

# 超临界流体中酶催化的研究进展\*

刘森林 宗敏华

(华南理工大学生物工程系 广州 510640)

**摘要:**阐述了充当反应介质的超临界流体、固定化酶的载体以及反应温度和压力对超临界流体中酶催化反应的影响,并介绍了超临界流体中酶催化反应在工业上的应用现状和发展前景。

**关键词:**超临界流体,酶催化

**中图分类号:**Q5503 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-081-05

目前,非水介质中的酶催化已成为生物工程领域中的研究热点。许多学者对有机介质中酶催化药物的手性合成<sup>[1]</sup>,外消旋体的拆分<sup>[2]</sup>,活性多聚物的选择性合成<sup>[3]</sup>等许多方面作了大量的研究,有些研究已应用于工业生产。然而,传统有机溶剂中酶反应的产物中不可避免地残留或多或少的有机溶剂,易对食品和医药造成污染,这使得有机介质中酶催化的应用受到一定的限制。近年来,在有机相酶催化研究开发的基础上发现了一种新的颇具特色的非水介质,即超临界流体(Supercritical Fluids, SCF)。一般而论,无溶剂系统是最优的酶反应系统,在受底物性质所限而非用溶剂不可的情况下,则最好选用水或超临界流体作用反应介质。

作为酶反应的介质,超临界流体当前正受到极大的关注。超临界流体具有传统有机溶剂的所有优点<sup>[4~6]</sup>:(1)增加非极性底物的溶解度;(2)可进行酶水解反应的逆反应,如酯化、内酯化、酯交换及肽的合成等;(3)减少底物或产物对酶的抑制;(4)增加酶的热稳定性;(5)减少反应副产物等。而且,超临界流体的物理性质介于气体和液体之间,因而具有其独特的优越性。它具有气体的高扩散系数、低粘度、低表面张力和液体的高密度的特性<sup>[7]</sup>,且可通过温度或压力的微小变化改变底物或产物在超临界流体中的溶解度,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排除,产物中不留下任何溶剂。特别是对于工业化生产,可使生物催化反应和产物分离同时进行,实行偶联操作<sup>[8]</sup>,便于自动化生产,为生物工程下游加工工艺的简化注入了新的潜力。可见,超临界流体具有传统有机溶剂无可比拟的优点。

\* 广东省自然科学基金资助项目(No. 980543)

收稿日期:1999-11-26,修回日期:2000-02-24

充当反应介质的超临界流体和固定化酶的载体是超临界流体中酶反应体系的重要要素。要充分发挥超临界流体中酶催化的优越性,就必须研究清楚它们对酶反应的影响。同时,超临界流体的流速以及温度和压力是实际操作中的关键性参数,有必要对它们的影响作一定的认识。本文就这些方面所取得的研究结果综述如下。

## 1 超临界流体的选择

超临界流体作为酶反应的介质,对酶反应起着重要作用。它能够改变酶的底物专一性、区域选择性和对映体选择性,并能增强酶的热稳定性,同时酶在不同超临界流体中的活性也存在极大的差异,因此,对超临界流体的选择就显得特别重要。通常,超临界流体的选择首先应遵循两个最基本的原则:一是酶在超临界流体中必须具有较高的活性;二是超临界流体的临界温度与酶的最适反应温度接近,因为操作温度通常与临界温度接近,温度过高会引起蛋白质变性,使酶失活。同时,还需要综合考虑如下因素:(1)临界温度和临界压力在实际生产中是否容易达到;(2)反应底物在该流体中必须具有较高的溶解度;(3)超临界流体对底物、产物和酶的情性,即不与它们发生化学作用;(4)对食品和医药无毒等。

常用的超临界流体有:CO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>、C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>、C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>、C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>、ClF<sub>6</sub>、SF<sub>6</sub>等,其中CO<sub>2</sub>最为常见。有人报道<sup>[9]</sup>,CO<sub>2</sub>是一种优良的介质,主要是因为它具有一些独特的优点,如临界温度(31.1℃)足够低,接近酶的最适反应温度;临界压力(7.4MPa)在实际工业应用中比较容易达到;特别是CO<sub>2</sub>无毒、不可燃、价格便宜、来源广泛,不存在环境污染问题。因此,超临界CO<sub>2</sub>中的酶催化在食品和医药工业中具有广泛的应用前景。

但也有学者报道,超临界CO<sub>2</sub>对某些反应并不是一种理想的溶剂,主要是因为CO<sub>2</sub>中酶的活性不高以及极性底物的溶解度较低。Almeida等<sup>[10]</sup>的研究结果显示,在酯酶催化正丁酸酯的转酯反应中,超临界CO<sub>2</sub>中的反应速度比超临界乙烷和丙烷中小,他们的解释是CO<sub>2</sub>的溶剂化效应在高压下较大并且在CO<sub>2</sub>中酶反应的活化能较高。Kamat等<sup>[11]</sup>也认为,对异丁烯酸甲酯和2-乙醇间的转酯反应而言,超临界CO<sub>2</sub>并不是一种良好的溶剂,因为超临界CO<sub>2</sub>可改变酶周围微环境的pH值或与酶表面的氨基形成共价复合物,导致酶的活性降低。于是,有些学者提出,通过酶的化学或物理修饰以提高它在超临界CO<sub>2</sub>中的活性。虽然通过PEG修饰以提高酶在有机介质中的活性已有大量的研究,但超临界流体中酶反应的相关研究尚未见报道。同时,CO<sub>2</sub>是一种非极性介质,极性底物在其中的溶解度较低,因而选择适当的助溶剂来增加极性底物在超临界流体中的溶解度也是今后的一个研究方向。

Kamat和Barrera等<sup>[11]</sup>曾对其它一些超临界流体(乙烷、乙烯和六氟化硫)中的酶反应作了研究。结果显示,在11MPa和45℃条件下,六氟化硫中酶反应的初速度(5.8mmol/L/h/mg)最大,比在CO<sub>2</sub>中(0.05mmol/L/h/mg)高100倍以上,而在乙烷和乙烯中相差不大(0.20~0.50mmol/L/h/mg),是CO<sub>2</sub>中的4~10倍,说明酶在不同超临界流体中的活性存在极大的差异。而且发现,超临界六氟化硫是一种比任何传统有机溶剂和其它超临界流体更好的溶剂,可使酶的活性得到充分展示,将为超临界流体中酶反应的进一步研究和应用带来新的前景。

到目前为止,超临界流体中的酶催化主要局限于CO<sub>2</sub>,这使得超临界流体中酶催化的广泛应用受到一定的限制,因此,进一步研究和开发新的超临界流体是今后研究的重点之一。

## 2 载体的选择

酶在超临界流体中使用的最简单形式是酶粉,但这不利于大规模的工业应用和自动化、连续化

生产。将酶固定于比表面积较大的惰性载体表面可增大酶与底物的接触面积、降低扩散限制,能更充分有效地发挥酶的高效催化作用,并且有利于酶的回收和再利用,增加酶的热稳定性。酶的固定化方法有多种,如吸附法、包埋法、载体偶联法和交联法等,由于超临界流体具有低粘度和高扩散系数的特性,吸附于载体上的酶不易脱落,可使用最简单、最经济的吸附法。

选择合适载体的重要性已被充分认识,许多学者对载体的影响作了大量的研究<sup>[12~15]</sup>。载体的性质可影响被吸附的酶量,并且载体可改变底物和产物在酶表面的微环境,影响酶分子上的结合水,从而影响酶的活性。Gunnlaugsttir 等<sup>[12]</sup>对载体的疏水性与吸附于载体上的酶量之间的关系作了研究,结果表明,在超临界 CO<sub>2</sub> 中被吸附的酶量随载体疏水性的降低而减少。而且发现酶的活性强烈依赖于底物和固定化载体的疏水性,然而对于不同的酶反应,载体对酶活性的影响是不同的。在固定化酯酶催化鱼肝油和乙醇的醇解反应中,载体的疏水性越强酯酶的活性越高;而在甘油酯的合成反应中却观察到相反的结果。这可用载体表面的化学性质对底物和酶结合的影响而得到解释。鱼肝油是疏水性较强的底物,在醇解反应中,它和疏水性较强的载体有较强的亲和力,因而酶表面的底物浓度增加,故吸附于疏水性较大的载体上的酶表现出较高的活性;在甘油酯的合成反应中,固定化于疏水性较弱的载体上的酶具有较高的活性,这是由于疏水性较弱的底物甘油与疏水性较弱的载体有较强的亲和力,因此疏水性较弱的载体可使底物在酶周围的局部浓度增加而使酶表现出较高的活性。Bosley 和 Clayton<sup>[16]</sup>也证实了载体的表面性质(特别是疏水性)可影响固定化酶的活性。同时,载体可影响到酶分子表面的结合水。在相同的水含量下,酶在疏水性较弱的载体上表现出较低的活性。因为疏水性较弱的载体能从酶和溶剂中夺走大量的水,造成酶部分失水而使酶的活性降低;而疏水性较强的载体不足以夺走酶的必需水,因而保持了较高的活性。

因此,可根据底物和载体的疏水性初步选择适当的载体。另外,还应考虑到载体的表面积、颗粒大小和内部孔径等因素。

### 3 工艺参数的影响

流体流速、反应温度和压力是影响超临界流体中酶反应的 3 个关键参数,其不仅影响底物和产物在超临界流体中的溶解度及酶的活性,还影响产物的提取。

**3.1 流速的影响** 流体流速影响产物提取的速率、提取物的成分和反应平衡,因而必须选择适当的流速。流速较高时提取速率较快,有利于反应向正方向进行,因而转化率较高,但提取产物的浓度较低,故应根据实际生产的需要选择适当的流速。

Gunnlaugsdottir 和 Sivik 等<sup>[17]</sup>研究了在超临界 CO<sub>2</sub> 中酯酶催化鱼肝油和乙醇合成乙醇酯的反应,发现流速对产物的提取有显著的影响。流速越快、提取速率越快,乙醇酯的回收率越高。例如,当流速为 0.3NL/min(NL 表示常温、常压下 CO<sub>2</sub> 的体积)时,经 270min 的提取,乙醇酯的总回收量为 1520mg;而当流速为 0.015NL/min 时,乙醇酯的提取量为 250mg。但是,提取物中乙醇酯的浓度随着流速的增加而降低。同时发现,高流速使乙醇酯的提取更具选择性,即反应混合物中随乙醇酯一起提取出的其它物质的量更少,而且随着流速的增加,反应平衡向合成乙醇酯的方向移动。流速从 0.015NL/min 增加到 0.075NL/min,转化率从 78% 增加至 82%,而当流速进一步提高到 0.15NL/min 时,转化率变化甚少,因此,应根据过程的经济性选择最佳的流速。

**3.2 温度和压力的影响** 超临界流体的性质随温度和压力的不同而异,温度或压力的微小变化会引起其性质发生较大的改变,因而明了温度和压力的影响就显得尤为重要。温度和压力能影响物质在超临界流体中的溶解度,影响水在流体和固定化载体间的分配,但最重要的是影响酶的活性。一般来说,温度越高,物质在超临界流体中的溶解度越小,酶的活性越大,但温度过高会引起蛋白质变

性,使酶失活;而压力越大,物质在超临界流体中的溶解度越大,酶的活性越低。但酶活性在不同超临界流体中对温度和压力的敏感程度不同。

Kamat 等<sup>[11]</sup>研究了在超临界 CO<sub>2</sub>、超临界乙烷和正己烷中温度和压力对酶反应的影响。结果发现,温度对超临界 CO<sub>2</sub> 中酶反应的影响甚小,当温度由 40℃ 上升至 45℃,反应速度几乎没有变化,他们的解释是,在高压下,CO<sub>2</sub> 易与酶表面的氨基形成共价复合物,增加了酶的刚性,使酶的活性既不随温度的上升而增加,也不随温度的上升而降低。然而,在超临界乙烷中,温度从 40℃ 上升至 45℃,初始反应速度从 0.18mmol/L/h/mg 增加到 0.34mmol/L/h/mg,而当温度进一步上升至 50℃,酶反应速度几乎没有增加。而在有机溶剂正己烷中,温度每增加 10℃,反应速度几乎增加一倍。这说明温度对酶活性的影响在超临界流体和有机溶剂中是不同的,在有机溶剂中酶的活性比在超临界流体中对温度要敏感得多,主要是因为超临界流体中的压力较高。同时,在传统的有机溶剂中,压力对酶的活性几乎没有影响,而在超临界流体中,压力增加一般使酶的活性下降,例如,在超临界乙烷中,压力从 11 MPa 增加到 20.6MPa,酶活性下降了 25%。

另外,温度和压力能影响水在超临界流体和载体之间的分配。Marty 等<sup>[8]</sup>的研究结果显示,对固定化酯酶在超临界 CO<sub>2</sub> 中催化乙醇和油酸的转酯反应体系,随温度的上升,固相中的水含量下降,超临界 CO<sub>2</sub> 中的水含量增加;同时,随压力的增加,超临界 CO<sub>2</sub> 中的水含量增加,固相中的水含量相对下降。

#### 4 现状与前景

近年来,有机溶剂中酶催化作用的研究取得极大的进展,这为超临界流体中酶催化的研究和应用开发奠定了基础。超临界流体作为一种特殊的非水介质,在酶催化反应性质方面与有机溶剂非常相似,或者说,超临界流体在本质上就是一种特殊的有机溶剂,因此,从理论上讲,应用于传统有机溶剂的所有酶催化反应都可能通过选择适当的超临界流体而在超临界流体中进行。

迄今,超临界流体中酶催化的应用研究已有相关报道。其中,一个重要的应用领域是醇解鱼肝油制备不饱和脂肪酸。有人通过研究指出,某些多聚不饱和脂肪酸(如 EPA 和 DHA)对关节炎和心脑血管疾病有良好的疗效,而市场上的鱼肝油是 EPA 和 DHA 的最好来源,大约含 EPA、DHA 各 10%。但因鱼肝油中的甘油三酸酯(含 EPA 和 DHA)不能浓缩到所需的浓度,因此必须用化学或酶催化的方法把不饱和脂肪酸从鱼肝油中分离出来,超临界流体中的酶催化因其高选择性、反应条件的温和性、产物易分离性和对产物无污染而被认为是一种颇受欢迎的选择。Gunnlaugsdottir 等<sup>[17]</sup>对商业化的固定化酯酶(E. C. 3. 1. 1. 3)在超临界 CO<sub>2</sub> 中催化该反应进行了研究,表明从反应混合物(其中包括甘油三酸酯、甘油二酸酯、甘油单酯和乙醇酯)中优先提取含 EPA 和 DHA 的乙醇酯是可行的,因为乙醇酯在超临界 CO<sub>2</sub> 中的溶解度比其它酯大得多,并且乙醇酯的提取有利于反应的进行。预计这一工艺不久就可实现工业化。

具有应用潜力的另一重要领域是药物的手性合成。目前,全世界使用最多的 25 种药物绝大多数是手性的,手性药物的研制已成为国内外药物研究的新方向之一,利用酶的高效性和高立体选择性,合成和制备手性化合物(如手性药物中间体、手性材料等)是超临界流体中酶催化的新应用,它将成为超临界流体中酶催化最具有潜力和发展前景的领域之一。Martins 等<sup>[8]</sup>利用酯酶 PPL(E. C. 3. 1. 1. 3)催化丁酸和外消旋环氧丙醇的选择性酯化,得到 S-构型的酯。

目前,超临界流体中酶催化的研究主要局限于 CO<sub>2</sub> 和脂肪酶,且在某些情况下,酶在超临界流体中的活性不高,因此,今后研究开发的重点应放在如何通过酶的修饰来提高酶在超临界流体中的活性,研究和开发新的超临界流体,扩大酶的应用范围,进一步研究各种工艺参数(特别是压力)的

影响等。迄今为止,该技术还处于实验研究阶段,离工业化还有一定的差距。但是,超临界流体中的酶催化因其独特的优越性,特别是在生物工程下游加工工艺中的潜力,随着研究的不断深入,这一技术不久将会应用于工业生产,并将引起生物工程下游加工工艺新的革命。同时,特别是超临界CO<sub>2</sub>对环境无污染,将使传统的化学工业和制药、食品工业向着绿色工业的方向发展,具有非常广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] Margonlin A L, Delinck D L, Whalon M R. *J Am Chem Soc*, 1990, **112**: 2847~2854.
- [2] Kirchner G, Scollar M P, Klibanow A M. *Biotechnol Bioeng*, 1986, **107**: 5448~5450.
- [3] Margolin A L, Fitipatrick P A, Dubin P L. *J Am Chem Soc*, 1991, **113**: 4693~4694.
- [4] Klibanow A M. *Chem Tech.*, 1986, **6**: 354.
- [5] Dorcdhik J S. *Enzyme Microb Technol*, 1989, **11**: 1994.
- [6] Luisi P L. *Meth Enzymol*, 1987, **136**: 1998.
- [7] Gunnlaugsdottir H, Sivik B. *J Am Oil Chem*, 1995, **72**: 399~404.
- [8] Marty A, Chulalaksananukul W. *Bioengineering*, 1992, **39**: 273~283.
- [9] Hawthorne S B, Galy A B, Schmitt V O, *et al.* *Anal Chem*, 1990, **62**: 633~642.
- [10] Almeida M C, Ruivo R, Maia C, *et al.* *Enzyme and Microbiol Tech*, 1998, **22**: 494~499.
- [11] Kamat S, Barrera J. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, **40**: 158~166.
- [12] Gunnlaugsdottir H, Wannerberger W, Sivik B. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, **22**: 360~370.
- [13] Martins J F, Carvalho I B, Sampaio T C, *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**: 785~790.
- [14] Lie E, Molin G. *J Chem Tech Biotechnol*, 1991, **50**: 549~553.
- [15] Reyes H R, Hill C G, Amundson C H. *J Food Process Presery*, 1994, **18**: 119~134.
- [16] Bosley J A, Clayton J C. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**: 934~938.
- [17] Gunnlaugsdottir H, Sivik B. *J Am Oil Chem Soc*, 1997, **11**: 1483~1489.