

文章编号: 1001-3555(2024)01-0026-09

基于硼氢化钠原位还原的纳米金杂化酶的制备及催化阿魏酸甘油酯合成

尹一¹, 孙立瑞¹, 刘青云¹, 辛嘉英^{1,2*}

(1. 哈尔滨商业大学食品科学与工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 中国科学院兰州物理化学研究所
羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 建立了一种基于硼氢化钠原位还原法制备纳米金杂化酶用以合成阿魏酸甘油酯的方法, 使杂化酶的催化活性、稳定性及结构的刚性皆有所提高. 利用硼氢化钠原位还原法制备了 $\text{NaBH}_4@Au\text{NPs-CRL}$ 杂化酶, 通过单因素实验得到了最优的杂化条件, 并利用荧光光谱、红外光谱、X-射线电子能谱、透射电镜等方法探究了杂化前后酶结构的变化. 研究表明制备的 $\text{NaBH}_4@Au\text{NPs-CRL}$ 杂化酶蛋白二级结构中 α -螺旋含量减少、 β -折叠含量增加, 杂化酶比活性为 $4.91 \pm 0.12 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 与游离酶相比提高了 66.44%, 最佳条件下催化合成阿魏酸甘油酯的转化率为 $98.39\% \pm 3.65\%$, 批式操作稳定性实验表明杂化酶的稳定性有较大提升.

关键词: 脂肪酶; 纳米金; 硼氢化钠; 杂化酶; 阿魏酸甘油酯

中图分类号: O643.32

文献标志码: A

DOI: 10.16084/j.issn1001-3555.2024.01.004

阿魏酸 (Ferulic acid, 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸) 是一种常见于多种水果、蔬菜、谷物和植物成分中的酚类化合物, 具有抗氧化、抗癌、抗炎、保护心脏和神经等多种生理学功能^[1-3]. 但是由于其所具有的低疏水性、低亲水性以及低稳定性等问题, 极大地限制了阿魏酸在食品、制药、化妆品等行业的应用^[4-5]. 阿魏酸衍生物的开发能够通过改变阿魏酸的理化性质, 拓宽其应用范围, 阿魏酸甘油酯就是其中一种常见衍生物. 脂肪酶是制备阿魏酸甘油酯最常用的酶, 不仅能催化酰基甘油酯、硫醇酯、酰胺等物质的水解, 还可在有机溶剂或无溶剂体系中催化酯化合成和转酯反应^[6-8]. Xin 等^[9] 尝试利用 *Candida Antarctica* lipase B (N435) 脂肪酶为催化剂进行阿魏酸和三油酸甘油的酯交换反应, 分别在有机相、无溶剂体系条件下进行合成反应, 得到最大收率约为 51.3%, 并且发现在有机相中进行反应时脂肪酶对体系水活度的要求较高, 水活度较大时酶活性损失较快. 为解决这一问题, Cumming H 等^[10] 以碳酸丙烯酯为溶剂, 在 80 °C 的真空条件下以固定化的

N435 脂肪酶和固定化的 *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) 为催化剂进行咖啡酸甘油酯的合成, 研究表明该方法有助于消除副产物水带来的不利影响, 并且脂肪酶在重复使用 4 次后仍能保持较高的转化率. 尽管产物的转化率有所提升, 但是底物多羟基甘油的较强极性对脂肪酶的活性有所影响, 脂肪酶的活性及稳定性仍是亟待解决的问题, 并且利用游离酶进行催化合成的过程中, 酶的重复利用也成为为一个难题^[11-14].

随着纳米技术的不断发展进步, 利用纳米材料的特殊性能进行脂肪酶的杂化修饰成为一种新兴的提高脂肪酶活性和稳定的有效手段^[15-16]. 金纳米颗粒 (AuNPs) 具有良好的比表面积和生物相容性, 因此可作为脂肪酶杂化的金属骨架. Barros H R 等^[17] 将 *Candida antarctica* fraction B (CALB) 脂肪酶与纳米金通过不同方式 (原位还原法和物理吸附法) 进行杂化, 利用荧光光谱、圆二色谱分析杂化后脂肪酶构象的变化, 期望能够阐述纳米材料与酶分子之间的相互作用, 研究表明纳米金在一定程度上能

收稿日期: 2023-09-27; 修回日期: 2023-11-05.

基金项目: 中央支持地方高校改革发展资金人才培养支持计划项目 (No. 304017)(The Central Government Supporting Local Colleges and Universities Reform and Development Fund Talent Training Support Program Project (No. 304017)).

作者简介: 尹一 (1995-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为生物催化与生物转化, E-mail: 466327014@qq.com (Yin Yi (1995-), male, master degree candidate, mainly engaged in research of biocatalysis and biotransformation, E-mail: 466327014@qq.com).

* 通信联系人, E-mail: xinjiayingvip@163.com.

够稳定酶的活性, 并且纳米金的浓度对脂肪酶色氨酸的荧光特性有明显影响. 杂化方法是影响杂化酶活性和稳定性的一个关键因素, 酶与纳米颗粒之间的相互作用会影响酶结构的完整性, 进而影响酶的活性和稳定性. Hinterwirth H 等^[18] 针对胰蛋白酶和纳米金颗粒的生物偶联活、稳定性和重复性进行了系统研究, 研究表明杂化后胰蛋白酶的活性取决于纳米金颗粒的大小和间隔物的长度.

为了进一步提高脂肪酶的活性和稳定性, 利用硼氢化钠法原位还原纳米金制备 $\text{NaBH}_4@ \text{AuNPs}$ -CRL 杂化酶, 通过控制杂化过程中硼氢化钠的浓度、杂化时间、杂化温度等条件因素, 在脂肪酶分子间和分子内部形成纳米金小颗粒, 通过 FTIR、TEM、XPS 等方法对杂化酶进行结构的表征, 通过批式操作实验探究杂化酶的批式反应稳定性, 为纳米杂化酶的合成提供一种新思路.

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

皱褶假丝酵母脂肪酶 (*Candida rugosa* lipase, CRL, $700 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 购自美国 Sigma 公司, U 为酶活性的国际标准单位); 氯金酸 (纯度 99.9%, 购自国药集团上海试剂公司); 阿魏酸 (纯度 >99%, 购自苏州畅通化学品有限公司); 甘油 (分析纯, 购自天津市天力化学试剂有限公司); 阿拉伯树胶粉 (生化试剂, 购自天津市致远化学试剂有限公司); 橄榄油 (分析纯, 购自上海源叶生物科技有限公司); 无水乙醇、氢氧化钠等均为分析纯试剂, 购自天津市天力化学试剂有限公司.

ZD-85A 气浴恒温振荡器 (常州金坛精达仪器制造有限公司); FDU-1200 真空冷冻干燥机 (东京理化器械株式会社); LRH-70F 生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); UV-2550 紫外-可见分光光

度计 (日本岛津); F-7000 荧光分光光度计 (日本日立); PerkinElmer 100 傅里叶变换红外光谱仪 (美国 PerkinElmer); Ultimate 3000 高效液相色谱仪 (Thermo Scientific); Jasco-j810 圆二色谱仪 (日本 Jasco); JEOL 2100 透射电镜 (日本 JEOL).

1.2 CRL 脂肪酶催化的阿魏酸甘油酯的合成

在反应开始之前, 酶和反应底物需在水活度恒定的密封环境中预平衡 2 d, 恒定的水活度由 0.3 nm 分子筛 ($a_w < 0.01$) 保持. 称取一定量的阿魏酸和甘油置于 50 mL 的具塞三角瓶中, 向其中添加 5 mL 二甲亚砜溶液, 置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 的摇床中混合 30 min 后加入一定量的 CRL 脂肪酶, 密封后置于 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中进行催化反应, 反应一定时间后, $4\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下离心 20 min 去除脂肪酶, 取上清液进行检测. 以底物阿魏酸的转化率和产物产率为指标考察反应时间、底物摩尔比、反应温度、酶添加量等因素的影响, 进行反应体系的优化, 实验平行 3 次, 利用 SPSS 20 和 Origin 2021 进行绘图和数据分析.

$\text{NaBH}_4@ \text{AuNPs}$ -CRL 杂化酶制备好后, 在底物 (阿魏酸/甘油) 摩尔比为 1 : 1、反应时间 48 h、温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\text{NaBH}_4@ \text{AuNPs}$ -CRL 杂化酶的添加量为 50 mg 的条件下催化合成阿魏酸单甘油酯, 利用高效液相色谱法测定剩余底物及产物的含量.

1.3 $\text{NaBH}_4@ \text{AuNPs}$ -CRL 杂化酶的制备方法

取 50 mL 具塞锥形瓶, 向其中分别加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CRL 酶液 10 mL、不同含量浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaBH_4 溶液、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HAuCl_4 溶液 4 mL, 震荡混匀后密封, 置于一定温度的 $8\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中进行原位还原反应, 反应结束后取出酶液倒入截留分子量为 12 000 MD 透析袋中透析 2 h, 经真空冷冻干燥后获得 $\text{NaBH}_4@ \text{AuNPs}$ -CRL 杂化酶粉末 (如图 1). 以杂化后脂肪酶的比

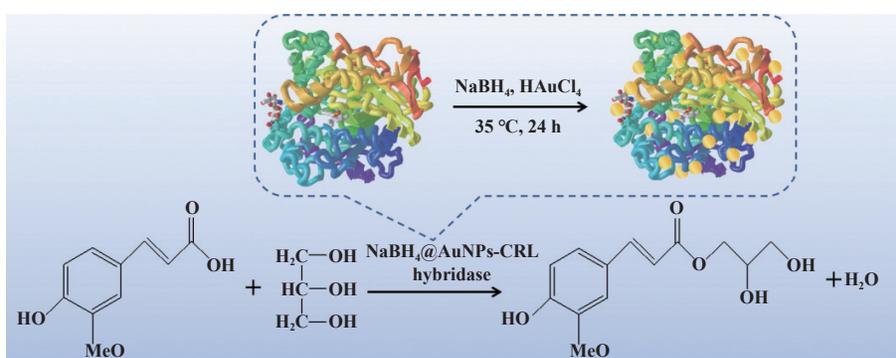


图 1 $\text{NaBH}_4@ \text{AuNPs}$ -CRL 杂化酶催化的阿魏酸甘油酯合成的示意图

Fig. 1 Schematic illustration of synthesis of glycerol ferulate catalyzed by $\text{NaBH}_4@ \text{AuNPs}$ -CRL hybridase

活性为指标,分别考察 NaBH_4 添加量、杂化时间、杂化温度等因素对杂化酶比活性的影响,进行 $\text{NaBH}_4@AuNPs$ -CRL 杂化酶制备的条件优化,实验平行 3 次,利用 SPSS 20 和 Origin 2021 进行绘图和数据分析。

1.4 $\text{NaBH}_4@AuNPs$ -CRL 杂化酶的表征

荧光光谱检测:取 1 mL 浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CRL 酶液和 1 mL $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaBH_4 溶液置于荧光比色皿中,每隔 5 min 添加 $50 \mu\text{L}$ $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HAuCl_4 溶液,设置激发波长为 280 nm,激发狭缝与发射狭缝为 5 nm,发射波长范围 300~700 nm,电压为 700 V,扫描速度为 $2400 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

红外光谱检测:分别取商品酶和待测的 $\text{NaBH}_4@AuNPs$ -CRL 杂化酶各 2 mg,放入傅里叶变换红外光谱仪中,先扫描空白背景,再扫样品(第 1 次扫描使测力计值达到 20,第 2 次再扫描即为样品的红外图谱)。扫描范围 $4000\sim 400 \text{ cm}^{-1}$,分辨率 4 cm^{-1} 。用 PeakFit 4.12 软件对其酰胺 I 带 ($1700\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$) 部分的数据进行分峰,然后用 Gauss 函数进行拟合,得出各子峰的面积和各二级结构的含量,通过柱状图进行对比分析。

X-射线光电子能谱: $\text{NaBH}_4@AuNPs$ -CRL 杂化酶的 X-射线光电子能谱利用美国 Thermo Scientific 公司的 ESCALAB-250Xi 型 X-射线光电子能谱仪进行分析,用 XPS PeakFit 4.0 分峰软件对 Au 元素的原始数据进行分峰拟合处理。

透射电子显微镜:将待测的 $\text{NaBH}_4@AuNPs$ -CRL 杂化酶溶液滴在具膜的 3 mm 铜网上,晾干成膜后进行透射电镜检测,利用 Nano Measurer 1.2 软件分析纳米颗粒的大小和粒径分布。

1.5 阿魏酸的转化率和产物产率的计算方法

采用高效液相色谱法进行转化率的计算。取 0.5 mL 反应后的待测液,用丙酮稀释 10 倍,再用甲醇稀释 20 倍,过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜后至于样品瓶中待测。液相色谱柱为 C18 反相柱,流动相 A 液为 0.1% 冰乙酸, B 液为 100% 甲醇,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,流速 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 $10 \mu\text{L}$,检测器为紫外检测器,检测波长为 254 nm,以 50%A + 50%B 为流动相进行洗脱,洗脱时间为 10 min。阿魏酸转化率 $\eta(\%)$ 由公式 $\eta(\%) = (C_0 - C_1)/C_0 \times 100\%$ 计算,其中 C_0 为阿魏酸的初始浓度 ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), C_1 为反应后阿魏酸浓度 ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

1.6 脂肪酶比活性测定

采用橄榄油乳化法测定脂肪酶的比活性,利用去离子水配制质量浓度为 $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿拉伯树胶粉溶液,将其与橄榄油以 3 : 1 的体积比混匀,置于磁力搅拌器上搅拌成乳状液。取 4 mL 乳状液和 pH 为 7.5、浓度为 $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 溶液 5 mL 混合后加入 10 mg 酶,放入 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 电热恒温水浴锅中进行反应,10 min 后加入 15 mL 无水乙醇终止反应,加 3 滴 1% 无水乙醇-酚酞指示剂,用 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液滴定至红色,保持 30 s 不褪色后,记录消耗的 NaOH 溶液体积。脂肪酶比活性 $A (\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$ 由公式 $A = (V_1 - V_2)/(t \times 10) \times 50$ 的计算得到,其中 V_1 是待测酶所消耗的 NaOH 体积量 (mL), V_2 是空白样品所消耗的 NaOH 体积量 (mL), t 为反应时间 (min)。

1.7 CRL 酶蛋白杂化效率和残余活性的测定

杂化效率是指在杂化过程中成功杂化的酶蛋白占总蛋白的比例。 $\text{NaBH}_4@AuNPs$ -CRL 杂化酶制备结束后于 $4500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下离心 20 min,上清液是剩余的杂蛋白,下层沉淀是杂化酶,将下方沉淀经冷冻干燥处理,通过橄榄油乳化法测定酶活性,测定的结果与初始酶活的比值即为酶蛋白的杂化效率。

2 结果与分析

2.1 脂肪酶催化阿魏酸甘油酯合成条件的优化

以二甲基亚砜为溶剂进行脂肪酶催化的酯化反应,以底物阿魏酸转化率和产率为指标,考察杂化前脂肪酶催化合成阿魏酸甘油酯的最佳合成条件,结果如图 2 所示。从图中可以看出,反应时间、底物摩尔比、温度和酶用量均显著影响阿魏酸的转化率。随着反应时间的延长,副产物的积累导致转化率在 48 h 后逐渐下降;反应过程中添加过多的甘油,可能会加强极性羟基对脂肪酶的影响,使酶的活性下降;适当的温度有利于提高分子运动的速度,降低反应活化能,过高温度会破坏酶的空间结构,使酶蛋白部分失活;在底物含量不变的条件下,适当增加酶用量能够提高底物转化率和产物产率。综上,通过单因素实验得到游离脂肪酶催化合成阿魏酸甘油酯的最佳合成条件为:底物摩尔比(阿魏酸/甘油, mol/mol)为 1 : 1,反应时间 48 h,温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$,酶添加量 50 mg,最佳条件下阿魏酸的转化率为 96.25%。

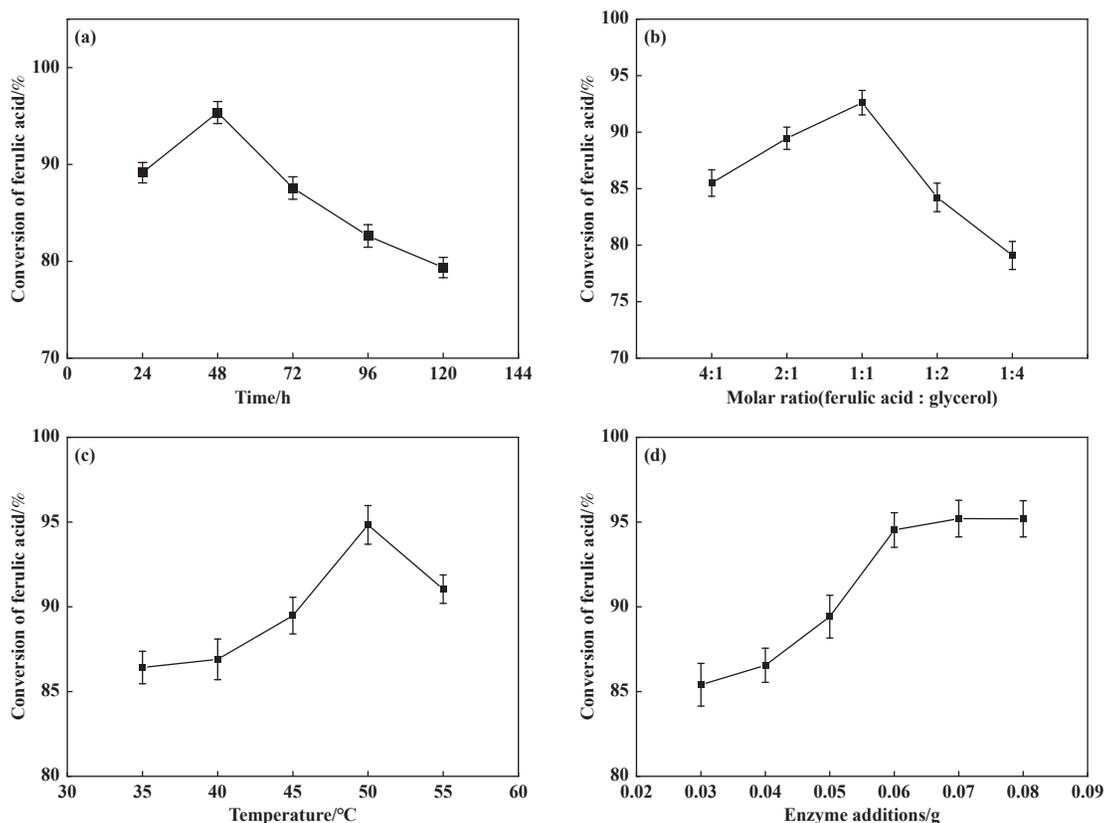


图 2 阿魏酸甘油酯合成条件的单因素优化

Fig.2 The one-factor optimisation of the conditions for the synthesis of glycerol ferulate

- (a) Reaction time(1 : 1 (ferulic acid/glycerol), 50 °C, 50 mg CRL); (b) Substrate molar ratio(48 h, 50 °C, 50 mg CRL);
(c) Temperature(1 : 1 (ferulic acid/glycerol), 48 h, 50 mg CRL); (d) Amount of CRL(1 : 1 (ferulic acid/glycerol), 48 h, 50 °C)

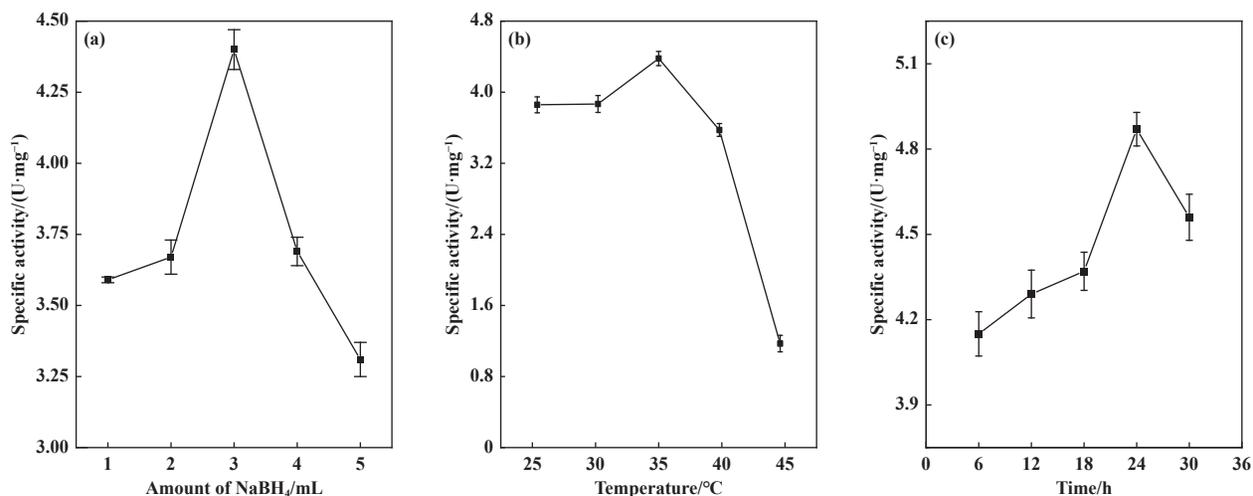
2.2 杂化酶制备条件的优化

将 NaBH_4 作为还原剂添加到含有氯金酸的脂肪酶溶液中, 在适当的条件下进行原位还原反应, NaBH_4 的添加量、杂化温度、杂化时间会显著影响形成纳米金的粒径和形态, 进而影响杂化后脂肪酶的活性. 因此以脂肪酶的比活性为指标考察了 NaBH_4 的添加量、温度、时间对 NaBH_4 @AuNPs-CRL 杂化酶比活性的影响, 结果如图 3 所示. 研究表明在反应时间相同的条件下, NaBH_4 的添加量不同影响原位还原形成的晶核数量, 晶核数量与脂肪酶的接触面积及脂肪酶在不同粒径大小的纳米金表面的相对曲率是影响杂化后脂肪酶活性的主要因素^[19]. 适当数量的纳米金与脂肪酶的接触面积较大, 能够显著增加杂化酶的比活性. 当杂化温度小于 35 °C 时, NaBH_4 @AuNPs-CRL 杂化酶的比活性随温度的升高而增加, 此时分子热运动速度逐渐加快, 有利于脂肪酶活性的提高. 当杂化温度大于 35 °C 时, 杂化酶活性迅速下降, 一方面温度较高时纳米金增长的

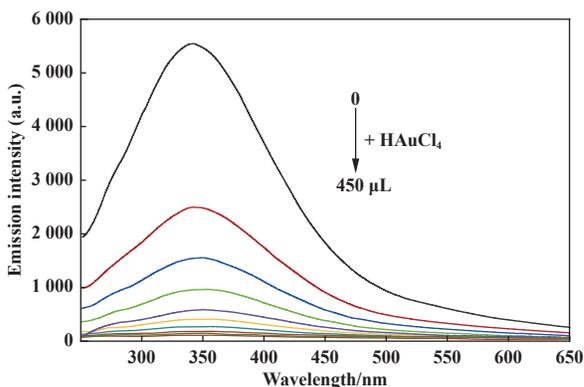
速度加快, 较大粒径的纳米金破坏了脂肪酶的空间结构, 另一方面高温使酶蛋白结构变形、蛋白失活. 随着反应时间的延长, 纳米金不断形成, 增加了脂肪酶催化过程中的电子传递速度, 导致杂化酶的比活性增加. 而当杂化时间超过 24 h 时, 杂化酶的比活性呈下降趋势, 可能是反应时间过长导致形成的纳米金粒径过大, 破坏了酶蛋白的空间结构. 因此用于合成杂化酶的 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaBH_4 的最佳添加量为 3 mL、最佳杂化温度应为 35 °C、最佳杂化时间为 24 h, 最佳条件下杂化酶的比活性为 $4.91 \pm 0.12 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 与游离酶 (游离酶的比活性为 $2.95 \pm 0.33 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) 相比提高了 66.44%.

2.3 杂化酶的表面分析

荧光光谱分析: 借助荧光光谱能够得到原位还原过程中脂肪酶与纳米金之间的相互作用. 图 4 是激发波长为 280 nm 时 CRL 酶液的荧光光谱图, 图中可以看出在 352 nm 波长处出现了脂肪酶的荧光发射峰, 为 CRL 脂肪酶结构中的色氨酸产生的荧光

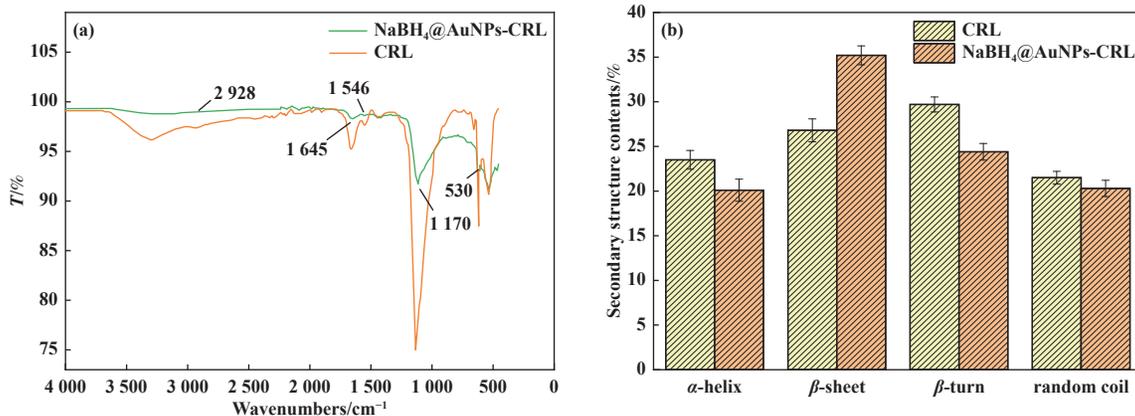
图 3 NaBH₄@AuNPs-CRL 杂化酶制备过程的条件优化Fig.3 The optimisation of the preparation of NaBH₄@AuNPs-CRL hybridases

(a) Amount of NaBH₄ (10 mL 10 mg·mL⁻¹ CRL, 30 °C, 24 h); (b) Temperature (10 mL mg·mL⁻¹ CRL, 3 mL mmol·L⁻¹ NaBH₄, 24 h); (c) Time (10 mL 10 mg·mL⁻¹ CRL, 3 mL 10 mmol·L⁻¹ NaBH₄, 35 °C)

图 4 NaBH₄@AuNPs-CRL 杂化酶制备过程的荧光光谱图Fig.4 The fluorescence spectra of the preparation of NaBH₄@AuNPs-CRL hybridases

效应。当在固定浓度的酶和 NaBH₄ 混合溶液中持续加入 HAuCl₄ 溶液时,发现荧光强度显著降低,几乎完全猝灭。产生这种现象的原因可能与原位合成的纳米金有关,随着 HAuCl₄ 浓度的增加,原位还原合成的纳米金也在持续增加,而 AuNPs 粒子与酶之间存在较强的相互作用,酶与 AuNPs 的结合导致了荧光的减弱。除此之外,在荧光峰中也观察到约 5 nm 的红移 (347 → 352 nm),这可能是由于杂化过程中产生的纳米金使脂肪酶 Trp 残基附近的微环境发生了变化,进而影响了杂化酶的催化性能。

红外光谱检测: 图 5 是游离酶和杂化酶的红外光谱图。图中 3 295 cm⁻¹ 处为 O—H 的伸缩振动峰; 1 654 cm⁻¹ 为 C=C 伸缩振动峰; 1 531 cm⁻¹ 处

图 5 NaBH₄@AuNPs-CRL 杂化酶的红外光谱图 (a) 以及各二级结构含量 (b)Fig.5 The FTIR spectra of NaBH₄@AuNPs-CRL hybridase(a) and the contents of secondary structure(b)

为 $\delta\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动峰; $1\ 122$ 和 $944\ \text{cm}^{-1}$ 处为 $\text{C}-\text{N}$ 或 $\text{C}-\text{S}$ 伸缩振动峰; $531\ \text{cm}^{-1}$ 处为 $-\text{S}-\text{S}-$ 的伸缩振动峰. 通过对比发现杂化酶在 $530\ \text{cm}^{-1}$ 处对应于 $\text{S}-\text{S}$ 键的峰强度明显减弱, 表明二硫键发生断裂, 形成 $\text{Au}-\text{S}$ 键, 金硫键是脂肪酶和纳米金之间的主要键合方式. 图中 $3\ 295$ 、 $2\ 928$ 、 $1\ 107\ \text{cm}^{-1}$ 处伸缩振动的轻微偏移可能是由 CRL/NaBH_4 和 AuNPs 之间的相互作用引起的.

采用 Origin 2021 软件对酰胺 I 带振动区进行二阶求导和傅立叶去卷积处理, 结合二阶导谱和去卷积谱得到的子峰峰位, 进行相应的二级结构构象指认. 将得到的数据绘制成柱形图进行对比分析, 发

现杂化后脂肪酶的 α -螺旋含量减少了 2.3%, β -折叠含量增加了 9.3%, β -转角含量降低, 无规则卷曲基本不变, 说明杂化后脂肪酶酶结构变得更加刚性, 这可能是脂肪酶活性提高的主要原因.

X-射线光电子能谱分析: X-射线光电子能谱使检验物质元素组成的有效手段. 图 6 是最佳条件下合成的杂化酶利用 XPS peak 分峰软件拟合 Au 的 $4f$ 轨道分峰拟合图及 XPS 全谱图. XPS 能谱显示在 84.15 和 $87.8\ \text{eV}$ 出现了两个 Au $4f$ 信号峰, 分别对应 $\text{Au}(0)\ 4f_{7/2}$ 和 $4f_{5/2}$, 两峰之间的分裂能为 $3.65\ \text{eV}$, 原始峰与拟合峰重叠度良好, 表明拟合效果较好. XPS 数据证明杂化酶中有金单质形成.

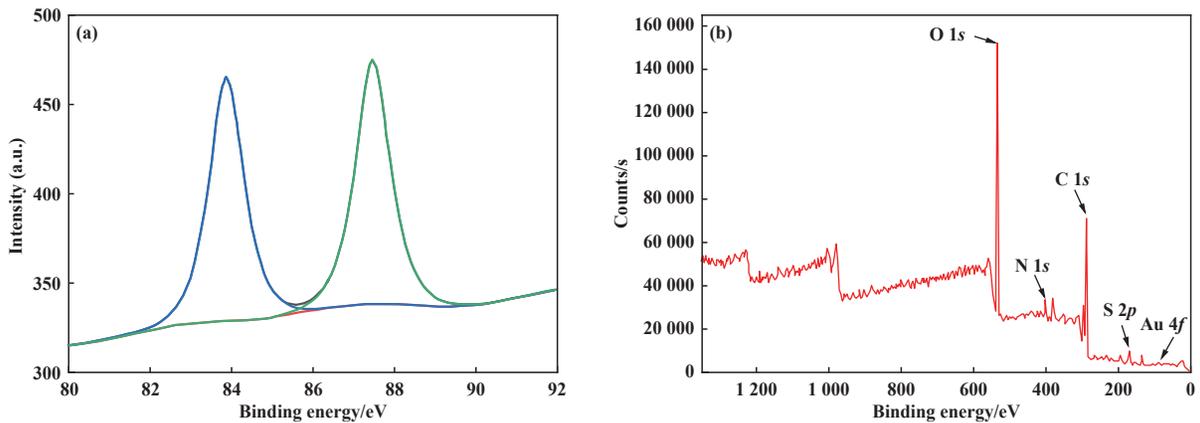


图 6 $\text{NaBH}_4@\text{AuNPs}-\text{CRL}$ 杂化酶的 XPS Au $4f$ 轨道分峰拟合图 (a) 及全谱图 (b)

Fig.6 XPS Au $4f$ orbit peak fitting (a) and full spectra (b) of $\text{NaBH}_4@\text{AuNPs}-\text{CRL}$ hybridase

杂化酶的透射电镜检测: 透射电镜能够直观的检测到纳米金的生成及表面亚显微结构. 图 7 是 NaBH_4 还原法制备的杂化酶的 TEM 图, 从图中可以看出, 原位还原形成的纳米金随机分布在体系及脂肪酶内部, 大体上呈圆形或椭圆形, 具有良好的分散性且具有明显的晶格结构, 晶格间距为 $0.235\ \text{nm}$. 通过纳米金的粒径分布图可以得到最佳条件下合成的纳米金平均粒径为 $1.29\ \text{nm} \pm 0.5\ \text{nm}$.

2.4 $\text{NaBH}_4@\text{AuNPs}-\text{CRL}$ 催化合成阿魏酸甘油酯

经实验验证 $\text{NaBH}_4@\text{AuNPs}-\text{CRL}$ 杂化酶与游离酶的最适温度和 pH 与游离酶相差不大, 因此在游离酶的最佳合成条件下进行在底物摩尔比 (阿魏酸/甘油, mmol/mmol) 为 $1:1$ 、反应时间 $48\ \text{h}$ 、温度 $50\ ^\circ\text{C}$ 、 $\text{NaBH}_4@\text{AuNPs}-\text{CRL}$ 杂化酶的添加量为 $50\ \text{mg}$ 的条件下催化合成阿魏酸单甘油酯, 经过定量计算底物阿魏酸的转化率为 $98.39\% \pm 3.65\%$.

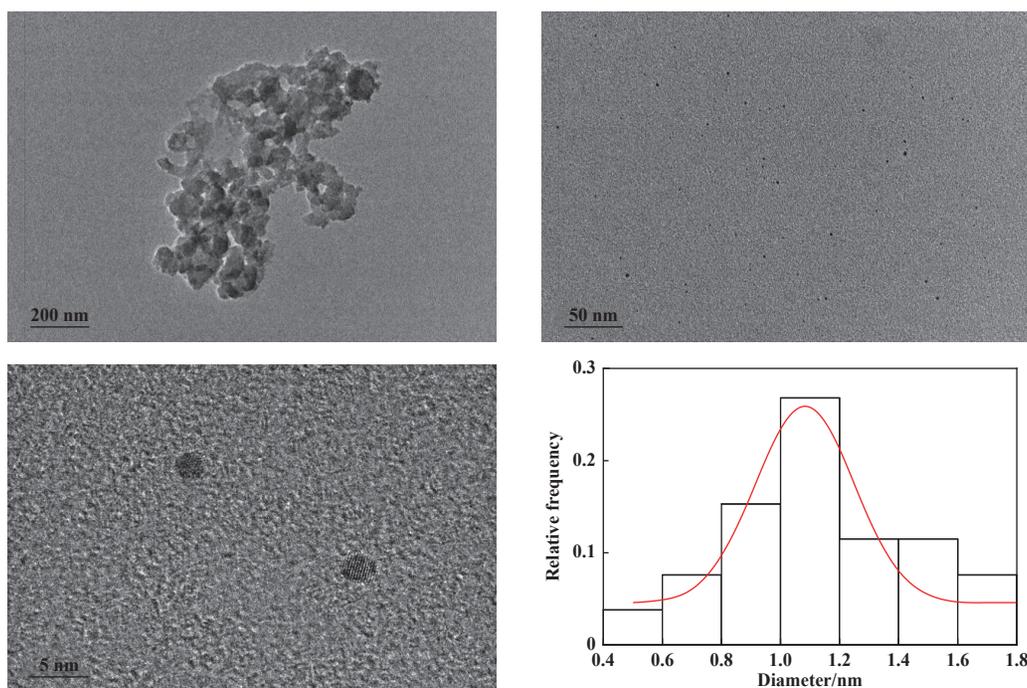
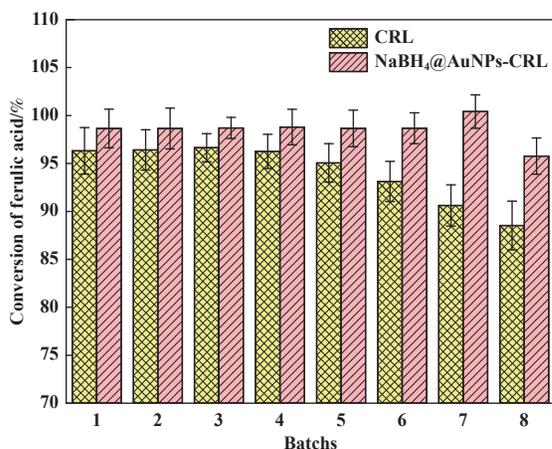
2.5 CRL 酶蛋白杂化效率和和残余活性结果分析

经测定, 上清液的蛋白浓度为 $0.121\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、

体积为 $15.5\ \text{mL}$, 计算可得, 用于杂化的酶的含量占总酶量的 25.02% , 游离酶残余活性为 60% . 分析杂化效率较低的原因可能与杂化方法有关, 杂化过程中为较好的保证杂化酶的活性, 需要严格控制氯金酸和硼氢化钠的添加量以及杂化时间, 因此该条件下不能促使所有游离酶发生杂化反应, 但是剩余的游离酶可继续添加氯金酸和硼氢化钠来进行杂化, 通过反复杂化后杂化效率有显著提升. 杂化效率较低、杂化过程酶活性损失是本方法的弊端, 后续会针对该问题进一步研究.

2.6 杂化酶的重复利用性分析

重复使用稳定性是判断杂化酶性能的一个重要的手段, 因此研究了游离酶与杂化酶的批次反应操作稳定性, 结果如图 8 所示. 与 $\text{NaBH}_4@\text{AuNPs}-\text{CRL}$ 杂化酶相比, 游离酶在使用 4 次后其催化阿魏酸的转化率呈现了下降趋势, 而 $\text{NaBH}_4@\text{AuNPs}-\text{CRL}$ 杂化酶能够重复利用 7 次以上活性都没有明显变化. 在催化阿魏酸和甘油的合成反应应用, 含有多

图 7 $\text{NaBH}_4@AuNPs\text{-CRL}$ 杂化酶的透射电镜图及粒径分布图Fig.7 TEM of $\text{NaBH}_4@AuNPs\text{-CRL}$ hybridase and diagram of particle size distribution图 8 $\text{NaBH}_4@AuNPs\text{-CRL}$ 杂化酶的批式反应操作稳定性Fig.8 The operational stability of the batch reaction of $\text{NaBH}_4@AuNPs\text{-CRL}$ hybridases

羟基的甘油和极性的反应体系在一定程度上抑制酶的催化活性,使脂肪酶活性下降,重复使用 8 次后酶活性下降为原来的 55%。而 NaBH_4 原位还原产生的小粒径纳米金通过金硫键、离子键和吸附作用与脂肪酶紧密结合,通过对蛋白质二级结构的微调提高酶蛋白催化的活性与稳定性。重复使用 8 次后,转化率下降为原来的 89%,证明 $\text{NaBH}_4@AuNPs\text{-CRL}$ 杂化酶表现出了良好的操作稳定性,并且易于重复利用。

3 结论

我们以 NaBH_4 作为还原剂,原位还原氯金酸成功合成了 $\text{NaBH}_4@AuNPs\text{-CRL}$ 杂化酶,以杂化酶的比活性为指标对杂化条件进行优化,得到了最佳杂化条件:向 10 mL $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CRL 酶液中添加 4 mL 浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HAuCl_4 溶液和 3 mL 浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaBH_4 溶液,混匀后置于 35°C 的摇床中杂化 24 h。利用 XPS、TEM、红外、荧光等手段对杂化酶结构进行了表征,证明杂化酶中有纳米金生成,杂化过程使酶蛋白的二级结构发生了改变, α -螺旋减小, β -折叠结构增加,酶蛋白结构向刚性转变。在最佳条件下利用杂化酶进行阿魏酸甘油酯的合成反应,得到阿魏酸的转化率为 $98.39\% \pm 3.65\%$ 。批式反应的操作稳定性试验显示,重复使用 8 次后 $\text{NaBH}_4@AuNPs\text{-CRL}$ 杂化酶活性保留了原来的 89%。杂化后酶的活性、稳定性皆有所提高,为纳米金杂化酶催化阿魏酸酯提供了一种新思路。

参考文献:

- [1] Ou S Y, Kwok K C. Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods[J]. *J Sci Food Agric*, 2004, 84(11): 1261–1269.
- [2] Zdunska K, Dana A, Kolodziejczak A, et al. Antioxi-

- dant properties of ferulic acid and its possible application[J]. *Skin Pharmacol Phys*, 2018, **31**(6): 332–336.
- [3] Li D, Rui Y X, Guo S D, *et al.* Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives[J]. *Life Sci*, 2021, **284**: 119921.
- [4] Xu Z, Wang T, Zhang S. Extracellular secretion of feruloyl esterase derived from *Lactobacillus crispatus* in *Escherichia coli* and its application for ferulic acid production[J]. *Bioresource Technol*, 2019, **288**: 121526.
- [5] Boz H. Ferulic acid in cereals—a review[J]. *Czech J Food Sci*, 2015, **33**(1): 1–7.
- [6] a. Chigorimbo-Murefu N T, Riva S, Burton S G. Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2009, **56**(4): 277–282.
b. Li Huan-huan (李欢欢), Duan Pei-gao (段培高), Huang Ya-wen (黄雅文), *et al.* One pot photoenzymatic cascades to synthesize chiral aliphatic amines (光酶级联—锅法合成手性脂肪胺)[J]. *J Mol Catal (China)*(分子催化), 2023, **37**(4): 323–330.
c. Dai Da-zhang (戴大章), Jiang Wen-ting (姜文婷), Xu Lu-yang (许鹿洋). Resolution of (*R,S*)-3-chloro-1-phenylpropanol by mesoporous molecular sieve SBA-15 immobilized lipase in solvent-free system(无溶剂体系介孔分子筛 SBA-15 固定化脂肪酶拆分 (*R,S*)-3-氯-1-苯基丙醇)[J]. *J Mol Catal (China)*(分子催化), 2023, **37**(4): 342–347.
- [7] a. Suárez-Escobedo L, Gotor-Fernández V. Solvent role in the lipase-catalysed esterification of cinnamic acid and derivatives. Optimisation of the biotransformation conditions[J]. *Tetrahedron*, 2021, **81**: 131873.
b. Yin Yi (尹一), Sun Li-rui (孙立瑞), Fang Qi-li (方祁利), *et al.* Optimization of microwave enhanced gold nanoparticles-crl hybridase (AuNPs-CRL) catalyzed synthesis of phytosterol esters (微波强化纳米金杂化 CRL 脂肪酶催化甾醇油酸酯的合成)[J]. *J Mol Catal (China)*(分子催化), 2022, **36**(6): 522–533.
c. Chen Lin-lin (陈林林), Zhang Jia-xin (张佳欣), Li Wei (李伟), *et al.* Preparation and catalytic properties of inorganic hybrid lipase (无机杂化脂肪酶的制备及其催化性能研究)[J]. *J Mol Catal (China)*(分子催化), 2022, **36**(3): 235–244.
- [8] Abdelgawad A, Eid M, Abou-ELMAGD W, *et al.* Lipase catalysed transesterification of palm stearin with ferulic acid in solvent-free media[J]. *Biocatal Biotransfor*, 2022, **40**(5): 378–385.
- [9] Chen L L, Xin J Y. Lipase-catalysed synthesis of feruloyl oleins and evaluation of their radical scavenging activity. Proceedings of the 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Chengdu, PR China, Jun 18–20, 2010[C]. New York: IEEE, 2010.
- [10] Cumming H, Marshall S N. Lipase-catalysed synthesis of mono- and di-acyl esters of glyceryl caffeate in propylene carbonate and their antioxidant properties in tuna oil[J]. *J Biotechnol*, 2021, **325**: 217–225.
- [11] Xu C, Zhang H, Shi J, *et al.* Ultrasound irradiation promoted enzymatic alcoholysis for synthesis of mono-glycerol phenolic acids in a solvent-free system[J]. *Ultrason Sonochem*, 2018, **41**: 120–126.
- [12] Yao N, Sun S. Hydrophilic glyceryl ferulates preparation catalyzed by free lipase b from *Candida antarctica*[J]. *J Oleo Sci*, 2020, **69**(1): 43–53.
- [13] Sun Shang-de (孙尚德). Enzymatic synthesis of feruloyl fatty acyl structural ester(酶法合成阿魏酰基脂肪酰基结构酯的研究)[D]. Wuxi (无锡): Jiangnan University (江南大学), 2009.
- [14] Sun S D, Shan L, Liu Y F, *et al.* Solvent-free enzymatic preparation of feruloylated monoacylglycerols optimized by response surface methodology[J]. *J Agr Food Chem*, 2008, **56**(2): 442–447.
- [15] El-Fakharany E M, Abu-Serie M M, Habashy N H, *et al.* Augmenting apoptosis-mediated anticancer activity of lactoperoxidase and lactoferrin by nanocombination with copper and iron hybrid nanometals[J]. *Sci Rep-Uk*, 2022, **12**(1): 13153.
- [16] Mai H D, Rafiq K, Yoo H. Nano metal - organic framework - derived inorganic hybrid nanomaterials: synthetic strategies and applications[J]. *Chem - Eur J*, 2017, **23**(24): 5631–5651.
- [17] Barros H R D, Santos M C, Barbosa L R, *et al.* Physicochemical study of the interaction between gold nanoparticles and lipase from *Candida sp.* (CALB): Insights into the nano-bio interface[J]. *J Brazil Chem Soc*, 2019, **30**: 2231–2242.
- [18] Hinterwirth H, Lindner W, Lämmerhofer M. Bioconjugation of trypsin onto gold nanoparticles: Effect of surface chemistry on bioactivity[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, **733**: 90–97.
- [19] Algar W R, Jeon T, Massey M, *et al.* Small surface, big effects, and big challenges: Toward understanding enzymatic activity at the inorganic nanoparticle–substrate interface[J]. *Langmuir*, 2018, **35**(22): 7067–7091.

Synthesis of Glycerol Ferulate Catalysed by NaBH₄@AuNPs-CRL Hybridases Prepared by *in situ* Reduction of Sodium Borohydride

YIN Yi¹, SUN Li-rui¹, LIU Qing-yun¹, XIN Jia-ying^{1,2*}

(1. Key Laboratory for Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. State Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: In this work, a method based on the *in situ* reduction of sodium borohydride for the preparation of gold nanobiohybrids for the synthesis of glycerol ferulate was established, which resulted in better activity, stability and structural rigidity of the hybridases. The optimum conditions for the preparation of the NaBH₄@AuNPs-CRL hybridases were obtained by a one-way experiment, and the changes of the lipase before and after hybridisation were explored using fluorescence spectroscopy, infrared spectroscopy, X-ray electron spectroscopy and transmission electron microscopy. It has been shown that the NaBH₄@AuNPs-CRL hybridases have a reduction of α -helix and an increase of β -folding in their secondary structure. The specific activity of the NaBH₄@AuNPs-CRL hybridases was $4.91 \pm 0.12 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, which was 66.44% higher compared to CRL. The conversion of the glycerol ferulate synthesis catalysed by the NaBH₄@AuNPs-CRL hybridases under the optimum conditions was $98.39\% \pm 3.65\%$, and the stability experiments carried out in batch mode showed that both the activity and the stability had been improved.

Key words: lipase; gold nanoparticles; sodium borohydride; hybridases; glyceryl ferulate