

固定化假丝酵母 1619 脂肪酶催化油酸油醇酯的合成

张 军 徐家立

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 比较了 14 种不同来源的脂肪酶催化油酸油醇酯的合成。其中,假丝酵母(*Candida* sp.) 1619 脂肪酶酯化能力最强,以硅藻土为载体,分别按 0.1% 添加椰子油、吐温 80,按 1% 添加 $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 种共固定物,酯化反应初速度提高了 1.5 倍。此固定化酶催化油酸油醇酯合成的最适温度为 30℃,0~60℃ 下反应 24h 的酯化率均在 90% 以上,100℃ 下还有 10.25% 的酯化率。最适酯化 pH6.0。反应中去水,可使终酯化率提高到 99%。在添加的 23 种有机溶剂中,以异辛烷促进酯化的效果最好,正壬烷和正己烷次之。此固定化酶在 28℃ 下批式重复反应的半衰期为 990h,柱式固定床反应器中 28℃ 连续运转 1000h 后酯化率为 78%。

关键词 脂肪酶,油酸油醇酯,酯化反应,固定化

酯蜡作为高级脂肪酸和脂肪醇酯化产生的一类酯,被广泛应用于化工、纺织、医药、日化、食品等工业中^[1,2]。其中,油酸油醇酯是一种液态的具有特殊用途的不饱和蜡,可用作高级润滑剂和高级润肤油的基料。生物体中多数酯蜡含量少,难于收集^[3]。用化学法合成酯蜡通常需在高温高压及强酸条件下进行,副反应多,产物分离难,生产成本高,且随着脂肪酸和脂肪醇碳链的加长,反应难度加大^[4]。近十几年来,随着对脂肪酶功能多样性^[5]研究的不断深入,利用其水解反应的逆反应——酯化反应,可较方便地制备出一系列不同理化性质的酯蜡产品,弥补了化学法合成的不足。有机相中酶法合成酯蜡是一项很有前途的新工艺^[6]。

目前,国内外在脂肪酶合成酯蜡的酶源^[7]、酶的固定化^[3]、反应条件^[8]、连续化制备^[9]等方面已做了一些研究。1991 年,Unichema International 公司已以“Bioester”的商品名上市了系列酶法合成的酯产品^[10]。本文报道了脂肪酶的固定化及酯化特性的一些研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 脂肪酶:本实验室制备及购于美国 Sigma 公司。

1.1.2 试剂:油醇为日本和光制药工业株式会社出品,其它试剂均购于美国 Sigma 公司和北京化工厂。

1.1.3 摇床:控温旋转式,美国 New Brunswick Scientific 公司出品, G-24 型。

1.2 方法

1.2.1 粗酶制备:发酵液离心(3 000r/min)后,上清液在 0~4℃ 下用 4 倍冷丙酮沉淀,室温下干燥,即得酶的丙酮干粉。

1.2.2 水解活力测定和酶活力单位定义:采用乳化系统⁽¹¹⁾,由 5ml 含 25% 橄榄油的聚乙烯醇(聚合度 2400~2500)溶液(2%)制备的乳化剂,4ml 0.1mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)、1ml 酶液组成,37℃ 反应 10min 后,加入 15ml 95% 乙醇中止反应,以酚酞作指示剂,用 0.05mol/L NaOH 溶液滴定。在测定条件下,每分钟释放出 1 μ g 分子脂肪酸的酶量定义为 1 脂肪酶活力单位(u)。

1.2.3 酯化反应系统和酯化率的计算:100ml 带塞锥形瓶中按等摩尔比加入 0.5g 油酸、0.475g 油醇及 5ml 正己烷组成基本反应系统,30℃ 振荡(250r/min) 10min 后,加入脂肪酶反应,以 10ml 1:1 丙酮乙醇混合液中止反应,酚酞作指示剂,用 0.2mol/L KOH 溶液滴定,以反应后脂肪酸的减少量计算酯化率。

1.2.4 脂肪酶的固定化:定量的载体与共固定物搅拌混合后,烘干,然后按每克载体加 0.5ml 酶液的比例上酶,混匀后,40℃ 干燥 24h。

1.2.5 固定化脂肪酶的批式反应:100ml 带塞锥形瓶中,按等摩尔比加入 1.5g 油酸、1.425g 油醇和 0.5g 固定化酶(3000u),28℃ 下反应 22h,倒出反应液,用 4ml 正己烷分二次洗涤固定化酶。洗涤液与反应液合并后,用 0.2mol/L KOH 滴定测酯化率。再将留有固定化酶的锥形瓶敞口 40℃ 放置 1h 后,加入同样数量底物,继续下一次反应。

1.2.6 固定化脂肪酶的柱式反应:在长 150mm、直径 10mm 的柱中填装 8g (48 000u) 固定化酶(床高 90mm),将油酸、油醇按等摩尔比混合均匀,从柱顶部注入柱内,28℃ 下反应,平均流速 1.2ml/h。

2 实验结果

2.1 不同脂肪酶对酯化的影响

在酯化基本反应系统中分别加入相同酶量的不同脂肪酶,反应 0.5h 后测酯化率,结果见表 1。从表中看出,在比较的 14 种脂肪酶中,以假丝酵母 1619 脂肪酶的酯化反应速度最快,故选用它作为进一步研究的材料。

表 1 不同脂肪酶对酯化的影响

Table 1 Effects of different lipases on esterification

Source	Relative activity/%	Source	Relative activity/%
<i>Rhizopus acidus</i> R7	62.7	<i>Penicillium cyclopium</i> PC43	37.2
<i>Rhizopus formosaensis</i> R101	37.2	<i>Geotrichum</i> sp. G28	36.8
<i>Rhizopus delemar</i> R65	46.5	<i>Geotrichum</i> sp. G135	23.3
<i>Rhizopus arrhizus</i> R80	34.8	<i>Trichosporium</i> sp. T85	26.6
<i>Rhizopus chlamydosporus</i> -R90	40.9	<i>Candida</i> sp. 1619	100.0
<i>Rhizopus</i> sp. R175	24.5	* <i>Candida cylindracea</i>	41.3
<i>Penicillium</i> sp. PG3	41.5	* <i>Porcine pancreatic</i>	60.0

Reaction system: Oleic acid 0.5g, oleyl alcohol 0.475g, *n*-hexane 5ml, lipase 480u, 37℃, shaken for 0.5h,

* From Sigma Co.

2.2 不同固定化载体对酯化的影响

分别用不同载体固定化假丝酵母(*Candida* sp.) 1619 脂肪酶,测其 0.5h 及 24h 酯化率。其中,无机载体包括硅藻土、石英砂、硅胶 G、活性氧化铝、碳酸钙、活性炭、皂

土;有机载体包括琼脂粉、明胶、大豆蛋白和酸型、碱型及吸附型离子交换树脂等,共 18 种。比较结果发现,硅藻土是较好的载体,固定后的脂肪酶酯化反应速度快,酯化率较高。而在同等条件下,吸附型树脂 DX-1 和皂土的相对酯化速度为硅藻土的 50% 和 12.6%。

2.3 固定化酶量对酯化的影响

以硅藻土为载体,分别固定不同量的酶,在酯化基本反应系统中测酯化率。结果发现,当 1g 硅藻土固定 12 000u 以下的脂肪酶时,酶量与酯化率呈线性关系。以下实验中每克固定化酶含 6000u 脂肪酶。

2.4 共固定物对固定化酶的影响

分别比较了 30 种表面活性剂、25 种天然及合成酯蜡、18 种脂肪酸、14 种脂肪醇和 20 种金属离子等近百种共固定物及不同添加浓度对酯化反应的影响。其中,在添加的 30 种表面活性剂中,Tween 类、Span 类及卵磷脂等有不同程度的促进酶催化的作用,其中以 Tween80 的促进效果最好;而 Brij 类、甲基硅油、Triton X-100 等对反应有不良影响。将不同酯类与酶共固定,测其酯化率发现,天然油脂的添加对酯化有正效果,其中,固定化酶中添加橄榄油及椰子油(按硅藻土重量的 0.1% 添加)后,使酯化率提高了 83% 和 77%。合成酯类也有促进作用。

脂肪酸、脂肪醇和不同金属离子作共固定物,对固定化酶活力有不同的影响。从比较的共固定物中挑出对酯化有促进作用的物质,再进行不同组合和浓度的比较,结果发现以先添加硅藻土重量的 0.1% 的椰子油和 Tween80 及 1% $MgSO_4$ 三种共固定物后,再固定酶,效果较好。在基本反应系统中,0.5h 酯化率由不加共固定物的 18% 提高到 45%,反应速度提高 1.5 倍。

2.5 温度对酯化的影响

不同温度对酯化和水解的影响见图 1。从图中可见,0~100℃ 以下均可发生酯化反应,最适酯化温度 30℃;而最适水解温度为 35℃,60℃ 时已基本不发生水解。

2.6 pH 对酯化的影响

利用硅藻土对 pH 的记忆效应^[12],制成不同 pH 值的固定化酶,测酯化率,结果如图 2。从图中可见酯化反应最适 pH 为 6.0。

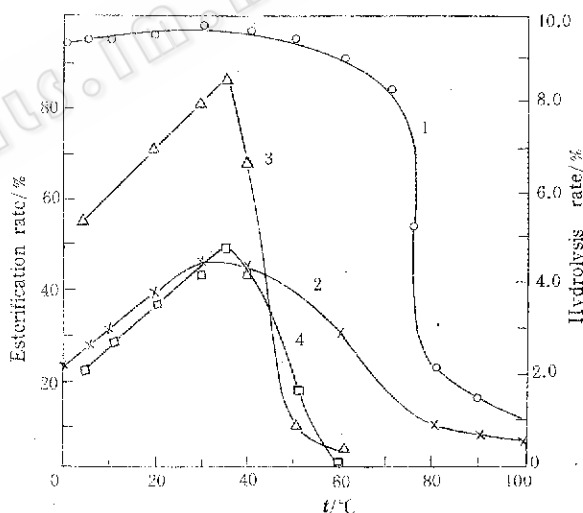


图 1 温度对酯化和水解的影响

Fig. 1 Effects of temperature on esterification and hydrolysis

Reaction systems:

Esterification: oleic acid 0.5g, oleyl alcohol 0.475g, *n*-hexane 5ml, immobilized lipase 0.08g (480u), shaken for 0.5h and 24 h. Hydrolysis, oleyl oleate 1g, phosphate buffer (0.1 mol/L, pH8.0) 5ml, immobilized lipase 0.08g (480u), shaken for 0.5h and 24h.

Esterification rate for (1) 24h (2) 0.5h.

Hydrolysis rate for (3) 24h (4) 0.5h.

2.7 有机溶剂对酯化的影响

在基本反应液中以等体积的不同种类的有机溶剂代替正己烷参与酯化反应, 结果见图 3。从图 3 中可见, 异辛烷促进酯化的效果最好, 正壬烷、正己烷次之。从实用考虑, 实验中选用正己烷。

2.8 底物摩尔比对酯化的影响

在酯化反应系统中, 变化底物的摩尔比后, 测酯化率, 结果发现, 油酸和油醇摩尔比在 1:0.2~4 之间对酯化率无明显影响, 其中, 以 1:1 为宜。

2.9 水量对酯化的影响

在酯化反应已达平衡的体系中 (反应 8h, 酯化率 92%) 加入吸水剂 (分子筛凝胶 Sephadex G-25 1g), 继续反应 32h, 终酯化率上升至 99%; 而加入 24ml 水后, 继续反应 32h, 酯化率则下降到 85%。如图 4 所示。可见, 水影响酯化率并调节酯化和水解反应平衡。

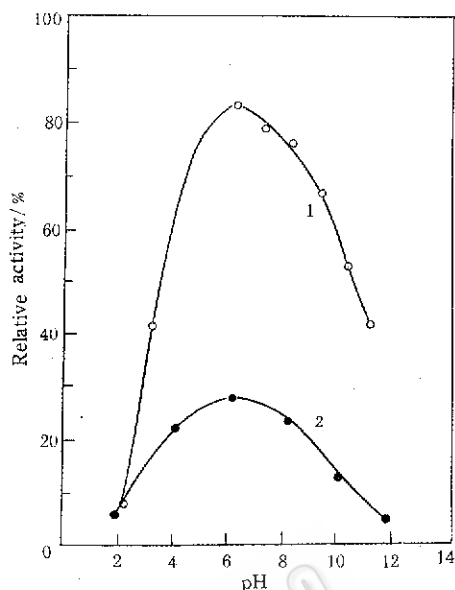


图 2 pH 对酯化的影响

Fig. 2 Effects of pH on esterification
Reaction system: oleic acid 0.5g, oleyl alcohol 0.475g, n-hexane 5ml, immobilized lipase 0.08g (480u) shaken for 0.5h and 24h. Esterification rate for (1) 24h (2) 0.5h.

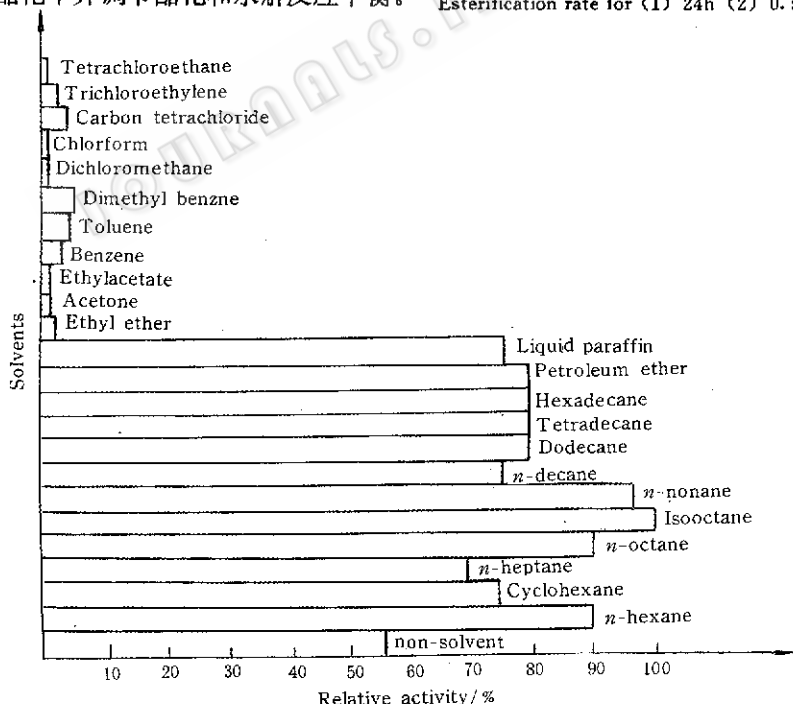


图 3 有机溶剂对酯化的影响

Fig. 3 Effects of organic solvents on esterification

Reaction system: oleic acid 0.5g, oleyl alcohol 0.475g, organic solvent 5ml, immobilized lipase 0.08g (480u), shaken at 30°C for 0.5h.

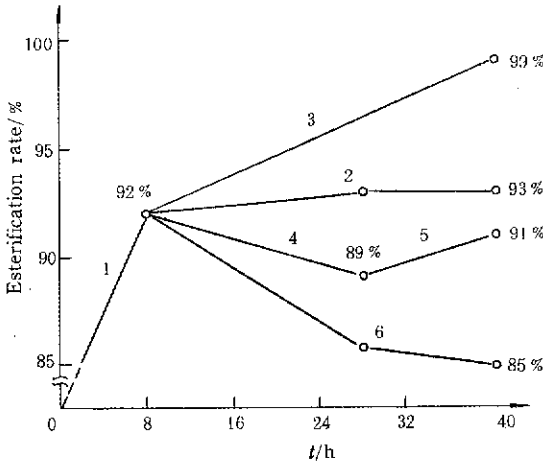


图 4 水量对酯化的影响

Fig. 4 Effects of water amount on esterification
Reaction system; oleic acid 0.5g, oleyl alcohol 0.475g,
n-hexane 5ml, immobilized lipase 0.08g
(480u), 30°C.

- (1) Pre-reaction time 8h. (2) Reaction 32h.
(3) Added 1g Sephadex G-25, reaction 32h.
(4) Added 8ml water, reaction 20h.
(5) Added 1g Sephadex G-25, reaction 12h.
(6) Added 24 ml water, reaction 32 h.

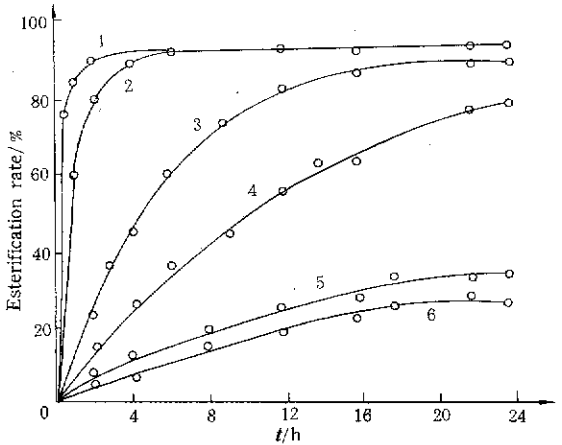


图 5 酯化反应时间进程

Fig. 5 Time courses of esterification

Reaction system; oleic acid 0.5g, oleyl alcohol
0.475g, *n*-hexane 5ml, 30°C, immobilized
lipase/u; (1) 2880 (2) 480 (3) 200 (4) 100
(5) 50 (6) 25.

2.10 酯化反应进程

以油酸油醇作底物的酯化反应进程见图 5。从图 5 可见，加大酶量可以缩短反应到达平衡的时间。

2.11 固定化酶批式及柱式反应

固定化酶在 28°C 下，批式反应 45 批 (22h 一批) 后，酯化率从 92% 降到 45.8%，测得此固定化酶的半衰期为 990h。在柱式固定床反应器中，连续运转 1000h 后，酯化率降到 78%，相对酯化率为 83%。见图 6。

3 讨 论

实验中发现，固定化脂肪酶催化酯化反应受温度的影响较不明显。在 0~60°C 终酯化率均在 90% 以上，在 100°C 还显示活力；而在催化水解反应时，60°C 就几乎不发生反应了 (图 1)。

能在较高温度下反应，使反应温度范围扩大是脂肪酶在有机相中催化逆反应-酯化反应的

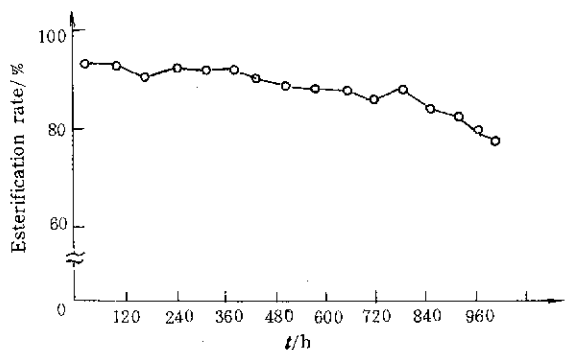


图 6 柱式反应器中连续化反应

Fig. 6 Esterification in continuous-flow column reactor
Reaction system; Equal molar mixture of oleic acid and oleyl alcohol, immobilized lipase 8g (48 000u) column 150 × 10mm, bed height 90mm, flow rate 1, 2ml/h. 28°C.

特色之一。这可能是在几乎无水的有机相中,酶的热变性不易发生,于是就表现出良好的热稳定性。

在研究 pH 对酯化有影响时,我们还采用了将 0.1mol/L 不同 pH 的磷酸缓冲液 0.2ml 加入酯化反应系统中测酯化率的方法,发现结果与利用载体的记忆效应制备不同 pH 固定化酶所得的趋势一致。

我们发现酯化反应系统中,有机溶剂的量在不大于底物量的 10 倍体积时对酯化影响不大,但有机溶剂的种类却对酯化有影响。烷烃类的疏水溶剂对反应有较好的促进效果,加入后降低了底物粘稠度,使固态底物溶解,使反应可在室温,甚至更低温度下进行。但在室温下呈液体的长链脂肪酸和长链脂肪醇组成的系统中,如本实验中的油酸油醇酯的合成,有机溶剂的加入不影响终酯化率,但可提高反应速度。

Klibanov 等^[13]指出,与化学反应相似,去除酯化反应中产生的水,可使反应向有利于酯生成的方向进行。吸水剂、减压、干燥气体通过反应器上部等^[14]都是有效的脱水措施,我们在实验中发现,脱水是使酯化率进一步提高的关键措施,反应中加入分子筛吸水,可使终酯化率由 92% 提高到 99%。

在批式反应中,每批反应结束后,我们在倒出反应液,用正己烷洗涤之后,于 40℃ 敞口放置 1h,这样不仅可以脱去有机溶剂,还可以去除部分反应中产生的水,使水不致积累过多。在连续柱式反应中,我们发现柱中流出的反应液微浊,放置后变得澄清,且下部有小水珠出现,可见,柱式反应中产生的一部分水分会随反应液流出,另一部分仍残存于柱床中,这也许是酯化率逐渐下降的原因之一。

酶经固定化后,酯化率明显高于游离酶,固定化酶可以反复使用,简化了产物的分离,且制备出的固定化酶稳定性良好。在实验中,我们发现,柱式反应器中固定化酶在连续反应了 1000h 后,继续浸在底物中 28℃ 下保存了 15 个月(即 450d)经正己烷充分洗涤后,还保留有 41% 的酯化率。

从我们的初步研究看出,酶法合成酯蜡具有底物投料浓度高,酯化率高,催化稳定性好,节能(室温反应),节省设备费用,反应条件温和(近中性 pH 值,常压),有向连续化生产工艺发展的前景等优点,是可发展成替代或补充化学合成法的新工艺。

参 考 文 献

- [1] Nawar W W. Food Chemistry, New York, Marcel Dekker, 1985, 139~244.
- [2] Razafindralambo H, Blecker C, Lognay G *et al.*, Biotechnology Letters, 1994, 16; 247~250.
- [3] Kolattukudy P E. The Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes, Amsterdam, Elsevier, 1975, 53~65.
- [4] Scott B, Adlercreutz P, Mattiasson B. Enzyme Microb. Technol., 1992, 14; 546~552.
- [5] Malcata F X, Reyes H R, Garcia H *et al.* Enzyme Microb. Technol., 1992, 14; 426~446.
- [6] Frank W W, Williams R. Enzyme Microb Tehnol, 1990, 12; 743~748.
- [7] Thomas V, Kieslich K, Erdmann H. Enzyme Microb Technol, 1992, 14; 631~639.
- [8] Mustranta A, Forssell P, Poutanen K. Enzyme Microb Technol, 1993, 15; 133~139.
- [9] Giorgio C, Gainer J L, Gibson M E. Enzyme Microb Technol, 1992, 14; 904~911.
- [10] Fredrik B Godtfedsen S E, Kirk O, TIBTECH, 1991, 9; 360~363.
- [11] 山田浩一, 町田晴夫. 日本芸化学会志, 1962, 36; 858.
- [12] Steyler D C. Enzyme Microb Technol, 1991, 13; 221.
- [13] Zaks A, Klibanov A M. Science, 1984, 224; 1249~1251.

[14] Gerlach D, Schreier P. Biocatalysis, 1989, 2: 257~263.

Oleyl Oleate Synthesis by Immobilized Lipase from *Candida* sp. 1619

Zhang Jun Xu Jiali

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing, 100080)

Abstract The effects of 14 different lipases on oleyl oleate synthesis were compared. The lipase from *Candida* sp. 1619 had the highest esterification activity. The lipase was immobilized by adsorbing it on celite when 0.1% coconut oil, Tween 80 and 1% MgSO_4 were added as co-immobilizing agents. The initial esterification velocity of the immobilized lipase was 1.5 times faster than the one without co-immobilized agents added. The optimum temperature for oleyl oleate synthesis was 30°C. The final esterification rates were over 90% while the reaction temperature ranged from 0~60°C. It attained 10.25% esterification activity even at 100°C. The optimum pH for esterification was 6.0. By means of dehydration, the final esterification rate reached 99%. Among 23 kinds of organic solvents added, hydrophobic alkanes promoted esterification, especially isooctane, *n*-nonane and *n*-hexane. In batch reaction, half lives of the immobilized lipase was 990 hours at 28°C. The esterification rate remained 78% after running in continuous flow column reactor at 28°C for 1000 hours.

Key words Lipase, oleyl oleate, esterification, immobilization