

恒pH控制对释放质子的酶反应动力学的影响

——一种变体积酶反应动力学

汪 恩 浩

(北京市营养源研究所, 北京)

俞 俊 棠

(华东化工学院, 上海)

释放质子的酶反应常通过滴加碱溶液将反应控制在恒pH条件下进行研究。由于碱溶液的加入, 随着反应的进行, 反应体系的体积不断增加。本文研究了这种变体积的酶反应动力学, 并用青霉素酰胺酶水解半青霉素的反应进行了验证。

关键词 释放质子的酶反应; 恒pH控制; 变体积反应体系; 动力学

许多酶催化的反应释放质子。为使反应在恒 pH 条件下进行, 常采用自动电位滴定计自动控制向反应液中滴加标准碱溶液, 以维持反应体系的 pH 恒定。如果我们的目的是要测定酶反应的初速度, 则加入的碱溶液的量很小, 它对反应速度的影响可忽略不计。但如果研究的对象是反应的过程, 或需要利用反应的浓度-时间曲线的实验数据, 碱溶液的加入量就很可观, 不容忽视。随着反应的进行, 反应液的体积不断增加, 酶的浓度不断下降; 底物的浓度除因反应而降低外, 同时也因碱溶液的加入而减少; 产物的浓度因反应而有升高的趋势, 同时又被加入的碱溶液所稀释而有下降的趋势。此时反应属变体积反应体系, 或开放体系。以假定反应体积恒定不变导出的动力学方程此时是否还适用需要重新检验^[1]。虽然提高碱液浓度或缓冲剂的浓度可减少这种稀释效应, 但是, 由于酶、底物和产物一般对 pH 很敏

感, 如滴入的碱溶液浓度过高, 在反应液中会引起局部 pH 过高, 加速酶的失活或底物、产物的破坏。故盲目提高碱溶液浓度以减少滴加总量的方法并不可取; 对某些酶反应, 高浓度的缓冲剂对酶的活力有抑制作用。在生产上, 提高缓冲剂的浓度不仅增加生产成本, 更会干扰后续浓缩、精制工序。因此采用较稀的碱溶液来控制反应的 pH 常常是必要的。

现在摆在我们面前的问题是恒 pH 控制引起反应体积不断增加对反应速度的影响。这个问题属于开放体系酶反应动力学范畴, 迄今尚未见文献论述。由于反应动力学方程是运用诊断变量法和非线性数值最优化方法等对反应进行模型检验或参数估计的依据^[2,3,6], 因此只有对这种变体积的开放体系酶反应动力学有深入的了解, 才能正确运用。本文对此问题进行了理论

本文于1984年10月9日收到。

分析, 得到变体积的酶反应动力学方程, 并据此探讨了碱液浓度对反应过程的影响等。明胶、戊二醛固定化含青霉素酰胺酶大肠杆菌细胞(以下简称IC)催化水解苜青霉素(BP)的反应被用于验证作者提出的动力学方程。

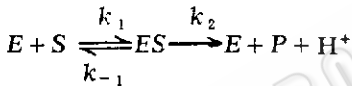
一、变体积的酶反应 动力学方程

为了便于叙述, 假定

(1) 一摩尔底物经酶催化可释放出一摩尔离子质子。

(2) 反应产生的质子立即由自动电位滴定计控制加入标准NaOH溶液中和。反应体系的pH保持恒定。

根据米-曼活性中间络合物学说, 酶催化的反应可用以下示意式说明:



酶反应的速度取决于ES的浓度[ES]和ES的分解速率常数 k_2 , 即

$$v = -\frac{dn_s}{Vdt} = k_2[ES] \quad (1)$$

式中: n_s ——底物的摩尔数 (mol)

V ——反应体积 (l)

k_2 ——ES的分解速率常数 (min)⁻¹

NaOH的加入不改变酶促反应的机理, 因此酶反应的速度取决于[ES]和 k_2 的情况也不会改变。即恒pH控制不改变酶反应的速率表达式(1)。

对于体积不变的封闭反应体系, 等摩尔反应的速率表达式为:

$$v = -\frac{dn_s}{vdt} = -\frac{d\left(\frac{n_s}{v}\right)}{dt} = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

当反应体系因不断加入NaOH而成为开放体系时, V 成为变量, 此时反应速率应为:

$$v = -\frac{dn_s}{Vdt} = -\frac{d(SV)}{Vdt} = -\left(\frac{dS}{dt} + \frac{SdV}{Vdt}\right) \quad (3)$$

(3)式说明当反应体积变化时, 反应速率不能用 $-dS/dt$ 来表示。虽然(3)式把反应体积对时间的变化率结合到反应速率表达式中, 但很难直接用它来分析实验数据, 需作进一步推导。由假设条件可知:

$$N(V - V_0) = n_{s_0} - n_s = S_0V_0 - SV \quad (4)$$

式中: N ——NaOH的当量浓度

V_0 ——反应液的初始体积 (l)

V ——反应 t 分钟后反应液的体积 (l)

n_{s_0} ——反应初底物的摩尔数

n_s ——反应 t 分钟后底物的摩尔数

重排(4)式可得:

$$V = V_0 \frac{S_0 + N}{S + N} \quad (5)$$

(4)式两边对 t 微分得:

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{dn_s}{Ndt} \quad (6)$$

将(5)、(6)两式代入(3)式得:

$$-\frac{ds}{dt} = -\frac{S+N}{N} \cdot \frac{dn_s}{Vdt} = -\frac{(S+N)^2}{NV_0(S_0+N)} \cdot \frac{dn_s}{dt} \quad (7)$$

$$\text{或 } v = \frac{N}{N+S} \cdot \frac{ds}{dt} = -\frac{(S+N)}{V_0(S_0+N)} \cdot \frac{dn_s}{dt} \quad (8)$$

(7)、(8)式即为符合假设条件的变体积酶反应动力学方程。

以上分析虽然是在两个假设条件下进行的, 但对于任何释放质子的化学反应, 根据反应的化学计量关系选择适当的系

数,对(7)式或(8)式进行修正,就可得到适用于该反应的动力学方程。

二、变体积酶反应动力学方程的应用

恒 pH 控制所产生的稀释效应对释放质子的酶反应的初速度的影响很小可忽略不计,而随着反应的进行其影响变得越来越大。因此我们所感兴趣的主要是这种稀释效应对反应过程的影响。由于碱液的加入不改变酶反应的速率表达式(1),因此只要把根据米-曼学说导出的酶反应速率方程代入(7)式积分,即可得到反应的底物浓度(或转化率)对时间的过程方程。兹以米-曼动力学为例:

$$v = \frac{dn_s}{V dt} = \frac{V_m S}{K_m + S} = \frac{k_2 [E] S}{K_m + S} \quad (9)$$

上式亦可写成:

$$- \frac{dn_s}{dt} = \frac{k_2 ES}{K_m + S} \quad (10)$$

式中: $[E]$ ——反应体系中酶的浓度

E ——反应体系中酶的总量

将(10)式代入(7)式积分得:

$$\begin{aligned} \left(1 - \frac{K_m}{N}\right) S_0 X + K_m \left(1 + \frac{S_0}{N}\right) \ln \frac{1}{1-x} \\ = \frac{k_2 E}{V_0} t \end{aligned} \quad (11)$$

x 为反应转化率。

$$x = \frac{n_{s_0} - n_s}{n_{s_0}} = \frac{N(S_0 - S)}{S_0(N + S)}$$

(11)式即为释放质子的米-曼型酶反应在恒 pH 控制情况下的转化率-时间过程方程。

利用分批反应的 t 对 S 的试验数据和变体积米-曼动力学方程(11)式,可用

诊断变量法^[5]进行动力学参数估计:

重排(11)式得:

$$A = K_m B + k_2 E \quad (12)$$

$$\text{式中 } A = V_0 S_0 x / t \quad (13)$$

$$B = V_0 [S_0 x / N + (1 + S_0 / N) \ln(1 - x)] / t \quad (14)$$

由分批反应的浓度-时间试验值,根据(13)、(14)二式可算出诊断变量 A 、 B 之值。以 A 对 B 作图可得直线。直线的斜率和截矩分别给出米-曼动力学的两个参数值。

为了估计控制反应 pH 所使用的碱液浓度对反应时间的影响,比较(11)式与恒体积条件下米-曼方程的积分式

$$S_0 x + K_m \ln \frac{1}{1-x} = \frac{k_2 E}{V_0} t^* \quad (15)$$

得到两者的反应时间之差为:

$$\begin{aligned} t - t^* = \Delta t &= \frac{K_m S_0 V_0}{k_2 E N} \left(\ln \frac{1}{1-x} - x \right) \\ &= \frac{K_m S_0 V_0}{k_2 E N} \left(\frac{x^2}{2} + \frac{x^3}{3} + \dots + \frac{x^n}{n} + \dots \right) > 0 \end{aligned} \quad (16)$$

因此,对于米-曼型反应,稀释总是使反应时间延长,其相对时差

$$\frac{\Delta t}{t^*} = \frac{K_m S_0 \left(\ln \frac{1}{1-x} - x \right)}{N \left(S_0 x + K_m \ln \frac{1}{1-x} \right)} \quad (17)$$

(17)式表示相对时差与碱液浓度成反比,但与酶的活力无关。对(17)式求极限得

$$\lim_{x \rightarrow 1} \frac{\Delta t}{t^*} = \frac{S_0}{N} \quad (18)$$

(18)式表示对于米-曼型反应,当反应完成时,相对时差仅与碱液浓度和初始底物浓度有关。尽管当 $x \rightarrow 1$ 时, $S < [E]$, (1)式则不能成立,但是当底物浓度远未降低到接近于酶的浓度时,反应已没有

什么实际意义。故(18)式可用以选择合适的碱液浓度, 或者对已选定的碱液浓度估计可能产生的最大相对时差。特别是当需要将稀释效应控制在可以忽略的范围时, 利用(18)式可以很容易地确定应采用的碱液浓度。

对于其它类型的酶反应, 从方程(7)出发, 遵循同样的途径可得到所需要的结果, 兹不赘述。如反应产生的是弱酸, 在一定的pH下会有部分酸是质子化的, 这将使滴定减少。由反应的pH值和弱酸的pK值可计算出质子化部分的分率, 在计算中校正。

三、实 验

明胶、戊二醛法固定化含青霉素酰胺酶大肠杆菌细胞D₈₁₆^[4]的颗粒度为250μ, 其内扩散阻力可忽略不计^[5]。BP被酶催化水解生成6-氨基青霉烷酸(6-APA)和苯乙酸(PAA)。反应产生的PAA用NaOH中和。反应在pH7.5、37℃的水溶液中进行。发现反应产生的6-APA的摩尔数与消耗的NaOH当量数对应得很好, 故此反应符合上述假定条件。特在以下反应初始条件下观察反应过程:

$$S_0 = 34.60mM; \quad V_0 = 43.50ml;$$

$$k_2 E = 0.049m \text{ mol}/\text{min};$$

$$N = 0.03089.$$

反应在一只带夹套的平底玻璃杯中进行, 循环泵将37℃的水由超级恒温水浴通过此反应器的夹套循环。反应pH由ZD-2型自动电位滴定计滴加NaOH控制。每半分钟记录一次NaOH的加入量。反应溶液用磁力搅拌器搅拌。反应转化率由NaOH的消耗当量数算出。

四、结果与讨论

IC催化水解BP的反应可用下式描述^[6]:

$$dn_s/dt = k_2 E \cdot S / \{ (1 + P/K_p) [S + K_m (1 + Q/K_q)] + S^2/K_s \} \quad (19)$$

式中、S、P、Q分别为BP、6-APA、PAA的浓度(mM);

$$K_p = 61mM; \quad K_q = 9.5mM;$$

$$K_s = 174mM; \quad K_m = 2.3mM.$$

将(19)式和实验的初始条件代入(7)式, 借助于计算机进行数值积分, 可得到反应时间T。反应时间的实验值t与计算值T之间吻合良好(见表1)。由表1可见, 反应50min后, 反应转化率达0.834。共加入40.64ml的NaOH, 反应体积增加了93.4%。

恒pH控制所产生的稀释效应使得酶反应的过程方程复杂化, 从而也给用诊断变量法或非线性参数估计法鉴别反应类型

表1 反应时间的实验值和计算值的比较

Table 1 The Comparison between the experimental and calculated values of the reaction time

X	0.249	0.355	0.458	0.554	0.639	0.711	0.766	0.805	0.834
ΔV(ml)*	12.12	17.32	22.30	26.97	31.14	34.66	37.30	39.24	40.64
t(min)	10	15	20	25	30	35	40	45	50
T(min)	10.36	15.31	20.53	25.94	31.34	36.61	41.28	45.11	48.37

* ΔV = V - V₀

表 2 NaOH浓度对反应过程的影响*

Table 2 The effects of different NaOH concentrations on the reaction course*

N	0.001	0.01	0.1	0.5	1	10	∞
x	T (min)						
0.2	24.67	23.15	24.39	24.60	24.63	24.65	24.65
0.4	63.65	48.70	52.29	53.23	53.37	53.49	53.51
0.6	130.15	80.05	85.86	88.30	88.68	89.03	89.07
0.8	264.11	126.28	132.33	137.60	138.45	139.29	139.38
0.9	112.41	167.52	170.67	178.50	179.86	181.19	181.34
0.95	567.90	206.32	204.80	214.98	216.80	218.60	218.81

* 反应初始条件 The initial reaction conditions: $S_0 = 51.60\text{mM}$; $V_0 = 500\text{ml}$;
 $V_m = 0.603\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$

和估计动力学参数带来困难。在实用上我们需要知道加碱所产生的稀释效应可以忽略时的最低碱液浓度。表 2 即为对不同的碱液浓度，将 (19) 式代入 (7) 式用计算机积分的计算结果。由表 2 可知，如选用 0.5—1.0N 的 NaOH 控制反应 pH，当转化率达 0.95 时，所产生的相对时差仅为 1—2%。由表 2 还可以观察到在 0.01N 附近有一个“最优”碱液浓度，使反应时间

最短。一般来说，有抑制作用的释放质子的酶反应，加碱所产生的稀释作用同时有降低反应速度（因底物和酶的浓度被稀释）和提高反应速度（因抑制物浓度被稀释）二种相反的效应。因此对于一定的反应转化率，存在着使反应时间最短的碱液浓度。这对于以分解底物为主要目的的反应（例如底物是某种污染源时）具有实际意义。

参 考 文 献

- (1) Hill, C.G.: *Chemical Engineering Kinetics & Reactor Design*, Published by John Wiley & Sons, New York, pp24—33, 1977.
- (2) Halwachs, W.: *Biotechnol. Bioeng.*, 20:281, 1978.
- (3) Hsu, T.A and G. T. Tsao: *Biotechnol. Bioeng.*, 21:2235, 1979.
- (4) 王庆诚等: *生物化学与生物物理学报*, 12(4):305, 1980.
- (5) 汪恩浩等: *华东化工学院学报*, 1983年第3期, pp291—308, 1983.

THE EFFECTS CAUSED BY CONSTANT pH CONTROL ON THE PROTON-RELEASING ENZYME-CATALYZED REA- CTION KINETICS —A KIND OF VARIABLE VOLUME ENZYME-CATALYZED REACTION KINETICS

Wang Enhao

(Beijing Institute for Nutritional Resources, Beijing)

Yu Juntang

(East China Institute of Chemical Technology, Shanghai)

Proton-releasing enzyme-catalyzed reactions are often studied under constant pH controled by adding aqueous alkali. So that the volume of reaction system is increasing as the reaction is going on. In this paper the reaction kinetics of the variable volume enzyme-catalyzed reaction was studied theoretically and established experimentally by the deacylation reaction of benzylpenicillin on penicillin amidase.

Key words

Proton-releasing enzyme-catalyzed reaction; constant pH control; variable volume reaction system; kinetics