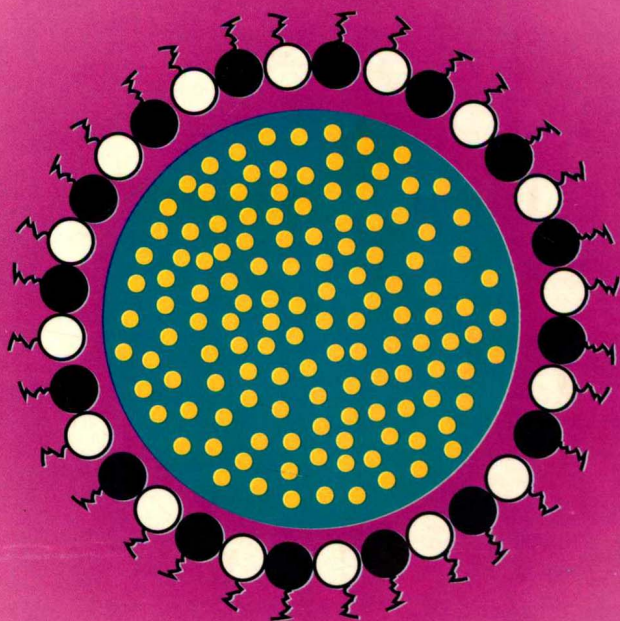


酶 化 工

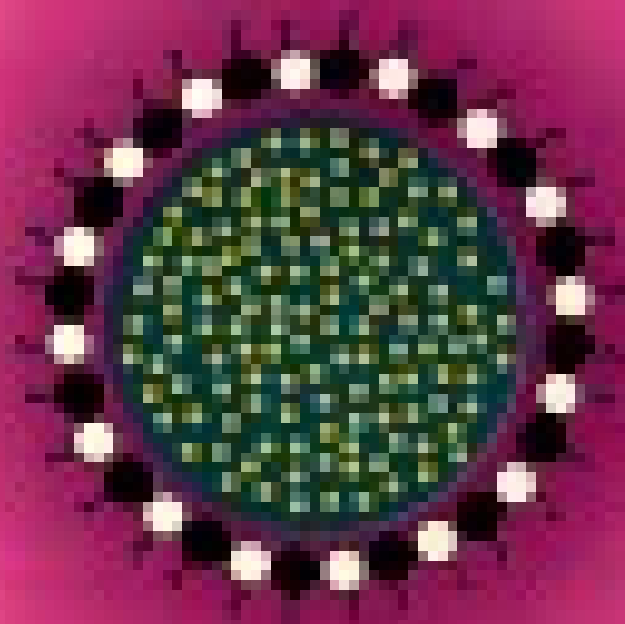
王运吉 张苓花 著



大连海事大学出版社

酶 化 工

王國興 曾軍民 編



人民海軍大學出版社

酶 化 工

王运吉 张苓花 著

大连海事大学出版社

酶 化 工

王运吉 张苓花 著

责任编辑:张娴

封面设计:王艳

大连海事大学出版社出版

大连海事大学出版社发行

大连海事大学印刷厂印刷

开本:850×1168 1/32 印张:10 字数:251 千
1997 年 9 月第 1 版 1997 年 9 月第 1 次印刷

印数:001~520 册 定价:24.00 元

ISBN 7-5632-1032-6/O · 65

内 容 简 介

本书概述了酶化工中关于酶促反应用于有机合成及天然产物修饰等方面的原理和方法,重点反映了当前国际上非水介质酶反应的发展现状。本书共分9章,包括第1章,酶促反应介质概论;第2章,非水酶学概论;第3章,酶促有机合成概论;第4章,糖及其类似物的酶促合成;第5章,氨基酸的酶法合成;第6章,生物活性肽及蛋白质的酶法合成;第7章,酶促酯合成与天然油脂的修饰;第8章,固定化脂肪酶及其反应器;第9章,其它生物活性物质的酶促合成。

本书可供从事生物化学、微生物学、日用化工、化学工程、有机化学、食品、发酵、制药等方面的科研和生产人员以及大专院校师生参考,也可作为研究生和大学高年级教材或参考书。

前 言

酶化工是酶工程或酶法加工工程,它是生物技术的分支学科,也是生物化工或生物化学工程的分支领域,它还是化学工程的前沿领域之一。酶化工是将酶学理论和科学知识转化为生产力,实现产业化和商品化的桥梁。近些年来,酶化工已取得了振奋人心的进展。特别是最近十多年来,由于非水酶学新领域的崛起,不仅更新了人们的观念和思维方式,引起传统水介质酶学的深刻变革,而且使酶的应用展现了更加广阔的前景,正在使化学-酶法合成变为现实,并取得了惊人的进展。酶化工作为酶学、化学和工程的交叉学科和多学科边缘地带与接触点,已经引起制药、有机合成、精细化工、环境及生物技术等领域的科学工作者的广泛关注。酶化工已进入了新的黄金时代。

在编写本书时我们注意到以下几个原则:首先,重点讨论酶化工新的分支领域非水介质酶反应概况,为了保持完整性,也兼顾水介质酶反应;其次,为了适用于各有关领域的读者使用,主要内容集中在酶化工多学科接触点,即酶促合成方面的现状、进展及发展趋势;第三个原则是尽量列出最近时期的主要评论或原始文献目录,以方便读者进一步学习和研究。

本书的内容可以分成两大部分,第一部分是概论(第1章~第3章);第二部分是个论性质的内容(第4章~第9章)。作者对罗杰、刘剑杰等在文献检索等方面提供的帮助表示感谢。

本书部分内容得到国家自然科学基金资助。

欢迎专家与读者对本书的错误与欠妥之处批评指正。

作 者

1996年10月于大连

本书由

中共大连市委、大连市人民政府资助出版

The published book is sponsored by

Dalian Municipal Government

大连市学术专著资助出版评审委员会

名誉主任 楼南泉 林纪方
主 任 司玉琢
副 主 任 高春武 吴厚福 何 杰
委 员 梁宗巨 王子臣 李寿山 王逢寿 汪榕培
夏德仁 罗均炎

自然科学专家评审组

组 长 钟万勰(大连理工大学 院士、博导、教授)
副组长 王关林(辽宁师范大学 博导、教授)
成 员 权伍畅(大连海事大学 博导、教授)
张玉奎(中科院大连化学物理研究所 博导、研究员)
张鸿庆(大连理工大学 博导、教授)
张耀光(辽宁师范大学 博导、教授)

目 录

第1章 酶促反应介质概论.....	1
1.1 水溶液体系	1
1.2 二相体系	1
1.3 胶束体系	3
1.4 液乳膜体系	6
1.5 液晶体系	9
1.6 单相有机溶剂体系.....	12
1.7 结语.....	18
第2章 非水酶学概论	21
2.1 概述.....	21
2.2 非水介质与非水酶学.....	21
2.3 酶的水化作用.....	22
2.4 有机溶剂效应.....	27
2.5 非水介质酶反应的控制.....	34
第3章 酶促有机合成概论	50
3.1 外消旋化合物拆分.....	50
3.2 从头合成不对称中心.....	64
3.3 其它有用反应.....	75
第4章 糖及其类似物的酶促合成	82
4.1 手性单体的制备.....	82
4.2 酶法 C—C 键合成	91
4.3 区域选择性酰化、脱酰化、氧化.....	95
4.4 酶促糖苷键的合成	103
4.5 酰基化糖的应用及化学-酶法	116

第5章	氨基酸的酶法合成	121
5.1	酶促合成方法概述	121
5.2	几种氨基酸的酶法合成	128
5.3	D-氨基酸的合成	137
5.4	含氟氨基酸的合成	138
5.5	结语	138
第6章	生物活性肽及蛋白质的酶法合成	143
6.1	酶法合成肽键的基本原理	144
6.2	甜味肽的合成	151
6.3	亮氨酸脑啡肽及 Dynorphin(1~8)的合成	158
6.4	表皮生长因子的合成	159
6.5	Eledoisin(6~11)六肽全合成	159
6.6	人胰岛素合成	160
6.7	核糖核酸酶 S-肽(1~15)的合成	162
6.8	固定化酶	162
6.9	结语	163
第7章	酶促酯合成与天然油脂的修饰	164
7.1	甘油酯的酶促合成	165
7.2	羧酸酯的酶促合成	177
7.3	天然油脂水解	185
7.4	天然油脂酶法修饰	190
第8章	固定化脂肪酶及其反应器	206
8.1	固定化脂肪酶	206
8.2	固定化脂肪酶反应器	215
8.3	结语	228
第9章	其它生物活性物质的酶促合成	233
9.1	药物的酶促合成	233
9.2	有机酸的酶促合成	252

9.3 核苷酸及其类似物的酶促合成	257
9.4 谷胱甘肽	262
9.5 胆色素原	263
参考文献	265

第 1 章 酶促反应介质概论

传统酶学实际上是水介质酶学,即反应的溶剂环境是水溶液,随着酶促反应研究的发展,各种酶反应介质体系应运而生。特别是近一二十年来,由于有机介质酶促反应的兴起与发展,使酶反应的应用领域扩大。本章概述酶促反应介质体系的类别及其主要特征。

1.1 水溶液体系

水溶液介质(Aqueous media)或水溶液体系(Aqueous systems)是指以水作为单一溶剂的反应体系,反应物溶解于水中,酶以溶解或固定化形式催化反应进行。

水作为一种最常用的溶剂,具有一些独特的性质。它是一种极性很强的溶剂,具有很大的介电常数,水分子易形成氢键,有很大的比热。当一种溶质溶于水时,会产生强烈的水合作用。可以认为,溶于水的物质,基本上是以水合物的形式存在。例如,在水溶液中,单独存在的 H^+ 的几率为 10^{-300} 。一般认为,这种水合作用对酶促反应的进行有极其重要的作用。也正是由于水作为溶剂的一些特殊性质及其对酶促反应的必要性,使水溶液体系成为传统酶学中最主要的酶促反应体系。一百多年来,传统酶学对其进行了广泛而深入的研究,形成了比较完整的理论体系。

1.2 二相体系

这里所说的“相”指介质系统中具有相同物理、化学性质的均匀部分。“二相体系”(Biphasic systems)是指反应介质存在着宏观

可见的两相的反应体系。按一般的分类,两相体系包括:水-水、水-油、油-油三种。

1.2.1 双相水体系

由于有机溶剂通常使微生物或酶失活,而混合一种或几种含水聚合物便可避免这种情况。某些聚合物可使娇嫩的生物大分子、细胞器及微生物稳定化。同时,双相水混合物还可将酶或细胞回收到一相中,而把反应产物回收到另一相中。例如 Kuhn(1980)使用葡聚糖 500、聚乙二醇(PEG6000)与水以适当比例混合即成水-水二相体系,轻相含大量 PEG,重相则含大多数葡聚糖。轻相:重相=9:1 时,则轻相含 90%以上乙醇,大多数酵母细胞分布于重相,而该相仅含乙醇总量的 10%,使发酵避免了乙醇抑制,可提高乙醇产率。

双水相萃取是 80 年代发展起来的分离技术,向水相中加入溶于水的高分子化合物,如 PEG 或葡聚糖,制成密度不同的两相或多相,轻相富含一种高分子化合物,重相富含另一种高分子化合物或盐类,由于都含多量水,所以称之为双水相。用双水相萃取蛋白质近年来颇受重视。双水相体系对底物溶解及产物回收均有利。

1.2.2 水-有机溶剂二相体系

这里所说的二相系统是指体系中包括含酶水溶液和由与水不混溶的有机溶剂组成的有机相。因为与水混溶的有机溶剂是酶的强变性剂(但也有些酶例外)。有不混溶性有机溶剂时,酶只与很低浓度的溶剂分子直接接触,酶稳定性好。利用有机相可使不溶于水的底物(如甾族化合物、油脂等)溶解在有机相中,保持高浓度底物,可作为底物和产物的“贮池”,从而减少产物与底物对反应的抑制作用,同时增加水相与底物间介面面积。

水-有机溶剂二相体系(Biphasic aqueous-organic systems)反应,一般要在搅拌(有时还要加乳化剂)的条件下进行,以便使介质呈乳化液状态。该体系可以进一步区分为水相为连续相或分散相

的二相体系。前者是以水相为主体的双相体系；后者则是以有机相为主体的双相体系。但不论是何种，酶均分布在水相中。因此，从酶的环境来说，两者之间并无本质差别，而且，在该体系中，酶的结构及催化性质与水体系中也无明显差异。

1.3 胶束体系

胶束 (Micelles) 亦称微乳液 (Microemulsions)，Martinek (1977) 首次报道了凝乳蛋白酶溶解在丁二酸二酯磺酸钠 (AOT)/ 异辛烷微乳液中仍具有催化活性，而且活性显著增加，酶的稳定性也有所增强。因此，微乳液技术为酶促有机合成的应用开辟了新途径，从而出现了一个崭新的研究领域，即胶束酶学 (Micellar enzymology)。

微乳液中酶促反应的研究大多数为油包水 (W/O) 型 (逆胶束)，而水包油 (O/W) 型微乳液 (正胶束) 中酶反应报道较少。截至目前，约有五十多种不同的酶进行过逆胶束体系反应的研究 (Sarcar 等, 1992)，该体系中的酶活性在大多数情况下高于在水溶液中的酶活性，逆胶束也常被看作是固定化酶的手段之一。

1.3.1 逆胶束体系

逆胶束体系 (Reverse micellar system) 的连续相为非极性有机溶剂，即不与水混溶的有机溶剂，在连续相中分散着由表面活性剂稳定化的微水核或微水池。表面活性剂的亲水部分 (极性头) 朝向水核；其疏水部分 (非极性尾) 朝向连续油相 (如正己烷等)。而正胶束与此相反，其连续相为水溶液，其中分散着由表面活性剂稳定化的微油核 (池)。图 1-1 是逆胶束的一个典型模式图。

由于逆胶束体系为酶创造了一个微水相环境，水核被表面活性剂壳包围，使酶不直接与非极性溶剂接触，从而减少了酶变性的可能性，同时，逆胶束也为酶提供了很大的介面面积。例如，需要均质三分钟，再经超声波处理 30 分钟才能使甘油三酯油滴大小达

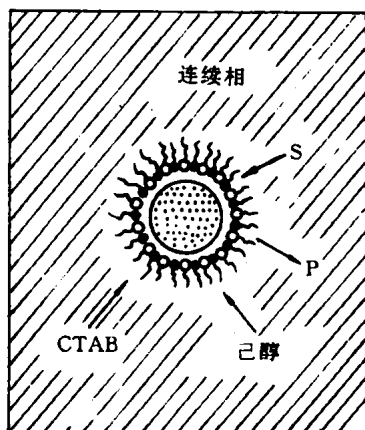


图 1-1 逆胶束模式图

阴影部分:生物催化剂;

S:底物;P:产物;

CTAB:表面活性剂(十六烷基三甲基溴化铵,己醇为助表剂)。

(Laane, C. 等,1987)

2000nm,但在逆胶束体系中,仅需简单混合就可使微水池小至 3nm,在适当条件下,逆胶束溶液是各相同性、澄清而且是热力学稳定的(Danielsson 等,1981)。在逆胶束中有极性核心,它包括表面活性剂的极性头组成的内表面、平衡离子和水,形成“水池”,酶以分子水平分散于这些 nm 级的“微水池”中(Luisi 等, 1988)。在某些逆胶束的制备中还需要助表剂(Cosolvents),此时,逆胶束微水池“壳”是由表面活性剂和助表剂两者组成的。

1. 3. 2 逆胶束的制备

首先需绘制相图,或根据已有相图资料选取缓冲液,制备反应微乳液。例如肖惠萍等(1993)选用正丁醇为助表剂(A),正辛烷为油相(O),十二烷基硫酸钠(SDS)为表面活性剂(S)。设定 S 与 A 质量比 $W_S/W_A=1:2$; S、A 与 O 的总质量 $W_S+W_A+W_O=29$; 含油量 $R_{h/o}=O/A+S$ 依次选取 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、90%,按上述公式定量配制表面活性剂、助表剂、油的混合体系,以水滴定该混合体系,至溶液由清变浊,记录浊点时水的体积,绘制出微乳液拟三元相图(图 1-2)。

由图 1-2 可见,SDS/正丁醇/正辛烷体系形成微乳液区域较大,有利用制备反应微乳液。取 $R_{h/o}=90\%$,以水滴定 SDS、正丁

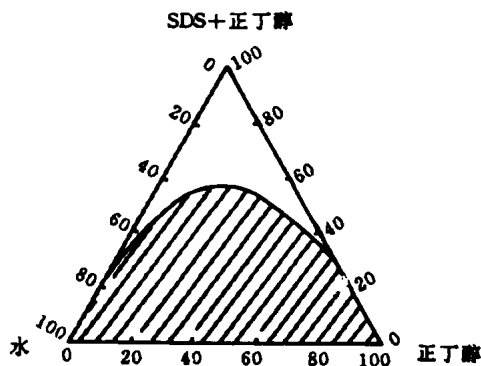


图 1-2 SDS/正丁醇/正辛烷/水拟三元相图

SDS 与正丁醇重量比为 1/2;

$T = 25^{\circ}\text{C}$; 阴影部分为微乳液。

逆胶束中是否能容纳酶分子(图 1-3)。关于逆胶束体系优化问题

醇、正辛烷混合体系,得 SDS 的 W/O 微乳液(逆胶束)。

逆胶束制备方法可分为相转移法、注入法和溶解法等。当然若使适合于酶反应,还需进一步对体系进行优化。例如,逆胶束水核的大小关系到

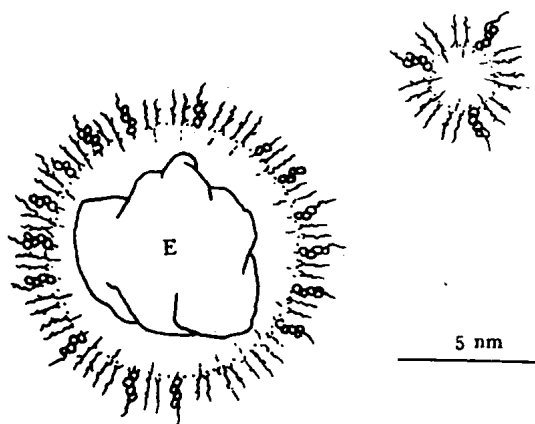


图 1-3 两种逆胶束假定的横截面图

小逆胶束(直径 $2\text{nm} \sim 3\text{nm}$)代表在 $W_o = 14$ 时的

大多数不能容纳酶分子的逆胶束;

大的逆胶束代表少数含酶逆胶束。

(Hedstrom 等, 1992)

详见第2章。

1.4 液乳膜体系

液体乳化膜(Liquid emulsion membrane, LEM)是原美国 EXX ON 研究工程公司的黎含之(Norman N. Li., 1968)首先提出的。对分离烃类或废水中的有机物很有效,且在经济上优于以往所有的方法。目前,液膜在金属分离提取、废水处理方面已由实验室研究阶段向工业化迈进。

乳液是悬浮在液体中半径很小的乳液微粒构成的。乳液通常由溶剂(水或有机溶剂)、表面活性剂(乳化剂)和添加剂组成。自从 Norman, N. Li. 开发了液膜技术以后,液乳膜发展成为两种类型,一种是水质膜,另一种是油质膜。前者是以水为膜质的液体膜,即水包油型液膜(O/W/O);后者以油相为膜质,即油包水型(W/O/W)液体膜。目前研究中绝大多数采用油质膜,特别是在膜中加入载体的 W/O/W 液体膜,用于阴、阳离子以及水溶性有机类物质的分离。如图 1-4 所示。先将内相液与液膜溶液充分乳化成油包水(W/O)型乳液,然后使其分散于外相形成水包油包水(W/O/W)型多相乳液。通常内相微滴直径为数微米,而 W/O 乳液滴径为 $0.1\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ 。单位体积中总面积很大,溶液组分透过速度相当快。后来在此基础上又发展了支撑液膜和膜萃取分离技术。

近十多年来,W/O/W 型液乳膜技术也应用于生化下游加工中,并尝试在酶促反应中应用。Mohan 与 Li(1974)首次将酶包胶于 LEM 中,也将全细胞包埋在 LEM 的内相中,并发现细胞活性可维持 5 天。Sekeper 及其合作者(1984)将 α -凝乳蛋白酶固定在 LEM 中,由外消旋 D,L-Aa 酯制备 L-Aa,在 pH6, 25℃ 下连续反应,活性损失约 70%。由于 LEM 技术具有工业化潜力而越来越受到重视。这种技术像逆胶束一样被看作为固定化酶技术,但我们在本章中将其列为一种特殊反应介质体系来介绍。