文章编号：1001-3555(2011)03-0276-05

丙酮介质中辣椒素酯的酶催化合成动力学研究

刘　绍[1,2]，刘卉琳[1]，董新荣[3*]，谢达平[1]
(1. 湖南农业大学　生物科技学院，湖南 长沙 410128；
2. 湖南农业大学　食品科技学院，湖南 长沙 410128；
3. 湖南农业大学　理学院，湖南 长沙 410128)

摘　要：对脂肪酶在丙酮介质中催化香草醇和壬酸甲酯合成辣椒素酯的反应动力学进行了研究. 以 HPLC 方法测定酶催化合成产物辣椒素酯的浓度，确定了反应初速度；采用双倒数作图分析法和产物抑制试验法研究了本合成反应的机制，结果表明辣椒素酯的酶催化合成是按乒乓反应机制进行的. 研究还确定了酶反应动力学方程和 V_{max}、K_{mA}、K_{mB}的值，并对其进行了验证，结果表明动力学方程与试验结果拟合度达 0.997.

关　键　词：辣椒素酯；酶催化反应；脂肪酶；有机介质；动力学
中图分类号：Q555 + .3；O643.32　　**文献标识码：**A

辣椒素酯类物质(Capsinoids)是结构类似辣椒素(Capsaicin)的酯类物质[1,2]，生物活性与辣椒素类似，具有抗疲劳、促进能量代谢、增强免疫力等作用，其细胞毒性比辣椒素低，受到人们的广泛重视[3-6]. 天然辣椒素酯资源有限，分离纯化困难，于是人们对其合成进行了不少的研究. 以脂肪酸酰氯与香草醇酯化等化学方法进行合成，产物复杂、产率低. 以脂肪酶催化合成辣椒素酯的反应具有专一性强、条件温和、收率高、环境友好、能耗低等优点，应用前景相当好. 为了探讨辣椒素酯的酶催化合成条件，我们在有机相中通过酶催化反应合成了系列香草醇酯类物质，并对酶催化合成条件进行了初步优化[6,7]. 如能进一步阐明其反应动力学特性，对控制酶催化反应和充分利用酶催化性质，提高酶催化的转化率，合理设计生产中的投料、工艺以及反应器，降低生产成本等有极大的参考意义. 本文对脂肪酶于有机介质中催化香草醇和壬酸甲酯合成壬酸香草醇酯(辣椒素酯)的反应动力学进行了探讨. 其反应如图 1 所示.

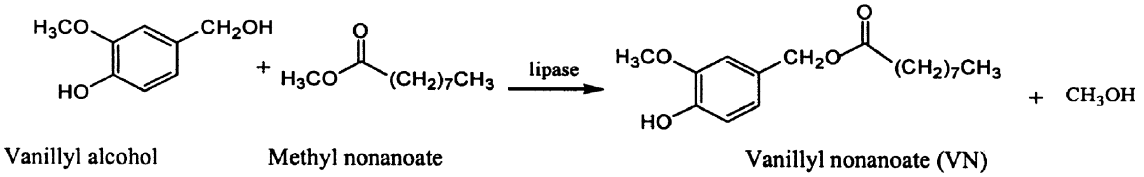


图 1 辣椒素酯的酶法合成反应

Fig. 1 The Lipase-Catalyzed Synthesis reaction of Capsinoids

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪酶 Novezymes 435 为丹麦 Novodisk 公司产品；香草醇(纯度 >97%)购于石家庄市东联南开香料开发有限公司；正壬酸(AR)购于天津市光复精细化工研究所；Capsaicin 为 Sigma 公司产品；甲醇为色谱纯；二次蒸馏水；柱层析硅胶(青岛海洋化工公司)；其他均为分析纯试剂. 正壬酸甲酯为本实验室以正壬酸与甲醇为原料合成.

1.2 仪器

AL204 电子天平为梅特勒-托利多仪器(上海)

收稿日期：2011-03-18；修回日期：2011-04-23.
基金项目：湖南省自然科学基金项目(07JJ6026).
作者简介：刘　绍，男，生于 1968 年，博士生，副教授.
* 通讯联系人，E-mail：xinrong108@yahoo.com.cn.

有限公司生产；THZ-82 型摇床为上海跃进医疗器械一厂生产；HY-5 回旋振荡器为常州市华普达教学仪器有限公司生产；日本岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪(带二极管阵列检测器)；BZ200S 超声清洗器为上海必能信公司生产；SGO-500 氮气、氢气空气发生器为北京东方精华苑科技有限公司生产.

1.3 实验方法

1.3.1 酶催化反应　在 5 mL 的反应管中，加入适当浓度的底物反应液 1 mL，然后以丙酮定容至 2 mL，再加入 Novo 435 酶颗粒 20 mg，于恒温为 30 ℃的摇床上以 80 r/min 的速度振摇反应. 定时取样，以 HPLC 方法测定反应产物辣椒素酯的生成量.

1.3.2 甲醇抑制酶催化反应试验　在反应体系中添加一定浓度的甲醇，其余条件同 1.3.1，依此分析甲醇的抑制作用.

1.3.3 辣椒素酯生成量的 HPLC 测定　色谱柱为 Vp-ODS 柱(150 mm × 4.6 mm，id，5 μm)；流动相为甲醇-水(80∶ 20)，流速为 0.9 mL/min，柱温为 40 ℃，检测波长为 280 nm，进样量 20 μL. 以辣椒素为外标，计算辣椒素酯的量.

1.3.4 反应初速率与反应动力学常数　反应速度以每 min 生成产物的 mmoL 数表示，依产物的生成量计算得到. 通过分析反应初速度和底物浓度间的关系，求出各动力学常数.

2 结果与分析

2.1 HPLC 法测定辣椒素酯的条件

由于辣椒素酯在甲醇体系中稳定性较差[8]，考虑到辣椒素与目标化合物结构相近，性质相似，因此可以辣椒素为外标采用 HPLC 法测定反应产物(目标化合物)的量. 首先参考文献[9]方法，将辣椒素标准样品的甲醇溶液以紫外光谱仪在波长 200 ~ 400 nm 内扫描，得到紫外检测波长为 280 nm. 然后用甲醇-水以不同比例进行分离试验，以确定合适的流动相比例. 当甲醇∶ 水 = 80∶ 20 时，反应原料之一的香草醇(另一原料在 280 nm 处无吸收)与反应产物分离良好(如图 2).

此外，线性范围确定与标准曲线绘制试验结果表明，当辣椒素进样量在 0.0115 ~ 2.30 μg 时，峰面积与进样量之间呈线性关系，回归方程为 $y = 813\,237x + 21\,490$，相关系数 r = 0.9997 ($n = 8$).

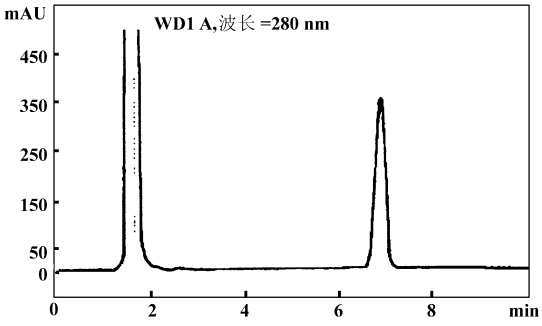


图 2 反应混合物与产物壬酸香草醇酯(RT 6.920min)的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of product and reaction compounds

2.2 辣椒素酯含量测定与酶催化反应机制分析

按 1.3.1 反应条件进行酶催化反应，精确反应 10 min 时，立即取反应液 50 μL，挥去丙酮后以甲醇稀释至 1 mL，按 HPLC 方法测定生成物的量，以回归方程 $y = 813\,237x + 21\,490$ 换算得辣椒素酯产物的浓度. 根据生成产物浓度计算酶反应初速度(如表 1)—每 min 生成产物的 mmol 浓度，单位为 mmol / L · min.

表 1 不同底物浓度时酶反应初速度

Table 1 The initial velocity of enzyme reaction on different substrate concentrations (mmol/ L · min)

Methyl nonanoate (mol / L)	Vanillyl alcohol (mol / L)				
	0.20	0.25	0.30	0.40	0.70
0.20	4.975	5.235	5.464	5.848	6.623
0.25	5.752	6.117	6.452	6.944	7.813
0.30	6.379	6.623	7.407	7.634	8.850
0.40	7.194	8.000	8.403	9.009	10.526
0.70	8.547	9.346	10.302	11.236	13.493

从产物生成量来看，当壬酸甲酯浓度为 0.4 mol/L 时，产物生成量为 10 mmol/L，为底物浓度的

2.5%；当壬酸甲酯浓度为 0.2 mol/L 时，产物浓度约为底物浓度的 3% 以下；当壬酸甲酯浓度为 0.7 mol/L 时，产物浓度为底物浓度的 2% 以下. 由此可见，产物生成量均在底物浓度的 3% 以下，故可认为测定所得酶催化反应速度为初速度，产物的抑制作用可忽略不计.

分别固定香草醇的摩尔浓度[B]为 0.20、0.25、0.30、0.40、0.70 mol/L，然后以 1/V 对壬酸甲酯浓度[A]的倒数作双倒数图，可得一组直线，如图 3 所示.

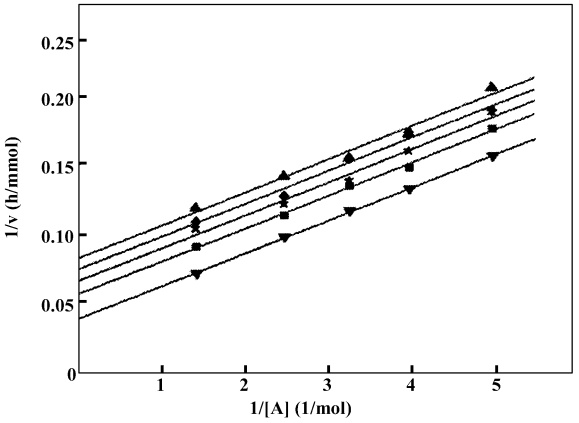


图 3 壬酸甲酯浓度[A]与反应速度 v 的双倒数图

Fig. 3 The double reciprocal curve of the concentration [A] of methyl nonanoate and corresponding initial velocity[v]

▲ 0.20 mol/L, ◆ 0.25 mol/L, ★ 0.30 mol/L, ■ 0.40 mol/L, ▼ 0.7 mol/L

(the vanillyl alcohol concentrations [B])

由图 3 可知，分别固定香草醇浓度时，以 1/V 对壬酸甲酯浓度倒数的双倒数图为一簇平行线，说明香草醇浓度的变化只有截距效应，无斜率效应，截距值分别为 0.037、0.055、0.065、0.071、0.083，这符合乒乓 BiBi 反应机制双倒数图的特征[10].

2.3 甲醇对酶催化反应的抑制特征

为了考察反应的一种生成物甲醇对酶催化的抑制作用，于反应体系中先加入一定量的甲醇，分别固定其浓度为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mol/L，同时固定香草醇的浓度为 0.20 mol/L，所得 1/V 对 1/[壬酸甲酯]的双倒数图为一簇直线(图 4). 由图 4 可见，抑制作用随甲醇浓度的增加而增强，甲醇可使直线的截距与斜率均发生改变，直线相交于 X 轴，显示出非竞争性抑制的特征，表明壬酸甲酯与甲醇不是结合于同一种酶形式，甲醇应是第一产物，这符合乒乓反应机制的特点[10].

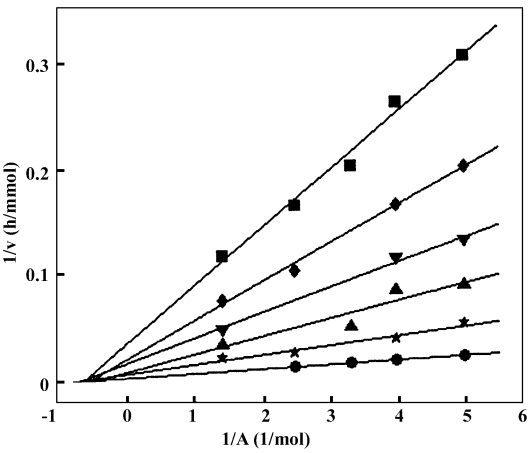


图 4 不同甲醇浓度对酶反应双倒数图的影响

Fig. 4 Effect of different concentration of methyl alcohol on double reciprocal plot

■ 0.25 mol, ◆ 0.50 mol, ▼ 0.75 mol, ▲ 1.00 mol, ★ 1.25 mol, ● 1.50 mol(methanol concentration); 1/A (reciprocal of methyl nonanoate concentration); 1/V (reciprocal of the enzymatic reaction velocity)

2.4 Novo435 催化辣椒素酯产生的动力学方程推导

根据 2.2 与 2.3 结果，可将脂肪酶 Novo435 催化辣椒素酯产生的反应动力学方程以下式表示：

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{mA}[B] + K_{mB}[A] + [A][B]} \quad (1)$$

其双倒数方程为：

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{mA}}{V_{maz}} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]}\right) \quad (2)$$

将图 3 中的纵截距对香草醇浓度[B]的倒数作图，可得图 5 所示直线.

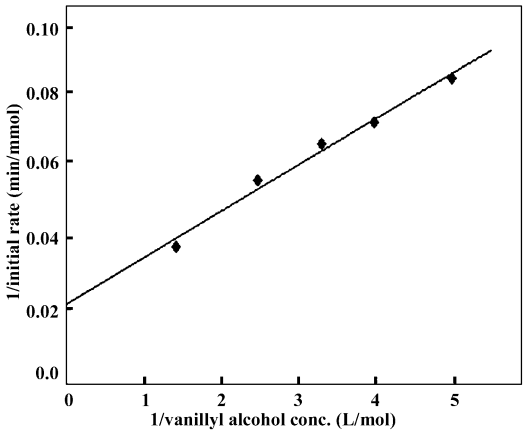


图 5 双倒数座标图纵轴截距与香草醇浓度[B]的倒数关系

Fig. 5 Relation between y-intercept and 1/vanillyl alcohol

由图 3 斜率可得：$K_{mA}/V_{max} = 0.0228$，由图 5 纵轴截距可知 $1/V_{max} = 0.0213$，直线斜率 $K_{mB}/$

V_{max} = 0.0126.

可联立解得：V_{max} = 46.95 mmol/min，K_{mA} = 1.070 mol/L，K_{mB} = 0.592 mol/L.

将上述计算结果代入方程(1)可得丙酮中脂肪酶 Novo435 催化辣椒素酯产生的动力学方程为：

$$\nu = \frac{46.95[A][B]}{1.070[B] + 0.592[A] + [A][B]} \quad (3)$$

2.5 验证试验

将试验数据按最小二乘法[11]处理，与采用动力学方程(模型)计算的数据进行比较，结果如图 6. 由图 6 可见，本文模型与试验结果吻合较好，其拟合度可达 r = 0.997.

任取不同浓度的底物进行酶反应初速度测定，测定值与代入方程进行计算的值相比较，计算其误差，结果如表 2 所示.

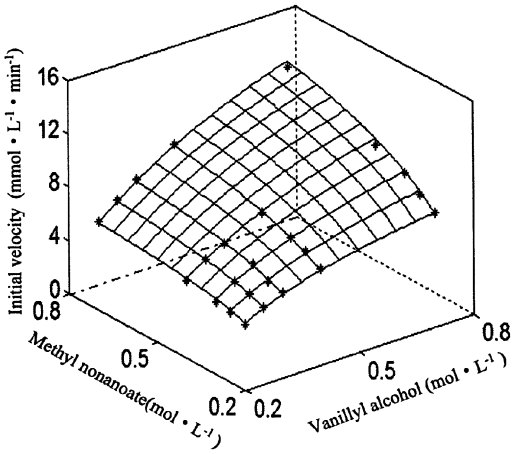


图 6 实测数据与方程的拟合曲面图

Fig. 6 The curve of model between tested data and equation

表 2 测定值与方程计算值的误差

Table 2 Difference between experiment data and calculated data

[B]/[A]	0.35/0.35	0.35/0.45	0.35/0.60	0.35/0.20	0.28/0.35	0.28/0.45	0.45/0.20
Dm *	8.25	9.02	10.62	5.67	7.52	8.38	6.04
Dc *	8.17	9.26	10.4 9	5.84	7.61	8.55	6.12
R *(%)	0.97	2.59	1.28	2.91	1.18	1.98	1.30

由表 2 可知，测定值与计算值的误差在 3% 以下，表明采用得到的模型参数进行模拟计算的结果与实际偏差不大，数学模型符合酶催化的动力学特点.

3 讨　　论

我们对脂肪酶 Novo435 在丙酮介质中催化香草醇与壬酸甲酯合成辣椒素酯的反应动力学特性进行了研究，建立了动力学方程. 在催化反应过程中，甲醇生成对酶催化反应的速度有一定的抑制作用，以反应转化率 65% 计[6]，同时考虑反应为等分子反应，故而本反应中甲醇生成的最大浓度为 0.45 mol/L，经测定可抑制约 20% 的反应速度. 在反应初期，产物浓度低，对反应速度的抑制小，其抑制作用可忽略不计. 在反应一定时间后，应及时将甲醇从反应体系中移出以解除其抑制作用，从而加快反应速度和缩短反应周期. 用于催化反应的脂肪酶颗粒，其酶活力会在贮藏过程中有所变化，本试验中酶活力为每克 46950 国际单位(以每 min 转化 1 μmoL的底物反应的酶量为 1 个国际单位). 此外，试验中发现香草醇在丙酮中的最大溶解度是 0.7 mol/L，因此如需提高辣椒素酯类产物的浓度，应提高香草醇的溶解度，对其进行分子修饰是一条可考虑的途径，这有待于进一步深入的研究.

参考文献：

[1] Kobata K, Todo T, Yazawa S, *et al. J. Agric. Food Chem.* [J], 1998, **46**: 1 695 – 1 697

[2] Kobata K, Sutohk K, Todo T, *et al. J. Nat. Prod.* [J], 1999, **62**(2): 335 – 336

[3] Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* [J], 2001, **65**(12): 2 735 – 2 740

[4] Nagaokakyo S Y, Shimizu T W, Otsu T F, et al. US[P], 6333421, 2001

[5] Ohnuki K, Haramizu S, Watanabe T, *et al. J. Nutr. Sci. Vitaminol*[J], 2001, **47**: 295 – 298

[6] Dong Xin-rong(董新荣), Liu Zhong-hua(刘仲华), Li Yu-hong(李雨虹), *et al. Synthetic Chemistry* [J], 2008, **16**(2): 136 – 140

[7] Li Yu-hong(李雨虹), Dong Xin-rong(董新荣), Xie Da-ping(谢达平), *et al. Res. Appl. Chem.* [J], 2007, **19**(4): 427 – 429

[8] Kouzou S, Kenji K, Tatsuo W. *J. Agric. Food Chem.*

[J], 2001, **49**: 4 026 – 4 030
[9] Sun Jin-ping(孙进平), Yang Geng-liang(杨更亮), Chen Yi(陈 义), *et al. Journal of Hobei University* [J], 2002, **22**(2): 5 – 147
[10] Zou Guo-lin(邹国林), Zhu Ru-pan(朱汝潘). Enzymology(酶学)[M], Wuhan: Wuhan University press (武汉大学出版社), 2000
[11] Chen Guang(陈 光), Ren Zhi-liang(任志良), Sun Hai-zhu(孙海柱). *Least-squares method curve fitting degree and matlab emerge* [J], Soft technology(软件技术), 2005, **24**(3): 107 – 108

Study on the Kinetics of Lipase-Catalyzed Synthesis of Capsinoids in Acetone Media

LIU Shao[1,2], LIU Hui-lin[1], DONG Xin-rong[3], XIE Da-ping[1]
(1. *College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha* 410128, *China*;
2. *College of Food science and technology, Hunan Agricultural University, Changsha* 410128, *China*;
3. *College of Science, Hunan Agricultural University, Changsha* 410128, *China*)

Abstract: The reaction kinetics for synthesis of capsinoids by lipase-catalyzed transesterification of vanillyl alcohol and methyl nonanoate in acetone was investigated in this work. The concentration of capsinoids obtained in the reaction was detected by HPLC and then the initial velocity of the synthesis reaction was calculated. The inhibiting test of product was carried out with methanol added. The results revealed that the enzymatic-synthesis reaction follows the Ping-Pang reaction mechanism. The kinetic equation with corresponding V_{max}, K_{mA} and K_{mB} was inferred by the double reciprocal plot. The fitting degree of equation model arrives at 0.997 to compare with the experimental data.

Key words: capsinoids; enzymatic-synthesis reaction; lipase; organic media; kinetics