

酶工程的新潜力 ——非水介质中的酶催化反应

罗 贵 民

(吉林大学酶工程实验室, 长春)

提 要

酶能在非极性溶剂中起作用这一发现大大扩展了生物催化剂的应用范围。影响酶在有机溶剂中活性和稳定性的关键因素包括: 酶的离子状态、载体性质和生物催化剂及溶剂的水合程度。在脂肪和油料加工领域中已开始出现工业应用。

改善酶的性质、扩大酶的使用范围始终是酶工程的重要任务之一。酶的操作稳定性较差, 适用范围较窄, 需要以水为反应介质, 而绝大多数有机化合物难溶于水, 这些因素限制了酶在工业上的应用。目前已知的二千多种酶中, 只有 16 种以公斤级的水平在工业上应用^[1]。但是, 酶技术的最新进展表明, 酶在工业上应用的障碍能够被克服, 新近发现的酶能在非极性溶剂中起作用这一事实就是有力的证明^[2-4]。很多不溶于水或在水中不稳定的产品现在可以用有机溶剂中的酶来生产^[5]; 通常在水中很难发生的有用的反应(如转酯化反应)在有机溶剂中, 酶的催化作用下可以有效地进行, 而水为反应物的水解反应平衡在非水介质中会向有利于缩合产物方向移动(如酯化反应)^[6]。酶技术的这一进展现已开始在脂肪和油料加工领域中获得应用, 展示了酶工程的新潜力。

一、酶活力的基本要求

关于有机溶剂中酶催化反应的必要条件和最佳条件已有人作了通俗易懂的说明^[7]。这里强调的是, 酶不能在完全无水的条件下起作用, 但酶活力所要求的水量与整个反应体积比, 几

乎趋近于零。实际上, 很多酶只需在其分子周围有一层单层水分子就足以维持酶催化活性所必需的构象^[8]。酶活力要求的水量部分与水在反应溶剂中的溶解度有关^[9]。一般说来, 疏水性越强的溶剂, 其中酶所要求的水量越少。例如, 乙醇脱氢酶在己烷中只需不到 0.1% (V/V) 的水, 即能满足其活力需求; 而在乙腈中则需要 5% 的水才能满足活力需求。值得提出的是, 即使是与水混溶的溶剂, 只要有足够的水也适用于酶反应。Klibanov 提出, 由于亲水性较强的溶剂容易夺走蛋白质的必须水合层, 所以应向这类溶剂加入更多的水, 以防止酶脱水, 维持酶活力^[2]。

Klibanov 还证明, 必须将酶以胜任催化作用的离子状态置于有机溶剂中^[3]。回收酶时水溶液的 pH 直接影响酶的微水环境的 pH, 因此也影响酶的电荷平衡。如果先将酶从水溶液(其 pH 相当于水溶液中酶反应的最适 pH)中沉积在惰性载体上, 通常会获得酶在有机溶剂中的最佳活力。但要注意, 载体所赋予的离子性质及有机溶剂的氢键合能力可能改变表现“最适 pH”, 因此, pH-活力图形应由载体和溶剂的每一组合来决定。

二、酶活力的相对大小及酶稳定性

与水溶液中的酶反应比较,有机溶剂中的酶活力究竟有多大?很遗憾,由于有机溶剂中的酶反应常是水中不能发生的反应,因此没有可供比较的数据。例如,脂肪酶的酯化反应和转酯化反应的速度常数在水中很难测定,因为水解反应占优势。在这种情况下,Klibanov用非催化反应来进行比较。发现酵母和猪胰脂肪酶在十六烷中的转酯化速度是非催化反应的 $1.5-3 \times 10^6$ 倍^[3]。也有可供比较的数据,如,沉积在玻璃球上的胆固醇氧化酶和辣根过氧化物酶在有机溶剂中可用来测定胆固醇,其反应速度是水中同样条件下的10—25%^[2]。Deetz等比较了马肝醇脱氢酶(HLADH)在水中和在有机溶剂中催化肉桂醇氧化的速度^[10]。在最适条件下,HLADH在丁醚中催化肉桂醇氧化的起始速度为 $23 \mu\text{mol}/\text{分} \cdot \mu\text{mol}/\text{亚单位}$ HLADH,相当于水缓冲液(pH7.0)中,饱和NAD⁺和肉桂醇条件下醇氧化速度的15%。用酵母醇脱氢酶(YADH)在含1%(V/V)水的醋酸丁酯中催化该反应时,酶活力是水缓冲液中酶活力的1%—64%。酶活力变动较大的原因是酶沉积的载体不同。YADH沉积在未修饰玻璃上时,活力最小;沉积在糖相玻璃(glycophase glass)上时,活力最高。很明显,如果水量、酶的离子状态和载体的性质是某一系统的最佳选择时,酶可在非水介质中获得较高的活力。

一般认为,有机溶剂是酶的变性剂。现在这种观念正受到严重挑战。有机溶剂中的水含量对有机溶剂中酶的稳定性影响很大。Zaks等测量了不同含水量的三丁酸甘油酯中的猪胰脂肪酶在100℃时的半寿期^[9]。在干燥的三丁酸甘油酯中的脂肪酶相当稳定,半寿期大于12小时;而在临界水含量[此例为0.3%(W/W)]以上,脂肪酶稳定性迅速下降;水含量大于1%时,酶立即失活。Deetz等也测定了HLADH在不同水含量的醋酸丁酯中,25℃时的稳定性^[10],发现在干燥的醋酸丁酯中,HLADH的

半寿期大于100小时,而水含量达到饱和时(~2% V/V),酶稳定性下降。这是因为水是酶热失活的必须参加者。因此在相当干燥的条件下则阻止了酶失活。酶在大多数有机溶剂中的不溶性也消除了酶构象的可变性,使酶变得更坚牢,其构象“冻结”在对应的从水溶液中分离酶时所处的构象上,因此,有机溶剂中的酶高温下也能保持适当的折叠状态,至少酶活性中心部分的构象很类似于酶在水溶液中的构象。

三、载体的影响

酶在有机溶剂中应用的最简单的形式是酶以酶粉的形式悬浮在有机溶剂中起作用。这种用法对市售脂肪粗酶制剂特别有用。脂肪酶以固体形式直接加入有机介质中时就可催化酯化反应和转酯化反应^[11]。非水催化作用的最大优点是酶可通过简单的吸附作用而有效地固定在惰性载体上^[8],这样可扩大酶与底物的接触面、降低扩散限制,更充分有效地利用酶。载体作为催化剂整体的一部分会影响酶的微环境,当然也影响酶的活力和稳定性。因此,载体的选择对开发经济、有效的生物催化工艺过程至关重要。

在HLADH催化的反应中,载体会通过分配效应剧烈改变酶微环境中底物和产物的局部浓度。例如,在水溶液中,底物(肉桂醇)浓度在0.1 mmol/L以上时可强烈抑制HLADH;但在有机溶剂(醋酸丁酯)中使用亲水载体(糖相受控多孔玻璃)时,底物浓度高达50 mmol/L也不会发生这种抑制作用^[10]。肉桂醇在水和醋酸丁酯间的分配系数不会引起这么大的效应。

在双相催化作用研究中,Tanaka等用聚合物包埋酶证明,载体的疏水性影响底物分配到酶最接近的水环境中^[12]。增加疏水残基的含量可系统地增加催化剂对疏水底物的活力。因此,选择载体是控制催化反应的底物和产物局部浓度的有效手段。

载体并不一定是固体或在有机溶剂中是不溶的。如果酶加到含有临界比的水-表面活性剂系统中,则酶会加入到反相胶团中^[13]。反相

胶团是包埋在表面活性剂的离子网格中的水微滴。酶在反相胶团中非常活泼。然而胶团结构易被破坏,而且可溶酶的量也有限,因此,这类系统的实际应用仍有待检验。

Inada 等制备了在有机溶剂(如苯、氯仿)中完全可溶的酶。办法是将聚乙二醇共价结合到酶表面的赖氨酸残基上^[14]。只要为酶的水合提供适量的水,这种聚乙二醇修饰酶(包括几种脂肪酶、胰凝乳蛋白酶、过氧化氢酶、辣根过氧化物酶)在有机溶剂中是很活泼的^[15]。此外,聚乙二醇网络的共价性质使聚乙二醇修饰酶的稳定性和反相胶团中的酶要大。修饰酶在有机溶剂中的完全可溶性也消除了异相催化反应中常有的扩散限制。所有这些研究都说明了载体、溶剂和水含量选择的重要性,它们是影响非水介质中酶活力及稳定性的关键因素。

四、现状与前景

迄今发现的能在有机溶剂中起催化作用的酶已有十多种^[2]。这些酶的结构、大小、来源和功能各异,但都由 20 种基本的氨基酸所组成。因此,可以推测,会有更多的酶能在非水介质中起催化作用。现已发现有机溶剂中的酶可催化酯基转移作用(可用来拆分外消旋醇)、酯化作用(可用于拆分外消旋酸)^[16], 硫代酯基转移反应^[3]、酚类的区域选择性氧化^[5], 醇类的氧化^[2,10]。不仅简单的水解酶类可在有机溶剂中起作用,涉及辅因子或酶偶联的复杂反应也可在非极性溶剂中实现^[17], 这证明其它的多酶系统也可在非极性介质中偶联。

此外,用葡萄糖氧化酶生产某些重要的化工产品、用过氧化物酶催化芳香族化合物的选择性羟化、用黄素氧化酶催化芳香醛的氧化、用半乳糖氧化酶氧化三碳醇等都可在有机溶剂中进行,而且反应具有高度的立体特异性。酶能催化多种底物转化的性质对酶的工业应用特别重要。目前不少科学家正致力于有机合成中生物催化剂的研究工作^[18,19]。

尽管关于酶在非水介质中的使用还有许多东西有待发现,但已开始出现工业应用。一个

最重要的应用领域是脂肪和油料的加工,因为底物甘油三酯油和脂肪酸酯在水中不溶。脂肪酶催化甘油三酯油的交换酯化,以提高其品级的工艺过程正在商业化^[20]。Macrae 等报告,来自细菌的脂肪酶在甘油三酯油中或在油的己烷溶液中利用脂肪酸(如硬脂酸和硬脂酸酯)可催化这个交换酯化反应^[21]。脂肪酶开始催化油中痕量水对酯的水解,然后重新酯化产生的酸和醇。这样,低品级的油(如棕榈油)中硬脂酸含量增加,从而生产类似可可奶油的脂肪。预计这个工艺过程不久就可商业化。

具有工业意义的非水催化工艺的第二个例子是通过立体选择性酯化来拆分手性 2-卤丙酸。Kirchner 等利用来自细菌的脂肪酶的立体特异性开发了一种工艺过程,用来生产旋光性的 2-氯丙酸或 2-溴丙酸,它们是生产杀虫剂的有用中间体^[11,22]。这种脂肪酶可在己烷或氯仿等有机溶剂中立体选择性地催化 R-2-卤丙酸与下述伯醇的酯化反应:正丁醇、正己醇或正辛醇。如果使用酸的外消旋混合物,则产生等克分子的 R-酯和未反应的 S-酸。这些产物可通过简单的抽提而分离、回收,从而可得到光学纯度大于 90% 的二种异构体。这种脂肪酶在操作条件下非常稳定,酶可重复使用,因而使这一工艺过程更为经济、诱人^[10]。

显然,利用水解酶(如脂肪酶、酰胺酶)的立体选择性是最直接的开发领域之一。酶的化学、区域和立体特异性可在合成、拆分各种旋光性醇、羧酸、酯和酰胺上大显身手。在有机溶剂中合成二肽已有报告^[23]。可以想见,在有机溶剂中利用类似的生物催化过程可以大量生产甜味剂 aspartame。

辣根过氧化物酶在水中不能与木质素作用,但在 95% 二噁烷中却能激烈地使木质素解聚。可以相信,使用有机溶剂中的酶将会解决许多其它的技术障碍^[2]。

对已往由于酶的缺点而不能作为工业催化剂应用的酶现在都应从能否在有机溶剂中使用来重新考虑。重点考虑的对象应当是:石油化工产品的酶法转化,油脂的酶催化聚合作用和

种子贮藏蛋白合成与调节的研究进展*

吴显荣 刘建卫

(北京农业大学生物学院植物生化教研组)

提 要

种子贮藏蛋白的合成机制是目前生物化学、农业、食品工业及生物技术极为关心及重点研究的课题之一,本文对贮藏蛋白及其基因、贮藏蛋白的合成、翻译后的修饰及合成的调节等最新研究进展,进行了较详细的讨论。

一、引 言

种子中的蛋白质可分为两大类:一类是贮

藏蛋白,占种子蛋白的大部分;另一类是各种酶

* 国家自然科学基金资助课题。

酶法改造,检测气体和有机物的酶传感器及有机废水处理等。现在看来,生物催化剂的应用范围有可能进一步扩大,在超临界液体和气体中使用酶就是证明。最近的工作证明,这种工艺在食品加工和化学工艺中可行^[24,25]。

在有机溶剂中使用酶标志着传统酶学的深刻变革,改变了关于酶工业应用潜力的思考方法,为酶的应用提供了广阔前景。随着这一技术的继续发展及其与 DNA 重组技术结合,必将深刻改变生物催化剂领域的面貌,出现更多的令人鼓舞的新产品和新工艺。

参 考 文 献

- [1] Coghlan, A.: *Chemistry & Industry*, 1985, 19, 642.
- [2] Klibanov, A. M.: *Chemtech*, 1986, 16, 354—359.
- [3] Zaks, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 3192.
- [4] Inada, Yuji. et al.: *Trends Biotechnol.*, 1986, 4, 190.
- [5] Kazandjian, R. Z. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 5448.
- [6] Martinek, K. et al.: *J. Appl. Biochem.*, 1981, 3, 93.
- [7] 黄中祥:《生命的化学》, 1987, 7, 18.
- [8] Cambou, B. et al.: *J. Am. Chem. soc.*, 1984, 106, 2687.
- [9] Zaks, A. et al.: *Science*, 1984, 224, 1249.

- [10] Dectx, J. S. et al.: *Trends Biotechnol.*, 1988, 6, 15.
- [11] Kirchner, G. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 7072.
- [12] Koshiro, S. et al.: *J. Biotechnol.*, 1985, 2, 47.
- [13] Larsson, K. M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1987, 864, 1.
- [14] Yoshimoto, T. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 1984, 6, 337.
- [15] Takahashi, K. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 1984, 6, 765.
- [16] Cesti, P. et al.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1985, 11, 401.
- [17] Grunwald, J. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 6732.
- [18] *Biocatalysis in Organic Syntheses*, Eds: J. Tramper, H. C. Vander Plas, P. Linko, Elsevier, Amsterdam, (1985), 3—258.
- [19] *NATO Advanced Research Workshop on Enzyme as Catalysts in Organic Synthesis*, Ed. M. P. Schneider, Reimsburg, Germany, 1986, 3—401.
- [20] Halling, P. J. et al.: *European Patent Application* 0064855.
- [21] Macrae, A. R.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1983, 60, 291.
- [22] Klibanov, A. M. et al.: *US patent* 46011987, 1986.
- [23] Margolin, A. L. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 3802.
- [24] Barzana, E. et al.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1987, 15, 25.
- [25] Randolph, T. W. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 1985, 7, 325.

[本文于 1987 年 7 月 25 日收到]