

文章编号: 1005-8893 (2000) 03-0027-03

脂肪酶催化酯化反应动力学^{*}

盛 梅¹, 朱海鸥², 戚 俊²

(1. 江苏石油化工学院 化学工程系, 江苏 常州 213016)

摘要: 在正己烷中应用工业用脂肪酶催化油酸和正十二醇的酯合成反应, 研究了该反应的动力学机制, 考察了酶和底物浓度对反应初速度的影响。结果发现: 反应过程中不存在底物抑制及扩散限制, 反应为动力学控制, 符合 Michaelis-Menton 方程。脂肪酶催化动力学符合 Ping-Pong Bi Bi 机理。

关键词: 酯化; 脂肪酶; 动力学

中图分类号: O 643.32 Q 556

文献标识码: A

有机相中酶生物催化的研究, 为酶的应用开辟了崭新的研究领域。脂肪酶可催化酯合成、内酯合成和酯交换反应。反应可在温和的条件下进行, 无环境污染, 能耗较低, 且脂肪酶具有高度的立体专一性和对底物的选择性^[1]。利用脂肪酶作为催化剂可合成许多化学法无法合成的产品, 减少中间产品和副产品的分离负荷^[2]。脂肪酶催化酯合成可广泛应用于食品添加剂工业^[3], 尤其是调味品的制备, 将酶催化酯合成应用于生产高质量的化妆品和药品添加剂已实现工业化。利用脂肪酶催化酯合成反应还可从植物油除臭剂馏出液中回收甾醇和维生素 E^[4]。

近年来, 国内外对脂肪酶在有机相中催化酯化反应的研究报道日益增多, 而对有机相中酶催化酯化反应的动力学研究报道相对较少^[1,5], 而动力学研究是弄清反应机理及设计生物反应器的基础。作者研究了正己烷中脂肪酶催化油酸和正十二醇酯化反应的动力学, 得出了反应机理和动力学模型, 并由实验数据得出了动力学参数。

1 材料与方法

1.1 材 料

脂肪酶: 洗涤剂工业用固体脂肪酶, 水解橄榄油酶活 126 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 丹麦 NOVO 公司生产。使用前按文献 [6] 方法预处理。

实验所用其它试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.2 实验方法

1.2.1 酶活力的测定

见文献 [7]。

1.2.2 脂肪酶催化酯化反应

将含一定浓度正十二醇和油酸的正己烷溶液 25 mL 置于锥形瓶内, 加入适量的酶溶液, 密闭后于 150 r/min 下恒温振荡反应 30 min, 取样分析。

1.2.3 反应初速度的测定

移取 30 μL 上述反应液于含有 5 mL 正己烷和 1 mL Cu (Ac)₂-吡啶溶液 (4% 的 Cu (Ac)₂ 用吡啶调节 pH 值至 6.1) 的比色管中, 经充分振荡后, 搁置过夜或在 3 000 r/min 下离心, 取上层用分光光度计 (在 710 nm 处) 测定其吸光度; 以同样方法制备不含酶的空白溶液作参比, 对照油酸浓度一吸光度标准曲线 (图略), 可测出反应前后反应液中油酸的浓度 (设分别为 c_1 、 c_2 , $\mu\text{mol/mL}$), 酯化反应初速度 v 可按下式计算:

$$v = \frac{25 \times (c_1 - c_2)}{30 \times m} \quad [\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})]$$

* 收稿日期: 2000-06-13

作者简介: 盛梅 (1964-), 女, 江苏江阴人, 副教授, 硕士; 2- 本院化学工程系 99 届毕业生。

2 结果与讨论

2.1 振荡速度与加酶量对反应速度的影响

实验测定了振荡器振荡速度对酯化反应初速度的影响,发现振荡速度大于 90 r/min 时对反应初速度基本没有影响。本实验采用振荡速度为 150 r/min,因此可忽略外扩散对反应速度的影响。

图 1 所示为在正己烷中油酸和十二醇进行酯化反应时,在不同底物浓度下,加酶量对反应初速度的影响。由图 1 可知,在试验所采用的底物浓度范围内,反应初速度随加酶量的增加而线性增加,表明酯化反应受动力学控制。

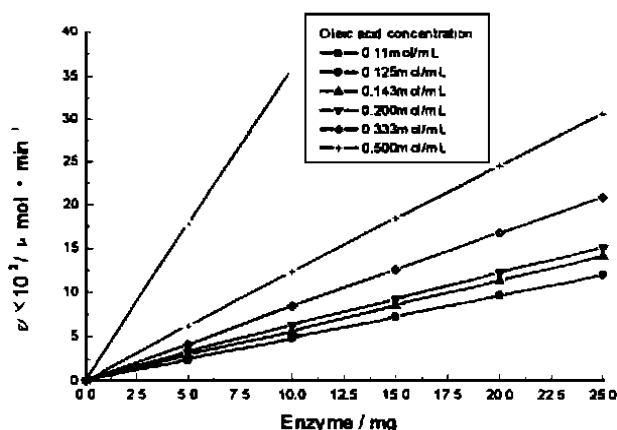


图 1 加酶量对反应速度的影响

2.2 底物浓度对反应初速度的影响

图 2 为底物浓度与酯化反应初速度之间的关系。由图 2 可见,当固定一底物浓度时,反应初速度随另一底物浓度的增加而增大。在试验所采用的

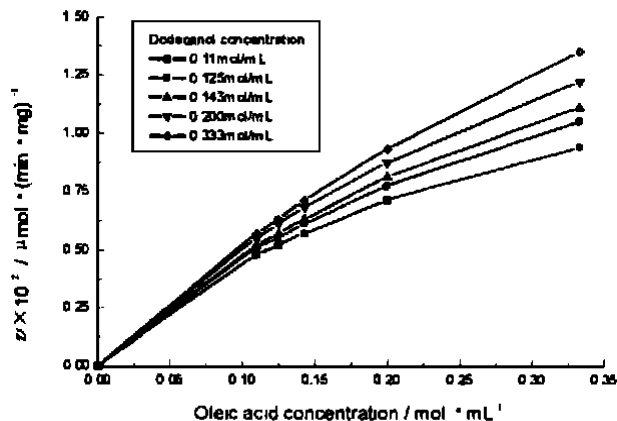


图 2 底物浓度对初速度的影响

底物浓度范围内,不存在底物抑制现象。Ramar-murthi^[5]等人报道,当底物甲醇的浓度较高时,对酶催化酯化反应存在抑制作用。这是因为甲醇是短链醇,其极性较大,易形成亲水性界面,夺取脂肪酶表面“必需”水层中的部分水,从而破坏蛋白质的三元结构,使酶失活。与甲醇相比,本试验所用的正十二醇为极性较小的长链醇,它不易形成亲水性界面,因此,不存在底物抑制现象。

将图 2 中的数据作双倒数图,得到如图 3 所示的一系列基本平行的直线,即斜率相等。可见,正十二醇与油酸的酯化反应遵循 Michaelis-Menton 动力学,酯化反应符合 Ping-Pong Bi Bi 反应机制。且由图 3 中斜率可得出:

$$K_{ma}/v_{max} = 17.2 \quad (1)$$

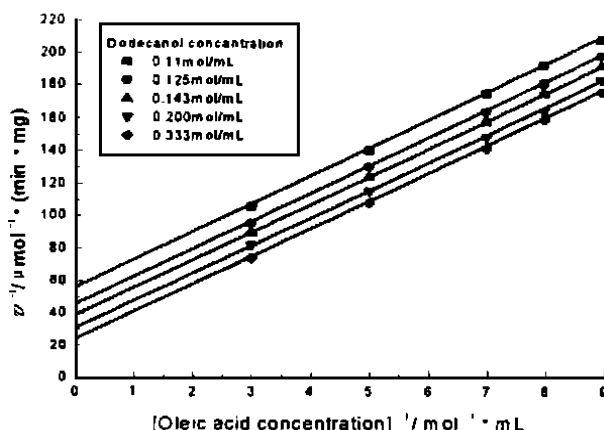


图 3 初速度与油酸浓度的双倒数图

2.3 反应模型

在正己烷中脂肪酶催化油酸和十二醇的反应属双底物酶促反应,在反应过程中,脂肪酶首先与油酸形成了一个非共价脂肪酶-酸复合物 EA,然后经单分子异构化反应,转化成酰基-酶中间体 F,同时释放出水 P。脂肪酶也可以与正十二醇形成脂肪酶-醇惰性复合物 EB,这是因为修饰酶(在第一步反应中释放出水后形成的酰基-酶复合物)与自由酶具有相似的结构^[8]。修饰酶也可与正十二醇形成酰基-酶-醇复合物,也可通过单分子异构化反应形成脂肪酶-酯复合物,然后形成产物酯,并释放出酶,由此得出反应速度方程如下:

$$v = \frac{v_{max} C_A C_B}{K_{ma} C_B + K_{mb} C_A + C_A C_B}$$

2.4 动力学常数的求取

将图 3 中的纵截距与正十二醇浓度的倒数作

图, 得到如图 4 所示的直线。

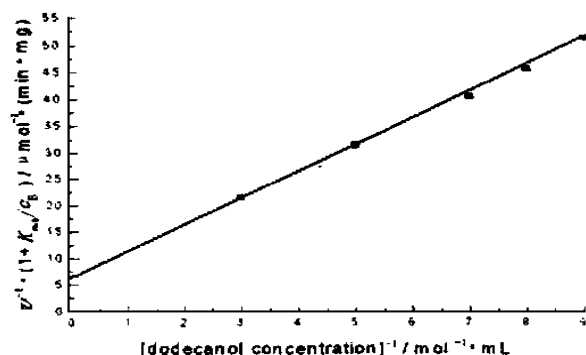


图 4 双倒数坐标图纵截距与正十二醇浓度倒数关系

由此直线的纵截距和斜率分别得到:

$$1/v_{\max} = 6 \quad (2)$$

$$K_{mb}/v_{\max} = 5 \quad (3)$$

联立求解式 (1)、式 (2)、式 (3), 得:

$$v_{\max} = 0.167 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$$

$$K_{ma} = 2.87 \text{ mol/mL}$$

$$K_{mb} = 0.83 \text{ mol/mL}$$

将三个动力学常数代入上述速度方程中, 得出动力学方程为:

$$v = \frac{0.167c_A c_B}{2.87c_B + 0.83c_A + c_A c_B}$$

3 结 论

对脂肪酶在正己烷中催化油酸和正十二醇酯化反应动力学进行了研究, 发现在动力学控制条件下, 反应符合 Michaelis—Menton 方程, 不存在底

物抑制现象, 底物浓度对反应速率的影响符合 Ping—Pong Bi Bi 反应机理。

符号说明:

m ——酶的质量, mg v ——反应速度, $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$

c_A ——油酸浓度, mol/mL c_B ——正十二醇浓度, mol/mL

K_{ma} ——酸的动力学常数, mol/mL

K_{mb} ——醇的动力学常数, mol/mL

v_{\max} ——最大反应速度, $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$

参考文献:

- [1] Yee P Y, Bushra A D. Kinetics Studies on Immobilized Lipase Esterification of Oleic Acid and Octanol [J]. J Chem Tech Biotechnol, 1996, 65: 239—248
- [2] Macrae A R. Tailored Triacylglycerols and Esters [J]. Biochem Soc Trans, 1989, 17 (6): 1 146—1 148.
- [3] Posorke L H, Lefebvre G K, Miller C A, et al. Process Considerations of Continuous Fat Modification with an Immobilized Lipase [J]. J Am Oil Chem Soc, 1988, 65 (6): 922—930.
- [4] Ramamurthi S, Bhind P R, McCurdy A R. Enzymatic Methylation of Canola Oil Deodorizer Distillate [J]. J Am Oil Chem Soc, 1991, 68 (12): 970—975.
- [5] Ramamurthi S, McCurdy A R. Lipase—catalyzed Esterification of Oleic Acid and Methanol in Hexane ——A Kinetic Study [J]. J Am Oil Chem Soc, 1994, 71 (9): 927—930.
- [6] 曹国民, 黄杰, 高广达. 蚕丝固定化脂肪酶的研究 [J]. 生物工程学报, 1997, 13 (1): 88—92.
- [7] 曹国民, 盛梅, 高广达. 蚕丝固定化脂肪酶催化性能研究 [J]. 日用化学工业, 1997, 6: 11—13.
- [8] Purich D L. In Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism [M]. New York: Academic Press, 1983 254.

Kinetics Studies on Lipase—Catalyzed Esterification of Oleic Acid and Dodecanol in Hexane

SHENG Mei¹, ZHU Hai—ou², QI Jun²

(1. Department of Chemical Engineering, Jiangsu Institute of Petrochemical Technology, Changzhou 213016, China)

Abstract: The kinetics of lipase—catalyzed esterification of oleic acid and dodecanol in hexane was investigated. The effect of enzyme and substrate concentration on the initial rate of esterification was studied, and the reaction kinetics was described in terms of the Michaelis—Menton mechanism. No evidence of inhibition by oleic acid and dodecanol was found at all substrate concentrations. The kinetics constants were measured for the reaction in the absence of any significant diffusional limitations. It was suggested that the kinetics of the enzymatic reaction agreed with a Ping—Pong Bi Bi mechanism.

Key words: esterification; lipase; kinetics