

表面活性剂包衣酶 在有机溶剂中拆分对映异构体

宋宝东 吴金川 王世昌
(天津大学化学工程研究所, 天津 300072)

摘要:天然酶经表面活性剂包衣后在有机溶剂中的活性和对映选择性有显著提高,稳定性也大为改善。目前研究涉及的大多为酯化或酯交换反应,使用最多的为脂肪酶,底物的分子结构对包衣酶的对映选择性有显著影响。指出可以借助膜反应器来实现包衣酶的截留和反复利用及产物的分离,通过改良表面活性剂或改进包衣酶的制备过程可望进一步提高包衣酶的收率和活性,包衣酶催化反应的机理及动力学也有待深入研究。

关键词:酶;表面活性剂;对映异构体;拆分;有机溶剂

中图分类号:TQ423.93

文献标识码:A

Resolution of enantiomers by surfactant-coated enzymes in organic solvents

SONG Bao-dong, WU Jin-chuan, WANG Shi-chang

(Chemical Engineering Research Center, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The activity and the enantiotropic selectivity of native enzymes coated with surfactants are remarkably increased and the stability is also greatly improved. Present researches mainly focus on esterification and trans-esterification reactions mostly catalyzed by lipases. The substrate molecular structure has a great effect on the enantiotropic selectivity of coated enzymes. It was pointed out that membrane reactors might be used to retain surfactant-coated enzymes for reuse and also to separate products. The yield and the activity of surfactant-coated enzymes could be further increased by improving the structure of surfactants or by optimizing the preparation of surfactant-coated enzymes. Mechanisms and kinetics of the catalytic reaction of surfactant-coated enzymes also needed further investigation.

Key words: enzyme; surfactant; enantiomer; resolution; organic solvent

近 10 年来,在有机介质中进行酶反应是酶工程领域研究的一个热门。与水溶液中的反应相比,有机介质中的酶反应的优势在于:首先,当底物是疏水性物质时,其溶解度得到提高,从而提高了反应效率;其次,酶分子在有机介质中比在水中有更加严密的构型,这表现在酶的热稳定性的提高和对底物选择性的增强^[1];另外,酶在有机介质中催化反应可有效地避免细菌的污染。近年来,随着色谱分析、实验室合成及生物制药等技术的不断进步,人们对拆分后的对映异构体单体的需求量不断增加。因这些物

质大多为疏水性的,只能通过酯化、酯交换等反应来合成,这就需要在有机介质中利用具有高的对映选择性的酶催化剂来实现。关于在有机介质中进行对映异构体的拆分反应,人们已提出了酶粉直接分散、聚乙二醇(PEG)化学修饰酶和将酶溶于由表面活性剂分子在有机溶剂中形成的反胶团中等许多有效的方法^[2,3]。1988 年 Okahata 等^[4,5]报道了表面活性剂包衣酶的方法,因其具有制备容易、催化活性高、有机溶剂选择范围广等优点而倍受人们关注。

表面活性剂包衣酶是用两亲的表面活性剂分子

收稿日期:2001-08-13

基金项目:国家自然科学基金(29876031)及教育部归国留学人员启动基金资助项目

作者简介:宋宝东,男,1966 年生,在职博士生,助理研究员,主要从事酶工程和化工分离工程的研究;王世昌,男,1934 年生,硕士,教授,博士生导师,从事酶工程、膜分离和海水淡化等领域的研究。

对亲水的酶分子进行包衣,表面活性剂分子中的亲水基团一端与酶分子的羟基以氢键的方式结合,另一端的疏水基团朝外与有机溶剂接触。这样,利用表面活性剂分子的两亲性质不仅使酶分子避免了与周围的有机溶剂直接接触而可能引起的变性与失活,而且包衣后的酶可以很容易地溶解在有机介质中,使反应在均相中进行,反应的效率得到大幅度提高。

迄今为止,对于利用表面活性剂包衣酶在有机介质中催化“普通”反应(这里指非拆分反应)的研究

较多,而关于对映异构体拆分反应的报道则较少。笔者对表面活性剂包衣酶应用于对映异构体拆分反应的研究现状进行系统评述,并探讨今后进一步研究和开发的方向。

1 研究现状

关于表面活性剂包衣酶催化对映异构体的拆分方面的研究较少,表 1 中列出了此领域的一些代表性文献。

表 1 表面活性剂包衣酶应用于对映异构体拆分反应的研究现状

酶来源	反应体系	最适溶剂	主要研究内容	参考文献
脂肪酶	对映异构体的醇/有机酸	异辛烷 (文献 7 为环己烷)	不同碳原子数的脂肪醇或芳香醇与有机酸酯化反应初速度和转化率与时间的关系、溶剂的影响等	[6~9]
脂肪酶	对映异构体的仲醇/有机酸	异辛烷	反应动力学机理的研究及动力学参数的求取	[10~11]
脂肪酶	R/S-(1-苯乙醇)/月桂酸	异辛烷	先将酶分子用底物类似物进行分子印迹,再用表面活性剂包衣	[12~14]
过氧化氢酶	过氧化氢氧化	1,1,1-三氯乙烷	包衣酶在各种溶剂中的溶解性以及溶剂的疏水性参数对酶活性的影响	[15]

由表 1 可见,表面活性剂包衣酶催化对映异构体拆分的模型反应大多为酯化或酯交换反应,研究最多的酶为脂肪酶。下面就表面活性剂包衣酶催化对映异构体的拆分反应的酶活性、对映选择性等进行评述。

Okahata 等^[5]报道了表面活性剂包衣酶在有机溶剂中催化对映异构体拆分反应的活性,他们选用的模型反应是 R/S-对映异构体醇与过量的脂肪酸在 40℃ 下的酯化,有机溶剂为异辛烷(水含量为 40~80 g/m³),脂肪酶来源于 *Pseudomonas fragi* 22。结果表明,酶反应活性受底物分子结构影响,2-壬醇与苯甲酸、醋酸和新戊酸不发生酯化反应,当有机酸为己酸和月桂酸时,反应的对映选择性 E 值(以反应的速率比 k_R/k_S 来表示)可达 11~13。反应活性最高的为 1-苯乙醇与月桂酸的酯化反应, E 值高达 250,反应进行 1.5 h 后,R-异构体已完全反应。这样,反应产物就可以很容易地用简单精馏的方法获得纯的 S-1-苯乙醇。从实验结果可以看出,在一定的酶催化反应体系中,底物(包括醇和酸)的分子结构在很大程度上决定了酶反应的对映选择性,这也从另一方面证明了酶催化的专一性。

Okahata 等^[12]还报道了对来源于 *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*) 的脂肪酶首先进行分子印迹

然后再用表面活性剂包衣(imprinted lipid-coated lipase,以下简称 ILCL)来提高酶 E 值的方法,他们选用的模型反应为 0.05 mol/L 的 R/S-1-苯乙醇与 0.5 mol/L 月桂酸的酯化,溶剂为异辛烷(水含量 60~80 g/m³)。天然酶先用底物类似物如 R-1-苯乙醇进行分子印迹,然后用表面活性剂二-十八烷基-N-D-葡糖酸-L-谷氨酸酯进行包衣。表 2 为实验结果,从表 2 可以看出,天然酶的 E 值仅为 5.5,不同的酶处理过程获得的酶的 E 值相差很大,其中以先分子印迹后包衣所得酶的 E 值最高,达 77,比天然酶提高了 14 倍。

表 2 不同酶处理过程所得酶的 E 值比较

酶	反应初始速度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$		E
	v_R	v_S	
天然酶	71	13	5.5
天然酶分子印迹	2.7	0.46	5.9
包衣酶	440	26	16
包衣后再分子印迹	930	43	22
先分子印迹再包衣	1100	14	77

酶稳定性实验显示,先分子印迹后再包衣所得酶在 40℃ 以下可以保持稳定的高 E 值。但随温度

的升高, E 值显著降低。如当温度达 60°C 时, E 值下降至未进行分子印迹前的包衣酶的水平。在溶剂稳定性方面, ILCL 在异辛烷中保持 1~2 天后, E 值降低至未进行分子印迹前的水平。但将 ILCL 以酶粉的方式保存在冰箱中, 其对映选择性至少在 1 个月内保持不变。

Okazaki 等人^[6]研究了不同来源的脂肪酶经表面活性剂包衣后催化缩水甘油与月桂酸的酯化反应, 选用的表面活性剂为谷氨酸二油醇酯核糖醇, 溶剂为环己烷, 反应温度为 35°C 。结果表明, 来源于 *Rhizopus delemar* 的脂肪酶的催化效率最高, 包衣酶的 E 值达 7.6(其余为 1.0~1.6), 且初始反应速率比直接分散于有机溶剂中的天然酶粉高 100 倍以上。虽然包衣酶的对映选择性提高的幅度不是很大(仅为 5~8 倍), 但初始反应速率却得到显著提高, 因此提高了酶反应的效率。

2 展望

尽管到目前为止关于表面活性剂包衣酶应用于有机溶剂中对映异构体的拆分的研究仍处于实验室开发阶段, 离工业化生产还有许多工作要做, 但其作为有机相中酶催化反应的一种行之有效的催化剂, 已经引起研究者们的高度重视。

表面活性剂包衣酶巧妙地利用了表面活性剂分子的两亲性质, 使酶催化反应均相地在有机溶剂中进行, 提高了反应的效率和对酶的对映选择性。由于酶分子受到表面活性剂分子层的有效保护不直接与有机溶剂接触, 也使酶的稳定性得到提高。与酶粉直接分散、酶化学修饰和将酶溶于反胶团中等其他方法相比, 表面活性剂包衣酶具有制备容易、酶活损失小、酶的催化活性和稳定性高等优点。

但表面活性剂包衣酶与产物的分离是一个需要解决的问题, 可借助于膜分离技术使表面活性剂包衣酶被膜截流而产物和底物透过。另外, 表面活性剂包衣酶的收率还较低, 目前只能达 20%~50%, 因而表面活性剂包衣酶的制备方法有待进一步完善。其次, 用于包衣的表面活性剂的分子结构还有进一步改进的余地, 比如在疏水链上引入双键或支链, 都有可能取得良好的效果。还有, 目前对表面活性剂包衣酶催化反应的动力学研究还不深入, 对于包衣剂分子如何影响包衣酶的活性、稳定性和对映

选择性还缺乏令人信服的理论解释。但可以相信, 表面活性剂包衣酶在有机相酶催化特别是对映异构体的拆分中的应用具有广阔的前景。

参考文献

- [1] Klivanov A M. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents[J]. *Acc Chem Res*, 1990, 23: 114~120
- [2] Tsai S W, Dordick J S. Extraordinary enantiospecificity of lipase catalysis in organic media induced by purification and catalyst engineering[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 52: 296~300
- [3] Colton I J, Ahmed S N, Kazlauskas R J. A 2-propanol treatment increases the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward esters of chiral carboxylic acids[J]. *J Org Chem*, 1995, 60: 212~217
- [4] Okahata Y, Fujimoto Y, Ijro K. Lipase-lipid complex as a resolution catalyst of racemic alcohols in organic solvents[J]. *Tetrahedron Lett*, 1988, 29(40): 5133~5134
- [5] Okahata Y, Ijro K. A lipid-coated lipase as a new catalyst for triglyceride synthesis in organic solvents[J]. *J Chem Soc Chem Commun*, 1988, 20: 1392~1394
- [6] Okazaki S Y, Kamiya N, Goto M, et al. Enantioselective esterification of glycidol by surfactant-lipase complexes in organic media[J]. *Biotechnol Lett*, 1997, 19(6): 541~543
- [7] Carrea G, Ottolina G, Riva S. Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media[J]. *Tibtech February*, 1995, 13: 63~69
- [8] Okahata Y, Mori T. Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media[J]. *Tibtech February*, 1997, 15: 50~54
- [9] Yang H, Cao S G, Han S P, et al. Studies on the factors that affect stereoselective esterification of (*R*, *S*)-2-octanol with octanoic acid catalyzed by lipase in organic solvent[J]. *Appl Biochemistry Biotechnol*, 1996, 59: 177~186
- [10] Kamiya N, Goto M. How is enzymatic selectivity of menthol esterification catalyzed by surfactant-coated lipase determined in organic media[J]. *Biotechnol Prog*, 1997, 13: 488~492
- [11] Kamiya N, Kasagi H, Inoue M, et al. Enantioselective recognition mechanism of secondary alcohol by surfactant-coated lipases in nonaqueous media[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 65(2): 227~232
- [12] Okahata Y, Hatano A, Ijro K. Enhancing enantioselectivity of a lipid-coated lipase via imprinting methods for esterification in organic solvents[J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 1995, 6(6): 1311~1322
- [13] Dabulis K, Klivanov A M. Molecular imprinting of proteins and other macromolecules resulting in new adsorbents[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 39: 176~185
- [14] Klivanov A M. Enzyme memory-What is remembered and why[J]. *Nature*, 1995, 374: 596
- [15] Jene Q, Pearson J C, Lowe C R. Surfactant modified enzymes: solubility and activity of surfactant-modified catalase in organic solvents[J]. *Enzy Microb Technol*, 1997, 20: 69~74