

# 无水条件下的生物催化剂

王凡业, 薛文漪

(青岛科技大学化工学院, 山东 青岛 266042)

**摘要:**在工业范围内广泛使用无水生物催化剂还存在 2 个障碍: 反应速率和长期稳定性的问题, 本文重点介绍了使用生物催化剂设计技术来克服这些障碍, 包括酶修饰、固定化、蛋白质工程和非传统溶剂的使用等技术。

**关键词:**生物催化剂; 无水条件; 催化剂设计; 溶剂设计

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2006)12-0067-02

## Research on biocatalysis in anhydrous conditions

WANG Fan-ye, XUE Wen-yi

(Institute of Chemistry, Department of Bioengineering & Pharmaceutics, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

**Abstract:** There are two obstacles laying before wide application of biocatalysis in anhydrous conditions in an industrial scale: reaction speed and long-time stability. In this paper the techniques such as chemical modification and immobilization of enzyme, protein engineering, untraditional organic solvents, etc., which are used to overcome the obstacles are introduced.

**Key words:** biocatalysis; anhydrous conditions; biocatalyst engineering; solvent engineering

将酶从其天然水环境中移出可改善其催化能力和特异性,使其可在合成化学中与新的底物在新型的反应系统中发生反应。虽然酶的新的使用前景十分诱人,但是如果要在工业范围内广泛使用无水生物催化剂还有 2 个障碍: 就是反应速率和长期稳定性的问题, 本文将重点介绍使用生物催化剂设计技术来克服这些障碍, 叙述将集中于酶修饰、固定化和非传统溶剂的使用。

## 1 有机溶剂的影响

人们对生物催化剂所面临的问题提出了一些新思路,进行了一些研究,并且这些研究已经为水在催化剂中的复杂作用提供了一些更好的解释。标准体系是由悬浮在低水量(体积比 < 5%)有机溶剂中的酶组成;但是它也可以使酶溶解在近乎无水的有机溶剂中,这种系统可检测溶解于无水溶剂中的酶。

研究表明,酶可以在含水量很少的介质中起作用,但至今还不清楚残留水的何种性质对催化剂起关键作用,在使用甘油等水的类似物进行研究时发现这些作用是非常复杂的<sup>[1]</sup>。水在“干的”酶系统中会将溶剂和酶分隔开,最终使热力学活性在各个相中达到一个平衡点。只有在最佳含水量时,蛋白质结构的动力学刚性和热力学稳定性之间达到最佳平

衡点,酶才表现出最大活力<sup>[2]</sup>。

## 2 生物催化剂设计

虽然酶在有机溶剂中失活的现象并不普遍,但会在有机溶剂中底物结合和催化程度都减损,有助于减小这些影响。用于提高酶在有机溶剂中的活性和稳定性的方法各种各样,有简单的也有复杂的,活化的机制通常很难解释,其现象上的解释已用于许多方面。在有机溶剂中活化酶的一种最简单的方法是化学修饰法。

### 2.1 化学修饰

酶表面的化学修饰通常是使疏水部分与赖氨酸残基相结合,这样可以提高酶在有机溶剂中的溶解度、稳定性和底物选择性<sup>[3]</sup>。这个方法与定点突变相结合极大地改善了蛋白酶的专一性<sup>[4]</sup>。邻苯二甲酸酐(PA)与辣根过氧化物酶(HRB)的连接使酶对有机混合溶剂的耐受性提高了 1 倍,其热稳定性方面比天然酶提高了 4 倍<sup>[5]</sup>,更高的有机溶剂耐受性可以认为是通过除去酶表面 4 个赖氨酸中的 2 个来达到。由于 PA 的芳香化合物表面结构,加入 PA 可能更易于分隔疏水底物与活性位点,提高催化效率<sup>[6]</sup>。

### 2.2 酶固定化

固定化酶的应用广泛,现在已有关于酶和辅因

收稿日期: 2006-09-14

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(20176019)

作者简介: 王凡业(1964-),男,硕士,研究员,主要从事生物化工方面的研究,0532-84022755。

在非水系统中稳定性的报道。例如, Temino 的研究<sup>[7]</sup>表明将乙醇脱氢酶及其 NADPH 辅因子包入聚乙烯醇水凝胶中可以保护有机溶剂中的酶, 也可减小其热变性作用。固定化酶也会表现出较好的力学性质, 这些性质与其工业反应器中可能的应用有关。

支持物要便于底物和产物的快速扩散, 最近有一种新的纳米结构的生物催化剂基质出现, 它允许底物和产物穿过疏水区域扩散进入亲水部分, 酶则包埋于该部分<sup>[8]</sup>。基质的两性性质使得亲水部分在酶填充物上增大, 使得疏水部分在非极性溶剂中增大, 这种固定化技术使得庚烷中辣根过氧化物酶催化的反应比没有辣根过氧化物酶催化的反应循环总量提高了 230 倍。

### 2.3 蛋白质工程

在有机溶剂中可以通过定向进化和定点突变等技术来改变酶的特异性和提高活性。Magnusson 等<sup>[9]</sup>通过在南极假丝酵母脂肪酶 B (CALB) 的立体特异性部位上进行位点突变, 扩大了 CALB 的特异性区域(通常适合于一条乙基链), 改善了其在环己烷中对 4-庚醇与丁酸乙烯酰基化的特异性。而 Suzuki<sup>[10]</sup>的实验表明聚 3-羟基丁酸酯解聚物减小了其底物结合区域, 这使得它在氯仿中的内酯聚合反应比野生型酶产生出更长的聚合物链。

有利的修饰在体内通过选择合适的生长条件也会受到影响, 如 Rahman<sup>[11]</sup>研究的绿铜假单胞菌 K 产生的蛋白酶, 以及 Fukushima<sup>[12]</sup>研究的嗜盐生物盐盒菌链 S-1 中的  $\alpha$ -淀粉酶。

## 3 溶剂设计

### 3.1 离子液体

离子液体是液相有机盐, 其理化性质表明它不会对环境造成污染, 这种非水溶剂无疑是非常有发展前景的。离子液体可调性质已经使研究人员能够修饰酶的特异性、提高活性以及简化产品回收。改变阳离子和阴离子的能力允许研究人员同时溶解底物、酶和辅因子, 使传统上比较困难的反应有所改观。离子液体也与其他活化技术共同开发<sup>[13]</sup>(如聚乙烯乙二醇修饰), 由于它们的低蒸汽压, 离子液体能很容易地从反应溶质中分离和再循环, 使之成为传统有机溶剂的绿色替代品。

反应在离子液体 1-丁基-3 甲基咪唑六氟磷酸盐([Bmim] - [PF6])中进行与在现在常使用的溶剂叔丁醇中相比, 工业脂肪酶的比较结果表明其初始速率提高了 2 倍<sup>[14]</sup>。但在循环 10 次之后, 酶在离

子液体(限制在 20%)的活性比有机的溶剂中(48%)要低。相反地 Persson 等<sup>[15]</sup>报告了固定的枯草杆菌酯酶在离子液体[Bmim][PF6]中的半衰期比在己烷中延长了 30 倍。

### 3.2 表面活性剂系统

通过将两性表面活性剂引入有机溶剂, 酶会被包入相反的微粒, 它可用于水-油乳液中, 或者使用离子对产生可溶性复合物<sup>[16]</sup>。虽然增溶作用缓解了悬浮粒子的部分限制, 使之可以与固相底物反应, 但在两相或三相系统中引入界面现象, 会对系统性能有复杂的影响<sup>[17]</sup>。例如在酪氨酸酶-AOT(十六烷基硫代琥珀酸钠)乳状液系统中, 选择性底物与表面活性剂连接是不利的<sup>[18]</sup>。

### 3.3 功能性添加剂

最近用沸石分子筛进行的研究已经表明包括反应混合物中的这些材料可用于改善酶的电离状况<sup>[19]</sup>, 其中那些材料可认为是溶剂设计的另一种方法。对于在 di-IPE 中脂肪酶催化的香叶醇的酯化作用, 由于含 Na<sup>+</sup>的沸石分子筛的存在, 对增加的酶活性产生了诱导<sup>[20]</sup>。速率的提高归因于沸石分子筛促进一个碱性更强的酶形式而且促进了酶活性位点上负电荷的产生。

毫无疑问, 无水生物催化剂是一个十分有前景的研究领域。通过对酶结构改造的进一步理解, 以及对低水含量环境中反应力学的更深入的研究, 研究人员已提出了许多新的方法来提高反应速率, 并且通过高通量底物修饰和酶筛分使无水生物催化剂适合实际应用, 这些研究无疑会使该领域有更广阔的发展前景。

## 参考文献

- [1] Torres S, Castro G R. Non-aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems[J]. Food Technol Biotechnol, 2004, 42: 271 - 277.
- [2] 彭立凤. 有机溶剂对酶催化活性和选择性的影响[J]. 化学进展, 2000, 12(3): 296 - 304.
- [3] Mine Y, Zhang L, Fukunaga K, et al. Enhancement of activity and enantioselectivity by cyclopentyl methyl ether in the transesterification catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase co-lyophilized with cyclodextrins [J]. Biotechnol Lett, 2005, 27: 383 - 388.
- [4] Davis B. Chemical modification of biocatalysts [J]. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14: 379 - 386.
- [5] O'Brien A M, Smith A T, Fagan C O. Effects of phthalic anhydride modification on horseradish peroxidase stability and activity [J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 81: 233 - 240.

(下转第 73 页)

公司在泰国建造一个年产 20 万 t 的新型丙烷工艺 AN 生产装置,提供丙烷原料。

尽管旭化成工业公司没有透露新工艺细节,但是专利中提及了丙烷、氨、氧气和惰性气体的混合物在含有 Mo、V、Nb、Sn 等金属成分的硅石催化剂的催化作用下进行反应的信息。4 年前的实验室结果表明,丙烷的转化率大约为 90%,其中有 70% 选择性地转化为 AN,并且 AN 的总收率为 60%。

与氨氧化工艺相比,新的 AN 生产工艺具有较低的生产成本,特别是在具有大量廉价丙烷原料生产地时,低成本的特点更为显著。

Chemical Engineering, 2006, 113(9): 18

### 微生物可能成为阻止地下水中铀迁移的解决方案

美国能源部(U.S. DOE)估计美国全国范围内地下水中超过 25 000 亿 L 存在铀污染物,过去 10 年里,美国政府机构投资研究能够阻止铀的地下迁移的天然微生物,以防止铀迁移到庄稼、动物以及人类能够接触到的河流中。

美国西北太平洋国家实验室(Pacific Northwest National Laboratory)的科学家们首次认为他们现在明白了沙雷菌(*Shewanella oneidensis*)能够对有毒金属进行

化学改性并中和这些有毒金属的作用机制。微生物能够产生一种源于细胞外的聚合物物质如黏土,这种聚合物包含一种能够将铀离子转化为不溶性铀氧化物如沥青铀矿的物质。沥青铀矿在黏土内沉积成直径为 5 nm 的珠子,这些珠子可以像胶水一样将铀粒子与土壤粘结在一起,阻止其进一步迁移。

Chemical Engineering, 2006, 113(9): 18

### 真菌类微生物可以去除石棉的有害作用

新的研究结果发现,石棉巨噬真菌类微生物能够降低石棉纤维的有害作用。石棉来源于大量富石棉土壤以及废气矿石的天然沉积,搅动时产生一种含石棉的、危害健康的灰尘,但是将来这些沉积物通过土壤真菌的作用会变成对健康无害的物质。

石棉属于硅酸盐类矿物,含有铁、镁、钙、镍、铝等成分,而且作为纤维具有来自天然的独特性能。石棉纤维容易形成微小灰尘状纤维,如果吸入体内,就会附着并沉积在肺部,造成肺部疾病,引起组织损伤并增加了各种癌症发生的危险。

土壤真菌可以从纤维中去处对 DNA 造成损伤的活性铁离子。意大利托里诺大学(University of Torino)的 Bice Fubini 及

其同事用石棉进行体外实验,结果表明,当土壤真菌存在时, DNA 的损害程度会降低。研究人员相信真菌可以产生一种能够与铁离子粘合在一起的螯合分子,并且能够预防对人体有害的羟基自由基的形成。但是,石棉的易剥落性以及石棉纤维尖细边缘非常容易穿刺细胞壁的性质,导致人类肺部的健康问题。因此,如果石棉巨噬真菌不能使纤维发生物理变化,仍将对人类产生有害作用。

提供石棉管理服务的英国环境服务集团(Environmental Services Group)的总裁 Mark Heath 称,现在的问题是是否有足够多的可以埋到地下的真菌,这些真菌在地下不仅与铁而且还与其他化学元素进行作用,破坏材料的纤维特性。

意大利研究人员认为可以将真菌用在开采富含石棉的石头以及废矿石堆放区,他们计划在欧洲最大的石棉矿区——Balangero 矿区进行现场试验研究。

体外试验对危害源辨识或者在人体中决定性反应方面作用有限,而且最近流行的病学和毒物学研究表明,与闪石石棉相比,低剂量的温石棉几乎没有危害性。此次试验采用的是温石棉或者白石棉,试验中所用真菌类包括 *Verticillium*、*Paecilomyces*、*Fusarium* 菌类。

Chemistry and Industry, 2006(19): 9

(上接第 69 页)

- [6] Song H Y, Yao J H, Liu J Z, *et al.* Effects of phthalic anhydride modification on horseradish peroxidase stability and structure[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 36: 605 - 611.
- [7] de Temino D M R, Hartmeier W, Ansorge-Schumacher M B. Entrapment of the alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* in polyvinyl alcohol for the synthesis of chiral hydrophobic alcohols in organic solvents[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 36: 3 - 9.
- [8] Bruns N, Tiller J C. Amphiphilic network as nanoreactor for enzymes in organic solvents[J]. *Nano Lett*, 2005, 5: 45 - 48.
- [9] Magnusson A O, Rotticci-Mulder J C, Santagostino A, *et al.* Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B[J]. *Chem Bio Chem*, 2005, 6: 1051 - 1056.
- [10] Suzuki Y, Taguchi S, Hisano T, *et al.* Correlation between structure of the lactones and substrate specificity in enzyme-catalyzed polymerization for the synthesis of polymers[J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 537 - 543.
- [11] Rahman R N Z R A, Geok L P, Basri M, *et al.* Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K[J]. *Bioresour Technol*, 2005, 96: 429 - 436.
- [12] Fukushima T, Mizuki T, Echigo A, *et al.* Organic solvent tolerance of halophilic  $\alpha$ -amylase from a *Haloarchaeon*, *Haloarcula* sp strain S-1[J]. *Extremophiles*, 2005, 9: 85 - 89.
- [13] Maruyama T, Yamamura H, Kotani T, *et al.* Poly(ethylene glycol)-lipase complexes that are highly active and enantioselective in ionic liquids[J]. *Org Biomol Chem*, 2004, 2: 1239 - 1244.
- [14] Roberts N J, Seago A, Carey J S, *et al.* Lipase catalysed resolution of the Lotrfiban intermediate 2, 3, 4, 5-tetrahydro-4-methyl-2-oxo-1H-1, 4-benzodiazepine-2-acetic acid methyl ester in ionic liquids: comparison to the industrial t-butanol process[J]. *Green Chem*, 2004, 6: 475 - 482.
- [15] Persson M, Bornscheuer U T. Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents[J]. *J Mo Cat: B*, 2003, 22: 21 - 27.
- [16] Bindhu L V, Abraham T E. Preparation and kinetic studies of surfactant-horseradish peroxidase ion paired complex in organic media [J]. *Biochem Eng J*, 2003, 15: 47 - 57.
- [17] Straathof A J J. Enzymatic catalysis via liquid-liquid interfaces[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83: 371 - 375.
- [18] Rodakiewicz-Nowak J, Ito M. Effect of AOT on enzymatic activity of the organic solvent resistant tyrosinase from *Streptomyces* sp REN-21 in aqueous solutions and water-in-oil microemulsions[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 284: 674 - 679.
- [19] Fontes N, Partridge J, Halling P, *et al.* Zeolite molecular sieves have dramatic acid-base effects on enzymes in nonaqueous media [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 77: 296 - 305.
- [20] Peres C, Harper N, da Silva M D R G, *et al.* Effect of zeolites on lipase catalyzed esterification in nonaqueous media[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 37: 145 - 149. ■