

# 烷基侧链对 Sol-gel 固定化脂肪酶酯化活性的影响机理

杨江科, 曹雄文, 程占冰, 刘利营

(华中科技大学生命科学与技术学院分子生物物理教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074)

**摘要:**以甲基三甲氧基硅烷(MTMS)、乙烯基三甲氧基硅烷(VTMOS)、乙烯基三乙氧基(VTEOS)、辛基三甲氧基硅烷(OTMOS)和四甲氧基硅烷(TMOS)为前趋体制备 4 种不同的固定化脂肪酶,并系统考察了烷基侧链对 sol-gel 固定化酶胶体结构和酶活性的影响。结果表明,随着烷基侧链的增长和数目的增加,固定化酶活力均逐渐增加,固定化脂肪酶颗粒平均孔径逐渐增大,孔体积逐渐增加,对底物的传质阻力逐渐降低;同时颗粒逐渐由球形变成不定形或团块状结构。脂肪酶活性的增加不仅来源于疏水性烷基侧链引起的脂肪酶的界面激活效应,同时固定化颗粒结构的改变增加了底物和酶分子的结合,提高了固定化酶的表现活性。

**关键词:**脂肪酶;有机硅烷;界面激活;表面积;孔径

**中图分类号:**TQ426.97

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-4320(2009)11-0056-03

## Mechanism of alkyl-substituted silane precursors influencing esterification activity of Sol-gel encapsulated lipase

YANG Jiang-ke, CAO Xiong-wen, CHENG Zhan-bing, LIU Li-ying

(Key Laboratory of Molecular Biophysics of the Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** Four silane precursors, methyltrimethoxysilane (MTMS), vinyltrimethoxysilane (VTMOS), vinyltrimethoxysilane (VTEOS), and *n*-octyltrimethoxysilane (OTMOS), are used as precursors to prepare various kinds of immobilized lipases, and the correlation between the alkyl of silane and the activity of the gel-encapsulated lipases are studied. The results show that with the increase of the chain length and the number of alkyl groups, the total activity of the immobilized lipase, its average pore size, and pore volume are increasing, while the mass transfer resistance of substrate is going down gradually. Meanwhile, the particles become amorphous or clumpy from sphere. The improvement of the activity may be caused by the opener conformation of the lipase triggered by the hydrophobic octyl groups and texture change of the gel matrices. And the change of particle morphology may increase the substrates concentration close to the active sites of the enzyme that increases the apparent activity of them.

**Key words:** lipase; silane; interfacial activation; surface area; pore diameter

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是重要的工业用酶,它在非水相体系中具有良好的酯化和转酯活力,可广泛应用于油脂化工、前体化合物的合成、手性药物的拆分以及生物能源等新型领域<sup>[1-2]</sup>。以有机硅为前趋体通过 Sol-gel 工艺对脂肪酶固定化是提高其在非水相体系中酶学性质、扩大其应用范围的优良工艺<sup>[3-4]</sup>。Sol-gel 固定化工艺不仅能提高脂肪酶的刚性和抗机械能力,其多孔的网状结构和疏水的烷基侧链有利于底物分子顺利进入胶体并与酶分子发生反应<sup>[5]</sup>。有机硅的烷基侧链是 Sol-gel 工艺中影响固定化酶性质最重要的因素,特别是对于脂肪酶,由于该酶具有特殊的“界面激活效应”——当酶分子

与疏水性底物接触时,能诱导酶分子进行一系统的构像转变,从原来的封闭状态转化为开放的状态,从而有利于底物分子进入酶分子的活性中心。另一方面烷基侧链也影响到有机硅烷前趋体的聚合和交联,影响胶体的结构和性质,从而影响到酶的固定化率以及表现活性<sup>[5-6]</sup>。

笔者以系列具有不同链长和侧链数目的有机硅烷为前趋体,系统考察了烷基侧链对固定化脂肪酶活性的影响,以期阐明其相互关系并获得最优的脂肪酶固定化条件;通过氮气吸附-解吸附和扫描电镜对固定化酶颗粒结构和表面形态的观察,探讨活化、烷基侧链和颗粒结构之间的相互关系,为固定化

收稿日期:2009-07-19

基金项目:国家“863”项目(2007AA05Z417)

作者简介:杨江科(1972-),男,博士,副教授,主要从事生物能源和工业酶生物技术等领域的研究,通讯联系人,027-87792214,jiangke\_yang@hotmail.com。

脂肪酶的规模化应用提供依据。

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂与仪器

洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶由本实验室自制,经 Bradford 法检测,其蛋白质含量为 0.8% (质量分数);有机硅前趋体甲基三甲氧基硅烷(MTMS)、四甲氧基硅烷(TMOS)、乙烯基三甲氧基硅烷(VTMS)、乙烯基三乙氧基硅烷(VTEOS)和辛基三甲氧基硅烷(OTMOS),武汉有机硅材料有限公司。考马斯亮兰 G-250、聚乙二醇(PEG400)、异丙醇等,上海国药集团化学试剂公司;牛血清白蛋白(BSA),Sigma 公司。

比表面积测定仪 ASAP2020,美国麦克仪器公司;发射扫描电子显微镜 Sirion 200,荷兰 FEI 公司。

### 1.2 固定化酶制备方法

准确称取一定量的脂肪酶,溶于 0.05 mol/L Tris-HCl (pH = 7.5) 缓冲液中,使其最终质量浓度为 400 mg/mL,离心除去不溶物;取一个 50 mL 的塑料管,加入 500  $\mu$ L 酶液、100  $\mu$ L NaF (1 mol/L)、90  $\mu$ L PEG 400 和 50  $\mu$ L 异丙醇,混匀 5 min 后加入 6 mmol 前趋体,剧烈震荡 5 s,置于冰水浴中至凝胶形成。室温封盖静置 8 ~ 24 h 后,打开盖子转入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中干燥 3 d;刮下白色凝胶,研钵碾碎,加入 5 mL Tris-HCl 缓冲液震荡洗涤 2 h,除去未包埋的酶,收集上清液,用于测定蛋白质固定化率;向固体颗粒加入 5 mL 丙酮震荡洗涤 2 h,除去未反应的前趋体;除去丙酮,室温干燥固定化酶,4 $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。不同固定化酶前驱体加入总量都是 6 mmol,但摩尔比不同。

### 1.3 测定和表征

采用考马斯亮兰染色法测定蛋白质含量,采用差值法计算固定化率。酯化酶活测定方法参考文献 [7]。有机硅颗粒孔径、孔体积、比表面积和吸附解吸附性质的测定使用比表面积测定仪 ASAP2020。有机硅颗粒表面的观察使用 FESEM 场发射扫描电子显微镜 (Sirion 200)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 烷基侧链对脂肪酶固定化率和活性的影响

实验首先考察了烷基侧链对脂肪酶固定化率和酯化酶活的影响,结果见图 1。不同的前趋体具有不同的最适的摩尔比,MTMS/TMOS、VTMOS/TMOS、VTEOS/TMOS 和 OTMOS/TMOS 的最适摩尔比分别为 5:1、7:1、3:1 和 1:1;在最适条件下随着烷基侧链

的增长,各固定化酶的固定化率变化不显著,但酶活从 1 233.1  $\mu$ mol/(h·g) (单位中的 g 指每克 gel,下同) 逐渐升为 4 614.3  $\mu$ mol/(h·g),即 OTMOS/TMOS 固定化脂肪酶的酶活比 MTMS/TMOS 提高 3.74 倍。这与烷基侧链对脂肪酶构象的激活和胶体颗粒传质阻力的减小有关。

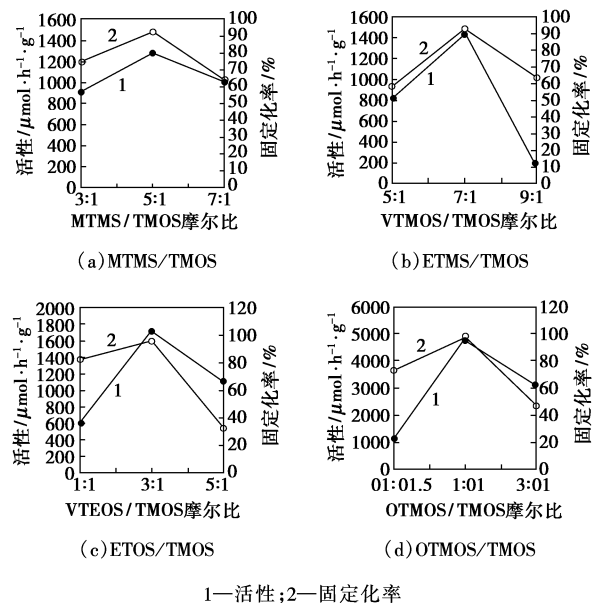


图 1 有机硅烷前趋体对脂肪酶的固定化率和活性

### 2.2 Sol-gel 胶体颗粒的比表面积和孔径特征分析

为探讨烷基侧链对胶体结构的影响,通过氮气吸附-解吸附试验分析了固定化酶胶体颗粒的孔径、孔体积和比表面积的特征,结果见表 1 和图 2。孔径与底物的传质阻力有直接关系,孔径大底物进入固定化颗粒容易,有利于反应的发生。如表 1 所示,随着侧链的增加孔径逐渐从 2.78 nm 增大到 15.64 nm,提高了 5.6 倍。这与固定化酶的酯化酶活逐渐增大相一致。

表 1 固定化脂肪酶胶体颗粒的表面积和孔径特征

有机硅烷	摩尔比	BET 表面积/ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	孔体积/ $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	平均孔径/ nm
MTMS/TMOS	5:1	61.46	0.043	2.78
VTMOS/TMOS	7:1	1.16	0.003	11.65
VTEOS/TMOS	3:1	5.52	0.018	13.04
OTMOS/TMOS	1:1	54.52	0.213	15.64

通常情况下,比表面积越大则固定化酶与底物的接触面积越大,在利于提高反应的速率,固定化的表观酶活越高<sup>[8-9]</sup>。本文中 VTMOS/TMOS、VTEOS/

TMOS、OTMOS/TMOS 制备的固定化酶颗粒比表面积和孔体积逐渐增大,且与酯化酶活逐渐增大相一致。然而 MTMS/TMOS 制备的固定化酶比表面积和孔体积都比较大,但是其表观酶活却非常低。究其原因,该胶体颗粒吸附-解吸附之间存在着严重的不平衡,解吸附速率远高于吸附速率[图 2(a)],这说明反应底物与酶接触的时间很短,不利于反应的发生。与之相对应,OTMOS/TMOS 胶体吸附-反吸附平衡性良好,有利底物和产生的充分交换;另一方面,该胶体吸附体积大,在  $p/p_0$  为 0.7 时,其吸附体各即达 29.6 mL/g[图 2(d)],远高于其他胶体。

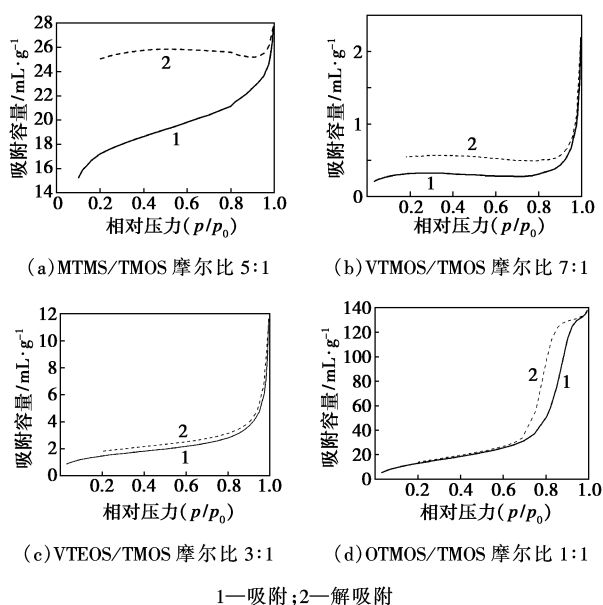


图 2 固定化脂肪酶胶体颗粒的氮气吸附-解吸附曲线

### 2.3 Sol-gel 固定化颗粒的表观结构

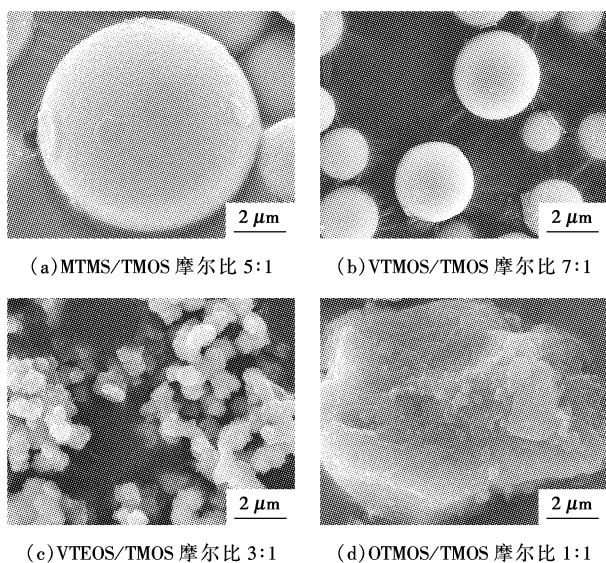


图 3 固定化脂肪酶胶体颗粒的表面结构

固定化酶颗粒的表面结构见图 3。随着烷基侧链逐渐增长,固定化颗粒形态逐渐由规则的球形变为不定形和块状结构。与表 1 和图 2 的结果相一致,MTMS/TMOS 的球形结构具有非常大的表面积,但是由于其孔径小,底物分子大多附着在球形的表面,易极解吸附而脱落,且难以进入球体内部与酶分子发生反应。因而,该种固定化脂肪酶的表现酶活最底。随着烷基侧链的增加,疏水性增强,胶体交联度降低,孔径增大,底物传质阻力的降低,固定化酶酯化酶活逐渐增高。

### 3 结语

有机硅烷前趋体的烷基侧链能显著影响 Sol-gel 固定化脂肪酶的酯化活性。在 MTMS、VTMOS、VTEOS 和 OTMOS 4 种前趋体中,固定化酶酯化活性随着烷基侧链的增长和数量的增加而增强。在硅烷前趋体 OTMOS/TMOS 为 1:1 的条件下,其酯化酶活达 4 614.3  $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$ ,较 MTMS/TMOS 提高了 3.74 倍。该固定化酶良好的活性表明,其可用于非水相体系的系列酯化反应中。脂肪酶活力的提高,除了由烷基侧链引起的界面激活效应外,与有机硅烷前趋体的烷基侧链对固定化脂肪酶胶体结构的影响显著相关。随着烷基侧链的增长,胶体颗粒逐渐变得蓬松不规则,孔径逐渐增大,对底物的传质阻力减小,有利于提高反应速率。

### 参考文献

- [1] Jegannathan K R, Abang S, Poncelet D, *et al.* Production of biodiesel using immobilized lipase: A critical review[J]. Critical Review of Biotechnology, 2008, 28: 253 - 264.
- [2] Shin J A, Akoh C C, Lee K T. Production and physicochemical properties of functional-buttermilk through enzymatic interesterification in a continuous reactor[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2009, 57(3): 888 - 900.
- [3] Soares C M F, dos Santos O A, de Castro H F, *et al.* Characterization of Sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor[J]. Journal of Molecular Catalysis: B. Enzymatic, 2006, 39: 69 - 76.
- [4] Cao X, Yang J, Shu L, *et al.* Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bioimprinting with substrate analogues[J]. Process of Biochemistry, 2009, 44: 177 - 182.
- [5] Gill I, Ballesteros A. Bioencapsulation within synthetic polymers: Part 1. Sol-gel encapsulated biologicals[J]. Trends of Biotechnology, 2000, 18: 282 - 296.
- [6] Forestia M L, Alimentib G A, Ferreira M L. Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: Effect on the enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36: 338 - 349.

硫酸钠干燥后,滤除干燥剂,蒸除溶剂得接近无色的透明液体 17.8 g,冷却后成白色固体,熔点 31.4 ~ 33.9℃,收率 97.8%。核磁共振氢谱( $^1\text{H-NMR}$ ),  $\delta$ : 2.3(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.8(s, 9H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.4(s, 2H, Ar-H)。

#### 1.4 6-甲基-2,3,4-三甲氧基苯甲醛(4)的合成

称取 3,4,5-三甲氧基甲苯 2.4 g 放置于 100 mL 圆底烧瓶中,搅拌下加入二甲基甲酰胺(DMF) 2.5 mL。使其溶解后用冰水浴冷却。缓慢滴加  $\text{POCl}_3$  2.7 g,滴加时不应超过 25℃。滴加完成后,撤除水浴,在室温下反应 1 h,提高反应温度至 40℃。在此温度下反应 2 h,在缓慢提高反应温度至 65℃,在此温度下反应 8 h,薄层色谱检查原料点消失时停止反应。将反应液加入到 200 mL 的冰水混合物中,搅拌片刻。用 10% NaOH 溶液调节 pH 至 8 左右,此时有固体析出。抽滤得到淡黄色固体。充分干燥后,称重 2.5 g,收率 89.3%,熔点 58.9 ~ 60.2℃。 $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$ : 10.03(s, 1H, CHO), 3.77 ~ 3.69(9H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.36(s, 1H,  $\text{CH}_3$ )。

#### 1.5 6-甲基-2,3,4-三甲氧基苯甲醇(5)的制备

称取 6-甲基-2,3,4-三甲氧基苯甲醛 4.2 g 于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 THF 5 mL,甲醇 10 mL,搅拌下加入  $\text{KBH}_4$  0.4 g,60℃下搅拌反应 4 h,停止反应。反应液中加水 100 mL, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  40 mL 萃取 4 次, $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  层用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥后,滤除干燥剂,蒸除溶剂后的无色透明液体 4.1 g,收率 97.4%。

#### 1.6 6-甲基-氯化苄(6)的制备

称取 6-甲基-2,3,4-三甲氧基苯甲醇 2.1 g 于 100 mL 圆底烧瓶中,加入  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  10 mL 搅拌溶解,滴加入  $\text{SOCl}_2$  2.0 mL,常温下反应 15 min 后停止反应,蒸除溶剂后,加入水 30 mL,石油醚 20 mL 萃取 3 次,石油醚层水洗至中性,用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥后,滤除干燥剂,蒸除溶剂,得淡黄色油状液体 1.8 g,收率 78.3%。

#### 1.7 *N*-苄基-*N'*-(6-甲基-2,3,4-三甲氧基)苄基哌嗪(1)的合成

称取苄基哌嗪 0.5 g 于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 DMF 5 mL,搅拌溶解后滴加 6-甲基-2,3,4-三甲氧基氯化苄 0.8 g, KI 0.1 g,90℃下反应,约 1 h 滴加 10% KOH 0.1 mL,至反应完全后停止反应。向反应液中加入水 100 mL,37% HCl 调节 pH 至强酸性。石油醚 10 mL 萃取 3 次。水层用 10% NaOH 调节 pH 至 12,石油醚 30 mL 萃取 4 次。石油醚层用 0.05% HCl 10 mL 洗涤 2 次。有机层用无水硫酸钠干燥后滤除干燥剂,蒸除溶剂得无色透明液体 0.7 g,收率 60.3%。 $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$ : 7.17 ~ 7.30(m, 5H), 6.56(s, 1H), 3.62 ~ 3.77(m, 13H), 2.13 ~ 1.33(m, 11H)。

## 2 结语

用该方法合成目标化合物具有条件温和,产率较高,中间体容易纯化分离等特点。该方法用于合成 *N*-苄基-*N'*-(多取代)苄基哌嗪类化合物具有通用性,对研究哌嗪衍生物的不对称合成具有重要的意义。

## 参考文献

- [1] Wierzbicki M, Lepagnol J, Tillement J-P, *et al.* Preparation of *N*-(3,4-dimethoxy-2-hydroxybenzyl)piperazines for the treatment of cerebral oxidative metabolism disequilibria: EP, 733627[P]. 1994-09-23.
- [2] 李建其, 黄丽瑛, 董文心, 等. 芳烷醇哌嗪类化合物的合成及抗抑郁活性[J]. 中国药物化学杂志, 2006(5): 270-276.
- [3] 李建其, 黄丽瑛, 陈建新, 等. 芳烷醇哌嗪衍生物的设计合成及镇痛活性[J]. 药学报, 2007(11): 1166-1177.
- [4] Bjorsvik H-R. Novel intermediates, process for their preparation and synthesis of 1,4-benzoquinones: US 798749[P]. 2008-11-20.
- [5] Lipshutz B H, Lower A, Berl V, *et al.* An improved synthesis of the "miracle nutrient" coenzyme Q10[J]. Organic Letter, 2005(19): 4095-4097.
- [6] Ji Yafei, Xu Wanmei, Jin Wenhui, *et al.* Practical synthesis of 2,3,4,5-tetramethoxytoluene[J]. Synth Commun, 2006, 36(14): 1961-1965. ■

(上接第 58 页)

- [7] 曹雄文, 苏磊, 闫云君, 等. 有机硅介质中脂肪酶印迹体系的优化及印迹机制的初步研究[J]. 应用化工, 2008, 37: 717-722.
- [8] Maury S, Buisson P, Perrard A, *et al.* Influence of the Sol-gel chemistry

on the activity of a lipase encapsulated in a silica aerogel[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 29: 133-148.

- [9] Reetz M T, Zonta A, Simpelkam P. Efficient heterogeneous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic Sol-gel materials[J]. Angew Chemie Intl Ed, 2003, 34: 301-303. ■