

双组分混合有机溶剂中脂肪酶催化反应的热力学分析

王乐乐, 白姝, 孙彦

(天津大学化工学院生物化工系, 天津 300072)

摘要: 将两种不同极性的有机溶剂 1,4-二氧六环和正庚烷按不同摩尔比混合, 配成具有不同 $\log P$ 值的双组分混合溶剂, 以此为反应介质考察了固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM 催化的正丁醇和月桂酸酯化反应的初速度. 同时在与上述混合溶剂具有相近 $\log P$ 值的单一溶剂中进行了类似研究. 实验结果表明, 在混合溶剂和单一溶剂中, 反应初速度随溶剂极性的变化规律呈现很大差异. 从溶剂混合对反应物热力学活度及反应活化能的影响可以合理地解释这一实验结果.

关键词: 脂肪酶; 双组分混合溶剂; $\log P$ 值; 热力学活度; 反应活化能; 酯化

中图分类号: Q550 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2005)06-0605-04

1 前言

非水酶学的一个重要研究领域是溶剂性质对酶催化活性的影响, 针对不同类型反应寻找适当的反应介质, 使作为生物催化剂的酶与其达到最理想的兼容性, 并由此形成了所谓“溶剂工程(Solvent engineering)”^[1]. 近年来, 随着离子液体和超临界流体等新型反应介质的出现和发展^[2], 溶剂工程的研究对象越来越趋于多样化, 但作为传统酶催化反应介质的有机溶剂仍是非水酶学研究的重点. 对大多数酶来说, 为衡量其与有机溶剂分子的兼容性, 寻找可使酶发挥最高活性的有机溶剂, 最常采用、最可靠的表达溶剂性质的参数是 $\log P$ 值^[3,4]. $\log P$ 是描述有机溶剂极性大小的参数, $\log P$ 值越大, 表明溶剂的疏水性越强. 由于溶剂 $\log P$ 值在影响酶催化活性方面所起的重要作用, 曾针对不同情况反复研究过单组分溶剂中酶活性随 $\log P$ 值的变化规律^[3-6], 但在双组分混合有机溶剂中的情况却未见报道.

本工作以固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM 为催化剂, 在由 1,4-二氧六环和正庚烷组成的混合有机溶剂 ($\log P$ 值为-0.5~3.5)中催化正丁醇和月桂酸的酯化反应, 以反应初速度表征酶催化活性, 研究酶活性随溶剂 $\log P$ 值的变化规律. 同时, 以单组分有机溶剂作为反应介质进行参比对照. 结果表明, 在相同的 $\log P$ 值范围内, 当

反应介质分别是双组分混合溶剂和单组分溶剂时, 酶催化活性随 $\log P$ 值的变化规律截然不同. 对此, 本工作进一步从反应物活度和反应活化能的热力学层面对实验结果进行了分析.

2 实验

2.1 材料

固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM(源于 *Rhizomucormiehei*, 固定在疏水树脂上, 水含量 3.2%)购于丹麦 NovoIndustri, 0.3 nm 分子筛(使用前 600 °C 高温活化)购于中国科学院大连化学物理研究所, 其他试剂均为国产分析纯.

2.2 反应介质的配制

可互溶的两种不同极性有机溶剂混合后的 $\log P$ 值可以通过半经验公式 $\log P_{\text{mixture}}=x_1\log P_1+x_2\log P_2$ 进行计算^[3], 其中 x_1 和 x_2 分别是两种有机溶剂的摩尔分率. 由 1,4-二氧六环($\log P=-1.1$)和正庚烷($\log P=4.0$)组成的混合溶剂, 其混合比及对应的 $\log P$ 值如表 1 所示. 用作参比实验反应介质的单一溶剂(附 $\log P$ 值)为: 丙酮(-0.23)、四氢呋喃(0.5)、环己酮(0.96)、三乙胺(1.5)、苯(2.0)、甲苯(2.1)、二甲苯(3.1)、正己烷(3.5). 反应前向反应介质和液体反应物中加入过量的 0.3 nm 活化分子筛, 密封保存, 以保证反应体系处于无水状态.

表 1 双组分混合溶剂的混合比率及对应的 $\log P$ 值

Table 1 The mole ratios of binary solvent mixtures and corresponding $\log P$ values

$\log P$	-0.5	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
$x_1:x_2$	7.475	3.630	2.185	1.427	0.961	0.645	0.416	0.244	0.109

2.3 酯化反应

在 10 mL 完全密封的塑料离心管中, 称取 1

mmol(0.2003 g)月桂酸, 用 3 mL 反应介质溶解, 再加入等摩尔的正丁醇, 同时加入过量(20 mg)活化分子筛, 最

收稿日期: 2005-01-14, 修回日期: 2005-03-03

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(编号: 20025617)

作者简介: 王乐乐(1980-), 男, 四川省南充市人, 硕士研究生, 生物化学工程专业; 孙彦, 通讯联系人.

后加入 30 mg 脂肪酶. 恒温摇床, 210 r/min. 反应 15 min 后取样检测, 根据生成产物月桂酸正丁酯的量计算反应初速度, 并以此表征脂肪酶的催化活性.

2.4 分析方法

待测样品用相应溶剂适当稀释后用 Agilent 6890N 型气相色谱工作站(美国 Agilent 公司)进行分析. 色谱柱为 Agilent 19091J-413 HP-5, 30 m×0.32 mm, 0.25 μm film(美国 Agilent 公司). 进样口温度 200 °C, 柱温初始 40 °C, 以 5 °C/min 速度升至 50 °C, 再以 20 °C/min 速度升至 200 °C, 保持 5.5 min, 程序升温共运行 15 min; 检测器温度 250 °C; 载气(N₂)流速 2.0 mL/min.

3 结果与讨论

3.1 溶剂 log*P* 值对酯化反应的影响

分别选择上述根据不同摩尔比混合而成的双组分混合有机溶剂及在同样 log*P* 范围内的单组分有机溶剂为反应介质, 研究脂肪酶催化活性随 log*P* 值增大的规律. 在两种情况下, 反应温度都固定为 25 °C, 实验结果如图 1 所示. 从图可以看出, 无论是在混合溶剂还是单组分溶剂中, 反应初速度都随 log*P* 值增大而增大, 但在两类不同溶剂中, 反应初速度的增长规律却明显不同. 在单组分溶剂中, 随着溶剂极性的下降, 反应初速度的增长曲线呈“S”型, 这与 Laane 等^[3]的研究结果吻合. 但在双组分混合有机溶剂中, 反应初速度在 log*P*<1.0 时几乎无变化, 当 log*P*>1.0 后开始增长, 且增长趋势不是“S”型, 而是类似指数型的增长. 这说明在非水相中进行的酶催化反应, 虽然公认的 log*P* 值是影响酶催化活性的主要因素^[3], 但当以双组分混合溶剂作为反应介质时, 溶剂混合后热力学参数的变化以及这些变化对底物热力学活度和反应活化能的影响不可忽略, 甚至可能成为影响酶活性的主要因素^[9].

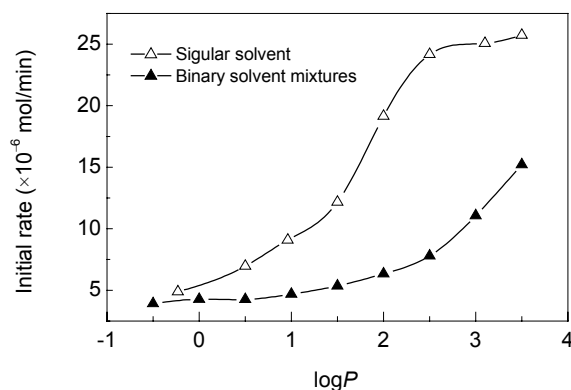


图 1 反应初速度(酶活性)随溶剂 log*P* 值的变化
Fig.1 Variation of initial reaction rates with log*P*

3.2 实验结果的理论分析

固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM 催化正丁醇和月桂酸的酯化反应, 从反应动力学的角度可以看成是一个二级反应, 因此其反应初速度 *r* 可用下式表示:

$$r = dC_p/dt = ka_1a_2, \quad (1)$$

其中 *k* 是反应速率常数, *a*₁ 和 *a*₂ 分别是反应物正丁醇和月桂酸的热力学活度, 即所谓参加反应的“有效浓度”. 从式(1)可以看出, 本研究中用以表征酶催化活性的反应初速度主要由两部分决定, 即反应物热力学活度的乘积 *a*₁*a*₂ 和反应速率常数 *k*. 一方面, 非理想混合溶剂中任意组分的热力学活度可以通过修正 UNIFAC 模型进行计算. 因此, 计算出不同溶剂中的 *a*₁*a*₂, 可分别研究双组分混合溶剂和单组分溶剂中 *a*₁*a*₂ 随溶剂 log*P* 值的变化规律. 另一方面, 根据过渡状态理论, 对某一特定的化学反应, 反应物必须克服“能垒”才能进行反应生成产物, 这一“能垒”即通常所谓的反应活化能 *E*_a. 一般情况下, 反应活化能越高, 表示该反应越难进行, 表现为较低的反应初速度; 反之, 较低的反应活化能意味着较高的反应速率, 该理论同样适用于酶催化酯化反应. 从阿伦尼乌斯方程可以看出, 反应速率常数与反应活化能直接关联^[10]:

$$k = A \exp \frac{-E_a}{RT}, \quad (2)$$

其中, *A* 为碰撞频率因子, *R* 为气体常数, *T* 为温度(K).

同样通过修正 UNIFAC 模型计算得到在不同溶剂中不同温度条件下的 *a*₁*a*₂^[11,12], 结合实验测定的反应初速度, 由式(1)计算出反应速率常数, 根据阿伦尼乌斯方程的对数形式, 以 ln*k* 对 *T*⁻¹ 作图, 可得到任意溶剂条件下的反应活化能:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}. \quad (3)$$

这样, 就可分别研究双组分混合溶剂和单组分溶剂中反应活化能随溶剂 log*P* 值的变化规律.

3.3 不同溶剂中反应物的热力学活度

非理想混合溶剂中任一组分的活度系数 *γ* 都可通过修正 UNIFAC 模型计算. 修正 UNIFAC 模型的基本思想是, 首先对混合溶剂中各组分分子进行正确的功能基团划分, 再根据文献[11]提供的功能基团贡献参数和方法进行计算(具体计算过程在此不再赘述), 得到各组分活度系数, 通过下式得出各组分的热力学活度值:

$$a = \gamma x. \quad (4)$$

式中 *x* 为反应物的摩尔分率.

本研究所涉及的各种有机物, 其正确的功能基团划

分如表 2 所示. 根据上述方法, 计算 25 °C 下不同溶剂中反应物(正丁醇和月桂酸)的 a_1a_2 , 分别得到在双组分混合溶剂和单组分溶剂中 a_1a_2 随溶剂 $\log P$ 值的变化规律, 如图 2 所示. 由图可见, 无论在混合溶剂还是单组分溶剂中, a_1a_2 随 $\log P$ 值的变化规律没有明显区别, 即如果仅考虑溶剂混合后反应物活度的变化, 还不能解释在具有相同 $\log P$ 值范围的双组分混合溶剂和单组分溶剂中, 反应初速度随 $\log P$ 值变化呈现不同增长规律这一现象. 因此, 本工作进一步考察了不同极性溶剂中该酶促酯化反应活化能随 $\log P$ 值的变化规律.

表 2 用于模型计算的功能基团划分

Table 2 The classification of functional groups in modeling

Substance	Functional groups
1-butanol	1CH ₃ , 3CH ₂ , 1OH (p)
Lauric acid	1CH ₃ , 10CH ₂ , 1COOH
1,4-dioxane	2CH ₂ OCH ₂
Acetone	1CH ₃ , 1CH ₃ CO
Tetrahydrofuran	2c-CH ₂ , 1c-CH ₂ OCH ₂
Cyclohexanone	4c-CH ₂ , 1c-CH ₂ CO
Triethylamine	3CH ₃ , 2CH ₂ , 1CH ₂ N
Benzene	6ACH
Toluene	5ACH, 1ACCH ₃
Xylene	4ACH, 2ACCH ₃
Hexane	2CH ₃ , 5CH ₂
Heptane	2CH ₃ , 5CH ₂

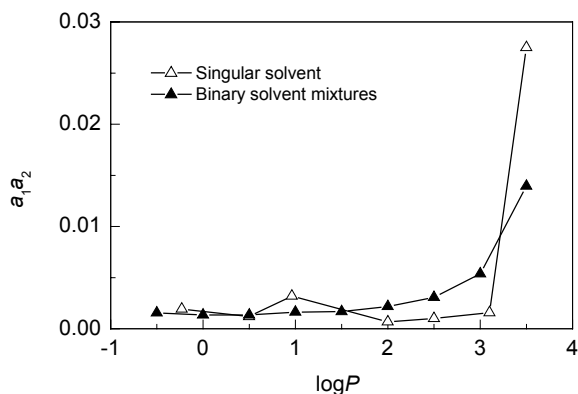
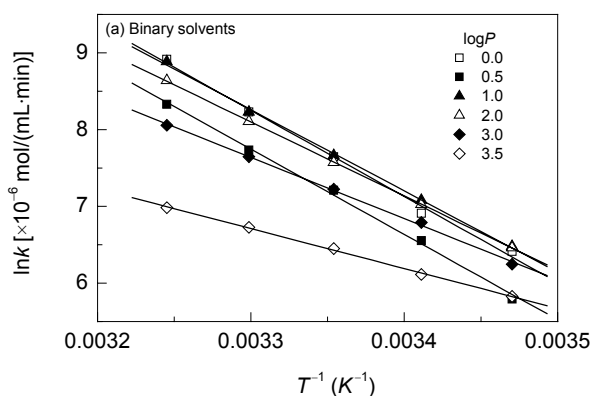


图 2 反应物活度乘积随溶剂 $\log P$ 值的变化
Fig.2 Variation of the product of reactant thermodynamic activities with $\log P$

3.4 不同溶剂中的反应活化能

在 15~35 °C 内, 以 5 °C 为间隔, 分别测定双组分混合溶剂和单组分溶剂中酶促酯化反应的初速度, 结合通过修正 UNIFAC 模型计算出的反应物热力学活度, 即可得到不同情况下该酶促反应的反应速率常数. 以 $\ln k$ 对 T^{-1} 作图, 拟合得到直线, 通过该直线的斜率即可计算出反应活化能, 见图 3.

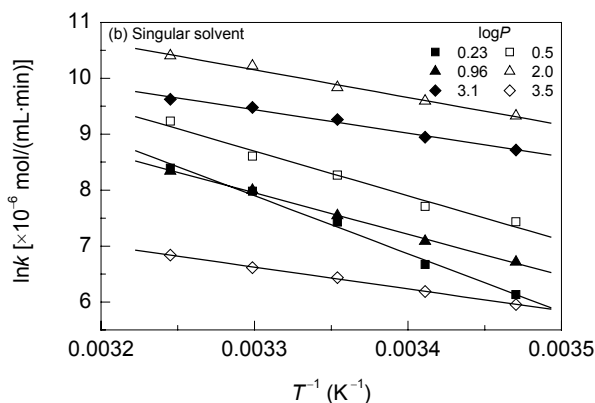


图 3 双组分混合溶剂和单组分溶剂中反应活化能的计算
Fig.3 Determination of the activation energies of the reactions in binary solvents and singular solvent

将计算出的反应活化能 E_a 对溶剂的 $\log P$ 值作图, 结果见图 4. 从图可以看出, 无论是在双组分混合溶剂还是单组分溶剂中, 反应活化能均随溶剂 $\log P$ 值的增加而下降, 且下降趋势都与反应初速度的增长趋势相吻合. 实验结果表明, 对于本研究所针对的酶促酯化反应, 双组分混合溶剂和单组分溶剂中反应活化能随溶剂 $\log P$ 值的变化规律可以较合理地解释在两类溶剂中酶活性随溶剂极性的变化规律截然不同这一现象. 也就是说, 对于双组分混合溶剂中进行的酶促酯化反应, 除溶剂极性($\log P$ 值)对酶催化活性有主要影响外, 溶剂混合后反应活化能变化的影响也同样重要.

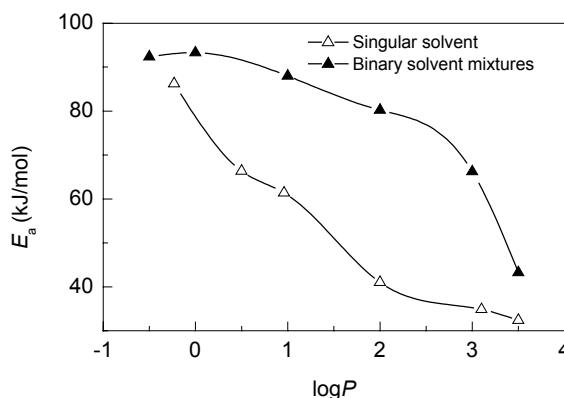


图 4 反应活化能随溶剂 $\log P$ 值的变化
Fig.4 Variation of reaction activation energy with $\log P$

4 结论

采用不同 $\log P$ 值的双组分混合有机溶剂为酶促反应介质, 研究了溶剂的 $\log P$ 值对固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM 催化正丁醇与月桂酸酯化反应的影响, 同时以单组分有机溶剂作参比实验. 结果表明, 在相同 $\log P$ 值范围内, 双组分混合溶剂中酶催化活性随 $\log P$ 值的变化规律与单组分溶剂相比有明显差异. 本研究以化学反应动力学为基础, 结合反应物热力学活度和反应活化能的分析, 较为合理地解释了实验结果.

研究发现, 在非水相中进行的酶催化反应, 反应物的热力学活度分析及以此为基础的反应活化能分析可作为预测酶催化活性的重要依据. 本研究为“溶剂工程”所涉及的反应介质优化进行了有益探索, 在溶剂筛选方面还可进行大量的研究.

参考文献:

- [1] Cernia E, Catoni E, Palocci C. Different Aspects of “Solvent Engineering” in Lipase Biocatalysed Esterification [J]. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 1996, 105: 79–86.
- [2] Susheel N, Narasimha M M. Lipase-catalysed Transesterification in Ionic Liquids and Organic Solvents: A Comparative Study [J]. *Tetrahedron Lett.*, 2002, 16: 2979–2982.
- [3] Laane C, Boeren S, Vos K, et al. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents [J]. *J. Biotechnol. Bioeng.*, 1987, 30: 81–87.
- [4] Cernia E, Palocci C, Soro S. The Role of the Reaction Medium in Lipase-catalysed Esterification and Transesterification [J]. *J. Chem. Phys. Lipids*, 1998, 93: 157–168.
- [5] Petersen N, Teresa M, Peter F. How Do Lipases and Esterases Work: The Electrostatic Contribution [J]. *J. Biotechnol.*, 2001, 2: 115–147.
- [6] Wei D Z, Gu C, Song Q, et al. Enzymatic Esterification for Flycoside Lactate Synthesis in Organic Solvent [J]. *J. Enzym. Microbiol. Technol.*, 2003, 33: 508–512.
- [7] Bellot J C, Choïnard L, Castillo E. Combining Solvent Engineering and Thermodynamic Modeling to Enhance Selectivity during Monoglyceride Synthesis by Lipase-catalysed Esterification [J]. *J. Enzym. Microbiol. Technol.*, 2001, 28: 362–369.
- [8] Villeneuve P, Jean G, Hass J M. Customizing Lipases for Biocatalysis: A Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approaches [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2000, 9: 113–148.
- [9] Marcus Y. *Solvent Mixtures: Properties and Selective Solution* [M]. New York: Marcel Dekker, 2002. 173–186.
- [10] Levine I N. *Physical Chemistry* [M]. Boston: McGraw-Hill, 2002. 212–217.
- [11] Gmehling J, Li J, Schiller M. A Modified UNIFAC Model—2. Present Parameter Matrix and Results for Different Thermodynamic Properties [J]. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1993, 32: 178–193.
- [12] Silva V M T M, Alirio E R. Synthesis of Diethylacetal: Thermodynamic and Kinetic Studies [J]. *J. Chem. Eng. Sci.*, 2001, 56: 1255–1263.

Thermodynamic Analysis of Lipase-catalysed Esterification in Binary Organic Solvent Mixtures

WANG Le-le, BAI Shu, SUN Yan

(Department of Biochemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Two kinds of miscible organic solvents with marked discrepancy in polarity, 1,4-dioxane and heptane, were mixed at different mole proportions to create a series of binary solvent mixtures with different $\log P$ values. Lipozyme RM IM-catalysed esterification between 1-butanol and lauric acid in such binary solvent mixtures as well as singular solvents with corresponding polarities was comparatively investigated. The variation of enzyme activity calibrated by initial rate of esterification with the decrease of solvent polarity in solvent mixtures and singular solvent was compared, and different variation tendencies were observed. Based on the results in the effect of the solvent mixture on the thermodynamic activities of reactants, the activation energies of reactions were proposed to rationally explain the phenomena observed in the esterification.

Key words: lipase; binary solvent mixtures; $\log P$; thermodynamic activity; activation energy; esterification