

酶促棕榈酸鲸蜡酯合成的底物抑制作用

赵晶晶¹ 王芳^{1,2} 邓利^{1,2} 谭天伟^{1,2*}

(北京化工大学 1. 生命科学与技术学院; 2. 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029)

摘要: 对实验室自制的固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶在正己烷中催化棕榈酸和鲸蜡醇的酯化反应的动力学机制进行了初步研究, 结果表明: 反应为动力学控制, 不存在扩散限制, 底物浓度对反应速率的影响符合 Ping-Pong Bi-Bi 反应机制。但在不同的底物浓度范围内存在不同程度的底物抑制作用, 其中以长链醇的抑制为主。本文根据底物浓度由低到高, 划分了三个底物浓度范围, 在不同的范围内分别研究了两个底物的抑制作用, 并选择不同的动力学模型, 求得了动力学常数。

关键词: 棕榈酸鲸蜡酯; 脂肪酶; 酯化; 动力学机制; 底物抑制作用

中图分类号: TQ645.9

引言

鲸蜡是最有经济价值的蜡酯之一, 被广泛用于化工、纺织、医药、日化和食品等工业中。天然鲸蜡主要取自抹香鲸的头部, 还有一些来自鲸蜡油。鲸蜡的主要成分和有效成分为棕榈酸鲸蜡酯, 含量至少是 90%。1970 年, 抹香鲸被列为濒临灭绝的物种, 各国开始禁止抹香鲸的捕杀, 使得鲸蜡资源紧缺, 不能满足市场的需求。

笔者在前期的实验中, 采用本实验室自主研发的固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶^[1]酶膜催化合成了棕榈酸鲸蜡酯, 研究了在有机介质中催化棕榈酸和鲸蜡醇酯化反应合成棕榈酸鲸蜡酯的反应、分离提纯过程, 在实现较高转化率的同时降低了脂肪酶的成本, 形成一条完整的工艺路线, 很有工业化潜力。

有机介质中脂肪酶催化棕榈酸鲸蜡酯合成的动力学研究^[2-3]是指导该反应过程优化和产业化的基础。在酶催化反应符合米氏方程的条件下, 脂肪酶催化酯化反应的动力学一般符合 Ping-Pong 反应机理^[4]。反应时, 随底物浓度的不同, 呈现的底物抑

制情况也不同, 如果确定了出现不同底物抑制时的底物浓度范围, 就可以根据底物浓度确定反应动力学模型及其动力学常数, 这对反应工艺的改进, 反应器的合理设计和放大都具有重要的参考价值, 为此本文在消除扩散的影响下研究有机相反应动力学中底物抑制的一些规律。

1 实验部分

1.1 实验材料

棕榈酸、鲸蜡醇、正己烷, 分析纯, 北京化学试剂公司; 固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶, 水解酶活 250 U/g, 实验室自制。

1.2 实验方法

在 50 mL 具塞锥形三角瓶中, 准确加入一定量的棕榈酸和鲸蜡醇, 加入 0.200 g 固定化脂肪酶和一定量的正己烷使反应体系的总体积为 5 mL, 放在温度为 40℃、转速为 180 r/min 的摇床中反应。反应进行到 3、5、10 min 时分别取样检测, 计算棕榈酸鲸蜡酯的增加量, 进而外推至零时刻, 用其作为反应初速率 v_0 。

1.3 分析方法

在初始反应体系中, 当棕榈酸浓度在 0.02 mol/L 到 0.08 mol/L 时, 反应后用 0.050 mol/L 的 NaOH 溶液滴定; 当棕榈酸浓度在 0.08 mol/L 到 1.00 mol/L 时, 用 0.200 mol/L 的 NaOH 溶液滴定。

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 反应过程中, 若底物或产物

收稿日期: 2007-04-15

基金项目: 国家自然科学基金 (20576013); 国家“973”计划 (2003CB716002); 北京市自然科学基金 (2071002); 北京市科技计划 (D0205004040211)

第一作者: 女, 1982 年生, 硕士生

*通讯联系人

E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

在液相主体和固定化酶外表面之间存在着浓度梯度时会引起外扩散,它的存在会使反应发生脉冲性的影响。实验测定了反应摇床转速对酯化反应初速率的影响,见图 1。发现当摇床转速大于 120 r/min 时,反应初速率基本保持恒定。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。为将外扩散的影响降低到最小,将转速定为 180 r/min。

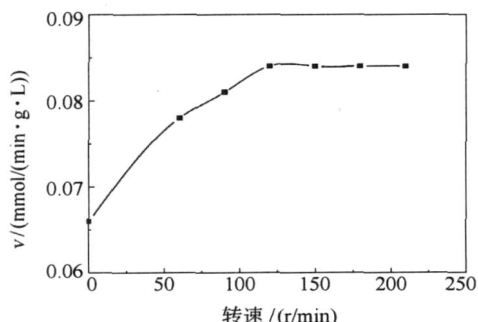


图 1 摇床转速对反应初速率的影响

Fig. 1 Effect of shaker speed on initial reaction rate

2.1.2 内扩散的影响 固定化酶催化的反应与固定化酶颗粒内部的物理结构常数、反应物系的性质等因素有关时会影响其内部阻力的变化而发生内扩散。但实际中并非所有的固定化酶催化反应都会存在严重影响其微孔内阻力的内扩散限制效应,本实验体系测定了酶浓度对反应初速率的影响,从图 2 中可以看出:酶浓度在 10 ~ 80 g/L 的范围内,随着酶浓度的增加,反应初速率逐渐加快,并且呈现线性关系。说明内扩散对整个反应的影响不大,反应主要是由动力学所控制。因此在建立动力学模型时可以忽略内扩散对反应速率的影响。

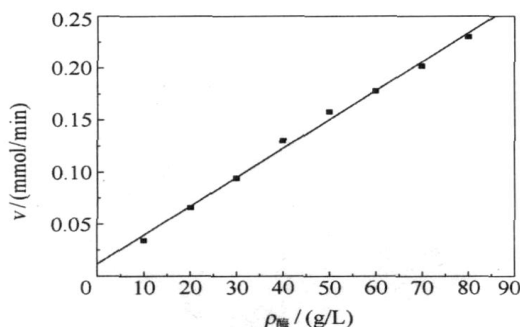


图 2 酶浓度对反应初速率的影响

Fig. 2 Effect of lipase concentration on initial reaction rate

2.2 动力学常数的求解

2.2.1 无底物抑制的浓度范围及其动力学常数

研究双底物的酶催化反应动力学,可以采用固定其中一种底物浓度不变,改变另一种底物浓度测其初速率的方法,通过作反应初速率和底物浓度的双倒数图来判断反应机制和底物抑制状况。正己烷中棕榈酸和鲸蜡醇的合成反应是在脂肪酶浓度为 0.04 g/mL,棕榈酸浓度 c_A 为 0.05 ~ 0.50 mol/L,鲸蜡醇浓度 c_B 为 0.04 ~ 1.00 mol/L 中进行的,实验分别固定鲸蜡醇的量,在不同棕榈酸浓度下测得酶促酯化反应的初速率 v ,分别对 $v^{-1} - c_A^{-1}$ 做图。

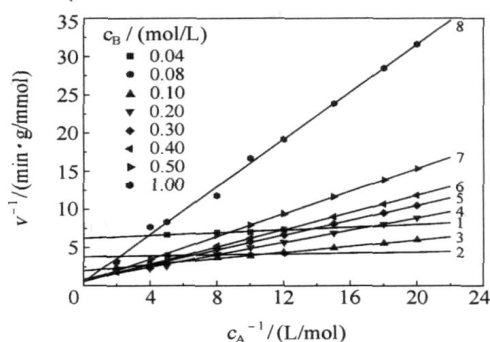


图 3 两底物浓度较低时的双倒数曲线

Fig. 3 Double-reciprocal plots of initial reaction rate of cetyl palmitate at low substrate concentrations

从图 3 可以看出,在醇浓度极低时(0.04 ~ 0.08 mol/L),图中的两条直线 1 和 2 基本平行,斜率基本相等,随着醇浓度的增加,在 v^{-1} 轴上的截距也逐渐减小,符合无底物抑制的酶催化反应 Ping-Pong Bi-Bi 机制的特征^[5],反应中,棕榈酸首先与脂肪酶结合,形成了非共价结合的脂肪酶-酸复合物 $E \cdot A$,脂肪酶-酸复合物 $E \cdot A$ 转换成羧酸-脂肪酶中间体 $E \cdot Ac$,同时释放出水,酰基化酶中间体接着与鲸蜡醇反应,形成了一个二元复合物 $E \cdot Q$,通过对鲸蜡醇的羟基亲电进攻后,这个二元复合物最后转变成酯 Q ,释放出酶 E ,自由的酶继续催化其他分子反应。其动力学行为可描述成

$$v = \frac{V_m c_A c_B}{K_A c_B + K_B c_A + c_A c_B} \quad (1)$$

其中: v 为反应速率, mmol/(min · g); V_m 为最大反应速率, mmol/(min · g); c_A 为酸的浓度, mol/L; c_B 为醇的浓度, mol/L; K_A 为酸的动力学常数, mmol/L; K_B 为醇的动力学常数, mmol/L。

可以通过对方程(1)的变换作图法求取动力学常数^[6],求得的动力学常数见表 1。

表 1 双底物抑制时的动力学常数

Table 1 Kinetic constants from Ping-Pong Bi-Bi model

反应类型	$V_m / (\text{mmol} / (\text{min} \cdot \text{g}))$	$K_A / (\text{mmol} / \text{L})$	$K_B / (\text{mmol} / \text{L})$	$K_{iB} / (\text{mmol} / \text{L})$	$K_{iA} / (\text{mmol} / \text{L})$
无底物抑制	7.092	0.723	1.652	—	—
只有醇抑制	4.975	0.846	0.199	0.027	—
双底物抑制	2.538	0.496	0.137	0.198	0.077

2.2.2 只有醇抑制的底物浓度范围及其动力学常数 从图 3 还可以看出,随着醇浓度继续增加(0.10 ~ 1.00 mol/L),从 3 到 8,直线的斜率逐渐增加,在 v^{-1} 轴上的截距减少,说明此时动力学行为显示出单底物抑制的 Ping-Pong Bi-Bi 机制的特征。这个抑制即为醇抑制,是在反应的初始阶段,过量鲸蜡醇与脂肪酶形成了死端酶-鲸蜡醇复合物 E-B 所造成的。其动力学行为可描述成

$$v = \frac{V_m c_A c_B}{K_A c_B \left(1 + \frac{c_B}{K_{iB}}\right) + K_B c_A + c_A c_B} \quad (2)$$

其中, K_{iB} 为醇的抑制常数, mmol/L。

可以通过作图法求解动力学常数,对方程(2)变换如下

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_m} + \frac{K_B}{V_m c_B} \right) + \frac{K_A}{V_m} \left(1 + \frac{c_B}{K_{iB}} \right) \frac{1}{c_A} = b + k \frac{1}{c_A} \quad (3)$$

$$b = \frac{1}{V_m} + \frac{K_B}{V_m c_B} \quad (4)$$

$$k = \frac{K_A}{V_m} + \frac{K_A}{V_m K_{iB}} c_B \quad (5)$$

为了求解动力学常数,对图 3 各点拟和线性关系,求取截距 b 和斜率 k ,然后分别对 $b c_B^{-1}$, $k c_B$ 作图,拟和线性关系后求出斜率和截距,并代入方程(4)和(5),可以求得动力学常数见表 1。

2.2.3 两种底物抑制的浓度范围及其动力学常数

为了研究底物中酸的抑制情况,固定醇的浓度,继续把酸的浓度增加,发现在酸的浓度大于 0.5 mol/L 时,随着酸浓度的增大,反应初速率开始减小,呈双倒数形如图 4 所示。

酸抑制反应是由于羧酸-脂肪酶中间体 E·Ac 与酸形成死端抑制复合物 E·Ac-A 所造成的^[7-8],因此在此条件下,两个底物的抑制作用均十分明显。为了更准确的描述酶促酯化反应的动力学特征,本文采用双底物抑制的 Ping-Pong Bi-Bi 机制描述。

$$v = \frac{V_m c_A c_B}{K_A c_B \left(1 + \frac{c_B}{K_{iB}}\right) + K_B c_A \left(1 + \frac{c_A}{K_{iA}}\right) + c_A c_B} \quad (6)$$

其中, K_{iA} 为酸的抑制常数, mmol/L。

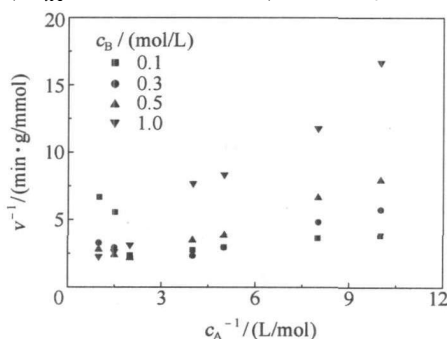


图 4 双底物抑制时的双倒数图

Fig. 4 Double-reciprocal plots of palmitic acid concentration versus initial reaction rate at fixed cetyl alcohol concentration at high substrate concentrations

将反应初速率与棕榈酸和鲸蜡醇浓度的关系在三维坐标中表示出来,如图 5 所示。对其所有的数据,采用方程(6)进行非线性拟和能得到其动力学常数,见表 1,可以看出醇的抑制常数要比酸的抑制常数大很多,说明了在酶催化合成长链蜡酯过程中,反应物长链醇的抑制作用是主要的,故建议在实验中

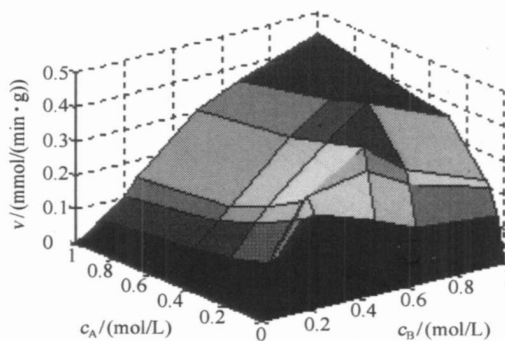


图 5 反应初速率与棕榈酸和鲸蜡醇浓度的关系

Fig. 5 Dependence of the initial reaction rate on the concentrations of both substrates

用自动或手动方法监控醇的加入量或采取脉冲加入为好。将得到的动力学方程也在三维坐标中表示, 见图 6, 经过验证, 图 6 中拟和得到的数据与图 5 所示的实验值的误差在 8 % 以内, 说明拟和得到的方程可以较好的反映出长链酸醇之间酯化反应的动力学特征。

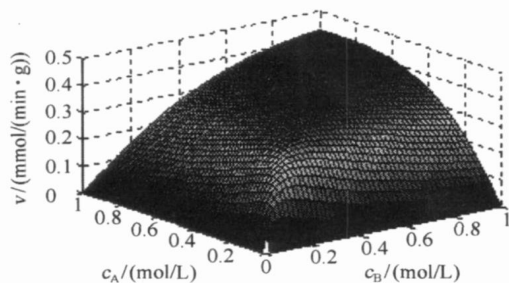


图 6 经非线性拟和后的动力学模型关系

Fig. 6 Representation of the parameters obtained for the Ping-Pong Bi-Bi model

3 结论

根据底物浓度的不同, 分阶段采用三种动力学模型描述反应, 在两种底物浓度极低的时候, 没有底物的抑制作用, 反应可以用无抑制作用的 Ping-Pong Bi-Bi 机制来表示; 在两种底物浓度比较低的时候, 只有醇的抑制作用较明显, 反应可以用符合单底物抑制作用的 Ping-Pong Bi-Bi 机制来表示; 当两底物浓度较大时 (大于 0.5 mol/L), 酸的抑制作用也不能忽略, 存在两种底物的抑制作用, 可以用符合双底物抑制作用的 Ping-Pong Bi-Bi 机制来表示。

参考文献:

- [1] TAN Tianwei, ZHANG Mu, WANG Bingwu, et al. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production lipase by fermentation [J]. Process Biochemistry, 2003, 39(4): 459 - 465.
- [2] GARCIA T, COTERON A, MARTINEZ M, et al. Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst [J]. Chemical Engineering Science, 2000, 55(8): 1411 - 1423.
- [3] RODRIGUEZ-NOGALES J M, ROURA E, CONTRERAS E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: A statistical approach [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(1): 63 - 68.
- [4] SEGEL I H. Enzyme Kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems [M]. New York: Wiley, 1975.
- [5] YADAV G D, LATHI P S. Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1, 2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(6): 814 - 820.
- [6] 周国伟, 黄锡荣, 李越中, 等. 脂肪酶在微乳液和微乳液凝胶中催化辛酸辛醇的酯化反应 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 224 - 227.
- [7] YADAV G D, LATHI P S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: Kinetic studies [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 27(2 - 3): 113 - 119.
- [8] ROMERO M D, CALVO L, ALBA C, et al. Kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in *n*-hexane [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 127(2): 269 - 277.

Substrate inhibition of wax ester synthesis catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99-125

ZHAO JingJing¹ WANG Fang^{1,2} DENG Li^{1,2} TAN TianWei^{1,2}

(1. College of Life Science and Technology; 2. Beijing Key Laboratory of Bioprocess, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The synthesis of cetyl palmitate in hexane has been investigated with immobilized lipase *Candida* sp. 99-125 prepared in our laboratory as the catalyst. The kinetics of the reaction were found to be consistent with the Ping-Pong Bi-Bi mechanism, which is characterized by inhibition by both alcohol and acid. The long-chain alcohol was shown to be the primary competitive inhibitor of the esterification. The inhibition effects of both substrates were studied in three different concentration ranges. Appropriate kinetic models for different substrate concentrations are proposed and the apparent kinetic parameters are calculated.

Key words: cetyl palmitate; lipase; esterification; kinetics; substrate inhibition