

有机溶剂在酶反应中的应用

孙 万 儒

(中国科学院微生物研究所)

有机溶剂广泛应用于有机化学反应。但酶反应中却很少使用；尽管有时分离纯化某些酶时也使用酒精或丙酮，但十分慎重。事实证明大多数有机溶剂会引起酶蛋白变性，失活或抑制酶反应；并且有的有毒，易燃。因此，长期形成一种概念：酶反应需在水溶液中进行，避免使用有机溶剂。

随着酶工程的发展，酶反应的应用不断扩大，许多在水中溶解度低的有机化合物的酶反应越来越重要。如何提高反应物浓度和反应效率，能否象化学反应那样，在酶反应中使用有机

溶剂，这是酶工程一个新的研究课题^[1,2]。

早在六十年代初，为解决微生物转化甾体化合物时溶解度低的问题，首先将其溶在酒精中，再加入到转化系统内，虽然转化时甾体化合物以微晶形式存在，但浓度仍有所提高，缩短了反应时间。从而刺激了人们研究有机溶剂应用于酶反应的兴趣。近几年虽取得了一些可喜结果，但毕竟还处于起始阶段。本文就这方面的研究进展作一简单介绍。

由于生物催化剂(包括可溶酶，自然细胞和固定化酶、固定化细胞)催化的反应类型，条件

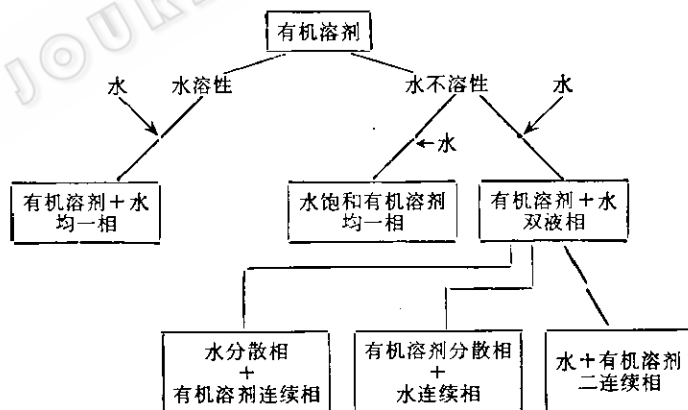


图1 水和有机溶剂组成的各种反应系统

和作用的底物千差万别,不可能说在某种情况下使用那种有机溶剂。目前只能依据酶反应,生物催化剂、底物、产物,有机溶剂性质和反应条件,通过试验选择。但以下几点可以参考:1.对底物和产物的溶解能力;2.底物和产物在有机溶剂和水中的溶解度;3.溶剂对生物催化剂的变性和抑制作用;4.溶剂对人的毒性和可燃性。

有机溶剂按其在水中的溶解度可分为:
1.与水以任意比例混合的水溶性有机溶剂。
2.与水不混溶的有机溶剂,但不意味与水绝对不相溶。因此,可以组成如图1所示的不同反应系统。

表1 有机溶剂选择与酶作用的底物和产物性质的关系

底物和产物性质	水溶性			水不溶性		
	溶解底物	溶解产物	不溶解底物	溶解底物	溶解产物	不溶解底物
底物溶于水 产物不溶于水	+	-	+	+	-	+
底物不溶于水 产物溶于水	+	±	-	+	+	-
底物溶于水 产物溶于水	+	+	-	×	×	×
底物不溶于水 产物不溶于水	+	IBC- SE+	±	+	IBC- SE+	±

+: 可以选用。

-: 不可用。

±: 某些情况可以,有些情况不可。

IBC-: 固定化酶和细胞不可以选择。

SE+: 可溶性酶可选择。

×: 不必要。

由于使用的生物催化剂性质不同,如可溶酶和自然细胞催化的反应多数仍在水相中或两相界面上进行,使用疏水性材料制备的固定化酶或固定化细胞可在有机相中进行。

可供选择的有机溶剂及分类:

水溶性: 甲醇、乙醇、丙醇、正丁醇、异丁醇、1,4-丁二醇、甘油、乙二醇、环己醇、聚乙二醇、乙醇单甲醚、丙酮、乙腈、丙腈、二氧六环、二甲基亚砜、氨基甲酸乙酯、二甲基甲酰胺、四氢呋喃等,

水不溶性: 石油醚、己烷、庚烷、十六烷、环己烷、苯、甲苯、四氯化碳、氯仿、氯甲烷、氯乙烷、二氯乙烷、三氯乙烷、乙醚、异丁醚、丁醚、戊醚、醋酸乙酯、醋酸丁酯、硝基甲烷等。

若只考虑底物和产物在水和有机溶剂中溶解度时,反应系统选择可参考表1。

一、有机溶剂和水组成的均一相系统

在均一相反应系统中使用的有机溶剂,较成功的是醇类和二甲砜。其目的有两个,一是提高底物或产物浓度;二是改变酶反应的动力学性质。

例如,用亲水性交联聚乙烯醇作载体,制备的具有糖基转移酶活力的固定化产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)细胞,催化尿嘧啶阿糖甙和腺嘌呤合成腺嘌呤阿糖甙的反应,由于腺嘌呤和产物腺嘌呤阿糖甙在水中溶解度低,进行悬浮反应很不方便,产物与生物催化剂分离难,并且随反应进行,产物在固定化细胞颗粒内积累,会破坏载体结构,抑制酶反应。若反应物中加入二甲砜或二甲基甲酰胺均可提高底物和产物的溶解度,但二甲基甲酰胺对酶活力有影响。40%的二甲砜可使腺嘌呤和产物腺嘌呤阿糖甙的浓度达50mM以上。于pH7.2,60℃下反应,合成收率为92%,固定化细胞使用35天,无活力损失^[3,4]。

另外利用蛋白酶催化多肽和蛋白质的合成,之所以取得成功,主要在于有机溶剂的使用如表2。

表2 有机溶剂在酶促合成多肽和蛋白质上的应用

酶	合成产物	有机溶剂	使用浓度(%)	合成收率(%)
枯草杆菌蛋白酶	核糖核酸酶	甘油	90	50
无色杆菌蛋白酶	人胰岛素	DMF和乙醇	30,30	80
羧肽酶Y	牛胰核糖核酸酶	甘油	90	50
凝血酶	人生长激素	甘油	80	20
嗜热杆菌蛋白酶	天冬甜味素	乙酸乙酯		93
胰凝乳蛋白酶	脑啡肽	乙醇或DMF		

有机溶剂能增加反应收率的原因,除了可提高底物溶解度而提高浓度外,还有1.降低水浓度和活变,减少酰基酶复合物的水解反应,提

高酰基转移反应；2. 明显提高反应物羧基的PK 值，降低了质子从羧基转移到氨基上的反应^[5-8]。在用青霉素酰化酶催化对羟基苯甘氨酸甲酯与青霉素母核 6-APA 合成羟苄青霉素时，许多醇均可提高合成收率，但以仲丁醇最佳，增加正丁醇用量到 7.5%，转化率可从 70% 上升到 93%。试验证明，仲丁醇的作用主要是降低对羟基苯甘氨酸甲酯的水解反应^[9]。

二、有机溶剂和水组成的双液相系统

在这样的反应系统中，要求底物在水和有有机溶剂中的溶解度尽可能大，而产物在水中的要小，反应产物才会不断从水相转移到有机溶剂相中。对改变反应平衡和降低产物对酶的抑制作用有利，可提高生物催化剂的催化效率。另需要有机溶剂在水中溶解度尽可能小，以减小有机溶剂对酶的变性和抑制作用。在使用固定化酶或固定化细胞时，要考虑有机溶剂是否对固定化载体有溶解、溶胀、收缩、凝聚和崩裂作用。同时有机溶剂的极性、介电常数对酶反应也有影响，如表 3。

表 3 有机溶剂对游离细胞和固定化细胞进行胆甾醇转化活力的影响

有机溶剂(1:1)	极性	介电常数	分配系数	转化活力(%)	
				游离细胞	固定化细胞
四氯化碳:正庚烷	0	2.2	0.02	68	0
苯:正庚烷	0	2.3	0.02	57	0
甲苯:正庚烷	0.4	2.4	0.06	68	0
氯仿:正庚烷	1.1	4.7	0.82	42	29
乙酸乙酯:正庚烷	1.9	6.0	0.25	27	0
丙酮:正庚烷	2.7	20.7	—	痕迹	0
乙醇:正庚烷	1.7	24.3	—	0	0
甲醇:正庚烷	1.7	36.6	—	0	0
氯甲烷:正庚烷	1.5	8.9	0.81	19	15

对于双液相反应系统，若催化剂在水相中催化，似乎可不必使用固定化酶和细胞，在水相中的酶或细胞也可反复使用。但固定化可改进酶的稳定性，因而还值得考虑。固定化酶的应用使物质转移的限制因子增加，不仅有有机相和水相间的质量转移，又增加了水相或有机相与固定化酶二相间的质量转移。因此固定化载体

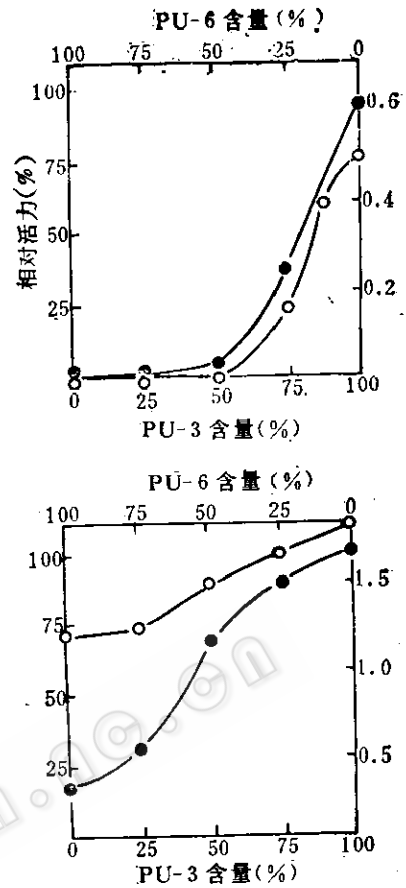


图 2 固定化载体的亲水性对酶活力和分配系数的关系

表 4 有机溶剂与生物催化剂稳定性

有机溶剂	生物催化剂	反应总时间(天)	保留活力(%)
三氯乙烷 四氯化碳 苯/正庚烷(1:1) 三氯乙烷 苯/正庚烷(1:1)	胆甾醇氧化酶		
	细胞	6.2	80
	细胞	2.8	50
	细胞	2.1	50
	固定化细胞	12.5	50-68
醋酸乙酯	β -羟基甾体脱氢酶		
	可溶酶	4.30	10
	固定化酶	62.5	35-60
醋酸乙酯	20 β 脱氢酶		
	固定化酶	15	25
苯/正庚烷 苯/正庚烷	Δ^1 -脱氢酶		
	细胞	0.13	2
	固定化细胞	0.25	50

的亲水性的大小对酶活力表现出有重要影响(图2)。对于疏水性底物,适当增加固定化载体

的疏水性,可提高底物在其中分配系数,增加固定化酶或细胞活力,其原因是增加疏水性底物在载体内的浓度。对需要脂溶性辅酶的甾体转化反应,载体的疏水性也是必要的。一些试验表明,用具有适当疏水性载体制备的固定化酶或细胞要比亲水性载体制备的固定化酶和细胞在作用非水溶性底物时,具有更好的稳定性^[10-14]如表4。

脂肪酶催化脂肪水解和酰基转移反应是另一种情况,酶催化的反应主要在二相界面上进行,增加界面积,可增加质量转移和反应速度。因此加入适当的乳化剂,使反应系统为乳浊状态,但要小心选择有机溶剂,以免酶在界面上很快失活。

三、水饱和的均一有机溶剂系统

利用脂酶或产酶酵母细胞催化 dl-薄荷醇琥珀酸单酯不对称水解,生产 l-薄荷醇,由于底物和产物在水中溶解度低,吸附于细胞表面反应速度极低。使用有机溶剂如:正庚烷、四氯化碳、氯仿等均可使之溶解,尤其正庚烷对底物和产物溶解度可达 39mM。由于游离细胞在有机溶剂中不悬浮,活性受其类型的影响。水解反应无水不能进行,采用水饱和的正庚烷系统时,固定化细胞的酶活力随凝胶的疏水性增加而增加,其稳定性也如此(图3)。用 PU-3 (光交联的聚氨基甲酸乙酯) 疏水性凝胶制备的固定化细胞在 30℃ 下水解 dl-薄荷醇琥珀酸单酯, l-薄荷醇收率为 80%,光学纯度 100%。固定化细胞半衰期为 55-63 天。长期反复使用表明,有机溶剂使酶部分变性。但不影响酶的立体专一性^[15]。

有机溶剂在酶法合成和转化水不溶性有机化合物中的应用,为生物催化剂的应用和酶工程的发展开辟了一个新的研究领域。从取得的结果看,十分令人鼓舞。研究还处于起始阶段,

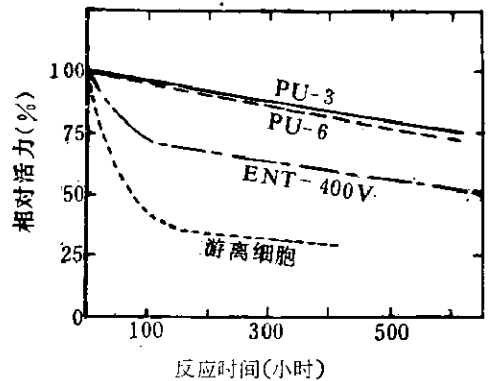


图3 固定化细胞的载体性质对其酶稳定性的影响
有机溶剂:正庚烷

需要的是做广泛深入的基础研究,才能使之得到更快的发展。可以预见,它的发展有带动性和方向性,但也不能认为任何酶反应以后均可使用有机溶剂。这样才能促进这方面的研究。

参 考 文 献

- [1] Lilly, M. D.: *J. Chem. Biotechnol.*, **32**: 162-169, 1982.
- [2] 福井三郎和田中溷夫: *发酵と工業*, **41** (7): 552-561, 1983.
- [3] Utagawa, T. et al.: *FEBS Lett.*, **109**: 261, 1980.
- [4] Yokozeki, K. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**(4): 225-231, 1982.
- [5] Irwin, M. et al.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**(5): 385-399, 1982.
- [6] 陈常庆,朱尚权: *化学通报*, **5**: 7-12, 1983.
- [7] Oyama, K. et al.: *J. Org. Chem.*, **46**: 5241-5242, 1981.
- [8] Morihara, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**: 396, 1980.
- [9] 加藤光一: *武田研究所報*, **40**(3-4): 253-302, 1981.
- [10] Kolot, F. B.: *Process Biochemistry*, **17**(6): 12-18, 1982.
- [11] Omata, T. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**: 143-155, 1979.
- [12] Omata, T. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **58**(4): 339-433, 1980.
- [13] Yamane, T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**(1): 2133-2145, 1979.
- [14] Buckland, B. C. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**(6): 815-826, 1975.
- [15] Omata, T. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**: 199, 1981.