

# 硅藻土吸附增强的(RS)-2,4-DP 对映体选择性酶促水解\*

方兆华 刘维屏<sup>†</sup> 周珊珊 文岳中

(浙江大学环境科学研究所, 杭州 310029)

**摘要** 利用手性气相色谱技术研究了硅藻土吸附作用对(RS)-2,4-二氯苯氧丙酸甲酯(2,4-DP)酶促水解对映体选择性的影响。实验结果表明,硅藻土吸附作用显著增强了酶促反应的对映体选择性(ER 值由 1.58 增加到 5.31)。进一步研究表明,硅藻土对脂肪酶的吸附,引起酶构象变化,影响农药底物与酶结合的微环境,是酶促反应的对映体选择性增强的主要原因。吸附在硅藻土上的脂肪酶,与 R-2,4-DP 结合更为困难,反应速率下降;而 S-2,4-DP 接近酶反应中心更加容易,反应速率上升。此外,硅藻土吸附作用对农药底物的束缚引起处于“自由状态”的底物减少,也使酶促反应的对映体选择性略有增强。

**关键词** 对映体选择性; 吸附作用; (RS)-2,4-二氯苯氧丙酸甲酯; 脂肪酶; 硅藻土

**中图分类号** X131.3 **文献标识码** A

手性污染物包括手性农药在环境中存在对映体选择性降解过程业已得到证实<sup>[1]</sup>。众多的研究结果显示<sup>[2]</sup>,在手性污染物的选择性降解过程中,酶促生物降解处于主导地位,而非酶促过程(如光解、水解和挥发等)几乎都没有对映体选择性。

农药在土壤中的吸附、脱附是农药在土壤-水环境中归宿的支配性因素<sup>[3]</sup>。当农药被土壤组分吸附以后,其生物活性和微生物对它的降解能力都会被减弱。对手性农药来说,吸附作用还有可能影响降解时的对映体选择性,从而影响不同对映体在环境中的选择性富集。已发表的文献中,仅有少数不对称有机合成研究方面的文献列举了一些吸附剂或催化剂固定化载体等对手性选择性的影响<sup>[4,5]</sup>。对于手性农药不同对映体进入环境以后,吸附、脱附等非手性因素如何影响其手性环境行为这一领域的研究国内外还未见报道。

土壤酶在土壤物质循环、污染物转化、农药降解等生物化学过程中起着催化和协调作用。手性农药在环境中的对映体选择性降解过程,土壤酶是重要的参与者之一。脂肪酶(lipase EC 3.1.1.3)是土壤水解酶类,主要由植物根系分泌<sup>[6,7]</sup>。从土壤中也选育出了能够分泌脂肪酶的微生物菌种<sup>[8]</sup>。作为合

成洗涤剂的替代品,也有一定的脂肪酶随洗涤废水被排放到环境中。

实验选用了具有代表性的手性污染物苯氧丙酸类除草剂(RS)-2,4-二氯苯氧丙酸甲酯(图 1)为研究对象,通过在脂肪酶促水解(RS)-2,4-DP 的反应体系中添加吸附剂硅藻土的方法,探讨了吸附作用对酶促水解对映体选择性的影响。

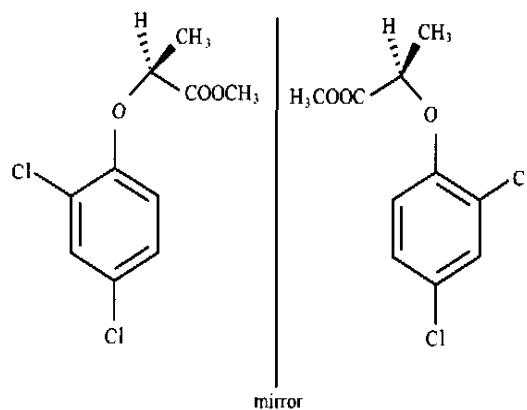


图 1 2,4-二氯苯氧丙酸甲酯(2,4-DP)对映异构体  
Fig. 1 Enantiomers of 2,4-dichloroprop methyl ester

\*国家自然科学基金项目(No. 30270767)和国家杰出青年基金项目(No. 20225721)资助

<sup>†</sup>通讯作者, Tel: 0571-86968420, E-mail: wpliu@mail.hz.zj.cn

作者简介:方兆华(1978~),男,浙江金华人,博士研究生,从事环境生物化学领域的研究

收稿日期:2004-05-25;收到修改稿日期:2004-10-12

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

青霉扩展菌脂肪酶(lipase EC 3.1.1.3,酶活力 10 000 U g<sup>-1</sup>)和牛血清蛋白(BSA)分别购于深圳绿微康生物工程有限公司和 Sigma 公司。(RS)-2,4-二氯苯氧丙酸甲酯(2,4-DP)由本所有机合成室合成,纯度 > 99%,结构经质谱和 NMR 确认,用甲醇配制成 500 mg L<sup>-1</sup>储备溶液,4 ℃ 下保存,使用时用 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 硼砂缓冲溶液即时稀释。硅藻土购于广州市化学试剂玻璃仪器批发部,为 USP 进口分装产品。其他试剂纯度均为分析纯,实验用水为去离子水。

### 1.2 硅藻土对 2,4-DP 的吸附实验

称取 50.0 mg 硅藻土置于 50 ml 具塞锥形瓶中,加入 10 ml 缓冲溶液(0.1 mol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 0.05 mol L<sup>-1</sup> 硼砂等体积混合,再用 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH 调节到脂肪酶最适 pH7.8),分别用移液枪加入 500 mg L<sup>-1</sup> 2,4-DP 的储备液 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.2 ml,使农药初始浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mg L<sup>-1</sup>,密封后在(25.0 ± 0.2) ℃ 下恒温振荡 5 h,此后 12 000 r min<sup>-1</sup>离心 15 min,上层清液过 0.45 μm 水系滤膜,在 HPLC 上分析农药浓度。每一个吸附点均采用 2 个平行及一个空白实验。配制不含硅藻土的 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 mg L<sup>-1</sup> 的 2,4-DP 溶液绘制相应的工作曲线(图略)。

### 1.3 硅藻土对脂肪酶的吸附实验

酶吸附实验采用赵振华等报道的方法<sup>[9]</sup>,并略有改进。称取 50.0 mg 硅藻土粉末置于 50 ml 具塞锥形瓶中,加入 0、2、3、4、5、6、7、8、9 ml 用去离子水配制并已准确测定蛋白质浓度为 100 mg L<sup>-1</sup> 的脂肪酶溶液,再加入去离子水使溶液总体积为 10 ml,室温密封振荡 5 h,12 000 r min<sup>-1</sup>离心 10 min,用 Bradford 法测定上清液中蛋白质的含量。每个吸附点采用两个平行和一个空白实验。各体系中加入蛋白质的总量扣除上清液中的蛋白量,即为硅藻土对酶的吸附量。

酶含量测定采用 Bradford 法<sup>[10]</sup>,以牛血清蛋白为标准蛋白质。

### 1.4 酶促水解实验

于 50 ml 具塞锥形瓶中依次加入 50.0 mg 硅藻土、10 ml pH7.8 缓冲溶液和 0.1 ml 500 mg L<sup>-1</sup> 2,4-DP 的甲醇储备液,混匀后,加入 2.5 mg 脂肪酶干粉,在(25.0 ± 0.2) ℃ 下无光照模式以 100 r min<sup>-1</sup>速度恒温回旋振荡,按 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h

时间,取出 3 个平行样品瓶,将样品转入 250 ml 分液漏斗,加入 10 ml 乙酸乙酯,振荡混合 5 min,连续重复 3 次,合并溶剂提取物,并通过 15 g 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 滤去水分,然后于 40 ℃ 真空旋转蒸发仪上浓缩至接近干。农药残留物用 10 ml 甲醇定容,最后转入 1.5 ml 自动进样瓶供 GC 分析残留农药浓度及 ER 值。酶促水解反应的对映体选择性通过残留农药对映体比例(ER 值)来表征,ER 值根据如下公式计算<sup>[11]</sup>:

$$ER = \frac{R \text{ 异构体峰面积}}{S \text{ 异构体峰面积}}$$

### 1.5 酶促反应的影响因素实验

**1.5.1 硅藻土添加量** 硅藻土添加量为 0、5、10、20、40、80、160 mg 硅藻土,反应时间 5 h,其他反应条件同 1.4 酶促水解实验。

**1.5.2 农药和酶用量** 采用 4 组不同配比的酶促反应体系,如表 1 所示。其他反应条件同 1.4 酶促水解实验。

表 1 农药和酶对脂肪酶促反应的影响实验设置

Table 1 Experimental design for investigating effects of 2,4-DP and lipase on lipase catalyzed reaction

处理编号 Treatment No.	农药 2,4-DP	硅藻土 Kieselguhr	脂肪酶 Lipase
i	0.10 ml	50 mg	2.5 mg
ii	0.10 ml	0 mg	2.5 mg
iii	0.08 ml	0 mg	2.5 mg
iv	0.10 ml	0 mg	3.0 mg

### 1.6 对映体选择性测定实验

GC-2010 气相色谱和电子捕获检测器(ECD)用来进行对映异构体的分析。ECD 温度为 230 ℃,检测器补充气为 N<sub>2</sub>(60 ml min<sup>-1</sup>);进样口温度 200 ℃,进样量 1 μl,分流比为 30;载气(He)流速为 1.2 ml min<sup>-1</sup>。

手性分离柱为 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 的 BCB-172 柱(20% 3-丁基二甲基硅烷基-β-环糊精溶解在 15% 二苯基和 85% 二甲基聚硅氧烷,BCB Analytik,Adliswil,瑞士)。柱温为:140 ℃ 50 min。在上述条件下,(RS)-2,4-DP 的对映异构体得到很好的分离<sup>[12]</sup>(图 5)。

## 2 结果与分析

### 2.1 硅藻土对 2,4-DP 和脂肪酶的吸附

硅藻土对 2,4-DP 的吸附等温线如图 2 所示。

按 Langmuir 吸附等温线拟合可得到 2,4-DP 在硅藻土上的吸附参数  $K_d$  值为 72.52 ( $R^2 = 0.9879$ )。

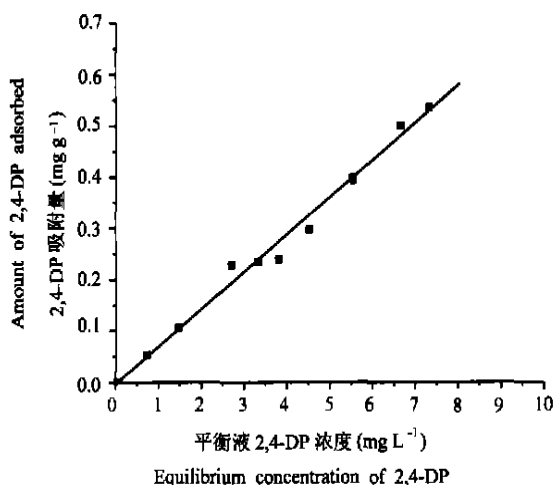


图 2 2,4-DP 在硅藻土上的吸附等温线

Fig. 2 Adsorption isotherm of 2,4-DP on kieselguhr

脂肪酶在硅藻土的吸附等温线如图 3 所示。吸附等温线符合 Langmuir 方程,  $C_m = K * C_s$  ( $K = 0.9815, R^2 = 0.9703$ ), 其中  $C_m$  表示单位重量吸附载体对溶质的吸附量 ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $K$  值是与吸附结合能力有关的常数,  $C_s$  是溶液中溶质的平衡浓度 ( $\text{mg L}^{-1}$ )。

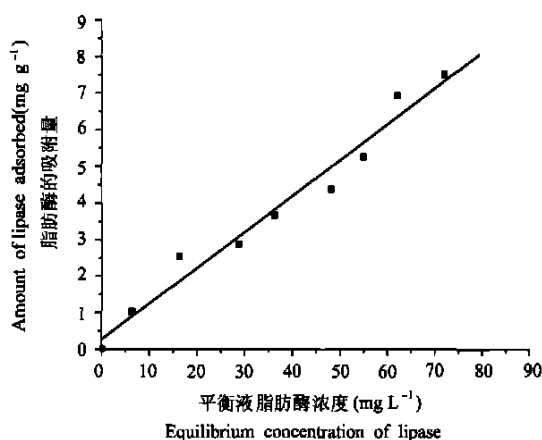


图 3 脂肪酶在硅藻土上的吸附等温线

Fig. 3 Adsorption isotherm of lipase on kieselguhr

## 2.2 (RS)-2,4-DP 对映异构体的分离和测定

在前述色谱条件下, 2,4-DP 两个对映异构体可以得到较好的分离, 如图 4(a) 所示。右侧的峰为 R-2,4-二氯苯氧丙酸甲酯<sup>[12]</sup>。

## 2.3 (RS)-2,4-DP 对映异构体的选择性酶促水解

通过比较在酶促反应体系中添加 50.0mg 硅藻土和无添加剂两种情况下, 反应后残留农药的手性气相色谱图(图 4), 也可以清楚地反映出吸附现象对酶促反应手性选择性的增强作用。

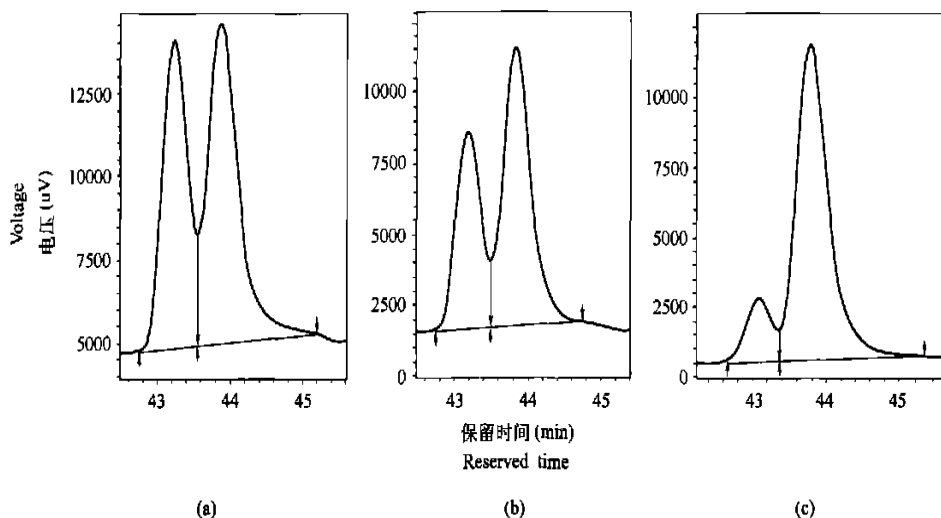


图 4 硅藻土对酶促反应对映体选择性的影响((a) 反应初始,  $ER = 1.15$ ; (b) 无添加剂酶促水解 8 h,  $ER = 1.58$ ; (c) 添加 50.0mg 硅藻土后酶促水解 8 h,  $ER = 5.31$ )

Fig. 4 Effect of kieselguhr on enantioselective factor of enzymatic reaction((a) preliminary,  $ER = 1.15$ ; (b) no additive for 8h,  $ER = 1.58$ ; (c) 50.0mg kieselguhr added for 8h,  $ER = 5.31$ )

酶促反应体系中(RS)-2,4-DP两个异构体残留率随时间变化曲线示于图5。对比硅藻土添加前后异构体残留率变化可知,在酶促反应体系中存在硅藻土时,R-2,4-DP酶促水解速率下降,而S-2,4-DP水解速率上升,从而使ER值从1.58增加到5.31。

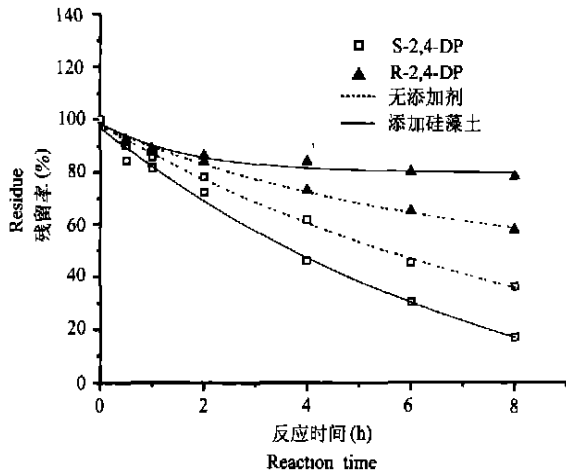


图5 酶促反应中(RS)-2,4-DP残留率

Fig. 5 Residue of (RS)-2,4-DP in enzymatic reaction

当反应时间为5 h,而其他条件相同情况时,不同添加量下硅藻土对酶促反应选择性影响示于图6。添加量对选择性增强影响十分明显,在酶促反应体系中添加少量硅藻土后,ER值迅速增大,随后缓慢上升。

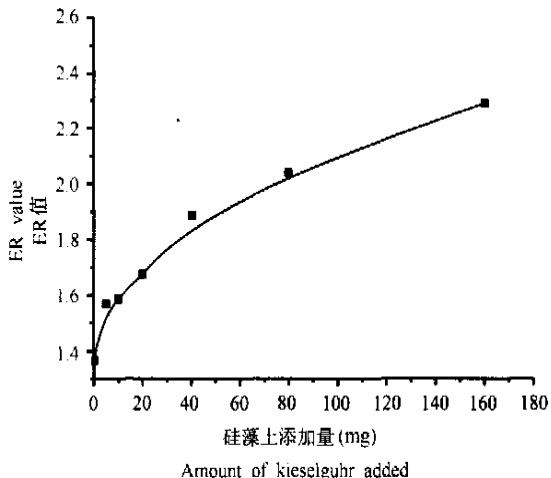


图6 不同添加量下硅藻土对酶促反应对映体选择性的影响

Fig. 6 Effect of addition rate of kieselguhr on enantioselectivity of enzymatic reaction

表2 硅藻土、农药和脂肪酶对酶促反应的影响

Table 2 Effects of kieselguhr, 2,4-DP and lipase on lipase catalyzed reaction

处理编号 Treatment No.	ER 值 ER value
i	5.31
ii	1.58
iii	1.66
iv	1.78

对比表1中反应ii与iii、ii与iv可知,当其他条件相同时,通过减少反应体系中农药浓度,或者增加酶用量均可使反应对映体选择性有所增强,表现为ER值分别从1.58增加到1.66和1.78,但均远小于硅藻土添加后的ER值5.31。从另一个方面证实硅藻土添加后选择性增强,主要原因并非由于脂肪酶活力增强,或是游离农药底物浓度的降低,而是由于吸附作用改变脂肪酶优势构象,使得脂肪酶对两种对映体催化活性的改变存在差异的结果。

### 3 讨论

利用手性气相色谱—ECD可以很好地分离2,4-DP两个对映体,通过色谱分离检测对映体浓度变化,可用于2,4-二氯苯氧丙酸甲酯酶促反应的对映体选择性研究。

在本实验条件下,硅藻土对2,4-DP的吸附等温线按Langmuir方程拟合可得到2,4-DP在硅藻土上的吸附参数 $K_d$ 值为72.52( $R^2 = 0.9879$ )。

脂肪酶在硅藻土的吸附等温线符合Langmuir方程, $C_m = K^* C_s$  ( $K = 0.9815$ ,  $R^2 = 0.9703$ ),其中 $C_m$ 表示单位重量吸附载体对溶质的吸附量( $\text{mg g}^{-1}$ ), $K$ 值是与吸附结合能力有关的常数, $C_s$ 是溶液中溶质的平衡浓度( $\text{mg L}^{-1}$ )。

在2,4-DP脂肪酶促水解反应体系中添加硅藻土吸附剂,通过用气相色谱检测对映体农药残留率变化以及ER值,研究了吸附作用对酶促水解对映体选择性的影响。实验结果表明,硅藻土吸附作用显著增强了酶促反应的对映体选择性(ER值由1.58增加到5.31)。进一步研究表明,硅藻土对脂肪酶的吸附,引起酶构象变化,影响农药底物与酶结合的微环境,是酶促反应的对映体选择性增强的主要原因。吸附在硅藻土上的脂肪酶,与R-2,4-DP结合更为困难,反应速率下降;而S-2,4-DP接近酶催化活

性中心更加容易,反应速率上升。

此外,硅藻土吸附作用对农药底物的束缚引起处于“自由状态”的底物减少,也使酶促反应的对映体选择性有所增强。

## 参考文献

- [ 1 ] Faller J, Hühneduss H, König W A, *et al.* Do marine bacteria degrade  $\alpha$ -Hexachlorocyclohexane stereoselectivity? *Environ. Sci. Technol.*, 1991, 25: 676 ~ 678
- [ 2 ] 马云,刘维屏. 手性污染物环境行为的对映体差异性. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(11): 4 ~ 9. Ma Y, Liu W P. The enantio-difference of environmental behavior of chiral contaminants (In Chinese). *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2002, 3(11): 4 ~ 9
- [ 3 ] 刘维屏,季瑾. 吸附、脱附—农药在土壤—水环境中归宿的主要支配因素. 中国环境科学, 1996, 16(1): 25 ~ 30. Liu W P, Ji J. One of the most important factors affecting the fate of pesticide in soil-water environmental: Sorption and desorption (In Chinese). *China Environmental Science*, 1996, 16(1): 25 ~ 30
- [ 4 ] Palomo J M, Fernández L G, Mateo C, *et al.* Enzymatic resolution of ( $\pm$ )-trans-4-(4-fluorophenyl)-6-oxo-piperidin-3-ethyl carboxylate, an intermediate in the synthesis of (-)-Paroxetine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, 13(21): 2 375 ~ 2 381
- [ 5 ] Pregolato M, Terreni M, Fuentes I E, *et al.* Enantioselective enzymatic hydrolysis of racemic glycidyl esters by using immobilized porcine pancreas lipase with improved catalytic properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 11(4/6): 757 ~ 763
- [ 6 ] 关松荫等编著. 土壤酶及其研究法. 北京:农业出版社, 1986. Guan S Y *et al.*, eds. *Soil Enzymes and Its Research Methods* (In Chinese). Beijing: Agricultural Press, 1986
- [ 7 ] Gramss G, Voigt KD, Kirsche B. Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere*, 1999, 39(7): 1 481 ~ 1 494
- [ 8 ] Karl E J, Stephane R, Bauke W D, *et al.* Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 15: 29 ~ 63
- [ 9 ] 赵振华,黄巧云,李学垣,等. 低分子量有机酸对胶体矿物吸附酸性磷酸酶和牛血清白蛋白的影响 I. 乙酸的影响. 土壤学报, 2003, 40(2): 224 ~ 231. Zhao Z H, Huang Q Y, Li X Y, *et al.* Effects of low-molecular organic acids on adsorption of acid phosphatase and BSA by soil colloid and clay minerals I. Effects of acetic acid (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(2): 224 ~ 231
- [ 10 ] Brandford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248 ~ 254
- [ 11 ] Henk J G, Peter G W, Jacob B, *et al.* Enantiomer fractions instead of enantiomer ratios. *Chemosphere*, 2000, 41: 725 ~ 727
- [ 12 ] 文岳中,蔡喜云,马云等. 衍生化-手性毛细管色谱分离和测定水中的 2,4-滴丙酸. 分析化学, 2004, 32(11): 1 492 ~ 1 494. Wen Y Z, Cai X Y, Ma Y, *et al.* Enantioseparation and determination of dichlorprop in water by derivatization-chiral gas chromatography (In Chinese). *Anal. Chemistry*, 2004, 32(11): 1 492 ~ 1 494

## ENHANCED ENANTIOSELECTIVE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF (RS)-2,4-DP INDUCED BY ADSORPTION ON KIESEL GUHR

Fang Zhaohua Liu Weiping<sup>†</sup> Zhou Shanshan Wen Yuezhong

(*Institute of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

**Abstract** Effect of kieselguhr on enantioselectivity of enzymatic hydrolysis of chiral dichlorprop methyl ester (2,4-DP) has been specifically studied by chiral gas chromatography. The results show that the adsorption of lipase on kieselguhr greatly enhanced enantioselectivity of hydrolysis of 2,4-DP with ER increasing from 1.58 to 5.31. It triggered changes in conformation of the enzyme, thus affecting the microenvironment of active sites, which may be the major reason of enhanced enantioselectivity of enzymatic reaction. Due to adsorption on kieselguhr, lipase became harder to combine with R-2,4-DP and the reaction rate of hydrolysis decreased. On the other hand, it was easier for S-2,4-DP to get close to the active sites of lipase, so the rate increased. In addition, adsorption of the pesticide on kieselguhr decreased “free pesticides”, which also enhanced the enantioselectivity of hydrolysis of 2,4-DP.

**Key words** Enantioselectivity; (RS)-2,4-DP; Adsorption; Kieselguhr; Lipase