

固定化脂肪酶有机相中催化己酸乙酯反应动力学研究*

徐 岩 赵成明 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

关键词 固定化脂肪酶, 动力学, 酯化反应, 底物抑制

分类号 Q814 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0533-36

有机相中脂肪酶催化反应动力学研究是酶工程领域中一个引起广泛兴趣的研究课题^[1]。目前的研究较多地集中于水解反应和转酯反应^[2~4]。对于酯化反应的动力学报道不多。酶反应动力学研究对于研究反应机理、确定有效的酶促反应环境、选择合适的酶反应器有着十分重要的作用。因此,对非水相中脂肪酶催化反应动力学的研究无论在理论上还是在实际应用中都有着重要的意义。

与自由酶相比,使用固定化酶可提高酶在有机相中的扩散效果和热力学稳定性,是调节控制酶活性常用的手段。但酶固定化以后,影响其动力学的因素增多,反应机制变得更加复杂。因为:1)酶在固定化过程中的扭曲影响了三维构象而可能改变酶催化活力;2)底物、产物和其他效应物在载体间的迁移扩散速度受到限制,不等分布可能会产生内外扩散限制;3)载体的疏水、亲水及电荷性质使固定化酶的微环境与宏观反应体系不同,对酶产生微环境效应。这些影响因素有时还相互交叉存在,它们综合决定着固定化酶的动力学性质^[5]。

在前面研究的基础上^[6],本文报道了对固定化脂肪酶有机相中酯化己酸乙酯反应的稳态动力学机理和底物抑制机制的研究。

1 材料和方法

1.1 脂肪酶

固定化 *Mucor miehei* 脂肪酶(商品名 Lypozyme IM),丹麦 Novo Nordisk 公司生产。

1.2 试剂

均为国产试剂产品,使用前均用 3A 分子筛除水,以保证酶的微水环境。

1.3 脂肪酶合成酯化反应体系

100mL-具塞三角瓶中将一定量的己酸、0.2g 酶粉(除在酶浓度对反应初速度的影响外)和正庚烷组合成 15mL-酯化反应体系。加入乙醇开始反应,30℃ 条件下 15r/min 旋转振荡,取样检测^[6]。

1.4 反应初始速率测定

按时取样,用带 0.15 μ m 微孔滤膜的注射器过滤除酶后,取 0.1mL 反应液,气相色谱分析产物量^[6]。反应初速率定义为每克酶每分钟生成产物的摩尔数。

1.4.1 反应动力学常数的测定: 根据测出脂肪酶催化己酸乙酯合成反应的初速度,通过分析反应初速度和底物浓度间的关系,求出各动力学常数。

2 结果与讨论

2.1 酶浓度与酯化反应初速度的关系

在加大了摇瓶转速(大于 150 r/min),克服了外扩散限制后, Fig. 1 表明底物量足够条件下,酶浓度对

* 生物反应器工程国家重点实验室开放课题部分资助。

收稿日期:1998-07-22, 修回日期:1998-12-14。

反应初速度的影响。酶浓度在 100mg/mL 的范围内成线性关系,说明整个反应基本上是由动力学所控制。

2.2 不同醇浓度下酸浓度对酯化反应初速度的影响

在不同乙醇浓度下,测定不同浓度酸与反应初速率间的关系。从 Fig. 2 中可看出,在己酸浓度 0.05 ~ 0.2 mol/L,乙醇浓度 0.05 ~ 0.1 mol/L 的浓度范围内,随底物醇和酸浓度的增加,反应初速度也随之加快,表现出双曲线的性质,符合典型的米氏方程,进一步说明该酯化反应为动力学所控制,基本无扩散限制的影响。

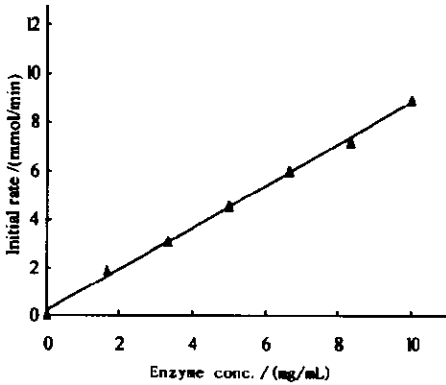


图1 酶的浓度对反应初速度的影响

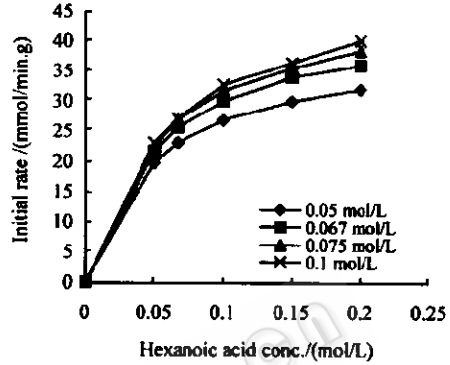


图2 在不同乙醇浓度下己酸浓度与反应初速度的关系

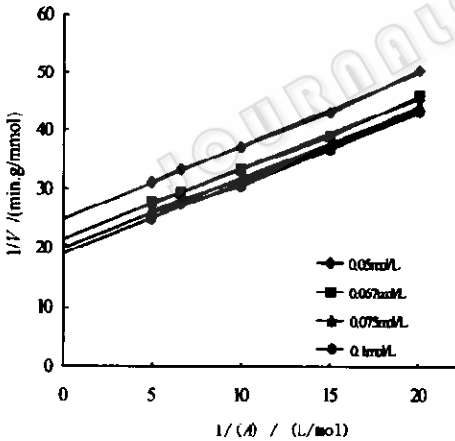


图3 在不同乙醇浓度下己酸浓度与反应初速度的双倒数图

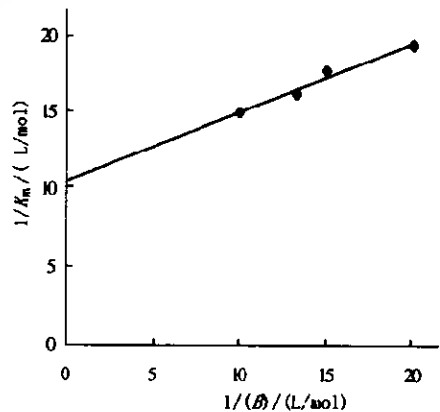


图4 乙醇浓度与己酸米氏常数的 Lineweaver-Burk 图

由 Fig. 2 可作出在不同醇浓度下,反应初速度与不同酸浓度间的双倒数曲线,见 Fig. 3。

从 Fig. 3 表现出来的平行模式表明脂肪酶催化的己酸乙酯合成反应符合双底物 Ping-Pong Bi - Bi 反应机制^[7]。即经过脂肪酶(E)先与己酸(RCOOH)结合形成脂肪酯-己酸复合物(E-RCOOH),接着该复合物转变成酰基脂肪酶中间体(F),在释放出水后,该酰基酶中间体被乙醇(R'OH)进攻而形成己酸乙酯(RCOOR),并释放出游离的脂肪酶。参见 Fig6。

按 King Altman 的方法,反应动力学速度方程为:

$$V = V_{max} / \{K_{mA} / [A] + K_{mB} / [B] + 1\} \tag{I}$$

以 Fig. 3 中横轴截距倒数(表观 K_m 值)对乙醇浓度倒数二次作图,可得 Fig. 4。再以 Fig. 3 中纵轴截距倒数(表观 V_{max} 值)对乙醇浓度倒数二次作图后可求得表观动力学常数为: $K_{mA} = 85.34 \text{ mmol/L}$; $K_{mB} = 33.59 \text{ mmol/L}$; $V_{max} = 79.82 \text{ mmol}/(\text{min}\cdot\text{g})$ 。

2.3 底物对反应初速度抑制的研究

在研究中还发现:在己酸浓度为 0.2 mol/L , 当醇浓度升高到一定值(约 0.2 mol/L)后, 反应速度反而下降, 不再符合米氏方程, 表现出较明显的底物抑制特征。见图 5。

再将反应后的酶收集、洗涤后重新进行反应, 发现酶恢复了其催化活性。即说明高浓度的乙醇对该酯化反应产生抑制, 而不是失活。而在底物醇的浓度在 $\leq 0.3 \text{ mol/L}$ 范围内, 反应初速率随己酸浓度增大而加快(数据未显示), 在此浓度范围内己酸对酯化反应并不产生抑制。这与 Langrand 发现:猪胰脂肪酶在转酯反应中无底物抑制现象以及在酯化反应中底物醇酸都会对 *Candida cylindracea* 脂肪酶产生抑制的情况是不同的^[7]。对于底物醇抑制现象的原因可能是由于酰基脂肪酶中间体的构象与游离酶相似, 因此部分游离酶一开始与醇相结合, 形成死端复合物(dead-end complex) $ER'OH$, 不能有效地参与到正常的酯合成反应中去。其机理见下 Fig. 6。

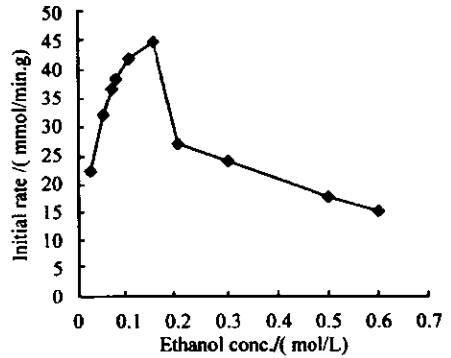


图 5 底物己酸浓度为 0.2 mol/L 时乙醇浓度对反应速度的影响

反应动力学方程式 (I) 的基础上修正脂肪酶催化合成己酸乙酯反应动力学方程式为:

$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_{mA}}{[A]} + \frac{K_{mB}}{[B]} + \frac{K_i}{[R'OH]}} \quad (II)$$

将式 (II) 改成双倒数形式, 经整理后, 得到式 (III), 从方程式 (III) 分析可知, 当 $[B]$ 较高时,

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_{mA}}{V_m \cdot [A]} + \frac{K_{mB}}{V_m \cdot [B]} \quad (III)$$

方程右边的最后一项可忽略, 这样, $1/V$ 与 $[B]$ 成线性关系。将高浓度醇 (0.2 mol/L , 0.3 mol/L , 0.5 mol/L , 0.6 mol/L) 对相应的 $1/V$ 二次作图后求得乙醇对反应的抑制常数 $K_i = 89.1 \text{ mmol/L}$ 。

最后相应的有醇抑制时的脂肪酶催化合成己酸乙酯反应的动力学方程可描述为:

$$V = \frac{79.82}{1 + \frac{85.34}{[A]} + \frac{85.34 \cdot [B]}{(89.1 \cdot [A]) + 33.59/[B]} + 1} \text{ mmol}/(\text{min}\cdot\text{g}) \quad (IV)$$

有机相酶促反应系统中水的含量是影响酶催化活性的重要因素之一, 本研究是在反应体系维持最适水含量的环境中进行, 详细情况将另见报道。

符 号 说 明

- | | | |
|------------------------|------------------------------------|---|
| $[A]$: 己酸浓度/(mol/L) | FH_2O : 酰基脂肪酶水复合物 | $R'OH$: 乙醇 |
| $[B]$: 乙醇浓度/(mol/L) | $FR'OH$: 酰基脂肪酶乙醇复合物 | V : 酯化反应初速度/mm \cdot min \cdot g |
| E: 脂肪酶 | K_i : 乙醇抑制常数/mm \cdot mol/L | V_{max} : 酯化反应最大速度/mm \cdot min \cdot g |
| $ERCOOH$: 脂肪酶己酸复合物 | K_{mA} : 己酸米氏常数/mm \cdot mol/L | |
| $ERCOOR'$: 脂肪酶己酸乙酯复合物 | K_{mB} : 乙醇米氏常数/mm \cdot mol/L | |
| $ER'OH$: 脂肪酶乙醇死端复合物 | $RCOOH$: 己酸 | |
| F: 酰基脂肪酶中间体 | $RCOOR'$: 己酸乙酯 | |

参 考 文 献

- [1] J. S. Dordick. *Biotechnol. Prog.*, 1992, 8(2):259~267.
- [2] A. Zaks, A. M. Klibanov. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 1985, 82(10):3192~3196.
- [3] D. A. Miller, J. M. Prausnitz, H. W. Blanch. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, 13(2):98~103.
- [4] R. Verger, C. Riviere, H. Moreau *et al.* *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering* Weinheim: VCH, 1991, pp. 105~116.
- [5] M. F. Chaplin, C. Bucke. *Enzyme Technology*. New York: Cambridge University Press, 1990. pp. 167~196.
- [6] 徐 岩, 章克昌, 王亚非. *生物工程学报*, 1998, 14(2):214~219.
- [7] A. Fersht. *Enzyme Structure and Mechanism*. 2nd. New York: W. H. Freeman, 1985, pp. 104~123.
- [8] M. Martinelle, K. Hult. *Lipases*. New York: Cambridge University Press, 1994. 159~180.

A Kinetic Study on Enzymatic Synthesis of Ethyl Hexanoate by Immobilized Lipase form *Mucor miehei* in Heptane*

Xu Yan Zhao Chengming Zhang Kechang

(School of Biotechnology, Wuzi University of Light Industry, Wuzi 214036)

Abstract The kinetics of the esterification of ethanol and hexanoic acid by immobilized lipase from *Mucor miehei* in heptane were investigated. The reaction follows Michaelis-Menton kinetics as observed from the relationship of initial rate of the reaction, both as a function of enzyme and of substrate concentration. The kinetics of reaction are suggested to agree with a Ping-Pong Bi Bi mechanism. The substrate inhibition by excess of ethanol has been identified at its concentration of more than 0.2 mol/L. Under the condition of no significantly diffused inhibitor, kinetic parameters of the reaction have been measured. The Michaelis constants for hexanoic acid (K_m hexanoic acid) and for ethanol (K_m ethanol) are 85.34 mmol/L and 33.59 mmol/L respectively. The maximum rate of the reaction (V_m) is 79.82 mmol/(min·g). The inhibitor constant of ethanol (K_i) is 89.1 mmol/L.

Key words Immobilized lipase, kinetics, esterification, substrate inhibition

* Partially Supported by the Open Project Program of the State Key Laboratory of Bioreactor Engineering.