

李楷原,刘翠,邓雅珊,等.酶促制备丝裂霉素类似物反应动力学模型研究[J].江西师范大学学报(自然科学版),2022,46(3):240-246.

LI Kaiyuan, LIU Cui, DENG Yashan, et al. The kinetic modeling of the enzymatic preparation of mitomycin analogs [J]. Journal of Jiangxi Normal University( Natural Science), 2022, 46(3): 240-246.

文章编号: 1000-5862(2022)03-0240-07

# 酶促制备丝裂霉素类似物反应动力学模型研究

李楷原, 刘 翠, 邓雅珊, 薛 晓, 许 慧, 王繁业\*

(青岛科技大学化工学院制药工程系, 山东 青岛 266042)

摘要: 基于固定化 *T. laibacchii* 脂肪酶催化 2-甲基-4-苯醌与正丁胺的 Michael 加成反应建立了酶促制备丝裂霉素类似物 2-甲基-3-正丁胺酰-1-氢-4-醌的反应动力学模型. 该反应在柠檬酸缓冲溶液( pH 值为 7.0) 中进行, 最终产率可达 98%. 该文提出了修正的有序双双和随机双双机理, 采用 King-Altman 方法得到相关微分方程组以表示即时反应速率. 通过联合解微分方程和最优化方法确定动力学模型参数, 使用 ode45 程序解微分方程组, 并运用 Fmincon 软件计算动力学常数. 研究表明: 模型拟合值与实验值的平均相对偏差为 11.25%, 且偏差服从关于  $y=0$  的轴对称分布. 当固定化酶粒径为 0.5 mm、搅拌转速为 200 rpm 时可以忽略内外扩散限制. 该文建立的动力学模型为固定化酶固有动力学模型.

关键词: 固定化脂肪酶; 动力学模型; Michael 加成; 随机双双机制; 扩散限制

中图分类号: TQ 028.8 文献标志码: A DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2022.03.04

## 0 引言

丝裂霉素是一类具有抗肿瘤活性的抗生素, 临床广泛用作抗癌药物. 但由于其毒性较高, 易导致严重的不良反应, 所以其在临床应用上受到一定限制<sup>[1]</sup>. 目前, 通过各种化学方法已成功合成了丝裂霉素类似化合物, 但化学法仍存在一些缺点, 如反应步骤繁琐、选择性差、反应条件苛刻等<sup>[2-3]</sup>. 酶催化法具有化学选择性高、反应条件温和、合成效率高、立体选择性和对环境友好等优点<sup>[4]</sup>, 该方法有可能避免上述问题.

脂肪酶是在有机合成领域中应用最广泛的多功能酶, 在 C—C 键的形成、C—杂原子键的形成、氧化和水解反应中显示出良好的催化能力<sup>[5]</sup>. 尽管脂肪酶催化水解反应与酯化的动力学模型已被广泛研究<sup>[6]</sup>, 但脂肪酶催化 Michael 加成反应的动力学模型研究鲜见文献报道. 本文所采用的 *T. laibacchii* 脂肪酶是一种胞内水解酶, 由于其优良的催化特性, 所以该酶已被用于酮洛芬的动力学拆分<sup>[7]</sup>、手性 1,3-

氧硫杂环戊烷的立体选择性合成<sup>[8]</sup>和  $\epsilon$ -己内酯直接原位开环聚合反应<sup>[9]</sup>. 酶的固定化<sup>[10]</sup>是改善酶特性的有效方法. 在酶固定化后其稳定性增加, 便于运输和贮存, 且其特异性<sup>[11]</sup>、对抑制剂或化学品的耐受性和可重复使用性<sup>[12-13]</sup>都有较大程度提升. 本文采用聚乙二醇 PEG4000 /  $K_2HPO_4$  双水相体系对 *T. laibacchii* 脂肪酶进行部分纯化, 并添加硅藻土载体实现脂肪酶的原位固定<sup>[14]</sup>. 疏水性<sup>[15]</sup>的硅藻土可在疏水环境中吸附残留物, 降低对酶的抑制作用<sup>[16]</sup>.

本文以固定化 *T. laibacchii* 脂肪酶为催化剂, 在柠檬酸盐缓冲溶液( pH 值为 7.0) 中催化 2-甲基-4-苯醌与正丁胺合成 2-甲基-3-正丁胺酰-1-氢-4-醌, 对脂肪酶催化 Michael 加成反应的反应机制进行了探索, 并建立了随机顺序双双机制反应的动力学模型.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2-甲基-4-苯醌(化合物 1, 质量分数为 98.0%) 和

收稿日期: 2022-02-03

基金项目: 国家自然科学基金(21546004, 21576145) 资助项目.

通信作者: 王繁业(1964—), 男, 山东青岛人, 教授, 主要从事生物制药研究. E-mail: lwz\_618@163.com

正丁胺(化合物 2, 质量分数为 99.7%) 均购自中国上海阿拉丁生化科技有限公司。所用酶为 *Trichosporon laibacchii* (*T. laibacchii*) CBS5791 的固定化脂肪酶, 酶活力为  $1\,280\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ , 该酶为本实验室自制活性酶。

## 1.2 固定化 *T. laibacchii* 脂肪酶的制备

称取一定量的粗脂肪酶(细胞匀浆液), 加入一定量的 PEG4000、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  和水, 形成 12% PEG4000/13%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的双水相体系, 利用旋涡混合器使体系充分混合, 在室温下以 3 000 rpm 的转速离心 5 min 以加速相分离, 小心地吸出上相(含有脂肪酶)并称其质量。往上相中加入适量的硅藻土(每单位活力脂肪酶加硅藻土 0.8 mg) 可使固定的脂肪酶易于过滤回收, 将得到的混合物在  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、150 rpm 转速条件下保温 2 h, 过滤, 用磷酸盐缓冲液洗涤并真空干燥后, 得到固定化的 *T. laibacchii* 脂肪酶<sup>[17]</sup>。

## 1.3 固定化 *T. laibacchii* 脂肪酶催化 2-甲基-1,4-苯醌与正丁胺的 Michael 加成反应

为解决底物溶解性问题, 在反应体系中添加体积分数为 2%~4% 的甲醇, 向 20 mL 反应瓶中加入 10 mL pH 值为 7.0 的柠檬酸缓冲溶液, 加入一定量的化合物 1, 使其物质的量浓度为  $0.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 化合物 2 与化合物 1 的物质的量之比为 1.05:1.00, 然后加入固定化 *T. laibacchii* 脂肪酶, 酶活性为  $25\sim 50\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 在转速为 200 rpm、温度为  $40\sim 50\text{ }^\circ\text{C}$  条件下反应 20~24 h。在反应结束后, 将反应液过滤以除去固定化 *T. laibacchii* 脂肪酶, 滤液用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取后的有机相, 用无水  $\text{MgSO}_4$  干燥, 最后减压蒸馏浓缩, 用硅胶柱层析法对浓缩液进行进一步纯化, 用石油醚(PE)和乙酸乙酯(EA)作为洗脱剂, 最终得到的产物为 2-甲基-3-正丁胺酰-1-氢-4-醌(化合物 3)。

## 1.4 内、外扩散实验

在不同转速(50~250 rpm)下进行外扩散实验, 采用不同粒径(0.1~0.9 mm)的固定化脂肪酶进行内扩散实验, 其他试验条件与 1.2 节相同。

## 1.5 脂肪酶活性测定

采用“橄榄乳化法”<sup>[18]</sup>测定脂肪酶活力, 在  $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、pH 值为 8.0 的条件下, 使用固定化 *T. laibacchii* 脂肪酶催化橄榄油水解反应, 1 min 生成  $1\text{ }\mu\text{mol}$  脂肪酶所需的脂肪酶被定义为一个脂肪酶活力单位(U)。

## 1.6 HPLC 分析

HPLC 分析采用安捷伦 Agilent1200 高效液相色谱仪, 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱(250 mm×4.

6 mm 5  $\mu\text{m}$ )。流动相为  $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=80:20$ , 流速为  $0.5\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 样品进样体积为  $5\text{ }\mu\text{L}$ , 柱温为  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , 检测波长为 227 nm。化合物 3 和 2-甲基-3,5-正丁胺酰-1,4-苯二酚(化合物 4)的保留时间分别为 3.602 min 和 3.803 min。

# 2 动力学模型

## 2.1 反应机理及动力学模型

反应路线如图 1 所示。固定化脂肪酶催化化合物 2 与化合物 1 进行 Michael 加成反应生成化合物 3, 化合物 3 有可能还会进一步反应生成二胺化副产物(4)。在脂肪酶催化的 Michael 加成反应中, 由于反应条件(如酶的活性、反应温度、反应介质的 pH 值等)是不同的, 所以反应可能会产生 2 种不同的产物。若脂肪酶有较好的区域选择性, 则产物以化合物 3 为主, 否则副产物化合物 4 的生成量会增加。

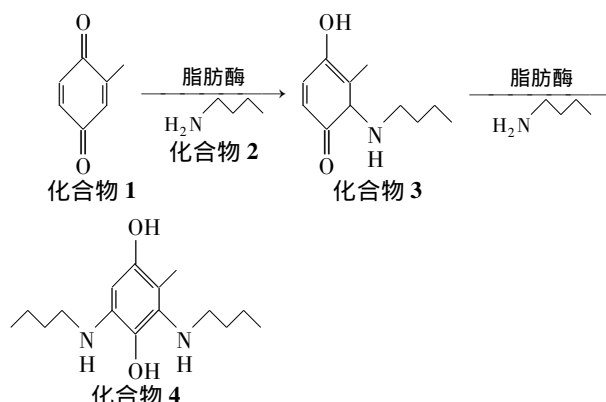


图 1 固定化脂肪酶催化化合物 1 与化合物 2 的 Michael 加成反应合成化合物 3 的反应路线

脂肪酶通过酸碱催化 Michael 加成反应, 由于在底物中没有离去基团, 所以在反应中不产生酰基酶<sup>[19]</sup>。对于 *T. laibacchii* 脂肪酶催化正丁胺与 2-甲基-1,4-苯醌的 Michael 加成反应, 本文提出一种初步的反应机理: (i) 底物与酶结合后, 氧阴离子空穴使 2-甲基-1,4-苯醌的  $\alpha\beta$ -不饱和羰基极化, 这样不仅有利于增加复合物的亲电子能力, 而且有利于后续烯醇化中间体的生成; (ii) 正丁胺与上述步骤的复合物反应可催化组氨酸使正丁胺去质子化, 并与极化后的苯醌进行加成反应。在苯醌的  $\text{C}_3$  处加入亲核试剂后, 质子化的组氨酸将苯醌的  $\alpha$ -碳质子化生成双键, 使烯醇和羰基结构相互转化。

对于 *T. laibacchii* 脂肪酶催化的双底物反应, 通常有乒乓机制<sup>[20-22]</sup>和三元复合机制 2 种反应机理(如有序双双和随机双双机制<sup>[23-26]</sup>)。对于化合物 1 与化合物 2 的 Michael 加成反应, 由于底物缺少离

子化基团,所以乒乓机制并不适用.本文将对这 2 种机制进行进一步研究,包括相关动力学模型的建立和模拟值与实验值的比较,最终推测出底物与酶最可能的结合顺序.将基于以下 2 种不同的机理建立动力学方程.

2.1.1 随机双双机制 采用 King-Altman 方法建立的随机双双机制的速率方程如下:

$$[A] = [A_0](1 - Y_1 - Y_2),$$

$$[B] = [B_0](1 - Y_1 - 2Y_2),$$

其中  $[A]$  为 2-甲基-4-苯醌的物质的量浓度 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $[A_0]$  为 2-甲基-4-苯醌的初始物质的量浓度 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $[B]$  为正丁胺的物质的量浓度 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $[B_0]$  为正丁胺的初始物质的量浓度 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $Y_1$  为化合物 3 的产率(%);  $Y_2$  为化合物 4 的产率(%).

$$\sum K = K_1 + K_2[A] + K_3[B] + K_4[A][B] + K_5[B][B] + K_6[A][A] + K_7[A][B][B] + K_8[A][A][B] + K_9[A][A][B][B] + K_{10}[B][B][B],$$

$$dY_1/dt = K_{11}\exp(-K_{12}/RT)[A][B][E_0]/[A_0]/\sum K, \quad (1)$$

$$dY_2/dt = K_{13}\exp(-K_{14}/RT)[A][B][B][E_0]/[B_0]/\sum K, \quad (2)$$

其中  $R$  为气体常数 ( $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  为温度 (K). 式 (1) 和式 (2) 分别代表产物  $P_1$  (3) 和  $P_2$  (4) 的反应速率,它们构成一个微分方程组,共有 14 个模型参数(见表 1).

2.1.2 有序双双机制 同样采用 King-Altman 方法,建立了有序双双机制的速率方程,包含 10 个模型参数.

$$\sum K = K_1 + K_2[A] + K_3[B] + K_4[A][B] + K_5[B][B] + K_6[A][B][B],$$

$$dY_1/dt = K_7\exp(-K_8/RT)[A][B][E_0]/[A_0]/\sum K, \quad (3)$$

$$dY_2/dt = K_9\exp(-K_{10}/RT)[A][B][B][E_0]/[B_0]/\sum K. \quad (4)$$

其中  $R$  为气体常数 ( $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  为温度 (K).

## 2.2 动力学参数的估计

联合使用解微分方程和最优化方法计算反应速率方程中的动力学参数.通过最小化目标函数拟合实验数据来估算模型参数 ( $K_1, K_2, \dots, K_{14}$ ):

$$F = \sum \sum \sum |(Y^{\text{estim}_{ijk}} - Y^{\text{exp}_{ijk}})/Y^{\text{estim}_{ijk}}| \times 100. \quad (5)$$

其中  $Y^{\text{estim}_{ijk}}, Y^{\text{exp}_{ijk}}$  为估产;  $i = 1, 2$  (即产品 3 和 4),  $j = 1,$

$2, 3$  (即  $40^\circ\text{C}, 45^\circ\text{C}, 50^\circ\text{C}$ );  $k$  为实验点  $k = 1, 2, \dots, 12$ .

由式 (5) 可见,通过对计算后的常微分方程数值解的分析,拟定了最优化方法.实验将二者进行充分结合,  $K_1 \sim K_{14}$  的参数估计如表 1 所示.本文用拟合值与实验值之差的绝对值进行计算,不会增加偏差的非线性相关数值.利用 Matlab6.5 软件计算,使用子程序 ode45 数值求解微分方程 (1) 和 (2) 或 (3) 和 (4),用优化子程序 fmincon 进行最优化计算.

表 1 动力学模型的估计参数

参数	改进的 随机双双机制	改进的 有序双双机制
$K_1$	3.99	17.16
$K_2$	16.57	19.96
$K_3$	20.39	19.94
$K_4$	30.95	72.39
$K_5$	126.44	8.33
$K_6$	140.17	1.00
$K_7$ 或 $a_1$	1.00	35.04
$K_8$ 或 $E_1$	1.00	7 689.20
$K_9$ 或 $a_2$	0.10	0.94
$K_{10}$ 或 $E_2$	0.50	13 308.00
$K_{11}$ 或 $a_1$	291.93	
$K_{12}$ 或 $E_1$	9 979.70	
$K_{13}$ 或 $a_2$	158.75	
$K_{14}$ 或 $E_2$	23 536.00	

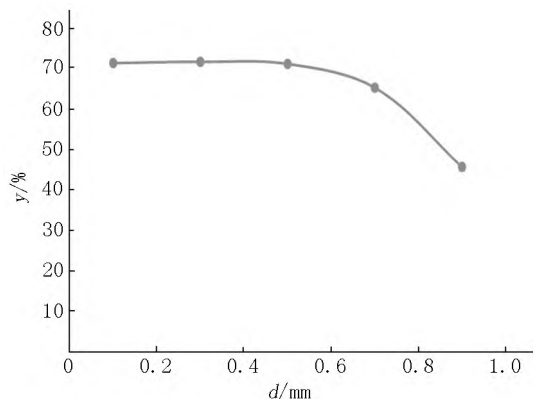
注:  $K_1, K_2, K_3$  为动力学参数 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ );  $K_4, K_5$  为动力学参数 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-2}$ );  $K_6$  为动力学参数 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-2}$  或  $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-3}$ );  $K_7$  为动力学参数 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-3}$  或指数前因素 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-2} \cdot \text{mL} \cdot \text{U}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $K_8$  为动力学参数 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-3}$  或活化能 ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ );  $K_9$  为动力学参数 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-4}$  或指数前因素 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-2} \cdot \text{mL} \cdot \text{U}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $K_{10}$  为动力学参数 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-3}$  或活化能 ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ );  $K_{11}, K_{13}$  为指数前因子 ( $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-2} \cdot \text{mL} \cdot \text{U}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $K_{12}, K_{14}$  为活化能 ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ).

## 3 结果与讨论

### 3.1 内外扩散实验

3.1.1 内扩散实验 使用不同粒径的固定化酶颗粒进行了多次实验,粒径范围为  $0.1 \sim 0.9 \text{ mm}$ ,实验结果如图 2 所示.由图 2 可见:当固定化 *T. laibacchii* 酶粒径为  $0.1 \sim 0.5 \text{ mm}$  时,化合物 3 的产率没有明显变化,此时,可忽略内扩散限制.当固定化 *T. laibacchii* 酶粒径大于  $0.5 \text{ mm}$  时,随着粒径的增大,产率降低,这表明当固定化脂肪酶的粒径大于  $0.5 \text{ mm}$  时,反应受内部扩散传质的影响从而控制了

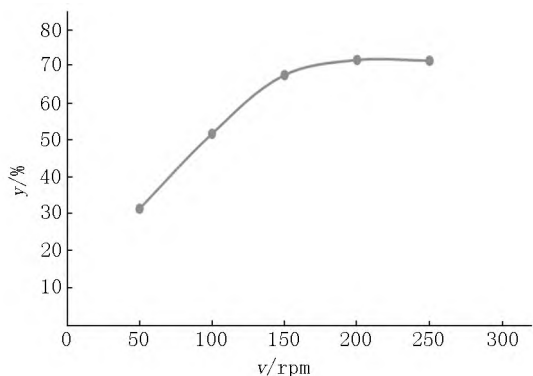
产物产量.此时,内扩散传质对产物的影响不能忽略.底物首先经内扩散到达催化剂表面并在达到一定浓度后与酶蛋白结合,才能发生酶促反应.在该反应体系中,当固定化酶粒径大于0.5 mm时,随着内扩散阻力的增加,对底物的转化率也有一定影响.因此,本文选择粒径为0.5 mm的固定化脂肪酶用于后续催化实验.



注: 温度为 50 °C, 搅拌速度为 200 rpm.

图2 固定化酶粒径对化合物3产率的影响

3.1.2 外扩散实验 采用不同转速(50~250 rpm)进行了外扩散实验,考察转速对2-甲基-4-苯醌的产率的影响.其他实验条件与内扩散实验相同.实验结果如图3所示.在含有固定化酶的非均相体系中,底物和产物都需要在主体溶液和固定化酶颗粒之间扩散<sup>[27-28]</sup>.由图3可见:当搅拌速度从50 rpm增加到150 rpm时,化合物3的产率从31.0%增加到67.5%.这表明在此转速范围内存在限制外扩散传质的因素.当转速从175 rpm增加到250 rpm时,化合物3的产率并没有明显增加.这表明当转速大于175 rpm时外扩散限制可忽略不计.所以,本文选择转速为200 rpm进行随后的实验以达到最佳的催化效果.



注: 温度为 50 °C, 固定化酶粒径为 0.5 mm.

图3 搅拌速度对化合物3产率的影响

由上述讨论可知,当固定化脂肪酶颗粒直径为0.5 mm、搅拌速度为200 rpm时,内外扩散传质阻力均可忽略.此时进行的反应动力学为固有动力学.

### 3.2 反应动力学实验

进行了固定化脂肪酶催化2-甲基-4-苯醌和正丁胺的Michael加成实验,底物正丁胺和苯醌的物质的量之比为1.05:1.00, pH值为7.5.图4分别给出了在40 °C、45 °C和50 °C下化合物3的产率.如图4所示,单胺化产物3的最高产率约为98.0%,远远高于其副产物化合物4的产率(最高产率约为1.6%,图4中未给出).上述结果表明所使用的固定化脂肪酶对2-甲基-4-苯醌和正丁胺的Michael加成反应具有良好的区域选择性.

对于酶催化反应,产物产率取决于酶的选择性、反应介质的pH值和底物的比例<sup>[29]</sup>.S. Hertera等<sup>[30]</sup>利用漆酶合成了丝裂霉素单胺化产物.结果表明:当pH值为7.0且苯醌与胺的物质的量之比为1.00:1.20时,单胺产物的产率较高.相反,当pH值为5.0且苯醌与胺的物质的量之比为1.00:2.50时,二胺产物生成量相对较多.K. Haghbeen等<sup>[31]</sup>也报道了合成对苯醌和邻苯醌的类似实验结果,在使用过量胺供体的核胺化反应中,二胺化产物的生成也会增加<sup>[32-33]</sup>.

### 3.3 温度的影响

考察了不同温度对产物产率的影响.当搅拌速度为200 rpm、脂肪酶活性为50 U·mL<sup>-1</sup>、底物物质的量之比 $n(\text{苯醌}):n(\text{胺})=1.00:1.05$ 时,实验结果如图4所示.由图4可知:当反应温度从40 °C升高到50 °C时,产物3的产率逐步上升.在50 °C时反应12 h后,产物3的产率为97.2%;而在45 °C反应15 h时,化合物3的产率达到97.2%;在40 °C反应19 h时化合物3的产率达到97.1%.这说明:随着温度的升高,反应呈现加速趋势.

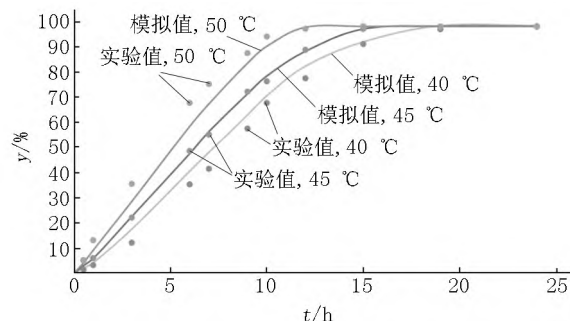


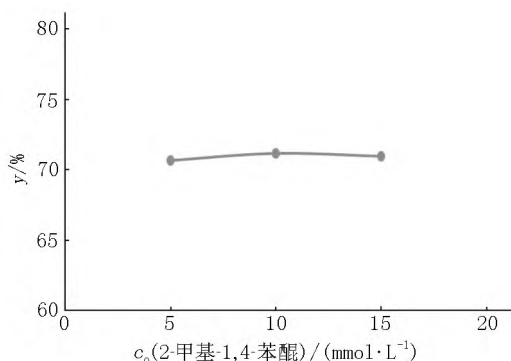
图4 化合物3的改进随机双双模型模拟结果与实验结果的比较

一般来说,较高的温度有利于酶催化反应的速率增加,也有利于降低反应物与酶底物复合物形成的反应能垒,从而提高反应速率与转化率<sup>[20]</sup>.本文的实验结果表明:*T. laibacchii* 脂肪酶在50 °C下具有良好的热稳定性.因此,为保持固定化脂肪酶的催

化效率,本文选择 50 ℃ 为最适温度,此时产物转化率是相对最高的。

### 3.4 底物物质的量浓度的影响

在一般情况下,若在酶催化反应中底物物质的量浓度过高,则相应的反应速度反而会下降,导致底物抑制产率下降<sup>[34]</sup>。由于单一底物或双底物对酶都可能具有抑制作用,所以本文可以通过保持一种底物的恒定然后改变另一种底物的物质的量浓度来分别进行实验。但是,在该生物催化反应中,2 种底物的物质的量浓度都很低,因此酶的抑制作用可以忽略。通过改变这 2 种底物的物质的量浓度进行底物抑制实验的结果如图 5 所示。由图 5 可知:当化合物 1 的物质的量浓度从 5 mmol · L<sup>-1</sup> 增加到 15 mmol · L<sup>-1</sup> (即  $n(\text{化合物 2}) : n(\text{化合物 1}) = 1.05 : 1.00$ ) 时,底物物质的量浓度的增加对化合物 3 的产率没有明显影响。因此,当化合物 1 的物质的量浓度范围为 5 ~ 15 mmol · L<sup>-1</sup> 时,2 种底物对反应系统都没有抑制作用。



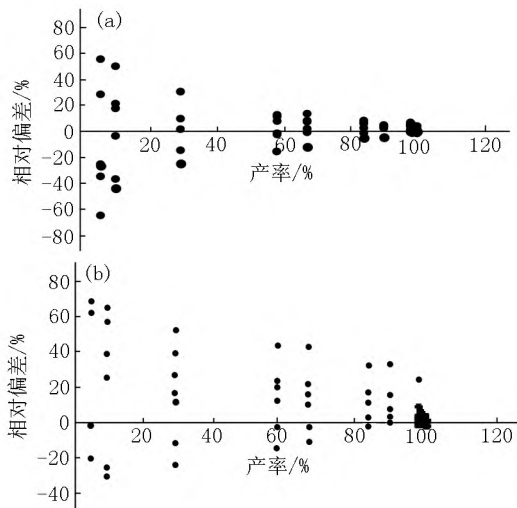
注:温度为 50 ℃,固定化酶粒径为 0.5 mm,搅拌速度为 200 rpm。

图 5 底物浓度对化合物 3 产率的影响

### 3.5 动力学模型

图 4 给出了化合物 3 和 4 的产率的随机双双机制模型的模拟值与实验值,化合物 3 和 4 的最高产率分别约为 98.0% 和 1.6%,化合物 3 的产率远高于化合物 4。根据目标产物 3 的随机双双机制的模拟产率与实验数据进行对比,对实验的相对偏差分布进行拟合,其平均偏差与最大偏差分别为 11.25% 和 28.57%,且偏差数据服从关于  $y=0$  的轴对称分布(见图 6)。这表明模型对实验数据拟合匹配程度很高。根据有序双双机制模拟得到的模拟值与实验值的实时偏差分布,得到其平均偏差与最大偏差分别为 21.7% 与 68.6%,且偏差数据服从关于  $y=0$  的轴不对称分布,这说明模型拟合程度并不适合 Michael 加成反应。因此,从拟合效果来看,随机双双机制模型优于有序双双机制模型。本文同时使用不同温度的所有实验数据用于估计动力学参数,将微分方程数值解

与非线性优化方法结合,直接确定了包括活化能在内的多个动力学参数,在一定程度上简化了动力学参数的估计过程,提高了计算效率。



注:包括 78 个数据点,相对偏差为  $(Y_{ijk}^{\text{estim}} - Y_{ijk}^{\text{exp}}) / Y_{ijk}^{\text{estim}} \times 100$ 。(a) 采用改进的随机双双机制,(b) 采用改进的有序双双机制。

图 6 动力学模型的估计值与实验值的相对偏差

大多数生化反应动力学的活化能范围为 2 ~ 40 kJ · mol<sup>-1</sup>,2 种模型动力学模型的活化能均在 7.68 ~ 23.5 kJ · mol<sup>-1</sup> 之间(见表 1),这说明本文所提出的动力学模型较好地拟合了实验数据。一般地,所有的吸附或平衡常数都必须为正符号,而表 1 中的所有模型常数都恰好满足这一点。根据模型与实验数据拟合的优劣程度来判断反应机制<sup>[25]</sup>,由于基于随机双双机制的模型的拟合效果显著优于有序双双机制,所以可以判断本研究的固定化脂肪酶催化 Michael 加成反应的反应机制是改进的随机双双机制。对于本次研究中所使用的固定化脂肪酶,可以忽略内部和外部传质阻力的影响。

## 4 结论

本文进行了固定化 *T. laibacchii* 脂肪酶催化的 2-甲基-1,4-苯醌与正丁胺的 Michael 加成反应制备丝裂霉素类似物 2-甲基-3-正丁胺酰-1-氢-4-醌的动力学模型研究。该反应在柠檬酸缓冲溶液(pH 值为 7.0)中进行,固定化脂肪酶选择性良好,产物产率达到 98%,并建立了反应动力学模型。本文提出的 Michael 加成反应机理是:在底物与酶结合后,氧阴离子空穴使 2-甲基-1,4-苯醌的  $\alpha$   $\beta$ -不饱和羰基极化,这不仅有利于增加复合物的亲电子能力,而且有利于后续烯醇化中间体的生成。正丁胺与上述步骤的复合物反应可催化组氨酸使正丁胺去质子化,并与

极化后的苯醌进行加成反应. 本文提出了改进的有序双双与随机双双机制, 经比较最终判断该反应遵循改进的随机双双反应机制, 并确定了相关动力学模型参数. 得到的模型拟合值与实验值的平均相对偏差为 11.25%, 且偏差服从关于  $y=0$  的轴对称分布. 采用微分方程数值解与非线性优化方法, 确定了最优动力学参数. 通过内外扩散实验得到反应的最适条件: 固定化酶粒径为 0.5 mm, 搅拌转速为 200 rpm. 此时消除了内外扩散的影响, 底物浓度较低, 未见明显底物抑制, 建立的动力学模型为固定化酶固有动力学模型.

## 5 参考文献

- [1] ZHAO Min, WANG Dandan, CHE Yuan, et al. Ginsenosides synergize with mitomycin C in combating human non-small cell lung cancer by repressing Rad51-mediated DNA repair [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2018, 39: 449-458.
- [2] NITHIANANDAM V S, ERHAN S. Quinone-amine polymers: 18: a novel method for the synthesis of poly(alkyl aminoquinone)s [J]. *Polymer*, 1998, 39(17): 4095-4098.
- [3] JEFFREY M S, SAMUEL J D. Total synthesis of gypsetin-FR-900482 [J]. *American Chemical Society*, 1995, 117: 4722-4723.
- [4] PATEL V, GAJERA H, GUPTA A, et al. Synthesis of ethyl caprylate in organic media using *Candida rugosa* lipase immobilized on exfoliated graphene oxide: process parameters and reusability studies [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 95: 62-70.
- [5] BUSTO E, GOTOR-FERNÁNDEZ V, GOTOR V. Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis [J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(11): 4504-4523.
- [6] YAW C T S, MOI Y C, ENG-TONG P, et al. Kinetic study of lipase-catalyzed glycerolysis of palm olein using Lipzyme TLIM in solvent-free system [J]. *PLOS ONE*, 2018, 13(2): e0192375.
- [7] ZHANG Yuanyuan, LIU Junhong. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 54(1): 40-46.
- [8] ZHANG Yuanyuan, GAO Xin, WANG Caiyun, et al. One-pot stereoselective synthesis of chiral 1,3-oxathiolane by *Trichosporon laibacchii* lipase: Optimization by response surface methodology integrated a desirability function approach [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 133: 27-34.
- [9] ZHANG Yuanyuan, LU Peiyu, SUN Qinghua, et al. Lipase-mediated direct in situ ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone formed by a chemo-enzymatic method [J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 281: 74-80.
- [10] 刘珊珊, 刘鹏, 周玲妹, 等. 有机相中脂肪酶的催化反应及其应用 [J]. *发酵科技通讯*, 2015, 44(2): 52-56.
- [11] 马晓, 侯彬彬, 赵玮钦. 改性硅藻土固定化脂肪酶催化蓖麻油制备生物柴油 [J]. *山东化工*, 2015, 44(24): 4-6, 10.
- [12] SHUAI Weitao, Das R K, Naghdi M, et al. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2017, 64(4): 496-508.
- [13] SHELDON R A, WOODLEY J M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry [J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(2): 801-838.
- [14] 杨学昊, 张增伟. 交联剂固定化假丝酵母脂肪酶及其催化反应研究 [J]. *中国油脂*, 2014, 39(2): 45-47.
- [15] BAKR H E G M M. Diatomite: its characterization, modifications and applications [J]. *Asian Journal of Materials Science*, 2010, 2(3): 121-136.
- [16] HERNANDEZ K, FERNANDEZ-LAFYUENTE R. Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sephadex: a very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide [J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(4): 873-878.
- [17] ZHANG Yuanyuan, LIU Junhong. Purification and in situ immobilization of lipase from a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase systems [J]. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878(11): 909-912.
- [18] LIU Junhong, ZHANG Yuanyuan. Optimisation of lipase production by a mutant of *Candida antarctica* DSM-3855 using response surface methodology [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46(4): 695-701.
- [19] MARIA S, PETER C, CECILIA B, et al. Direct epoxidation in *Candida antarctica* lipase B studied by experiment and theory [J]. *ChemBioChem*, 2010, 9(15): 2443-2451.
- [20] BADGUJAR, KIRTIKUMAR C, et al. Kinetic modeling and docking study of immobilized lipase catalyzed synthesis of furfuryl acetate [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 84(10): 1-10.
- [21] RIZZI M, STYLOS P, RIEK A, et al. A kinetic study of immobilized lipase catalysing the synthesis of isoamyl acetate by transesterification in n-hexane [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(9): 709-714.
- [22] KAMBLE M P, SHINDE S D, YADAV G D. Kinetic resolution of (*R,S*)- $\alpha$ -tetralol catalyzed by crosslinked *Candida antarctica* lipase B enzyme supported on mesocellular foam: a nanoscale enzyme reactor approach [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 132: 61-66.
- [23] BADGUJAR K C, BHANAGE B M. Synthesis of geranyl acetate in non-aqueous media using immobilized *Pseudo-*

- monas cepacia* lipase on biodegradable polymer film: kinetic modelling and chain length effect study [J]. *Process Biochemistry* 2014 49( 8) : 1304-1313.
- [24] GARCÍA R , GARCÍA T , MARTÍNEZ M , et al. Kinetic modelling of the synthesis of 2-hydroxy-5-hexenyl 2-chlorobutyrate ester by an immobilised lipase [J]. *Biochemical Engineering Journal* 2000 5( 3) : 185-190.
- [25] YADAV G D , TRIVEDI A H. Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of *n*-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media [J]. *Enzyme and Microbial Technology* 2003 32( 7) : 783-789.
- [26] YADAV G D , BORKAR I V. Kinetic modeling of immobilized lipase catalysis in synthesis of *n*-butyl levulinate [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2008 , 47( 10) : 3358-3363.
- [27] SUN Jingcan , YU Bin , Philip Curran , et al. Lipase-catalysed ester synthesis in solvent-free oil system: is it esterification or transesterification [J]. *Food Chemistry* , 2013 , 141( 3) : 2828-2832.
- [28] KUPERKAR V V , LADE V G , PRAKASH A , et al. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: optimization and kinetic studies [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , 2014 , 99: 143-149.
- [29] BERKA R M , SCHNEIDER P , GOLIGHTLY E J , et al. Characterization of the gene encoding an extracellular lac-case of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 1997 , 63 ( 8) : 3151-3157.
- [30] HERTER S , MICHALIK D , MIKOLASCH A , et al. Laccase-mediated synthesis of 2-methoxy-3-methyl-5-( alkylamino) and 3-methyl-2, 5-bis( alkylamino) -[1, 4]-benzoquinones [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , 2013 90: 91-97.
- [31] HAGHBEEN K , TAN Engwui , et al. Facile synthesis of catechol azo dyes [J]. *Journal of Organic Chemistry* , 1997 , 63: 4503-4505.
- [32] NIEDERMEYER T H J , MIKOLASCH A , LALK M. Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: reaction products of *p*-hydroquinones and primary aromatic amines [J]. *Journal of Organic Chemistry* 2005 70: 2002-2008.
- [33] MIKOLASCH A , MATTHIES A , LALK M , et al. Laccase-induced C-N coupling of substituted *p*-hydroquinones with *p*-aminobenzoic acid in comparison with known chemical routes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2008 80( 3) : 389.
- [34] BADGUJAR K C , BHANAGE B M. The green metric evaluation and synthesis of diesel-blend compounds from biomass derived levulinic acid in supercritical carbon dioxide [J]. *Biomass and Bioenergy* 2016 84: 12-21.

## The Kinetic Modeling of the Enzymatic Preparation of Mitomycin Analogs

LI Kaiyuan , LIU Cui , DENG Yashan , XUE Xiao , XU Hui , WANG Fanyue \*

( Department of Pharmaceutics , College of Chemical Engineering , Qingdao University of Science and Technology , Qingdao Shandong 266042 , China)

**Abstract:** The reaction kinetic model for enzymatic preparation of mitomycin analogue 2-methyl-3-*n*-butylamino-1-hydro-4-quinone is established based on the Michael addition reaction of 2-methyl-1, 4-benzoquinone and *n*-butylamine catalyzed by immobilized *T. laibacchii* lipase. The reaction is carried out in a citric acid buffer solution ( pH = 7.0) , and the final yield reaches 98%. In this paper , the modified ordered bi-bi and random bi-bi mechanisms are proposed , and the relevant differential equations are obtained by the King-Altman method to express the instantaneous reaction rate. The kinetic model parameters are determined by the combined solution of differential equations and optimization methods , and ode45 is used to solve the differential equations and Fmincon is used to calculate the kinetic constants. The results show that the average relative deviation between the model fitted value and the experimental value is 11.25% , and the distribution is symmetrical with zero axis. When the particle size of the immobilized enzyme is 0.5 mm and the stirring speed is 200 rpm , the experimental results show that the internal and external diffusion limitations can be ignored. Therefore , it can be seen from the above that the established kinetic model is the inherent kinetic model of the immobilized enzyme.

**Key words:** immobilized lipase; kinetic modeling; Michael addition; random bi-bi mechanism; diffusion limitation

( 责任编辑: 刘显亮)