

有机相酶促反应中 固定化脂肪酶的非共价修饰

徐 岩 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 在选用 8 种具有两亲性质的表面活性剂、2 种胆汁盐和 12 种金属盐, 对庚烷中催化己酸乙酯合成的固定化米氏毛霉脂肪酶进行非共价修饰时发现: 在一定的质量浓度范围内, 阴、阳离子型和非离子型的表面活性剂对脂肪酶酶促催化活性有不同程度的促进; 在底物浓度从 0.25 mol/L 提高至 0.5 mol/L 时, 气溶胶硫代琥珀酸 2[2-乙己酸]酯钠盐、十二烷基磺酸钠和 TritonX-100 对于脂肪酶保持稳定的催化活性有较大的提高作用。并从酶的活性中心和表面活性剂的结构和特性上对原因进行了分析。而胆汁盐和金属盐对脂肪酶的修饰作用不大, 在高浓度时反而会抑制酶的活性。

关键词 固定化脂肪酶; 酶的修饰; 表面活性剂; 抑制剂

分类号 TQ 925.6

0 前 言

异常环境有机介质中酶促催化具有增强非极性底物的溶解性, 溶剂化作用改变反应系统的动力学和平衡而改变反应性质, 能控制和改变底物部位的选择性及手性选择性, 抑制水引起的副反应、酶不溶解和易回收等特点。因而已被用来合成众多的有用的有机化合物, 成为酶工程、生物工程中新的研究热点, 有些产品已工业化生产^[1]。

但是在有机介质中酶容易受到各种因素的影响, 酶与底物的接触受到限制而使酶促反应效率降低, 反应时间较长, 因此酶的选择性和稳定的催化活性的调节与控制是研究有机相酶促反应机制和应用的重要课题。目前酶在有机介质中催化的选择性和稳定性的调节与控制方法有: 1) 选择和优化反应条件, 但此法有局限性, 改变的幅度也有限; 2) 改变酶分子自身, 如蛋白质工程、酶的化学修饰等^[2,3]。与前两法相比, 非共价修饰具有方便、实用的特点。这些非共价修饰剂大多是酶的抑制剂。脂肪酶抑制剂可以用来研究脂肪酶的结构和代谢特性, 如在对米氏毛霉(*Mucor miehei*) 脂肪酶晶体结构及其选择性和作用方式的研究中已有效地使用它的抑制剂^[4]。在有机相酶学研究中, Russel, Guo, Goto 等通过改变脂肪酶

的构象或界面特性来调节和控制酶的稳定的特异性^[5-7]。此前作者已经报道了使用微生物脂肪酶在正庚烷中合成短链芳香酯^[8]。本研究是在前面工作的基础上,使用具有两亲特性的表面活性剂、胆汁盐和金属离子这些脂肪酶的抑制剂对固定化脂肪酶进行非共价修饰,以利于酶活性的调节和控制。

1 材料和方法

1.1 实验器材

- 1) 固定化 *Mucor miehei* 脂肪酶(商品名 Lypozyme IM) Novo Nordisk 公司提供。
- 2) 乙醇、己酸、庚烷和金属盐等化学试剂 均是从上海化学试剂站购买的分析纯试剂。
- 3) 表面活性剂: 十二烷基苯磺酸钠 (LAS), 十二烷基磺酸钠 (SDS), 由上海洗涤剂厂提供; 气溶胶硫代琥珀酸 2[2-乙己酸] 酯钠盐 (AOT), 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB), 为日本和光纯药工业株式会社产品; 脂肪醇聚氧乙烯醚 [9] (AEO9), 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100), 月桂酸失水山梨醇酯聚氧乙烯醚 (Tween 20), 油酸失水山梨醇酯聚氧乙烯醚 (Tween 80), 均是上海助剂厂产品。
- 4) 脱氧胆酸钠, 牛黄胆酸钠 德国 Serva 公司产品。
- 5) HYG 回转式恒温调速摇瓶柜 上海医药工业研究院提供。
- 6) SP-3700 气相色谱仪 北京分析仪器厂制。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酶合成低分子酯反应体系 在 100 mL 具塞三角瓶中, 加入含有等摩尔己酸和乙醇、以及 15 mL 溶剂所组成的酯化反应体系, 再加入若干量的脂肪酶样品, 30 条件下 150 r/min 旋转振荡, 定时取样检测。在研究稳定性影响因素的批次反应中, 经收集酶、正庚烷洗涤、冷冻干燥后, 再加入下一次反应。

1.2.2 脂肪酶酶促酯化程度的测定和转化率计算 将取出的样品用 0.15 μm 微孔滤膜过滤后, 取 100 μL 加入 10 mL 水溶液中, 用 0.25 mol/L 的氢氧化钠溶液滴定未反应的脂肪酸, 以 3 滴 1 g/dL 的酚酞为指示剂。计算脂肪酶的酯合成转化率。

酯合成转化率 = 脂肪酸减少的滴定摩尔数 / 反应初始时脂肪酸的滴定摩尔数

1.2.3 醇、酸、酯和溶解的气相色谱检测 用 25 m 长的 SE-30 毛细管柱, 氢火焰检测器, 氮气为载气, 柱前压 5.88×10^4 Pa, 尾吹 30 mL/min; 柱温条件是: 50 , 3 min, 10 /min 至 150 , 保持 2 min. 以 2-乙基正丁酸为内标, 检测产物的含量^[8]。

2 实验结果

2.1 表面活性剂对酯化反应的影响

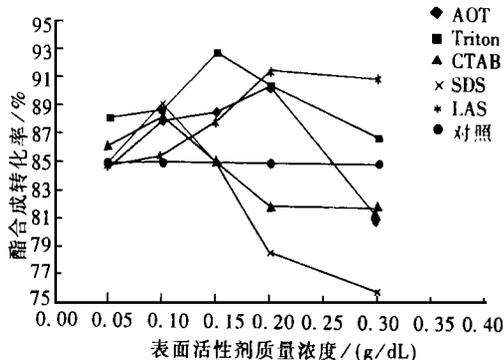
用 8 种不同类型的表面活性剂按 0.1% 的量加入反应体系。结果见表 1。所有的这 3 类表面活性剂对脂肪酶的催化能力都有不同程度的影响, 大多略有提高, 但幅度并不大。说明表面活性剂对 *Mucor miehei* 脂肪酶的影响与其自身的类型关系不大, 无论是阳离子型、阴离子型或非离子型的表面活性剂都会对脂肪酶催化活性产生影响。这个结果与 Chang 的发现^[9] 完全不同。这说明不同的脂肪酶由于结构的差异, 对于不同的表面活性剂给予的修饰的情况是不相同的。

影响表面活性剂改善酶催化活性的因素,除了其种类外,还有其加入的质量浓度。选择 AOT, Triton X-100, CTAB, SDS 和 LAS 五个表面活性剂来研究其质量浓度对在溶剂相中催化活性的影响。不同的表面活性剂改善 *Mucor miehei* 脂肪酶的最适质量浓度是不一样的。但总的来说,在最适质量浓度下,表面活性剂可以改善脂肪酶的催化活性,其中 LAS, Triton X-100, AOT 的改善作用比较大,但是较高的质量浓度反而会抑制脂肪酶的催化活性,见图 1。

表 1 表面活性剂对己酸乙酯合成转化率的影响

表面活性剂	类型	酯合成转化率/ %	相对转化率/ %
LAS	阴离子型	85.46	100.7
SDS	阴离子型	89.09	105
AOT	阴离子型	87.88	103.6
CTAB	阳离子型	87.88	103.6
Tween 20	非离子型	84.85P	100
Tween 80	非离子型	83.03	97.9
AEO ₉	非离子型	84.85	100
Triton X-100	非离子型	87.88	103.6
Contrast		84.85	100

条件: 15 mL 正庚烷中加入 0.1 g MML, 0.25 mol/L 等摩尔底物和 0.1 g/dL 的表面活性剂, 在 30 °C 下反应 24 h。

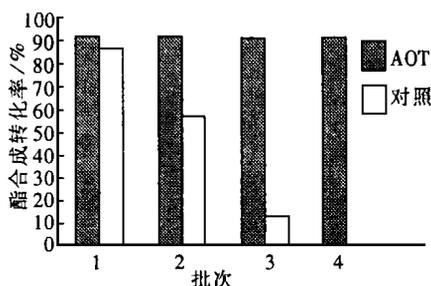


条件: 15 mL 的正庚烷中加入 0.1 g MML, 0.25 mol/L 等摩尔的底物醇酸和不同质量浓度的表面活性剂。

图 1 表面活性剂质量浓度对酯合成转化率的影响

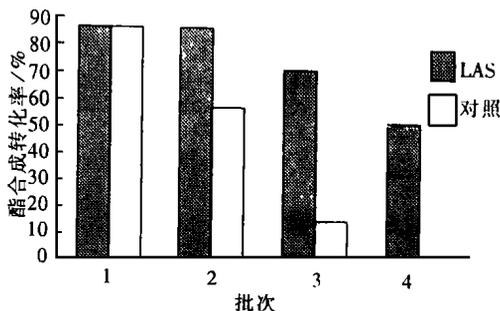
2.2 表面活性剂对酯化反应中脂肪酶稳定性的影响

在比较了表面活性剂对 *Mucor miehei* 脂肪酶催化活力的影响后,进一步研究对 *Mucor miehei* 脂肪酶溶剂相中催化稳定性的作用情况。选用 AOT, LAS, Triton X-100 和 CTAB 四种表面活性剂,在批次反应中观察脂肪酶稳定性,发现:将底物醇酸的浓度从 0.25 mol/L 提高到 0.5 mol/L,加入 AOT 可使固定化 *Mucor miehei* 脂肪酶在连续 4 批反应中保持较高的酶促催化活性,己酸乙酯产物的质量浓度可高达 79.4 g/L;到第 5 批时,酯合成转化率则降低到约 40%。但对照中,第 2 批次的酯合成转化率就降低到不足 60%,第 3 批只有 10%。图 2~5 是分别加入 AOT、LAS、CTAB 和 Triton X-100 后,对脂肪酶稳定性的影响。



条件: 在 15 ml 正庚烷中加入 0.1 g AOT、0.5 mol/L 的等摩尔底物醇酸和 0.1 g/dL 的 MML, 30 °C 条件下反应 48 h。

图 2 表面活性剂 AOT 对 *Mucor miehei* 脂肪酶稳定性的影响

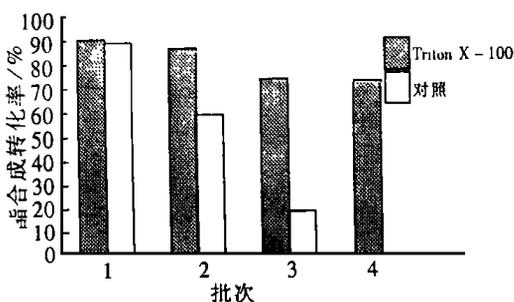


条件: 在 15 ml 正庚烷中加入 0.1 g MML、0.5 mol/L 的等摩尔底物醇酸和 0.2 g/dL 的 LAS, 30 °C 条件下反应 48 h。

图 3 表面活性剂 LAS 对 *Mucor miehei* 脂肪酶稳定性的影响

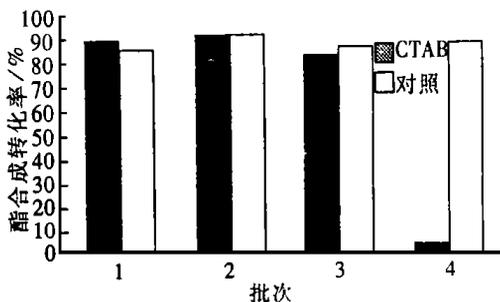
可见有的表面活性剂,如阴离子和非离子型的 AOT, Triton X-100 和 LAS 能够使 *Mucor miehei* 脂肪酶在庚烷中的催化的稳定性有比较明显的改善。

但在底物浓度为 0.25 mol/L 的条件下,阳离子型的 CTAB 对酶的催化稳定性不仅没有什么改进,在第 4 批反应中反而影响了其催化能力。这与表面活性剂的极性可能有关。



条件: 在 15 ml 正庚烷中加入 0.1 g MML、0.5 mol/L 的等摩尔底物醇酸和 0.15 g/dL 的 Triton X-100, 30 条件下反应 48 h.

图 4 表面活性剂 Triton-100 对 *Mucor miehei* 脂肪酶稳定性的影响



条件: 在 15 ml 正庚烷中加入 0.1 g MML、0.25 mol/L 的等摩尔底物醇酸和 0.1 g/dL 的 CTAB, 30 条件下反应 48 h.

图 5 表面活性剂 CTAB 对 *Mucor miehei* 脂肪酶稳定性的影响

2.3 胆汁盐对酯化反应的影响

胆汁盐如脱氧胆酸钠和牛黄胆酸钠,可以调节一些脂肪酶在水相中的水解反应,还能够提高溶剂相里底物的立体选择性^[10]。研究中,在 0.25 mol/L 浓度的醇酸反应体系里,加入 0.1 g 脂肪酶和不同质量浓度的脱氧胆酸钠和牛黄胆酸钠,8 h 的催化结果见表 2。尽管胆汁盐有促进脂肪酶水解脂肪的活性,但在庚烷中却不能促进 *Mucor miehei* 脂肪酶合成己酸乙酯。相反胆汁盐含量过高时,反而会抑制脂肪酶酯合成的活性。

2.4 金属离子对酯化反应的影响

对于脂肪酶,某些金属可以通过连接到酶蛋白上,稳定脂肪酶的构象,改变酶的活性,并且还可以清除界面上产生的脂肪酸对酶的抑制作用,对酶产生激活作用^[4]。选择 12 种无机盐,按照 2 mmol/L 的浓度加入脂肪酶反应体系中,24 h 的反应结果见表 3。结果说明:只有金属 Cu^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} 和 Co^{++} 离子对 *Mucor miehei* 脂肪酶在溶剂相中的催化活性有微弱的促进作用。其他金属离子均有不同程度的抑制作用。

表 2 胆汁盐对 *Mucor miehei* 脂肪酶正庚烷中酯化己酸乙酯转化率的影响

胆汁盐	胆汁盐质量浓度/(g/dL)	酯合成转化率/%
对照	0.0	90.7
脱氧胆酸钠	0.1	88.7
	0.2	85.9
	0.4	84.0
牛黄胆酸钠	0.1	90.0
	0.2	85.7
	0.4	83.0

条件: 在 15 ml 正庚烷中加入 0.1 g MML, 0.25 mol/L 的等摩尔底物和不同质量浓度的胆汁盐,在 30 条件下反应 24 h.

表 3 金属离子对 *Mucor miehei* 脂肪酶正庚烷中合成己酸乙酯酯合成转化率的影响 %

金属盐	相对酯合成转化率	金属盐	相对酯合成转化率
EDTA	97.22	MgCl_2	100.40
NaCl_2	97.22	BaCl_2	89.49
HgCl_2	95.35	MnCl_2	99.98
SnCl_2	97.02	CoCl_2	101.40
CuCl_2	103.20	KCl	95.66
FeCl_3	97.22	对照	100.00
CaCl_2	103.50		

条件: 在 15 ml 正庚烷中加入 0.1 g MML, 0.25 mol/L 的等摩尔底物和 2 mmol/L 的金属盐。

3 讨 论

Mucor miehei 脂肪酶是目前对其结构研究比较多和比较清楚的真菌脂肪酶之一。作为一个典型的真菌脂肪酶的代表, X-衍射结晶学的研究表明: *Mucor miehei* 脂肪酶的二级结构主链由九股的 β -中心折叠系统和五段 α -螺旋所组成, 它的催化活性是在以 Ser 为主的与 Asp、His 组成的三分子催化中心进行的。但是这个中心却埋在一段螺旋结构的“盖子”下面。“盖子”的疏水基团与这个三分子的疏水区域相结合, 见图 6。

这个带有 Trp 的“盖子”具有两亲特性。Trp 疏水表面与催化中心的疏水区域相结合, 暴露出的另一亲水端则面向外, 与水分子以氢键作用连接^[11]。从表面活性剂的化学结构看(图 7)。表面活性剂同样具有疏水和亲水两端。

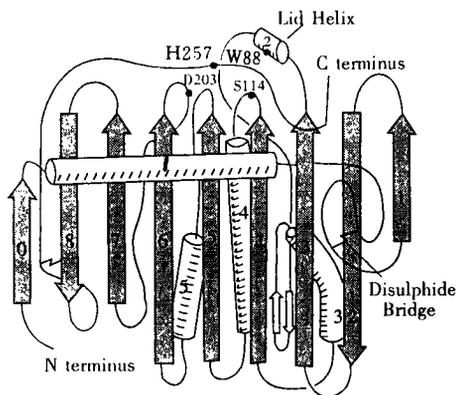


图 6 *Mucor miehei* 脂肪酶二级结构示意图

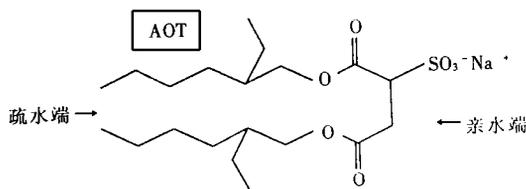


图 7 AOT 分子的化学结构

在水相环境里,“盖子”的构象变化而暴露的活性中心是热力学不稳定的。因为大量的疏水区域也必然暴露。相反,在疏水环境中,非极性的环境则是稳定的。“盖子”的开启也稳定。当非共价修饰时,表面活性剂溶解在非极性的有机溶剂中,会将亲水部位朝外,另一端朝内。这就使得“盖子”更加稳定;又使脂肪酶分配在内部的微水环境中,把酶与外部的有机溶剂分开,其疏水端可以阻止水分对酶的进一步作用所造成的失活,使脂肪酶催化活性更加稳定。与 Han^[12]和 Kim^[13]的“*Rhizopus arrhizus*和 *Candida rugosa* 脂肪酶在表面活性剂修饰后更加不稳定”的发现相比,是截然不同的结果。

参 考 文 献

- 1 George Bell, Halling P J, Barry D. Biocatalyst behaviour in low-water systems. Moore TIBTECH, 1995, 13: 468 ~ 473
- 2 Gorman L S, Dordick J S. Organic solvents strip water off enzymes. Biotechnol Bioeng, 1992, 39: 392 ~ 397
- 3 George Bell, Takahashi K. Magnetic lipase active in organic solvents. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 142(2): 291 ~ 296
- 4 Patkar S, Bjorkling F. Lipase inhibitors. In: Woolley P, Petersen S ed. Lipases. New York: Cambridge University Press, 1994. 207 ~ 224
- 5 Russell A J, Kalibanov A M. Surfactant modified enzymes. J Biol Chem, 1988, 263: 11624 ~ 11626
- 6 Guo Z W, Goto M, Kamiya N, et al. Enantioselective Inhibition: A strategy for improving the enantioselectivity of biocatalysis systems. J Am Chem Soc, 1989, 111: 6836 ~ 6841
- 7 George Bell, Goto M, Goto M, et al. Enzymatic interesterification of triglyceride with surfactant-coated lipase in organic media. Biotechnol Bioeng, 1995, 45: 27 ~ 32

- 8 徐岩, 章克昌. 微生物脂肪酶在正庚烷中合成短链芳香酯的研究. 生物工程学报, 1998, 14(2): 243 ~ 248
- 9 Chang P S, Rhee S J. Characteristics of lipase catalyzed glycerolysis of triglyceride in Aot-isooctane reversed micelles. Biocatalysis, 1990, (3): 345 ~ 355
- 10 Wu S, Guo J S, Sih C J. Enhancing the enantioselectivity of candida lipase catalyzed ester hydrolysis. J Am Chem Soc, 1990, 112: 1990 ~ 1995
- 11 Lawson D M, Brzozowski A M, Donson G G, et al. The three-dimensional structures of two lipases from filamentous fungi. In: Woolley P, Petersen S ed. Lipases. New York: Cambridge University Press, 1994. 77 ~ 94
- 12 Han D, Rhee S J. Characteristics of lipase catalyzed glycerolysis of triglyceride in Aot-isooctane reversed micelles. Biotechnol Bioeng, 1986, 28: 1250 ~ 1255
- 13 Kim T, Chung K. Some characteristics of palm kernel olein hydrolysis by *Rhizopus arrhizus* lipase in reversed micelle of Aot in iso-octane, and additive effects. Enzyme Microb Technol, 1989, (11): 528 ~ 532

Non-covalent Modification of Immobilized-Lipase Used in Enzymatic Catalysis in Organic Phase

Xu Yan Zhang Kechang

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract In biosynthesis of ethyl hexanoate catalyzed by immobilized lipase from *Mucor miehei* in heptane, enzyme inhibitors, different types of amphipathic surfactants, bile salts and metal salts were used to modify lipase non-covalently. It was found that all anionic, cationic and non-ionic surfactants were able to enhance the catalysing activities in varying degrees at certain concentrations. Among them, AOT, LAS and Triton X-100 had significant effects on stability, which made lipase more stable when the concentrations of substrate ethanol and hexanoic acid were increased up to 0.5 mol/L from 0.25 mol/L. The reason for that was analyzed on basis of the structure of the lipase and surfactant. Bile salts and metal salts had nearly no improvement in the activities of lipase, and even inhibited that at slightly higher concentration.

Key words immobilized lipase; modification of enzyme; surfactant; inhibitor

(责任编辑: 秦和平)