

非水酶学和非水相生物催化研究进展

杨仲毅^{1,2}, 倪晔¹, 孙志浩¹

1 江南大学生物工程学院, 无锡 214122

2 浙江海正药业股份有限公司, 台州 318000

摘要: 近年来工业生物技术飞速发展, 酶学和生物催化领域也取得突破性进展, 特别在酶在非水相中活性及稳定性研究, 耐溶剂生物催化剂的筛选、构建、修饰和改造, 生物相容性和环境相容性好的绿色介质等方面取得了较大的进展。最近的研究热点和未来几年的研究方向主要为: 基于基因组信息的耐溶剂酶的虚拟筛选和构建; 基于自然界筛选新酶基因的耐溶剂酶重构和改造; 离子液体等环境友好的绿色介质系统等几个方面。

关键词: 非水相, 生物催化, 耐溶剂酶

Recent trend of nonaqueous enzymology and biocatalysis in nonaqueous media

Zhongyi Yang^{1,2}, Ye Ni¹, and Zhihao Sun¹

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd., Taizhou 318000, China

Abstract: With the rapid development of industrial biotechnology, breakthrough in enzymology and biocatalysis has been made in recent years, especially in areas of stability and activity of enzyme in nonaqueous media, screening, construction and modification of solvent-tolerant biocatalysts, as well as the development of green solvent with excellent biological and environmental compatibility. Recent trend and future focus include: in silico virtual screening and construction of solvent-tolerant biocatalysts based on bioinformatic technology, modification and construction of native solvent-tolerant biocatalysts, the development of environmental friendly green solvent such as ionic liquids.

Keywords: nonaqueous, biocatalysis, solvent-tolerant biocatalyst

酶是在生理条件下执行功能的生物催化剂, 以酶工程为核心的技术以其水溶液体系、条件温和、具有对映体选择性等特点^[1], 成为绿色化学的主要技术之一; 酶在制药、食品、纺织、洗涤用品等行业有着广泛深入的用途, 已经发展成为全球性的酶工程产业。自上世纪 60 年代酶大规模生产应用至今已有半个世纪, 由于生产工艺不断改善, 基因工程酶

的应用和酶的新应用领域开发, 工业酶产业稳定增长, 广泛应用于医药和试剂、纺织和皮革工业、食品和饲料工业等行业。预期 2011 年全球酶制剂需求将达到 60 亿美元, 平均年增长率达 7.6%^[2]。

然而酶的催化作用不仅限于对天然状态的模拟。理论上说, 酶几乎可以催化有机化学中现有的各类反应, 有些酶可以在极端环境如高温条件下起

Received: October 8, 2009; Accepted: October 22, 2009

Corresponding author: Ye Ni. Tel: +86-510-85329265; Fax: +86-510-85918252; E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

作用,有些可以催化有机相中的反应,有些则具有独特的催化效果,可以催化传统有机化学难以实现的反应。这些特点比较吻合化学工业的要求。化学工业往往使用非天然底物,对环保、安全的要求也逐渐提高,对酶的生物催化过程也提出了更高的要求。

将酶应用于生物催化的主要挑战是将生理状态下的催化剂转变为工业过程中苛刻条件下执行功能的催化剂^[3]。多数酶在水相催化,反应本身是安全可放大的。但化学反应过程往往使用非生理性底物,自然界的酶可以在低浓度底物时工作,产生的产物浓度低,远达不到工业化的要求。低产物浓度增加了下游处理的负担,回收产物时需要去除大量的水,影响大规模过程的经济性。许多产品制造过程需要液液萃取,仍然需要耗费大量有机溶剂。非水相生物催化及原位产物分离技术就成为绿色制造新化合物的一个很好选择^[4]。

1 非水相机理与提高耐受性研究进展

1984年,Zaks等在Science上发表“Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100°C”^[5],使原来认为“生物催化必须在水溶液中进行”的酶学概念发生了革命性的变化,并由此开创了非水相生物催化的新时代。生物催化剂在有机溶剂中反应与常规有机

化学过程相同,但所使用的生物催化剂必须对化学品和有机溶剂耐受性好。某些生物催化反应可在水-有机溶剂两相体系中进行,可减少有机溶剂用量。

过去几年里关于非水相生物催化剂的溶剂耐受性研究进展较大。但阐明机理较难,仍在猜测阶段,许多例子只是肤浅解释。分子动态模拟与实验结果结合,提供了深入了解有机溶剂对酶毒害作用的一种方法,如水分子的夺取和对活性位点的渗入(Penetration)(图1)^[6-7]。

一些酶具有内源性耐溶剂特性。极端生物可以在极端环境下生存,很有希望获得高稳定性酶^[8],这是当前的研究热点。这些极端生物中的基因克隆与表达后有可能更适用于非水相生物催化。以革兰氏阴性菌 *Pseudomonas* 和海洋来源的革兰氏阳性菌 *Bacillus* 为代表的一类耐溶剂细菌被统称为 OSTB (Organic solvent-tolerant bacteria)^[9]。对于 *Pseudomonas* 细胞耐溶剂特性的机理曾有研究显示^[10]:溶剂对细胞的毒害作用主要是由于溶剂在细胞质膜上的富集造成的,而微生物细胞主要通过两种手段来应对溶剂的毒害作用。一方面,细胞通过改变自身细胞膜的脂肪酸(Fatty acid)组成来调整细胞膜的通透性和流动性,表现为细胞膜内的顺式(*Cis*)不饱和脂肪酸转化为反式(*Trans*)不饱和脂肪酸。另一方面,细胞

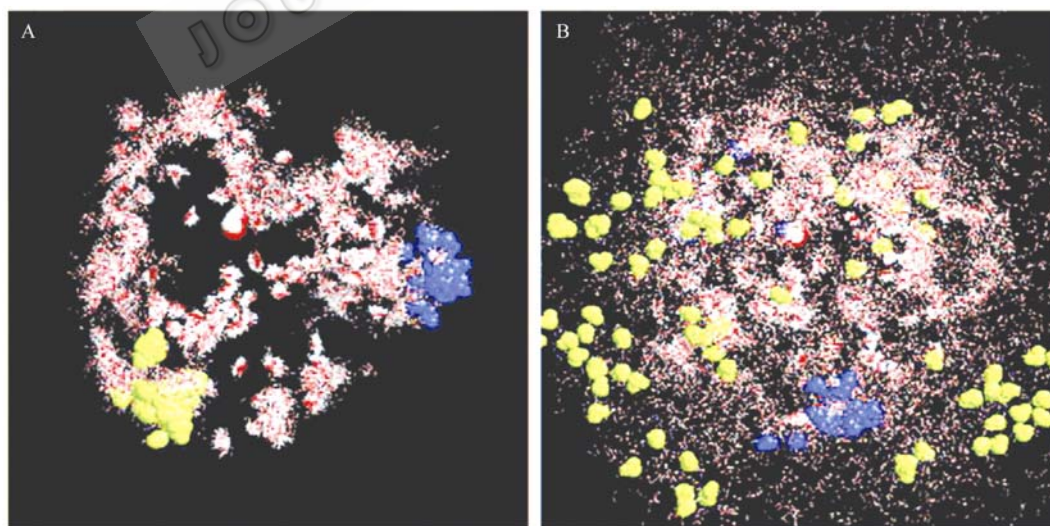


图1 有机溶剂对水分子的影响^[6-7]

Fig. 1 Effect of organic solvents on proximal water molecules^[6-7]. Superposition of 90, 3.6 ns snapshots of water stripping from ion-paired subtilisin BPN0 in the organic solvents. (A) Octane. (B) Acetonitrile (enzyme not shown). Water molecules are shown in wire-frame format and some are color-filled on the basis of their translational diffusivity: red, tightly bound; blue, loosely bound; yellow, freely moving. It was found that about 25% of water molecules within 4 Å of the enzyme are stripped away in acetonitrile.

膜上存在溶剂外排系统(Solvent efflux system), 其 SrpABC 甲苯外排泵(Efflux pump), 可协助细胞排出甲苯。

非水相体系要实现工业化, 生物催化剂的活性及稳定性下降是最大障碍。提高有机溶剂耐受性和酶活的方法有多种, 酶修饰、固定化、非传统介质的应用等生物技术改造是克服这些障碍的重要方法^[6]。

酶化学修饰或赋形剂激活方法有助于有机溶剂中活性位点的保存, 提高酶的柔性。酶的化学修饰主要是酶表面基团尤其是赖氨酸的疏水修饰, 使酶在有机溶剂中稳定性、溶解度提高。赋形剂技术如将青霉素酰胺酶与盐共冻干^[6], 使其在正己烷中的转酯活性提高了 35 000 倍。推测是由于冻干时活性位点的保存及有机环境中柔性增强的结果。

定向进化、定点突变等实验室技术也可提高酶在有机溶剂中的活性^[11]。南极假丝酵母 *Candida antarctica* lipase B 立体专一性区域点突变使其在环己烷中专一性常数提高了 270 倍, 最有效的点突变是 trp104Ala。

固定化技术可以保护酶在有机溶剂中的变性^[12]。

介质工程通过选用不同物理化学特性的反应介质改变酶与底物作用的微环境, 达到对生物催化剂的性能进行人工强化和定向调控的目的。与常规有机溶剂相比, 一些非传统溶剂也能增强酶的溶剂耐受性, 提高酶活, 改善其对映体选择性^[13]。例如, 对于很多疏水性很强的底物, 由于其在水溶液中几乎不溶而导致分散性很差。此时, 加入少量表面活性剂即可显著地改善底物的分散状况, 大幅度提高反应的速率和选择性。最近离子液体的应用也提高了酶的长期稳定性^[14], 并可促进酶、辅因子和底物的同时溶解。

将固体树脂等吸附材料加入酶反应体系固-液两相介质系统, 有时也被认为是非水相体系^[15]。在固体或液体的两相系统中吸附或萃取对生物催化剂有抑制作用的底物、产物, 也被认为是相对提高了生物催化剂对高浓度底物、产物的耐受性。

2 工业化非水相生物催化

非水相生物催化已经从实验室研究走向了工业

应用, 在工业规模生物反应过程中, 很多都有有机相的参与。已经比较成熟的有酯化/酰化反应(脂肪酶/蛋白酶)、水解反应(脂肪酶/蛋白酶)、羰基还原反应(酮还原酶/醇脱氢酶)、腈水解反应(腈水解酶/水合酶)和腈合成反应(羟腈化酶), 正在向规模化应用的如转氨反应(转氨酶)、烯醇还原反应(烯醇还原酶)、羟化反应和 Bayer-Villiger 氧化反应(单加氧酶)、环氧水解反应(环氧水解酶)、环氧化反应(卤过氧化酶), 还有硫酸酯构型翻转反应(烷基硫酸酯酶)、脱卤反应(脱卤酶)、C-C 键形成反应(醛缩酶等)以及消化化反应(氨氧化酶、异构酶)等^[4,16-17]。这些酶催化的反应具有很高的效率和较少的副产物/废弃物排放, 对制药和化工行业产生非常深远的影响。

脂肪酶商品化品种多, 用途广泛, 常被用于非水相的生物催化反应。BASF 公司(R)-1-苯乙胺的选择性酰化生产工艺即是由脂肪酶催化^[18-19], 该工艺已商业化。在该工艺中, 脂肪酶在甲基叔丁基醚溶剂中催化消旋苯乙胺的选择性酰化反应, 分离出未酰化的(S)-苯乙胺后, (R)-1-苯乙胺酰化产物可以通过碱水解得到(R)-1-苯乙胺(图 2)。许多种胺可以通过这种有机溶剂中的选择性酰化方法得到拆分, 可以用于催化这个反应的酶有 *Subtilisin carlsberg* 和 *Burkholderia plantarii* 来源的脂肪酶、*Candida antarctica* lipase B (EC 3.1.1.3)及青霉素酰化酶(EC 3.5.1.11)等。

利用氰醇裂解酶生产(S)-氰醇和(S)-羟基羧酸在经济上是很具有吸引力的工艺路线。日本触媒株式会社专利 EP1026256^[20]公布的(S)-间苯氧基苯甲醛氰醇催化反应体系为 0.15 mol/L pH 4.0 的柠檬酸钠缓冲液平衡的异丙醚, 酶的形式为基因工程大肠杆菌的丙酮干粉, 反应结束后转化率为 96.9%, 产物 *e.e.* 值为 58.6%; DSM 专利 EP 927766^[21]公布的反应体系为甲基叔丁基醚和水两相组成, 酶的形式为毕赤酵母发酵液离心上清^[22], 反应结束后转化率为 97%, 产物 *e.e.* 值为 98%(图 3)。(S)-间苯氧基苯甲醛氰醇是生产拟除虫菊酯的手性中间体, DSM 已建立了(S)-醇腈酶催化的工业化高效生产工艺过程。

Dowpharma 公司利用 Diversa 公司的腈水解酶生产(R)-4-氰基-3-羟基-丁酸(阿托伐他汀合成路线的关键中间产物)(图 4)^[23-25]。该工艺中反应底物

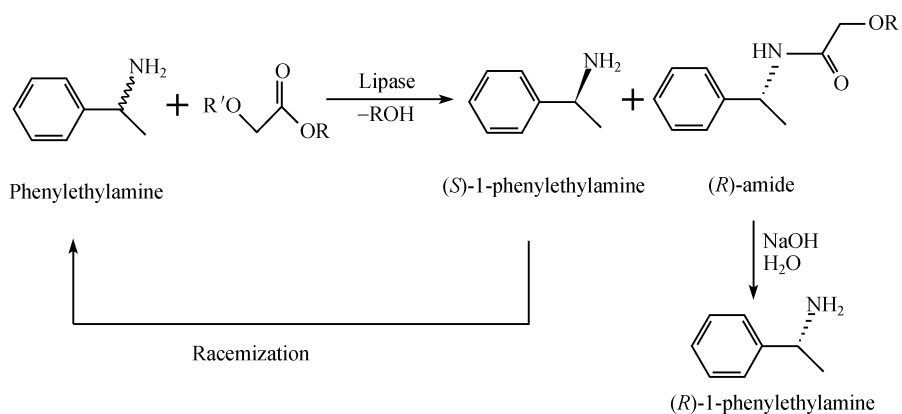


图2 (R)-1-苯乙胺非水相生物催化

Fig. 2 Nonaqueous biocatalysis for (R)-1-phenylethylamine production.

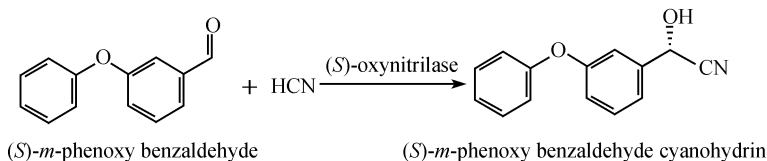


图3 除虫菊酯的手性中间体的生物合成

Fig. 3 Biosynthesis of pyrethroid intermediate.

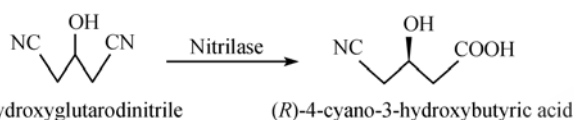


图4 (R)-4-氰基-3-羟基-丁酸的酶法合成

Fig. 4 Enzymatic synthesis of (R)-4-cyano-3-hydroxybutyric acid.

3-羟基戊二腈(HGN)是一种与水互溶的有机试剂,反应时底物浓度可以达到3 mol/L,腈水解酶不仅可以在16 h内可将底物100%地转化,而且通过对腈水解酶的定向进化,将该酶的190位丙氨酸残基突变为组氨酸后,产物*e.e.*值从原始酶的88%上升到99%。

3 非水相生物催化研究的几个科学问题和研究方向

3.1 需要进一步研究与关注的具体问题

耐溶剂生物催化剂的筛选和构建,包括耐溶剂菌的特性与机理研究、基于基因组信息的酶的虚拟筛选(In silico virtual screening)、耐溶剂酶活性指纹谱(Enzyme activity fingerprinting)高通量测定和表达方法、溶剂外排系统在非耐溶剂菌中的构建、耐溶剂菌生物催化体系的构建等。

对酶进行蛋白质修饰以改变酶的催化特性^[26],基于蛋白质工程的酶的定向进化,提高酶在高底物浓度和有机溶剂体系中的催化活性;酶固定化,提高其溶剂耐受性从而应用于非水相催化,特别是研究新型纳米固定化基质。

离子液体、超临界介质^[27]等非传统介质的研究;高效的液-液两相萃取催化介质系统,例如反胶束系统、油点系统、无机盐-水溶性高分子双水相系统、表面活性剂、功能添加剂等研究,以最大限度地提高系统的生物相容性、酶对高浓度底物、产物的耐受性以及工业化运行操作中的寿命周期。

3.2 发展多学科技术

生物催化数据库(BioCatalysis)、生物转化数据库(Biotransformations)、溶剂选择数据库(Solventcentral.com)等生物信息学的完善与运用,能为适合非水相反应的生物催化剂及其催化反应条件的筛选,为精细化学品及大宗化学品的生物合成提供多种选择。

高通量检测与筛选技术可以极大地加快非水相生物催化剂及介质筛选和优化研究进程,并为工业化过程放大提供科学基础和数据支持^[28]。

非水相生物催化的工业化技术研究,如设定量

化的绿色指标, 生物相容性和环境相容性研究, 过程优化、设备技术、自动化控制及系统集成等研究。

REFERENCES

- [1] Goldberg K, Schroer K, Lütz S, *et al.* Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**: 237–248.
- [2] Global demand for enzymes to approach \$6 bn. *Focus Catal*, 2008, (1): 2. doi: 10.1016/s1351-4180(08)70005-5.
- [3] Illanes A. Enzyme Biocatalysis-Principles and Applications. London: Springer-Verlag, 2008: 2.
- [4] Woodley JM. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol*, 2008, **26**(6): 321–327.
- [5] Zaks A, Klivanov AM. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*, 1984, **224**(4654): 1249–1251.
- [6] Hudson EP, Eppler RK, Clark DS. Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, **16**: 637–643.
- [7] Yang L, Dordick JS, Garde S. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophys J*, 2004, **87**: 812–821.
- [8] Borgne SL, Quintero R. Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel Proc Technol*, 2003, **81**: 155–169.
- [9] Sardesai Y, Bhosle S. Isolation of an organic-solvent-tolerant cholesterol-transforming *Bacillus* species, BC1, from coastal sediment. *Mar Biotechnol* (NY), 2003, **5**: 116–118.
- [10] de Bont JAM. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Tibtec December*, 1998, **16**: 493–499.
- [11] Bloom JD, Meyer MM, Meinhold P, *et al.* Evolving strategies for enzyme engineering. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, **15**: 447–452.
- [12] Matsuda T, Yamanaka R, Nakamura K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, **20**: 513–557.
- [13] Lee MY, Dordick JS. Enzyme activation for nonaqueous media. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**: 376–384.
- [14] Roosen C, Müller P, Greiner L. Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **81**: 607–614.
- [15] Kim PY, Pollard DJ, Woodley JM. Substrate supply for effective biocatalysis. *Biotechnol Prog*, 2007, **23**: 74–82.
- [16] Hilterhaus L, Liese A. Building blocks. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2007, **105**: 133–173.
- [17] Bommarus AS, Polizzi KM. Novel biocatalysts: recent developments. *Chem Eng Sci*, 2006, **61**: 1004–1016.
- [18] Balkenhohl F, Hauer B, Ladner W, *et al.* Resolution of the racemates of primary and secondary amines by enzyme-catalyzed acylation: US Patent, 4332738, 1995-03-30.
- [19] Dittrich K, Balkenhohl F, Ladner W. Separation of actively amides: US Patent, 19534208, 1997-03-20.
- [20] Semba H. Method for the production of optically active cyanohydrins: US Patent, 1026256, 2000-09-08.
- [21] Poechlauer P, Schmidt M, Wirth I, *et al.* Enzymatic process for the preparation of (S)-cyanohydrins: US Patent, 927766, 1999-07-07.
- [22] Hasslacher M, Schall M, Schwab H, *et al.* (S)-hydroxynitril lyase from *Heva Brasiliensis*: US Patent, 9703204, 1997-01-30.
- [23] Desantis G, Zhu ZL, William A, *et al.* An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 9024–9025.
- [24] DeSantis G, Wong K, Farwell B, *et al.* Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene sitesaturation mutagenesis (GSSM). *J Am Chem Soc*, 2003, **125**: 11476–11477.
- [25] Bergeron S, Chaplin DA, Edwards JH, *et al.* Nitrilase-catalyzed desymmetrisation of 3-hydroxyglutaronitrile: preparation of a statin side-chain intermediate. *Org Proc Res Dev*, 2006, **10**: 661–665.
- [26] Salleh AB, Basri M, Taib M, *et al.* Modified enzymes for reactions in organic solvents. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, **102-103**: 349–357.
- [27] Knez Z. Enzymatic reactions in dense gases. *J Supercrit Fluids*, 2009, **47**: 357–372.
- [28] Pohn B, Gerlach J, Scheideler ML, *et al.* Micro-colony array based high throughput platform for enzyme library screening. *J Biotechnol*, 2007, **129**: 162–170.