

中文摘要

血红蛋白-无机杂化纳米花的合成及其在卡宾反应中的应用

酶作为一种无毒并对环境友好的生物催化剂，因其催化性能高，反应条件温和及专一性强等特点，已被广泛地应用于有机合成中。由于游离酶难以回收利用，对反应条件要求严格，易失活等固有的局限性，限制了酶在工业生产中的实际应用。通过合适的固定化载体以及固定化方法将酶分子固定在载体基质中可有效克服酶的自身局限性，从而促进酶催化在工业生产领域更广泛的应用。

酶可以催化许多非天然反应，这种现象被称作“酶催化非专一性”，这一发现极大地扩展了酶在有机合成中的应用。血红素蛋白是一类含有铁卟啉的蛋白质（血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素、过氧化物酶等），具有催化多种非天然反应的能力，如氧化反应、卡宾转移反应和卡宾 X-H 插入反应。这些研究开辟了由血红素蛋白催化的有机反应类型的新世界。本课题组前期报道过血红蛋白可高效催化卡宾反应合成喹啉类化合物的路径，但游离血红蛋白难以回收利用，蛋白稳定性较差。为解决上述问题，通过将牛血红蛋白（VHb）和铜离子共同孵育来制备血红蛋白-磷酸铜杂化纳米花（Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs）并将其应用于催化卡宾反应合成喹啉类化合物。研究表明，Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 在该反应中表现出优异的催化性能，并且 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNF 重复利用 10 次后，依旧可获得高达 85% 的收率，表现出优异的重复利用性能。

除此之外血红素蛋白已经被很多研究证明可以催化卡宾 N-H 插入反应构建 C-N 键，为合成 α -氨基酸衍生物、 α -氨基酮和含氮杂环提供了简洁的途径。苯胺和重氮乙酸乙酯（EDA）为底物的卡宾 N-H 插入反应是评估血红素蛋白催化卡宾插入反应活性的反应模型，而血红蛋白催化的卡宾 N-H 插入反应还没有被探索过。本论文利用 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 来催化苯胺和重氮乙酸乙酯的卡宾 N-H 插入反应，探究该固定化酶的催化性能及可重复利用性等。在本研究过程中，我们通过控制单因素变量，从反应时间、反应温度和催化剂用量三方面对于反应条件进行了优化。在最适反应条件下：即苯胺（1 mmol），重氮乙酸乙酯（1 mmol），去离子水（10 mL），Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs（蛋白含量：15mg），

连二亚硫酸钠 (25 mg), 25°C, 12 h 时, 固定化酶催化卡宾 N-H 插入反应的催化产率可高达 87%, 而游离 Hb 的产率为 74%。此外, Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 在 15 次重复循环后产率仍高达初始产率的 75%, 这表明经过固定化制备的 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNF 具有优异的可重复利用性。本文的工作拓宽了血红蛋白催化的非天然反应的应用。

关键词:

血红素蛋白, 血红蛋白, 非天然反应, 固定化酶, 卡宾 N-H 插入反应, 血红蛋白-磷酸铜杂化纳米花

Abstract

Hemoglobin-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and applications for carbene reactions

As a kind of non-toxic and environmentally friendly biocatalysts, enzymes have been widely used in organic synthesis because of their high catalytic performance, mild reaction conditions and strong specificity. Because free enzymes are difficult to recover and reuse, strict requirements on reaction conditions, easy inactivation and other inherent limitations, the practical application in industrial production of enzymes is limited. The immobilization of enzyme molecules in the carrier matrix can overcome the limitations of enzyme effectively through appropriate immobilization carrier and immobilization method, so as to promote the wider application of enzyme catalysis in industrial production field.

The discovery that enzymes can catalyze many unnatural reactions, a phenomenon known as enzyme catalytic promiscuity, has greatly expanded the use of enzymes in organic synthesis. Hemoproteins are a class of proteins containing iron porphyrins (hemoglobin, myoglobin, cytochrome, peroxidase and so on) that have the ability to catalyze a variety of unnatural reactions, such as oxidation, carbene transfer, and carbene X-H insertion. These studies opened up a new world of types of organic reactions catalyzed by heme proteins. Our research group has previously reported that hemoglobin (Hb) can efficiently catalyze the synthesis of quinoxaline compounds by carbene reaction, but free Hb is difficult to recycle and has poor protein stability. To solve the above problems, we prepared hemoglobin-copper phosphate hybrid nanoflowers (Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs) by co-incubating bovine hemoglobin with copper ions and used it to catalyze carbene reaction to synthesize quinoxalines. The results show that Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs show excellent catalytic performance in this reaction, and Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs can still get up to 85% yield after repeated 10 times, showing excellent reuse performance.

In addition, many studies have proved that hemoproteins can catalyze carbene N-

H insertion reaction to construct C-N bond, which provides a simple way for the synthesis of α -amino acid derivatives, α -amino ketone and nitrogen heterocyclic rings. Carbene N-H insertion with aniline and ethyl diazoacetate (EDA) as substrates is a model for evaluating the activity of carbene insertion catalyzed by hemoproteins, but the carbene N-H insertion catalyzed by hemoglobin has not been explored. In this paper, Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs were used to catalyze carbene N-H insertion reaction between aniline and ethyl diazoacetate, to explore the catalytic performance and reusability of the immobilized enzyme. In this study, we optimized the reaction conditions from three aspects of reaction time, reaction temperature and catalyst dosage by controlling single factor variables. Under optimal conditions, aniline (1 mmol), ethyl diazoacetate (1 mmol), deionized water (10 mL), Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs (protein content: 15 mg), sodium hydrosulfite (25 mg), 25°C, 12 h, Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNF catalyzed carbene N-H insertion reaction yields up to 87%, and free Hb yields up to 74%. Furthermore, after 15 repetitions, the yield of Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNF was still up to 75% of the initial yield, indicating that the immobilized Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNF had excellent reusability performance. The work in this paper broadens the application of unnatural reactions catalyzed by hemoglobin.

Key words:

Hemoprotein, Hemoglobin, Non-natural reaction, Immobilized enzyme, Carbene N-H insertion reaction, Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNF

目 录

第一章 前言	1
1.1 酶催化非专一性	1
1.2 血红素蛋白催化非专一性	1
1.3 固定化酶概述及研究现状	5
1.3.1 酶的固定化概述	5
1.3.2 固定化酶的发展历史	5
1.3.3 固定化酶方法	6
1.3.4 固定化酶载体	7
1.4 有机-无机纳米花概述	8
1.4.1 纳米花的生长机理	8
1.4.2 纳米花材料分类	9
1.5 本论文的研究目的与主要内容	13
第二章 血红蛋白-磷酸铜纳米花的制备及表征	15
2.1 引言	15
2.2 实验部分	15
2.2.1 实验仪器	15
2.2.2 实验试剂	16
2.2.3 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 的制备及条件优化	16
2.2.4 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 的固定化率和蛋白载量	18

2.2.5 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 的表征	18
2.2.6 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 稳定性考察	19
2.3 结果分析	20
2.3.1 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 制备工艺优化结果	20
2.3.2 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 的固定化率和蛋白载量	23
2.3.3 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 的表征	23
2.3.4 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 稳定性考察	26
2.4 本章小结	28
第三章 血红蛋白-磷酸铜纳米花 催化卡宾反应合成喹喔啉类化合物	30
3.1 引言	30
3.2 实验部分	31
3.2.1 实验仪器	31
3.2.2 实验试剂	32
3.3 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 催化合成喹喔啉化合物	33
3.3.1 底物的制备	33
3.3.2 实验方法	33
3.3.3 反应条件优化	33
3.3.4 探究 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 在合成喹喔啉类化合物中的催化 性能	34

3.3.5 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 可重复利用性	34
3.4 结果与讨论	34
3.4.1 反应条件优化	34
3.4.2 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 在合成喹啉类化合物中的催化性能	36
3.4.3 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 可重复利用性	37
3.5 本章总结	38
3.6 目标产物表征	38
第四章 血红蛋白-磷酸铜纳米花催化卡宾 N-H 插入反应	40
4.1 引言	40
4.2 实验部分	40
4.2.1 实验仪器	40
4.2.2 实验试剂	41
4.3 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 催化卡宾 N-H 插入反应	41
4.3.1 实验方法	41
4.3.2 探究 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 卡宾 N-H 插入反应中的催化性能	42
4.3.3 反应条件优化	43
4.3.4 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 可重复利用性	44
4.4 结果与讨论	44

4.4.1 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 卡宾 N-H 插入反应中的催化性能	44
4.4.2 反应条件优化	45
4.4.3 Hb-Cu ₃ (PO ₄) ₂ HNFs 可重复利用性	47
4.5 本章小结	48
4.6 目标产物表征	49
第五章 总 结	50
参考文献	52
附 录	68
硕士期间发表论文	70
致 谢	71

中英文缩略语对照表

缩略语	英文全称	中文名称
Hb	Hemoglobin	血红蛋白
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
PPL	Porcine pancreatic lipase	猪胰脂肪酶
Mb	Myoglobin	肌红蛋白
HPR	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HNFs	Hybrid nanoflowers	杂化纳米花
Cyt C	Cytochrome C	细胞色素 C
BCA	Bicinchoninic acid method	二喹啉甲酸法
EDA	Ethyl diazoacetate	重氮乙酸乙酯
DI Water	Deionized water	去离子水
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸缓冲液

第一章 前言

1.1 酶催化非专一性

随着人类社会的进步和发展，医药、纺织、造纸、化工、食品加工，环保和能源开发等领域也不断创新发展，这些领域发展同时势必伴随着有机化学反应的发生，而在有机化学反应中常会利用一些有毒的金属催化剂、强而昂贵的氧化剂甚至会产生一些有毒有害物质，对环境生态以及人类健康都会造成一定的影响。在工业的发展的同时我们更应该兼顾对于环境的保护^[1-4]。而酶作为一种无毒并对环境友好的生物催化剂，因此可替代传统有机化学反应中的催化剂，为生态环境提供可靠的保护，从而使有机化学反应更加绿色环保，是实现“绿色化学”的一个重要手段^[5]。

酶是一种由活细胞产生并且具有催化能力的蛋白质或 RNA。近年来，由于酶具有高效的催化活性，反应条件温和以及专一性强等特点而被广泛应用在化学合成、食品、污染处理等领域。在先前的研究中通常认为酶具有专一性，即酶对所作用的底物有严格的选择性，一种酶只能作用于一种底物，或一类分子结构类似的底物，促其进行特定的化学反应，这种选择性作用的现象则被称为酶的专一性。这种专一性在一定程度上限制了酶的应用。然而近些年研究已发现，许多酶除了催化水解酯化等传统反应外，还能催化其他多种类型的反应，这种非特异性作用的现象被称为“酶催化非专一性”（Enzyme catalytic promiscuity）^[6-11]。“酶催化非专一性”这一特性有力的促使科研人员对于酶催化的新型有机反应的挖掘。这种酶的非专一性催化和有机化学的结合，极大的拓宽了酶在有机化学领域的应用前景^[16-18]。

1.2 血红素蛋白催化非专一性

血红素蛋白，是一组以血红素（铁卟啉）为辅基的蛋白质。包括血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素、过氧化氢酶以及某些过氧化物酶。这些血红素蛋白承担着很多重要的生物学功能，与氧的结合和传递（如肌红蛋白 Mb 和血红蛋白 Hb），电子转移（如细胞色素 c 和细胞色素 b），催化（如过氧化物酶和细胞色素 P450）到信号传导（如 CO 传感器）^[19-26]。其中血红素蛋白令人印象深刻的

催化功能是显而易见的，它可以促进一系列具有化学挑战性的氧化转化。几十年来，血红蛋白一直是科研者的灵感来源并致力于挖掘血红蛋白在体外催化非天然化学反应的功能^[27-34]。

近年来，科研人员们基于近年来对血红蛋白催化反应的理解，结合定向进化等工程技术，提供了一套强大的血红蛋白催化剂。血红蛋白在氧化反应（羟基化、环氧化和亚砷化）和卡宾介导的转化合成应用中，是一类很有前途的生物催化剂。现在已经有研究表明含血红素的酶和蛋白质是“非生物”卡宾转移反应的功能性生物催化剂如图 1.1 所示，包括烯烃环丙烷化，Y-h 卡宾插入（其中 Y = N, S, B, 或 Si），C-H 功能化，乙基重排，醛烯炔化等^[35-48]。

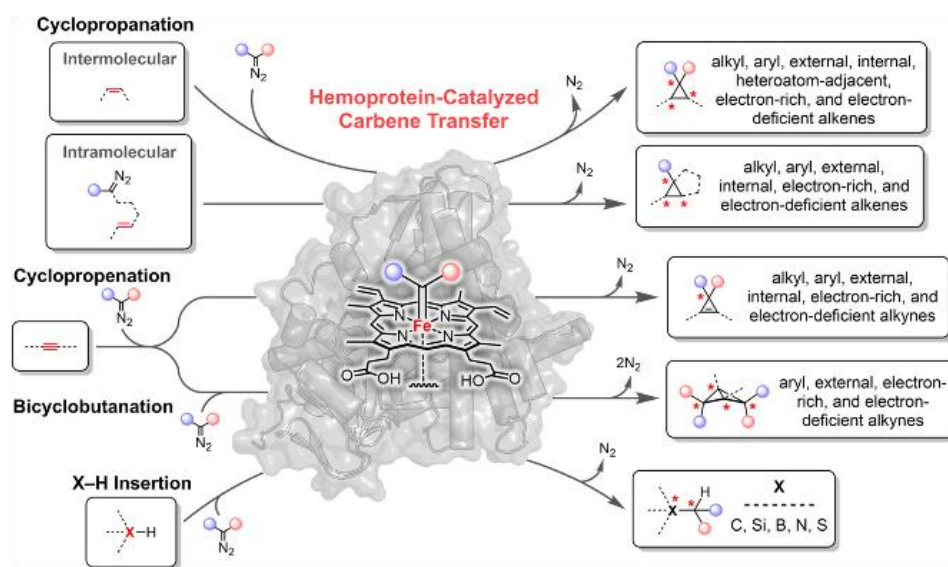


图 1.1 血红蛋白催化卡宾转移的反应^[49]

Fig 1.1 Carbene-transfer reactions catalyzed by hemoproteins

Noah P. Dunham 等科研人员已经利用天然血红蛋白（细胞色素 P450）以及定向进化的血红蛋白依赖的细胞色素 P450，作用于苯乙烯环丙烷化这个非天然有机化学反应，与传统的合成方法相比具有温和和高效的优势^[49]。Pedro S 同样报告了来自巨型芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）的细胞色素 P450 变体（P450BM3）是介导卡宾反应苯乙烯环丙烷反应的有效催化剂，并探索了一些常见的血红蛋白是否在水介质（磷酸盐缓冲液，5%甲醇共溶剂）中显示催化活性。他们选择了苯乙烯和重氮乙酸乙酯（EDA）之间的反应，这是一个公认的模型系统，用于验证新的环丙烷催化剂。初步实验表明，在厌氧条件下，还原剂（例如连二亚硫酸钠， $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ）存在时，辣根过氧化物酶（HRP）、细胞色素 c（cyt c）、肌红蛋白（Mb）和 P450BM3 对该反应均有催化效果。这些开

创性的研究打开了由血红素蛋白催化的非生物反应的闸门^[50]。并且 Fasan 等研究人员，利用工程化肌红蛋白具有选择性可调控的特点，探索基于肌红蛋白作为卡宾转移酶在非天然化学反应合成中的应用^[51]。

除了在卡宾转移中的应用外，血红素蛋白也被发现并被改造为与卡宾类似的氮宾转移的高效转移酶，如图 1.2 所示。在上世纪 80 年代就有研究发现，血红素蛋白可以将氮宾中间体插入到 C-H 键中^[52]。然而直到 2013 年，科研人员才通过定向进化的方法将这种反应性进行进一步的开发和改进^[53]。Singh 等科研人员也研究报道了细胞色素 P450 作为构成了支持芳基磺酰叠氮化物分子内 C-H 胺化生成环胺的有效催化剂^[54]。Prior 等报道了一种基于细胞色素 P450 单加氧酶的含铁酶催化剂的定向进化，用于苯基 C-H 键的高度对映选择性分子间胺化，该生物催化剂具有优良的对映体选择性，并可用于制备有价值的苄基胺^[55]。

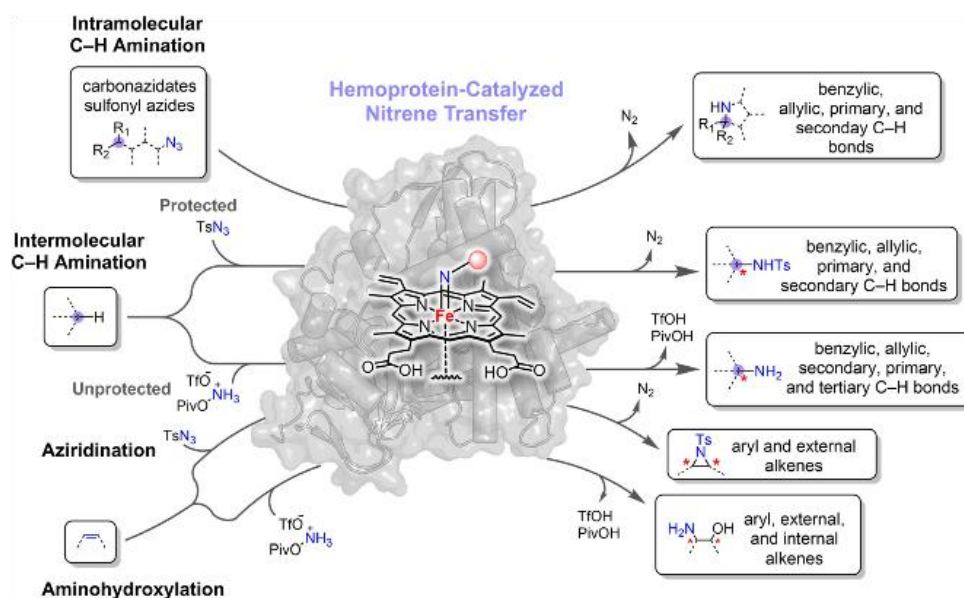


图 1.2 血红素蛋白催化氮宾转移的反应^[49]

Fig 1.2 Nitrene-transfer reactions catalyzed by hemoproteins

血红蛋白是一种重要的血红素蛋白，在一些体外研究，血红蛋白具有氧化活性，可作为一种模拟过氧化物酶，可用于催化多环芳烃、酚类等有机污染物的氧化，表现出优良的催化性能^[56-58]。并且由于血红蛋白来源广、价格低、稳定性高的优点，所以现被广泛研究开发应用于催化一些新型非天然化学反应中。促进了酶在绿色合成中的发展和应用。

Liu 等研究已证明，可通过改良的方法制备一种含有 Hb 的生物催化剂，能有效降解和去除有机废水中有毒且难以降解的芳香族化合物（ACs），如苯胺、

苯酚等。在 25°C、pH 7.0、PEG (0.1826 mg·mL⁻¹) 的条件下反应 3 h 后, 血红蛋白 (40 U) 对于苯胺 (5 mM) 的去除率可高达 76%^[59]。

李奉熙等人首次以血红蛋白 (Hb) 作为催化剂, 催化苯并恶唑通过氧化环合反应制备出 2-取代苯并恶唑, 如图 1.3 所示。采用该工艺, 可获得高收率的 2-取代苯并恶唑。并且该制备方法的反应条件温和, 可放大, 具有较高的实际应用价值。因此, 该方法有望成为合成 2-取代苯并恶唑的一种替代方法。此外, 该研究为血红蛋白催化有机反应类型提供了新范例, 有望扩大血红蛋白在有机合成中的应用^[60]。

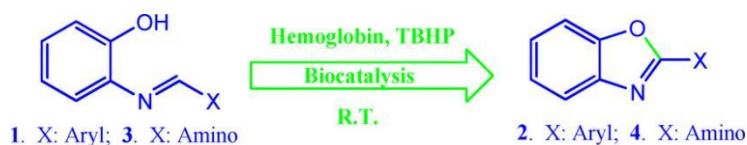


图 1.3 血红蛋白催化合成 2-取代苯并恶唑^[60]

Fig 1.3 Synthesis of 2-substituted benzoxazoles catalyzed by hemoglobin

李奉熙等进一步利用血红蛋白具有卡宾转移酶催化活力的特点, 构建了“一锅法”血红蛋白 (Hb) 和脂肪酶 (PPL) 双蛋白催化乙酰乙酸乙酯、对甲基苯磺酰叠氮以及邻苯二胺三组分在水相中合成喹喔啉类化合物的方法, 产率可高达 95%, 且具有较好的位置选择性, 如图 1.4 所示。这项作为喹喔啉类化合物的合成提供了一种绿色温和的策略^[61]。

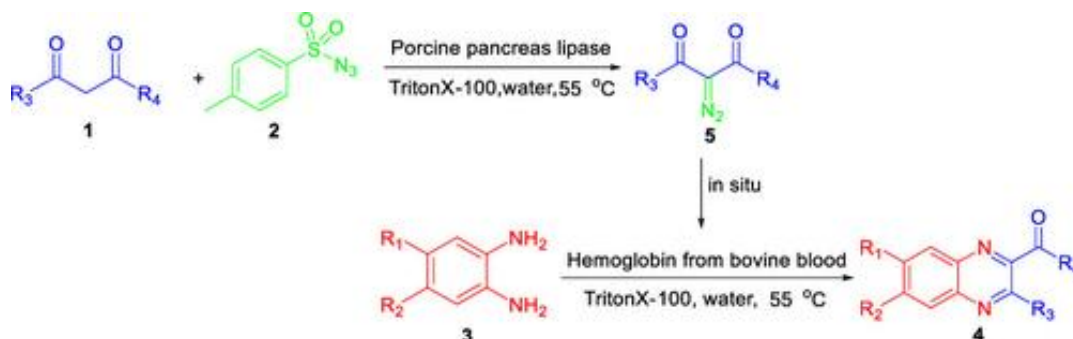


图 1.4 脂肪酶-血红蛋白催化合成喹喔啉^[61]

Fig 1.4 Lipase-Hemoglobin system for the synthesis of quinoxalines

此外 Haecin Keum 等人采用血红蛋白催化的生物催化反应测定了多环芳烃 (PAHs) 的去除效率。以芘作为多环芳烃的模型, 研究其在 H₂O₂ 和血红蛋白质量比为 3:1 的条件下的氧化去除。在 H₂O₂ 和血红蛋白的作用下, 对芘的去除率可达 91.1%。而仅在 H₂O₂ 作用下芘的去除率为 21.3%。该研究结果表明, 血红蛋白的催化氧化可能是去除芘的主要原因^[62]。

综上所述, 血红蛋白可以催化多种非天然有机反应类型, 并表现出优异的

催化性能，但为了克服血红蛋白在溶剂中难以回收、在反应中活性低、稳定性差等缺点，通常选用合适的固定化载体和固定化方法对血红蛋白进行固定化，以提升血红蛋白的重复利用性能、酶活力以及稳定性等，所以固定化血红蛋白的研究是具有十分重要的研究价值和意义。

1.3 固定化酶概述及研究现状

1.3.1 酶的固定化概述

酶作为一种无毒并对环境友好的生物催化剂，具有高效的催化性能、反应条件温和、优良的立体选择性和位置选择性等特点，已被广泛应用于医药、纺织、造纸、化工、食品加工、环保和能源开发等领域^[63-68]。然而，由于常用的游离酶在非水环境中的活性和稳定性较低，投入用量大且难以与底物分离，不能回收重复利用，对反应条件要求严格，易失活等缺点，从而大大限制了其在工业生产中的实际应用^[69]。在上述背景下，将酶固定在固体载体上似乎是提高有机介质活性的一种有效方法^[70-78]。所以固定化酶技术在酶催化应用领域中逐渐吸引更多科研者的关注并显现出巨大的应用前景。

酶固定化技术是通过物理或化学的方法将游离酶连接在一定的不溶性固体载体上，限制酶分子在一定区域内发挥作用，从而提高酶的稳定性、催化活性和对极端环境的耐受性，并且通过这种方式得到的固定化酶，易从体系中分离并进行重复利用，从而降低工业成本^[79-85]。由于固定化酶比游离酶有更多的优势，酶固定化技术已得到广泛科研工作者的关注，酶固定化技术的研究开发，大大推动了酶在医药、纺织、造纸、化工、食品加工，环保和能源开发等领域中的实际应用，并且也取得了许多重大成果^[86-93]。影响固定化酶性能的主要两个因素是固定化酶方法和载体的选择，所以为最大程度保持酶固有的优良性能同时提升固定化酶性能，我们应该根据酶自身的性质选择合适的固定化方法和固定化载体。

1.3.2 固定化酶的发展历史

固定化酶的研究是起始于 1916 年，Nelson 和 Grlmn 发现了酶的固定化现象，自此以后科学人员们就逐渐开展了许多关于固定化酶的研究。正式开展固定化酶的研究是于 20 世纪 60 年代，研究人员固定化氨基酰胺酶用于 L-氨基酸的生

产，是首次将固定化酶在工业上进行大规模应用^[94]。1971年在首届酶工程会议上，首次提出“固定化酶”这个名称，到20世纪80年代，固定化酶已经在世界范围引起科研人员的广泛关注和研究。

1.3.3 固定化酶方法

传统的酶固定化方法主要可分为吸附法、包埋法、交联法、共价结合法以及亲和固定法^[95]，如图1.5所示。

(1) 吸附法

吸附法是利用各种吸附剂（如：活性炭、分子筛、硅胶、硅藻土等）将酶吸附在载体表面的方法。该方法主要是利用一些分子间弱相互作用力（范德华力、疏水作用力和氢键等）实现将游离酶固定在载体上。通过该种固定化方法虽然结合力较弱，但是操作简单、条件温和、能够保持酶分子的原有结构，载体种类多、易于回收利用，从而降低成本，被广泛应用在酶固定化领域。根据酶和载体的结合作用力的不同，吸附法又可以分为物理吸附法和离子吸附法。离子吸附法的吸附量一般情况下大于物理吸附法。

(2) 包埋法

包埋是指在材料制备过程中将酶包埋在网络或中空纤维或微胶囊中，从而使其固定化的方法，该方法可以为酶提供一个稳定的微环境。根据载体的材料选择和方法的不同，可将包埋法分为凝胶包埋法（网格型包埋法）、半透膜包埋法（微囊型包埋法）。而半透膜包埋法因其具有比表面积大的特点而被广泛使用。包埋法操作简便、条件温和、稳定性好、容量大、酶不易泄露等优点，被广泛应用在酶固定化领域。包埋法常用的载体有琼脂糖、明胶、醋酸纤维素、聚丙烯酰胺等。

(3) 交联法

交联法是指利用具有双功能或多功能试剂和酶分子上的氨基或羧基发生反应，在双功能或多功能试剂和酶之间进行交联形成共价键，得到不溶于水的聚集体，从而实现酶的固定化的方法。根据交联载体的不同，可将交联法分为：酶交联法、惰性蛋白交联法以及载体交联法三种。我们广泛应用的是载体交联法，常见的交联试剂有戊二醛、双偶氮苯、己二胺、顺丁烯二酸酐、异氰酸衍生物等。

(4) 共价结合法

共价结合法是将带有活性基团的不溶性载体和酶蛋白上的一些特殊基团（如氨基，羧基或酪氨酸和组氨酸中的芳香环）反应形成共价键，从而实现将酶固定在载体上的方法。该法优点是酶和载体之间有较强的结合力，即使在反应条件较为苛刻的条件下，酶也不易从载体上脱落，从而提高重复利用率。是固定化酶最常用的方法之一。共价结合发常用的载体有：琼脂糖、纤维素等。

（5）亲和固定法

亲和固定法是通过支持物上的官能团（如亲和素）与蛋白质序列上的亲和标记（如生物素）之间的亲和键进行连接，这种方法允许控制生物分子的方向，以避免酶失活和/或活性位点阻断。几种亲和方法已被描述通过（链）亲和素-生物素，凝集素-碳水化合物和金属阳离子-螯合物相互作用固定化酶。酶可以在其序列中包含亲和标记（例如糖片段），但在某些情况下，亲和标记（例如生物素）需要通过位点定向突变、蛋白质融合技术和转录后修饰等基因工程方法附着在蛋白质序列上。

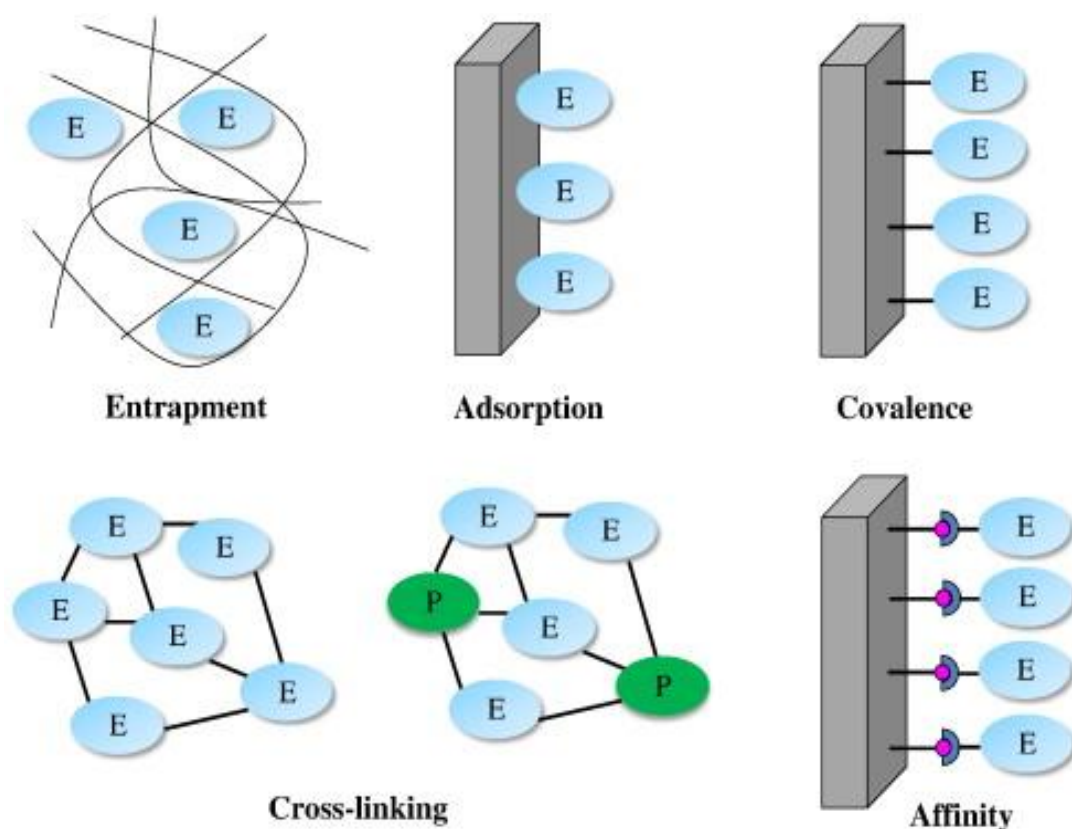


图 1.5 酶固定化的方法示意图^[95]

Fig 1.5 Schematic diagram of enzyme immobilization method

1.3.4 固定化酶载体

对于固定化酶来说,载体材料的选择至关重要,载体材料选择决定固定化酶的最终性能。理想的固定化材料应该具备无毒无害、成本低、机械强度大、稳定性高、良好的生物相容性、环境耐受性强和耐微生物分解等特性^[96-98]。

载体材料因其化学组分的不同而被分为无载体材料、有机载体材料和复合载体材料三大类。常见的无载体材料有活性炭、沸石、二氧化硅、硅藻土和金属氧化物等,因其具有较高的化学稳定性、机械强度和较低的使用成本而被广泛使用^[99-104]。而常见的天然有机载体材料有纤维素、壳聚糖和琼脂等,具有生物相容性好、无毒等特性而被广泛使用^[105-112]。部分合成的有机载体材料因其表面基团丰富、比表面积大等优良特性也被广泛使用,如:聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚丙烯腈、聚乙烯醇^[113-119]等。随着固定化酶技术的不断研究和发展,很多新型材料也被开发用于进行酶的固定化,如新型纳米材料、磁性高分子微球和新型介孔材料等。

1.4 有机-无机纳米花概述

20世纪60年代,酶固定化技术的发展激发了化学家们设计含有高度稳定酶的新型生物材料。然而,固定化通常会导致酶活性的丧失。到20世纪90年代,固定化在纳米材料上的酶的活性可以保持在与游离酶相同的水平。随着2012年第一个有机-无机杂交纳米花的发现,这一领域的兴趣再次被唤醒,许多新型纳米材料的研究仍在进行中^[120-123]。

自21世纪初开始对新型纳米材料的研究以来,各种具有迷人形貌的纳米材料被开发出来,如核壳结构、Janus粒子和纳米管^[124-128]等。在这些新型纳米结构中,纳米花的形态特征因其比球形纳米颗粒具有更高的比表面积而引起了科研人员们的兴趣^[129-130]。当以酶作为有机组分,金属离子作为无机组分构成的花状有机-无机杂化纳米结构显示出比游离和传统固定化酶更高的酶活性和稳定性^[131-133]。这为酶的固定化提供了一种新的方法,并且该合成方法只需要在金属离子溶液中加入蛋白质就可以制备出纳米结构,操作过程简便安全,不需要任何有毒元素或极端恶劣的条件^[134-137]。并且该固定化酶在反应体系中易回收并可以重复利用。因此,纳米花的合成受到了研究者们广泛的关注,并且被广泛应用于生物催化和模拟酶、组织工程、高灵敏度生物传感试剂盒设计开发中^[138-142]。

1.4.1 纳米花的生长机理

纳米花生长机理如图所示：以 Cu^{2+} 为无机组分，酶为有机组分为例制备纳米花，其生长过程主要分为 3 个阶段：(1) 初生晶体的成核和形成。(2) 晶体生长。(3) 纳米花的形成^[131, 143]。

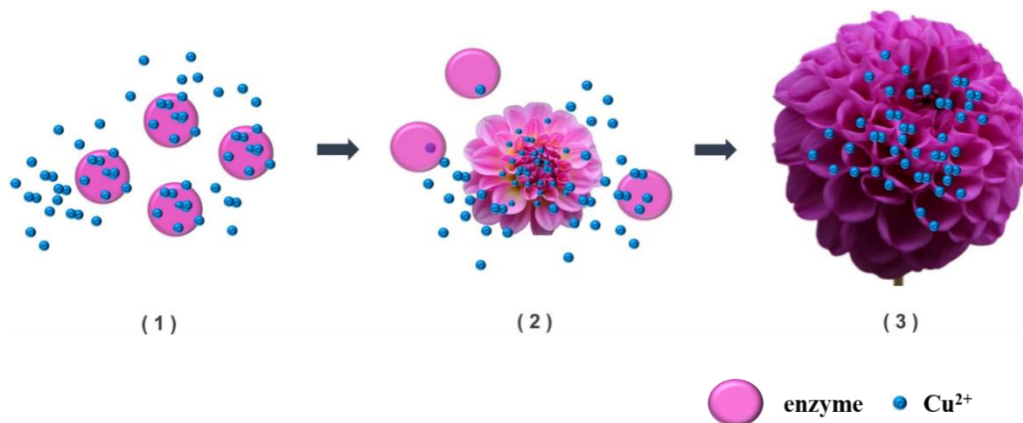


图 1.6 有机-无机杂化纳米花的形成机制

(1)初生晶体的成核和形成 (2)晶体的生长 (3)纳米花的形成^[131]

Fig 1.6 The formation mechanism of organic-inorganic hybrid nanoflowers

(1) nucleation and formation of primary crystals (2) crystal growth

(3) nanoflowers formation

最初，生长早期是金属磷酸盐初生晶体的形成，在这一阶段，酶（蛋白质）主要通过蛋白质主链上的酰胺基团与金属离子（ Cu^{2+} ）进行配位形成复合物。这些复合物为初生晶体的成核提供了一个位置。在第二生长阶段，蛋白质分子的聚集和初级晶体的形成。聚集体表面的单个 Cu^{2+} 位点促进了磷酸铜晶体的生长，形成初级花瓣。在最后一步，各向异性生长导致完全形成一个分枝的花状结构。在这个生长过程中，蛋白质诱导金属磷酸盐晶体成核，形成花瓣的支架，并起到“胶水”的作用，将花瓣粘合在一起。

1.4.2 纳米花材料分类

“有机-无机杂化纳米材料”，顾名思义，所有的无机纳米颗粒成分都与有机材料结合在一起。其纳米花的性质随着有机组分和无机组分的变化而变化。主要分为两类：①有且只有一种蛋白作为有机组分和无机组分（金属离子）相互作用形成的纳米花。②有两种或两种以上蛋白作为有机组分和无机组分（金属离子）相互作用形成的纳米花。

1.4.2.1 单蛋白掺入纳米花

Wu 等以漆酶为有机组分， Cu^{2+} 为无机组分，制备出固载漆酶的杂化纳米花，并将其用于葡萄黄素的合成反应中，与游离漆酶催化活性相比，固载漆酶的纳米花催化活性提高了 2.2 倍左右。此外，与游离漆酶在含铜离子（类似于纳米花合成中铜离子浓度）的溶液中相比，纳米花中的漆酶比活性增加了 180%。结果还表明，在重复循环 10 次后，漆酶在纳米花保留了 93.2% 的初始酶活力，固定化漆酶相较于游离漆酶具有优良的重复使用性、pH 稳定性和热稳定性，有效解决了游离漆酶自身的局限性^[144]。

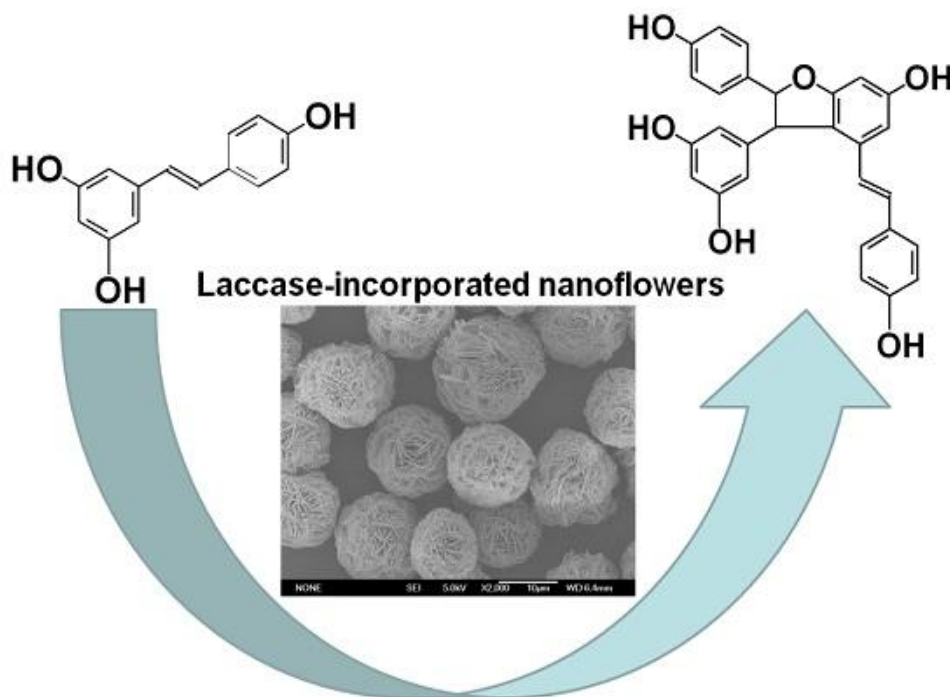


图 1.7 漆酶杂化纳米花催化合成葡萄素^[144]

Fig 1.7 Synthesis of Viniferin catalyzed by laccase-incorporated nanoflowers

Jiang 等分别以脂肪酶（PPL）为有机组分， Cu^{2+} 作为无机组分，获得了固载脂肪酶（PPL）的杂化纳米花。该纳米花可以成功催化对硝基苯辛酸酯的酯类水解反应，证实了被固载到该载体上的脂肪酶能保持良好的活性和稳定性。并且通过利用该酶载纳米花催化葵花籽油生产生物柴油，其转化率可达到 95% 以上。并且在该实验中该酶载杂化纳米花在该反应中还有良好的抗甲醇性以及可回收性，综上所述，有机-无机杂化纳米花与传统固定化方法相比，能够提高酶的催化活性、稳定性以及可重复利用性，其在酶学催化中具有广阔的发展前景^[145]。

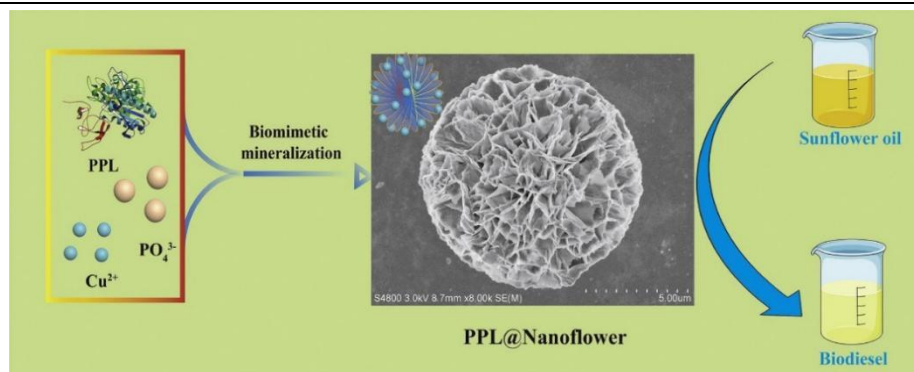


图 1.8 PPL@Nanoflower 催化葵花籽油合成生物柴油^[145]

Fig 1.8 Synthesis of biodiesel from sunflower oil by PPL@Nanoflower

此外，Zhang 等以报道了一种以 Mn^{2+} 作为无机组分制备的 $Mn_3(PO_4)_2$ 类纳米花的电学生物传感器用于莱克多巴胺（RAC）的检测。采用自组装法合成了 $Mn_3(PO_4)_2$ —蛋白质杂化纳米复合材料，其中免疫球蛋白 G（IgG）、牛血清白蛋白(BSA)和莱克多巴胺抗体（RACanti）等蛋白质作为有机组分，制备了三种纳米复合材料，即 $Mn_3(PO_4)_2$ 与 IgG 的纳米复合材料（ $Mn_3(PO_4)_2@IgG$ ）、RACanti（ $Mn_3(PO_4)_2@RACanti$ ）和 BSA 与 Au 纳米颗粒（ $Mn_3(PO_4)_2@BSA@AuNPs$ ）。以评价基于 $Mn_3(PO_4)_2$ 类纳米花的不同生物传感器的效率。结果表明，这些 $Mn_3(PO_4)_2$ 类纳米花具有较高的化学活性和良好的电化学性能，并且这类纳米复合材料制备简单、功能化程度高、生物分子结合量大、生物相容性好，可应用于食品添加剂检测，与其他方法相比，生物传感器具有快速、简单、灵敏等优点^[146]。

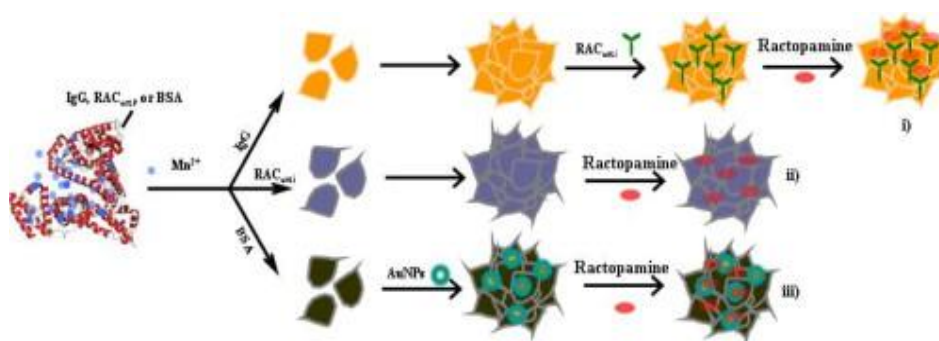


图 1.9 $Mn_3(PO_4)_2$ 纳米花作为一种新型电学生物传感器用于检测拉克多巴胺的合成原理图，包括(i) $Mn_3(PO_4)_2@IgG$ ，(ii) $Mn_3(PO_4)_2@RACanti$ ，和(iii) $Mn_3(PO_4)_2@BSA@AuNPs$ 纳米花^[146]

Fig 1.9 Fabrication schematic diagram of $Mn_3(PO_4)_2$ —based nanoflower as a novel electrochemical biosensors for RAC detection, including (i) $Mn_3(PO_4)_2@IgG$, (ii) $Mn_3(PO_4)_2@RACanti$, and (iii) $Mn_3(PO_4)_2@BSA@AuNPs$ nanoflowers

1.4.2.2 多蛋白掺入纳米花

张柳等制备出一种以葡萄糖氧化酶 (Gox) 和脂肪酶 (PPL) 双酶为有机组分, Cu^{2+} 为无机组分, 孵育而成的双酶共包埋有机-无机杂化纳米花, 用于烯烃的环氧化反应。该实验结果表明, 相较于游离的葡萄糖氧化酶 (Gox) 和脂肪酶 (PPL) 来说, 双酶纳米花催化性能更高, 且反应重复循环 10 次后, 产率仍可高达 82%^[147]。

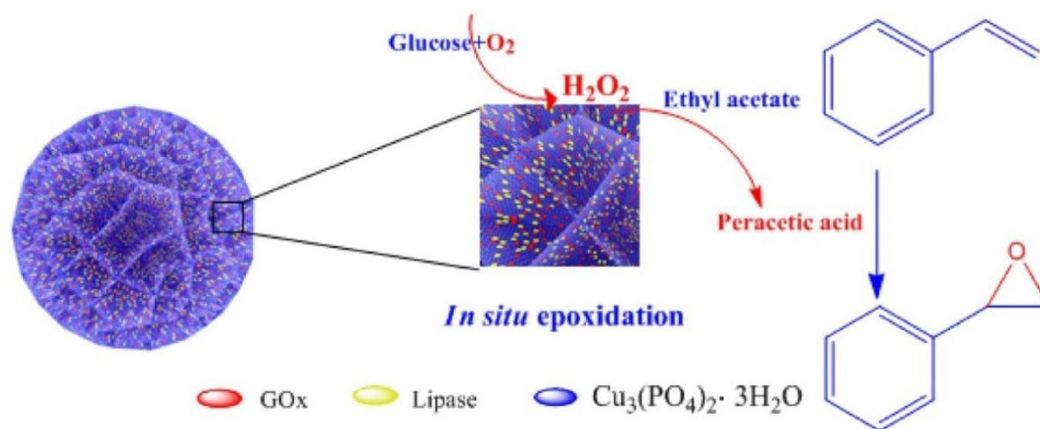


图 1.10 双酶纳米花介导烯烃环氧化反应的研究^[147]

Fig 1.10 The process of epoxidation of alkenes mediated by dual-enzyme nanoflower

Sun 等人以葡萄糖氧化酶 (GOx) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 双酶作为有机组分, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 为无机组分, 制备双酶共包埋有机-无机杂化纳米花 (GOx&HRP- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ nanoflowers), 纳米花的葡萄糖氧化酶 (GOx) 组分氧化葡萄糖生成过氧化氢 (H_2O_2), H_2O_2 再与纳米花上相邻的辣根过氧化物酶 (HRP) 组分氧化显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB), 从而产生明显的颜色变化。由于在单个纳米花中, 两种酶组分的距离很近, 这种新型传感器大大减少了 H_2O_2 的扩散和分解, 从而大大提高了葡萄糖检测的灵敏度。因此, 所得到的多酶共包埋有机-无机杂化纳米花可以作为葡萄糖检测的高灵敏度比色传感器^[148]。

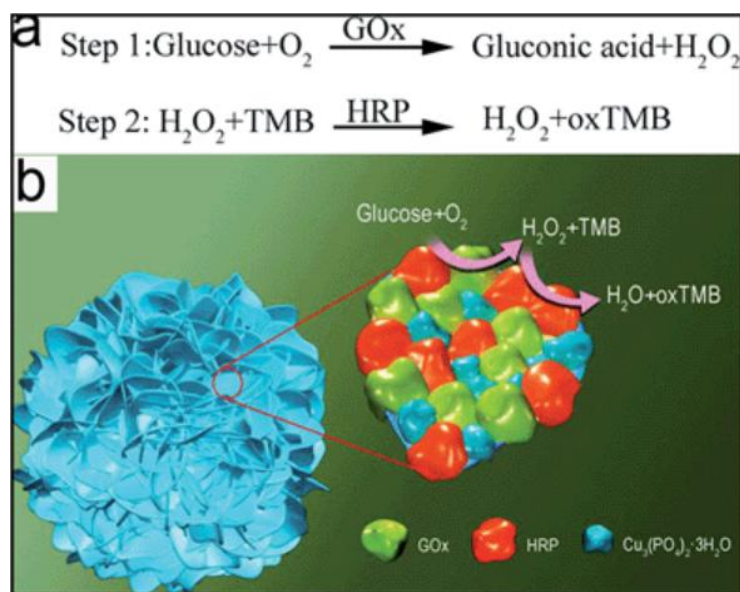


图 1.10 (a) 利用 GOx&HRP-Cu₃(PO₄)₂·3H₂O 纳米花检测葡萄糖的级联反应

(b) GOx&HRP-Cu₃(PO₄)₂·3H₂O 纳米花检测葡萄糖的机理^[148]

Fig 1.10 (a) The glucose cascade reaction was detected by GOx&HRP-Cu₃(PO₄)₂·3H₂O nanoflowers (b) Mechanism of glucose detection by GOx&HRP-Cu₃(PO₄)₂·3H₂O nanoflower

综上所述，有机-无机杂化纳米花引起了科研人们的研究兴趣，并已经发表了大量相关论文。并且纳米花是利用简单的合成方法和在安全的制备条件下制备而成。此外，杂交纳米花易于实现高效和酶的稳定性，其在生物技术、生物医学、环境化学乃至工业生物催化方面都有很大的应用潜力，我们也相信有机-无机杂交纳米花的研究将为生物材料和生物技术产业的快速发展带来创造性的解决方案。

1.5 本论文的研究目的与主要内容

受到以上研究成果启发，本文以牛血红蛋白作为有机组分，铜离子作为无机组分制备出血红蛋白-磷酸铜杂化纳米花，应用于一些非天然有机反应中，以下为本文的主要研究内容：

(1) 血红蛋白-磷酸铜纳米花的制备和优化

本篇论文我们以牛血红蛋白作为有机组分，铜离子作为无机组分制备血红蛋白-磷酸铜杂化纳米花，并从温度、离子浓度和蛋白浓度三方面对纳米花的制备条件进行优化，通过扫描电子显微镜（SEM）、傅里叶红外光谱（FT-IR）和

X 射线衍射光谱 (XRD) 对其进行表征和分析, 并对纳米花的热稳定性和储存稳定性进行考察。

(2) 血红蛋白-磷酸铜纳米花在催化卡宾反应合成喹啉类化合物

我们课题组在先前的研究中, 提出了一种绿色高效的喹啉类化合物制备路径, 即首次利用酶的方法催化合成喹啉类化合物, 但为解决酶难回收的问题, 所以本文将我们所制备的血红蛋白-磷酸铜纳米花应用于该有机反应中, 探究血红蛋白-磷酸铜纳米花在该反应中的催化性能及其可重复利用性。

(3) 血红蛋白-磷酸铜纳米花在卡宾 N-H 插入反应中的应用

我们首次利用血红蛋白催化苯胺和重氮乙酸乙酯 (EDA) 的卡宾 N-H 插入反应, 并将制备的血红蛋白-磷酸铜纳米花也应用于该反应中, 探究固定化血红蛋白在该有机反应中的催化性能以及固定化酶的可重复利用性。

第二章 血红蛋白-磷酸铜纳米花的制备及表征

2.1 引言

为发展更有效和更清洁的化学反应，生物催化表现出强大的优势，酶催化具有反应条件更温和、催化效率更高、环境更友好绿色等优点，所以酶催化已经成为化工合成和生产中一强有力的工具^[149]。

自固定化酶技术出现以后，研究人员们发现固定化酶具有提高游离酶的活性，稳定性高及容易从体系中回收并重复利用等优点而被广泛应用于有机化学合成中^[150-151]。固定化酶的过程中选择适宜的载体可以保护蛋白分子的空间结构不被破坏，保护酶的活性中心，从而保持酶分子的催化活性。所以选择合适的固定化载体至关重要^[152]。此前，已经有报道蛋白质作为有机组分，金属离子作为无机组合，制备出有机-无机杂化纳米花，杂化纳米花是有机分子和无机分子在阴离子和阳离子静电作用下自组装而成的，合成方法安全且制备过程简单。杂交纳米花易于实现酶催化的高效性和酶的稳定性。因此有机-无机杂化纳米花引起了科研人员们的研究兴趣，并已经发表了大量相关论文^[144-148]。受到以上研究的启发，本文以牛血红蛋白（Hb）作为有机组分， Cu^{2+} 作为无机组分，通过低温孵育制备出血红蛋白-磷酸铜杂化纳米花（Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs），并将其作为催化剂应用于有机化学合成中。在制备 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 的过程中，我们利用血红蛋白具有的过氧化物酶活力来评估其固定化蛋白的活力，并从温度、蛋白浓度以及金属离子浓度三方面探究 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 制备的最适条件，利用扫描电子显微镜（SEM）、傅里叶红外光谱（FT-IR）以及 X 射线衍射（XRD）对 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 进行表征和分析。

2.2 实验部分

2.2.1 实验仪器

主要仪器及购买商家:

编号	仪器名称	购买商家
1	JJ224BC 型分析天平	昆山巨天仪器设备有限公司
2	BSA223S-CW 电子天平	昆山巨天仪器设备有限公司
3	恒温水浴锅	北京市水光明医疗仪器有限公司
4	恒温振荡培养箱	哈尔滨东联电子技术有限公司
5	Nicolet 5700 型傅里叶红外光谱仪	Thermo Fisher Scientific
6	BOT-IA 型三用紫外分析仪	山东一矿机械设备有限公司
7	数显控温磁力搅拌器	常州市金坛大地自动化仪器厂
8	台式高速冷冻离心机	湖南湘立科学仪器有限公司
9	通风橱	北京森雷普实验室设备有限公司
10	KQ-250DE 型数控超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
11	真空冷冻干燥机	郑州冰雪时代设备有限公司
12	钨灯丝扫描电子显微镜	日本电子株式会社
12	XRD 衍射仪 (XRD-6000)	日本岛津

2.2.2 实验试剂

本实验主要试剂及购买商家:

编号	药品名称	购买商家
1	Bovine hemoglobin	上海源叶科技有限公司
2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	毕得医药
3	邻甲氧基苯酚 (愈创木酚)	安耐吉化学
4	过氧化氢 (30%)	安耐吉化学
5	二辛可酸 (BCA)	安耐吉化学
6	溴化钾	安耐吉化学
7	磷酸缓冲液/PBS (pH 7.4)	上海化学试剂有限公司

2.2.3 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的制备及条件优化

2.2.3.1 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的制备

取 10 mg 牛血红蛋白溶于 100 mL PBS (PH 7.4, 0.01M) 中, 配置成 0.1

mg/mL 的血红蛋白溶液，加入 CuSO_4 (1200 μL , 500 mM) 溶液，混合均匀后放置在 4°C 低温室内静置孵育 48 h，在 6000 rpm 下离心 10 min 收集得到固定化血红蛋白，并用去离子水 (DI) 洗涤所得固定化酶 2-3 次，去除固体表面残余未固定上的游离血红蛋白。

2.2.3.2 血红蛋白酶活性测定

动物血红蛋白是红细胞内运输氧的特殊蛋白质，它是一种球状蛋白，由四个多肽亚基组成，每个亚基包含一个血红素（铁卟啉）作为活性中心。在一些体外研究，血红蛋白具有氧化活性，可作为一种模拟过氧化物酶，可用于催化多环芳烃、酚类等有机污染物的氧化，表现出优良的催化性能^[56-58]。所以本文利用愈创木酚法测定血红蛋白的过氧化物酶活力，在血红蛋白存在下， H_2O_2 可将愈创木酚氧化成茶褐色物质，并在 470 nm 有最大的吸收值，所以我们通过监测 5 min 内 470 nm 波长下吸光度的变化求得血红蛋白的过氧化物酶活力。以每分钟内 A_{470} 变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活性单位 (U)。即本文酶活力单位定义为：在 25°C pH 7.4 条件下，1 mg 蛋白每分钟氧化底物（愈创木酚）引起吸光值得增加量 ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)^[153]。

2.2.3.3 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 制备条件优化

有机-无机杂化纳米花合成条件的改变对于酶活力以及理化性质都有一定影响，所以本文我们从温度，金属离子 (Cu^{2+}) 浓度，以及蛋白（酶）浓度三方面优化 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 的制备，在单一变量条件下，确定血红蛋白-磷酸铜纳米花的制备的最适条件。

(1) 温度

纳米花的孵育温度能有效调节纳米花的生长速度，进而决定纳米花生长的大小和孔径，从而对于酶活力有一定的影响。并且合成温度过高容易影响血红蛋白三维立体构像，进而影响其稳定性。本文我们在蛋白（酶）浓度 0.1 mg/mL、 CuSO_4 (500 mM) 条件下，分别在 4°C 和 25°C 温度条件下，考察不同温度下制备所得 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 的酶活力，以探究 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 形成的最适温度条件。

(2) 金属离子浓度

金属离子是纳米花生长早期形成金属磷酸盐初生晶体的关键组成成分，在纳米花的生长过程中起着至关重要的作用。所以本文我们在 4°C、蛋白浓度 0.1 mg/mL 条件下，分别考察了在 10 mM、50 mM、100 mM、200 mM、300 mM、400 mM 以及 500 mM 七种不同金属离子浓度条件下制备所得 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的酶活力，以探究 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 形成的最适金属离子用量。

(3) 蛋白浓度

血红蛋白作为纳米花生长过程中重要的组成成分，在纳米花的各个生长阶段都发挥着重要的作用，所以本文我们在 4°C、CuSO₄ (100 mM) 条件下，分别考察了在 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.25 mg/mL 以及 0.5 mg/mL 四种不同蛋白浓度条件下制备所得 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的酶活力，以探究 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 形成的最适蛋白（酶）用量。

2.2.4 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的固定化率和蛋白载量

采用 BCA 法测定上清液中所残余血红蛋白浓度，其原理是碱性条件下，蛋白将 Cu²⁺还原为 Cu⁺，Cu⁺与 BCA 试剂形成紫色的络合物，两分子 BCA 螯合一个 Cu⁺。该水溶性的络合物在 562 nm 处显示强烈的吸光性，有最大吸收。与标准曲线对比，即可计算出待测液中的血红蛋白含量^[154]。

杂化纳米花的固定化率计算公式如下：

$$I = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

I = 固定化率（%），A₁ = 加入的蛋白含量（mg），A₂ = 上清中蛋白含量（mg）

在最适条件下制备 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs。制备完成后离心（6000 rpm，10 min）收集纳米花沉淀，用去离子水（DI）洗涤 2-3 次以去除表面未固定的酶。最后将 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 进行真空干燥并称量。

杂化纳米花的蛋白载量计算公式如下：

$$L = \frac{A_1 - A_2}{A_3}$$

L = 酶载量（mg/g），A₁ = 加入的蛋白含量（mg）

A₂ = 上清中蛋白含量（mg），A₃ = 总共添加 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的质量（g）

2.2.5 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的表征

2.2.5.1 扫描电子显微镜 (SEM)

在最适条件下制备出 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 后, 离心回收 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 蓝色沉淀, 并用去离子水 (DI) 洗涤 2-3 次后, 放入真空冷冻干燥机中干燥 12 h 后, 研磨成细腻的蓝色粉末, 取少量样品粘在裁剪好的导电胶上, 并用洗耳球吹 3-5 次, 以除去表面多余样品, 随后将制好的样品进行喷金处理, 以保证测试样品的良好导电性, 然后使用扫描电子显微镜, 对其形态进行扫描观测并拍照保存。

2.2.5.2 傅里叶红外光谱 (FT-IR)

首先进行背景的制备。取出 3-5 g 溴化钾粉末, 放置在 60°C 光照下, 烘干水分, 研磨溴化钾直至成为面粉状细腻粉末。取适量溴化钾粉末放入压片模具中, 用压片机压成透明薄片, 然后放置于样品架中, 扫描所得即为背景。然后进行样品的制备。向上述研磨好的溴化钾粉末中加入少量的待测样品, 同样放置在 60°C 光照下, 烘干水分, 并研磨直至成为面粉状细腻粉末。取适量样品粉末放入压片模具中, 用压片机压成透明薄片, 然后放置在样品架中, 扫描所得即为所测样品的红外光谱图。

2.2.5.3 X 射线衍射分析 (XRD)

首先将硅片用酒精棉球擦拭干净并擦干水分, 取适量待测样品粉末放入硅片中间, 用刮板将粉末集于硅片中间并用平整光滑的玻璃板轻轻压平压实, 使样品表面平整且倾斜不易脱落的程度。然后将制备的样品基于插入在样品采集器中, 在工作电压为 40 kV、工作电流为 50 mA、样品扫描速度为 4°min^{-1} 、 2θ 范围为 5° - 8° 内分析所制备的纳米花的晶体信息。

2.2.6 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 稳定性考察

2.2.6.1 储存稳定性

酶的保存时间以及保存条件的变化都会对酶的天然结构以及酶的活性造成影响, 大部分酶经过固定之后, 都会具有更强的活性以及更久的保存时间, 为了探究本文所制备的 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 长时间储存后的催化能力, 我们将 Hb-

$\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 放置在 4°C 的温度条件下, 储存 60 天, 每隔 10 天进行取样进行酶活力的测定, 以初始制备所得的样品的酶活力为 100%, 计算存储 60 天后的相对酶活力。

2.2.6.2 热稳定性

蛋白质的三维构象会受到温度的影响, 过高的温度会破坏蛋白质的三维构象从而使其失活, 为了探究血红蛋白-磷酸铜纳米花对于温度的耐受能力, 我们将血红蛋白-磷酸铜纳米花和游离血红蛋白放置在 30°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C 、 70°C 、 80°C 、 90°C 、 100°C 下孵育 1 h 后, 测定其酶活。以未进行热处理的蛋白所测得的酶活力为 100%, 计算在不同温度条件下经过热处理过后的样品的相对酶活力。

2.3 结果分析

2.3.1 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 制备工艺优化结果

2.3.1.1 温度

结果如下图 2.1 所示, 我们可以看出不同温度下所制备的 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 表现的酶活力不同, 在较低的温度条件下, 所制备的 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 酶活力明显高于较高温度条件下所制备所得的 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs, 这可能是因为在较低温度的条件下血红蛋白和金属铜离子生长成为花状结构的速度相对更为缓慢, 生长形成的花状的结构特征有利于更多的血红蛋白的沉积和插入。并且与较高的温度条件相比, 在低温 4°C 条件下血红蛋白更有利于保持血红蛋白分子稳定的三维构象。综上结果所述, 在 4°C 条件下所制备的 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 表现出更高的酶活力, 所以本文我们将 4°C 作为 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 制备的最适温度条件。

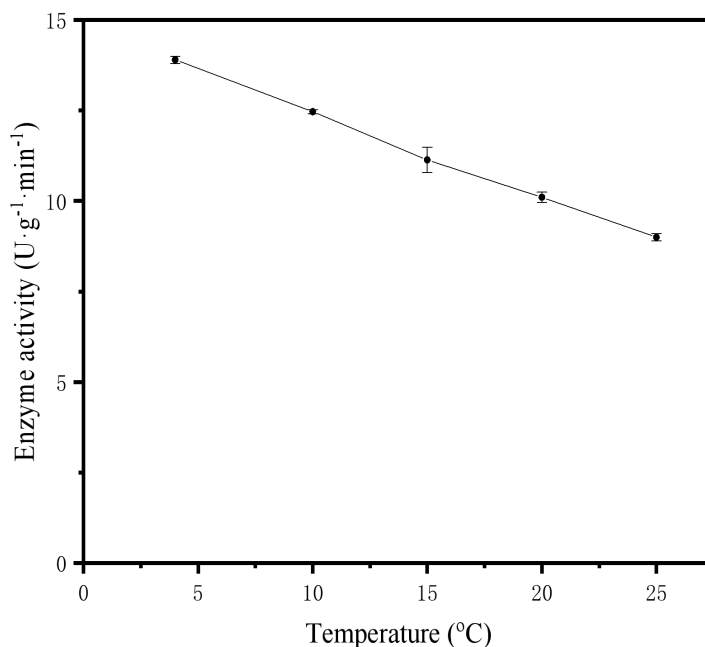


图 2.1 温度对于血红蛋白-磷酸铜纳米花酶活力的影响

Fig 2.1 Effect of temperature on the activity of Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs

2.3.1.2 离子浓度

根据图 2.2 我们可以看出，当 Cu^{2+} 浓度为 10-100 mM 时，随着 Cu^{2+} 浓度的逐渐递增，Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的酶活力也不断增加，当 Cu^{2+} 浓度大于 100 mM，酶活力逐渐下降。这可能是因为随着 Cu^{2+} 的浓度增加，制备出来的纳米花沉淀也随之增加，从而使每克纳米花中的蛋白载量降低，当加入相同浓度的蛋白溶液测定酶活时，蛋白载量较低的会使反应体系中加入的纳米花沉淀量增大，从而造成传质效率降低，影响酶和底物之间充分接触，进而影响酶活。并且在实验操作过程中我们发现，当加入血红蛋白和磷酸缓冲液（PBS）用量一定时，加入高浓度的 Cu^{2+} 溶液，在孵育并离心后的上清会呈现出明显的蓝色，这是因为上清中有大量的 Cu^{2+} 剩余，这会导致金属离子流失并且污染环境。鉴于节约原料以及保护环境的理念，所以我们选择 100 mM 的 Cu^{2+} 浓度作为 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 合成的最适 Cu^{2+} 浓度。

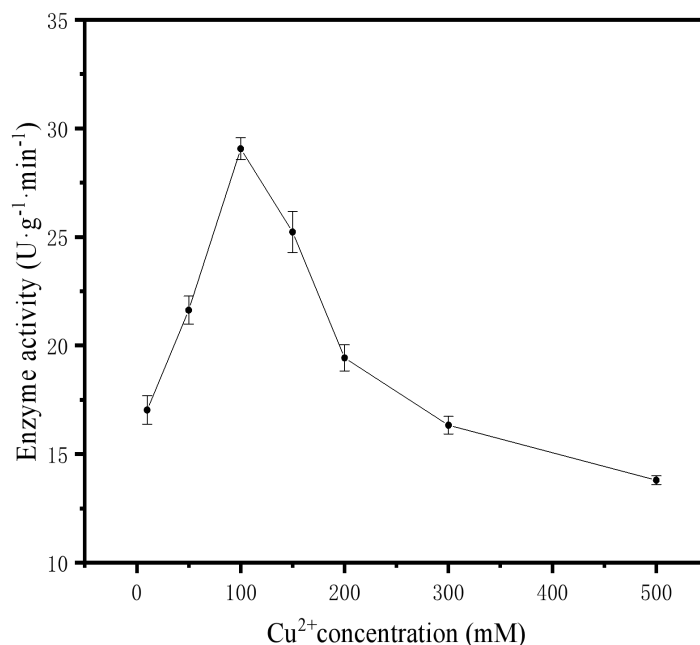


图 2.2 离子浓度对于血红蛋白-磷酸铜纳米花酶活力的影响

Fig 2.2 Effect of ion concentration on the activity of Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs

2.3.1.3 蛋白浓度

如图 2.3 所示，我们考察了不同蛋白浓度下 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的酶活力。从图示结果可以看出，随着蛋白浓度的逐渐递增，Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的酶活力也不断提高，这可能是因为较高的蛋白浓度会为磷酸铜晶体提供更多的成核位点，有利于纳米花的形成，但浓度超过 0.1 mg/mL 时，酶活力并没有因为蛋白浓度的增加而成倍数明显提升，这可能时因为在一定质量的无机组分中添加过量的蛋白质会导致包封效率的显著降低，大量的蛋白剩余无法和金属磷酸盐晶体结合生成纳米花，造成酶的损失和浪费，根据这些考虑，所以本文选择 0.1 mg/mL 的蛋白浓度制备 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs，以节约蛋白并获得良好的纳米花形态。

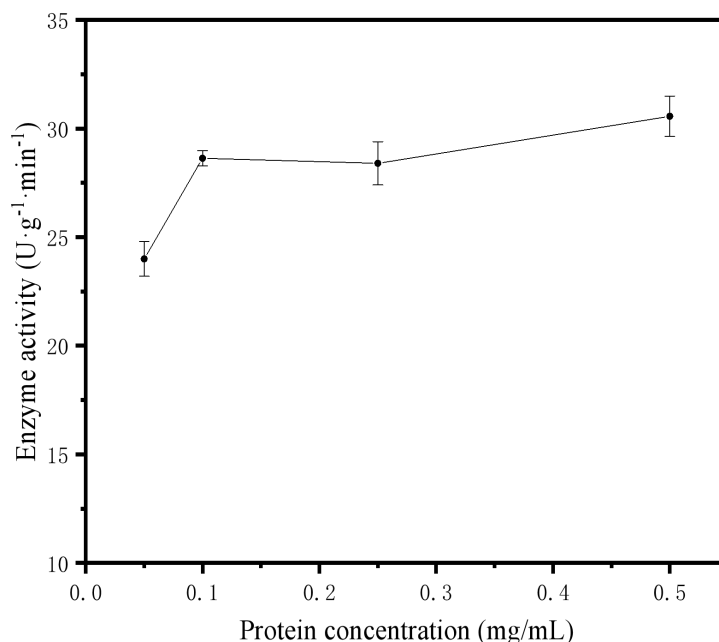


图 2.3 蛋白浓度对于血红蛋白-磷酸铜纳米花酶活力的影响

Fig 2.3 Effect of protein concentration on the activity of Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs

综上所述，我们确定了在 4°C、100 mM CuSO₄、血红蛋白 0.1 mg/mL 的条件下所制备的 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 具有最高的酶活力。所以本文将以该条件作为 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的最适制备条件。

2.3.2 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的固定化率和蛋白载量

本文在 4°C、血红蛋白 0.1 mg/mL、100 mM CuSO₄ 的条件制备 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 过程中，加入血红蛋白溶液 100 mL，即总加入的血红蛋白含量为 10 mg，通过 BCA 法测定上清中残余酶量为 0 mg，通过计算，该条件下所制备的 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 固定化率为 100%。

在 4°C、血红蛋白 0.1 mg/mL、100 mM CuSO₄ 的条件下所制备的 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 经真空干燥后称量为 101.7 mg，经计算杂化纳米花的酶载量为 98.3 mg/g，因此，Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 中血红蛋白的质量分数为 9.83%（为方便计算，本文后续按照 10% 计算 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 中的蛋白含量）。

2.3.3 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的表征

2.3.3.1 扫描电子显微镜 (SEM)

图 2.4 分别是 (A) 无添加 Hb 的 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 (B) 以 Hb 作为有机组分制备的 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 的扫描电子显微镜图像。从图中我们可以看到二者都具有明显的花状结构，大小均一，纳米花花瓣之间存在很多空隙，显示出了纳米花高表面积与体积比的层次化结构。这种空隙结构有利于小分子底物进入从而和酶进行充分接触，且在添加 Hb 前后，纳米花形态未发生明显改变，说明 Hb 的加入并不会引起纳米花形态结构的改变，这些杂交纳米花的平均直径为 15-20 μm 。

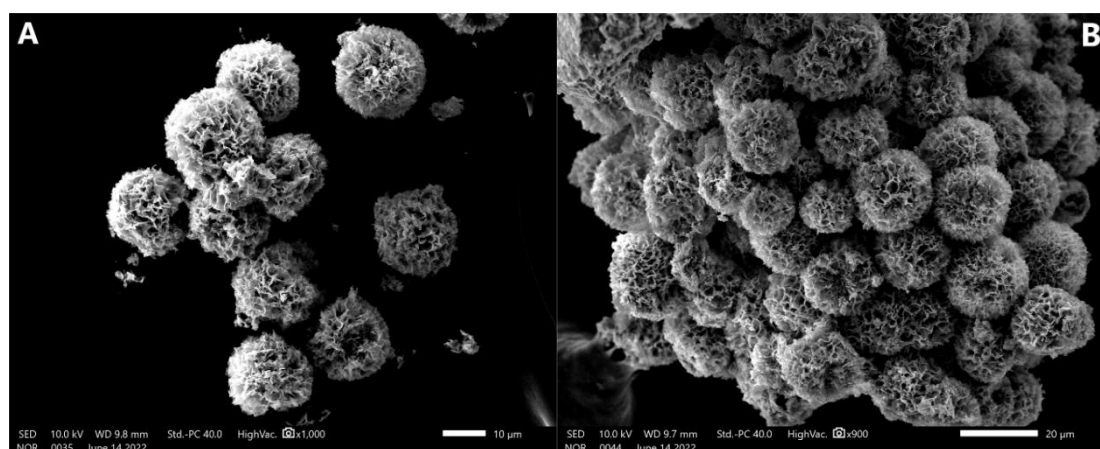


图 2.4 扫描电子显微镜图 (A) 磷酸铜 (B) 血红蛋白-磷酸铜纳米花 (HNFs)

Fig 2.4 Scanning electron microscopy (SEM) images of (a) $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$
(b) Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs

2.3.3.2 傅里叶红外光谱 (FT-IR)

为了验证 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 的形成，用傅里叶红外光谱 (FT-IR) 对游离 Hb、 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 进行表征和分析。结果如图 2.5 所示，在纯 Hb 的 FT-IR 光谱曲线图中，在 1654 cm^{-1} 处观察到酰胺 I 的特征吸收带，这归因于蛋白质主链中的肽键 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动。 1531 cm^{-1} 处的吸收带是由 N-H 弯曲/C-N 拉伸 (酰胺 II) 和 $-\text{COO}-$ 不对称拉伸共同作用形成的。在 1390 cm^{-1} 处的吸收带和 $-\text{COO}-$ 的对称拉伸有关。在 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 的光谱曲线图中，我们可以看到属于磷酸基团的特征吸收带，在 1145 cm^{-1} 处属于 $\text{P}=\text{O}$ 双键的伸缩振动、 1048 cm^{-1} 处为 $\text{P}-\text{O}$ 键的不对称拉伸、 990 cm^{-1} 为 $\text{P}-\text{O}$ 键的伸缩振动、 628 cm^{-1} 为 $\text{P}-\text{O}$ 键的弯曲振动和 560 cm^{-1} 为磷酸盐离子平面内弯曲振动所引起的特征吸收峰。

与纯 Hb 和 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 相比，我们制备所得的 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 的 FT-IR 光谱均具有 Hb 和 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 的特征吸收峰。这证明 Hb 被成功固定到磷酸铜纳米花载体中。此外，酰胺 I 和酰胺 II 特征吸收条带的存在也表明 Hb 在 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 中保留了其固有二级结构的基本特征。

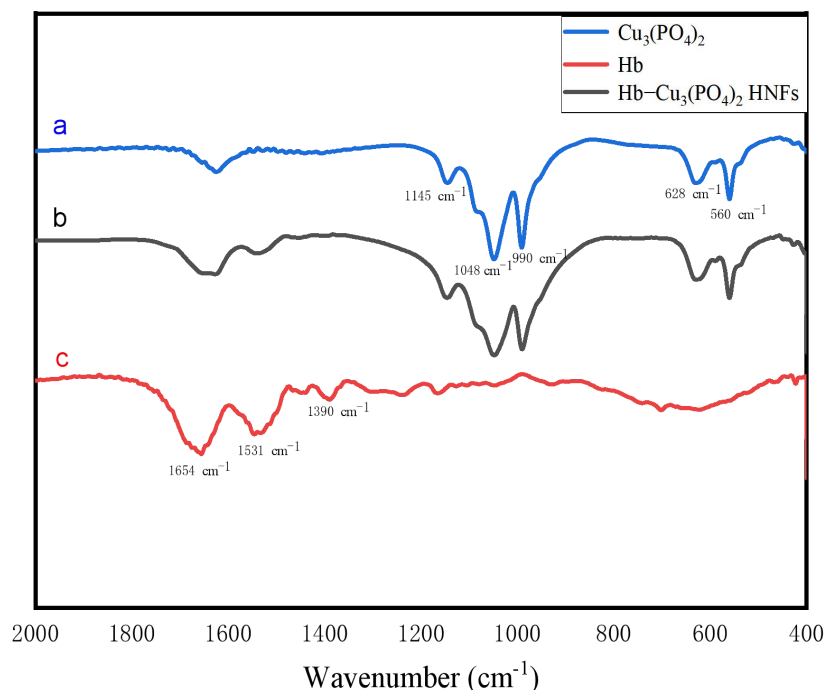


图 2.5 傅里叶红外光谱 (a) 磷酸铜 (b) 游离血红蛋白
(c) 血红蛋白-磷酸铜杂化纳米花

Fig 2.5 FT-IR spectra. (a) $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ (b) Free Hb (c) $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs

2.3.3.3 X 射线衍射分析 (XRD)

为了对制备的 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 进行精确的物相分析，我们对其进行了 X 射线衍射分析 (XRD)，测试结果如图 2.6 所示， $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 和 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 的衍射峰与 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 的标准 JCPDS 数据有较好的索引关系 [JCPDS 卡 22-0548]。证实我们所制备的纳米花为磷酸铜纳米花。并且 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 两者的 X 衍射峰位置几乎保持一致，说明两者晶型结构相同，血红蛋白的加入组装并没有对 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 的晶型结构造成改变。

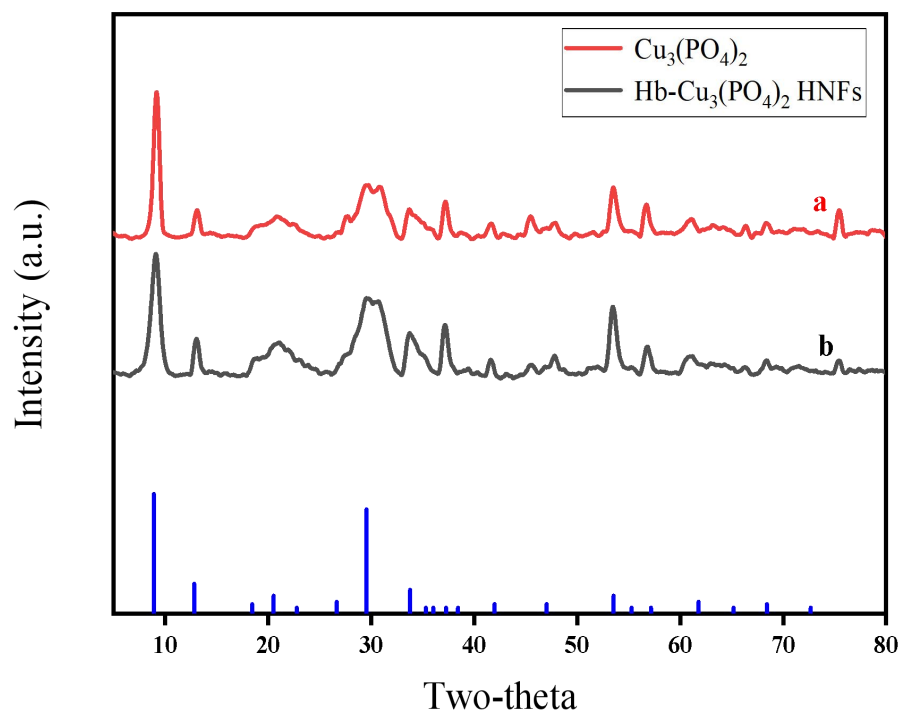


图 2.6 X 射线衍射图 (a) 磷酸铜 (b) 血红蛋白-磷酸铜杂化纳米花

Fig 2.6 XRD patten of (a) $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ (b) $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs

2.3.4 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 稳定性考察

2.3.4.1 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 储存稳定性

如图 2.7 所示, 探究了在 4°C 的温度条件下, 游离 Hb 和 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 的储存稳定性。随着储存时间的增加, 游离 Hb 以及 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 的催化活性均下降, 其中游离 Hb 损失了超过 50% 的初始酶活性, 而 $\text{Hb-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 保留了接近 80% 的初始酶活力, 该结果表明固定化 Hb 相对于游离 Hb 具有更好的储存稳定性, 这可能是因为纳米花结构能较好的保护血红蛋白的三维构象, 使其在储存 60 天后依旧保持较高的活性。

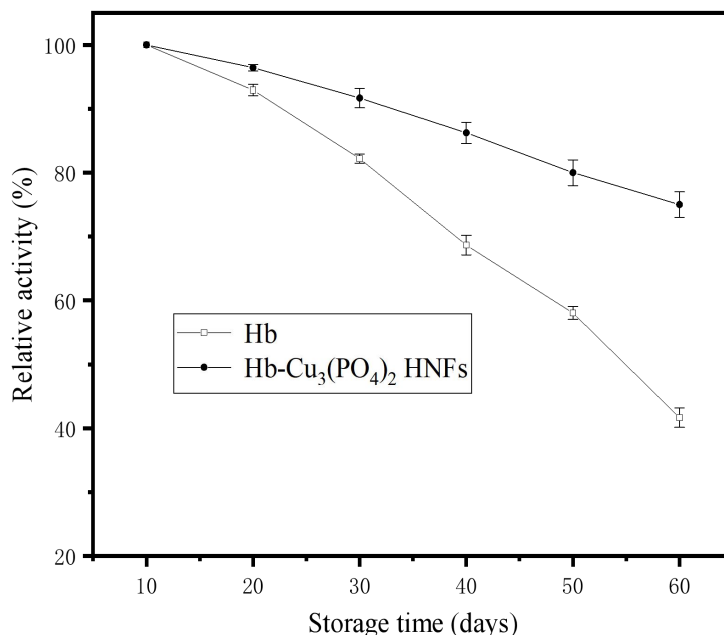


图 2.7 储存稳定性

Fig 2.7 Storage stability

2.3.4.2 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 热稳定性

如图 2.8 所示，探究了游离 Hb 和 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 的热稳定性。当温度低于 40°C 时，游离 Hb 和 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 均保留了 90% 以上的初始酶活力，随着温度逐渐升高，二者酶活力均不断降低，但游离 Hb 所受影响明显高于 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs，在 50°C 孵育 1h 后，游离 Hb 酶活力仅剩初始酶活力的 50% 左右，而 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 还能保留 80% 左右的初始酶活力。当温度达到 70°C 时，游离 Hb 酶活力仅剩初始酶活力的 15% 左右，Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 保留 60% 左右的初始酶活力。当温度达到 100°C，二者酶活力均为 0，这可能由于高温下，蛋白质分子空间结构被破坏，导致酶失活。所以综上所述，Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 相对于游离 Hb 具有更高的耐热性能，能在相同温度下保留更多的酶活力。这可能是由于纳米花孵育时，Hb 和 Cu²⁺ 和 PO₄³⁻ 结合后刚性增强，从而提高了其热稳定性。

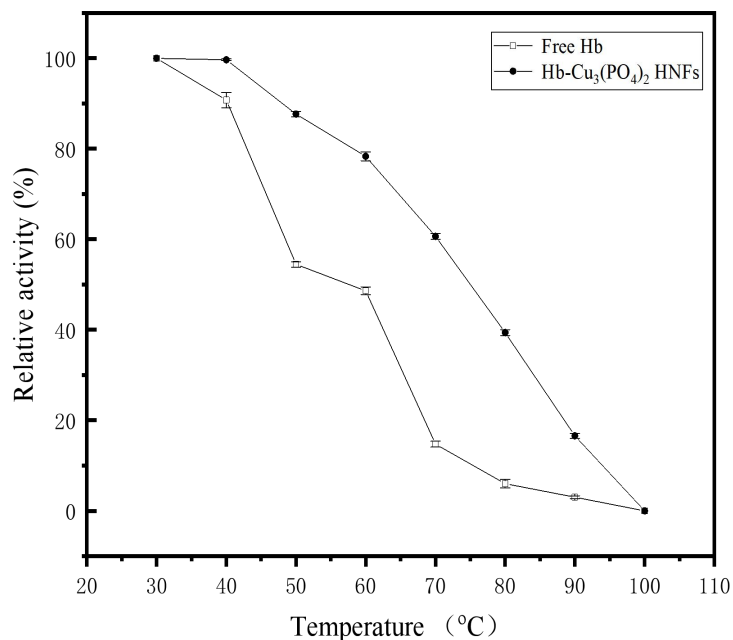


图 2.8 热稳定性

Fig 2.8 Thermal stability

2.4 本章小结

纳米花因其高表面积与体积比的层次化结构，增大了酶和底物的接触面积，从而提高了酶的催化活性，纳米花花瓣之间存在很多空隙，有利于小分子底物进入与酶进行充分接触，并且纳米花的制备方法简单安全，易于回收重复利用等优点促进了酶在有机合成领域中的广泛应用。

在本章中，我们以牛血红蛋白作为有机组分， Cu^{2+} 作为无机组分，有机分子和无机分子在阴离子和阳离子静电作用下自组装而成制备出负载血红蛋白的磷酸铜纳米花，并且我们从孵育温度、离子浓度以及蛋白浓度三方面确定了Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs生长的最适条件。即在4°C、100 mM CuSO₄、血红蛋白0.1 mg/mL的条件下所制备出的纳米花表现出最高的酶活力。我们也通过扫描电子显微镜 (SEM)、傅里叶红外光谱 (FT-IR) 以及 X 射线衍射(XRD)对固定化酶的形态以及结构进行表征，证明血红蛋白已经成功与载体结合，并考察了Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs的热稳定性和存储稳定性，在4°C储存60天后，Hb-Cu₃(PO₄)₂

HNFs 仍能保持高达初始酶活性的 80%，并且在不同温度下孵育 1 h 后，Hb- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs 相对于游离 Hb 具有更高的耐热性能，能在相同温度下保留更多的酶活力。

第三章 血红蛋白-磷酸铜纳米花 催化卡宾反应合成喹喔啉类化合物

3.1 引言

喹喔啉类化合物是重要的结构基序，具有高效的药理活性，如抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、驱虫和抗艾滋病病毒活性等^[155-159]。此外，喹喔啉还被广泛用于染料、有机半导体、脱氢环烯、太阳能电池、感光材料等的合成^[160-165]。因而备受科研研究者们的关注。当前已经有许多化学法，包括芳香 1,2-二羰基化合物与 1,2-二羰基化合物的双缩合、1,2-酮醇与芳香 1,2-二胺的级联氧化-缩合、喹喔啉 *n*-氧化物的脱氧、末端或内部炔烃或酮与 1,2-二胺的氧化环化、环氧化合物与烯-1,2-二胺偶联以及邻苯二胺与重偶氮羰基串联环化等都被用来开发喹喔啉的合成^[166-170]。然而，这些方法大多存在昂贵且有害的金属催化剂、过渡金属残余、产品收率不理想、生产成本低、反应条件苛刻、溶剂挥发或有害等问题，从而限制了它们在实际生产上的广泛应用^[171]。所以为了遵循“绿色化学”的原则以及开发更高效的合成路线，科研人员们又面临着一个全新的挑战。利用生物酶合成高价值化学品是一项具有广泛潜力的强大战略，是实现绿色化学的最佳解决方案之一。因此，研究人员对挖掘蛋白质的非天然反应表现出了越来越大的兴趣，并报道了许多关于这一主题的研究。脂肪酶和血红蛋白是理想的候选者。基于以上研究进展，我们研究小组在此前已经设计了一种新的脂肪酶-血红蛋白级联反应，通过“一锅法”催化 1,3-二羰基化合物、磺酰叠氮化物和 1,2-二胺三组分反应来高效合成喹喔啉类化合物（3-甲基喹喔啉-2 羧酸乙酯）。在脂肪酶催化的杂化反应中，PPL 总是表现出令人满意的催化能力。血红蛋白比其他血红素蛋白具有更高的催化性能，可能是由于血红蛋白四个亚基的协同作用。并且该反应利用环境友好型溶剂水作为有害有机溶剂的替代品，在水相体系中仍获得了较高的产率。但是由于生物酶难于回收，经济成本高，所以无法大批量进行工业生产，所以本文在李奉熙等人工作的基础上，通过利用我们所制备的固定化酶 Hb-Cu₃(PO₄)₂ HNFs 代替游离 Hb 进行喹喔啉类化合物的合成，探究其在该非天然化学反应中的催化性能以及可重复性能^[61]，实验机理如

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/215001303003011114>