- [36] Nakazawa, H. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 27: 19, 1973.
- [37] Fukuda, Y. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 49: 1011, 1971.
- [38] Matsushima, H. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 32: 63, 1975.
- [39] Enei, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36: 1861, 1972.
- [40] Enei, H. et al.: *ibid.*, 36: 1869, 1972.
- [41] Ebei, H. et al.: *ibid.*, 37: 493, 1973.
- [42] Enei, H. et al.: *ibid.*, 37: 485, 1973.
- [43] Enei, H. et al.: *ibid.*, 37: 725, 1973.
- [44] Nagasaki, T. et al.: *ibid.*, 37: 2841, 1973.
- [45] Matsushima, H. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 32: 69, 1975.
- [46] 冯汉昌、于连生: 微生物学报, 16:177, 1976。
- [47] Shimizu, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 53: 77, 1975.
- [48] Saif-ur-Rehman, S. et al.: *ibid.*, 53: 380, 1975.
- [49] 孟广震: 微生物学通报, 4:41, 1977。
- [50] Pierpoint, W. S. et al.: *Biochem. J.*, 56: 130, 1954.
- [51] Pierpoint, W. S. et al.: *ibid.*, 61: 368, 1955.
- [52] Tanaka, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36: 867, 1972.
- [53] Brown, G. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 234: 370, 1959.
- [54] Brown, G. M. et al.: *ibid.*, 234: 379, 1959.
- [55] 中国科学院西北水土保持生物土壤研究所微生物研究室: 微生物学报, 17:47, 1977。
- [56] 中山大学生物系生化微生物教研室: 中山大学学报(自然科学版), 1975年, 第3期, 第15页。
- [57] Watanabe, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36: 2265, 1972.
- [58] Kumagai, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35: 769, 1970.
- [59] Kumagai, H. et al.: *ibid.*, 34: 266, 1969.
- [60] 中山大学生物系生化微生物教研室: 微生物学报, 13: 185, 1973。
- [61] 欧伦英等: 中山大学学报(自然科学版), 1974年第4期, 第97页。