

文章编号: 1001-3555(2013)01-0083-06

表面活性剂在水-有机两相体系中对 β -葡萄糖苷酶催化合成红景天苷的影响

王梦亮*, 姜磊麟, 崔晋龙, 焦红卫

(山西大学 应用化学研究所, 山西 太原 030006)

摘要: 采用缓冲液/正己烷为反应体系, 比较了几类表面活性剂(CTAB, SDS, SDBS, Tween 20)对酶活的影响. 并在该反应体系中, 考察了表面活性剂对 β -葡萄糖苷酶催化合成红景天苷的反应中底物转化率以及初始反应速率的影响, 确定了反应混合体系的适宜含水量. 结果表明, 在水/有机两相体系中, HLB 值较高的 SDS 对酶的失活体现出了一定的抑制作用, 其余表面活性剂均对酶失活起了不同程度的加速作用. 在几类表面活性剂各自最适添加浓度下, CTAB, SDS, Tween 20 三组均将底物转化率从 9.2% 提高到 11% 左右. 不添加表面活性剂所测得的初始反应速率最高, Tween 20 组次之, 离子型表面活性剂添加组最低. 对于 SDS 添加组, 当其含水量为 10% 时, 底物转化率可以达到 22.3%.

关键词: 生物催化; β -葡萄糖苷酶; 逆水解反应; 表面活性剂

中图分类号: O643

文献标志码: A

红景天苷(Salidroside)是景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola* L.)植物中最为重要的药效成分, 鉴于其优良的抗疲劳、抗衰老、抗微波辐射等特性, 已在医疗保健、食品工业、军事航天等领域体现出了较高的利用价值^[1]. 目前, 制备获取糖苷类化合物的方法途径有: 1. 从植物体中提取; 2. 化学合成法; 3. 生物愈伤组织培养合成; 4. 生物催化合成法. 其中, 生物催化合成因其具有独特的高立体、区域选择性, 操作简单, 反应条件温和等特点^[2]而受到广大研究者的关注. 由于糖苷酶具有转糖基活性, 因而常用作于生物催化合成糖苷类化合物的催化剂. β -葡萄糖苷酶催化合成红景天苷的反应如图 1 所示. 生物催化合成研究主要以反应介质工程为热门研究领域, 从最初的水相介质到而后的水-有机相反应体系^[3-4], 再到近几年热门的离子液体^[5-7]等新型反应介质的出现使得糖苷类化合物的

合成研究表现出良好的发展势头. 此外, 对于维持生物催化合成糖苷反应的催化剂—糖苷酶活性的相关技术也有所研究^[8].

表面活性剂对酶催化的反应研究主要涉及脂酶, 纤维素酶, 磷脂酶等, 相对而言, 对于糖苷类化合物的合成影响介入却鲜有报道. 研究表明, 表面活性剂有助于维持酶的活性, 但目前仍缺少详尽、深入的机理来解释这一作用机制. 此外, 表面活性剂在以上的研究中还表现了其他杰出的性质, 比如有效降低脂酶水解反应中降低油水界面表面张力, 促进纤维素酶等水解反应中酶的解吸附作用等^[9-11]. 我们在前期工作的基础上, 以水-正己烷作为反应体系, 研究了该体系中几类离子/非离子型表面活性剂(见表 1)对合成红景天苷底物转化率的影响. 且对各类表面活性剂对 β -葡萄糖苷酶活的影响也有所探讨.

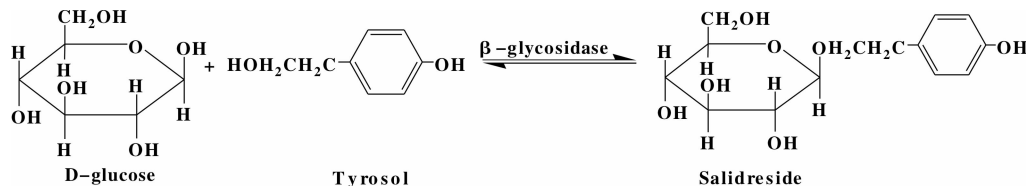


图 1 D-葡萄糖与酪醇合成红景天甙反应式

Fig. 1 Synthesis of salidroside from D-glucose and tyrosol

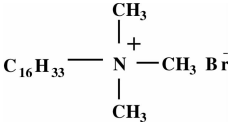
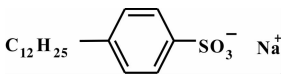
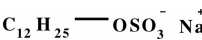
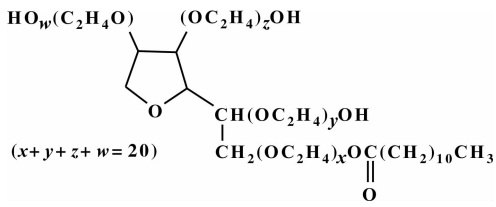
收稿日期: 2012-11-30; 修回日期: 2013-01-05.

基金项目: 科技部创新方法专项(2010M020700).

作者简介: 姜磊麟(1988-), 男, 硕士. Tel: 18734820983 E-mail: thewayyer@163.com.

* 通讯联系人, Tel: (0351)7016101 E-mail: mlwang@sxu.edu.cn.

表 1 表面活性剂的分类
Table 1 Classification of surfactants

Name	Chemical structure	Ionic nature	HLB
Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)		C	15.8
Sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS)		A	12.3
Sodium dodecyl sulfate (SDS)		A	40.0
Polyoxyethy—lene(20) Sorbaitan Monolaurate (Tween20)		N	16.7

N, nonionic; C, positively charged; A, negatively charged; HLB, hydrophilic-lipophilic balance.

1 实验部分

1.1 β-葡萄糖苷酶粗酶粉的制备及其酶活测定

将干燥的杏仁充分研磨后依次用预冷(4℃)的乙酸乙酯和丙酮分别洗涤2次,获得的粗酶粉经干燥后置于4℃环境下密封保存备用.

采用DNS法^[7]对β-葡萄糖苷酶活性予以测定.测定条件为:取0.5 mL适当稀释的粗酶液(pH=6.0),0.5 mL底物水杨苷(0.5%)(中国药品生物制品检定所),在50℃条件下恒温反应20 min,加入1 mL DNS制剂,沸水加热5 min,冷却至室温后用蒸馏水稀释至25 mL,过滤.用紫外分光光度计于540 nm波长下测量其吸光度值,以加热灭活的酶作对照.一个酶活单位定义为50℃,pH 6.0的条件下,每分钟催化水解水杨苷产生1 μmol还原糖所需的酶量.

1.2 表面活性剂添加对酶活影响的测定

取2.5 U当量的粗酶粉,5 g/L的表面活性剂添加至2 mL pH 6.0的磷酸缓冲液和2 mL正己烷的混合体系中,于50℃,180 r/min的条件下恒温反应.每隔一定的时间段抽取粗酶液,测量其酶活性值.以不添加任何表面活性剂的反应组为对照.

1.3 酶催化合成红景天苷

称取0.5 mmol 酪醇(AR,阿拉丁),0.1 mmol葡萄糖(AR,天津恒兴化学试剂有限公司),表面活性剂,2.5 U粗酶粉混溶于2 mL缓冲液/正己烷(1/1,V/V)混合体系中.在50℃,180 r/min的条件下震荡反应24 h.

反应结束后,抽取一定量的水相反应液,用2倍体积的蒸馏水稀释,经微孔滤膜过滤后在高效液相色谱仪上分析:Sinochrom ODS-BP柱(4.6 mm×200 mm,5 μm),UV230⁺型紫外检测器,P230型高压恒流泵,柱温30℃,检测波长278 nm,进样量20 μL,流动相为0.8 mL/min的甲醇/水(30/70,V/V)^[7].

2 结果与讨论

2.1 表面活性剂对酶活的影响

图2a是各类表面活性剂在1 g/L的添加量时对酶活的影响.以每个时间段测定的不含表面活性剂的组所测得的酶活值为基准,图中纵坐标为各个表面活性剂添加组测得酶活值减去基准酶活值而得到的差值.从图2a中可以看出各类离子型表面活性剂在最初时刻均对酶活有降低的作用,其中阴离子型表面活性剂SDS影响较小.非离子型表面活性剂Tween 20保持了略高于对照组的酶活值.但当

表面活性剂与酶接触时间变长后, SDS 逐渐体现出维持酶活的作用, 在每个时间段内均测得了略高于对照组的酶活值. 在 72 h 时, Tween 20 也开始表现

出了抑制酶失活的作用, 但依旧不如 SDS 效果明显. 处于 CTAB 和 SDBS 的环境下的酶活, 同对照组相比, 均对酶失活起了加速或促进的作用.

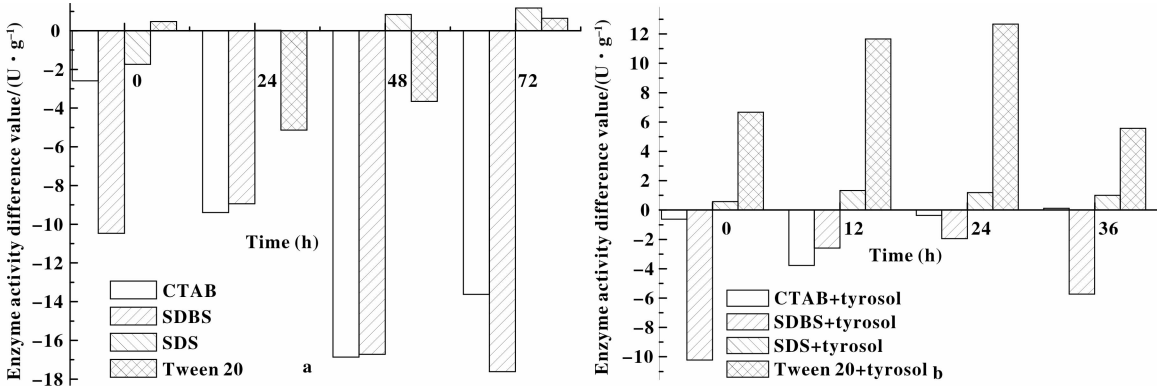


图 2 表面活性剂在水/有机两相中对酶稳定性的影响

Fig. 2 Effect of surfactant on enzyme stability in the aqueous-organic biphasic system.

The enzyme activity of the group which without surfactant adding was taken as the standard.

β-Glycosidase was incubated in the mixture that contained 50 mmol/L phosphate buffer (pH 6.0) and n-hexane (1/1, V/V) at 50 °C, 180 r/min. Each surfactant was added at 1 g/L. Tyrosol was added at 30 g/L(b).

酶因同时含有亲水和憎水的氨基酸结构而体现出局部的亲水性和疏水性, 所以, 任何疏水或亲水的材料均会对酶的结构造成一定程度的影响^[12-13]. 此外, 酶结构中某些氨基酸基团具有带电性, 所以电性离子或基团同酶的带电氨基酸基团接触产生静电作用会引起酶蛋白的结构发生扭曲等变化. 酶结构刚性的增强也会“加固”酶的结构从而抑制酶的变性^[14]. 表面活性剂跟酶接触, 同酶蛋白发生亲/憎水的作用, 使酶的结构发生改变, 可能对酶的结构予以加固, 从而抑制酶失活. 这一现象在水相中的研究表现尤为明显. 离子型表面活性剂, 在水中水解产生带电基团, 在对酶蛋白进行有效修饰的同时也因为静电作用而对酶的活性中心同某些氨基酸电荷的耦合配对等作用造成干扰, 相对而言, 电中性的基团往往对酶固有活性影响更为轻微^[14], 因此, 在初始阶段, 非离子型的表面活性剂 Tween 20 添加组测得了较离子型表面活性剂组高的酶活值.

同纯水相反应体系相比, 表面活性剂在水/有机两相体系中对酶活的影响表现出了较大的差异. 在水相中非离子型的表面活性剂 Tween 20 对酶失活有着显著抑制效果, 而在水/有机两相体系中, Tween 20 在前期却没有体现出对酶失活的显著抑制作用. 事实上, 在水/有机两相体系中, 表面活性剂除与酶蛋白表面发生作用, 同时还会降低水、有机相界面处的表面张力, 增大有机相与水相互接触的几率, 从而

使得酶受有机相影响加重, 更易“中毒”失活. 当这一作用处于主导地位时, 添加有表面活性剂组的酶就显现出了比对照组更易失活的态势.

当酶处于总反应体系时, 必然会受到周围各种基质的影响. 图 2b 显示的是在有酪醇存在于反应体系中时, 表面活性剂的引入对酶活的影响. 此时, 以仅添加酪醇为对照, 图中纵坐标为各个表面活性剂添加组测得酶活值减去对照组所测得的酶活值所得差值. 可以发现, 此时非离子表面活性剂 Tween 20 表现出了较 SDS 更为良好的维持酶活性的作用, 且远优于其他组别. 阴离子表面活性剂 SDS 组测得酶活值低于 Tween 20 组, 但依旧表现了一定的抑制失活效果. 同作为阴离子表面活性剂的 SDBS 自始至终都表现出了对酶失活促进的作用. 可以推测, 葡萄糖的加入势必对酶也会造成一定程度的影响(本文未予以探究), 从而最终影响到底物的转化率.

亲水亲油平衡值(HLB)通常被用于评价表面活性剂的亲水或憎水的程度, 一般而言 HLB 值处于 1~40 之间, HLB 越小表示亲油性越强, 反之亲水性越大. 试验中考察的表面活性剂的 HLB 值同酶活差值(72h)间的对应关系如表 2 所示.

从表 2 数据可以看出, HLB 值越大(亲水性强)对应的酶活差值就越大. 表面活性剂在该环境下表现出了 HLB 值越大越有利于酶活性保持的趋

势. 但此时酶是处于水/有机两相体系中, 这并非单纯的是表面活性剂对酶的影响结果, 其中还介入了有机试剂对酶的影响. 就单独考虑酶活变化趋势与表面活性剂 HLB 值的关系而言, 仍需返回纯水相体系中进行进一步的研究.

表 2 HLB 值对酶活的影响
Table 2 Effect of HLB on enzyme activity

Surfactant/ HLB value	Enzyme activity difference value at 72 h/U
SDBS/12.3	-17.62
CTAB/15.8	-13.62
Tween 20/16.7	0.64
SDS/40	1.17

2.2 表面活性剂对酶催化合成反应的影响

在不同添加浓度情况下, 几类表面活性剂对底物葡萄糖转化率的影响结果如图 3 所示. 底物转化率计算方法如下:

Conversion of glucose =

$$\frac{\text{The consumption amount of glucose}}{\text{The initial addition amount of glucose}} \times 100\%$$

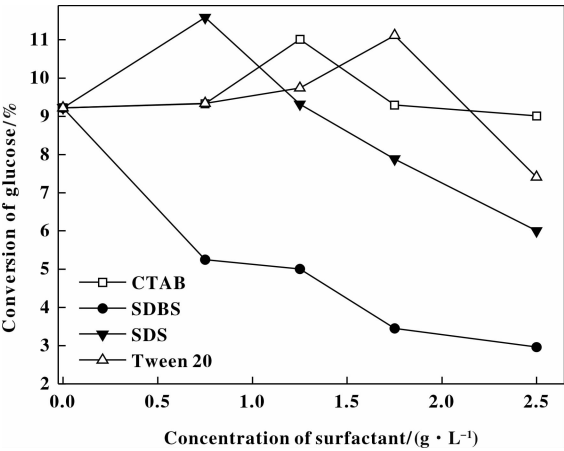


图 3 表面活性剂对底物葡萄糖转化率的影响
Fig.3 Effect of surfactant on the conversion of glucose
Conditions: 0.1 mmol glucose, 0.5 mmol tyrosol, 2.5 U almond seed meal, 1 mL n-hexane, 1 mL phosphate buffer (pH 6.0, 50 mmol/L), total volume 2 mL, 50 ℃, 180 r/min, reaction time 24 h. 0 mg, 1.5 mg, 2.5 mg, 3.5 mg and 5 mg of various surfactants were added into the reaction system as shown above.

由图可见, 除 SDBS 外, 其他几类表面活性剂在各自的合适添加浓度下均对底物转化率有所提高, 其中 SDS 添加组结果略微突出, SDS 在 0.75 g/L 的添加量时, 底物转化率比对照组扩大 1.3 倍. 当超过表面活性剂各自的最佳添加浓度时, 底物转化率呈下降趋势, 甚至随着添加浓度的升高出现低于空白添加组的现象. 在阴离子表面活性剂 SDBS 组中, 葡萄糖转化率随着 SDBS 添加浓度的增加而降低.

表面活性剂促进底物转化率的提高可以归功于表面活性剂抑制酶失活的功效. 但在反应体系中, 由于诸多因素的影响, 所有表面活性剂对抑制酶失活的作用均有所淡化. 可以看出, CTAB、SDS、Tween 20 在各自最佳的添加浓度下, 对底物葡萄糖转化率的提升得的是一相近值(约为 11%). 当表面活性剂的浓度过高时, 多余的表面活性剂可能会针对酶的活性位同反应底物产生竞争^[15], 不利于底物和酶活性中心的结合. 此外, 当表面活性剂浓度超过其临界胶束浓度(CMC)后, 还会产生胶束增溶等影响(见 2.3 节), 最终导致底物转化率降低.

图 4 为各类表面活性剂在对于底物转化率达最高值时各自最佳浓度添加量下反应初始速率的测定. 初始反应速率计算方法如下:

$$\text{Initial reaction rate} = \frac{\text{The amount of product (mM)}}{\text{Reaction time (h)}}$$

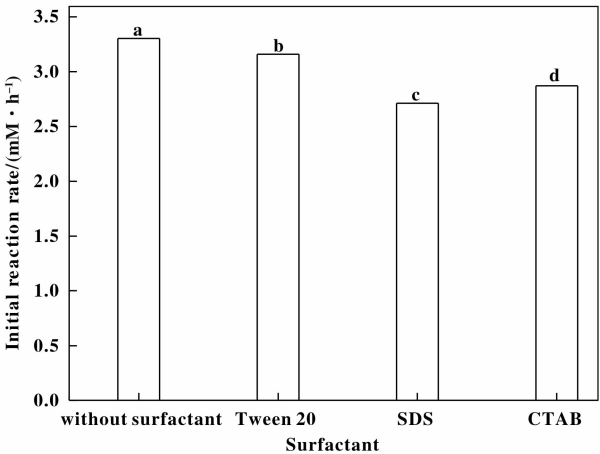


图 4 表面活性剂对初始反应速率的影响
Fig.4 Effect of surfactant on the initial reaction rate
Conditions: b, 3.5 mg Tween 20, c, 1.5 mg SDS, d, 2.5 mg CTAB. 0.1 mmol glucose, 0.5 mmol tyrosol, 2.5 U almond seed meal, 1 mL n-hexane, 1 mL phosphate buffer (pH 6.0, 50 mmol/L), total volume 2 mL, 50 ℃, 180 r/min.

前面提到因受到静电作用而导致酶蛋白结构变化将酶活性位覆盖等影响,离子型表面活性剂添加组在初始反应阶段测得了较对照组低的酶活值.在初始反应速率的测定中,这一影响结果也有所展现:在不添加任何表面活性剂的情况下,测得初始反应速率值最大,非离子型表面活性剂 Tween 20 组测得的初始反应速率值略低于对照组,高于离子型表面活性剂添加组.离子型表面活性剂 CTAB 和 SDS,在水中水解产生的带电基团,因为静电作用而对酶活性中心等结构(酶固有的活性)产生了比电中性的基团更大的影响^[14].所以离子型表面活性剂测得较非离子型表面活性剂更低的初始反应速率值.

2.3 含水量对底物转化率的影响

以添加 0.75 g/L 的 SDS 组为实验对象,考察含水量对底物转化率的影响,结果见图 5.当含水量低于 10% 时,转化率相对较低,含水量为 10% 时,底物转化率急剧上升且达到最大值.水含量超过 10% 后,随着水含量的增多葡萄糖转化率呈下降趋势.

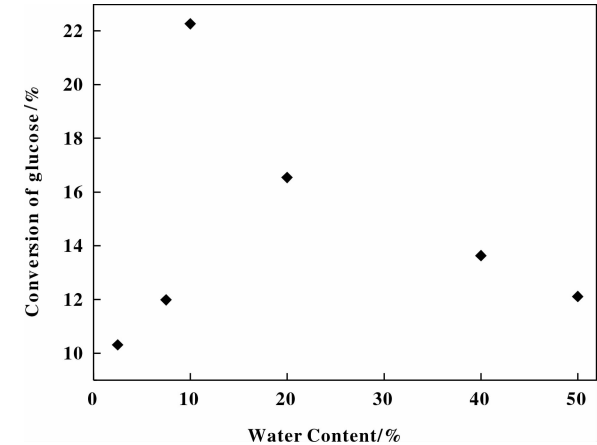


图 5 含水量对底物葡萄糖转化率的影响

Fig. 5 Effect of water content on the conversion of glucose

酶蛋白所含的结合水可削弱各极性残基间的相互作用,使其彼此分开,以此增大酶活性中心的柔性,降低酶与底物形成过渡态的能域.适量的含水量对于酶是必需的,但游离水过多使得酶活性中心内部水聚集,使酶的结构发生改变,从而降低酶的活性^[7].再者,最为关键的一点是:糖苷合成反应属于逆水解反应,反应体系中水浓度和活度过大,不利于反应平衡向合成糖苷的方向移动,所以底物转化率降低.

另一方面,随着水含量降低,表面活性剂浓度逐渐升高,当其达到临界胶束浓度后,在水溶液中形成胶束,产生两种增溶现象.其一是对极性较高的反应底物而言,反应底物作为增溶质采用吸附在胶束的亲水基团或靠近胶束栅状层的表面区域(图 6-a)的方式增溶,其增溶量较小;其二是对水不溶性的正己烷而言,此时正己烷作为增溶质进入胶束烃核(图 6-b)达到增溶的效果,其增溶量较大.所以,胶束的形成虽能在一定程度上提高底物同酶的接触几率,但同时也会引起更多的有机相与酶接触以加重酶“中毒”失活的症状,进而影响底物的转化,且这一影响远远大于底物的增溶作用影响.此外,过多胶束的形成也会降低酶在反应介质中的扩散,不利于酶和底物的接触.综合考虑,10% 的含水量对于产物的合成最为适宜.

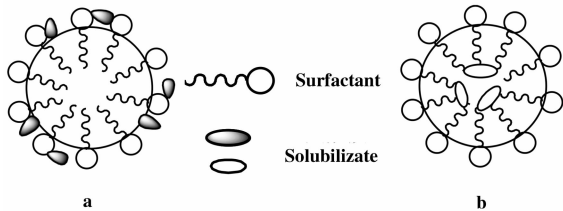


图 6 胶束增溶模型

Fig. 6 Model of micellar solubilization

3 结 论

综上所述,在水/有机两相反应体系中考察了几类表面活性剂对酶活性的以及底物转化率的影响.结果表明,仅 SDS 体现出了较低的抑制酶失活的作用效果,其余表面活性剂均对酶失活起了不同程度的促进作用.但当酯醇存在于反应体系时,Tween 20 表现出了最为优异“维活”作用.鉴于表面活性剂有利于维持酶活的影响,SDS, CTAB, Tween 20 均小幅度地提升了底物转化率.在 SDS 添加组中,当混合反应体系中水含量为 10% 时,葡萄糖转化率达到最高为 22.3%.酶属于复杂的生物大分子,其活性影响因素较多,外来添加物对其造成的影响不能采用单一理论或机制解释清楚.我们重点研究了表面活性剂对酶活性的影响,而对于反应体系中,表面活性剂对可溶性底物与酶之间的影响作用还有待进一步考察.

参考文献:

[1] Zhang Zhu-rong(张祖荣), Liao Zhi-hua(廖志华). 红景

- 天苷的生物合成途径及生物技术研究进展[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2010, **41** (9): 1571.
- [2] Holemann A, Seeberger P H. Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**: 615.
- [3] Flowers H M. Chemical synthesis of oligosaccharides [J]. *Methods Enzymol.*, 1987, **138**: 359–404.
- [4] Vulfson E N, Patel R, Law B A. Alkyl glucoside synthesis in a water-organic two-phase system [J]. *Biotechnol Lett.*, 1990, **12**: 397–402.
- [5] Udo Kragl, Marrit Eckstein, Nicole Kaftzik. Enzyme catalysis in ionic liquids [J]. *Curr Opin Biotechnol.*, 2002, **13**: 565–571.
- [6] Yang Rong-ling, Li Ning, Zong Min-hua. Using ionic liquid cosolvents to improve enzymatic synthesis of arylalkyl β -D-glucopyranosides [J]. *J. Mol Catal B: Enzym.*, 2012, **74**: 24–28.
- [7] Wang Meng-liang (王梦亮), Guo Chun-xia (郭春侠). 离子液体中 β -葡萄糖苷酶生物催化合成红景天甙 [J]. *Chin J Catal* (催化学报), 2011, **32**(6): 1051–1055.
- [8] Padma V. Iyer, Laxmi Ananthanarayan. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment [J]. *Process Biochemistry*, 2008, **43**: 1019–1032.
- [9] Canioni P, Julien R, Rathelot J, Sarda L. Interaction of porcine pancreatic colipase with a nonionic detergent, Triton X-100: spectrophotometric studies [J]. *Biochemie.*, 1976, **58**: 751–753.
- [10] Patkar S. Bjorkling F: lipase Inhibitors [M]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1994.
- [11] Fikret Kaya, John A Heitmann Jr., Thomas W Joyce. Influence of surfactants on the enzymatic hydrolysis of xylin and cellulose [J]. *Tappi J.*, 1995, **78**: 150–157.
- [12] You C C, De M, Han G, Rotello V M. Tunable inhibition and denaturation of α -chymotrypsin with amino acid-functionalized gold nanoparticles [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**: 12873–12881.
- [13] Norde W, Zoungrana T, Biotechnol. Surface-induced changes in the structure and activity of enzymes physically immobilized at solid/liquid interfaces [J]. *Appl. Biochem.*, 1998, **28**: 133–143.
- [14] Talbert J N, Goddard J M. Enzymes on material surfaces [J]. *Colloids Surf., B*. 2012, **93**: 8–19.
- [15] Donn N Rubingh. The influence of surfactants on enzyme activity [J]. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 1996, **1**: 589–603.

Effect of Surfactants on the β -Glycosidase Enzymatic Synthesis of Salidroside in Aqueous-organic Biphasic Systems

WANG Meng-liang^{*}, JIANG Biao-lin, CUI Jin-long, JIAO Hong-wei
(Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: β -Glycosidase from almond seed was used as catalyst for the synthesis of salidroside. Enzyme activity in the presence of surfactants (CTAB, SDS, SDBS and Tween 20) was studied by assaying for enzyme activity in aqueous-organic biphasic. SDS was found to be the most effective at maintaining enzyme activity in the aqueous-organic biphasic systems. The effect of surfactant on the substrate conversion in the aqueous-n-hexane biphasic system was investigated, too. The conversion of glucose was enhanced to 11.6% by adding 0.75 g/L SDS in the reaction system. Glucose conversion of 11% was achieved by adding CTAB of 1.25 g/L and Tween 20 of 1.75 g/L, respectively. For the SDS treatment, a substrate conversion rate of 22.3% was obtained under the condition of water content of 10% in the biphasic systems.

Key words: bio-catalysis; β -glycosidase; reverse hydrolysis; surfactant