

无溶剂体系中固定化脂肪酶催化的酯交换反应研究^{*}

马 林, 徐 迪, 古练权

(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 采用癸酸乙酯与己醇的酯交换作为模型反应, 研究了两种固定化脂肪酶在异丙醚溶液和无溶剂体系中的催化行为。考察了水活度 (水含量)、反应时间、搅拌以及底物摩尔比等因素对酯交换反应的影响, 并对无溶剂体系固定化脂肪酶催化反应的机制进行了初步探讨。结果表明, 在无溶剂体系中, 固定化脂肪酶的活力显著提高, 反应转化率达到 90% 以上。

关键词: 固定化脂肪酶; 无溶剂反应; 酯交换反应

中图分类号: Q643.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 05-0039-05

在非水介质中, 脂肪酶的催化反应在医药、食品以及化工领域的应用潜力极大的吸引了人们的注意, 使脂肪酶成为有机合成中重要的生物催化剂, 广泛应用于油脂、食品、香料、化妆品、医药、农药等有机合成领域中^[1]。随着脂肪酶催化反应体系从水溶液到水互溶有机溶液、水-有机溶剂两相反应体系、低水有机溶剂、反向胶束体系研究的深入发展, 人们也开始探索其它反应体系中脂肪酶催化反应的可能性, 如超临界流体反应体系, 气相反应体系以及无溶剂反应体系^[2-9]。虽然无溶剂酶催化有机合成具有许多优点, 如反应速度快、生产能力高、节省溶剂、无污染等, 但相对于有机溶剂中酶催化反应的研究来讲, 有关无溶剂体系中影响因素的研究报道较少。我们在研究水活度对有机溶液中固定化脂肪酶催化性质的影响过程中, 使用的固定化脂肪酶是直接吸附在聚丙烯 EP-100 上^[9], 这种合成高分子聚丙烯 EP-100 在非水介质酶催化反应中是一种广泛使用的固定化载体, 它具有吸附酶量大, 在有机介质中分散性能好, 酶催化效率高的特点。由于采用聚丙烯粉 EP-100 固定化酶的单位重量体积较大, 如果在无溶剂体系中进行反应, 不能进行搅拌。

为了探索无溶剂体系中固定化酶催化的反应性质, 我们主要研究了固定化 *Rhizopus arrhizus* 脂肪酶和 *Candida rugosa* 脂肪酶在异丙醚溶液和无溶剂体系中的催化行为, 并对两种体系中酶催化反应速度和转化率进行了比较, 初步提出了无溶剂体系酶催化反应机制。

1 材料与方法

1.1 材 料

Rhizopus arrhizus 脂肪酶 (标准酶活力 80 000) 购自 Gist Brocades S A 公司; *Candida rugosa* 脂肪酶购自 Sigam chemicals (St. Louis, USA)。

正癸酸、正癸酸乙酯、月桂酸乙酯、异丙醚、己醇、甲苯及各种分析纯盐 LiBr, LiCl, MgCl₂, Mg(NO₃)₂, NaCl, K₂SO₄, KCl 均来自 Merck 公司; 聚丙烯粉 EP-100 (200~400 μm) 购自 Akzo 公司。

1.2 方 法

1.2.1 酶的固定化^[6] 将 1 g 聚丙烯粉 (EP-100) 与 3 mL 乙醇混合。脂肪酶酶粉 (*Rhizopus arrhizus* 脂肪酶 0.3~0.5 g, *Candida rugosa* 脂肪酶 1 g) 溶解在 20 mL 磷酸钠缓冲液 (20 mmol/L, pH 6.0) 中, 离心 (4 000 r/min) 除去不溶的固体物质, 然后将脂肪酶酶液与聚丙烯粉混合, 在室温振荡培养 24 h。过滤、用水洗涤, 然后加入 1 mL pH 7.0, 20 mmol/L 的磷酸钠缓冲液, 在 0.1 Pa 下真空抽干过夜。

1.2.2 异丙醚中酶催化的酯交换反应 将分别含有 50 mmol/L 癸酸乙酯和 50 mmol/L 己醇的异丙醚溶液 (4 mL), 聚丙烯吸附的脂肪酶干粉 (*Rhizopus arrhizus* 脂肪酶 10 mg, *Candida rugosa* 脂肪酶 20 mg) 的开口小瓶, 放置在装有饱和盐水溶液的密封瓶内, 25 °C 平衡 16~24 h, 然后将底物溶液与固定化酶混合封口, 25 °C, 175 r/min。振荡开始反应。间隔一定时间, 用微量注射器取出 50 μL 样品, 甲

* 收稿日期: 2003-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20074042)

作者简介: 马林 (1959 年生), 男, 博士, 教授; E-mail: cedc43@zsu.edu.cn

苯 450 μL 稀释, 经岛津气相色谱分析, 计算出酯交换反应和酯水解反应速度或新酯的产率。

1.2.3 无溶剂体系中固定化酶催化的酯交换反应 将含有聚丙烯吸附的脂肪酶干粉 10 mg 的开口小瓶, 加入不同量的 pH 7.0, 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲液。取 200 μmol 癸酸乙酯(47.2 μL) 和 200 μmol 己醇(25 μL) 与固定化酶混合, 用不锈钢钢勺研磨 1~2 min, 使固定化酶与底物充分混合, 放置在不同温度反应一定时间, 然后加入 2 mL 异丙醚将反应混合物溶解, 取出 25 μL 样品经岛津气相色谱分析。

1.2.4 气相色谱分析 癸酸乙酯、癸酸和癸酸己酯直接通过气相色谱进行分析, 采用岛津气相色谱仪(GC9AM), 装有 GP 10% SP-216PS 100/120 Supelcoport 玻璃柱 (ID: 2.6 mm, 长 2.1 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA), 酯交换反应和酯合成反应的底物和产物的分离使用氮气作为载体气, 在 145 $^{\circ}\text{C}$ 运行 6 min, 然后以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至 175 $^{\circ}\text{C}$ 。继续运行 4~6 min。根据癸酸乙酯、月桂酸乙酯标准曲线的峰面积比例计算出产物癸酸己酯峰面积与癸酸乙酯的比例, 再利用癸酸的标准曲线, 计算各种物质的含量。

2 结果与讨论

2.1 水活度对异丙醚溶液中固定化酶催化活力的影响

有机介质中酶催化的反应的研究已经表明反应体系必须有一些水的存在才能表现出最好的酶催化活性^[7]。虽然水的含量相对有机溶剂的量是极少的, 但是由于反应体系中这些微量水的存在, 脂肪酶催化的酯交换反应同时仍然有水解反应发生。这样, 酯交换反应, 酯合成反应和酯水解反应将同时存在于反应体系中。在反应的某一阶段, 整个反应体系将处于一个平衡。水的含量不但影响酯交换反应的速度 R_s , 同时也影响水解反应的速度 R_h , 这种影响同反应体系中底物(醇)的浓度以及水的浓度有关。

图 1 为水活度对 2 种固定化脂肪酶在异丙醚中催化癸酸乙酯与己醇酯交换反应速度的影响。

图 1 表明, 水活度对两种固定化酶催化酯交换反应速度的影响具有不同的行为, 其中固定化 *Candida rugosa* 脂肪酶在 $a_w = 0.33$ 时表现出最大的酯合成反应速度(0.788 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 高水含量反应速度反而降低; 但酯水解反应速度则随着水活度的增高而增加。固定化 *Rhizopus arrizus* 脂肪酶则

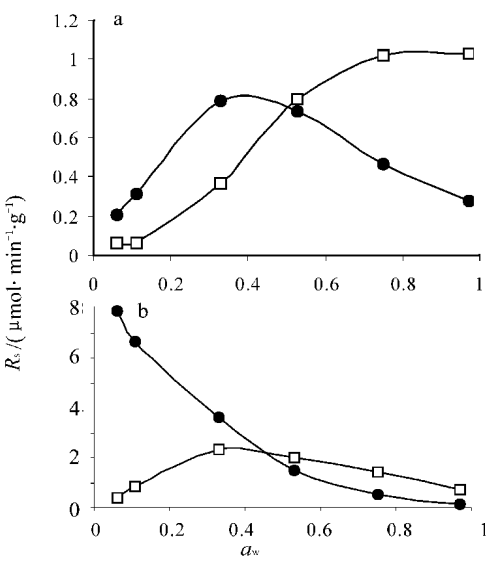


图 1 水活度对固定化 *Candida* 脂肪酶(a)和 *Rhizopus* (b)脂肪酶催化酯交换反应速度的影响

Fig 1 Effect of water activity on the rate of transesterification catalyzed by immobilized *Candida* lipase (a) and *Rhizopus* lipase (b)

—●— Rate of estenification; —□— Rate of ester hydrolation

在低水活度, 即 $a_w = 0.06$ 时表现出酯合成最大反应速度。实际上在水活度为 0 时, 其反应速度最快, 达到 11.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 固定化酶。酯水解活性则随水活度增大, 然后随之下降, 在 $a_w = 0.33$ 时表现出最大值。

2.2 反应时间对异丙醚中固定化脂肪酶催化酯交换反应转化率的影响

从应用角度看脂肪酶催化的酯交换反应, 人们希望反应具有较快的酯合成反应速度, 较小的水解反应速度, 同时还希望反应具有较高的转化率。图 2 表明了 in 最佳水活度条件下, 反应时间对反应转化率的影响。

从图 2 可以看出, 2 种固定化脂肪酶催化的酯交换反应达到反应平衡时, 转化率仅达到 45% 左右, 反应时间长达 3~8 d, 酶催化效率较低。

2.3 水含量无溶剂体系固定化脂肪酶催化的酯交换反应的影响

为了考察水含量对 2 种固定化酶催化酯交换反应速度的影响, 采用直接加水方式进行了研究。结果见图 3。

图 3 (a) 表明通过直接加水方式, 固定化 *Candida rugosa* 脂肪酶催化酯交换反应的速度在加水量 3.6~18 μL 范围内变化不大, 3 h 反应的转化率达到 15% 左右, 在加水量 14.4 μL 时具有最大转化率。

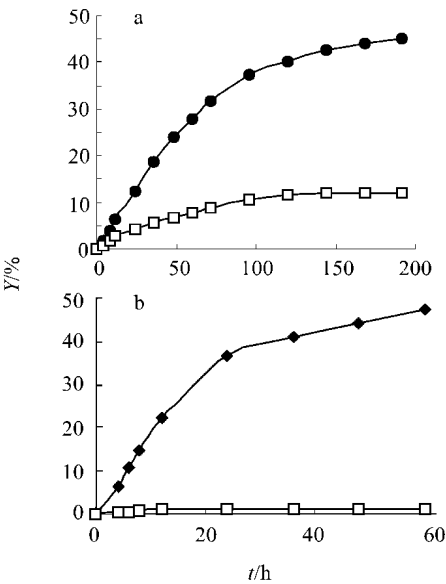


图2 反应时间对固定化 *Candida* 脂肪酶(a) 和 *Rhizopus* (b) 脂肪酶催化酯交换反应产率的影响

Fig.2 Effect of the reaction time on the transesterification catalyzed by immobilized *Candida* lipase (a) and *Rhizopus* lipase (b) 50 mmol/L substrates in diisopropyl ether, $a_w=0.33$ —●—: yield of new ester; —□—: yield of acid

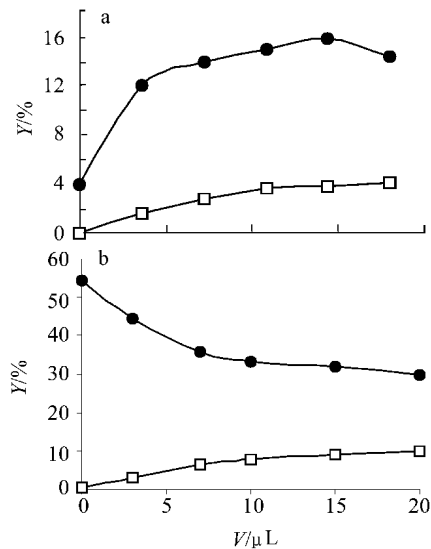


图3 无溶剂体系中加水量对固定化 *Candida* 脂肪酶(a) *Rhizopus* 脂肪酶(b) 催化酯交换反应的影响

Fig.3 Effect of the amount of water added on the solvent free transesterification catalyzed by immobilized *Candida* lipase (a) and *Rhizopus* lipase (b) 10 mg of immobilized lipase and 50 mmol/L substrates mixed with pH 7.0, 0.05 mol/L of phosphate buffer for 3 h at 25 $^{\circ}$ C —●— yield of new ester; —□— yield of acid

图3(b)可以看出, 在无溶剂体系中, 固定化 *Rhizopus* 脂肪酶催化酯交换反应在不加水的情况下

(仍然含有微量的水), 其反应速度较快, 3 h 反应转化率已经达到 50% 以上。随着加入的水量增加, 酯合成的反应速度下降, 但水解反应速度增加。对于固定化 *Candida* 脂肪酶在加水量 14.4 μ L 时, 按 3 h 计算反应速度, 为 17.58 μ mol $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ g $^{-1}$, 与在异丙醚中反应相比 ($a_w=0.33$, 0.788 μ mol $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ g $^{-1}$), 其反应速度提高了 20 多倍; 而固定化 *Rhizopus* 脂肪酶在无溶剂中不加水情况下, 反应 3 h 的速度为 60.62 μ mol $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ g $^{-1}$, 比在水活度 0 时的反应速度 (11.2 μ mol $\cdot$ min $^{-1}$) 提高 5 倍以上。

2.4 反应时间对固定化脂肪酶催化无溶剂反应转化率的影响

对于一个化学反应来说, 转化率的高低、反应时间的长短, 决定了该反应能否在工业生产中应用。图 4 表明了反应时间对两种固定化酶催化酯交换反应转化率的影响。

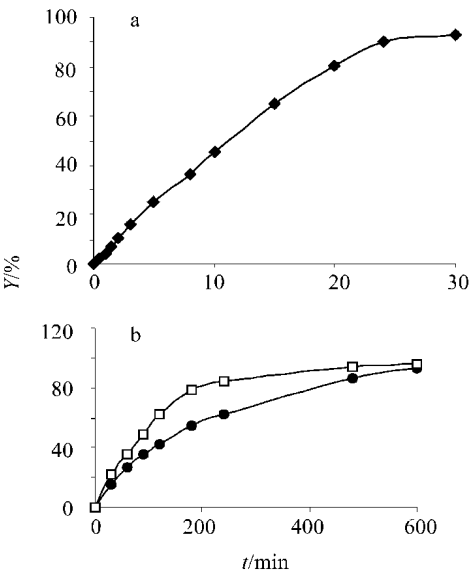


图4 反应时间对固定化 *Candida* 脂肪酶 (a) 和 *Rhizopus* (b) 脂肪酶催化无溶剂反应转化率的影响
Fig.4 Effect of the reaction time on the solvent free transesterification catalyzed by immobilized *Candida* lipase (a) and *Rhizopus* lipase (b) 200 μ mol of substrates, 14.4 μ L of pH 7.0, 0.05 mol/L of phosphate buffer at 25 $^{\circ}$ C

图 4 的结果可以看出, 当反应的底物摩尔数不变, 使用的固定化脂肪酶量不变时, 在无溶剂体系中, 两种固定化脂肪酶不但催化反应速度较快, 而且反应转化率较高, 在较短时间内达到 90% 以上。其中固定化 *Candida rugosa* 脂肪酶催化的无溶剂体系的转化率与在异丙醚中反应比较, 反应时间由 7 d 减少到 24 h, 固定化 *Rhizopus arrizus* 脂肪酶, 催化的反应由 2 d 减少到 8 h, 收率均由 45% 左右提高到 90% 以上。可以看出在无溶剂体系中进行酶

催化反应, 反应速度不但加快, 其生产能力也大大提高, 更有利于工业化生产。

2.5 底物摩尔比对固定化酶催化无溶剂酯交换反应的影响

为了进一步考察脂肪酶在无溶剂体系中的催化能力, 我们研究了两种底物的摩尔比例对酶催化反应速度的影响。由于其中任何一种底物摩尔数的增加, 反应体系出现明显的液相, 当采取放置不动的反应方式时, 反应 3 h 的转化率没有明显提高, 而且随着其中一种底物浓度的增加反而呈现底物抑制现象。这是因为由于反应体系中液体相的形成使上面的底物只能通过扩散才能与酶接触, 从而影响转化率的提高。当采用磁力搅拌方式进行反应时, 同放置不动反应相比, 反应体积较小时, 如癸酸乙酯与己醇 (200 μmol) 的摩尔比为 1 和 1.5 时, 搅拌对反应效果没有影响, 但当两种底物的摩尔比继续增大, 通过搅拌, 反应的产物收率则有所提高, 在摩尔比达到 3 时, 反应 3 h 的产物量可以达到 174 μmol , 相对己醇的转化率为 87%。但随着己醇摩尔数的增加, 反应速度或反应转化率下降, 己醇对脂肪酶的抑制作用增强。其原因可能是由于反应体系没有溶剂, 只是两种底物形成的液体相, 己醇的浓度相当之高, 因此对该酶的抑制作用也明显增强。

2.6 无溶剂体系中固定化酶的催化机制讨论

我们认为, 在无溶剂体系中脂肪酶催化的酯交换反应速度比有机溶剂中快, 转化率高的原因不仅仅是底物浓度在酶分子周围较高, 很可能与底物分子在酶分子、固定化载体表面的排列、分布等有关。在无溶剂体系中, 底物分子周围没有溶剂, 混合后的两种底物分子应该呈均匀的排列状态。在实验条件下, 加入了比底物摩尔数高数倍的水, 这些水分子可以在酶分子表面可形成一个水分子层, 或者在固定化载体表面形成一个水分子层。由于底物分子中的羟基或酯基具有一定是极性, 有可能有序地分布排列在酶分子的表面或固定化载体的表面。而由于脂肪酶所催化的底物大多在反应温度呈液体状态, 从而在酶分子表面的水分子层上又形成一底物分子层, 这种水分子层和底物分子层的形成有利于底物分子流动。在实验中, 我们没有采用通常在溶液反应体系中常用的搅拌或振荡方法来增加底物与酶的接触, 因此底物分子与酶分子的结合、产物分子从酶活性中心的离去完全依靠化合物的自身运动 (图 5)。

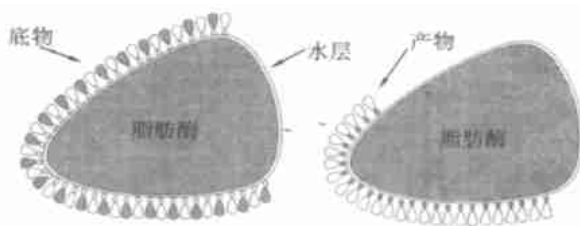


图 5 无溶剂体系脂肪酶催化反应的理想模型

Fig 5 Model of the solvent-free transesterification catalyzed by immobilized lipase

但当底物分子过多时, 必然造成底物分子在酶分子、载体表面的多层排列, 从而影响产物的离去和底物分子进入。因此, 在理想的无溶剂催化反应中, 两种底物分子适量比例、均匀地分布、单分子层排列在每个酶分子、载体周围, 这样在没有搅拌的情况下, 酶可以以最大反应速度催化反应完成。

从整个无溶剂脂肪酶催化的酯交换的研究结果可以看出, 在无溶剂反应体系中, 脂肪酶催化反应过程简便易行, 反应速度快, 催化效率高, 而且降低了溶剂对酶分子的变性作用。我们相信随着无溶剂体系中酶催化反应研究的深入, 酶催化的无溶剂反应将更有利于工业生产, 必将为酶促有机合成研究带来新的动力。

参考文献:

- [1] SCCHMID R D, VERGER R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications[J]. *Angew Chem Int*, 1998, 37: 1608—1633.
- [2] HAILING P J. Biocatalysis in low water media: understanding effects of reaction conditions[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, 4: 74—80.
- [3] JÜRGEN O Metzger. Solvent-free organic syntheses[J]. *Angew Chem Int*, 1998, 37(21): 2975—2978.
- [4] CHATTERJEE T, BHATTACHARYYA D K. Synthesis of terpene ester by an immobilized lipase in a solvent-free system[J]. *Biotechnol Lett*, 1998, 20(9): 856—858.
- [5] KARRA-CHAABOUNI M, PULVIN S, TOURAUD D, et al. Enzymic synthesis of geraniol ester in a solvent-free system by lipase[J]. *Biotechnol Lett*, 1996, 18(9): 1083—1088.
- [6] GITLESEN T, BAUER M, ADLERCREUTZ P. Adsorption of lipase on polypropylenepowder[J]. *Bio Chim Biophys Acta*, 1997, 1345: 188—196.
- [7] ZAKS A, KILBANOV A M. The effect of water on enzyme action in organic media[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263: 8017—8021.

Research on Solvent free Transesterification Catalyzed
by Immobilized Lipase

MA Lin, XU Di, GU Lian quan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Using transesterification of ethyl decanoate with hexanol as model, the transesterification catalyzed by two immobilized lipase in diisopropyl ether and solvent free system was studied. Effects of water activity or amount of added water, reaction time and stirring on the transesterification were investigated, and the mechanism catalyzed by immobilized lipase in solvent free systems was explained. The results showed that the activity of immobilized lipase in solvent free system increased remarkably, the yield higher than 90% was achieved.

Key words: immobilized lipase; solvent free reaction; transesterification

。简 讯。

中山大学学科建设再上台阶

在 2003 年全国第 9 次学位授权审核中, 中山大学新增博士、硕士学位授权一级学科 6 个, 新增博士学位授权点 9 个; 自行审批硕士学位授权点 18 个。通过此次学位授权审核, 中山大学的学科体系更加完善, 结构更为合理。目前, 中山大学共有博士、硕士学位授权一级学科 17 个, 博士学位授予权覆盖 137 个学科专业, 硕士学位授予权覆盖 196 个学科专业。一级学科授权数名列全国第 9 位, 博士学位授权点列全国第 5 位。

(本刊通讯员)