

微水体系中荧光假单胞菌脂肪酶催化合成单甘酯

夏咏梅^{1*} 章克昌² 石贵阳² 李晓晖² 方云¹

(江南大学¹ 化学工程学院;² 生物工程学院, 无锡 214036)

摘 要 研究了无溶剂微水体系中荧光假单胞菌脂肪酶(PFL)催化油脂甘油解合成单甘酯的反应因素以及多温程非均相固液反应对单甘酯产率的影响。以初始体系最低共熔点(PFL)取代临界温度学说中的油脂初熔点,通过考察不同 IEP 体系的甘油解,发现 PFL 酶促油脂甘油解时存在碳链基质特异性的函数关系,即反应物油脂中饱和碳残基的质量百分含量($C_{16} + C_{18}$)与单甘酯产率间符合以下多项式: $Y = -0.0006X^3 + 0.0592X^2 - 0.8909X + 26.753$ ($13\% < X < 76.5\%$),式中 X 为 $C_{16} + C_{18}$, Y 为 40℃ 时等温反应条件下的单甘酯产率。IEP 为 40℃ 时,最适等温反应条件如下:加水量 3%~4.5%,加酶量为 500u/g 油脂,摩尔比 1:2.5~5.0(油脂:甘油)反应温度 40℃。实验条件下多步程序降温反应 48h 后单甘酯最高产率为 81.4%。

关键词 微水体系, 脂肪酶, 单甘酯, 最低共熔点, 基质特异性

中图分类号 Q814.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0084-05

1990 年 McNeil 等^[1-3]报道了无外加溶剂法(简称无溶剂法)酶促油脂甘油解的研究,发现 3 种天然油脂在反应中存在著名的临界温度(T_c)现象。 T_c 现象被归因于产物单甘酯的熔点高于原料油脂的熔点,因而通过微相分离使得反应平衡移向单甘酯一方。McNeil 等根据微相分离学说创造了两步温程单甘酯合成法^[1-4],即反应先在略低于油脂熔点的温度下进行,然后降低反应温度至 5~20℃ 继续反应 4~5d。彭立凤等^[5-6]对此也有报道。

本研究室于 1991 年起展开了非水相酶促合成单甘酯的研究^[7-12]。由于甘油以及其它组分的加入会改变油脂或单甘酯的析出温度,我们以初始体系最低共熔点(Initial eutectic point, 以下简称 IEP)取代油脂熔点进行深入研究,提出了第一临界温度的概念^[12]。指出针对某一特定的脂肪酶,所有试验油脂在第一临界温度以下反应时才能体现出较好的甘油解活性^[12],例如 PFL 的第一临界温度为 46℃。但是,微相分离学说及前期研究结果尚不能解释第一临界温度以下单甘酯为何不能一直析出至体系共熔点接近单甘酯熔点为止,我们认为这或许与其基质特异性有关。但文献所见酶促油脂甘油解反应研究中,除 1,3-位置特异性之外,鲜见对油脂基质特异性

的研究报道。因此本文将荧光假单胞菌脂肪酶为催化剂,对最低共熔点下的无溶剂微水体系酶促油脂甘油解反应及其基质特异性进行深入的研究,进一步揭示非均相酶促油脂甘油解反应的内在规律。

1 材料与方 法

1.1 材 料

脂肪酶由下列公司赠送: *Pseudomonas fluorescens* (PFL), Amano 公司; *Pseudomonas* sp. (AK), Amano 公司; *Candida antarctica* (CAL), Novo Nordisk 公司; PPW, Novo Nordisk 公司。 *Candida cylindracea* (CCL) 购自 Sigma 公司。

橄榄油为 CP 级,其它各种精制油脂由杭州油脂化工厂提供,使用前均经真空脱水。甘油为 AR 级,所有分析用试剂均为 AR 级。

1.2 方 法

1.2.1 总单甘酯含量的测定^[10]:用高碘酸-硫代硫酸钠氧化还原法测定出总单甘酯含量,单甘酯平均分子量以 346 计。

1.2.2 油脂组成分析:油脂经水解再甲酯化后用气相色谱分析其脂肪酸组成,色谱条件为:毛细管柱, FFAP(SEG 公司生产) 25m × 0.25mm × 0.2μm; 柱温

收稿日期:2001-09-14, 修回日期:2001-10-19。

基金项目:国家工业技术“九五”攻关项目基金资助(No. 96-c03-02-05)。

* 通讯作者。 Tel:86-510-5867220; Fax:86-510-5867220; E-mail:yongmeix@163.net

185℃,气化温度 250℃,检测器温度 260℃。

1.2.3 无溶剂法酶促油脂甘油解合成单甘酯^[12]:将一定量的油脂和甘油(除特别说明外,原料摩尔比为甘油:油脂=2.5:1)以及适量水置于用水浴加热、带机械搅拌和温度控制的玻璃反应器中。升温至反应温度后再加入脂肪酶,搅拌至反应物固化后停止搅拌,继续放置至设定时间为止。文中所有反应温度均为标注值 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 不同脂肪酶催化油脂甘油解的活性

以皂用棕榈油为原料,甘油和棕榈油的摩尔比为2.5:1,体系中加入占甘油质量4%的水,加酶量为1000u/g棕榈油,在40℃下反应6h后单甘酯的产率见表1。

表1 不同脂肪酶催化油脂甘油解的活性比较

Table 1 Enzymatic glycerolysis catalyzed by different lipases

Source of lipases	Hydrolytic activity to olive oil	Specificity	Yield of MG/%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (PFL)	30000	1,3	62.3
<i>Candida cylindracea</i> (CCL)	7500	1,3	12.2
<i>Candida antarctica</i> (CAL)	7500	1,3	41.1
PPW	400000	unknown	62.8
<i>Pseudomonas</i> AK	25000	1,3	52.3

表1反映了几种脂肪酶在同样反应条件下其甘油解活力与水解酶活没有必然关联。其中脂肪酶PPW和PFL均表现出很好的催化活性。Yamane^[4]小组发现大多数细菌脂肪在反应中的催化能力较高,而其研究的6种酵母和霉菌的脂肪酶的催化活性都很低。脂肪酶PPW为曲霉脂肪酶,说明细菌之外的其它菌的脂肪酶也可以有较好的单甘酯合成能力。以下研究中将采用PFL为催化剂。

2.2 无溶剂酶促油脂甘油解的碳链特异性

PFL的第一临界温度为46℃^[12],当体系在最佳反应温度下反应一段时间后,体系共熔点略有上升。根据微相分离学说,如果此时在46℃以下升高反应温度,虽然单甘酯析出的驱动力降低,但理论上十六、十八饱和碳单甘酯及其与油酸单甘酯的混合物在46℃以下仍然能够析出,然而事实并非如此。此实验现象揭示酶的甘油解催化活性可能不仅与IEP有关而且与低共熔体系组成或者油脂具体组成有关,即可能存在一定的碳链特异性,因此本文以总单甘酯为标的,考察酶促单甘酯合成的碳链特异性。

对常见油脂的GC分析表明,油脂的碳链分布及其长度以十六、十八饱和碳和十八不饱和碳为主(参见表2)。为减少干扰因素,用植物油即橄榄油、棕榈油及氢化棕榈油进行复配,分别在第一临界温度以上(50℃)和PFL的适宜反应温度(40℃)下着重考察十六、十八饱和碳和十八不饱和碳的质量含量及其相关关系对单甘酯产率的影响。实验结果见图1~4,其中甘油:油脂=2:1(mol:mol),加酶量为500u/g油脂,加水量为甘油的4%。图中C₁₆+C₁₈表示油脂中C₁₆和C₁₈酰基质量含量的总和占总组成的质量百分比,余此类推。

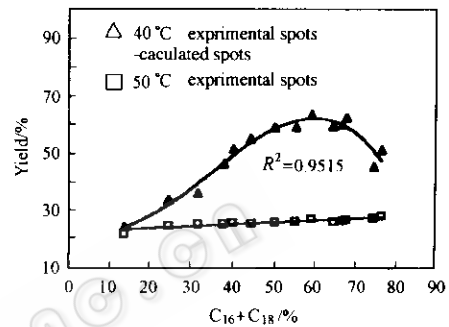


图1 油脂中C₁₆+C₁₈含量对单甘酯产率的影响

Fig.1 Effect of C₁₆+C₁₈ content in the oils on the yield of MG

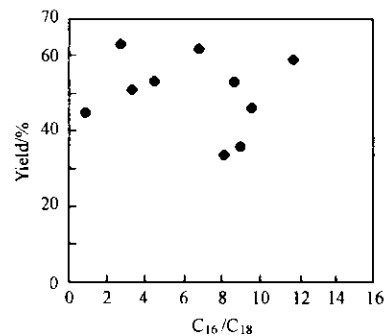


图2 油脂中C₁₆/C₁₈(质量比)对单甘酯产率的影响

Fig.2 Effect of C₁₆/C₁₈(mass ratio) in the oils on the yield of MG

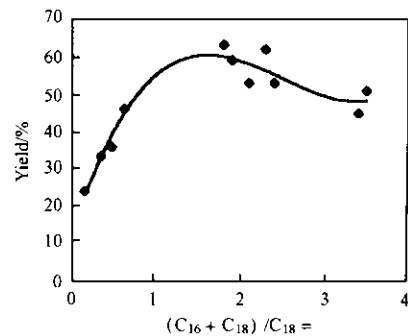


图3 油脂中(C₁₆+C₁₈)/C₁₈=(质量比)对单甘酯产率的影响

Fig.3 Effect of (C₁₆+C₁₈)/C₁₈=(mass ratio) in the oils on the yield of MG

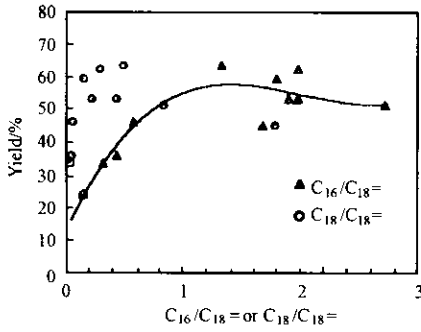


图 4 油脂中 $C_{16}/C_{18} =$ 及 $C_{18}/C_{18} =$ (质量比)对单甘酯产率的影响

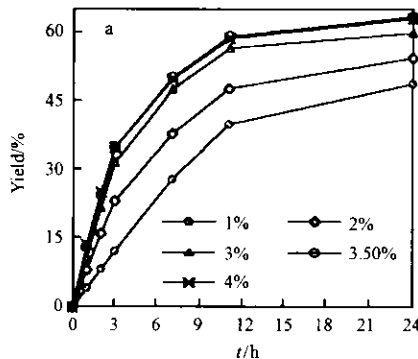
Fig.4 Effect of $C_{16}/C_{18} =$ and $C_{18}/C_{18} =$ (mass ratio) in the oils on yield of MG

表 2 原料油脂组成
Table 2 Composition of oils and fats(%)^a

Sample	C_{12}^b	C_{14}	C_{16}	C_{18}	C_{18}^c
Palm Stearin	0.13	1.40	59.4	5.10	33.2
Palm Olein	0.27	1.11	40.5	4.13	54.0
Tallow	0.17	4.2	27.7	23.1	37.2
Olive oil	0.09	1.03	4.9	1.5	85.3
Hydrogenated palm oil	0.10	1.45	56.9	41.1	-
Hydrogenated tallow	0.10	4.50	33.2	61.2	-
Hydrogenated lard-palm	0.09	2.04	57.4	40.5	-

^a 高于 C_{20} 者未计入,故表中数据(w/w)未归一化;^b 将碳数小于 12 者合并计入;^c 将单不饱和与二不饱和合并计入

图 1 中 50℃ 的反应结果表明此温度下单甘酯产率与组成无关,这可以用第一临界温度解释^[12]。由图 1 ~ 图 4 可见,40℃ 下将原料油脂的 3 类主要成分进行归类分析、制图考察,观察其与单甘酯平衡产率之间的关系,发现 $C_{16} + C_{18}$ 与单甘酯平衡产率之间的对应关系最好。经过对实验点中等步长数据的离差分析和回归拟合,得到以下多项式方程:



$$Y = -0.0006X^3 + 0.0592X^2 - 0.8909X + 26.753$$

(13% < X < 76.5%, $R^2 = 0.9515$) (1)

式中 X 为原料油脂中 C_{16} 与 C_{18} 质量百分含量的总和, Y 为如上反应条件下的单甘酯产率。

上式是以组合植物油为原料进行反应得到的结果,为了考察其普适性,用精制牛羊油 ($C_{16} + C_{18} = 50.5\%$) 和猪油 ($C_{16} + C_{18} = 43.7\%$) 对其进行验证。同样条件下反应 24h,单甘酯产率分别为:牛羊油单甘酯产率为 54.9% (计算值 55.5%, 相对误差 1.09%),猪油单甘酯产率为 51.4% (计算值 50.8%, 相对误差 1.17%)。

式(1)对酶促油脂甘油解合成单甘酯有着重要的理论意义,即原料组成对等温反应的单甘酯产率起了决定性的作用。同时式(1)也体现了临界温度现象实质上是组成影响的部分表现现象,它从理论上用数学关系式揭示了油脂组成对酶促油脂甘油解的影响。将式(1)的结果与前面对温度效应的研究结果相结合,即可以解释为什么 IEP 低于 46℃ 的体系进一步在最佳反应温度之上反应时,单甘酯浓度不继续增大:因为此时未反应物中不饱和碳酰基多于饱和碳的,当体系中饱和碳酰基达到平衡转化率后,生成的油酸单甘酯 (mp35℃) 必须在其混合体系中的凝固点之下才能析出。IEP 越低,此凝固点越低。

2.3 甘油中加水量的影响

所选体系 IEP 与 PFL 的适宜催化温度相同 (40℃),反应物摩尔比(甘油:油脂)及反应温度分别取最佳值 2.5:1、40℃^[13]。以亲水性原料即甘油中的含水量来考察体系中加水量对单甘酯合成的影响。由图 5 中可以看出,反应初期,加水量在 1% ~ 5% 之间时,单甘酯生成量随加水量增大而增加,而甘油中加水量为甘油的 3% ~ 4.5% 时影响不大;加

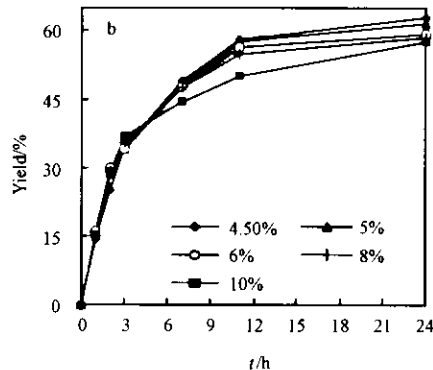


图 5 加水量对酶促油脂甘油解的影响

Fig.5 Effect of dosage of water on the enzymatic glycerolysis

水量超过2%后,单甘酯生成量显著增加,因此甘油中最适加水量宜取为3%~4.5%。

2.4 加酶量的影响

以甘油与油脂(摩尔比为2.5:1,加水量为甘油的3.5%)40℃时在不同加酶量下进行反应,实验结果见图6~图7。反应初期单甘酯生成速度随加酶量增大而增大。加酶量为500u/g油脂时,反应24h后已达到平衡;继续增大加酶量可以缩短反应时间,但是不够经济,因此加酶量宜选为500u/g。

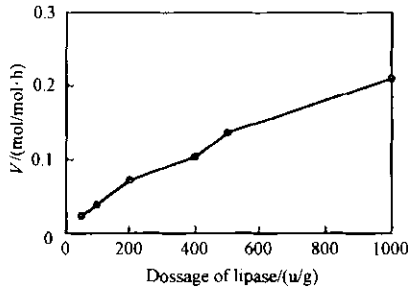


图6 加酶量对单甘酯生成速度的影响

Fig.6 Effect of dosage of lipase on the produced speed of MG

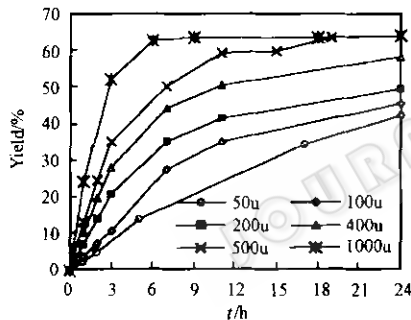


图7 加酶量对单甘酯产率的影响

Fig.7 Effect of dosage of lipase on the yield of MG

2.5 不同 IEP 体系的程序降温反应

由2.2研究结果中知,当体系中饱和碳酰基达到平衡转化率后,生成的油酸单甘酯必须在其混合体系中的凝固点之下才能析出。因此要进一步提高单甘酯产率必须降低反应温度,但低反应温度有利于单甘酯的析出而不利于增大反应速度,采用多步反应温度程序可以缓解该温度段内的反应速度与单甘酯析出对温度要求不同的矛盾。

前期工作中我们对棕榈油的程序降温反应进行了研究,经过全程反应后总单甘酯产率中的大部分来自于第一反应温度下的反应^[11],因此要想在最短的时间内获得最高的单甘酯产率,从式(1)可知反应物组成非常重要。但是另一方面,式(1)体现了临界

温度现象实质上是组成影响的部分表现现象,所以如果实际应用中单甘酯的碳链组成有要求而不宜变动的,有必要研究不同 IEP 体系的不同反应温度程序以提高单甘酯产率。

表3为不同 IEP 的体系的程序降温反应结果,反应温度程序变化少许而致实验变化不大的数据未予示出。表中实验体系和温度程序的选择依据以下研究结果^[12]:① PFL 的第一临界温度为46℃。② 30℃下反应生成的油酸单甘酯能够析出;③ IEP 在35~45℃时,等温反应的最佳反应温度及临界温度与 IEP 相同或相近;IEP 低于35℃或高于45℃时,等温反应的最佳反应温度及临界温度在 IEP 和40℃之间。

表3 不同 IEP 体系的程序降温酶促油脂甘油解

Table 3 Enzymatic glycerolysis courses under different IEP

IEP/℃	Courses	Total time/h	Yield of MG/%
46	(44℃)24h	24	44.0
	(44℃)24h+(15℃)144h	168	47.0
	(44℃)24h+(30℃)144h	168	43.8
44	(42℃)7h	7	50.3
	(42℃)7h+(13℃)24h	31	59.5
	(42℃)7h+(13℃)96h	103	64.5
42	(42℃)7h+(30℃)24h	31	54.7
	(42℃)7h+(30℃)96h	103	65.6
	(40℃)18h	18	62.4
40	(40℃)18h+(25℃)9h+(10℃)24h	51	72.7
	(40℃)18h+(25℃)9h+(10℃)48h	75	81.1
	(40℃)24h+(25℃)7h+(20℃)17h	48	76.3
	(40℃)3h+(38℃)15h+(25℃)6h+(15℃)24h	48	80.2
	(40℃)7h+(30℃)17h+(15℃)96h	120	69.0
	(40℃)7h+(30℃)17h+(10℃)25h	49	59.1
	(40℃)7h+(30℃)17h+(10℃)120h	144	66.1
	(40℃)7h+(38℃)11h+(15℃)30h	48	81.4
	(40℃)11h+(15℃)37h	48	71.5
	(40℃)11h+(28℃)33h	48	63.0
25	(40℃)11h+(30℃)37h	48	65.6
	(40℃)11h+(12℃)12h	23	64.5
	(40℃)11h+(12℃)23h	114	68.6
	(40℃)18h+(15℃)31h	49	70.2
	(40℃)11h+(15℃)37h	48	71.5
	(40℃)18h+(15℃)96h	96	81.5
	(40℃)18h+(20℃)78h	48	77.5
	(40℃)18h+(25℃)8h+(15℃)22h	46	80.2
	(38℃)24h	24	54.9
	(38℃)24h+(15℃)17h	41	61.3
25	(38℃)24h+(15℃)40h	64	64.8
	(40℃)2.5h+(25℃)7h+(15℃)40h	50	65.8
	(40℃)2.5h+(25℃)7h+(15℃)40h+(10℃)36h	86	73.2

表3的结果进一步证明油脂组成对单甘酯产率的重要性,同时也表明多步温度程序更有利于提高单甘酯产率,这一点对当油脂组成不利于得到高产率时(参见 IEP 为25℃者)尤为重要。

REFERENCES(参考文献)

- [1] McNeil G P, Yamane T. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J Am Oil Chem Soc*, 1991, **68**: 6 ~ 10
- [2] McNeil G P, Shimizu S, Yamane T. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. *J Am Oil Chem Soc*, 1990, **67**: 779 ~ 783
- [3] McNeil G P, Shimizu S, Yamane T. High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J Am Oil Chem Soc*, 1991, **68**: 1 ~ 5
- [4] Bornscheuer U T, Yamane T. Activity and stability of lipase in the solid-phase glycerolysis of triolein. *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**: 864 ~ 869
- [5] PENG L F(彭立凤), TAN T W(谭天伟). Lipase-catalyzed synthesis of monoglycerides by glycerolysis of palm oil. *J. Beijing Univ. Chem. Technol.* (北京化工大学学报), 1998, **2**: 6 ~ 10
- [6] PENG L F(彭立凤), TAN T W(谭天伟). Lipase-catalyzed synthesis of monoglycerides by glycerolysis of tallow. *J. Hebei Normal University* (河北师范大学学报), 1998, **2**: 25 ~ 29
- [7] GAO X G(高修功), ZHANG K C(章克昌), CHAO S G(曹淑桂). Effect of temperature on monoglyceride synthesis. *J. Wuxi Uni. of Light Ind.* (无锡轻工大学学报), 1997, **3**: 47 ~ 50
- [8] XIA Y M(夏咏梅), WANG Z Y(王征远), ZHANG K C(章克昌). The synthesis of monoglycerides catalyzed by lipases. *China Surfactant Detergent & Cosmetics* (日用化学工业), 1999, **6**: 5 ~ 8
- [9] XIA Y M(夏咏梅), ZHANG K C(章克昌). Glycerolysis of palm oil catalyzed by pseudomonas lipase in solvent-free system I studies on enzymatic synthesis of monoglycerides. *Fine Chemicals* (精细化工), 2000, **17**(4): 194 ~ 196
- [10] XIA Y M(夏咏梅), ZHANG K C(章克昌). Glycerolysis of palm oil catalyzed by pseudomonas lipase in solvent-free system ii studies on enhancing the yield of monoglycerides. *Fine Chemicals* (精细化工), 2000, **17**(5): 249 ~ 251
- [11] XIA Y M(夏咏梅), ZHANG K C(章克昌). Studies on enzymatic glycerolysis of palm oil with temperature programming in solid state. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(2): 235 ~ 237
- [12] XIA Y M(夏咏梅), ZHANG K C(章克昌). Temperature effect on enzymatic oil glycerolysis in solvent-free system. *Fine Chemicals* (精细化工), 2000, **17**(6): 311 ~ 313

Enzymatic Synthesis of Monoglycerides in Microaqueous Media by Using Lipase from *Pseudomonas fluorescens*

XIA Yong-Mei^{1*} ZHANG Ke-Chang² SHI Gui-Yang² LI Xiao-Hui² FANG Yun¹

(Southern Yangzi University 1. School of Chemical Engineering; 2. School of Biotechnology Engineering, Wuxi 214036, China)

Abstract Enzymatic synthesis of monoglycerides by glycerolysis of oil and fats in microaqueous solvent-free media was investigated by using lipase from *pseudomonas fluorescens* (PFL). Initial eutectic point (IEP) was substituted for melt point of oil and fats in Critical Temperature Theory. By investigating the glycerolysis under different IEP, it is showed that there is a relationship between composition of the oils and the yield of monoglycerides: $Y = -0.0006X^3 + 0.0592X^2 - 0.8909X + 26.753$ ($13\% < X < 76.5\%$), here X is the contents (W/W) of saturated fatty acid residue ($C_{16} + C_{18}$) in the oils, Y is the yield of monoglycerides at 40°C. The optimum isothermal reaction conditions for a system which IEP is 40°C are: 40°C, 3% ~ 4.5% (W/W) water in glycerol, dosage of lipase is 500u/g oil when the mole ratio of glycerol to oil is 2.5:1. The highest yield of monoglycerides is 81.4% in 48h by means of programming temperature reaction.

Key words microaqueous media, lipase, monoglycerides, eutectic point, specificity

Received: 09-14-2001

This work was supported by a grant from State Scientific and Technological Research Project (No. 96-c03-02-05).

* Corresponding author. Tel: 86-510-5867220; Fax: 86-510-5867220; E-mail: yongmeix@163.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn