

非水介质中脂肪酶催化亚油酸油醇酯合成的研究*

宋 欣* 曲音波

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要: 利用实验室自制及购买的几种脂肪酶制剂催化的酯化反应来制备亚油酸油醇酯,其中本实验室制备的丝孢酵母脂肪酶酯化效果最好,作为进一步研究的实验用酶。以正己烷为反应溶剂,在微水系统对影响亚油酸油醇酯合成的各种因素进行了研究,确定酯化反应合成的最适温度为 35℃,0~100℃反应 10h 的酯化率均可达到 90%,最适酯化 pH 为 8.0,最适底物浓度为 0.25mol/L,最适水含量为 0.05%,在选用的 11 种有机溶剂中,以环己烷的酯化率最高,二甲亚砜最低。

关键词: 酯蜡,脂肪酶,酯化反应,微水系统

中图分类号: Q815 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0195-04

STUDIES ON LIPASES-CATALYZED OLEYL LINOLEATE SYNTHESIS IN NONAQUEOUS MEDIA

SONG Xin QU Yin-Bo

(State key laboratory of microbial technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract: The effects of several lipases of different sources on oleyl linoleate synthesis were compared. The strain producing lipase of highest activity was screened by our laboratory. Several factors which influenced oleyl linoleate synthesis was studied. The optimum temperature for esterification was 35℃ and the esterification reaction could proceed at temperature range of 4~80℃, the optimum pH was 8.0, optimum substrate concentration was 0.25mol/L. Among 11 kinds of organic solvents compared, the esterification rate in cyclohexane was ten times higher than that in dimethylsulfoxide.

Key words: Oleyl linoleate, Lipase, Esterification reaction, Microaqueous system

脂肪酶(EC3.1.1.3)在非水体系中能够催化合成脂肪族、芳香族和其他多种多样的酯类。当脂肪酶在非水介质中催化酯化反应和转酯反应时,表现出 pH 记忆功能^[1,2],酶活性增强,酶的热稳定性增强^[3,4],其活性还受到水活性的影响^[5,6]。这些反应中的大多数都是以链较长的脂肪酸为底物的。其中一类反应是高级脂肪酸和脂肪醇合成酯蜡的酯化反应,合成的酯蜡用途广泛,可以用在化工、纺织、医药、日化、食品等工业中,亚油酸油醇酯是长链不饱和的亚油酸

和油醇形成的具有特殊用途的一种酯蜡,可用作高级润滑剂和高级润肤油的原料。利用传统的化学法合成酯蜡,需要在高温高压及强酸条件下进行反应,副反应多,产物的分离纯化困难,生产成本低,且对于长链脂肪酸和醇的反应难度增大。利用脂肪酶水解反应的逆反应—酯化反应合成酯蜡的方法,具有反应条件温和,产

*华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室开放课题

收稿日期:1999-01-04,修回日期:1999-04-12

物的分离纯化容易等优点,能够弥补化学法的不足,因此从八十年代开始,已经合成了许多具有不同特性的酯蜡,成为一个极有发展前景的研究领域^[7~10]。

目前,国内外对亚油酸油醇酯和亚麻酸油醇酯(另文发表)的合成未见报道,本文以一株酯化活性较高的丝孢酵母脂肪酶为材料,对影响亚油酸油醇酯合成的诸多因素进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 脂肪酶:本实验室制备,无锡酶制剂厂赠送及购于美国 Sigma Co.。

1.1.2 试剂:所有试剂均为上海试剂二厂生产,分析纯。

1.2 方法

1.2.1 粗酶制备:发酵液离心(5000r/min) 20min后,清液用硫酸铵反抽提法沉淀,经 DEAE 纤维素离子交换柱层析,冷冻干燥后即得到纯化了不同倍数的酶干粉。

1.2.2 酯化反应系统和酯化率:100mL 带塞锥形瓶中加入一定量的亚油酸及油醇,使之溶于 8mL 正己烷中,形成等摩尔比反应底物,并加入不同来源但酶活单位相同(100u)的几种脂肪酶,组成基本反应系统,一定温度下振荡反应,一定时间后以 15mL 丙酮:乙醇 = 1:1 (v/v) 的混合液来中止反应,加入几滴酚酞作为指示剂,用氢氧化钠的甲醇溶液进行滴定,根据脂肪酸的减少量来计算酯化率。

2 结果与讨论

2.1 不同脂肪酶对酯化反应的影响

在酯化基本反应系统中分别加入相同酶活单位(200u)的不同脂肪酶,并分别在反应 1h、10h 时测定酯化率,结果见表 1。从表中可以看出,所比较的 10 种脂肪酶,在 1h 时, Y-11 菌株脂肪酶的酯化速度最快,圆柱状假丝酵母也较快,反应 10h 后,以假丝酵母和 Y-11 脂肪酶的酯化率最高,均在 90% 以上。因此选择本实验室经筛选和诱变得到的 Y-11 脂肪酶作为进一

步实验用材料。

表1 不同脂肪酶对酯化的影响

脂肪酶来源	粗酶活力 (u/g prot.)	酯化率(%)	
		1h	10h
丝孢酵母 Y-1	960	30.2	40.6
丝孢酵母 Y-11	1500	70.6	93.5
酵母 S ₉	700	36.3	47.5
酵母 S ₁₁	850	40.2	50.3
霉菌 J ₈₋₂	1080	19.6	29.8
霉菌 M ₂	950	60.5	75.3
*圆柱状假丝酵母 (CCL)	10,000	68.7	94.3
**猪胰(PPL)	60,000	55.1	85.2

*无锡酶制剂厂赠送,**购于美国 Sigma Co.,其它酶制剂为本实验室制备

2.2 不同底物浓度对酯化的影响

采用不同浓度的亚油酸和油醇,组成基本反应系统,在每一种情况下,亚油酸和油醇均为等摩尔浓度,最大酯化率随底物浓度的变化情况见图 1。从图中看出,在底物浓度为 0.25 mol/L 时,酯化率最大。

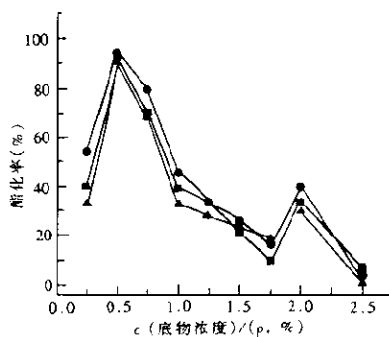


图1 底物浓度对酯化反应的影响

—■— 油酸, —●— 亚油酸, —▲— 亚麻酸

2.3 不同溶剂对酯化反应的影响

酯化反应在 11 种有代表性的溶剂中进行,以研究不同的溶剂系统对酯化反应的影响,结果见表 2。以往有许多文献报道,酶的催化活性与溶剂的疏水性的大小(其大小可用疏水性参数 lgP 来表示)有很大关系。在疏水性较强(lgP 高)的溶剂中比在亲水性较强的溶剂(lgP 低)中的催化活性高。一些学者认为,在非水介质中,只有维持一定的活性构象,酶才能发挥催化作

用,这就要求酶分子表面始终存在一层必需水。疏水性有机溶剂不会夺去这层必需水,因而酶分子可以正常地行使其催化功能,而亲水性溶剂较易夺去酶分子表面的这层必需水而使酶分子处于刚性的非活性状态,因而使酶的催化活性降低。本实验所用的 11 种有机溶剂,从表 2 可以看出,二甲亚砜(dimethylsulfoxide DMSF)的 lgP 最低,而异辛烷的 lgP 最高,酶在 DMSF 中的催化活性仅是在异辛烷中的十分之一左右,与前人的研究结果相吻合^[12,13]。

表2 不同有机溶剂对酯化的影响

所用溶剂	疏水性常数lgP	相对活力(%)
异辛烷	4.5	100
正庚烷	4.0	97.1
正己烷	3.5	95.7
环己烷	3.2	98.3
甲 苯	2.5	85.2
苯	2.0	75.1
吡 啶	0.71	56.8
四氢呋喃	0.49	46.5
二甲基甲酰胺	-1.0	12.7
二氧六环	-1.1	11.5
二甲亚砜	-1.3	10.2

2.4 不同反应温度对酯化的影响

以环己烷为反应溶剂,底物浓度为 0.25 mol/L,在不同的温度下进行酯化反应,24h 后测定酯化率的大小。

从实验结果可以看出,亚油酸油醇酯的酯化可以在 0℃~100℃ 的温度范围内进行,在 100℃ 时仍有 10% 的酯化活性,在 35℃ 下的酯化率最高。

2.5 不同 pH 对酯化反应的影响

将 0.02mol / L 的不同 pH 的磷酸缓冲液 0.2mL 加入到基本反应系统中,测定不同 pH 对酯化反应的影响。结果表明酯化反应的最适作用 pH 为 8.0,与 Y-11 脂肪酶水解活性较高的 pH 一致,这意味着脂肪酶的酯化活性和水解活性之间可能存在着一定的联系,脂肪酶在缓冲液中的表面离子状态可以在有机溶剂中维持,而不同的 pH 缓冲液中,酶表面的解离状态不同,所以在有机溶剂中,酶的活性就不同。脂肪酶在有机相中的反应受 pH 的影响极大。

2.6 水含量对酯化反应的影响

往基本反应体系中分别加入不同体积的最适 pH 的缓冲液,测定水含量对酯化率的影响。结果表明在水含量为 0.05% 时,达到最大反应速率 0.19μmol/min · mg。为了进一步研究水分对酶的酯化活性的影响,在反应前加入过量的分子筛,除去反应体系中的全部水分,结果酯化率极低,仅为 1.5%,这个结果说明,少量的水对于酶维持活性是必需的。另外在 10h 的酯化反应过程中,每隔 2h 向反应体系中加入适量的分子筛,以及及时除去酯化反应生成的水分,结果酯化率达到 99.2%,极大地提高了酯化活性,这表明过量的水分影响了反应平衡向酯化方向移动。

3 讨论

我们利用实验室经诱变筛选得到的丝孢酵母 Y-11 脂肪酶催化有机相中亚油酸与油醇的酯化反应,10h 后酯化率可达到 93.5%,及时除去反应过程中生成的水分,可使酯化反应接近完全,酯化率达到 99.2%。底物的浓度、所用溶剂的种类、反应温度、pH 值、水分的含量多少都是影响反应的重要因素。脂肪酶在有机相中的作用温度范围在 0~100℃,热稳定性增强,这说明由于水含量极低,脂肪酶的构象不易向活性低的方向转化。疏水反应模型可以很好地解释脂肪酶在非水介质中的大多数反应,而本研究中环己烷的 lgP < 4,以它为介质的酯化反应活性却很高,这其中的机制还需要进一步深入的研究。

从以上的研究可以看出,本实验室筛选诱变得到的丝孢酵母 Y-11 脂肪酶可以较好地催化合成亚油酸油醇酯,且反应条件温和(中温偏碱性 pH、常温常压),与其他类似反应相比,具有短时间内酯化效率就可以达到很高的水平(1h 70.6%,10h 93.5%),可以减少生产成本,因而具有良好的工业应用前景。

参 考 文 献

[1] Zaks A, Klibnov A M. Proc Natl Acad Sci U.S.A, 1985, 82:3192~3196.
[2] Zaks A, Klibnov A M. J Biol Chem., 1988, 263: 3194~3201.

- [3] Zaks A, Klibnov A M. Science, 1985, **224**:1249~1251.
- [4] Ahern T J, Klibnov A M. Science, 1985, **225**:1280~1284.
- [5] Gilles B, Yamazaki H, Armstrong D W. In: Biotechnol Lett, 1987, **9**:709~714.
- [6] Goderis H L, Ampe G, Feyten M P *et al.* Biotech Bioeng, 1987, **30**:258~266.
- [7] Razafindralambo H, Blecker C, Lognay G *et al.* Biotechnol Lett, 1994, **16**:247~250.
- [8] Scott B, Adlercreutz P, Mattiasson B. Enzyme Microb Technol., 1992, **14**:546~552.
- [9] Malcata F X, Reyes H R, Garcia H *et al.* Enzyme Microb Technol., 1992, **14**:426~446.
- [10] Frank W M, Williams R. Enzyme Microb Technol., 1990, **12**:743~748.
- [11] 张军, 徐家立. 生物工程学报, 1995, **11**(4): 325~331.
- [12] Yang B, Kuo S J, Hariyadi P *et al.* Enzyme Microb Technol., 1994, **16**:577.
- [13] Valivety R H, Johnston G A, Suckling C J *et al.* Biotech Bioeng., 1991, **38**:1137.