

固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶催化酯化 脂肪酸低碳醇酯反应条件的研究

邓利 刘柳 董贤 谭天伟

(北京化工大学生物化工系北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029)

摘要:以硅藻土和纺织品为载体,采用吸附法制备固定化脂肪酶,研究了固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶在有机溶剂中催化脂肪酸低碳醇酯化合成过程中,有机溶剂性质、脂肪酸与低碳醇的结构、pH 值、反应温度和体系含水量、低碳醇的抑制作用等因素对酯化过程的影响。试验结果表明:底物低碳醇需要采用流加方式加入体系,石油醚是最适宜的有机溶剂,脂肪酸与醇的碳链越长,越易于酯化;固定化脂肪酶对直链醇的选择性优于支链醇。以石油醚为有机溶剂,在反应温度为 40℃、pH 值为 7 时,硬脂酸与甲醇的酯化率达 95%;反应后期应除去体系中的水以避免酶失活。固定化酶间歇催化油酸与甲醇的酯化时,重复使用 15 次(每次 24 h),其操作半衰期约为 360 h。

关键词:固定化;脂肪酶;酯化;脂肪酸低碳醇酯

中图分类号:TQ225.24

文献标识码:A

Study on esterification reaction of fatty acids short chain ester by immobilized lipase from *Candida sp.* 99-125

DENG Li, LIU Liu, DONG Xian, TAN Tian-wei

(Beijing Key Laboratory of Bioprocess, Department of Biochemical Engineering,
Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Immobilized lipase from *Candida sp.* 99-125 was prepared by using diatomite or textile as supporter. Effects of various factors on esterification of fatty acids and short chain alcohol in solvent were studied, including properties of solvent, structure and the chain length of fatty acids and alcohol, pH, temperature, amount of water and enzyme, inhibition of short chain alcohol on enzymatic reaction. Results show that: short chain alcohol must be added by fed-batch, and the best solvent is petroleum ether; the longer carbon chain of fatty acid and alcohol is, the easier esterification can be; selectivity of lipase from straight chain alcohol is better than from branch chain alcohol. 95% of esterification yield can be achieved at 40℃ under pH = 7. Riddance of water from the system should be done at the approaching end of reaction to prevent lipase from losing its activity. The immobilization lipase can be reused by 15 times (each time for 4 h), and half-life of immobilized lipase for esterification process can be about 360 h.

Key words: immobilization; lipase; esterification; fatty acid short chain ester

脂肪酸低碳醇酯是指长链脂肪酸(碳链长度 12~22)与低碳醇(甲醇、乙醇、丙醇、丁醇)组成的脂肪酸酯,可以通过酯化或酯交换二种方法获得。它们是重要的工业添加剂和表面活性剂,也可作替代能源,是一种可生物降解、空气污染物排放低的可再生的“生物柴油”,可使汽车尾气中的颗粒物降低 80%,CO₂ 排放量降低 70%,并且无硫化物和铅的排

放^[1]。其通常生产方法为脂肪酸和醇在高温(150~200℃)和强酸或强碱催化剂作用下合成的,该方法能耗高,分离提取难,产品质量差,污染严重。近年来人们开始利用脂肪酶催化合成短链酯^[2~7],短链酯酶法合成主要用酶为毛霉脂肪酶,但毛霉脂肪酶发酵水平较低。以前研究中多数对象是长链或中等链长的脂肪酸和长链或中等长度的脂肪醇的酯化反

收稿日期:2002-07-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20176002)

作者简介:邓利,男,1971年生,在职博士生,讲师;谭天伟,男,1964年生,博士,教授,博导,主要从事生化工程酶工程方面的研究。

应条件,但长链脂肪酸和短链醇的酯化合成过程却有所不同。笔者对酶法酯化合成生物柴油(脂肪酸甲酯、乙酯、丙酯和丁酯)的过程进行了初步研究,研究了温度、pH值、含水量、底物作用、溶剂作用等参数对酯化合成转化率的影响。

1 实验部分

1.1 实验材料和仪器

油酸(化学纯)、硬脂酸、棕榈酸、甲醇、乙醇、丙醇、丁醇,北京化学试剂公司;假丝酵母 99-125 脂肪酶,实验室自行发酵。

摇床,哈尔滨东联电子公司;电子天平,赛多利斯公司;磁力搅拌器。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化脂肪酶

以硅藻土、纺织品为载体,吸附法制备。取 10 ml 含 10 mg 椰子油、10 mg 吐温 80 的己烷溶液与 3.3 ml 质量浓度 30 g/L 的 $MgSO_4$ 溶液,搅拌制成乳浊液。与 10.00 g 硅藻土或纺织品混合,干燥。加入 10.00 g 缓冲溶液,干燥后称出 8.57 g。与 10 ml 酶液(含 1.43 g 酶粉)混合,室温放置直至干燥。固定化酶的表现酶活力是理论酶活力的 80% 以上。

1.2.2 酯化合成脂肪酸甲酯

基本反应体系:50 ml 具塞锥形瓶中加入 1.68 g 油酸和 5 ml 溶剂,0.084 g 固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶,然后在反应过程中分 2 次加入 0.24 ml 的甲醇,反应初期加入为 0.12 ml 的甲醇,在 10 h 时加入另一半甲醇 0.12 ml,同时加入吸水剂硅胶,然后在 40℃ 密闭振荡,总反应时间 24 h。改变不同的反应条件(温度、酶量、底物浓度等)重复实验。

1.2.3 酯化率的测定

反应结束时在体系中加入酶抑制剂,然后滴加酸碱指示剂,用 NaOH 滴定反应体系内酯化所减少的油酸的量,计算酯化率。

2 实验结果与讨论

2.1 温度对酶反应的影响

脂肪酶来源不同,最适温度也各不相同,大多数脂肪酶最佳温度范围介于 30 ~ 37℃,固定化以后,对酶的构象有一定稳定作用,最适温度会发生变化,使酶能在更高的温度下使用。温度的提高对于催化过程是有利的。最适温度为 35 ~ 45℃,温度低于 35℃ 时,随着温度的升高,反应速度加快,酯化率增加。但当温度超过 45℃ 时,随着温度的升高,酯化

率反而下降。这主要是由于当温度高于最适温度时,酶开始部分失活,温度越高,酶失活越快,酯化率下降就越多。这正显示出生物催化剂不同于一般化学催化剂的特性,即在较温和的环境中(40℃),固定化酶可获得最佳活力。

2.2 底物浓度及溶剂的影响

底物浓度的不同影响着酯化反应的速度,也影响酯化率的高低。实验结果表明,最佳底物浓度是 0.85 mol/L。浓度过高,底物与酶接触的界面面积减少,同时还存在底物的抑制作用,导致反应速度降低,酯化率低;底物浓度过低,反应速度低,符合反应过程的基本规律。

有机溶剂作为酶催化反应的介质,对酶的活性和稳定性等性能有很大的影响,因此选择合适的有机溶剂是酶催化反应的关键之一。笔者试验了无溶剂、正戊烷、环己烷、己烷、庚烷、异辛烷、石油醚等 7 种体系下,油酸和甲醇酯化反应以及油酸和丁醇酯化反应的过程。由表 1 可见,在其他条件均相同的前提下,油酸和甲醇及丁醇的酯化反应中,酯化率与溶剂的疏水性的大小次序基本上是一致的。这一结果进一步证实,溶剂的疏水性影响酶的活力,溶剂的疏水性愈强,固定化酶在其中催化酯化反应的酯化率也较高。

表 1 溶剂对酯化过程的影响

溶剂	酯化率 / %	
	油酸甲酯	油酸丁酯
石油醚(60 ~ 90℃)	79.44	85.71
异辛烷	78.14	84.80
正庚烷	76.71	83.52
正己烷	76.59	83.02
环己烷	74.93	82.11
正戊烷	71.85	81.51
无溶剂	65.98	62.50

从表 1 中可以看出,石油醚是最理想的有机溶剂,因此在整个试验过程中,选用石油醚作为反应体系。同时也应该看到,在整个反应体系中,底物甲醇的亲水性很强,在反应体系中的起着控制和限制作用,有机溶剂的疏水性对反应的影响不是十分明显。

2.3 pH 值对酶催化反应的影响

在非水介质中,酶能“记忆”它们所经历的最后—一个水溶液的 pH 值。酶的离子化状态是由其水化层的 pH 值决定的,在水介质中,微环境的 pH 值随

庞体水相 pH 值而变化。但在非水介质中,庞体相(有机溶剂)没有任何驱动力改变微环境的 pH 值。脂肪酶在固定化过程所经历的缓冲液中的表面离子状态可以在有机溶剂中维持,这就是酶的记忆效应。而不同的 pH 值缓冲液中,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。这意味着脂肪酶的酯化活性在有机溶剂体系中受 pH 值影响很大。酯化反应受 pH 值的影响较大,在 pH 值约为 6~7 时,酯化率最高,偏离此值,酯化率明显下降。因为在适宜 pH 值时,酶分子上活性基团的解离状态最适于酶与底物的结合,有利于充分发挥酶的催化活性,提高酯化率。

2.4 体系中含水量对酶催化反应的影响

为了进一步研究水分对酶的酯化活性的影响,笔者在初始反应体系中加入了一定含量的水(油酸和甲醇的酯化过程),图 1 结果表明水的加入反而降低了酯化速度和酯化率。说明固定化酶内部结合水已经满足了酶促反应的微水环境的要求,加入的过量水会引起酶中心内部“水簇”的生成,从而改变酶的活性结构使酶活性降低。反应初期不需要加入微量的水,固定化酶内部结合水足以启动酶促反应。

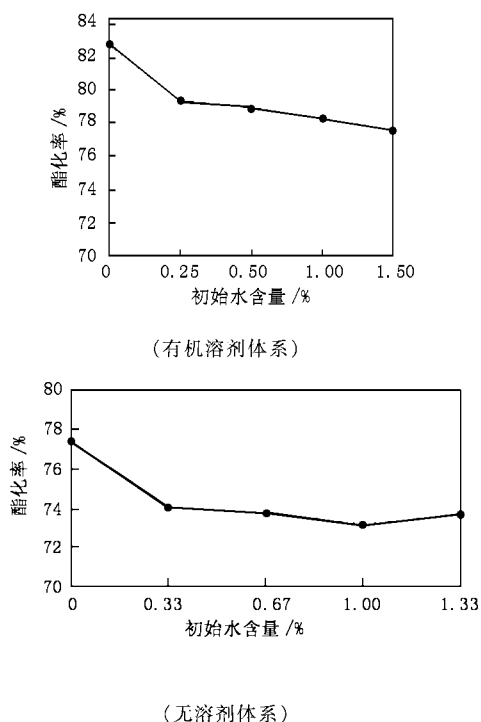


图 1 初始水含量对酯化过程的影响

另外在酯化反应过程中,随着反应的进行会产生大量的水,将会抑制反应的进行,正反应减慢,逆反应加强,同时水的存在会引起酶的稳定性下降。

从表 2 中可以看出,我们在油酸和甲醇酯化反应过程进行到 10 h 时加入吸水剂后,可以明显提高反应速度和酯化率 15%。

表 2 加入吸水剂后对酯化率的影响

反应时间/h	酯化率/%	
	不加吸水剂	加入吸水剂
8	47.43	47.43
10	48.03	48.63
12	58.91	62.53
14	61.11	67.62
16	63.11	70.77
19	62.89	75.20
21	63.19	78.52
24	64.43	82.77

注:吸水剂于反应开始后约 10 h 加入。

2.5 固定化酶催化对底物特异性

为了研究固定化酶对不同脂肪酸和低碳醇酯化过程的影响,笔者在石油醚体系中,对棕榈酸、油酸和硬脂酸与甲醇、乙醇、丙醇、丁醇和异丙醇的酯化过程进行了研究。其中棕榈酸与这 5 种低碳醇反应的酯化率分别为 70.4%、70.46%、74.89%、77.23%、72.54%,表明固定化酶催化棕榈酸与不同的低碳直链醇反应时,醇的碳原子数越多,酯化率越高,而从同一碳原子数的醇的异构体来看,固定化脂肪酶对直链醇的选择性优于对支链醇的选择性。这可能是由于羟基向碳链中心移动后,不易接近脂肪酶的活性中心,从而使酶的表现活性下降。

表 3 是甲醇、乙醇与不同的酸(棕榈酸、油酸、硬脂酸)在固定化酶的催化作用下酯化的结果,表明硬脂酸的酯化率最高,且随着脂肪酸碳原子数增加,酶活性增加,即酯化率增加。

表 3 不同脂肪酸对酯化过程的影响

脂肪酸	酯化率/%	
	甲醇	乙醇
棕榈酸	70.40	77.23
油酸	81.45	84.91
硬脂酸	96.45	94.03

2.7 酶的纯度和固定化酶的最佳用量

酶的浓度对反应速度和酯化率影响较大,从图 2 的结果(A 为固定化酶表观酶活 7 939 U/g; B 为固定化酶表观酶活 13 809 U/g)可知,在酶浓度较低时,随着酶浓度的提高,酯化率呈线性提高;当酶浓

度增加到饱和浓度以后,则呈最大速度,此时呈原型曲线,此时由于酶促反应界面面积的限制,再增加浓度,反应速度和酯化率不变。

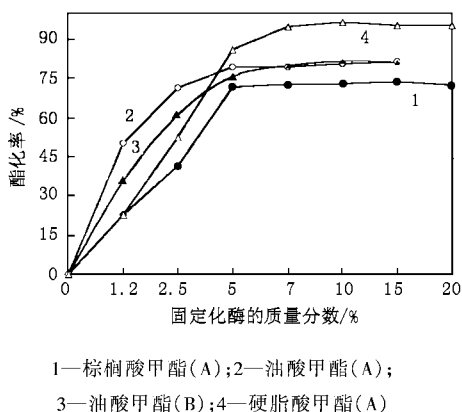
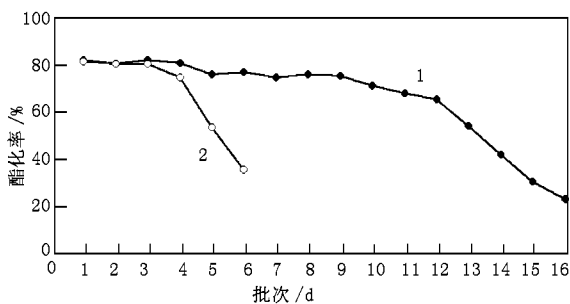


图2 固定化酶的浓度对不同脂肪酸体系的酯化过程的影响

酶的纯度直接影响着固定化酶的表观酶活,它对酶促反应的影响主要是惰性杂蛋白吸附在固定化载体上导致酶稳定性和活性的下降,从图2中的曲线2和曲线3的比较结果可知,固定化表观酶活对单次酶促反应没有很大的影响,油酸和甲醇在不同酶活的固定化酶催化作用下,酯化率无变化。但是从图3的结论来看,酶活和纯度低将导致固定化酶的催化寿命明显下降。



固定化酶的表观酶活为:1—3 3650 U/g;2—7 143 U/g

图3 酶的纯度对酯化过程的影响

2.8 低碳醇对酶的抑制作用

低碳醇因其强极性和强亲水性对酶蛋白有很强的破坏能力,主要是影响酶的稳定性和活性。笔者从脂肪酸低碳醇酯的酯化过程中,发现甲醇、乙醇、丙醇和丁醇这些低碳醇作为底物对反应过程有着很强的抑制作用。笔者对油酸和甲醇的酯化体系进行了深入的研究。首先进行了4种底物摩尔比的实验:酸醇比1:0.3、1:0.5、1:1和1:1.5,反应时间为2

h,甲醇的转化率分别为95.8%、96.0%、27.5%和20.5%,表明甲醇过量导致对酶促反应很强的抑制作用,1/2摩尔比的甲醇参与酯化反应时,其甲醇的转化率可达到96%。因此可以采用在反应过程中分段加入甲醇的方法来消除过量的低碳醇对酶催化的抑制作用。

一元酸和一元醇进行酯化反应的最佳物质摩尔比是1:1。将相同物质质量的甲醇平均分多次均匀加入反应底物中,考察是否流加次数越多对酯化反应影响越大。当流加次数从1次增加到4次时,酯化率分别为77.56%、80.33%、84.28%、82.43%。流加甲醇可以明显改善抑制作用提高酯化率,流加次数增多,甲醇对酶促反应的抑制越弱,酯化率提高,但是流加次数不是越多越好。

从前面的分析知,酸醇摩尔比1:0.5的底物反应终点时,酯化率可以达到48%,醇的转化率为96%,而后继续流加剩下的0.5摩尔比的甲醇,酯化率只能提高到80%左右。可能是逆反应和产物的存在对正反应产生竞争性抑制。笔者提高底物甲醇的用量来加强正反应,采用了不同酸醇比的几个体系,从表4中的结果得出摩尔比为1:1.4时,酯化率可以提高到92.52%,但不是醇越多、流加次数越多,酯化率就可以无限提高的。整个过程的抑制作用动力学还有待于进一步研究。

表4 酸醇摩尔比对酯化过程的影响

酸醇摩尔比	1:1	1:1.1	1:1.2	1:1.3	1:1.4	1:1.5	1:2.0
酯化率/%	79.20	84.56	89.07	89.74	92.52	92.14	76.10

注:酸醇摩尔比1:1.1为流加1次,1:(1.2~1.5)为流加3次,1:2.0为流加4次。

3 结论

通过大量的实验表明,可以采用吸附法固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶,固定化酶能较好的用于脂肪酸低碳醇酯的酯化合成。对影响酶促酯化反应的参数进行了较深入的研究,得到了一组最佳的参数:温度为40℃,体系采用石油醚(60~90℃)为溶剂,底物酸的浓度为0.85 mol/L,pH值为7,反应初期不需要加入水分,反应中期需加入硅胶为吸水剂除去过程产生的水。该固定化酶对碳链较长的低碳醇和脂肪酸有更好的转化率,酶的质量分数为底物酸的5%。固定化酶的酶活越高将明显提高其在酯化过程中的使用批次。由于低碳醇对酶蛋白的破坏作

(下转第37页)

聚集体开始变得“松散”,并逐渐细化,当分散时间达 7.5 h 时,其中有 73.5% 的 SiO₂ 以纳米尺寸存在。与文献[3]所报道的相应的分散液的 TEM 图比较,可以看出 SiO₂ 在 PET 中的分散性均比在分散液中差,这说明 SiO₂ 在酯交换和缩聚过程中又发生了重新团聚的趋势。

2.5 纳米 SiO₂ 的浓度对其分散性的影响

图 6 中(a)~(e)分别是 SiO₂ 含量(占 PET 质量百分比)为 1.0%、1.5%、2.0%、3.0% 和 4.0% 时的 PET/SiO₂ TEM 照片,图 6(f)是 SiO₂ 含量为 1.0% 放大 10 万倍的 TEM 照片。表 1 是相应的 PET/SiO₂ 复合物中一维尺寸在 100 nm 以下的 SiO₂ 粒子统计数字。

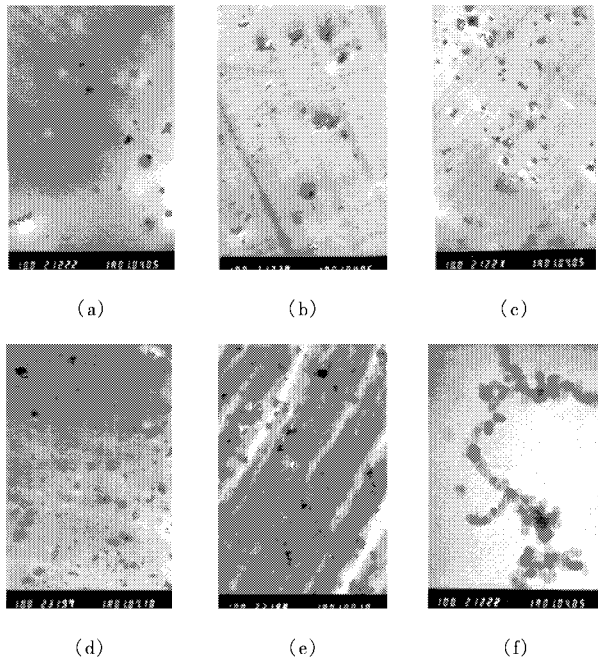


图 6 PET 中不同纳米 SiO₂ 的浓度下制备的 PET/纳米 SiO₂ 的 TEM 照片(×10 000)

表 1 SiO₂ 加入量对 SiO₂ 直径分布的影响

SiO ₂ 质量分数/%	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
直径小于 100 nm 的 SiO ₂ 含量/%	88	85	74	66	61

由图 6 及表 1 可见,当 SiO₂ 质量分数为 1.0% 和 1.5% 时,其分散性较好,粒径尺寸较小,特别是 SiO₂ 质量分数为 1.0% 时, SiO₂ 以单相连纳米球体存在(见图 6(f));当 SiO₂ 质量分数为 2%~4% 时,粒子聚集的倾向增大,团聚体增多,100 nm 以下的 SiO₂ 百分比下降。显然是由于 SiO₂ 含量的增多,粒子本身相互碰撞几率增大的缘故。当采用球磨酯交换时, SiO₂ 的质量分数小于 4.5% 时对其分散性影响不大,例如质量分数为 2.0% 和 4.5% 时,100 nm 以下的 SiO₂ 分别占总数的 95.07% 和 91.31%。

3 结论

(1) 制备 PET/纳米 SiO₂ 复合材料,采用球磨分散、球磨酯交换、A1120 为分散剂且分散时间达 7.5 h 时纳米 SiO₂ 在 PET 中的分散效果最佳,100 nm 以下 SiO₂ 的比例最高可达 95.07%。

(2) 随纳米 SiO₂ 加入量的提高,在 PET/纳米 SiO₂ 复合材料中以纳米尺寸存在的比例下降。

参考文献

- [1] 张志琨,崔作林. 纳米技术与纳米材料[M]. 北京:国防工业出版社,2000.34,45~67
- [2] 徐国财,张立德. 纳米复合材料[M]. 北京:化学工业出版社,2002.107,315
- [3] 王锐,武荣瑞,等. PET/纳米 SiO₂ 复合材料的制备(I):纳米 SiO₂ 在 PET 单体 EG 中的分散性研究[J]. 高分子材料科学与工程,2002(4):
- [4] Gandhi N N, Sudhirprakash B, et al. Studies on the lipozyme-catalyzed synthesis of butyl laurate[J]. Biotechnol Bioeng,1995,46:1
- [5] 徐岩,章克昌. 抑制剂对有机相酶促己酸乙酯合成中固定化脂肪酶影响[J]. 生物工程学报,1999,15(3):404~407
- [6] Leitgeb M, Knez Z. The influence of water on the synthesis of *n*-butyl oleate by immobilized *Mucor Miehei* lipase[J]. JAOCA,1990,67:775~778
- [7] Sonnet P F, McNeill G P, Jun W. Lipase of *geotrichum candidum* immobilized on silica gel[J]. J Am Oil Chem Soc,1994,71:1421~1423
- [8] Knothe G, Dunn O R, Bagby M O. Technical aspects of biodiesel standards[J]. INFORM,1996,7(8):827~829
- [9] Monot F, Brozeix F, Bardin M, et al. Enzymatic esterification in organic media: Role water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis[J]. Appl Microbiol Biotechnol,1991,35:759~765

(上接第 33 页)

用,反应过程需要分批流加甲醇,最佳流加方式为先加入酸醇摩尔比为 0.5 的甲醇,在反应中期再加入 0.5 摩尔比的甲醇。油酸与甲醇的最佳摩尔比为 1:1.4,在此条件下,甲醇需分 3 次流加到体系中,转化率可达 92.5% 以上。硬脂酸甲酯的转化率可达 95% (酸醇比为 1:1)。固定化酶的半衰期为 360 h。该固定化酶对于脂肪酸低碳醇酯酯化合成潜力很大。

参考文献

- [1] 徐岩,章克昌,王亚非. 微生物脂肪酶在正庚烷中合成短链芳香酯的研究[J]. 生物工程学报,1998,14(2):243~248