

抑制剂对有机相酶促己酸乙酯合成 中固定化脂肪酶影响

徐 岩 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

关键词 固定化脂肪酶, 酶的修饰, 表面活性剂, 抑制剂

分类号 Q555 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0404-07

稳定的催化活性和选择性的调节与控制已成为研究有机相酶促反应机制和应用的重要内容。由于选择和优化反应条件的方法具有较大局限性,目前有机介质中酶催化选择性和稳定性的调节与控制的研究除了常用的固定化手段外,更关注通过改变酶分子自身的一些方法上。如蛋白质工程、酶的化学修饰和非共价修饰^[1,2]。相比之下,其中非共价修饰具有方便、实用的特点。酶的修饰剂大多也是酶的抑制剂。抑制剂已用来研究脂肪酶的结构与代谢特征^[3]。Russel, Guo 等通过其改变酶的构象和界面特征来调节和控制酶稳定的特异性^[4,5]。

我们在对微生物脂肪酶正庚烷中合成短链芳香酯研究基础上^[6,7]。本文报道用具有两亲特性的表面活性剂、胆汁盐和金属离子这些脂肪酶的抑制剂对庚烷中脂肪酶酶促己酸乙酯酯化反应的影响,以促进酶活性的调节和控制的研究和应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 脂肪酶: 固定化 *Mucor miehei* 脂肪酶(商品名 Lypozyme IM, 简称 MML)通过吸附法固定在大孔酚型阴离子交换树脂的固定化脂肪酶, Novo Nordisk 公司提供。

1.1.2 试剂: 十二烷基苯磺酸钠(LAS), 上海洗涤剂厂; 十二烷基磺酸钠(SDS), 上海洗涤剂厂; 气溶胶硫代琥珀酸 2-(2-乙己酸)酯钠盐(AOT), ; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 日本 Wako Pure Chemical Industries, Ltd 产; 脂肪醇聚氧乙烯醚(9)(AEO9), 国产; 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100); 月桂酸失水山梨醇酯聚氧乙烯醚(Tween 20)和油酸失水山梨醇酯聚氧乙烯醚(Tween 80), 上海助剂厂产。脱氧胆酸钠, 牛黄胆酸钠德国 Serva 公司产。其他试剂均为上海化学试剂站分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶合成己酸乙酯反应体系: 在 100 mL 带塞三角瓶中, 15 mL 的溶剂里加入等摩尔己酸、乙醇和若干量脂肪酶组成反应体系。在 30℃ 下 150 r/min 旋转振荡。连续批次反应中, 过滤收集酶、正庚烷洗涤、冷冻干燥后用于下一批次反应^[7]。

1.2.2 脂肪酶酶促酯化程度的测定和转化率计算: 将取出的样品用 0.15μm 微孔滤膜过滤后, 取样, 气相色谱分析检测后计算脂肪酶的酯合成转化率^[7]。

酯合成转化率 % = 脂肪酸酯摩尔数 / 反应初始时脂肪酸的滴定摩尔数

2 实验结果

2.1 表面活性剂对酯化反应的影响

用8种3类不同类型的表面活性剂,按0.1 g/dL的量加入,结果见表1。说明无论是阳离子型、阴离子型或非离子型的表面活性剂都会对脂肪酶催化活性产生影响。大多都略微有些提高,但幅度不大。这个结果与Chang的发现完全不同。由于脂肪酶结构的差异造成不同的表面活性剂产生的结果是不同的^[8]。

另外,表面活性剂浓度也影响着酶的催化活性。选择AOT、Triton X-100、CTAB、SDS和LAS5个表面活性剂来进一步研究的结果见图1。在最适浓度下,表面活性剂可以改善脂肪酶的催化活性,不同的表面活性剂最适浓度是不同的。有的在较高浓度下反而会抑制酶的活性。

表1 表面活性剂对己酸乙酯合成转化率的影响

Surfactant	Type	Conversion / %	Relative conversion / %
LAS	Anionic	85.46	100.7
SDS	Anionic	89.09	105.0
AOT	Anionic	87.88	103.6
CTAB	CATIONIC	87.88	103.6
Tween 20	Non-ionic	84.85	100.0
Tween 80	Non-ionic	83.03	87.9
AEO ₉	Non-ionic	84.85	100.0
Triton X-100	non-ionic	87.88	103.6
Contrast		84.85	100.0

Condition: 0.1 g of MML in 15 mL heptane with 0.25 mol/L of substrates and 0.1% addition of surfactants at 30°C for 24h

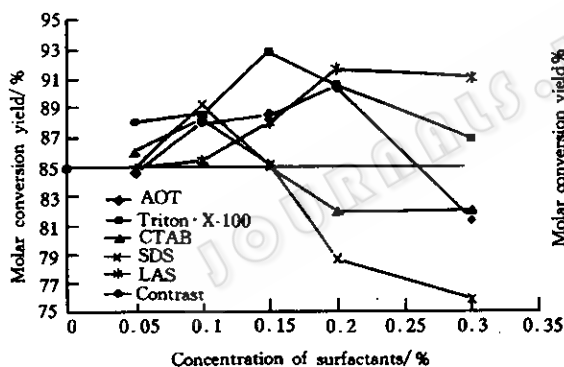


图1 表面活性剂浓度对己酸乙酯合成转化率的影响

Condition: 0.1 g of MML in 15 mL of heptane with 0.25 mol/L of substrates and surfactants at 30°C for 24h.

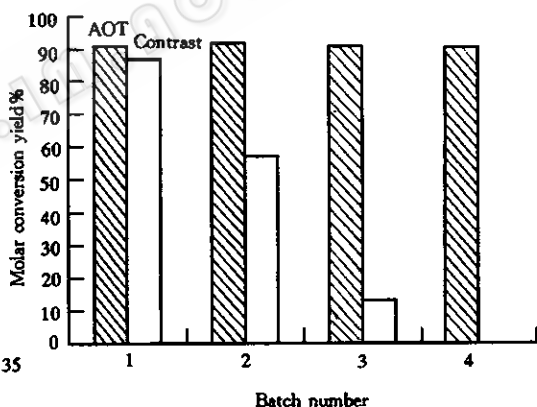


图2 表面活性剂AOT对己酸乙酯批次合成反应中脂肪酶稳定性的影响

Condition: 0.1 g of MML in 15 mL of heptane with 0.25 mol/L of substrates and 0.1% addition of AOT at 30°C for 48 h.

2.2 表面活性剂对酯化反应中脂肪酶稳定性的影响

进一步研究其对溶剂相中酶催化稳定性的影响。用AOT、LAS、Triton X-100和CTAB四种表面活性剂在批次反应后发现:将底物醇酸的浓度从0.25 mol/L提高到0.5 mol/L,加入前3种可以使固定化*Mucor miehei*脂肪酶在连续4批反应中仍保持较高的酶促催化活性,己酸乙酯的浓度可高达79.4 g/L。图2是AOT对脂肪酶稳定性的影响。而在对照中,第2批的转化率降低到不足60%。第3批则只有10%。LAS和Triton X-100与AOT有类似的结果,只是CTAB对酶的稳定性没有改善(数据未显示)。可见这3种阴离子和非离子型表面活性剂能够使*Mucor miehei*脂肪酶在庚烷中的催化的稳定性有比较明显的改善。

表2 胆汁盐对己酸乙酯合成转化率的影响

Bile salt	Conc. of salt / %	Molar conversion yield / %
Contrast	0.0	90.7
	0.1	88.7
Sodium deoxycholate	0.2	85.9
	0.4	84.0
	0.1	90.0
Sodium taurocholate	0.2	85.7
	0.4	83.0

Condition: 0.1 g of MML in 15 mL of heptane with 0.25 mol/L of substrates at 30°C for 8h.

酶蛋白上稳定脂肪酶的构象,改变酶的活性。还可以清除界面上产生的脂肪酸对酶的抑制作用,产生对酶激活作用^[3]。选择了12种无机盐,反应结果见表3。只有 Cu^{++} 、 Ca^{++} 、 Mg^{++} 和 Co^{++} 离子对 *Mucor miehei* 脂肪酸在溶剂相中催化活性有微弱的促进作用。其他均有不同程度的抑制作用。

表3 金属离子对己酸乙酯合成转化率的影响

Inorganic salt	EDTA	NaCl_2	HgCl_2	SnCl_2	CuCl_2	FeCl_3	CaCl_2	MgCl_2	BaCl_2	MnCl_2	CoCl_2	KCl	CK
Molar conversion yield / %	90.0	90.03	88.29	89.84	95.56	90.03	95.84	92.97	82.87	92.58	93.90	88.58	92.6
Relative conversion yield / %	97.22	97.22	95.35	97.02	103.2	97.22	103.5	100.4	89.49	99.98	101.4	95.66	100.00

Condition: 0.1 g of MML in 15 mL of heptane with 0.25 mol/L substrates and 0.002 mol/L of metal ions at 30°C for 24 h.

3 讨论

根据 X-衍射结晶学研究表明:作为典型的真菌脂肪酶代表, *Mucor miehei* 脂肪酶的二级结构主链是由九股 β -中心折叠系统和五段 α -螺旋所组成,它的催化活性是在以 Ser 为主的与 Asp、His 组成的三分子催化中心进行的。这个中心是埋在一段螺旋结构的“盖子”下面。这个盖子是具有两亲特性的,“盖子”的疏水基团与这个三分子的疏水区域相结合,亲水端则暴露向外,与水分子以氢键作用连接^[3]。从表面活性剂,如 AOT 的化学结构来看(图 5)。

表面活性剂同样具有疏水和亲水两端。所以在酶分子的表面,表面活性剂会亲水端朝向酶,疏水端向外进行排列,把酶与外部的溶剂分开,使修饰了的脂肪酶分配在内部的微水环境中,其疏水端可以阻止水分对酶的进一步作用从而所造成的失活,使脂肪酶催化活性更加稳定。所以 AOT 等表面活性剂在合适浓度下促进了酶活性和稳定性的提高。这与 Han^[10]和 Kim^[11]等的发现:“*Rhizopus arrhizus* 和 *Candida rugosa* 脂肪酶在表面活性剂修饰后更加不稳定”是截然不同。与表面活性剂不同的是:胆汁盐和金属离子不仅对酶的活性没有改善,有的在浓度提高时反而有显著的抑制作用。实验中还发现:反应结束去除这些抑制剂后,酶活性又有所恢复。不同的表面活性剂不尽相同的原因和详细作用机理的阐明还有待进一步研究。

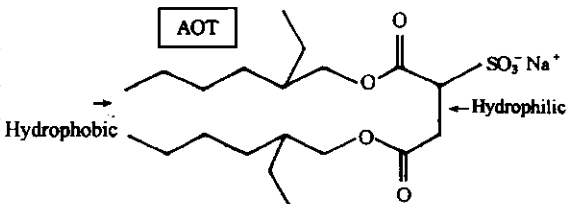


图3 表面活性剂 AOT 的化学结构

与 Han^[10]和 Kim^[11]等的发现:“*Rhizopus arrhizus* 和 *Candida rugosa* 脂肪酶在表面活性剂修饰后更加不稳定”是截然不同。与表面活性剂不同的是:胆汁盐和金属离子不仅对酶的活性没有改善,有的在浓度提高时反而有显著的抑制作用。实验中还发现:反应结束去除这些抑制剂后,酶活性又有所恢复。不同的表面活性剂不尽相同的原因和详细作用机理的阐明还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] L. S. Gorman, J. S. Dordick, *Biotechnol. Bioeng.*, 1992, 39:392~397.
- [2] K. Takahashi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 142(2):291~296.
- [3] D. M. Lawson, A. M. Brzozowski. G. G. Donson *et al.* In: Woolley P. S. Petersen, Eed. *Lipases*, New York: Cambridge University Press, 1994:77~223.
- [4] A. J. Russell, A. M. J. Kalibanov. *Biol. Chem.* 1988, 263:11624~11626.
- [5] W. Z. Guo, M. Goto, N. Kamiya *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111:6836~6841.
- [6] Y. Xu, K. Zhang. In: J. R. Whitaker Eds, *Proceedings of Food for Health in the Pacific Rim*, Connecticut Food and Nutrition Press California, USA, 1998. 587~593.
- [7] 徐 岩, 章克昌. *生物工程学报*, 1998, 14(2):243~248.
- [8] P. S. Chang, S. J. Rhee. *Biocatalysis*, 1990, 3:345~355.
- [9] S. Wu, J. S. Guo, C. J. Sih., *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112:1990~1995.
- [10] D. Han, S. J. Rhee. *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, 28:1250~1255.
- [11] T. Kim, K. Chung. *Enzyme. Microb. Technol.*, 1989, 11:528~532

The Effects of Inhibitors on Immobilized-lipase in Synthesis of Ethyl Hexanate in Organic Phase

Xu Yan Zhang Kechang

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

Abstract Lipase inhibitors, eight of amphiphathy surfactants, two of bile salts and twelve of metal salts, were used in synthesis of ethyl hexanate catalyzed by immobilized lipase from *Mucor miehei* in heptane for lipase's modification. It was found that all anionic, cationic and non-ionic surfactants enhance the catalyzing activities in varying degrees under some concentration. Among them, SOT, LAS and Triton X-100 have significant effects on stability, making lipase more stable than in contrast when the concentration of substrates hexanoic acid were up to 0.5 mol/L from 0.25 mol/L. The reason for that was analyzed on basis of lipase and surfactant's structure. Bile salts and metal salts have almost no improvement to the activities of lipase, even inhibited them at higher concentration.

Key words Immobilized lipase, modification of enzyme, surfactant, inhibitor