

有机介质中酶催化反应体系的构建原则

隋德新 姜涌明

(江苏农学院生化教研室, 扬州 225001)

提 要

构建有机介质中的酶反应体系必须考虑四种物理化学原则, 即有机溶剂的选择, 体系中酶和有机溶剂的分配形式, 酶分子的存在状态和酶的选择。

关键词 有机介质, 酶反应, 构建理论

酶能在有机介质中起催化作用是酶学研究领域的新发展。与传统的水为介质的酶反应相比, 在有机介质中的酶反应具有独特的优点^[1]。(1) 可以使用水不溶的底物; (2) 可以降低底物或产物对一些酶的抑制作用; (3) 可以防止底物或产物不必要的水解反应; (4) 有利于产物和非固定化生物催化剂的回收; (5) 避免了微生物对反应体系的污染。但是, 由于酶是有催化活性的蛋白质, 在水介质中, 象氢键、静电键和疏水作用力等分子内和分子间相互作用力的组合, 构成了复杂的网络, 从而在酶分子表面形成一个水化层, 确保了酶分子严格的活性构象。而在有机溶剂中, 有机溶剂的引入, 常破坏上述相互作用力形成的网络, 使水化层丢失, 降低酶的稳定性和催化活性, 甚至完全变性^[2,3]。因此, 在有机介质中, 为了使酶充分地发挥作用, 必须保护酶的水化层。基于这种原因, 在有机介质中构建酶的催化体系必须考虑如下原则^[4,5]:

1. 有机溶剂的选择: 使用的有机溶剂尽可能不与维持酶分子天然构象的水化层强烈地相互作用。

2. 酶分子的存在状态: 若使用的溶剂一定要破坏酶的水化层, 酶的存在状态应该人为地加以改造, 如酶的固定化, 以提高酶对有机溶剂的抗性。

3. 酶和有机溶剂的分配形式: 在反应体

系中, 使水溶性酶和有机溶剂定向分配, 以达到所谓的空间分离作用, 维持酶活性。

4. 酶的选择: 使用的酶最好具有对抗有机溶剂变性的潜在能力。

一、有机溶剂的选择^[5-7]

有机溶剂对酶活性的影响主要有如下三种方式: (1) 有机溶剂直接与酶作用, 抑制或失活酶。在这种情况下, 有机溶剂破坏了维持酶活性构象的氢键和疏水作用力, 降低了酶的稳定性和活性。(2) 有机溶剂通过与底物或产物相互作用影响酶活性。(3) 有机溶剂直接与酶周围的水化层作用, 虽然这种作用并未直接破坏酶本身, 但使酶活性和稳定性下降。特别是高极性的溶剂能溶解较多的水, 使酶周围的必要水层被完全破坏, 导致酶失活。而疏水性溶剂不与酶结合的水化层作用, 对酶活性影响较小。

基于上述三种原因, 选择有机溶剂必须考虑下述几种因素。(1) 有机溶剂与反应的相容性。例如, 酶催化糖修饰反应, 必须在亲水性的与水互溶的溶剂(如二甲基甲酰胺等)中进行, 若使用疏水的有机溶剂, 底物不溶解, 酶促反应就不能发生。同样, 反应产物与溶剂的互溶性也是重要的。极性的产物常分散在酶的周围, 造成抑制作用和不必要的副反应。例如, 在正己烷中, 多酚氧化酶催化多酚氧化, 生成的产物醌

在正己烷中不溶解,并在酶周围的水层中发生不必要的聚合反应。而在以氯仿作溶剂的体系中,酯易于分配到溶剂中,所以酶不失活^[8]。(2)选择的溶剂对主反应必须是惰性的。例如醇和酯之间发生的酯基转移反应,生成一种新的醇和新的酯,该反应既不能用醇,也不能用酯作溶剂,否则无法使主要反应定量发生。(3)选择溶剂须考虑的其它因素是:溶剂的密度,粘度,表面张力,毒性,废物的处理和成本等。

那么,在特定的酶反应中,如何选择溶剂系统?所用的溶剂物化性质与酶活性间有何种联系呢?Brink 等对丙烯的环氧化作用研究表明:低极性高分子量(>200)的溶剂有利于酶活性^[33]。Laane 等人的类似研究表明^[33]:溶剂的 $\lg P$ 高时有利于酶活性, P 是指特定溶剂在水和辛醇双相系统中的分配比,即:

$$P = [\text{溶剂}]_{\text{辛醇}} / [\text{溶剂}]_{\text{水}}$$

在丙烯的环氧化反应中,溶剂的 $\lg P > 4$ 测得的酶活性高,而 $\lg P < 2$ 时酶活性低。这说明溶剂的极性高,亲水性高,越易使酶脱水失活。

在上述模型中,只反映了一些溶剂对酶活性和稳定性的影响,尚未说明溶剂对酶动力学的影响,如确定催化速度常数 K_{cat} 和 K_m 值。因此,在有机溶剂中,控制酶活性的变量很多,建立溶剂特性与酶活性和动力学间的联系还是一项艰巨的工作。

二、体系中酶和有机溶剂的分配形式^[9,10]

为了确保酶的稳定性和催化活性,设计的反应体系应使酶处于水相环境而不与有机溶剂直接接触。

① 水/水不溶的有机溶剂双相体系^[11,12]

该体系由含有可溶性酶(或完整细胞)的水相和非极性有机溶剂相构成。水相与有机相可形成一个接触的界面层,水相也可以水滴的形式分散在有机相中。在该体系中,酶反应仅在含酶的水相中进行。底物大部分处于有机相,少部分分配入水相,而酶反应的产物重新抽提

进入有机相,有机相再继续为水相提供底物。这种体系特别适于水中溶解度较差的底物(如固醇、脂肪)转换。

液-液双相体系的优点是:体系容易构建,酶与产物容易分离,避免了水解反应和产物的抑制作用。但是,该体系中,有机溶剂在水中尚有部分溶解作用,虽浓度很低,但仍能使酶失活。

② 液/固双相体系^[13,14]

该体系有两种形式,一种是悬浮在水相中的固定化酶(或固定化细胞)与水不溶的有机溶剂构成。在该体系中,使用固定化酶的优点是(1)酶稳定性比在液-液双相体系高。例如,固定在 CNBr-Sepharose 4 B 上的 β -羟类固醇脱氢酶在水-乙酸乙酯体系中连续使用两个月仍保留 60% 活性,而游离酶在几天内就完全失活^[14]。(2)该体系有利于生物催化剂的回收,特别是产物浓缩在水相时。(3)该体系中有有机溶剂/水相接触界面较大,降低了底物或产物转移时的扩散限制,因而提高了反应速度。缺点是载体与底物疏水性明显不同时,限制底物的转换。

液-固双相体系的另一种形式是把固体酶颗粒直接悬浮在有机溶剂中^[4]。1913 年, Bourquelot 等把苦杏仁酶悬浮在酒精中,以葡萄糖和乙醇合成了葡萄糖酯,产率达 80—85%。五十年后, Dastoli 等把结晶的 α -胰凝乳蛋白酶和黄嘌呤氧化酶悬浮在多种有机溶剂中均保留了活性。

为什么固体酶悬浮在有机溶剂中能保持其活性呢?原因是:在非极性的溶剂中,固体酶颗粒表面形成了一层变性蛋白质,此变性蛋白层起到了“屏蔽”作用,避免了颗粒内的部分与有机溶剂的接触。此外,在固体酶颗粒内部的酶分子受各方向邻近分子的紧紧挤压(类似鸟笼作用)^[15],提高了稳定性。

这种方法的优点是体系极易构建,并特别适用于非常疏水的有机溶剂体系;另外该体系适于高温反应。如脂酶悬浮在甲苯中,100℃时不仅稳定,且有很高活性^[4]。

值得注意的是：悬浮在有机溶剂中的固体酶的催化活性极大地依赖于制备该酶时溶液的 pH 值。这说明回收酶时水溶液的 pH 值直接影响酶的微环境的 pH 和酶分子上可离子化基团的电荷平衡。所以，在该体系中，必须将酶以胜任催化作用的离子状态置于有机溶剂中^[16]。此外，要控制酶颗粒的大小，酶颗粒小，可加大酶与有机溶剂的界面，使反应速度提高。

上述液/液、液/固双相体系的共同优点是：体系容易构建，产物和酶容易回收。缺点是：扩散限制严重，反应速度慢，不能使用分光光度技术跟踪反应进程。而使用下面的体系可以克服这些缺点。

③ 反向胶团体系^[4,9]

把表面活性剂溶解在非极性有机溶剂中，就可自发地形成近于球形的反向胶团。该反向胶团的结构是表面活性剂的疏水尾部朝外，极性的头部朝内的微胶团。这种结构十分类似于生物膜的脂双层，如图 1 所示



图 1 反向胶团的结构和酶的分布

在反向胶团的内部可容纳一定量的水，这部分水的极性、粘度、酸碱性和亲水性不同于外部的水。把酶的水溶液与表面活性剂和非极性的有机溶剂混合，经简单振荡，就会自发地形成反向胶团，酶分配在反向胶团内部的水性环境中(类似于洞穴)，从而把酶和胶团外部的有机溶剂分开，避免了酶变性。

反向胶团体系的优点是：(1) 胶团内部能够为酶作用提供最佳的微环境；(2) 胶团体系是透明的和热力学上稳定的，有利于光学方法跟踪酶反应进程；(3) 在表面活性剂的性质和水含量最佳化时，反向胶团中的酶稳定性可大大提高；(4) 适于疏水化合物的酶促合成与转换。但是，反向胶团结构容易破坏，胶团中容纳的酶量也有限；另外，高浓度的表面活性剂影响产物的

分离和酶的回收。Luisi 等提出^[9]把含酶的胶团与有机溶剂间用半透膜隔开，使含酶的胶团不透过膜，而产物和反应物可透过膜，反应结束后，可得到清洁的产物。

④ PEG-酶复合物/有机溶剂体系^[17]

酶经过聚乙二醇 (PEG) 修饰后能溶于有机溶剂，形成一个光学透明的溶液体系。在该体系中，由于 PEG 长链的高度水化作用，在 PEG-酶周围形成一个水化层，避免了有机溶剂与酶的直接作用，保护了酶活性和稳定性。例如经 PEG 修饰的辣根过氧化物酶和过氧化氢酶在甲苯中与天然的酶有同样的吸收光谱。说明酶结构受到 PEG 的保护。此外，经 PEG 修饰的酶耐热性明显提高，有利于加速反应进行。

三、酶分子的存在形式

在水/有机溶剂共存体系中，若使用的溶剂一定要破坏酶的结构和活性，那么，可将酶人为地加以改造，如酶的固定化或化学修饰，以提高酶对有机溶剂的抗性。

酶分子经固定化方法结合到不溶性载体上可使酶对抗有机溶剂的变性作用，提高酶反应速度和半衰期，酶的热稳定性也明显提高。例如， α -胰凝乳蛋白酶共价包埋在聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 细颗粒中，在辛醇中的热稳定性比游离酶的热稳定性高，也明显高于该酶在水中的热稳定性^[18]，如图 2 所示。

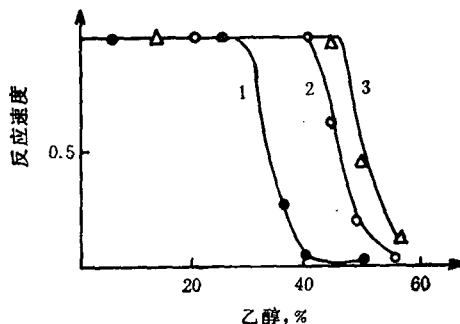


图 2 乙醇浓度对 α -胰凝乳蛋白酶的影响

1 是游离酶；2、3 是酶与载体间形成 5 个和 12 个共价键的固定化酶

目前，经固定化后，酶稳定性和活性提高的机制尚不清楚。推测(1)在固定化酶周围，水的

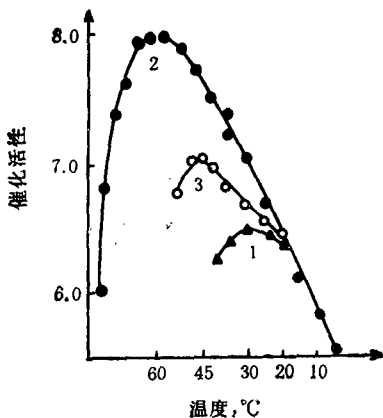


图3 α -胰凝乳蛋白酶与温度关系
1、2 是以辛醇为介质

浓度增高,保护了酶的水化层,从而提高了酶对有机溶剂的抗性。(2)通过酶与载体间形成的多点结合作用,稳定或固定了酶的催化活性构象。例如, α -胰凝乳蛋白酶与聚丙烯酰胺凝胶共价结合后,在乙醇中的稳定性明显提高,并且固定化 α -胰凝乳蛋白酶对有机溶剂的抗性随着酶与载体间共价键数量的增加而增加,结合的键越多,稳定性越高^[18],如图3所示。(3)使用的载体会通过分配效应剧烈地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以上时可强烈抑制马肝醇脱氢酶(HLADH),但在乙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时也不会发生抑制作用^[18]。此外,载体的疏水性影响底物分配到酶最接近的水环境中^[2,3]。载体疏水基增加可提高酶对疏水底物的活力。因此,载体的性质,载体与酶的结合方式和强度是影响固定化酶在溶剂中稳定性和活性的内在因素。

四、酶的选择

解决有机溶剂中生物催化反应的直接方法是寻找在有机介质中能保持催化活性构象的酶。事实上,有些酶能直接溶于无水的有机溶剂中并发挥催化作用。例如,溶解于二甲亚砜

和二甲基甲酰胺中的血球铜蛋白的吸收光谱与EPR光谱与其在水介质中十分类似,更重要的是在上述两种溶剂中血球铜蛋白具有超氧化物歧化酶活性。此外,通过蛋白质的甲基化作用,疏水分子对酶蛋白的修饰均可提高酶在有机溶剂中的溶解性和稳定性。而蛋白质工程技术的迅速发展,将设计和生产出在有机溶剂中具有高活性的酶制品^[20]。

综上所述,按照上述四项物理化学原则,在有机溶剂中构建生物催化体系的方法是多种多样的。理想的体系通常是多种因素的组合结果。选用的溶剂既有利于保护酶的水化层又有利于维持酶蛋白内部的疏水相互作用,以便发挥酶的最佳活性。

参考文献

- 1 Klivanov A M et al. *Chemtech*, 1986; 6: 354
- 2 Martinek K et al. *Biocatalysis*, 1987; 1: 9
- 3 Laane C. *Biocatalysis*, 1987; 1: 16
- 4 Levashov A V et al. *Enzyme Microb Technol*, 1988; 12: 710
- 5 Dordick J S. *Enzyme Microb Technol*, 1989; 4: 194
- 6 Laane C et al., *Biotechnol Bioeng*, 1987; 30: 81
- 7 Klivanov A M et al. *Biotechnol Bioeng*, 1986; 28: 417
- 8 Klivanov A M et al. *Appl Biochem Biotechnol*, 1985; 11: 401
- 9 Dickinson M et al. *Enzyme Microb Technol*, 1989; 1: 55
- 10 Klivanov A M et al. *J Biol Chem*, 1988; 263: 3194
- 11 Cremonesi P et al. *Arch Biochem Biophys*, 1973; 159: 7
- 12 Lilly M D et al. *Biotechnol Bioeng*, 1975; 17: 815
- 13 Kashiro S et al. *J Biotechnol*, 1985; 2: 47
- 14 Carrea G et al. *Biotechnol Bioeng*, 1979; 21: 39
- 15 Iaks A et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 3192
- 16 Wheeler C J et al. *Arch Biochem Biophys*, 1986; 248: 429
- 17 Inada Y et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 122: 845
- 18 Sergeeva M V et al. *Biokhimiya (Russ)* 1988; 4: 69
- 19 Dectx J S et al. *Trends Biotechnol*, 1988; 6: 15
- 20 Mozhaev V V et al. *CRC Crit Rev Biochem*, 1983; 6

【本文于1989年12月30日收到,1990年5月26日修回】