2011年 第41卷 第5期:763~772

SCIENTIA SINICA Chimica

评 述

www.scichina.com chem.scichina.com



表面活性剂在逆胶束酶反应系统中的作用机制

梁运姗, 袁兴中*, 曾光明, 钟华, 李辉, 王伟伟

环境生物与控制教育部重点实验室(湖南大学);湖南大学环境科学与工程学院,长沙 410082 *通讯作者, E-mail: yxz@hnu.cn

收稿日期: 2010-07-02; 接受日期: 2010-09-06 doi: 10.1007/s11426-011-4266-2

摘要 随着胶体界面科学与酶技术的发展, 逆胶束酶反应系统作为酶等生物分子的高效分离或催化转化的介质体系, 为分子生物技术的发展带来了新的机遇. 表面活性剂分子特有的两亲性结构, 能使微水相以纳米尺寸的水滴形式稳定在非极性有机溶剂中, 为酶的活性保持提供了典型的类生物膜微环境. 本文对逆胶束酶反应系统原理做简要介绍, 并解析表面活性剂的浓度变化及其构型差异在逆胶束酶反应系统中的作用机制, 综述近年来表面活性剂在逆胶束酶领域应用的最新成果, 同时探讨了新型功能性表面活性剂在胶束酶学中的应用前景和研究趋势.

关键词 逆胶束 酶 表面活性剂浓度 表面活性剂分子结构 逆胶束酶反应系统

1 引言

逆胶束酶反应系统是胶体界面化学与生物技术 交叉领域的研究内容. 逆胶束(又称"反胶束"或"反胶 团"),是表面活性剂两性分子在非极性有机溶剂中超 过其临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)时自发形成的聚集体.其中,表面活性剂疏水的 非极性尾部指向有机溶剂, 亲水的极性头部指向聚集 体内部,形成一个纳米级大小的极性核(polar core), 水分子插入核内, 酶分子溶于逆胶束中, 组成逆胶束 酶反应系统^[1~3]. Hoar 和 Schulman^[4]最早报道逆胶束 的存在,他们将其命名为"oleopathic hydromicelle". Hanahan^[5]和 Misiorowski^[6]等人曾发现一些具有分解 脂肪能力的酶类可以在逆胶束体系中保持较高的活 性和稳定性,甚至表现出"超活性(Superactivity)". 1977年, Luisi和他的合作者们^[7]发现α-胰凝乳蛋白酶 (alpha-chymotrypsin)可以溶解于含有表面活性剂的 有机溶剂中,并首次提出利用逆胶束法萃取蛋白质 的观点. 而 Martinek 等^[8]则率先对酶分子在逆胶束溶 液中的催化活性行为开展系统的研究,并首次解析 了过氧化物酶和胰凝乳蛋白酶在表面活性剂丁二酸 二辛酯磺酸钠(AOT)逆胶束体系中的催化活性特征, 发表了关于逆胶束酶催化反应的首篇正式研究报道, 由此开创了以逆胶束酶反应系统为核心的"胶束酶学 (micellar enzymology)"研究领域.

逆胶束介质在宏观上为均一透明的热力学稳定 体系,在微观上则可视为由高度分散的单个逆胶束 聚集体构成的非均一溶液,可以为反应提供受纳米 尺度调制的介观环境,因而被视为纳米反应器的一 种类型.近年来,随着纳米科学与技术的迅速发展, 逆胶束作为纳米反应器的优点也不断凸现^[9, 10].在逆 胶束酶反应系统中,水相以纳米尺寸的水滴形式分 布在油相中,并依靠聚集在油水界面处的表面活性 剂起到稳定作用,与油相形成了彼此分离的微区,该 体系中的纳米水核与细胞生物膜中的微水相相似, 因此,这一反应体系能够模拟生物细胞内的微环 境^[11],促使酶等生物分子在其中呈现出"超级活性", 从而解决了现代酶技术中广泛探索的"如何极大限度 地使酶在细胞外长期保持活性"的难题^[12, 13],为酶高 效催化以及酶的纯化技术等带来了新的机遇.最近, Das 等^[14]研究了在阳离子表面活性剂逆胶束系统中, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)和大豆 过氧化物酶(soybean peroxidase, SBP)与单壁碳纳米 管(single-walled carbon nanotubes, SWNTs)杂交所表 现出的超活性,并指出两种酶由于在 SWNTs 上发生 疏水性吸附而导致了明显的酶二级结构缺失,但活 性却比未提供逆胶束环境的水相体系中的酶活高约 7~9 倍,并达到其在水-有机溶剂两相混合体系中活 性的 1500~3500 倍.这实现了功能性纳米材料与生物 活性分子的高效组合,同时也展现出逆胶束介质体 系对于极大限度地发挥酶活性的巨大潜力.

表面活性剂作为逆胶束酶系统的组成要素之一, 一方面促成了逆胶束的特殊结构;另一方面,也在逆 胶束酶反应系统中发挥着至关重要的作用.目前,对 于逆胶束酶反应系统中表面活性剂的作用机制在国 内尚未有深入报道,国外也处于探索性研究阶段.本 文依据近年来相关领域研究所取得的最新进展,从 浓度变化和构型差异的角度概述表面活性剂在逆胶 束酶反应系统中的作用机制,拟为实际操作中表面 活性剂的定量优化和定性选择提供系统的理论指导, 同时对今后的研究趋势和重点进行展望.

2 逆胶束酶反应系统原理

逆胶束酶反应系统具有热力学动态平衡性. 酶 分子在逆胶束系统中所处的位点取决于酶自身的亲 水/疏水性,如图 1 所示. 亲水酶(如胰凝乳蛋白酶 chymotrypsin)会溶入逆胶束的核心水团中,不与有 机溶剂直接接触;表面活性酶(如脂肪酶 lipase)会紧 附于逆胶束的内表层;而疏水酶(如黄嘌呤氧化酶 xanthine oxidase,腺苷三磷酸酶 atpases,一氧化碳 脱氢酶 CO dehydrogenase 和碱性磷酸酶 alkaline



图 1 逆胶束酶系统示意图. E₁为亲水酶; E₂为表面活性酶; E₃为疏水酶^[11, 15]

phosphatase 等)则位于表面活性剂的疏水尾基区域. 酶分子的溶入过程是自发进行的.可将固态的酶加 入到含水的逆胶束溶液中,或将较高浓度的含酶水 溶液注入到含表面活性剂的有机溶剂中去,通过振 荡或搅拌使之最终形成稳定的热力学平衡体系^[11, 15].

由于表面活性剂胶团的屏蔽作用,溶于逆胶束 中的酶不与有机溶剂直接接触,因而可以有效保持 酶的活性,从而实现逆胶束介质中酶的催化转化过 程,或在逆胶束体系中实现酶的分离与纯化^[2,3].

对于酶催化反应而言,亲水性的底物可渗透到 逆胶束的纳米水核中与酶结合,而亲脂性底物则能 大量溶于有机溶剂中或附着于表面活性剂膜上,通 过传质作用与酶分子接触并发生反应.与水相介质 中的酶催化反应相比,许多水不溶性底物由于在逆 胶束聚集体附近和酶分子附近浓度的增加,从而促 使酶催化反应速度加快^[16].

而在逆胶束系统中进行酶的分离纯化则是实现 了液-液萃取技术的突破.其分离纯化原理如图 2 所



图 2 逆胶束法纯化酶的流程示意图

示. 逆胶束选择性分离目标蛋白质包括萃取 (forward extraction)和反萃取 (backward extraction)两个过程. 萃取过程是目标蛋白质从主体溶液转移至逆胶束溶 液中;反萃取过程为目标蛋白质从逆胶束溶液中转 移至第二水相(或以固体的形式游离出来). 近年来, 逆胶束纯化技术在药学、食品工程和生物工程等领域 的应用备受关注,成为生化产品分离纯化研究的一 个新的热点. 与传统的生物活性蛋白质分离纯化方 法相比,逆胶束纯化具有分离步骤少、操作简易、成 本较低、选择性高和不易引起酶蛋白失活变性等诸多 优势^[3, 17-22].

逆胶束酶反应系统具有两大优势特征^[11]:其一, 逆胶束酶反应系统为非均相微系统,这一结构本身 意味着亲水性和疏水性的反应底物均可溶入其中. 换言之,逆胶束酶反应系统提供了酶和底物(包括亲 水性、亲脂性和两亲性的底物)接触的条件.其二,逆 胶束系统具有严格的"超微区域化作用 (nanocompartmentalization)",其亚结构具有可控性.具体而言,在 逆胶束酶系统中,由于表面活性剂分子形成反相微 胶层,使微水相与有机溶剂分隔开,产生面积相当大 的界面,形成特殊的界面隔离效应.而系统中的微胶 层与核心水团均具有可调节性,通过控制系统中各 参数的特征,可以对其亚结构进行调控,从而优化酶 在其中的行为和性质.

3 表面活性剂浓度对逆胶束酶反应系统的 作用

在逆胶束酶反应系统中,通过改变表面活性剂 的浓度,可实现对逆胶束微聚体物理化学性质的调 控,改变逆胶束体系中酶的溶入量及其活性.对于酶 催化反应而言,表面活性剂浓度的变化还会影响到 催化反应底物的分配行为,从而导致酶催化反应动 力学行为的改变.

3.1 表面活性剂浓度对逆胶束微聚体大小、形状及 微属性的调控

逆胶束微聚体的大小取决于增溶水量的多少和 表面活性剂的浓度^[11].因此,通常以水和表面活性剂 浓度的摩尔比值 W₀来衡量逆胶束微聚体的大小特征. 当增溶水量与表面活性剂的浓度比例保持一定时, W₀ 值不变,逆胶束微聚体的大小不变,如图 3B.在



图 3 表面活性剂和水浓度对逆胶束微聚体大小的作用[11]

系统增溶水量不变的情况下,表面活性剂浓度的增 大将导致逆胶束微聚体变小(图 3C).相反,当表面活 性剂浓度一定时,增加水的含量将导致逆胶束微聚 体增大(图 3A).

逆胶束不是刚性球体, 而是热力学稳定的聚集 体. 在表面活性剂浓度不同的情况下, 由于水、表面 活性剂和有机溶剂三者浓度比例的不同, 逆胶束的 形状一般会在球形、近似球形或柱状结构之间变化. 逆胶束纳米水核中的"水"据其分配位点和物理性质 的不同,可划分为自由水和与表面活性剂结合水两 部分. 在水核的中心区, 与表面活性剂分子距离相对 较远的水可称为自由水,反之,紧密绑定在表面活性 剂分子层上的水则为结合水.结合水与自由水的物 理性质存在差异,因而逆胶束系统具有非水相流体 的性质. 当表面活性剂浓度很小时, 逆胶束聚集体数 量较少,系统中的水趋向于普通水性质,溶入其中的 酶活性相对较低;而当表面活性剂浓度过大时,则可 能因表面活性剂聚合而引起酶失活现象[23].因此,控 制表面活性剂的浓度,使逆胶束微聚体浓度处于适 量的范围,是优化逆胶束微属性的重要因素之一.

但已有的研究发现,在一定的浓度数量级范围 内,表面活性剂浓度的改变,通常只会导致逆胶束聚 集体数量的变化,而不易引起逆胶束大小、形状和性 质的改变^[15].严格的数值分界区间目前尚未见有具 体的报道.且由于不同表面活性剂本身性质不同,其 浓度变化所引起的逆胶束特性变化机制仍有待进一 步的研究.

3.2 表面活性剂浓度对酶的作用

表面活性剂的浓度可以影响到逆胶束系统中酶

765

的溶入量及其催化活性.有机相中表面活性剂浓度 增大,逆胶束聚集体数量增加,可以为酶分子提供更 大的聚集空间,从而有利于酶的溶入.但是,表面活 性剂浓度的增加,并不一定伴随着酶溶入量的同步 增加.Liu 等人^[21]在采用逆胶束法提取纳豆激酶 (nattokinase)的研究中发现,表面活性剂 AOT 浓度由 50 增加至 200 mM,酶蛋白萃取率及其活性的回收率 并无显著的提高.本课题组^[24]在研究逆胶束体系中 羧甲基纤维素的酶解特性时,发现相同底物浓度和 反应条件下,表面活性剂浓度在 1 倍 CMC 浓度时可 获得相对较高的酶解效率.

依据酶与表面活性剂是否发生相互作用, Martinek 等^[11]将酶分为两类: 第一类为活性与表面 活性剂无关的酶,如α-胰凝乳蛋白酶(alphachymotrypsin)、胰蛋白酶(trypsin)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 和脂肪氧化酶(lipoxygenase). 第二类酶如过氧化物酶(peroxidase)、酸性磷酸酶(acid phosphatase)、漆酶 (laccase) 和前列腺素合成酶 (prostaglandin synthetase), 在逆胶束系统中的活性则 强烈依赖于表面活性剂的浓度. 原因是第二类酶的 分子中各自存在不同类型的锚定基团,具有疏水性 作用. 表面活性剂分子可以和酶分子的疏水性锚定 基团结合, 当表面活性剂浓度改变时, 酶的活性也发 生变化^[25]. Kabanov 等^[26]用天然的α-胰凝乳蛋白酶和 经过硬脂酰共价改性的α-胰凝乳蛋白酶做了比较试 验,发现在 AOT-辛烷逆胶束体系中,在固定的 W₀条 件下, 天然的α-胰凝乳蛋白酶活性不受表面活性剂 浓度变化的影响;而具有疏水性的改性α-胰凝乳蛋 白酶的活性则明显与表面活性剂浓度有关,其催化 反应速率常数Kcat随表面活性剂浓度的增大而显著减 小. 表面活性剂浓度的改变对酶在逆胶束中的分配 行为和性质的影响较为复杂,至今仍缺乏深入的研 究.

3.3 表面活性剂浓度对催化底物分配行为的作用

在逆胶束酶催化反应系统中,酶活性受表面活 性剂浓度影响的另一重要原因是由于底物分配行为 的改变^[15].因为在逆胶束酶反应系统中,决定酶催化 活性大小的是能与酶分子接触的、能维持酶催化反应 的底物量.底物在逆胶束层和有机相之间分配时,其 分配行为将随着表面活性剂浓度的改变而不同.逆 胶束酶催化动力学的拟相模型^[16]认为,部分底物由 于与表面活性剂发生静电吸引或疏水性亲合而分布 于微胶层中,即与逆胶束系统中的表面活性剂"膜" 紧密结合.表面活性剂浓度的增加,对底物与酶的接 触造成一定程度上的抑制,从而使得催化反应速率 常数 *K*_{cat}值略有减小^[27].

此外,一些底物特异性研究的结果发现,在逆胶 束酶反应系统中,与疏水性底物相比,亲水性的底物 受表面活性剂浓度的影响相对较小.这可能与分子 运动特征有关.碰撞理论从另一角度给出了一些相 关的解释,认为逆胶束体系处于不停的运动状态,逆 胶束微粒之间的碰撞频率达到每秒 10⁹~10¹¹次.并 且,逆胶束微粒中的增溶物在频繁地进行交换.亲水 性底物分子的交换速率为每秒 10⁶~10⁸ mol,即每 1000~10000 次碰撞能引起一次增溶物的交换.而疏 水性底物分子的交换速率则更大^[28].表面活性剂浓 度的增加,促使逆胶束微粒数量增加,微粒之间的相 互碰撞增强,从而加速了体系中分子扩散与交换的 过程^[3, 29].这一机理解释了在一些逆胶束酶系统中催 化反应速率随表面活性剂浓度增加而增大的现象.

4 表面活性剂分子结构对逆胶束酶反应系 统的影响

表面活性剂的尾基是由疏水的碳氢链组成的非 极性基团,头基为亲水的极性基团.不同表面活性剂 的分子结构差异决定了它们的性质、功能有所不同. 核磁共振波谱(¹H NMR)分析表明了胶束酶系统中大 量的反应发生在胶束表面,因此微胶层表面的电性 质和结构特点对化学反应有显著影响.

4.1 静电作用

表面活性剂亲水性头基的电荷由阴阳离子表面 活性剂类型决定.

研究人员在脂肪酶(lipase)和α-胰凝乳蛋白酶 (alpha-chymotrypsin)的逆胶束催化水解反应方面做 了大量的实验.结果发现,同等条件下,在AOT逆胶 束中的水解反应速率远远高于在其余阳离子、非离子 或两性离子表面活性剂逆胶束系统中的反应速率. Bommarius等^[30]在黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)催 化氧化羟基苯甲醛试验中,将水溶液体系和不同电 性离子表面活性剂(包括阴离子型 AOT,阳离子型 DTAB 和非离子型 Triton-X100 逆胶束体系中的反应 进行比较. 结果表明, 不同反应体系中的催化反应效 率不同, 其中, 间位和对位羟基苯甲醛催化在其中三 种体系中的反应效率从高到低排序为: DTAB> Triton-X 100>水. Kuwahara 等^[31]研究了己糖激酶 (hexokinase, HK)在阴离子表面活性剂 AOT、阳离子 表面活性剂 HTAC 和非离子表面活性剂 C₁₂E₈ 逆胶束 体系中的催化反应, 结果显示在 HTAC 体系中的催 化活性比 AOT 体系中高 2~3 倍, 而在 C₁₂E₈ 逆胶束体 系中的 HK 反应活性则远远高于在其余体系中的活 性. 由此认为 AOT 和 HTAC 逆胶束中的高电荷内表 面层对 HK 的催化活性产生抑制.

在阳离子表面活性剂逆胶束中添加非离子表面 活性剂,可以实现对反应界面的改性.非离子表面活 性剂与阳离子表面活性剂的协同作用,可以降低界 面上的正电荷密度,从而减少阳离子在界面上对酶 的活性位点所产生的抑制,使酶在其活性位点上占 据的空间自由度相对更大,酶的活性也更强,其机理 如图 4 所示. Shome 等^[32]以黏稠色杆菌的脂肪酶 (*Chromobacterium viscosum* lipase, CV-lipase)为测试 物,在溴代十六烷基三甲铵(CTAB)-水-异辛烷-正己 醇逆胶束体系中,分别加入不同非离子表面活性剂 (Brij-30, Brij-92, Tween-20, and Tween-80),考察在不 同的助表面活性剂与表面活性剂的摩尔比(z)值、pH 为 6、温度为 25 ℃及不同 W_0 值的情况下,以对硝基 苯基辛酸酯(*p*-nitrophenyl-*n*-octanoate)为底物的酶催 化反应. 发现脂肪酶在添加了非离子表面活性剂的 混合逆胶束体系中,活性几乎可以增强到其在单一 表面活性剂 CTAB 逆胶束体系中的 200%. 有趣的是, 该酶活性甚至超过了其在 AOT 逆胶束中的活性值. 并且,在以辣根过氧化物酶(HRP)为测试物的试验中, 也得到相似的结果.

反应底物在逆胶束静电场中的迁移趋向取决于 胶束层表面电势的(正负)符号. Ermakova 等^[33]采用 Brownian 动力学模拟分析了逆胶束的静电场对酶-底 物复合物(encounter complex, EC)形成的对抗性作用, 并指出静电场影响着专一性底物向酶的活性位点迁 移的趋势, 胶束的负电势促使 EC 形成机率的增加, 而正电势的作用则相反.

4.2 头基的亲水性作用

表面活性剂头基的亲水性程度是关系到逆胶束 内表面层水分子含量高低的重要因素,而逆胶束界 面上的水分子浓度对酶的活性有着重要的维系作用. 对于阳离子表面活性剂逆胶束体系而言,仅仅 W₀的 改变并不能促使逆胶束界面上水分子的增加,因而 很难依靠 W₀来调节酶的活性,这也是常规阳离子表 面活性剂逆胶束系统中酶的活性较低的原因之一. 但是,在表面活性剂 CTAB 的极性头基中引入羟乙 基基团之后,却能使逆胶束体系中脂肪酶的催化活 性明显增强,甚至达到了其在 AOT 逆胶束体系中的



图 4 非离子表面活性剂对阳离子逆胶束系统中酶活增强作用的示意图^[32]

催化效率^[34, 35]. 究其原因, 羟基基团的引入, 使得通 过氢键结合作用形成的水分子数目增加, 从而导致 反应界面上水含量的增加. 此外, 我们在前期研究中 证实表面活性剂亲水基结构的不同, 会引起与其相 吸附的细胞表面亲水疏水性的改变^[36-38]. 因而可以 推测, 表面活性剂的亲水性头基与酶分子表面化学 基团之间可能存在的相互作用极为重要.

4.3 头基的体积大小和柔韧性作用

表面活性剂亲水性头基体积的增加,可以促进 逆胶束系统微胶层上酶与底物的聚集, 使酶与底物 的接触空间增大. Das 等^[35]在研究阳离子逆胶束中脂 肪酶的活性时,将表面活性剂 CTAB 中的"三甲基 (three methyl groups)"结构分别用羟乙基(hydroxyethyl, 系列 I)、甲氧乙基(methoxyethyl, 系列 II)和正丙基 (n-propyl, 系列III)进行取代, 三种取代系列中表面 活性剂头基的亲水性依次降低. 但结果显示, 系列Ⅱ 中脂肪酶的活性显著高于其在系列 I 中的活性.并 且,系列Ⅰ和系列Ⅲ中酶活几近相同,尽管这两个系 列中表面活性剂头基的亲水性有显著差异. 研究显 示,系列Ⅰ和系列Ⅲ中表面活性剂单分子头基体积 大小接近,而系列II中表面活性剂单分子头基体积 则显著大于其余两个系列.因此,表面活性剂头基的 体积大小是决定逆胶束中酶活性的重要因素,其重 要性超过头基的亲水性作用. Dasgupta 等^[39]也证实了 表面活性剂头基的增大为逆胶束体系的反应提供了 更为有效的活性空间,这比逆胶束界面上的水浓度 的影响更为重要.

事实上,在 2003 年 Das 等^[34]的研究中,羟乙基 基团的引入不仅仅是使得界面上亲水性的增强,而 且使得表面活性剂分子的易曲变性发生了变化(弯曲 系数增大).若在表面活性剂分子头基刚性(rigidity) 不变的情况下,单纯引入羟基基团,逆胶束中的酶活 活性基本不变.因为在刚性的极性头基结构中,虽然 亲水性得到增强,却不能使头基表面积增大;相反, 若无羟基基团的增加,但改变表面活性剂分子弯曲 构象,随头基柔韧性的增强,逆胶束中的酶活也有所 提高^[40].因此,在表面活性剂分子的柔韧性发生了变 化(弯曲系数增大)的同时,可能导致了头基的大小增 加,从而导致反应界面上的面积增大,有利于酶活的 保持.

4.4 头基的不饱和基团作用

表面活性剂极性头基中不饱和基团的引入,会导致酶分子结构中α-螺旋(α-helix)含量的下降,使酶的活性降低.在圆二色谱分析中可表现为酶在远紫外区中的椭圆率随着界面上不饱和度的增加而增大. Debnath等^[41]首次考察了表面活性剂分子头基的不饱和度对逆胶束酶活性的作用.该研究以两种酶(脂肪酶 CV-lipase 和辣根过氧化物酶 HRP)作为受试物,并分别比较了脂肪族与芳香族不饱和取代基型的作用差异.研究发现,在构成逆胶束体系的表面活性剂头基结构中,无论是脂肪族基型还是芳香族基型,不饱和基团的引入均可导致酶在逆胶束界面上的活性行为受到抑制,且随着不饱和度的增加,酶活性降低. 重要的是,与头基体积大小作用相比,不饱和度的抑制性影响更大.

4.5 疏水尾基的长度作用

许多单链型表面活性剂在溶液中的性质与其碳 原子数成线性相关.研究人员^[42]发现,在相同的表面 活性剂头基结构条件下,逆胶束系统中的酶活随着 表面活性剂烷基链长度的增加而显著提高.这可能 因为表面活性剂疏水链长度的增加,导致逆胶束系 统的微胶层界面也随之扩增,从而使反应界面上酶 与底物浓度的增加,与表面活性剂头基增大的作用 相似.但是,酶催化动力学参数显示,表面活性剂烷 基链长度的增加并不能绝对地促使催化反应速率提 高.因此,酶与底物的分配行为受到影响只是其中一 个原因.至于表面活性剂疏水尾基长度的增大,是否 因碳链的折叠而引起逆胶束酶系统反应界面区域的 扩增,并从而导致该界面上底物与酶浓度增加,继而 改变酶分子在界面层上的二级结构,仍有待更进一 步的考证.

5 新型功能性表面活性剂的开发及其在胶 束酶学中的研究趋势和应用前景

目前用于构建逆胶束体系的表面活性剂基本上仍局限于化学表面活性剂.常用的有 AOT、CTAB、氯化三辛基甲铵(trioctylmethylammonium chloride, TCMAC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PTEA)以及磷脂酸(phosphatidic acid, PTA)等,其中

AOT 最为常用. 寻找更好的新的逆胶束体系是胶束 酶学的发展方向之一. 而开发适用于逆胶束酶反应 系统的新型功能性表面活性剂则成为逆胶束应用研 究的一个重要内容.

非离子表面活性剂的介入有利于逆胶束系统中的酶活保持.但是,常规的非离子型表面活性剂却难以单独用于逆胶束体系的构建,因其通常需要添加助表面活性剂如直链醇等,并且,所形成的逆胶束中水核的大小只能在一个相对很小的数值区间内进行控制^[43,44].而与酶分子匹配的逆胶束水核大小对酶的活性发挥有着重要作用,且高浓度的醇对于很多酶类会产生抑制.Zhang等^[45]合成了一种具有双链结构的新型功能性非离子表面活性剂—N-葡萄糖基谷氨酸二癸酯(*N*-gluconyl glutamic acid didecyl ester,GGDE),并考察其在 GGDE/TritonX-100 - 环己胺 - 水逆胶束体系中木素过氧化物酶(lignin peroxidase,LiP)催化氧化藜芦醇的活性行为,研究发现在适合的逆胶束大小、水相 pH 值和双氧水浓度等条件下,LiP的催化效率比在 AOT 逆胶束中要高 40 倍.

最新的研究^[46]显示,将水溶性的离子液体型表 面活性剂 1-烷基-3-甲基溴化咪唑(1-alkyl-3-methyl imidazolium bromides)与 CTAB 混合,在适合的烷基 链长度如 1-乙基-3-甲基溴化咪唑(1-ethyl-3-methyl imidazolium bromide, EMIMBr)结构下,逆胶束体系 中的胰蛋白酶(trypsin)活性显著增强.与离子液体混 合使用下的酶活性优于单独使用 CTAB 的情况.这 是因为溴离子与逆胶束微水相中的水分子之间通过 氢键结合,导致酶分子附近的水的亲核性增强;同时, 由于离子液体的存在,逆胶束水核的水力学半径相 对增大,这也更好地保护了酶的二级结构.

然而,化学表面活性剂的使用,终难以避免其对 酶有效性的负面作用以及对环境的污染.相比之下, 生物表面活性剂(biosurfactant,简称 BS)作为一种环 境友好型的天然表面活性剂,产生于微生物、动物或 植物的代谢过程中,具有低毒性、可降解性、生态相 容性和高效性等特殊功能[47~49]. 生物表面活性剂取 代化学表面活性剂的应用可有效避免环境中化学试 剂大量使用所造成的污染累积,使得工艺流程更具 安全性和环境可持续性. 研究表明生物表面活性剂 可以促进一些微生物胞外酶的分泌并加速其对目标 底物的催化转化过程^[50-54]. 但目前为止, 在逆胶束体 系中应用生物表面活性剂的研究仍鲜见报道. 近期, 有研究者[55~57]尝试采用生物表面活性剂构建逆胶束 体系,并将其用于银纳米颗粒的合成,发现所合成的 纳米粒子在含生物表面活性剂的逆胶束中具有很好 的稳定性.这体现了生物表面活性剂用于逆胶束体 系构建的可行性. 据此, 本课题组^[24]率先将生物表面 活性剂鼠李糖脂引入到逆胶束酶反应系统,考察纤 维素酶在"鼠李糖脂/异辛烷/正己醇/水"逆胶束体系 中的催化行为,研究结果表明在同等条件下,生物表 面活性剂鼠李糖脂比 CTAB、SDS 和 Tween 80 这 3 种化学表面活性剂更具优势.

而生物表面活性剂的来源和种类颇为丰富,其 在逆胶束酶反应系统中的应用也必定有着巨大的潜 力和良好的发展前景.

6 结语

逆胶束酶反应系统的研究历史较短,技术条件 尚不成熟.且由于其所具有的非均相、多要素等复杂 性特征,导致系统内相行为特征和各要素作用机制 的研究难度大、不确定性强.目前,应用于逆胶束酶 反应系统的表面活性剂种类较为有限,表面活性剂 在逆胶束酶反应系统中的作用机制仍缺乏深入的探 究,这也制约了逆胶束酶反应技术从实验室基础走 向产业化应用的发展步伐.随着今后新型功能性表 面活性剂的开发,尤其是生物表面活性剂的研制及 其与纳米技术的协同发展^[58],逆胶束酶反应系统的 应用前景必将更为广阔,其相关的机理研究也将得 到进一步完善.

致谢 本工作得到国家自然科学基金项目(50978087, 50978088, 51039001), 教育部创新团队项目(IRT0719), 湖南省 自然科学基金创新群体项目(10JJ7005)和湖南省重大科技专项(2009FJ1010)资助, 特此致谢.

参考文献」

1 周群英,高廷耀.环境工程微生物学.第二版.北京:高等教育出版社,2000,276-279

- 2 Melo EP, Aires-Barros MR, Cabral JM. Reverse micelles and protein biotechnology. Biotechnol Annu Rev, 2001, 7: 87-129
- 3 Tonova K, Lazarova Z. Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion. *Biotechnol Adv*, 2008, 26: 516–532
- 4 Hoar TP, Schulman JH. Transparent water in oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. *Nature*, 1943, 152: 102–103
- 5 Hanahan DJ. The enzymatic degradation of phosphatidylcholine in diethyl-ether. J Biol Chem, 1952, 195: 199–206
- 6 Misiorowski RL, Wells MA. Activity of phospholipase A2 in reversed micelles of phosphatidylcholine in diethyl ether: Effect of water and cations. *Biochemistry*, 1974, 13: 4921–4927
- 7 Luisi PL, Henninger F, Joppich M. Solubilization and pectroscopic properties of alpha-chymotrypsin in cyclohexane. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, 74: 1384–1389
- 8 Martinek K, Leavashov AV, KIyachko NL, Berezin IV. Catalysis by watersoluble enzymes in organic solvents stablization of enzymes against the denaturation (inactivation) when they are included in inversed micelles of surface-active substana. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 1977, 236: 920–923 (in Russian); 1978, 236: 951–953 (in English)
- 9 冯绪胜, 刘洪国, 郝京诚. 胶体化学. 北京: 化学工业出版社, 2005, 183-202
- 10 钟克利, 尹炳柱, 金龙一. 胶束作为纳米反应器的研究进展. 高分子通报, 2009, 2: 48-57
- 11 Martinek K, Klyachko NL, Kabanov AV, Khmelnitsky YL, Levashov AV. Micellar enzymology: its relation to membranology. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 981: 161–172
- 12 马光辉, 王平, 苏志国. 纳米科学与酶. 中国基础科学, 2009, 5: 49-54
- 13 Padma VI, Laxmi A. Enzyme stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. Process Biochem, 2008, 43: 1019–1032
- 14 Das D, Das PK. Superior activity of structurally deprived enzyme- carbon nanotube hybrids in cationic reverse micelles. *Langmuir*, 2009, 25: 4421–4428
- 15 Biasutti MA, Abuin EB, Silber JJ, Correa NM, Lissi EA. Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants. Adv Colloid Interface Sci, 2008, 136: 1–24
- 16 Carvalho CML, Cabral JMS. Reverse micelles as reaction media for lipases. Biochimie, 2000, 82: 1063-1085
- 17 Bansal-Mutalik R, Gaikar VG. Reverse micellar solutions aided permeabilization of baker's yeast. Process Biochem, 2006, 41: 133-141
- 18 Hebbar HU, Sumana B, Raghavarao KSMS. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 4896–4902
- 19 Imm JY, Kim SC. Convenient partial purification of polyphenol oxidase from apple skin by cationic reversed micellar extraction. Food chem, 2009, 113: 302–306
- 20 Bansal-Mutalik R, Gaikar VG. Cell permeabilization for extraction of penicillin acylase from Escherichia coli by reverse micellar solutions. Enzyme Microb Technol, 2003, 32: 14–26
- 21 Liu JG, Xing JM, Shen R, Yang CL, Liu HZ. Reverse micelles extraction of nattokinase from fermentation broth. *Biochem Eng J*, 2004, 21: 273–278
- 22 Streitner N, Voβ C, Flaschel E. Reverse micellar extraction systems for the purification of pharmaceutical grade plasmid DNA. *J Biotechnol*, 2007, 131: 188–196
- 23 Goto A, Yoshioka H, Manabe M, Goto R. NMR, spectroscopic study on the dissolution of water in sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate/toluene solution. *Langmuir*, 1995, 11: 4873–4875
- 24 王伟伟, 袁兴中, 曾光明, 梁运姗, 晁阳. 逆胶束体系中纤维素酶解特性研究. 环境科学, 2010, 31: 2202-2207
- 25 Kabanov AV, Levashov AV, Klyachko NL, Namyotkin SN, Pshezhetsky AV. Enzymes entrapped in reversed micelles of surfactants in organic solvents: A theoretical treatment of the catalytic activity regulation. J Theor Biol, 1988, 133: 327–343
- 26 Kabanov AV, Levashov AV, Martinek K. Giving of membrane active properties to water soluble enzymes via their artificial hydrophobization—A new approach to regulation of the kinetic parameters of enzymatic reactions in the systems "surfactant-water-organic solvent" (in Russian). Vestnik MGU, Ser II, Khimiya. 1986, 27: 591–594
- 27 Brown ED, Yada RY, Marangoni AG. The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactant concentration in Aerosol-OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1161: 66–72
- 28 Sánchez-Ferret Á, García-Carmona F. Biocatalysis in reverse self-assembling structures: Reverse micelles and reverse vesicles. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 409–415
- 29 Rodakiewicz-Nowak J, Ito M. Effect of AOT on enzymatic activity of the organic solvent resistant tyrosinase from Streptomyces sp. REN-21 in aqueous solutions and water-in-oil microemulsions. J Colloid Interface Sci, 2005, 284: 674–679
- 30 Bommarius AS, Wang DIC, Hatton TA. Xanthine oxidase reactivity in reversed micellar systems: A contribution to the prediction of

enzymatic activity in organized media. J Amer Chem Soc, 1995, 117: 4515-4523

- 31 Kuwahara Y, Goto A, Ibuki Y, Yamazaki K, Goto R. Catalytic activity of hexokinase in reversed micelles. *J Colloid Interf Sci*, 2001, 233: 190–196
- 32 Shome A, Roy S, Das PK. Nonionic surfactants: a key to enhance the enzyme activity at cationic reverse micellar interface. *Langmuir*, 2007, 23: 4130–4136
- 33 Ermakova EA, Zakhartchenko NL, Zuev YF. Effect of surface potential of reverse micelle on enzyme–substrate complex formation. *Colloids Surf A*, 2008, 317: 297–302
- 34 Das D, Das PK. Improving the lipase activity profile in cationic water-in-oil microemulsions of hydroxylated surfactants. *Langmuir*, 2003, 19: 9114–9119
- 35 Das D, Roy S, Mitra RN, Dasgupta A, Das PK. Head-group size or hydrophilicity of surfactants: the major regulator of lipase activity in cationic water-in-oil microemulsions. *Chem Eur J*, 2005, 11: 4881–4889
- 36 Yuan XZ, Ren FY, Zeng GM, Zhong H, Fu HY, Liu J, Xu XM. Adsorption of surfactants on a *Pseudomonas aeruginosa* strain and the effect on cell surface lypohydrophilic character. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76: 1189–1198
- 37 Zhong H, Zeng GM, Yuan XZ, Fu HY, Huang GH, Ren FY. Adsorption of dirhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77: 447–455
- 38 Zhong H, Zeng GM, Liu JX, Xu XM, Yuan XZ, Fu HY, Huang GH, Liu ZF, Ding Y. Adsorption of monorhamnolipid and dirhamnolipid on two *Pseudomonas aeruginosa* strains and the effect on cell surface hydrophobicity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79: 671–677
- 39 Dasgupta A, Das D, Das PK. Probing the relationship between interfacial concentrations and lipase activity in cationic w/o microemulsions: A quantitative study by chemical trapping. *Langmuir*, 2007, 23: 4137–4143
- 40 Mitra RN, Dasgupta A, Das D, Roy S, Debnath S, Das PK. Geometric constraints at the surfactant headgroup: Effect on lipase activity in cationic reverse micelles. *Langmuir*, 2005, 21: 12115–12123
- 41 Debnath S, Das D, Das PK. Unsaturation at the surfactant head: Influence on the activity of lipase and horseradish peroxidase in reverse micelles. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356: 163–168
- 42 Dasgupta A, Das D, Mitra RN, Das PK. Surfactant tail length-dependent lipase activity profile in cationic water-in-oil microemulsions. J Colloid Interf Sci, 2005, 289: 566–573
- 43 Orlich B, Schomäcker R. *Candida Rugosa* lipase reactions in nonionic w/o-microemulsion with a technical surfactant. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28: 42–48
- 44 Chen N, Fan JB, Xiang J, Chen J, Liang Y. Enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose in reverse micelles. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764: 1029–1035
- 45 Zhang Y, Huang XR, Huang F, Li YZ, Qu YB, Gao PJ. Catalytic performance of lignin peroxidase in a novel reverse micelle. *Colloids Surf B*, 2008, 65: 50–53
- 46 Debnath S, Das D, Dutta S, Das PK. Imidazolium bromide-based ionic liquid assisted improved activity of trypsin in cationic reverse micelles. *Langmuir*, 2010, 26: 4080–4086
- 47 Mulligan CN. Environmental applications for biosurfactants. Environ Pollut, 2005, 133: 183-198
- 48 Zeng GM, Fu HY, Zhong H, Yuan XZ, Fu MX, Wang W, Huang GH. Co-degradation with glucose of four surfactants, CTAB, Triton X-100, SDS and Rhamnolipid, in liquid culture media and compost matrix. *Biodegradation*, 2007, 18: 303–310
- 49 Yuan XZ, Meng YT, Zeng GM, Fang YY, Shi JG. Evaluation of tea- derived biosurfactant on removing heavy metal ions from dilute wastewater by ion flotation. *Colloids Surf A*, 2008, 317: 256–261
- 50 Chávez FP, Gordillo F, Jerez CA. Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls. *Biotechnol Adv*, 2006, 24: 309–320
- 51 Singh A, Van Hamme JD, Ward OP. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2, Application aspects. *Biotechnol Adv*, 2007, 25: 99–121.
- 52 Liu J, Yuan XZ, Zeng GM, Shi JG, Chen S. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochem*, 2006, 41: 2347–2351
- 53 Zeng GM, Shi JG, Yuan XZ, Liu J, Zhang ZB, Huang GH, Li JB, Xi BD, Liu HL. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39: 1451–1456
- 54 Liang YS, Yuan XZ, Zeng GM, Hu CL, Zhong H, Huang DL, Tang L, Zhao JJ. Biodelignification of rice straw by *Phanerochaete* chrysosporium in the presence of dirhamnolipid. *Biodegradation*, 2010, 21: 615–624
- 55 Xie YW, Ye RQ, Liu HL. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. Colloids Surf A, 2006,

279: 175-178

- 56 Reddy AS, Chen CY, Baker SC, Chen CC, Jean JS, Fan CW, Chen HR, Wang JC. Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant stabilizing agent. *Mat Lett*, 2006, 63: 1227–1230
- 57 Kiran GS, Sabu A, Selvin J. Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19. *J Biotechnol*, 2010, 148: 221–225
- 58 Mulligan CN. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. Curr Opin Colloid Interf Sci, 2009, 14: 372–378

Effects of the surfactants on enzyme-containing reversed micellar system

LIANG YunShan, YUAN XingZhong, ZENG GuangMing, ZHONG Hua, LI Hui & WANG WeiWei

Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control (Hunan University), Ministry of Education; College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China

Abstract: With the development of colloid interface and enzyme technologies, enzyme-containing reversed micellar system has been receiving much attention in bioseparation and bioconversion. Because of its high efficiency, it has brought new opportunities for the development of molecullar biotechnology. Reversed micelles represent nano-sized aqueous droplets stabilized by surfactant amphiphiles inside the bulk organic solvents. The entrapped enzymes have enhanced activities under those conditions as suited in the lipid bilayers of biological membranes. The fundamentals of enzyme-containing reversed micellar system are described in this paper, with special emphasis on the effects of surfactants varying in concentrations and structures. The latest study progress on the surfactants application in enzyme-containing reversed micelles is reviewed. The introduction of novel functional surfactants in micellar enzymology and their future development are also discussed.

Keywords: reversed micelle, enzyme, surfactant concentration, surfactant molecular structure, enzyme-containing reversed micellar system