

文章编号 :1009-038X(2000)04-0349-05

非水相酶促 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成的动力学

汤鲁宏, 张浩, 孙云飞

(无锡轻工大学食品学院 江苏无锡 214036)

摘 要 对叔戊醇中酶法合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯(L-AP)的反应动力学进行了研究,对影响其反应动力学的因素(转速、温度、水分活度、酶质量分数和底物浓度)进行了探讨,确定了最有效的酶促反应环境.即转速为 200 r/min,温度为 55 ℃,水分活度为 0,加酶量为 20%.并对底物进行了比较,得到了对酶亲和力最大的底物——棕榈酸甲酯.

关键词 L-抗坏血酸棕榈酸酯 动力学 脂肪酶

中图分类号:O643.32

文献标识码:A

Kinetic Study on Lipase Catalyzed Synthesis of L-ascorbyl Palmitate in 2-methyl-2-butanol

TANG Lu-hong, ZHANG Hao, SUN Yun-fei

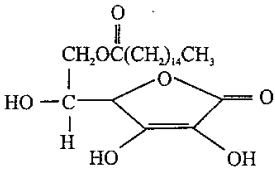
(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract The kinetics of the synthesis of L-ascorbyl palmitate catalyzed by immobilized lipase from L-ascorbic acid and an acyl donor (palmitic acid, methyl palmitate or ethyl palmitate) in 2-methyl-2-butanol has been investigated. The factors affecting reaction rate (rotation speed, temperature, enzyme concentration and substrate concentration) have been discussed. The reaction conditions have been optimized: 200 r/min, 55 ℃, $a_w = 0$, 20% for adding enzyme quantity. The results have been modeled through Lineweaver-Burk equation.

Key words L-ascorbyl palmitate; kinetics; lipase

自从 20 世纪 80 年代 Klibanov 等^[1]相继发现一些酶在无水的条件下仍具有催化活性,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).

L-抗坏血酸棕榈酸酯(L-Ascorbyl Palmitate)简称 L-AP,是一种广泛应用于食品行业的新兴的多功能食品添加剂^[2],其结构如下:



国外对于非水相中酶法合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯做了初步探索^[3],但对其反应动力学的研究尚未见报道.作者系统地研究脂肪酶 Novo 435 在叔戊

收稿日期:1999-11-08 修订日期:2000-05-10.

作者简介:汤鲁宏(1960-),男,江苏南京人,工学博士,副教授.

万方数据

醇溶剂中催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的动力学机制,并确定了最有效的酶促反应环境。

1 材料与方法

1.1 试剂

脂肪酶 NOVOZYM 435, Novo Nordisk 公司提供,其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

摇床 HZS-H 水浴振荡器,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司制造。

1.3 实验方法

由一定量的棕榈酸(或棕榈酸甲酯、棕榈酸乙酯)和 0.24 g 抗坏血酸和叔戊醇溶剂组成的 20 mL 反应体系,加酶量为 0.2 g(考察酶质量分数对反应初速度影响的实验除外),反应温度为 55 ℃(考察温度对反应初速度影响的实验除外),摇床转速为 200 r/min(考察转速对反应初速度影响的实验除外),水分活度为 0.9(考察水分活度对反应初速度影响的实验除外)。

1.4 分析方法

硅钼杂多兰分光光度测定法。

1.5 水分活度实验

反应前,将底物和溶剂的混合物置于密闭容器中,与饱和盐水溶液进行气相平衡 48 h,使它们的水活性与饱和盐水溶液的水活性相同。室温下,所用饱和盐水溶液的水活性分别为:MgCl₂ 0.31;Mg(NO₂)₂ 0.55;NaCl 0.75;K₂SO₄ 0.97。

2 结果与讨论

酶法合成主要利用脂肪酶作为催化剂,使 L-抗坏血酸与酰基供体棕榈酸或棕榈酸酯发生直接酯化或酯交换反应,生成 L-抗坏血酸棕榈酸酯,其合成机理见图 1。

2.1 摇床转速对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响

在其他条件相同的情况下,在 0~300 r/min 范围内测定 3 种底物在不同转速条件下对反应初速度的影响,结果见图 2。可知:在转速较低时,由于传质阻力,反应初速度也较低,随着转速增大,反应初速度也随之逐渐增大,当摇床转速增大至 200 r/min 以上,反应初速度基本保持恒定。这也说明在转速增大过程中,固定化酶反应体系中的外扩散限制对反应的影响逐渐减小。为减轻由摇床转速所引起的外扩散限制,将转速定为 200 r/min。

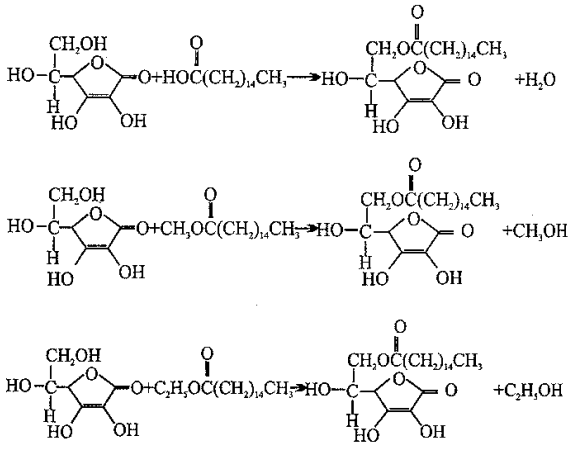


图 1 脂肪酶催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的反应机理
Fig. 1 Reaction mechanism of L-ascorbyl palmitate synthesis catalyzed by lipase

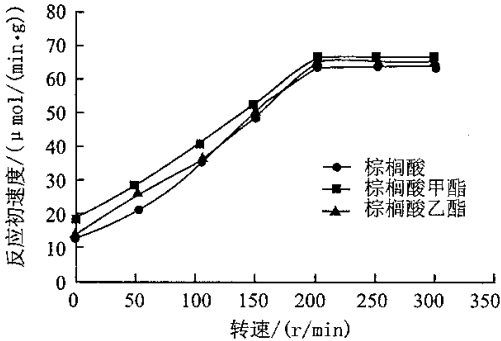


图 2 转速对反应初速度的影响

Fig. 2 Effect of rotary speed on primary reaction velocity

2.2 温度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响

温度不但影响酶的催化活性和操作稳定性,也影响底物的状态以及底物和产物的传质速度。在其他条件相同的情况下,在 30~70 ℃ 范围内测定 3 种底物在不同温度下对反应初速度的影响,实验结果见图 3。

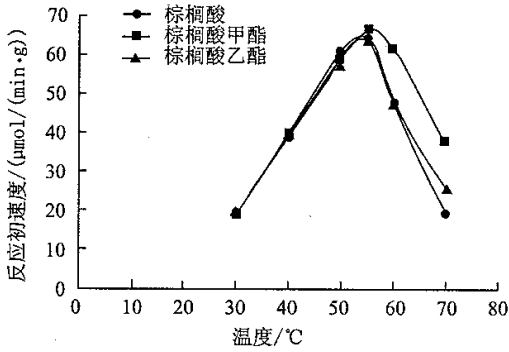


图 3 温度对反应初速度的影响

Fig. 3 Effect of temperature on primary reaction velocity

由图 3 可见,温度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度具有较大的影响.随着温度的升高,3 种底物合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的反应初速度都迅速升高,当达到 55 ℃ 时,随着温度的继续升高,反应初速度反而迅速降低.3 种底物合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的最适温度都为 55 ℃.

2.3 水分活度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响

在其他条件相同的情况下,分别研究了在不同水分活度下,酶对以棕榈酸、棕榈酸甲酯、棕榈酸乙酯为底物的 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响,结果见图 4.可知,随着水分活度的增加,酶活力逐渐下降,反应初速度逐渐降低.研究中仅对溶剂和底物进行了水分活度的平衡实验,在水分活度为 0 的情况下,固定化酶本身所固有的水分即可保证酶活达到最高,因为一定量的水对于酶的活力是必不可少的,水分子可以屏蔽酶分子内部极强的集团间的静电作用,使酶分子有足够的“柔性”,能够处于催化作用所必需的构象状态^[4].随着水分活度的增加,水在酶分子周围形成“水簇”^[5],此时酶活逐渐降低,同时水分含量的增加也导致水解反应的加速,使得反应初速度降低.

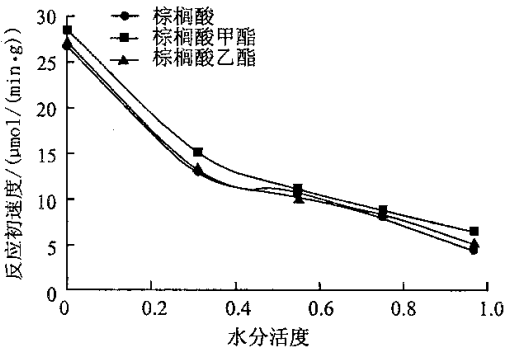


图 4 水分活度对反应初速度的影响
Fig.4 Effect of water activity on primary reaction velocity

2.4 酶质量分数对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响

在其他条件相同的情况下,分别研究了不同质量分数的酶对以棕榈酸、棕榈酸甲酯、棕榈酸乙酯为底物的 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响,实验结果见图 5~7.可知,随着酶质量分数的增大,反应初速度逐渐加快,但并不是呈线性增加.当酶质量分数达到某一值时,反应初速度基本保持恒定,这是由于底物已被酶全部饱和,故酶反应初速度保持不变.当酶质量分数在 20% 以上时,反应初速度基本恒定.

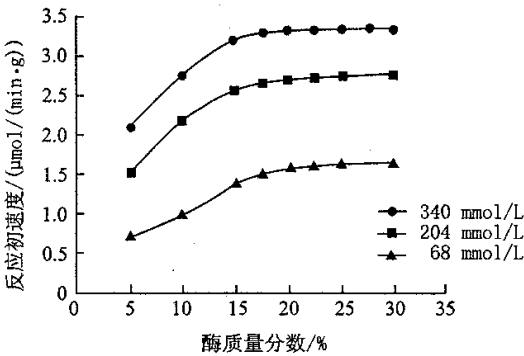


图 5 酶对以棕榈酸为底物的 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响
Fig.5 Effect of palmitate with different lipase concentration on synthesis of L-ascorbyl palmitate

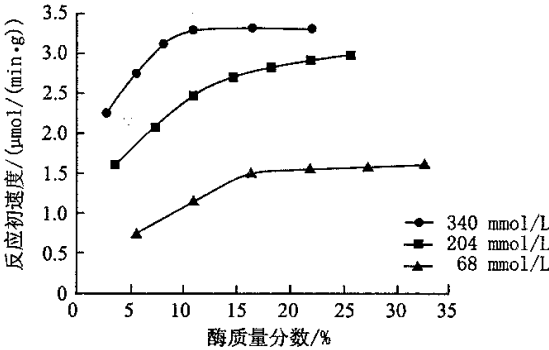


图 6 酶对以棕榈酸甲酯为底物的 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响
Fig.6 Effect of methyl palmitate with different lipase concentration on synthesis of L-ascorbyl palmitate

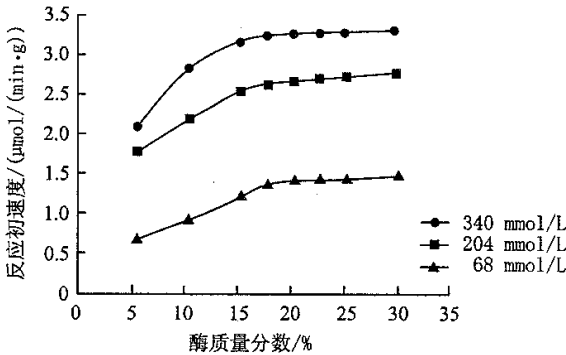


图 7 酶对以棕榈酸乙酯为底物的 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响
Fig.7 Effect of ethanyl palmitate with different lipase concentration on synthesis of L-ascorbyl palmitate

2.5 底物浓度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响

在 L-抗坏血酸和酶量等条件相同的情况下,改

变 3 种底物的浓度,测出相应的反应初速度,结果见图 8.可知,L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度随着底物浓度的增大而加快,此后,反应初速度变化的趋势逐渐变缓,最后达到一恒定值.

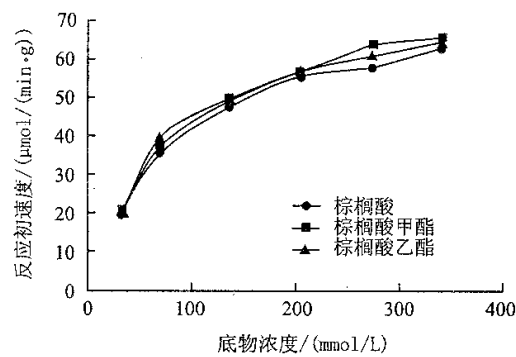


图 8 底物浓度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响

Fig.8 Effect of substrate concentration on the primary reaction velocity of the synthesis of L-ascorbyl palmitate

2.6 动力学参数的确定

由于 L-抗坏血酸在叔戊醇溶剂中是微溶的,因此它在体系中的浓度可视为恒定,此反应可看作是单底物反应.根据 Lineweaver Burk 方程可得到 $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$,利用双倒数作图法求解各动力学参数,结果见图 9~11.

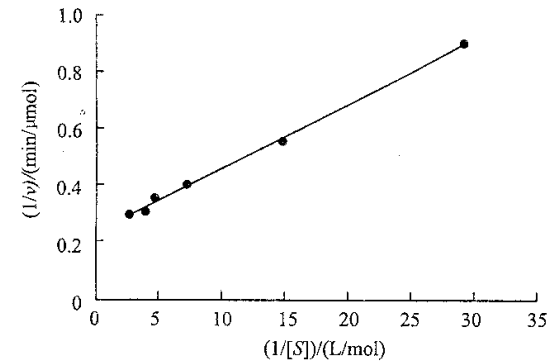


图 9 棕榈酸合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的 1/[S] 与 1/v 的关系

Fig.9 Relation between 1/[S] and 1/v in synthesis of L-ascorbyl palmitate from methanoyl palmitate

由图 9~11 可知,棕榈酸与 L-抗坏血酸合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的米氏常数 $K_m = 0.102$, $v_{max} = 4.17$,米氏方程为 $\frac{1}{v} = 0.0245 \cdot \frac{1}{[S]} + 0.240$.

棕榈酸甲酯与 L-抗坏血酸合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的米氏常数 $K_m = 0.0949$, $v_{max} = 4.24$,
万方数据

米氏方程为 $\frac{1}{v} = 0.0224 \cdot \frac{1}{[S]} + 0.236$.

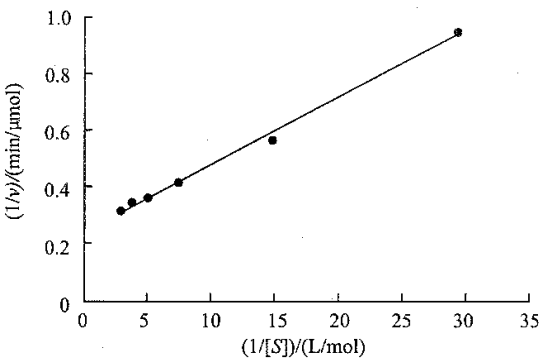


图 10 棕榈酸甲酯合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的 1/[S] 与 1/v 的关系

Fig.10 Relation between 1/[S] and 1/v in synthesis of L-ascorbyl palmitate from methanoyl palmitate

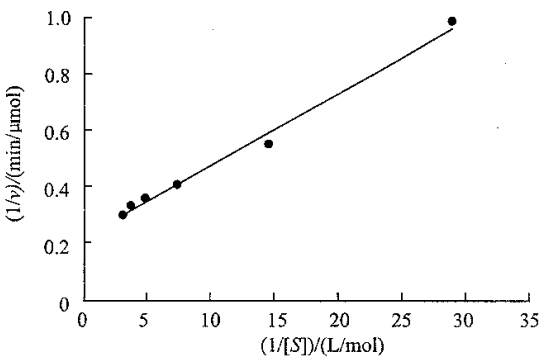


图 11 棕榈酸乙酯合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的 1/[S] 与 1/v 的关系

Fig.11 Relation between 1/[S] and 1/v in synthesis of L-ascorbyl palmitate from ethanoyl palmitate

棕榈酸乙酯与 L-抗坏血酸合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的米氏常数 $K_m = 0.104$, $v_{max} = 4.35$,
米氏方程为 $\frac{1}{v} = 0.0239 \cdot \frac{1}{[S]} + 0.230$.

如果同一种酶有几种底物,就有几种 K_m 值,其中 K_m 值最小的底物一般称为该酶的最适底物.不同的底物有不同的 K_m 值说明同一酶对不同底物的亲和力不同,一般用 $1/K_m$ 近似地表示酶对底物亲和力的大小, $1/K_m$ 愈大,表示酶对该底物的亲和力大,酶促反应易于进行.棕榈酸的 $K_m = 0.102$,棕榈酸甲酯的 $K_m = 0.0949$,棕榈酸乙酯的 $K_m = 0.104$.可见,棕榈甲酯的 K_m 值最小, $1/K_m$ 最大,即与酶的亲和力最大,酶促反应易进行.

3 结 语

系统地研究了酶法合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯

的影响动力学的各种因素 ,确定了最佳的酶促反应环境 ,实现了条件的最优化 ,并对底物进行了比较 ,

得出了对酶亲和力最大的底物 ,对酶反应工艺的确
定和酶反应器的选择具有一定的参考价值.

参考文献

- [1] ZAKA A , KLIBANOV A M. Enzymatic catalysis in organic media[J]. **Science** ,1984 ,224 :1249~1251.
- [2] NIPPON ROSHU K K. Antioxidative properties of ascorbyl palmitate[J]. **Jpn Fudo Saiensu** ,1992 ,31(9) 22~30.
- [3] HUMEAU . Synthesis of 6-O-palmitoyl L-ascorbic acid catalyzed by candida antica lipase[J]. **Biotechnology Letters** ,1995 ,17 (10) :1091~1094.
- [4] ZAKS A , KLIBANOV A M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents[J]. **J Biol Chem** ,1988 ,263 :3194~3201.
- [5] AFFLECK R , XN I F , SNZAWA V , et al. Enzymatic catalysis and dynamics in lower water environment[J]. **Proc Natl Acad Sci USA** ,1992 ,89 :1100~1104.