

# 固定化脂肪酶合成二元酸酯

寇秀芬 夏嘉宁 徐家立

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**关键词** 二元酸酯, 固定化脂肪酶, 酯化

**中图分类号** Q814.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)01-0116-03

二元脂肪酸酯可作高质量的溶剂、润滑剂, 又可作为燃料和多种轻工业产品的添加剂, 主要用作润滑剂的基础油和塑料增塑剂。二元酸酯基合成润滑剂产品, 具有闪点高, 适用温度范围宽、润滑性好的特点。二元酸酯挥发性小, 稳定性和挠曲性良好, 适用于食品包装和户外用塑料制品<sup>[1]</sup>。

用脂肪酶催化合成包括二元酸酯在内的脂肪酸酯蜡是省能、减少副反应、提高产品质量的有效方法<sup>[2]</sup>。固定化假丝酵母(*Candida sp.*) - 1619 脂肪酶在催化油酸油醇酯<sup>[3]</sup>, 聚乙二醇 400 酯<sup>[4,5]</sup>的合成中已显出良好的效果。本文报道这种固定化酶, 合成二元酸酯的酯化条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂:** 油醇购于日本 Wako Pure Chemical Industries LTD。七、九、十一、十三、十五、十七醇和壬二酸是美国 Sigma 公司的产品。十一、十二、十三、十五、十六碳二元酸由本所陈远童教授惠赠。其余试剂为北京化工厂产品。脂肪酶为本实验室制备, 每克干粉  $1.4 \times 10^5$  u<sup>[3]</sup>。

**1.1.2 仪器:** 震荡器为 G<sub>24</sub> Environmental Incubator Shaker, 美国 New Brunswick Scientific Co. Inc. 产品, 反应所用转速为 150 r/min。

### 1.2 方法

**1.2.1 固定化脂肪酶:** 以硅藻土为载体, 吸附法制备<sup>[3]</sup>。取 10 mL 含 10mg 椰子油, 10 mg 吐温 80 的己烷与 3.3 mL 3% (W/V) MgSO<sub>4</sub> 溶液制成乳浊液, 与 10.000 g 硅藻土混合, 气干后, 称出 8.571 g, 与 10 mL 的酶溶液(含 1.429 g 酶粉)混合, 室温放置 24 h 晾干。制成每克含  $2.0 \times 10^4$  u 脂肪酶的固定化酶。不同 pH 的固定化酶制作时, 在与酶液混合前, 按每克载体以 1 mL pH 2~13 的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液分别处理, 干燥后再加入酶液。

**1.2.2 二元酸酯的合成:** 基本反应体系为 100 mL 锥形瓶中, 加入 1 mmol 二元酸, 2 mmol 醇, 3 mL 溶剂, 15 mg 固定化脂肪酶(300 u), 40℃ 密闭震荡反应 5~24 h。无溶剂反应体系为 100 mL 锥形瓶中, 加入 5 mmol 癸二酸(1.011 g), 10

mmol 十二醇(1.863 g)或油醇(2.685 g), 150 mg 固定化脂肪酶(3000 u), 敞口静置或震荡反应。

**1.2.3 酯化率的测定:** 以反应体系内酯化所减少的脂肪酸量, 计算出酯化率<sup>[3]</sup>。

**1.2.4 薄层色谱分析:** 样品溶在等体积的己烷和乙醇的混合溶液中(5%, W/V), 在 GF<sub>254</sub> 硅胶板上(10 cm × 15 cm)展开, 上样 40 μL。展开过的薄板干燥后, 喷 2.5% 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 乙醇溶液, 在 105℃ 下 5 min 显色。色谱展开溶剂为: 己烷: 乙醚: 乙酸 = 30:20:1 (V: V: V)。

## 2 实验结果

### 2.1 二元酸对酯化的影响

在含己烷的基本反应体系中作用 5 h, 各种直链二元酸和油醇的酯化结果见图 1。可见癸二酸的转化率最高, 十一和十三碳二元酸次之。

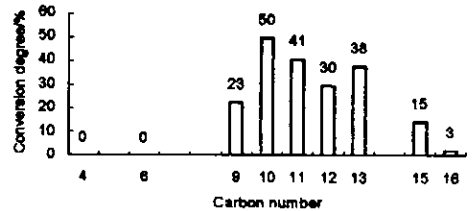


图 1 二元酸对酯化的影响

### 2.2 醇对酯化的影响

在含己烷的基本反应体系中反应 5 h, 在 18 种饱和正醇中, 癸二酸与 4~18 碳的 15 种正醇的酯化较好(图 2)。而在

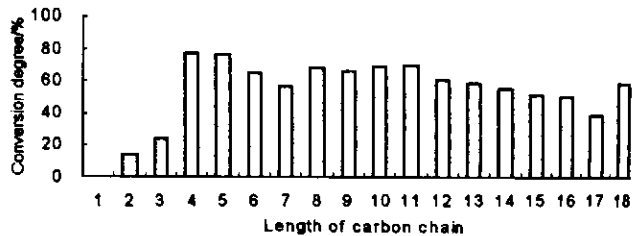


图 2 醇对酯化的影响

23 种 2~8 碳的醇中,伯醇与癸二酸的酯化率远高于仲醇和多元醇,叔醇无反应。

### 2.3 溶剂对酯化的影响

在含溶剂的基本反应体系中,1 mmol 癸二酸(0.202 g)和 2 mmol 油醇(0.537 g)反应 5 h。结果发现,在 15 种溶剂中,烃类、苯、甲苯、二甲苯和四氯化碳利于反应。

### 2.4 底物摩尔比对酯化的影响

在基本反应体系中,癸二酸和油醇总量固定为 0.739 g,改变两底物的摩尔比,反应 24 h,以化学计量投料为基准。结果发现投醇过量利于提高酯化率和反应速度。

### 2.5 酯化反应时程

在基本反应体系中癸二酸和油醇的反应时程如图 3 所示,用酶量 500 u 以上的样品,反应 24 h 的酯化率达到 87%。

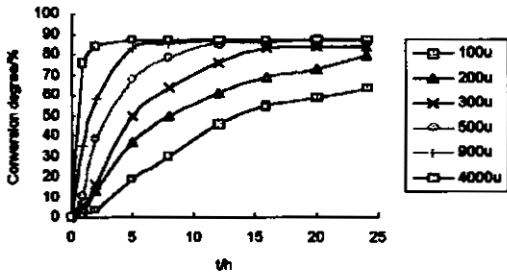


图 3 酯化反应的时程

### 2.6 温度和 pH 对酯化率的影响

无溶剂基本反应体系中的十二醇与癸二酸敞口静置反应 3.5 h 的最适温度范围为 50~70℃。40~100℃ 范围内,反应 17 h,50、70 和 90℃ 下的酯化率分别达到 92.2%、95% 和 92%。

癸二酸和油醇在不同 pH 下反应 5 h,在 pH 2~12 范围内,pH 4~11 间的差别不大,合适的 pH 范围为 6~8。

### 2.7 产物分析

在无溶剂体系中,癸二酸和油醇在 40℃ 振荡反应 2 h (转化率 48%) 和 24 h (转化率 90%) 的反应液,经薄层色谱

检测,出现  $R_f = 0.96$  点(图 4)。癸二酸和油醇的层析点的  $R_f$  值分别为 0 和 0.5。

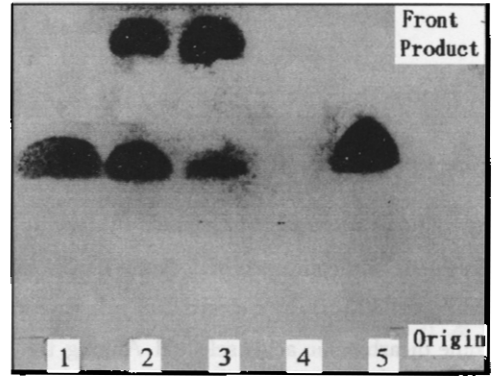


图 4 反应物的薄层色谱

1. 0 h; 2. 2 h; 3. 24 h; 4. Sebacic acid; 5. Oleyl alcohol

## 3 讨论

癸二酸在含己烷和油醇的反应液中的溶解度很低(40℃ 下,每毫升溶液中溶解的癸二酸不到 0.2 mg),而它的熔点却达到 134℃,在实验的反应温度范围内(30~100℃)不会液化。实际上,反应是在固液异相体系中进行的,溶剂只是帮助醇的溶解和促使癸二酸悬浮分散。在无溶剂体系中,只要醇处于液态,即使静止状态下,也发生反应。这种固液三相间发生明显酯化反应的现象的开发和利用,可进一步扩大脂肪酶催化反应的底物范围。

Zaks 和 Klibarnov<sup>[7]</sup>指出,除去反应产生的水,会促进酯化。实验中,在有溶剂的反应体系中,40℃ 反应 5 h,转化率达到 50% 后,分别加 3.6 mL 水和 300 mg 分子筛 3 A,继续反应 19 h,对照、加水和加脱水剂的酯化率分别为 86%、60% 和 97%。无溶剂体系中,密闭和敞口反应 24 h 的酯化率分别为 79% 和 91%。而水解反应时,温度超过 50℃ 就会造成这种酶的失活<sup>[3]</sup>,可见脱水不但有利于酯化反应,而且有利于酶的稳定。

## 参 考 文 献

- [1] Johnson R W, Fritz E 编(陆用海,胡征宇 主译).《工业脂肪酸及其应用》,北京:中国轻工业出版社,1992, pp. 381~382; pp. 451~452
- [2] Frank W W, Williams R. *Enzyme Microb Technol*, 1990, 12: 743~748
- [3] Zhang J, Xu J L. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1995, 11(4): 243~251
- [4] 寇秀芬,徐家立. *生物工程学报*, 1996, 12(增刊): 131~135
- [5] Kou X F, Xu J L. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1997, 13(3): 201~206
- [6] Steyler D C. *Enzyme Microb Technol*, 1991, 13: 221~226
- [7] Zaks A, Klibarnov A M. *Science*, 1984, 224: 1249~1251

## Synthesis of Dicarboxylic Esters by Lipase

KOU Xiu-fen XIA Jia-ning XU Jia-li

( Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Science ,Beijing 100080 )

**Abstract** The syntheses of dicarboxylic esters by immobilized lipase from *Candida sp.* - 1619 were investigated. The reaction system was composed of 1 mmol dicarboxylic acid ,2 mmol alcohol ,3 mL hexane and 15 mg celite-adsorbed immobilized lipase( 300 u ) in a closed 100 mL Erlenmeyer flask ,shaken at 40°C for 5h. Sebacic acid was the best substrate among nine dicarboxylic acids selected. Among the 18 saturated fatty n - alcohols ,the alcohols with carbon chain length rangin from C4~C18 had good reactivity. The primary alcohols had much better reactivities than corresponding secondary alcohols and multihydroxy-alcohols. Tertiary alcohols showed no reactivity. Hydrocarbons ,benzene ,toluene ,xylene and tetrachloride were favorite reactants among 15 organic solvents selected. in none-solvent stationary system ( 5 mmol sebacic acid ,10 mmol dodecanol ,150 mg immobilized lipase( 3000 u ))reacted without plug for 3. 5h ,the optimum temperature was 60°C . The conversion degree was over 92% when reaction carried out at 50~90°C for 17h. The suitable reaction pH ranged from 6~8. The reactant was developed on GF<sub>254</sub> plate( hexane :ethyl ether :acetic acid = 30 :20 :1( V :V :V ) ). There were three spots with different R<sub>f</sub> value at 0. 96 ,0. 55 and 0 corresponding to product ,oleyl alcohol and sebacic acids ,respectively.

**Key words** Dicarboxylic acids , immobilized lipase ,esterification