

聚羟基烷酸酯酶降解动力学研究*

郑裕东 王迎军 吴 刚 陈晓峰 钟青华

(华南理工大学材料学院 广州 510640)

摘 要 研究了羟基丁酸-羟基戊酸共聚物(PHBV)在脂肪酶中的降解行为,用滴定法测定降解速度并进行酶促反应动力学研究.探讨了降解速度与酶浓度和底物浓度的数学关系和 Michaelis-Menten 常数,从实验上和理论上证实了 PHBV 的物理形态和几何尺寸对酶降解过程的影响,以及实验数据与非均相动力学模型的拟合.

关键词 聚羟基烷酸酯, 酶降解, 动力学, 滴定

聚羟基烷酸酯(PHA)是一类通过微生物发酵合成的脂肪族聚酯,在特殊条件下作为许多微生物储存的碳源和能量而存在于细胞体内,又可在细胞所分泌的多种解聚酶的催化下发生酯键水解而降解^[1-4].由于 PHA 的酶解反应比较复杂,至今国内外对其降解过程的动力学理论研究尚未获得统一认识,国外研究者用 Michaelis-Menten 动力学模型来研究 PHAase 解聚酶对聚羟基丁酸酯(PHB)的降解过程,在进行了边界条件的假设后,计算得到 Michaelis-Menten 常数为 73 ~ 131 $\mu\text{g/mL}$ ^[5,6];但采用不同的方法(如失重法、滴定法或光密度法等)对降解速度进行测定时,动力学参数值有较大的差别^[7,8];而且传统的均相动力学模型已不能完全适用于不可溶 PHA 体系.而对于 PHA 在其他酶体系中(如脂肪酶等)的降解行为,以及不可溶 PHA 的物理形态和几何尺寸与动力学参数的关系国内外均鲜见研究报道.

本工作以羟基丁酸-羟基戊酸共聚物(PHBV)为研究对象,PHBV 作为可降解的生物医用高分子,探讨其在体内环境中的结构性能变化以及在体内酶作用下的降解行为对该材料的研究和开发非常重要,为此本工作选择了一种来自动物体中的脂肪酶进行 PHBV 降解动力学研究,采用滴定法测定降解产物中有机酸浓度的变化来计算降解速度,从实验和理论上探讨了不同酶浓度、底物浓度、以及 PHBV 的形态和尺寸对降解速度的影响关系,并进行了动力学参数的计算.

1 实验部分

1.1 原材料

PHBV(HB:HV = 90:10), $M_n = 235000$, 英国 ICI 公司提供;假丝酵母脂肪酶 AS2.1.203, 华南理工大学食品系提供;氯仿(分析纯)和氯化钠(分析纯)广州化学试剂厂生产;氢氧化钠(分析纯)汕头光华化学试剂厂生产.

1.2 PHBV 试样的制备

粉末 PHBV 试样是将 PHBV 粉末充分研磨过筛,直径小于 10 μm ,干燥待用;膜状 PHBV 试样:将适量 PHBV 溶于氯仿中,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温搅拌至 PHBV 完全溶解,浇注于平板玻璃槽中,室温自然干燥 24 h 后,真空干燥 12 h,得到厚度为 50 μm 的 PHBV 膜;三维多孔 PHBV 试样,将研磨过筛后的致孔剂氯化钠加入 PHBV/氯仿溶液中充分搅拌混合为均匀浆料,浇注于平板玻璃槽中,于室温自然挥发 48 h 后,得到 PHBV/致孔剂膜,将该膜浸入去离子水中洗去致孔剂,35 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 48 h,得到孔径为 100 μm ,孔隙率为 90% 的多孔 PHBV 膜.

1.3 降解实验与降解速度测定

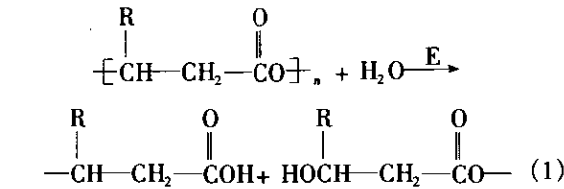
PHBV 的酶降解实验选择假丝酵母脂肪酶 AS3.1.203,采用滴定的方法进行酶降解反应动力学研究,其原理为 PHBV 酶降解反应产生羟基丁酸等有机酸降解产物,通过 NaOH 溶液进行滴定,用 NaOH 的滴加速度来表征 PHBV 降解产物羟基丁酸的产生速度,即 PHBV 降解速度^[8].将不同的 PHBV 试样完全浸泡于不同浓度的一系列 1 mL 等

* 2001-12-25 收稿,2002-03-29 修稿;国家自然科学基金重点项目(基金号 59932050)、广东省自然科学基金项目(基金号 990621)和广东省“十五”重大科技专项(A302020202)资助

分酶溶液中,反应试管放置在 37℃ 恒温振荡培养箱中进行酶降解实验;在降解不同时间后将其中 3 组试样取出用 10 mmol/L NaOH 溶液进行滴定,并计算平均消耗 NaOH 当量数.其中酶溶液活度分别为 0.3~2.5 U/mL.粉末的 PHBV 的浓度分别为 0.35~2 mg/L.

2 酶降解动力学理论

PHBV 在酶的催化作用下发生以下酯键水解反应:



其中 R 为 CH₃ 或 CH₂CH₃,因 PHBV 降解产物为有机酸,可通过测定溶液中 H⁺ 浓度的变化来表征 PHBV 的降解速度. MuKai 等认为酶与 PHBV 底物的相互作用分为两个过程,首先酶分子(E)中的疏水键与 PHBV(S)结合为活性复合物(ES)后,再与底物发生酶促反应形成产物(P),

$$E + S \rightleftharpoons ES \qquad (2)$$



当假设酶与底物的结合为反应控制步骤时,且酶的浓度为不变量,降解反应速度可用以下公式表示^[9,10]:

$$v = K_3[ES] = \frac{K_3[E][S]}{[S] + K_m} \qquad (3)$$

$$K_m = \frac{K_2 + K_3}{K_1} \qquad (4)$$

公式(4)就是著名的 Michaelis-Menten 公式,其中 K_m 为 Michaelis-Menten 常数,是只与酶的性质有关,而与酶的浓度无关的动力学参数.如果[S]≫[E],即酶全部与底物结合:[E]=[ES].此时为最大反应速度:

$$V_{max} = K_3[E] \qquad (5)$$

为了得到准确的 K_m 值, Lineweaver 等将公式(3)倒转成为:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{K_3[E][S]} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}[S]} \qquad (6)$$

当假定底物浓度为不变量时,[E]≫[S],将得到以下公式^[10]:

$$V = K_3[ES] = \frac{K_3[E][S]}{[E] + K_m} \qquad (7)$$

$$V_{max} = K_3[S] \qquad (8)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{[E] + K_m}{[S][E]} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}[E]} \qquad (9)$$

3 结果与分析

3.1 降解速度与底物浓度的关系

研究 PHBV 降解行为时,分两种情况进行讨论,分别为固定酶浓度,研究降解速度与底物浓度的关系;以及固定底物浓度,研究降解速度与酶溶液浓度的关系,图 1 为不同浓度的 PHBV-1 在 2.25 U/mL 酶溶液中不同时间降解后进行滴定,至 pH=8.0 时消耗 NaOH 溶液的微当量数,由此数据计算 PHBV 的降解速度,图 2 为分别在活度为 1.5、2.25、4.8 U/mL 的酶溶液中进行上述测定并按公式(5)和(6)计算,得到降解速度与底物浓度的关系曲线,可以看出对于直径 10 μm 的 PHBV 粉末,其降解速度随底物浓度的增加而增加,但不是线性关系,对图 2 求倒数后作图(见图 3),降解速度的倒数 1/V 与底物浓度的倒数 1/[S]成直线关系,符合 Michaelis-Menten 动力学方程,根据公式(6)计算 Michaelis-Menten 常数 K_m 为 0.78 mg/mL,最大降解速度 V_{max} 为 0.033 meq/min,说明此酶促反应既不是零级反应,也不是一级反应,而是[S]的混合级反应.从图 3 可以看到酶溶液浓度不同,对 K_m 值无影响.

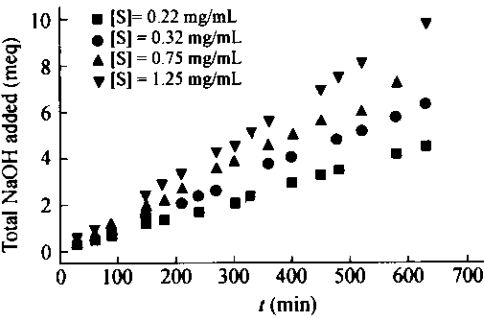


Fig. 1 Titrimetric rate for enzymatic degradation of PHBV powder

3.2 降解速度与酶浓度的关系

当固定底物浓度时,降解速度与酶浓度的关系却与 Michaelis-Menten 动力学方程不甚吻合,图 4 表示 PHBV 浓度为 1.5 mg/mL 时,降解速度的倒数 1/V 与酶浓度的倒数 1/[E]的关系,与直线有较大偏差.研究中发现降解速度随酶浓度的变化

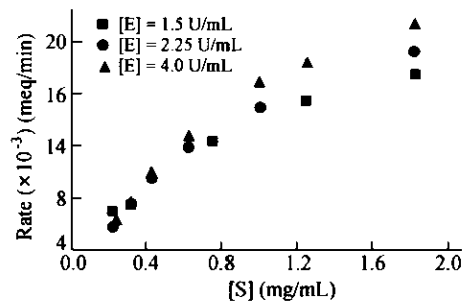


Fig. 2 Degradation rate versus concentrations of PHBV powder in three value of $[E]$

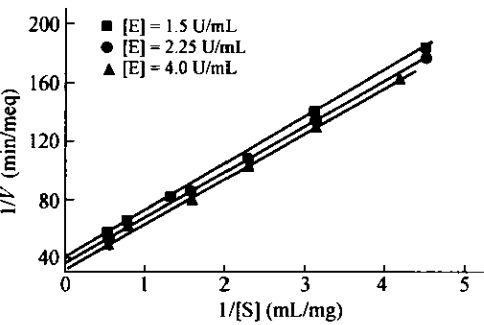


Fig. 3 Lineweaver-Burt plots of equation (6) for degradation rate date of PHBV powder

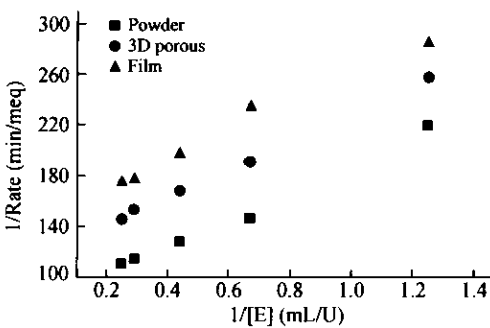


Fig. 4 Relationship of $1/\text{rate}$ and $1/[E]$ for three kinds of formation of PHBV

关系受 PHBV 形状和比表面积的影响很大. 为此我们用 PHBV 膜, PHBV 多孔网状薄块和 PHBV 粉末进行降解实验比较, 图 5 为 3 种试样的降解速度与酶浓度的关系曲线, 将其取倒数后作图均不能得到线性关系, 说明此酶促反应的 $[E]$ 依赖性不符合传统的 Michaelis-Menten 方程.

对于不可溶 PHBV 的酶降解, 底物的表面状态 and 比表面积影响反应的进行, 必须对 Michaelis-Menten 动力学模型中降解速度与酶浓度对依赖关系进行修正, McLaren 提出非均相酶促动力学理

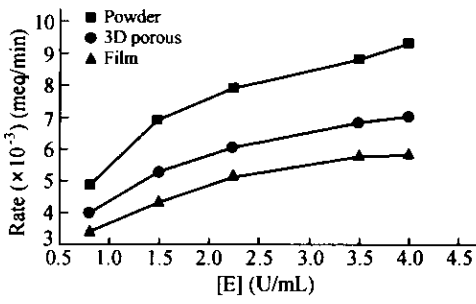


Fig. 5 Degradation rates of PHBV samples with three kinds of formation

论, 认为酶在不可溶底物表面的吸附与结合为速度控制步骤, 其中酶的吸附符合 Freundlich 等温效应^[11]:

$$[ES] = K[E]^n \tag{10}$$

其中 n 为反应幂数, 当不可溶底物为二维固体表面时, n 预测为 $2/3$; 在一维固体表面时, n 为 $1/3$; 由此可见反应幂数与底物几何形态紧密相关. PHBV 的降解速度与酶-底物活性络合物的浓度成正比, 则:

$$V = K_3[ES] = K_3K[E]^n \tag{11}$$

其中 K 为吸附平衡常数, $K = k_1/k_2$.

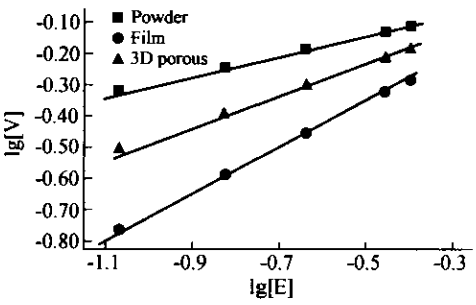


Fig. 6 Double-log plot of the degradation rates from Fig. 5

图 6 为将图 5 中 V 和 $[E]$ 数据取双对数作图所得曲线, 可见 $\lg V$ 与 $\lg [E]$ 为直线关系, 说明 PHBV 酶降解速率与酶浓度 $[E]$ 的关系符合公式 (11). 但对于粉末、多孔膜和膜等 3 种不同结构的试样, 直线斜率不同, 分别为 0.31、0.48 和 0.75, 由此表明 PHBV 底物的几何形状与比表面积直接影响酶降解反应幂数 n , 其中悬浮于溶液中 PHBV 粉末状微粒 (直径 $< 10 \mu\text{m}$), 反应幂数为 0.31, 相当于一维固体表面^[10]; PHBV 膜的比表面积在 3 种样品中最小, 反应幂数为 0.75, 近似于二维固体表面; PHBV 三维多孔试样孔径为 $100 \mu\text{m}$, 孔隙率达 91%, 比表面积介于三者之间, 反应幂数为

0.48.我们认为 PHBV 底物的几何形态及比表面积与酶降解反应过程及降解速度有直接关系,有关机理有待于进一步深入研究.

REFERENCES

- 1 Philippa J H, Robert H M, Mark R T. *Macromolecules*, 1996, 29: 2472 ~ 2475
- 2 He Wennan(贺文楠), Zhang Zengmin(张增民), Hu Ping(胡平), Chen Guoqiang(陈国强). *Acta Polym Sini(高分子学报)*, 1999, (6): 709 ~ 714
- 3 Zheng Yudong(郑裕东), Zhong Qinghua(钟青华), Ma Wenshi(马文石). *Chemical J of Chinese University(高等学校化学学报)*, 2000, 21: 991 ~ 913
- 4 Zheng Yudong(郑裕东), Ren Yaobin(任耀彬), Ma Wenshi(马文石). *Materials Science and Engineering(材料科学与工程)*, 2001, 19(2): 43 ~ 46
- 5 Nakayama K, Saito T, Fukui T. *Biochemistry Biophysics Acta*, 1985, 63: 827 ~ 830
- 6 Mukai K, Yamada K, Doi Y. *International J Biology Macromolecule*, 1992, 14: 235 ~ 242
- 7 Mark R T, Robert W L, Fuller R C. *Polymer*, 1997, 38: 551 ~ 558
- 8 Hocking P J, Marchessault R H, Timmins M R, Fuller R C. *Macromolecules*, 1996, 29: 2472 ~ 2475
- 9 Beiley J E, Ollis D F. *Biochemistry Engineering Fundament*. New York: McGraw-hill, 1989
- 10 Jin Changzhen(金长振). *Theory and Practice for Enzymology(酶学的理论与实际)*. Beijing(北京): Keji Chubanshe(北京科技出版社), 1989
- 11 McLaren A D. *Enzymologia*, 1963, 26: 237 ~ 241

KINETIC STUDY FOR ENZYMATIC DEGRADATION OF POLYHYDROXYALKANOATES

ZHENG Yudong, WANG Yingjun, WU Gang, CHEN Xiaofeng, ZHONG Qinghua

(College of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract The microbial polyesters have attracted attention as an biodegradable materials for a wide range of agricultural, marine and medical applications. It is important to investigate the biodegradation behavior and kinetics of the biodegradable reaction. Traditional Michaelis-Menten kinetics was originally derived for homogeneous reactions in which both the enzyme and the substrate are soluble. The enzymatic degradation of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) is a heterogeneous reaction, because PHBV is an insoluble substrate, and the kinetic relation needs to be altered to fit it. In this paper, the kinetics of the enzymatic degradation behavior of PHBV was studied. It is well known that the enzymatic hydrolysis of water-insoluble film of PHB by depolymerases produces water-soluble products composed of monomers and dimers of R-3-hydroxybutyric acid. The rates of degradation were determined by the titrimetric methods, which are quantitative by directly measuring the acid groups formed as a result of ester bond hydrolysis. The degradation of PHA samples with different shapes and morphology was studied. The kinetic analysis revealed that the degradation reaction exponentials of PHBV powder, solution-casting film and solution-casting-leaching porous film were different, which were inconsistent with classical enzymatic kinetics. The variations of kinetics curves depended on the concentration of enzyme and PHA. A heterogeneous kinetics treatment was derived to describe the relationship of degradation rates with enzyme concentrations and substrates. The influence of PHBV physical morphology on their degradation was also investigated. The results show that the specific surface area and the shape of PHA samples effect the adsorption and combination of enzyme to substrates and finally conduce to the changes of enzymatic degradation process and the rate of degradation of PHBV.

Key words Polyhydroxyalkanoates, Enzymatic degradation, Kinetics, Titrimetry