非水介质中不同反应体系的酶促反应

刘 薇 王乃兴* 李文军

(中国科学院理化技术研究所 北京 100101)

摘 要 简要评述了近年来五种不同反应体系(有机溶剂体系，反胶束体系，超临界流体体系，低共熔体系和气相体系)中酶催化反应的进展，并对不同体系中酶促反应的主要影响因素作了简要概述。

关键词 酶促反应 有机溶剂 反胶束 超临界流体 低共熔多相混合物 气相

Enzymatic Reactions in Different Reaction Systems of Non-aqueous Media

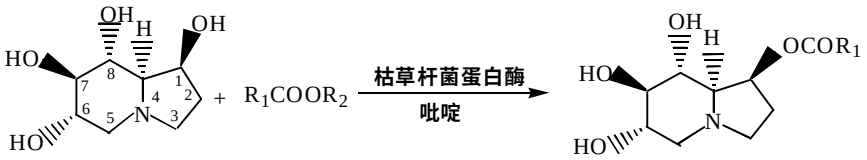
Liu Wei, Wang Naixing*, Li Wenjun

(Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences Beijing 100101)

Abstract The new processes of enzymatic catalysis in different reaction systems (organic solvent, mixed reverse micelles, supercritical liquid, heterogeneous mixtures of substrates, gas phase) were reviewed. And the primary factors that influence the enzymatic reactions in different systems are introduced triefly.

Key words Enzymatic catalysis, Organic solvent, Mixed reverse micelles, Supercritical liquid, Heterogeneous mixtures of substrates, Gas phase

酶是一类由生物细胞产生且具有催化活性的特殊蛋白质。由于酶催化反应具有专一性强（酶催化具有区域选择性和立体选择性）、催化效率高、在常温常压等温和条件下能进行操作等优点，从而引起了众多学者的兴趣。而酶在非水介质中同样具有催化活性的发现[1]，促进了非水酶学的兴起，使之成为目前重要的酶技术之一。随着研究的深入和学科的交叉，各种新的酶促反应体系也相继被发现[2,3]，大大拓宽了酶催化反应的应用范围，使酶法合成逐步发展成为与化学法合成相互补充的合成方法。如 Margolin 等[4]研究了在无水吡啶中以枯草杆菌蛋白酶为催化剂的选择性酰化反应，该反应可以得到 1 位选择性酰化产物。



(1)

R_1= 烷基，芳基，α-氨基烷基；R_2 = 氯乙基，2,2,2-三氟乙基，乙烯基

反应中使用丁酸氯乙酯、三氯乙酯或三氟乙酯等活泼酯作为羧基组分可促进反应的进行。同样的条件下甚至可以形成 *D*-构型的氨基酸酰化产物。而传统的化学法是无法区分这些二级羟

刘 薇 女，25 岁，硕士生，现从事有机合成研究。 *联系人

基的，显示了酶法合成的优越性。

1 有机溶剂中的酶促反应

近年来有机溶剂中的酶促反应成为人们的研究热点，这是因为它有许多突出的优点：有机底物在有机溶剂中有较大的溶解度；在有机溶剂中，酶的热稳定性和储存稳定性比在水中有明显提高；在有机溶剂中，某些反应过程的热力学平衡可以向期望的方向移动，可以发生水溶液中不可能进行的反应，如脂肪酶催化酯交换和酯合成反应等；在有机溶剂中，酶分子构象表现出比在水溶液中更有刚性的特点，因而可以通过选择不同性质的溶剂来调控酶的某些选择性；产物的分离与纯化比在水中容易；另外，酶不溶于有机溶剂，因此有利于酶的回收与再利用等[5]。

这里所说的有机溶剂并不是绝对无水的，只是体系中含水量较少而已。事实上，水在酶催化反应中发挥着双重作用[1,6]：水分子直接或间接地通过氢键、疏水键及范德华力等非共价键相互作用，来维持酶的催化活性所必需的构象。与酶分子紧密结合的一层左右的水分子对酶的催化活性是至关重要的，称之为“必需水”。不同酶与必需水结合的紧密程度及所结合的必需水数量是不同的。另一方面，水是导致酶的热失活的重要因素。有水存在时，随着温度的升高，酶分子会发生以下变化而失活：(1)形成不规则结构；(2)二硫键受到破坏；(3)天冬酰胺和谷氨酰胺水解变为相应的天冬氨酸和谷氨酸；(4)天冬氨酸肽键发生水解。因此，在非水相酶反应体系中存在着“最佳含水量”。该“最佳含水量”不仅取决于酶的种类，也与所选用的有机溶剂有关。

在有机介质酶促反应体系中，水起着至关重要的作用。研究中常用水活度 a_w 表征酶表面的水含量大小。a_w 被定义为在一定温度和压力下反应体系中水的蒸气压和同样状态下纯水的蒸气压之比。当体系达到平衡态时，体系中各部分的 a_w 值相等。由于有机介质酶促反应体系中水的重要作用，可以通过体系中含水量的不同使反应向所期望的方向发展。一方面可以通过调节含水量影响酶的水化程度及物理状态，使酶根据需要表现出不同的催化活性。另外，还可以通过改变体系中水的活度而改变反应的平衡点。例如，随着水活度的降低，脂肪酶催化反应难易程度有如下顺序：水解>醇解>酯交换>酯化[7,8]。在反应介质中可能同时存在不同反应，但通过控制水的活度，可使所期望的反应占主导地位。

反应体系中的有机溶剂对酶促反应也有一定影响。它主要通过以下三种途径发生作用：一是有机溶剂与酶直接发生作用，通过干扰氢键和疏水键等改变酶的构象，从而导致酶的活性被抑制或酶的失活；二是有机溶剂和能扩散的底物或反应产物相互作用，影响正常反应的进行；三是有机溶剂还可以直接和酶分子周围的水相互作用。一般认为，在非水相反应体系中，极性强的有机溶剂对酶的催化活性不利，因为它们会剥夺酶表面微环境中的必需水而使酶失活。所以在多数情况下，酶在疏水性强的有机溶剂中保持较高的活性[9,10]。研究表明在非水介质中加入某些添加剂如乙二醇、多元醇聚合物[11]，大环有机物[12]如硫冠醚[13]及非缓冲体系的盐类[14]均可起到稳定酶或增强其活性及选择性的作用。

酶在非水溶剂中反应的研究，在国外已取得突破性进展，并不断扩大其应用范围。如用酶催化转酯反应拆分外消旋体，已获得高光学纯度的对映体[15,16]；在酶促反应体系中添加β-环糊精可提高对映体的纯度[17]；枯草溶菌素有效地催化合成氨基酸及肽的酯[18]。这一领域在国内也受到了大家的重视。如杨波等[19]提出了有机溶剂中在 Lipase from Candida Antrarctica(CAL)脂肪

酶的催化作用下，含手性中心碳原子的胺类化合物酰胺化的异构选择性规则；韦丽红等[20]用胰脂酶在有机介质中催化反应，得到高光学纯度的 2-氨基丙醇(*R*)(-)和(*S*)(+)对映体；宗敏华等[21]探讨了超声辐射对有机相中脂肪酶催化有机硅醇与脂肪酸酯化反应的促进作用。刘平等[22]研究了有机溶剂中酶催化合成五肽前体的反应。此外，最近又有研究成果表明，有机溶剂体系也可使用混合有机溶剂体系[23]，如在乙醇中加入疏水有机溶剂等[24]。

有机溶剂中的酶促反应在有机合成中表现了良好的应用前景。然而，影响酶促反应的因素是复杂的。体系中的含水量、有机溶剂的性质、添加剂的种类和浓度、底物性质等都对反应结果有一定影响。因此，对于有机溶剂中的酶促反应的内在规律及调控还需要作进一步探讨。

2 反胶束体系中的酶促反应

反胶束是表面活性剂分子在非极性溶剂中自发形成的聚集体。表面活性剂分子的极性一端朝内而非极性一端朝外与有机溶剂接触。胶团内可溶解少量水而形成微型水囊，里面容纳酶分子。这种“水囊”中的环境与生物物质的固有环境相类似，当酶在其中起催化作用时，活性保持不变。同时，包埋于反胶团中的酶不仅避免了与周围有机溶剂直接接触而可能导致的失活，而且高度分散的反胶团提供了巨大的相界面积，使得通过反胶团内外间的传质阻力变得很小。特别是当产物为非水溶性时，其一经形成即转入有机相而远离酶，可有效地减弱其对反应的抑制作用[25]。

反胶束体系中所用的表面活性剂可以是阳离子型、阴离子型，也可以是两性型或非离子型[26,27]。如：二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠(AOT)、十二烷基聚氧乙烯醚($C_{12}E_4$)、卵磷脂、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)等。而有机溶剂常选用正辛烷或异辛烷，因为憎水溶剂不会破坏酶周围的水层，从而使酶处于活性状态[28]。由于水是维持酶的催化构象和作用所必需的，所以反胶束体系中的含水量是影响酶活性的关键因素。含水量大小常以水与表面活性剂摩尔比 W_0 表示，即 $W_0=[H_2O]/[SAA]$。研究表明不同的酶有不同的最适 W_0 值，该值取决于表面活性剂和酶的性质，意味着反胶束的内核体积与酶分子体积相适应。酶活力与 W_0 的关系一般符合钟形曲线[29,30]。

此外，水相的 pH 会通过改变酶表面的电荷而改变酶的催化活性；而且，它对酶构象的改变也有一定影响[28]。

由于反胶束体系既能为反应物和产物提供有机相，又能为酶分子维持其活性提供稳定的微环境，因此近年来受到人们的普遍关注。其中研究最多的是肽的合成和脂肪酶的催化反应。如 Xing 等[31]研究了 AOT/正辛烷的反胶束体系中α-胰凝乳蛋白酶催化合成肽衍生物的反应，得到 56%～88%的产率。而且还对反应体系的 W_0 值，反应时间和酶浓度等条件进行了讨论。

$$\text{ZTyrOEt} + \text{GlyGlyOEt} \xrightarrow[\text{反胶束体系}]{\text{胰凝乳蛋白酶}} \text{ZTyrGlyGlyOEt} \qquad (2)$$

Tsai 等[32]研究了 AOT/异辛烷/磷酸缓冲液中脂肪酶催化油脂水解反应时表面活性剂浓度对 Cabdida Rngosa 脂肪酶(CRL)水解活力的影响。李干佐等[33]研究了 AOT/异辛烷/水体系中 Candida lipolytical(CL)脂肪酶催化庚酸和庚醇的酯化反应动力学。Rees 等[27]研究了阳离子表面活性剂 CTAB 的反胶束体系中 Chromobactrum viscosum 脂肪酶(CVL)催化癸酸辛酯的合成。Chen 等[34]在反胶束体系中用不同的蛋白酶合成了二肽。此外，马成松等[35]还研究了辣根过氧化物酶在 AOT/

水/异辛烷中的多底物酶促反应。随着研究的不断深入，在反胶团中进行酶的催化合成反应不仅在理论方面，而且在应用开发上同样具有广阔的前景。

3 在超临界流体中的酶促反应

在有机介质中进行酶促反应时，传统有机溶剂中酶促反应的产物中不可避免地会残留或多或少的有机溶剂，易对食品和医药造成污染。为了克服这一缺点，另一种颇具特色的非水介质-超临界流体开始受到大家的关注。

超临界流体除具有传统有机溶剂的所有优点外，还具有其独特的优越性。它除了具有液体的高密度性，还具有气体的高扩散系数、低粘度和低表面张力，使底物向酶的传质速度加快，从而使反应速度提高。如 Marty 等[36]通过实验表明，超临界流体的高扩散系数消除了外传质的影响。而且超临界流体可通过温度或压力的微小变化来改变溶剂的性质，如超临界流体的密度，粘度和溶解能力等。因此可根据不同物质在不同温度和压力下溶解度不同，方便地将酶促反应产物从残留反应物和副产物中分离出来，而且超临界流体在反应后可被彻底清除，产物中不留下任何溶剂。

超临界流体作为酶的反应介质，对酶促反应起着重要的作用。它能够改变酶的底物专一性、区域选择性和对映体选择性，并能增强酶的稳定性。而且酶在不同超临界流体中的活性也存在差异[37]。常用的超临界流体有 CO_2,、SO_2、C_2H_4,、C_2H_6、C_3H_8、C_4H_{10} 等。其中以 CO_2 最为常见，主要是因为它临界条件温和，利于酶保持生物活性。而且 CO_2 价格便宜、无毒无污染，符合当今绿色化学发展的方向。但也有人认为超临界 CO_2 对某些酶促反应而言不是一种良好的反应介质。因为 CO_2 是非极性的，对极性底物的溶解度较低，不利于反应的进行。同时，Kamat 等[38]的研究结果显示，对于异丁烯酸甲酯和丁醇间的转酯反应而言，超临界 CO_2 也不是理想的溶剂，因为它可以改变酶周围微水环境的酸度，而且还能与酶蛋白表面的自由氨基生成共价络合物而降低酶的活性。

同有机溶剂中的酶促反应一样，系统含水量对超临界流体中的酶促反应也有较大影响。在酶需要少量水维持其活性构象的同时，过量的水又会引起酶活性中心的内部水簇的生成而导致酶活性的降低[39]。此外，酶分子的固定化及固定化载体的选择等因素都对酶促反应有影响。

关于超临界流体中酶促反应的研究已有相关报道。如 Gunnlangsdottir 等[40]研究了用固定化酯酶催化醇解鱼肝油制备不饱和脂肪酸的反应；Rantakyla 等[41]研究了布洛芬(α-甲基-4-(2-甲基丙基)苯乙酸)和正丙醇在脂肪酶催化下的手性合成反应。目前，它的应用还有一定的局限性。因此，继续探讨超临界流体中酶促反应的反应机理，通过酶的修饰提高酶在反应介质中的活性，通过添加辅助剂来增加底物在超临界流体中的溶解度等都可以作为今后研究的方向，以达到进一步扩大其应用范围的目的。

4 低共熔多相混合物中的酶促反应

在有机溶剂中进行酶催化反应时，通常要选择对反应底物的溶解性好而又不使酶失活的溶剂，而在某些酶促反应中很难找到这样合适的溶剂。因此，直接利用固相反应物形成低共熔多相混合物作为反应体系进行酶促反应现在逐渐受到人们的关注。

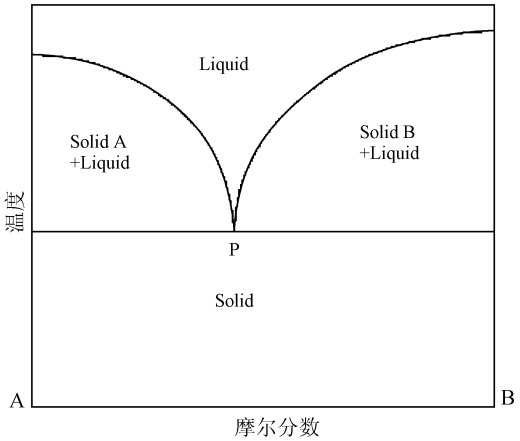


图 1 低共熔混合物相图示意图

Fig.1 Phase diagram for eutectic system

所谓低共熔混合物是指将两种纯净物按不同比例相混合，在一定组成下，相图上出现了一个最低熔化温度点，即低共熔点(即图 1 中点 P)，此时形成的混合物叫低共熔混合物。低共熔点一般比任何一种纯净物的熔点都低。当体系温度高于低共熔温度时，反应体系中就会产生包含各种反应物的液相。实验证明，酶促反应正是在低共熔混合物中的液相发生的[42]。另外，在低共熔体系中加入一定量的辅助剂，可以加快低共熔体系中液相的形成，提高反应速度[43]。

体系中加入的辅助剂主要是一些亲水性的含氧有机溶剂如醇、酮、酯等[42]，它的主要作用是改善低共熔体系的性质，而不是反应的溶剂。辅助剂在反应机理中起着复杂的作用，主要是影响体系中液相的组成和理化性质，其次对酶的活性、产物的结晶也有影响，而且它还与反应的产率有关[43]。尽管辅助剂的种类和用量随反应和酶的不同而变化，但辅助剂的 Hilderbrand 溶解度参数(d)值在 8.5～10.0 之间，lg$P$(P 表示一种有机溶剂在正辛醇和水两相溶液中的分配系数)在–1.5～–0.5 之间为最好[44]。

总之，低共熔多相混合物体系中的酶促反应不需溶剂、成本低、污染少、纯化过程容易，而且避免了有机溶剂对酶活性的影响，因此有着广阔的应用前景，对食品、制药等产品纯度要求较高的行业来说更具有深远的意义。但目前对它的研究主要限于肽类和酯类的合成。如 Gill 等[45]研究了寡肽的合成；刘伟雄等[46]研究了乌桕酯(Chinese vegetable tallow, CVT)与硬脂酸甲酯的酯交换反应；夏咏梅等[47]研究了脂肪酶催化合成单脂肪酸甘油酯的反应等。继续研究该反应的动力学模型，逐渐摸索酶促反应中各因素的调控，使之更好的用于大规模生产等都是今后研究发展的方向。

5 气相中的酶催化反应

为了克服酶促反应底物在水相中溶解度较小的缺点，人们研究了有机溶剂中的酶催化反应并取得了很大的进展。而气相中的生物催化反应在克服了这一困难的同时，又有优于液相反应的优点：某些酶在液相中使用受到一定的限制，如酶和辅酶的操作不稳定性、底物及产物的不溶性和酶的活性被产物抑制等[48]。而气相中的反应就可以克服这些缺点，而且气相中的酶促反应更利于易挥发性产品的生产。

“必需水”数量一直是酶促反应中所研究的重要内容。Hwang 等[49]研究了固定化醇氧化酶在气相中的催化反应：

$$C_2H_5OH\,(g) + O_2\,(g) \xrightarrow{\text{乙醇氧化酶}} CH_3CHO\,(g) + H_2O_2\,(g) \qquad (3)$$

他们认为生物酶在含水量很小，已不能在酶蛋白质表面形成单分子覆盖层时，仍可以催化气相底物。而且，水活度越高反应速度越快。但水活度高，酶的稳定性下降。另外，Robert 等[50]在研究脂肪酶的酯交换反应中发现，当生物酶有一完整的水层时，活性和稳定性最大。若酶的水含量低于形成完整水层，则酶的活性不能完全发挥，但酶不会变性。

尽管生物酶用于气相催化不适用于糖、氨基酸等不易挥发的底物，但它将来可用于某些易挥发产品的工业生产以及有害气体的分析和处理，是一种可行的新技术。然而，我们在这方面的工作还很有限，需要进一步研究其动力学和其他相关的影响因素。

6 结束语

综上所述，非水介质中的酶催化反应以其独特的优越性引起了广大生物学家和化学家的兴趣。许多研究工作者正致力于这一领域的探索。人们在不断的发掘新酶，深入研究其结构和催化机理，摸索不同反应体系中酶催化活性的变化及其对反应的影响等。我们相信，随着生物学，化学和其它相关学科的发展，酶催化反应的机制将会被人们认识和掌握，酶法和化学法相结合将会使有机合成化学更好地应用于各个领域。

参考文献

[1] A Zaks, A M Klibanov. Science, 1984, 224 (15): 1294~1251.
[2] 闫爱新, 田桂玲, 叶蕴华. 化学进展, 2001, 13 (5): 203~208.
[3] 冯柏成, 袁卫平, 杨 丽 等. 化工进展, 1998, 4: 17~19.
[4] A L Margolin, D L Delinck, M R Whalon. J. Am. Chem. Soc.,1990, 112 (8): 2849~2852.
[5] 田桂玲, 邢国文, 叶蕴华. 有机化学, 1998, 18: 11~19.
[6] A Zaks, A M Klibanov. J. Bio. Chem., 1988, 263 (17):8017~8021.
[7] S Lamare, M D Legoy. Trends. Biotechnol., 1993, 11: 413~418.
[8] S Lamare, M D Legoy. Biotechnol. Bioeng., 1995, 45 (5): 387~397.
[9] 叶蕴华, 谢海波, 田桂玲. 化学通报, 1994, (10): 5~9.
[10] 姚 鹏, 马润宇, 王立新. 化工进展, 1998, 6: 1~4.
[11] A D Triantafyllon, P Adlercreutz, B Mattiasson. Biotechnol. Appl. Biochem., 1993, 17 (2): 167~179.
[12] F Theil. Tetrahedron, 2000, 56 (19): 2905～2919.
[13] Y Takagi, J Teramoto, H Kihara et al. Tetrahed. Lett., 1996, 37 (28): 4991~4992.
[14] Y LKhmelniky, S H Welch, D S Clark et al. J. Am. Chem. Soc., 1994, 116 (6): 2647~2648.
[15] K Judit, V D E Johan, P Antal et al. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, 12 (4): 625~631.
[16] G David, S Christophe, M Pierre et al. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, 12 (7): 2473~2480.
[17] G Ashraf, S Volker. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, 12 (19): 2761~2766.
[18] C F Liu, P T James. Org. Lett., 2001, 3 (26): 4157~4159.
[19] 杨 波, 泉多惠子, 张书圣. 高等学校化学学报, 2001, 22 (8): 1332~1337.
[20] 韦丽红, 李志远, 陈志宇 等. 中国药物化学杂志, 2002, (1): 43~44.
[21] 宗敏华, 杜 伟, 李慧青 等. 华南理工大学学报 (自然科学版), 2000, (3): 101~104.
[22] P Liu, G L Tian, K S Lee et al. Tetrahedron Lett., 2002, (43): 2423~2425.
[23] 刘 平, 田桂玲, 叶蕴华. 高等学校化学学报, 2001, 22 (8): 1342~1348.
[24] V Y Levitsky, P Lozano, J L Iborra. Enzyme Microb.Technol., 2000, 26: 608~613.
[25]吴金川, 何志敏, 姚传义. 化学工程, 1999, 27(2): 27~30.
[26] S Backlund, M Rantala, O Molander. Colloid. Polym. Sci., 1994, 272: 1098~1103.

[27] G D Rees, B H Robinson. Biotechnol. Bioeng., 1995, 45: 344~355.
[28] 张 灏, 陈海群. 江苏石油化工学院学报, 1998, 10 (3): 37~39.
[29] N Kriegera, M A Taipa, E H M Melo. Appl. Biochem. Biotechnol., 1997, 67: 87~95.
[30] G E Crooks, G D Rees, B H Robinson. Biotechnol. Bioeng., 1995, 48: 78~88.
[31] G W Xing, D J Liu , Y H Ye et al. Tetrahed. Lett., 1999, 40 (10): 1971~1974.
[32] S W Tsai, Y P Lee, C L Chang. Biocatal. Biotransform., 1995, 13: 89~98.
[33] 周国伟, 李干佐, 李越中 等. 化学学报, 2001, 59 (3): 344~349.
[34] Y X Chen, X Z Zhang, K Zhang. Enzyme Microb. Technol., 1998, 23 (5): 243~248.
[35] 马成松, 李干佐, 沈润南 等. 分子科学学报, 1998, 12: 237~242.
[36] A Marty, W Chulalaksananukul, R M Willenot. Biotechnol. Bioeng., 1992, 39 (3): 273~280.
[37] 刘森林, 宗敏华. 微生物学通报, 2001, 28 (1): 81~85.
[38] S Kamat, J Barrera. Biotechnol. Bioeng., 1992, 40: 158~166.
[39] 阮 新, 曾健青, 张镜澄. 有机化学, 1998, 18: 282~287.
[40] H Gunnlangsdotlir, B Sivik. J. Am. Oil Chem. Soc., 1997, 11: 1483~1489.
[41] M Rantakyla, O Aaltonen. Biotechnol. Lett., 1994, 16 (8): 825~830.
[42] R Lopez-Fandino, I Gill, E N Vulfson . Biotechnol. Bioeng., 1994, 43 (11): 1016~1023.
[43] M Erbeldinger, X W Ni, P J Halling. Enzyme Microb. Technol., 1993, 13: 141~148.
[44] I Gill, E N Vulfson. Trends Biotechnol., 1994, 12 (4): 118~122.
[45] I Gill, E N Vulfson. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115: 3348~3349.
[46] 刘伟雄, 魏东芝 华东理工大学学报,1999,25 (2): 131~134.
[47] 夏咏梅, 章克昌. 化学通报, 2001, (5): 303~305.
[48] E Barzana . Anal. Biochem., 1989, 182: 109~115.
[49] S O Hwang. Biotechnol. Bioeng., 1993, 42: 667~673.
[50] H Robert . Prog. Biotechnol., 1992: 85~92.