

# 在无溶剂系统中固定化脂肪酶合成聚乙二醇<sub>400</sub>月桂酸酯

寇秀芬 徐家立

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 在无溶剂反应系统中,研究了固定化假丝酵母(*Candida* sp.)-1619 脂肪酶催化合成聚乙二醇<sub>400</sub>(PEG<sub>400</sub>)月桂酸酯的酯化条件。在反应过程中不断脱水和使用月桂酸的量高于化学计量值的方法,使酯化率明显提高。分批补加 PEG<sub>400</sub>使产量进一步增加。在 5.0mmol 月桂酸,2.5mmol PEG<sub>400</sub>,20mg 固定化脂肪酶(200u),0.2ml 水组成的反应体系中,40℃,锥形瓶敞口振荡反应 48h,酯化率达 91%;在负压条件下反应,酯化率达 98.9%;反应体系中月桂酸的量增加到 6.0mmol 时,PEG<sub>400</sub>完全被酯化。用己烷提取产物的收率为 95%,通过薄层色谱鉴定酯化产物为双酯。

**关键词** 无溶剂系统,固定化酶,酯化,聚乙二醇<sub>400</sub>月桂酸酯

前文报道了固定化假丝酵母(*Candida* sp.)-1619 脂肪酶在有机溶剂中合成 PEG 脂肪酸酯反应条件的研究<sup>[1]</sup>。实验中发现,在不添加溶剂时,PEG<sub>400</sub>和月桂酸也能反应,并有 39.3%的酯化率。影响酯化程度的重要因素是水量和底物的摩尔比。Ergarn 等人<sup>[2]</sup>和 Casimir<sup>[3]</sup>在用脂肪酶合成甘油酯的研究中,采用抽真空,将试管口敞开使反应生成的水自然挥发以及加入分子筛、用干空气鼓泡等方法脱去反应生成的水,以打破反应平衡,都取得了提高反应速度和酯化程度的良好效果。本文报道无溶剂系统中,月桂酸与 PEG<sub>400</sub>酯化条件优化的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂:** PEG<sub>400</sub>, 月桂酸, 己烷等为北京化工厂产品。假丝酵母(*Candida* sp.)-1619 脂肪酶,为本实验室制备,每 g 干粉 190000u<sup>[4]</sup>。

**1.1.2 仪器:** 振荡器为 G<sub>24</sub> Enviromental incubator shaker, 美国 New brunswick scientific Co. Inc 产品,反应所用的转速为 150r/min。

### 1.2 方法

**1.2.1 固定化脂肪酶:** 以涤棉布为载体,吸附法制备<sup>[4]</sup>。取 10g 载体,先用 10ml 内含 0.01g 椰子油和 0.01g 吐温 80 的己烷溶液处理,取出气干后,将其浸泡在 10ml 酶液(10000μ/ml)中,充分浸润后取出,在 40℃干燥 12h 后备用。

**1.2.2 PEG<sub>400</sub> 月桂酸酯的合成:** 100ml 锥形瓶中,加入 5.0mmol 月桂酸,2.5mmol PEG<sub>400</sub>,20mg 固定化脂肪酶(200u)和 0.2ml 水,40℃振荡反应。

本文于 1996 年 5 月 15 日收到。

**1.2.3 减压下酯化反应:** 在 100ml 抽滤瓶中进行反应, 用真空泵使反应瓶中保持  $2.66 \times 10^4$  Pa 的真空度, 40℃ 振荡反应。

**1.2.4 酯化率的测定:** 按前文报道的方法<sup>[4]</sup>, 以反应系统中脂肪酸减少的量计算出酯化率。

**1.2.5 产物的提取:** 称取 10g 反应液, 加入 10ml 乙醇, 30ml 己烷, 以酚酞为指示剂用 5mol/L NaOH 中和反应液中剩余的酸, 分层后分离出上层提取液, 下层再加 30ml 己烷提取, 这样连续提取 5 次, 合并 5 次己烷提取液, 在 60℃ 水浴中减压去掉己烷, 得白色膏状产物, 称重并算出产物收率。

**1.2.6 反应产物薄层色谱:** 样品的乙醇溶液 (10mg/ml) 50 $\mu$ l 点样于硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层色谱板上 (10cm $\times$ 10cm)。第一次用体积比为氯仿: 甲醇: 水 = 60: 10: 1 的溶剂系统上行展开到 2.2cm 处, 取出板干燥后, 第二次用己烷: 乙醚: 乙酸 = 70: 70: 1 的溶液系统展开到 7.5cm 处, 取出的板干燥后, 喷 2.0% 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 乙醇溶液, 在 105℃ 下烤 5min 显色<sup>[5]</sup>。

## 2 实验结果

### 2.1 水量对酯化反应的影响

反应开始之前, 在反应体系中添加不同量的水后, 锥形瓶敞口振荡反应, 测定反应 4h, 8h, 22h 的酯化率, 结果见图 1。由图 1 可见, 反应开始时向反应体系中添加 0.2ml 的水有助于酯化反应, 反应 22h 酯化率可达 82%, 随外加水量的增加酯化率下降。但是, 外加水量达 3ml 时, 反应 22h 酯化率仍然可以达到 70%, 高于未添加水的酯化程度 (55%)。这个结果, 明显地不同于在有机溶剂中外加水量对酯化反应的影响结果。而当反应体系中添加 0.2ml 的水时, 锥形瓶加塞后振荡反应 22h, 酯化率为 51%。可见在无溶剂系统中, 水量也是影响酯化反应的重要调控参数。

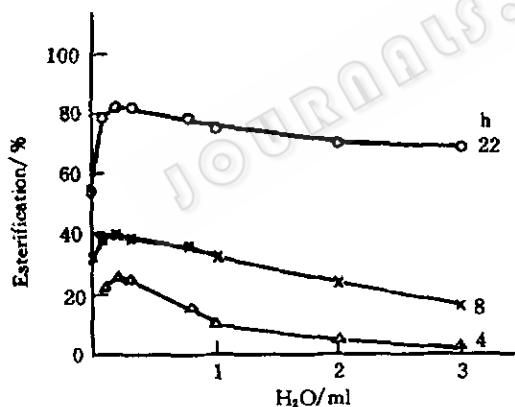


图 1 水量对酯反应的影响

Fig. 1 Effect of added water amount on esterification  
Reaction system: 5.0 mmol lauric acid, 2.5 mmol PEG<sub>400</sub>, 10mg immobilized lipase (200u), Amount of adding water: 0.1 to 3.0 ml, shaken at 40℃ in 100 ml conical flask without plug.

### 2.2 水对反应平衡的影响

在 2.1 的实验基础上, 进一步考察水量变动对酯化反应的影响。在密闭反应 24h, 酯化反应达平衡后 (延长反应时间酯化程度几乎不变), 又用几种不同方式改变反应平衡: 1. 用真空泵使瓶中保持  $2.66 \times 10^4$  Pa 的真空度, 再继续反应 12h, 酯化率达 91%, 24h 后酯化率达 98.9% (图 2 曲线 1); 2. 反应瓶敞口再继续反应

24h 酯化率达 91% (图 2 曲线 2); 3. 原反应条件下继续反应 24h, 酯化率仍维持 51% (曲线 3); 4. 向反应体系中添加 2ml 水, 反应 6h 后, 酯化率由 51% 下降到 30%, 再延长反应时间, 酯化程度未见提高。可见, 反应过程中不断去掉生成的水打破反应平衡, 酯化率显

著提高。

### 2.3 底物摩尔比对酯化反应的影响

在基础反应体系中,把月桂酸和 PEG<sub>400</sub> 的总重量定为 2.0g,改变它们的摩尔比,在 40℃、45℃、50℃ 下进行酯化反应。结果见图 3。从图 3 可见,反应体系中,无论是 PEG<sub>400</sub> 还是月桂酸过量时,都有利于酯化反应,在 40℃、45℃ 下,酸过量更有利于酯化反应。

### 2.4 补加 PEG<sub>400</sub> 提高产量

由图 3 可以看出当反应体系中酸过量,40℃ 下进行反应时,体系中的 PEG<sub>400</sub> 几乎完全被酯化。利用这一反应特点,将反应体系中的月桂酸和 PEG<sub>400</sub> 的摩尔比定为 4:1,待反应物中的 PEG<sub>400</sub> 完全酯化后,再补加 PEG<sub>400</sub>,使反应物中残余的酸和补后的醇的摩尔比再调节到 4:1 后继续反应。在含 40mmol 月桂酸,10mmol PEG<sub>400</sub> 的反应体系中,锥形瓶敞口反应 16h 后,PEG<sub>400</sub> 完全被酯化。经过 4 次补加 PEG<sub>400</sub>,反应 40h 后,反应物中积累的产物由补醇前的 7.64g 增加到 13.9g(图 4)。在反应前将相同量的 PEG<sub>400</sub> 一次投入,反应 48h,只能合成 10.2g 产物。采用分批加入 PEG<sub>400</sub>,不仅可以缩短反应时间,而且可以提高产量。

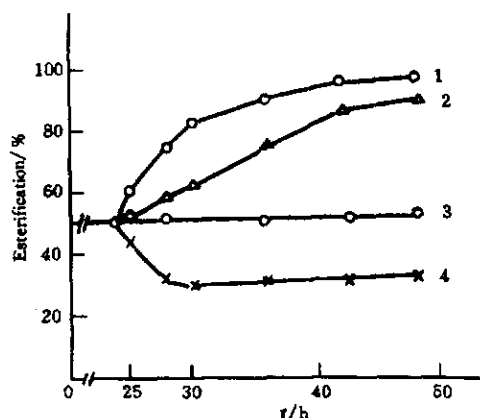


图 2 水对反应平衡的影响

Fig. 2 Effect of water on the reaction equilibrium

Base reaction system:

The reaction equilibrium was broken through different means: 1. Vacuum, 2. Flask kept open, 3. Control, 4. Water added

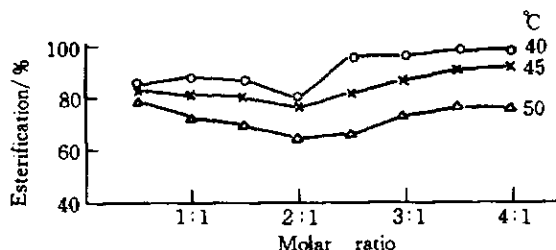


图 3 底物摩尔比对酯化反应的影响

Fig. 3 Effect of molar ratio of substrate on esterification

Reaction system: 200u immobilized lipase (20mg), 0.2ml water, total weight of substrates: 2g, shaken at 40℃, 45℃ and 50℃, respectively for 22h

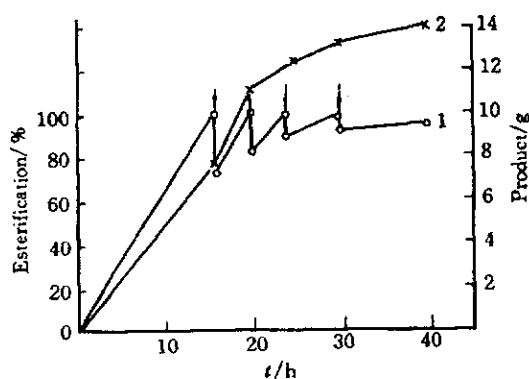


图 4 流加 PEG<sub>400</sub> 对产物的影响

Fig. 4 Effect of fed-batch feeding of PEG<sub>400</sub> on product

1. Esterification degree, 2. Product, ↓ Feeding of PEG<sub>400</sub>

## 2.5 产物的提取和分析

**2.5.1 产物的提取:** 按方法中描述的步骤用己烷分 5 次提取产物。以第 3 批为例, 每次提取的收率为: 第一次 53.1%, 第二次 27.3%, 第三次 11.6%, 第四次 2.9%, 第五次不到 0.8%, 提取的总收率达 95.7%。几批酯化程度不同的反应液提取产物的结果列于表 1, 由表 1 可见, 提取总收率为 93%~97%。

表 1 产物的提取

Table 1 Extract of product

Batch	Reactant		Product		
	Sample/g	Esterification/%	Calculated/g	Obtained/g	Recovery/%
1	10	81.3	7.65	7.15	93.5
2	10	81.3	7.65	7.21	94.2
3	10	91.0	8.55	8.18	95.7
4	10	91.0	8.55	8.25	96.4
5	10	100	7.52	7.39	97.4

\* Molar ratio of lauric acid to PEG<sub>400</sub>: batch 1 to 4 was 2:1 batch 5 2.4:1 batch 5 is 2.4:1

**2.5.2 产物分析:** 取月桂酸与 PEG<sub>400</sub> 摩尔比为 2.4:1, 反应 16h, 有 77% 的 PEG<sub>400</sub> 已被酯化的反应液样品, 经薄层色谱分析(图 5), 产物双酯,  $R_f$  值为 0.51。

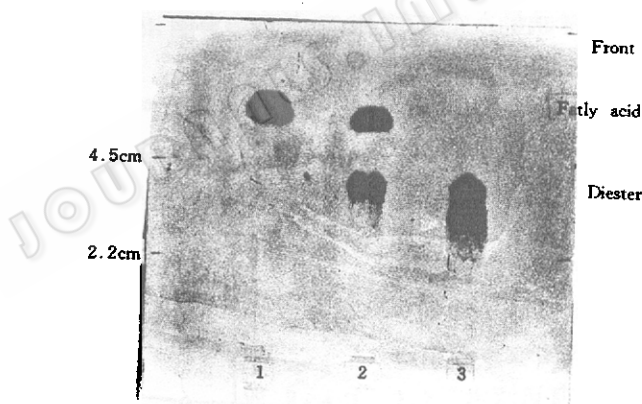


图 5 反应物的薄层色谱

Fig.5 Thin layer chromatogram of product

1. Reaction 0h, 2. Reaction 16h, 3. Product

Development system: a. Chloroform: Methanol: Water (60:10:1),

b. Hexane: Diethyl ether: Acetic acid (70:30:1), Visualization by 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## 3 讨 论

在无溶剂反应系统中, 通过负压环境中使容器敞口反应的条件下, 打破反应平衡, 使酯化率提高到 91%~98%, 这与文献报道的结果相似<sup>[3]</sup>。另一方面, 在酸过量时, 采用分批补加 PEG<sub>400</sub> 进一步缩短了反应时间, 提高了产物量, 而且简化了产物的分离和精制。

在本研究的基础上, 如综合优化的酯化条件, 例如, 增加酶量<sup>[1]</sup>, 负压条件下反应, 分

批补加 PEG<sub>400</sub> 等措施,还可以进一步缩短反应时间并有望实现连续化或半连续化更大规模的制备和生产。有关产物中单双酯比例的调控,高效固定化酶运转稳定性等的研究见下报。

### 参 考 文 献

- [1]寇秀芬,徐家立,生物工程学报,1996,12(增刊):150~155.
- [2]Ergan F, Trani M, Andre G. Biotechnol Bioeng, 1990, 35:195~200.
- [3]Casimir C. Biotechnology Letters, 1993, 15(9):949~945.
- [4]张 军,徐家立. 生物工程学报,1995,11(4):325~331.
- [5]Amelie Ducret, Andre Giroux, Michael Trani *et al.* Biotechnol and Bioeng, 1995, 48:214~221.

## Polyethylene Glycol<sub>400</sub> Laurate Synthesized by Immobilized Lipase in a Solvent-free System

Kou Xiufen Xu Jiali

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** Conditions for the esterification of polyethylene glycol<sub>400</sub> (PEG<sub>400</sub>) with lauric acid by immobilized lipase from *Candida* sp. -1619 in a solvent-free system were investigated. The esterification degree was increased greatly through dehydrating during the reaction and the amount of lauric acid added was more than that of the stoichiometric ones and the yield of product was further improved by fed-batch feeding of PEG<sub>400</sub>. In the reaction system that composed of 5.0 mmol lauric acid, 2.5 mmol PEG<sub>400</sub>, 20mg immobilized lipase(200u), 0.2 ml water, at 40℃ shaken for 48h in 100 ml conical flask without plug, the esterification degree of 91% was obtained, when a vacuum was applied to the vessel during the reaction, the esterification degree of 98.9% was reached. When the amount of lauric acid used was increased to 60 mmol, the PEG<sub>400</sub> in reaction system was completely esterified. The recovery yield of product was 95% by hexane extracting and the esterified product was identified as diester by means of TLC.

**Key words** PEG<sub>400</sub>laurate, immobilized lipase, solvent-free system, esterification