

## • 生物育种与工艺优化 •

# 基于金属有机框架的固定化酰胺酶制备及催化合成 (S)-4-氟苯甘氨酸

林超平<sup>1,2</sup>, 汤江涛<sup>1,2</sup>, 郑仁朝<sup>1,2</sup>, 郑裕国<sup>1,2</sup>

1 浙江工业大学 生物工程学院 生物有机合成技术研究浙江省重点实验室, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学 生物工程学院 生物转化与生物净化教育部工程研究中心, 浙江 杭州 310014

林超平, 汤江涛, 郑仁朝, 等. 基于金属有机框架的固定化酰胺酶制备及催化合成(S)-4-氟苯甘氨酸. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2936-2946.

Lin CP, Tang JT, Zheng RC, et al. Synthesis of (S)-4-fluorophenylglycine by using immobilized amidase based on metal-organic framework. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2936-2946.

**摘 要:** 以微水溶剂热法快速制备的稳定锆基金属有机框架为载体, 戊二醛为交联剂, 采用交联法对酰胺酶进行固定化, 考察了不同条件对酰胺酶固定化效率的影响。结果表明, 戊二醛浓度为 1.0%、交联时间为 180 min、载体与酶的质量比为 8:1, 固定化效率最佳, 固定化酶活力回收率达 86.4%, 蛋白负载量达 115.3 mg/g。固定化酶最适温度为 40 °C, 最适 pH 值为 9.0, 在 40 °C 下半衰期为 72.2 d, 该固定化酶的  $K_m$  为 58.32 mmol/L,  $V_{max}$  为 16.23  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,  $k_{cat}$  为 1 670  $\text{s}^{-1}$ 。此外, 考察了固定化酶催化合成 (S)-4-氟苯甘氨酸的工艺: 最适底物浓度 300 mmol/L, 固定化酶用量 10 g/L, 反应时间 180 min, 在最佳反应条件下转化率达 49.9%, 对映体过量 (Enantiomeric excess, *e.e.*) 为 99.9%。进一步考察了该固定化酶分批催化反应性能, 重复使用 20 批次后, 固定化酶活力仍保留 95.8%。

**关键词:** 金属有机框架, 酰胺酶, 固定化, (S)-4-氟苯甘氨酸

## Synthesis of (S)-4-fluorophenylglycine by using immobilized amidase based on metal-organic framework

Chaoping Lin<sup>1,2</sup>, Jiangtao Tang<sup>1,2</sup>, Renchao Zheng<sup>1,2</sup>, and Yuguo Zheng<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 Engineering Research Center of Bioconversion and Biopurification, Ministry of Education, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

**Abstract:** A stable Zr-based metal-organic framework (MOF, UiO-66-NH<sub>2</sub>) synthesized via micro-water solvothermal method was used to immobilize amidase by using the glutaraldehyde crosslinking method. The effect of immobilization

**Received:** September 25, 2020; **Accepted:** February 2, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFE0129400), Postdoctoral Science Foundation of Zhejiang Province, China (No. ZJ2020125).

**Corresponding author:** Renchao Zheng. Tel: +86-571-88320391; Fax: +86-571-88320884; E-mail: zhengrc@zjut.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2017YFE0129400), 浙江省博士后科研择优资助项目 (No. ZJ2020125) 资助。



conditions on enzyme immobilization efficiency was studied. An activity recovery rate of 86.4% and an enzyme loading of 115.3 mg/g were achieved under the optimal conditions: glutaraldehyde concentration of 1.0%, cross-linking time of 180 min, and the weight ratio of MOF to enzyme of 8:1. The optimal temperature and optimal pH of the immobilized amidase were determined to be 40 °C and 9.0, respectively, and the  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $k_{cat}$  of the immobilized amidase were 58.32 mmol/L, 16.23  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ , and 1 670  $\text{s}^{-1}$ , respectively. The immobilized enzyme was used for (S)-4-fluorophenylglycine synthesis and the optimal reaction conditions were 300 mmol/L of *N*-phenylacetyl-4-fluorophenylglycine, 10 g/L of immobilized enzyme loading, and reacting for 180 min at pH 9.0 and 40 °C. A conversion rate of 49.9% was achieved under the optimal conditions, and the conversion rate can be increased to 99.9% under the conditions of enantiomeric excess. The immobilized enzyme can be repeatedly used, 95.8% of its original activity can be retained after 20 cycles.

**Keywords:** metal-organic framework, amidase, immobilization, (S)-4-fluorophenylglycine

酶作为一种天然生物催化剂, 具有催化效率高、特异性好、环境友好、反应条件温和等优势, 被广泛应用于医药、能源、食品以及饲料等众多领域, 被誉为工业生物技术的“芯片”<sup>[1-2]</sup>。酰胺酶 (EC 3.5.1.4) 能够催化酰胺键水解合成手性羧酸及其衍生物。酰胺酶在制备光学纯氨基酸等系列活性化合物领域具有巨大的潜力<sup>[3-8]</sup>。然而, 游离酶在催化反应中易受高温、强酸/强碱、有机溶剂等工业环境影响而失活, 导致其表观催化活性较低, 且难以回收和重复利用, 使其在工业应用中受到限制。

为了提高酶催化剂的工业应用属性, 固定化酶技术应运而生。固定化酶能够增强酶蛋白的稳定性, 使其能够在苛刻的工业生产环境下表现出良好的催化活性和操作稳定性<sup>[9-11]</sup>。此外, 固定化酶催化因操作简单、可重复使用及易于下游分离纯化等优势已成为合成手性化学品的理想途径之一。近年来, 研究者成功将酰胺酶固定在有机、无机及杂化材料上, 如壳聚糖、树脂、二氧化硅、碳纳米管等<sup>[12-14]</sup>, 这些材料具有官能团丰富和机械强度高优点而备受关注, 但仍存在着各种弊端, 如二氧化硅具有较高的孔隙率, 但是后续固定化酶易泄露等; 其他杂化材料存在着合成过程复杂、酶固定化过程易失活、不易回收利用等问题。因此, 选择制备简单、高效、稳定的载体材料对酶固定化至关重要。

金属有机框架 (Metal-organic frameworks,

MOF) 是一种由有机配体和金属离子或团簇通过配位键自组装形成的具有分子内空隙的有机-无机杂化纳米材料<sup>[15-16]</sup>。金属有机框架因其结构的高度可调节性、丰富的配位位点、开放的框架结构和埃级孔道尺寸, 为不同酶分子创造稳定的微环境, 从而在极大地提高酶负载率的同时限制了酶分子的泄露, 甚至极端条件下仍能维持酶的活性, 已被广泛应用于酶的固定化<sup>[17-20]</sup>。

本研究以快速合成的稳定的金属有机框架 (Fast-UiO-66-NH<sub>2</sub>) 作为载体, 利用戊二醛交联法固定酰胺酶, 研究了不同条件对蛋白固定化效率和酶活力回收率的影响, 筛选获得了最佳的固定化条件。系统优化了固定化酰胺酶合成抗肿瘤化疗止吐药阿瑞匹坦手性中间体 (S)-4-氟苯甘氨酸合成工艺, 为大规模酶法生产 (S)-4-氟苯甘氨酸提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酰胺酶由本实验室制备<sup>[16]</sup>。

*N*-苯乙酰-4-氟苯甘氨酸由本实验室制备<sup>[21]</sup>; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 购于阿拉丁试剂有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于江苏凯基生物技术股份有限公司; 氯化钙、氨基对苯二甲酸、戊二醛 (50%) 均购于百灵威科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。



## 1.2 仪器与设备

恒温水浴振荡器 SHA-C, 德国 Julabo SW22 公司; SpectraMax M5, 美国 Molecular Devices 公司; PFDS8508 型冷冻干燥机, 韩国浩瀚有限公司; 超纯水系统, Sartorius 公司。

## 1.3 酰胺酶的固定化

### 1.3.1 金属有机框架 Fast-UiO-66-NH<sub>2</sub> 的制备

采用微水溶剂热制备锆基金属有机框架材料。在 250 mL 圆底烧瓶中添加 *N,N*-二甲基甲酰胺 DMF (100 mL)、氨基对苯二甲酸 (1.5 g, 6.4 mmol)、氯化锆 (1.17 g, 6.44 mmol)、超纯水 2 mL, 混合后超声 5 min, 然后将混合液置于反应釜中加热至 120 °C 反应 20 min。冷却室温后, 将溶液离心, 沉淀用无水乙醇洗涤 3 次, 得到的固体在 50 °C 真空干燥 12 h, 即为金属有机框架 Fast-UiO-66-NH<sub>2</sub>。

### 1.3.2 固定化酶的制备

取制备的金属有机框架材料 100 mg 与酰胺酶 20 mg 加入到 10 mL 磷酸盐缓冲液 (500 mmol/L, pH 8.0) 充分混合, 加入一定量 25% (W/V) 的戊二醛溶液。固定反应一定时间, 离心除去上清。用磷酸盐缓冲液 (100 mmol/L, pH 8.0) 清洗 3 次, 自然风干, 收集后保存待用。每一部分溶液采用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白含量, 计算固定化效率和固定化酶活力回收率。采取单因素试验分别进行戊二醛浓度 (0.1%–3.0%)、载体与酶的质量比 (6:1–12:1)、固定化时间 (30–270 min) 等条件优化。

$$\text{酶活力回收率 (\%)} = \frac{\text{固定酶总活力}}{\text{用于固定化的总酶活力}} \times 100$$

$$\text{蛋白固定效率 (\%)} = \frac{\text{载体固定的蛋白}}{\text{用于固定化的总蛋白}} \times 100$$

### 1.3.3 固定化酶的表面

将 10 mg/mL FITC 溶解在二甲基亚砷中, 然后加入 1 mL 含有 2 mg/mL 酰胺酶的磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 中, 25 °C、120 r/min 反应 8 h。然后将溶液透析处理, 每隔 6 h 更换一次透析液。透

析结束后, 将溶液冷冻干燥, 即制备得到带有 FITC 的酰胺酶。将带有 FITC 的酰胺酶按照上述方法进行固定化, 即制备得到含有 FITC 的固定化酶。同时, 将制备获得的固定化酰胺酶进行冷场发射扫描电镜测试。

### 1.3.4 固定化酶酶学性质研究

固定化酶反应体系 1 mL: 固定化酶 10 mg, 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (100 mmol/L, pH 9.0), *N*-苯乙酰-4-氟-苯甘氨酸 50 mmol/L。在 20–50 °C、200 r/min 条件下反应 3 min, 随后离心分离固定化酶, 取上清液用 HPLC 检测底物和产物。采用不同 pH 7.0–11.0 的缓冲溶液, 加入固定化酶 10 mg, *N*-苯乙酰-4-氟-苯甘氨酸 50 mmol/L, 在 40 °C、200 r/min 条件下反应 3 min, 分离固定化酶, 取上清检测。

将固定化酶置于不同温度 (30–50 °C) 的缓冲液中保温 1–12 d 后, 定时取固定化酶测定活力, 计算残存酶活力百分数 (初始酶活力定义为 100%)。将固定化酶置于 pH 9.0、4 °C 下储藏, 定时取样测定残存酶活力。

固定化酶反应体系 1 mL: 固定化酶 10 mg, 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (100 mmol/L, pH 9.0), 20–200 mmol/L *N*-苯乙酰-对氟苯甘氨酸。在 40 °C、200 r/min 条件下反应 3 min, 随后分离固定化酶, 取上清液用 HPLC 检测。

酶活力单位定义: 在标准酶活力测定条件下, 酶每分钟催化底物 *N*-苯乙酰-对氟苯甘氨酸生成 1 μmol/L (S)-4-氟苯甘氨酸所需要的酶量定义为一个酶活力单位, 即 1 U。

*N*-苯乙酰-4-氟-苯甘氨酸和 (S)-4-氟苯甘氨酸及 *e.e.* 的检测分析参考前期建立的高效液相色谱 (HPLC) 方法<sup>[21]</sup>。

## 1.4 固定化酶催化合成 (S)-4-氟苯甘氨酸

将一定量固定化酶和底物 *N*-苯乙酰-4-氟-苯甘氨酸加入 10 mL 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH



9.0) 中, 在 40 °C、200 r/min 条件下反应一定时间, 分离固定化酶, 取上清用 HPLC 分析。采取单因素试验分别优化固定化酶用量 (4–16 g/L)、底物浓度 (100–350 mmol/L) 和反应时间 (60–240 min)。

### 1.5 固定化酶的操作稳定性

向 25 mL 锥形瓶中加入 10 mL 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.0) 与 300 mmol/L 的 *N*-苯乙酰-4-氟-苯甘氨酸, 接着加入 10 g/L 的固定化酶混匀, 40 °C 恒温水浴摇床中反应 180 min 后取样测定底物转化率。每一批次反应结束后, 离心回收固定化酶, 用蒸馏水清洗 3 次后用于下批次反应, 每批次实验重复 3 次, 转化率取其平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 金属有机框架结构的表征

对合成的金属有机框架 (Fast-UiO-66-NH<sub>2</sub>) 进行表征, 结果如图 1 所示。样品呈现淡黄色粉末状, 扫描电镜和透射电镜分析表明金属有机框架颗粒尺寸为 200–300 nm。

对金属有机框架进行 N<sub>2</sub> 等温吸-脱附、热重分析以及 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 测试表征, 结果如图 2 所示。N<sub>2</sub> 等温吸-脱附 (图 2A)、热重曲线 (图 2B) 与 XRD (图 2C) 衍射峰与文献报道溶剂热法合成金属有机框架相符<sup>[22]</sup>, 合成时

间仅需 20 min, 远比一般溶剂热法短 (12–24 h)。金属有机框架比表面积达到 769.3 cm<sup>2</sup>/g, 其孔径分布在 1.8 nm 左右, 故后续很难通过吸附对酶进行固定化。此外, 考察了金属有机框架在 pH 9.0 条件下的稳定性, 结果如图 2C 所示。金属有机框架放置 10 d 的 XRD 衍射峰几乎未变化, 表明金属有机框架比较稳定。

### 2.2 固定化条件优化

#### 2.2.1 交联剂浓度对固定化效率的影响

该金属有机框架孔径小, 酶分子很难进入空隙内部, 但其表面具有丰富的氨基基团, 可为载体与酶分子进行交联提供反应位点。因此, 采用戊二醛介导的交联法固定酰胺酶。

考察了戊二醛浓度对固定化的影响, 结果如图 3 所示。由图可知, 随着戊二醛浓度从 0.1% 增加到 1.0%, 蛋白固定化效率和酶活力回收率都有所增加。当戊二醛浓度为 1.0% 时, 酶活力回收率达到最高, 继续增加戊二醛浓度, 酶活力回收率下降趋势明显, 蛋白固定化效率变化不大。故后续实验均采用的戊二醛浓度为 1.0%。

#### 2.2.2 交联时间对固定化效率的影响

交联时间是影响酶固定化的重要参数, 交联时间过短, 交联不完全, 影响酶与载体结合的牢固程度, 导致后续使用过程中容易发生酶泄漏;

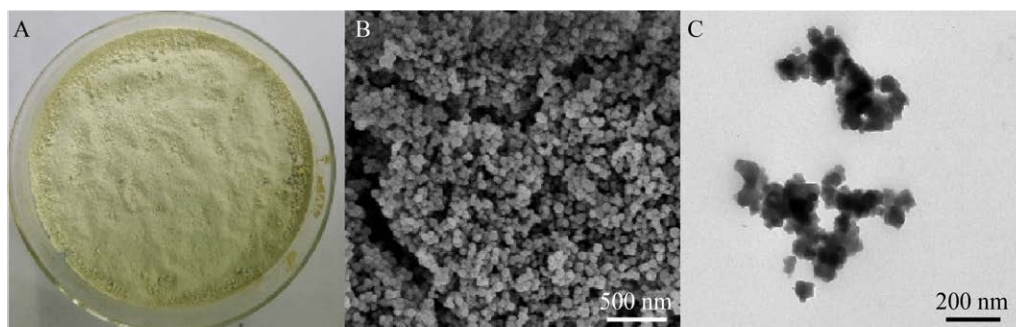


图 1 金属有机框架的外观图 (A)、扫描电镜图 (B) 及透射电镜图 (C)

Fig. 1 Appearance (A), scanning electron microscope image (B) and transmission electron microscope image (C) of metal-organic framework.



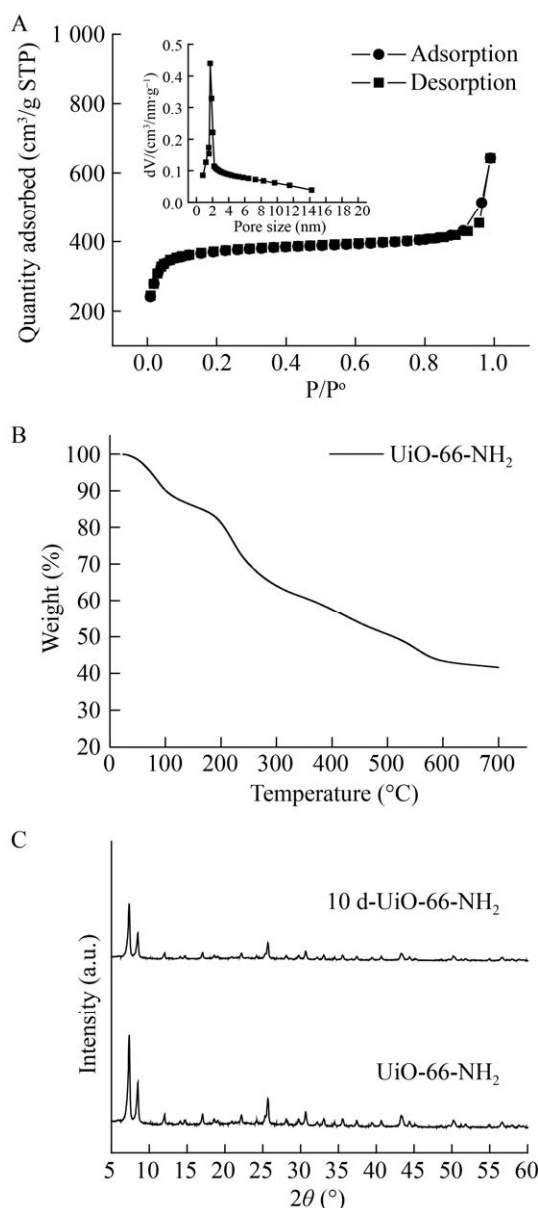


图2 金属有机框架的等温吸-脱附 (A)、热重分析 (B) 及 XRD 图 (C)

Fig. 2 The  $N_2$  adsorption-desorption isotherms (A), TGA curve (B) and XRD (C) of metal-organic framework.

交联时间过长, 交联剂对酶蛋白有一定的毒害作用, 导致固定化酶活力偏低。因此, 考察了交联时间对酶固定化效率的影响, 结果如图 4 所示, 当交联 180 min 时, 酶活力回收率达到最高, 延长交联时间, 蛋白固定化效率缓慢增加, 但酶活力回收率逐渐下降, 因此, 后续实验采用交联时间 180 min。

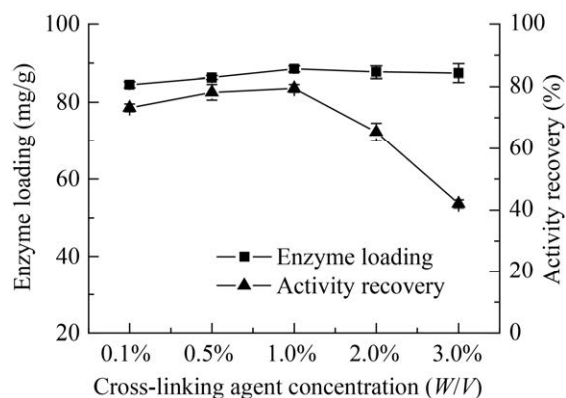


图3 交联剂浓度对固定化效率的影响

Fig. 3 Effect of cross-linking agent concentration on immobilization efficiency.

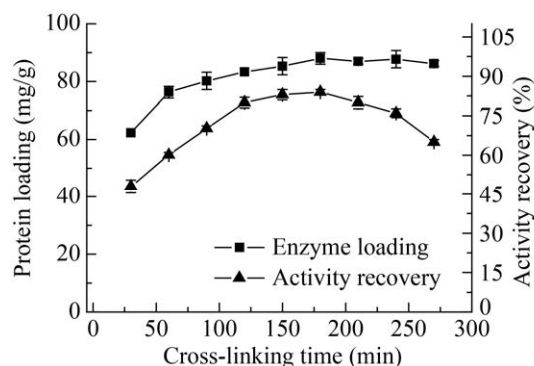


图4 交联时间对固定化效率的影响

Fig. 4 Effect of cross-linking time on immobilization efficiency.

### 2.2.3 金属有机框架与酶质量比对固定化效率的影响

金属有机框架与酶的质量比同样是影响酶固定化效率的一个重要参数。比例过低, 酶分子之间会发生交联作用导致酶的活力损失; 比例过高, 造成载体材料的浪费, 使得酶蛋白固定效率下降。因此, 考察了金属有机框架与酶质量比对固定化效率的影响, 结果如图 5 所示。当金属有机框架与酶质量比在 6:1 至 8:1 时, 固定化酶活力回收率随之增大, 蛋白固定化效率缓慢下降。

当该比例为 8:1 时, 固定化酶活力回收率达



到 86.4%，蛋白负载量达到 115.3 mg/g，当该比例超过 8:1 时，酶活力回收率急剧下降。故后续实验均采用载体与酶的质量比为 8:1。

## 2.3 固定化酶物理特性

图 6 显示以 FITC 标记酰胺酶制备的固定化酶的激光共聚焦图像，图中可见分布的绿色荧光斑点。由于金属有机框架本身不是荧光材料，故所观察到的荧光信号是金属有机框架中固定的 FITC-酰胺酶。结果表明，酶被固定于金属有机框架上。

图 7 显示制备固定化酰胺酶的扫描电镜图像，图中金属有机框架表面聚集大量交联的酶蛋白，进一步验证酶成功固定在金属有机框架上。

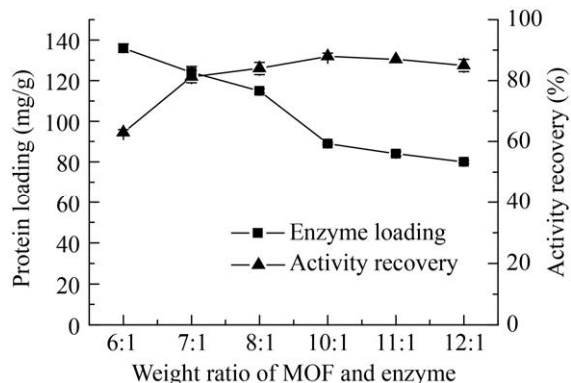


图 5 金属有机框架与酶的质量比对固定化效率的影响  
Fig. 5 Effect of weight ratio of MOF to enzyme on immobilization efficiency.

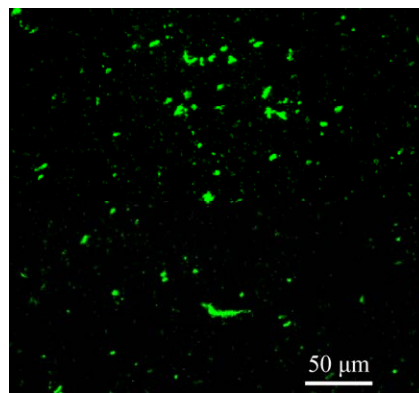


图 6 FITC-酰胺酶激光共聚焦显微镜图  
Fig. 6 Confocal microscopy image of the FITC-amidase.

## 2.4 固定化酶学性质

### 2.4.1 温度对固定化酶活力的影响

考察了 25–50 °C 范围内温度对固定化酶活力的影响，结果如图 8 所示，固定化酶在 25–40 °C 下，活力缓慢增加，在 40 °C 达到最大。而游离酶在 25–35 °C 下随着温度升高活力增加，35 °C 时活力最高。在实验温度范围内，酶经过固定化后最适温度由 35 °C 偏移至 40 °C，产生最适温度偏移原因一方面可能是由于酶的稳定性和耐受性有所提高<sup>[22]</sup>，酶经交联作用固定在载体上，其结构发生一定的改变，进而酶的刚性提升，使其对温度的敏感性降低；另外一方面可能是由于较高的温度使得固定化酶附近底物传质效率加快，而导致固定化酶作用的最适温度向高温方向移动<sup>[23]</sup>。

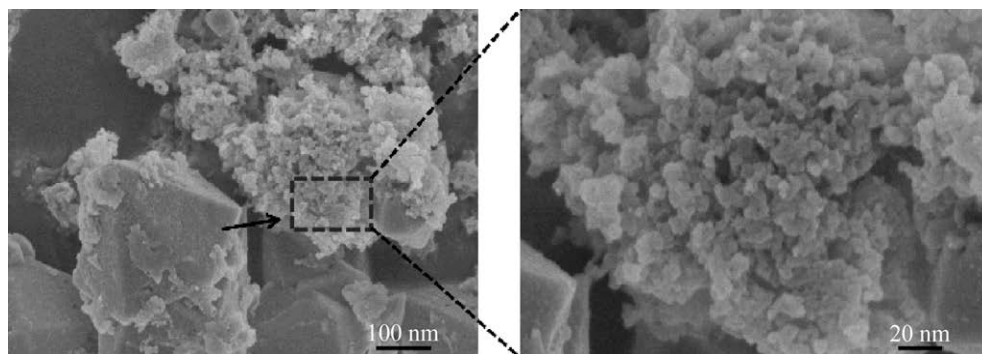


图 7 固定化酰胺酶扫描电镜图  
Fig. 7 Scanning electron microscope images of the immobilized amidase.



### 2.4.2 pH 对固定化酶活力的影响

考察了不同 pH 对固定化酶活力的影响, 结果如图 9 所示。当 pH 在 7.0–9.0 之间时, 固定化酶活力随着 pH 升高而逐渐增加, 当 pH 为 9.0 时达到最大, 随后 pH 在 9.0–11.0 范围内固定化酶活力逐渐降低。相比于游离酶, 固定化酶对 pH 变化的敏感性较小, 在实验范围 pH 内, 其保留的酶活力均高于游离酶。这可能是由于固定化酶稳定性提升以及酶固定化后周围微环境的变化引起的<sup>[24]</sup>。

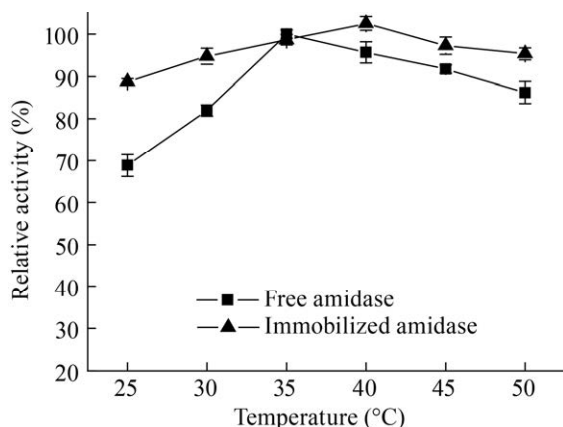


图 8 温度对固定化酶活力的影响

Fig. 8 Effect of temperature on the activity of immobilized enzyme.

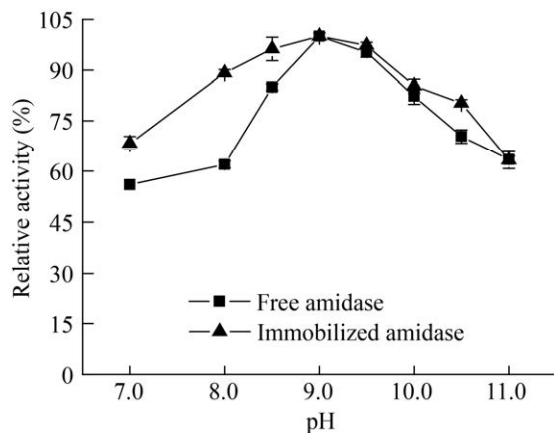


图 9 pH 对固定化酶活力的影响

Fig. 9 Effect of pH on the activity of immobilized enzyme.

### 2.4.3 固定化酶温度稳定性考察

进一步考察了固定化酶在 30–50 °C 范围的热稳定性, 结果如图 10 所示。固定化酶在最适温度 40 °C 下保温 12 d, 仍保留 80.4% 的酶活力; 而在 50 °C 下保温 12 d, 固定化酶仍保留 45.6% 的酶活力。根据固定化酶半衰期计算公式:  $t_{1/2} = \frac{0.693}{K_D}$ ;

式中  $K_D = \frac{2.303}{t} \lg\left(\frac{E_0}{E}\right)$ , 固定化酶在 30 °C、40 °C、50 °C 的半衰期分别为 76.6 d、72.2 d、8.5 d。表明固定化酶在最适温度 40 °C 下具有良好的稳定性, 超过 40 °C 其稳定性下降明显。主要原因可能是过高的温度导致酶的结构变化, 使得酶活力降低。因此, 固定化酶对温度的耐受性有所提升, 但幅度有限, 可能由于酶分子虽然被固定在载体上限制其移动, 但其表面部分暴露在载体外部环境中易受到环境因素影响导致其结构改变。此外, 固定化酶在 4 °C 下贮存 4 个月, 仍保留 95.3% 原始酶活力, 说明固定酶具有较好的储藏稳定性。

### 2.4.4 动力学参数考察

在最适条件下测定了固定化酶动力学参数  $K_m$ 、 $V_{max}$  和  $k_{cat}$ , 结果如表 1 所示。固定化酶的  $K_m$  比游离酶大, 说明固定化酶对底物的亲和力降低。这可能是由于游离酶经过固定化后其结构发

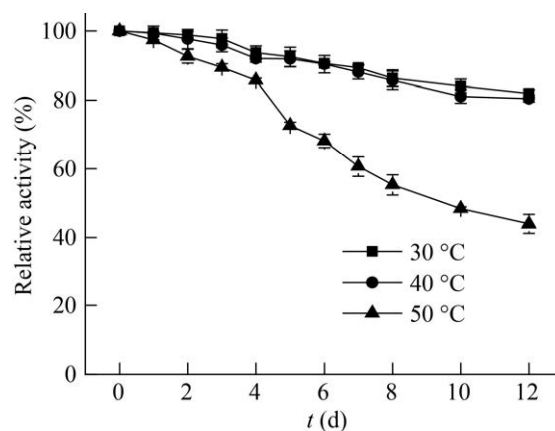


图 10 温度对固定化酶活力的影响

Fig. 10 Effect of temperature on the activity of immobilized enzyme.



表 1 固定化酶和游离酶酶学性质

Table 1 Kinetic parameters of immobilized and free amidase

Michaelis-Menten	Free amidase <sup>a</sup>	Immobilized amidase
$K_m$ (mmol/L)	53.65±0.9	58.32±0.6
$V_{max}$ (μmol/(min·mg))	21.32±0.6	16.23±0.4
$k_{cat}$ ( $10^3 s^{-1}$ )	1.89±0.2	1.67±0.01
$k_{cat}/K_m$ ( $10^4 L/(s·mol)$ )	3.53±0.01	2.87±0.05

<sup>a</sup> Reported by our previous study<sup>[16]</sup>.

生一定变化,导致活性位点与底物结合效率下降。固定化酶催化效率值  $k_{cat}/K_m$  相比于游离酶小幅下降,可能是由于酶通过交联方式固定在载体表面,导致酶构象发生变化或者底物的传质受阻<sup>[25-26]</sup>。

## 2.5 固定化酶催化合成 (S)-4-氟苯甘氨酸的条件优化

### 2.5.1 固定化酶用量对催化反应的影响

酶的添加量是酶催化工业应用的一个重要的因素,酶用量不足使得反应不完全,酶用量过多导致成本过高。在最适温度、最适 pH 条件下考察了不同酶用量对催化反应的影响,结果如图 11 所示。最佳酶用量为 10 g/L。

### 2.5.2 底物浓度、反应时间对催化反应的影响

在上述优化条件确定后,考察了不同底物浓度对催化反应的影响,结果如表 2 所示。当底物

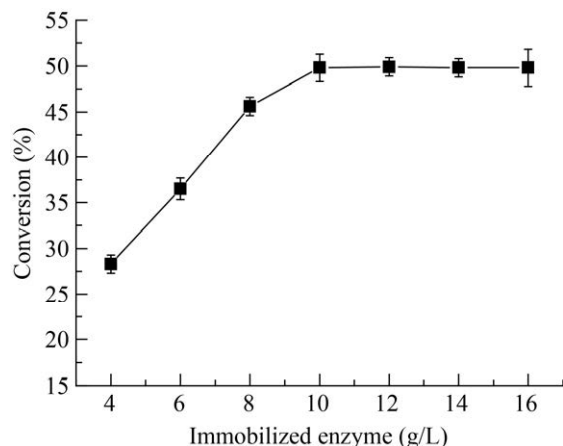


图 11 固定化酶用量对催化反应的影响

Fig. 11 Effect of immobilized enzyme loading on catalytic reaction.

表 2 反应底物浓度、反应时间对固定化酶催化的影响

Table 2 Effect of substrate concentration and reaction time on the reaction catalyzed by immobilized enzymes

Substrate concentration (mmol/L)	Reaction time (min)	Conversion (%)	<i>e.e.</i> (%)
100	60	49.9	99.9
150	90	49.9	99.9
200	120	49.9	99.9
250	120	49.5	99.9
250	150	49.9	99.9
300	150	49.5	99.9
300	180	49.9	99.9
350	180	48.3	99.9
350	240	48.5	99.9

浓度在 100–200 mmol/L 范围内,反应 120 min,转化率达到 49.9%;当底物浓度在 200–300 mmol/L 范围内,适当延长反应时间 (150–180 min),转化率均可达到 49.9%;当底物浓度超过 300 mmol/L 时,反应 180 min,转化率为 48.3%,即使延长反应时间,转化率仍低于 49%。说明底物浓度小于 200 mmol/L 时,反应没有抑制作用且反应迅速,在 200–300 mmol/L,有轻微的底物抑制作用,通过适当延长反应时间仍可以使得转化完全,当底物浓度高于 300 mmol/L 时,反应出现严重的抑制作用,导致转化不完全。此外,不同底物浓度催化反应生成的 (S)-4-氟-苯甘氨酸的 *e.e.* 始终为 99.9%。为了使催化反应转化率维持在比较高的水平,因此选择最佳底物浓度为 300 mmol/L,反应时间 180 min。

### 2.5.3 固定化酶的操作稳定性

在实际工业应用中酶催化剂重复使用性能是评价固定化酶的重要指标之一。为了考察固定化酶操作稳定性,利用固定化酶进行连续催化合成 (S)-4-氟苯甘氨酸,结果如图 12 所示。固定化酶连续反应 20 批次以后,残余酶活力仍保留原始酶活力的 95.8%,表现出良好的操作稳定性。

## 3 讨论

本研究以微水溶剂热法合成锆基金属有机



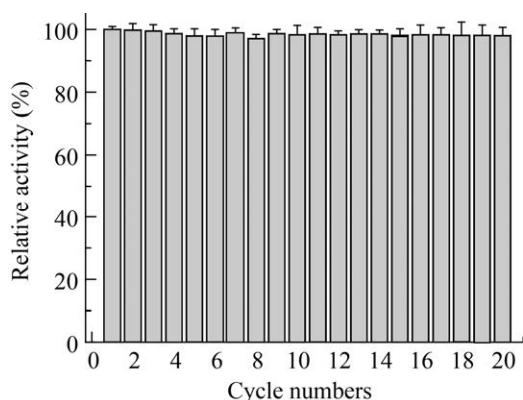


图 12 固定化酶的操作稳定性

Fig. 12 Operational stability of immobilized enzyme.

框架 Fast-UiO-66-NH<sub>2</sub> 作为载体,利用戊二醛作为交联剂对酰胺酶固定化进行系统的考察,研究表明:当戊二醛添加浓度为 1.0%、交联时间 180 min、载体与酶质量比为 8:1,固定化效果最好,酶活力回收率达到 86.4%,蛋白固定化效率为 88.5%,酶负载量达到 115.3 mg/g。虽然 Fast-UiO-66-NH<sub>2</sub> 的最佳蛋白负载量 (115.3 mg/g) 低于前期构建的多级孔金属有机框架 (211.3 mg/g),但是其酶活力回收率 (86.4%) 与固定化效率 (88.5%) 与多级孔金属有机框架比较接近 (88.2%, 92.2%)。这可能是由于微水溶剂热法制备金属有机框架是微孔,限制了酶大量进入孔道内部,此外,两者都采用戊二醛交联法,使二者具有较好的酶固定化效率<sup>[17]</sup>。固定化酶学性质分析表明,该固定化酶最适温度为 40 ℃,最适 pH 值为 9.0,在 40 ℃ 的半衰期为 72.2 d,具有较

好的稳定性。该固定化酶的  $K_m$  为 58.32 mmol/L,  $V_{max}$  为 16.23  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,  $k_{cat}$  为 1 670  $\text{s}^{-1}$ 。利用含有氨基的有机配体制备金属有机框架,使其含有丰富的氨基可作为酶固定化结合位点。以戊二醛为交联剂,与酶表面的亲核性基团进一步共价结合。采用共价交联对进行固定化使得酶与载体结合得更加牢固,同时制备的固定化酶稳定性较好,在使用过程中没有酶的泄露。表 3 总结并归纳了最近几年常用的“一锅法”固定化酶方法,与已报道的“一锅法”(共沉淀或仿生矿化)的方法相比,利用该方法固定酰胺酶具有以下特点:

(1) 酶与载体结合更加牢固;(2) 固定化酶在催化过程中没有酶的泄露;(3) 固定化酶在水相环境中较好的稳定性。因此,金属有机框架 Fast-UiO-66-NH<sub>2</sub> 合成简单、快速、稳定、成本较低,同时固定化酰胺酶效果较好。

利用固定化酰胺酶催化合成 (S)-4-氟苯甘氨酸,优化后的反应条件为:底物 *N*-苯乙酰-4-氟苯甘氨酸浓度为 300 mmol/L,固定化酶用量为 10 g/L,在 100 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.0) 中,反应温度为 40 ℃,反应时间 180 min。反应转化率达到 49.9%,*e.e.* 为 99.9%。进一步考察固定化酶分批次催化反应,结果表明,连续使用 20 次,固定化酶仍保留 95.8% 的原始酶活力,表现出良好的操作稳定性。本研究为固定化酶催化合成 (S)-4-氟苯甘氨酸的工业化生产奠定了基础。

表 3 近年来不同框架固定化酶的比较

Table 3 Comparison of enzyme immobilization based on different support

Enzymes	Supports	Methods	Applications	References
Catalase	ZIF-90	Co-precipitation	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> degradation	[2]
Cyt c	ZIF-8	Co-precipitation	Biocatalysis	[15]
Hydratase	ZIF-67	Biomimetic mineralization	Biocatalysis	[27]
Peroxidase	Cu-BDC	Biomimetic mineralization	Biosensing	[28]
Amidase	UiO-66-NH <sub>2</sub>	Cross-linking	Biocatalysis	The study



## REFERENCES

- [1] Sheldon RA, Pereira PC. Biocatalysis engineering: the big picture. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(3): 2678-2691.
- [2] Sheldon RA, Woodley JM. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem Rev*, 2018, 118(2): 801-838.
- [3] Wu ZM, Liu CF, Zhang ZY, et al. Amidase as a versatile tool in amide-bond cleavage: from molecular features to biotechnological applications. *Biotechnol Adv*, 2020, 43(2): 107574.
- [4] 顾诚伟, 曹成浩, 金利群, 等. 酰胺酶催化合成手性氨基酸的研究进展. *发酵科技通讯*, 2017, 46(3): 162-169.  
Gu CW, Cao CH, Jin LQ, et al. Research progress of enzymatic synthesis of chiral amino acids by amidase. *Bull Ferment Sci Technol*, 2017, 46(3): 162-169 (in Chinese).
- [5] Wu ZM, Zheng RC, Tang XL, et al. Identification and characterization of a thermostable and cobalt-dependent amidase from *Burkholderia phytofirmans* ZJB-15079 for efficient synthesis of (R)-3,3,3-trifluoro-2-hydroxy-2-methylpropionic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 101(5): 1953-1964.
- [6] Wu ZM, Zheng RC, Ding X, et al. Enzymatic production of key intermediate of gabapentin by recombinant amidase from *Pantoea* sp. with high ratio of substrate to biocatalyst. *Process Biochem*, 2016, 51(5): 607-613.
- [7] Wu ZM, Zheng RC, Zheng YG. Exploitation and characterization of three versatile amidase super family members from *Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 86: 93-102.
- [8] Xue YP, Zheng YG, Liu ZQ, et al. Efficient synthesis of non-natural L-2-aryl-amino acids by a chemoenzymatic route. *ACS Catal*, 2014, 4(9): 3051-3058.
- [9] 周涛, 朱雄军, 苏建华, 等. 葡萄糖氧化酶的有机相共价固定. *生物工程学报*, 2012, 28(4): 476-487.  
Zhou T, Zhu XJ, Su JH, et al. Covalent immobilization of glucose oxidase within organic media. *Chin J Biotech*, 2012, 28(4): 476-487 (in Chinese).
- [10] Rafiei S, Tangestaninejad S, Horcajada P, et al. Efficient biodiesel production using a lipase@ZIF-67 nanobioreactor. *Chem Eng J*, 2018, 334: 1233-1241.
- [11] 李宏亮, 胡晶, 谭天伟. 固定化脂肪酶合成维生素 A 棕榈酸酯. *生物工程学报*, 2008, 24(5): 817-820.  
Li HL, Hu J, Tan TW. Immobilized lipase catalyzed synthesis of vitamin A palmitate. *Chin J Biotech*, 2008, 24(5): 817-820 (in Chinese).
- [12] Ahmed IN, Yang XL, Dubale AA, et al. Hydrolysis of cellulose using cellulase physically immobilized on highly stable zirconium based metal-organic frameworks. *Bioresour Technol*, 2018, 270: 377-382.
- [13] Tian CC, Xu XY, Zhang HY, et al. Incorporating lanthanum into mesoporous silica foam enhanced enzyme immobilization and the activity of penicillin G acylase due to lewis acid-base interactions. *ChemBioChem*, 2020, 21(15): 2143-2148.
- [14] Liu WM, Luo JX, Zhuang XJ, et al. Efficient preparation of enantiopure L-tert-leucine through immobilized penicillin G acylase catalyzed kinetic resolution in aqueous medium. *Biochem Eng J*, 2014, 83: 116-120.
- [15] Falcaro P, Ricco R, Doherty CM, et al. MOF positioning technology and device fabrication. *Chem Soc Rev*, 2014, 43(16): 5513-5560.
- [16] Lin CP, Xu KL, Zheng RC, et al. Immobilization of amidase into a magnetic hierarchically porous metal-organic framework for efficient biocatalysis. *Chem Commun*, 2019, 55(40): 5697-5700.
- [17] Cheng KP, Svec F, Lv YQ, et al. Hierarchical micro-and mesoporous Zn-based metal-organic frameworks templated by hydrogels: their use for enzyme immobilization and catalysis of Knoevenagel reaction. *Small*, 2019, 15(44): 1902927.
- [18] Wu XL, Yue H, Zhang YY, et al. Packaging and delivering enzymes by amorphous metal-organic frameworks. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1-8.
- [19] Wu XL, Yang C, Ge J, et al. Polydopamine tethered enzyme/metal-organic framework composites with



- high stability and reusability. *Nanoscale*, 2015, 7(45): 18883-18886.
- [20] Liu X, Qi W, Yang YF, et al. A facile strategy for enzyme immobilization with highly stable hierarchically porous metal-organic frameworks. *Nanoscale*, 2017, 9(44): 17561-17570.
- [21] Lin CP, Tang XL, Zheng RC, et al. Efficient chemoenzymatic synthesis of (*S*)- $\alpha$ -amino-4-fluorobenzeneacetic acid using immobilized penicillin amidase. *Bioorg Chem*, 2018, 80: 174-179.
- [22] Jung SH, Park SS. Dual-surface functionalization of metal-organic frameworks for enhancing the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B in polar organic media. *ACS Catal*, 2017, 7(1): 438-442.
- [23] Chen BQ, Yin CH, Cheng YY, et al. Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: the effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability. *Biomass Bioenerg*, 2012, 39: 59-66.
- [24] Lin CP, Wu ZM, Zheng RC, et al. Continuous production of aprepitant chiral intermediate by immobilized amidase in a packed bed bioreactor. *Bioresour Technol*, 2019, 274: 371-378.
- [25] Chen QT, Liu D, Wu CC, et al. Co-immobilization of cellulase and lysozyme on amino-functionalized magnetic nanoparticles: an activity-tunable biocatalyst for extraction of lipids from microalgae. *Bioresour Technol*, 2018, 263: 317-324.
- [26] Jia DX, Xu HP, Sun CY, et al. Covalent immobilization of recombinant *Citrobacter koseri* transaminase onto epoxy resins for consecutive asymmetric synthesis of L-phosphinothricin. *Bioproc Biosyst Eng*, 2020, 43(9): 1599-1607.
- [27] Li ZX, Xia H, Li SM, et al. *In-situ* hybridization of enzymes and their metal-organic framework analogues with enhanced activity and stability by biomimetic mineralisation. *Nanoscale*, 2017, 9(40): 15298-15302.
- [28] Pei XL, Wu YF, Wang JP, et al. Biomimetic mineralization of nitrile hydratase into a mesoporous cobalt-based metal-organic framework for efficient biocatalysis. *Nanoscale*, 2020, 12(2): 967-972.

(本文责编 郝丽芳)