

庚烷中微生物脂肪酶催化酯化 反应动力学的研究

施 炜 陈 日方 全文海 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 对国产解脂假丝酵母脂肪酶 *Candida lipolytical lipase* 在庚烷中催化 醇与月桂酸酯化反应的动力学进行了研究. 结果发现反应不存在扩散限制, 仅为动力学控制, 符合米氏方程. 虽然存在 醇抑制现象, 但底物浓度对反应速率的影响符合 Ping-Pong 反应机理, 由此推导了反应动力学模型并由实验数据求得了各模型参数.

关键词 脂肪酶; 有机溶剂; 酯化反应; 醇; 月桂酸; 动力学

中图分类号 Q556. 1

0 前 言

1984年 Zaks Klivanov 等人首先报道了脂肪酶在有机溶剂中具有极高的热稳定性和催化活性^[1], 引起人们的普遍关注和极大兴趣. 随后越来越多的人致力于非水介质中酶的结构和功能的研究, 这些研究使得传统酶学领域迅速生长出一个全新的分支——非水酶学 (Nonaqueous Enzymology)^[2,3]. 近年来, 有关酶在有机相中催化反应的文献逐渐增多, 反映了各国学术界及工业界对该领域的重视, 但只有 Chulalakananukul^[4], Suresh^[5]及 Yee Peng Yong^[6]等对非水介质中脂肪酶催化酯合成反应的动力学进行了研究. 动力学的研究对于弄清反应的机理及过程的放大都是必不可少的, 因此笔者以脂肪酶催化月桂酸与丁醇在正庚烷中的酯化反应为模型, 拟在消除扩散的影响下研究有机相中反应动力学的一些规律.

1 材料与方法

1.1 原料

脂肪酶: 解脂假丝酵母酯脂肪酶 (CLL), 水解酶活 $100 \mu \text{mol}/(\text{s} \cdot \text{g})$, 无锡酶制剂厂.

1.2 主要试剂

正庚烷: 分析纯, 杭州炼油厂;

月桂酸: 化学纯, 上海化学试剂站;

正丁醇: 分析纯, 无锡市溶剂总厂.

收稿日期: 1997-12-26

第一作者: 施炜, 男, 1971年3月生, 博士生

1.3 实验方法

将含一定浓度月桂酸与正丁醇的庚烷溶液 10 mL置于 100 mL容量瓶中,加入 0.25 g 脂肪酶 CLL,密闭后于 30℃ ,150 r/min摇瓶机中恒温振荡反应,于反应转化率达到 10% 左右时取样测定,计算反应初速率并分析求得各动力学参数

1.4 分析方法

有机溶剂中脂肪酶酯合成活力的测定按文献 [7] 中方法测定

2 结果与讨论

2.1 传质对酶催化的影响

2.1.1 外扩散的影响 实验测定了摇瓶机转速对酯化反应初速度的影响,见图 1,发现转速大于 100 r/min时对反应初速度没有大的影响,因此在转速为 150 r/min时反应基本不受外扩散的影响

2.1.2 内扩散的影响 若反应不受内扩散的影响,反应初速度应随体系中酶量的增加而按比例增加 见图 2,当酶量超过 0.75 g/L时,反应速度即不随酶量变化,提示反应可能受内扩散的影响 为消除此影响,实验中采用的酶量为 0.25 g/L

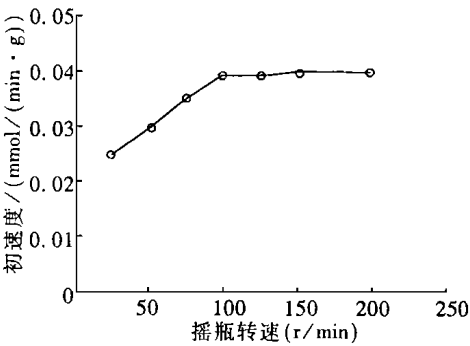


图 1 摇瓶转速对反应的影响

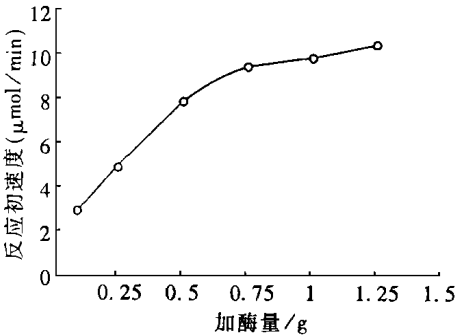


图 2 加酶量对反应初速度的影响

2.2 反应底物浓度对反应初速度的影响

从图 3可以看出,在一定醇浓度下,反应初速度随酸的浓度增加而增加,即使酸的浓度达到 0.2 mol/L,反应速度也没有降低,虽然增加的幅度减小,但酸对于酶没有抑制现象.而在一定酸浓度下,反应的速度开始随醇浓度的增加而增加,但当醇浓度超过一定临界值后,反应速度反而降低,这表明醇可能对酶存在抑制现象

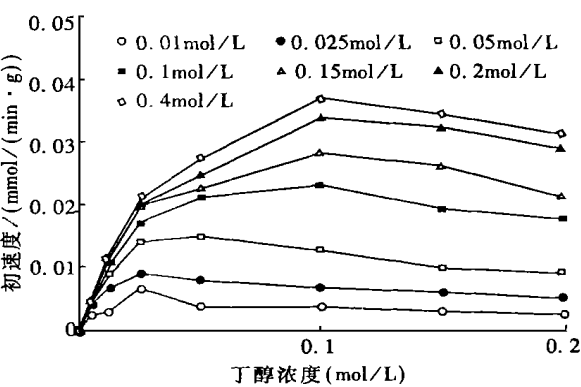


图 3 底物浓度对反应初速度的影响

2.3 反应的机理模型

将图 3中的数据以双倒数坐标描绘,结果见图 4,可以看到,在低醇浓度下(5 mmol/L, 12 mmol/L) 1/v - 1/A 的两条直线基本

平行,斜率基本相等,这符合反应经历了一个酶的中间形式及一系列二元复合物反应的机理特征.随着醇浓度继续增加,曲线的斜率增加,在 $1/v$ 轴上的斜率减小,趋向于一极限值.

如将图 4 中的各条直线的斜率对丁醇的浓度作图可得一条直线,如图 5 所示.这与图 4 显示出的特征都说明反应符合 Ping-Pong 反应机理^[8].

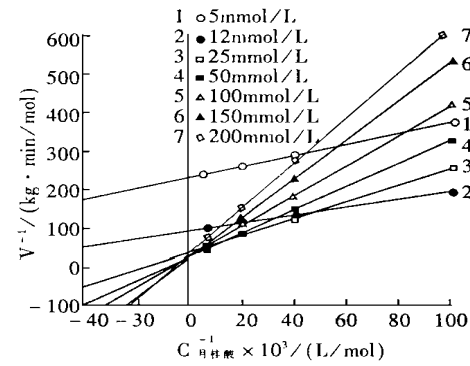


图 4 双倒数坐标曲线

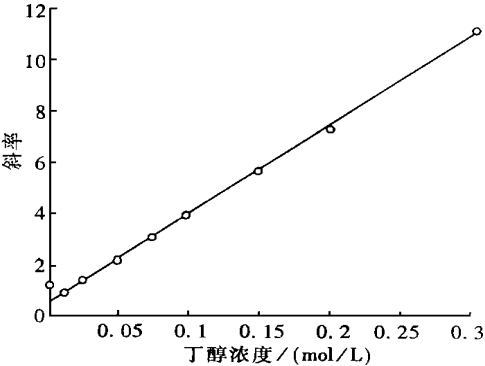


图 5 双倒数坐标图直线斜率与丁醇浓度关系

反应机理可用图 6 表示.反应过程中脂肪酶与丁醇形成一个惰性酶-醇复合物 EB,或与酸形成脂肪酶-酸复合物 EA,脂肪酶-酸复合物 EA 转换成羧酸-脂肪酶中间体 F,同时释放出 水 P,然后羧酸-脂肪酶中间体与丁醇作用形成另一个二元复合物 EQ,这个二元复合物最后转变成酯 Q,释放出酶 E.

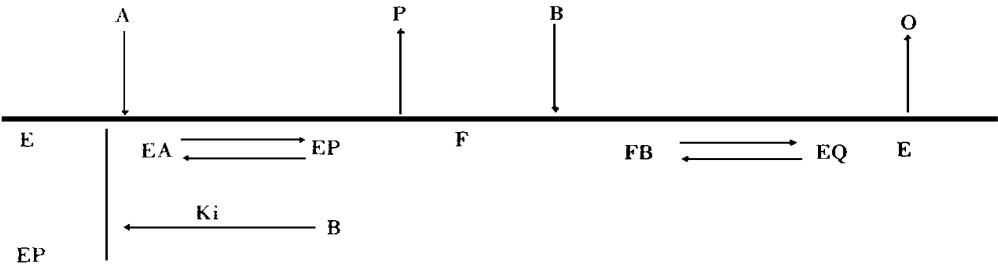


图 6 反应机理图

A: 月桂酸; B: 丁醇; P: 水; Q: 月桂酸丁酯; E: 脂肪酶; F: 羧酸-酶中间体;
EA, EB, EQ, FP, FB: 酶与底物的复合物; K_i : 丁醇的抑制常数.

根据上述反应机理,可写出动力学方程如下:

$$v/V_m = C_A C_B / (K_A C_B + K_m C_B^2 + K_B C_A + C_A C_B)$$

式中:

v 为反应速度 $\text{mmol}/(\text{min} \cdot \text{g})$; V_m 为最大反应速度, $\text{mmol}/(\text{min} \cdot \text{g})$; C_A 为酸的浓度 mmol/L ; C_B 为醇的浓度 mmol/L ; K_A 为酸的动力学常数 mmol/L ; K_m 为 K_A/K_i 比值; K_B 为醇的动力学常数 mmol/L ; K_i 为醇的抑制常数 mmol/L .

从图 4 中可看出 $1/v$ 轴的截距为 $(K_B/C_B + 1)/V_m$,因此当 B 的浓度增大时,截距趋向于 $1/V_m$. 将图 4 中的直线斜率对 B 的浓度作图 5,其斜率可由上式得出为:

$$L(\text{slope}) = (K_A + K_m C_B)/V_m = (K_A + K_A C_B/K_i)/V_m$$

从上式可看出图 5 中 $1/v$ 轴的截距为 K_A/V_m , 曲线斜率为 $K_A/V_m K_i$.

2.4 动力学参数的求取

速度表达式中动力学参数根据图中的物理意义求取获得:

$$K_A = 64.9 \text{ mmol/L}; \quad K_B = 147.2 \text{ mmol/L}; \quad V_m = 0.2172 \text{ mmol}/(\text{min} \cdot \text{g}); \quad K_m = 4.189; \quad K_i = 15.5 \text{ mmol/L}.$$

3 结 论

在对国产解脂假丝酵母脂肪酶 *Candida lipolytica* lipase (CLL) 在有机溶剂中催化丁醇与月桂酸酯化反应动力学的研究中, 由实验结果发现在一定条件下反应不存在内、外扩散限制, 反应符合典型的 Michaelis-Menten 方程, 为动力学控制。虽然存在丁醇抑制现象, 但底物浓度对反应速率的影响符合 Ping-Pong 反应机理。

参 考 文 献

- 1 Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic catalysis in organic media. Science, 1984, 224: 1249~ 1251
- 2 Klibanov A M. Enzymes that work in organic solvents. CHEM TECH, 1986, 16: 354~ 359
- 3 Dordick J S. Principles and Application of Nonaqueous Enzymology. Applied Biocatalysis, 1990, 1: 1~ 50
- 4 Chulala K. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in hexane. FEBS Lett, 1990, 276: 181~ 184
- 5 Suresh. Lipase catalyzed esterification of oleic acid and methanol in hexane—a kinetic study. J of AOCS, 1994, 71: 927~ 930
- 6 Yee P Y. Kinetic studies on immobilized lipase esterification of oleic acid and octanol. J of Chem. Tech. Biotechnol., 1996, 65: 239~ 248
- 7 James S F. Titration of acid in nonaqueous solvents. Analytical Chemistry, 1951, 23(4): 589~ 591
- 8 Segal L H. Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York, 1975, 544~ 590, 606~ 626, 884~ 942

Kinetic Study on Lipase Catalyzed Esterification of Lauric Acid and Butanol in Heptane

Shi Wei Cheng Fang Quan Wenhai Zhang Kechang

(School of Biotechnology in Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract The purpose of this research is to study a lipase *Candida lipolytica* lipase (CLL) which is to be used in the synthesis of long-chain fatty acid ester. A fundamental study on the kinetics of the esterification of butanol with lauric acid, catalyzed by CLL in heptane was conducted. The fact that effects of substrate concentration on initial rate of the reaction followed Michaelis-Menten equation suggests that the reaction agrees with the Ping-Pong Bi Bi mechanism. Inhibition by excess of butanol has been identified. The kinetic constants have been measured for the reaction in the absence of any significant external diffusion limitations.

Key words lipase; esterification; butanol; lauric acid; kinetics

(责任编辑: 陈 娇)