

# 微乳液中脂肪酶对扁桃酸乙酯水解反应 和 $\alpha$ -溴丙酸酯化反应的催化作用

肖惠萍 刘军\* 李祖义

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

针对脂肪酶作用于相界面和微乳液油水界面膜的特点,首次将柱状假丝酵母脂肪酶(*Candida cyclindracea* Lipase)加入水包油(O/W)型微乳液及油包水(W/O)型微乳液中,分别进行扁桃酸乙酯水解和 $\alpha$ -溴丙酸酯化反应。实验表明,在微乳液中能进行脂肪酶的催化作用,且比普通两相溶液体系中催化效果更佳。在十二烷基磺酸钠(AS)/正丁醇/正辛烷的O/W型微乳液中,扁桃酸乙酯水解48h,反应转化率达90%以上,得光学纯度达97%的S型扁桃酸;在十二烷基硫酸钠(SDS)/正丁醇/正辛烷的W/O型微乳液中, $\alpha$ -溴丙酸进行了酯化反应,经6h,反应转化率达45%,得光学纯度99%的R型 $\alpha$ -溴丙酸丁酯。

**关键词** 微乳液; 脂肪酶; 水解; 酯化

1977年 Martinek 首次报道了胰凝乳蛋白酶溶解在丁二酸二辛酯磺酸钠(AOT)/异辛烷微乳液中仍具有催化活性,从此,微乳液中的酶催化作用研究倍受青睐<sup>[1,2]</sup>。到1986年已知有三十多种酶在微乳液中具有催化活性,一些酶在微乳液中不仅保存了活性,而且活性显著增强,酶的稳定性也有所增加<sup>[3]</sup>。微乳液技术的出现为酶催化应用于有机合成开辟了新的途径<sup>[4,5]</sup>。

目前,微乳液中的酶催化反应研究多侧重于油包水(W/O)型<sup>[4,5,11-14]</sup>,水包油(O/W)型微乳液中的催化作用极少报道。Mackay<sup>[6]</sup>曾报道过十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)的O/W型微乳液中,磷脂与氟离子的亲核反应,但是,该反应并没涉及酶催化作用。常见的W/O型微乳酶促反应体系有:CTAB/正己醇/正辛烷、AOT/异辛烷/磷脂、Brij-96/环己烷等,十二烷基硫酸钠(SDS)/正丁醇/正辛烷体系中的反应未见报道。本文研究了

脂肪酶(*Candida cyclindracea* lipase)在O/W型及W/O型两类微乳液中的作用<sup>[7-9]</sup>。在AS/正丁醇/正辛烷的O/W型微乳液中,催化扁桃酸乙酯的水解反应,在SDS/正丁醇/正辛烷的W/O型微乳液中,催化 $\alpha$ -溴丙酸的丁酯化反应,得到两种手性中间体:S型扁桃酸和R型 $\alpha$ -溴丙酸丁酯。

## 材料与 方法

### (一) 材料

脂肪酶 购自Sigma公司

1. CCL No. L-1754 *Candida cyclindracea* lipase 4780 u/mg, protein<sup>[16]</sup>
2. PPL1 No. L-3126 *Procine pancreas* lipase 320 u/mg, protein<sup>[16]</sup>
3. PPL2 No. L-3126 *Procine pancreas* lipase 143 u/mg, protein<sup>[16]</sup>

本文于1992年3月16日收到。

\*华东师大化学系91届毕业生。

扁桃酸乙酯(DL) 东京化成(E, P)

$\alpha$ -溴丙酸(DL) 上海试剂厂(C, P)

正辛烷 杭州炼油厂(C, P)

正丁醇 苏州金城炼油厂(C, P)

丁二酸二辛酯磺酸钠(AOT) 上海试剂二厂(L, R)纯化<sup>[10]</sup>

十二烷基磺酸钠(AS) 上海试剂一厂(C, P)重结晶

十二烷基硫酸钠(SDS) 东京化成(G, P)

## (二) 反应微乳液的制备

1. 水滴定绘制相图: 设定  $W_s/W_A = 1:2$ ,  $W_s + W_A + W_o = 29$ ,  $R_{1/1} = O/A + S$ , 其中: S 为表面活性剂, A 为助表剂正丁醇, O 为油正辛烷,  $W_s$ 、 $W_A$ 、 $W_o$  分别为 S、A 和 O 的质量。依次取不同含油量 ( $R_{1/1}$ : 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、90%), 按上述公式定量配制表面活性剂、助表剂、油的混合体系, 以水滴定该混合体系, 至溶液由清变浊, 记录浊点时水的体积, 即可绘出微乳液拟三元相图。

2. AS、SDS 微乳液体系的制备: 取  $R_{1/1}$  为 5%, 以 Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液滴定 AS, 正丁醇、正辛烷混合体系, 制得 AS 的 O/W 型微乳液; 取  $R_{1/1}$  为 90%, 以水滴定 SDS、正丁醇、正辛烷混合体系, 得 SDS 的 W/O 微乳液。

3. AOT 微乳液的制备: 0.05mol/L AOT 正辛烷溶液 100ml, 滴加 1ml 蒸馏水, 摇匀。

## (三) 反应及反应产物的提取分离

1. 扁桃酸乙酯的水解: 同时在 AS 的 O/W 微乳液体系和正辛烷/水的两相体系中进行反应。(1) 50ml 锥形瓶中依次加入 150mg 扁桃酸乙酯, AS 微乳液 5.5ml。(2) 50ml 锥形瓶中依次加入 150mg 扁桃酸乙酯、0.5ml 正辛烷, 5.0ml Tris-HCl

(pH8.0) 缓冲液。混合液(1)、(2)在 28°C 恒温 2min 后, 加入 10mg/ml 酶溶液 2ml, 置于摇床上进行反应 (28°C、120r/min)。

2.  $\alpha$ -溴丙酸的酯化: 50ml 锥形瓶中依次加入 100mg  $\alpha$ -溴丙酸、4.50 ml W/O 微乳液、0.5ml 正丁醇、0.5ml Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液。此混合液 28°C 恒温 20min 后, 加入 30mg 酶, 置于摇床上进行反应 (28°C、120 r/min)。

3. 产物的提取及分离: 反应结束时, 先以 1N 盐酸调节 pH 至 2 以终止反应, 再以 15ml 乙酸乙酯提取两次, 合并有机相, 过滤, 无水硫酸钠干燥, 蒸去溶液, 产物用硅胶柱层析分离或作色谱分析。微乳液体系反应产物分离时, 需去水完全, 并再次以乙酸乙酯溶解, 使残留表面活性剂沉淀而除去。

## (四) 产物的分析测定

1. HPLC 分析扁桃酸乙酯水解产物条件: 仪器: Shimadzu LC-6A; 柱: Shimpack CLC-SIL; 流动相: 正己烷/异丙醇; 500:25; 流速: 1ml/min; 柱温: 30°C; 紫外检测: 254nm

2. HPLC 分析  $\alpha$ -溴丙酸酯化产物条件: 仪器: Shimadzu LC-6A; 柱: Shimpack CLC-ODS; 流动相: 甲醇: 水 = 95:5; 流速: 1ml/min; 柱温: 30°C; 紫外检测: 226nm

3. GC 分析  $\alpha$ -溴丙酸酯化产物条件: 仪器: HP 5880 A; 柱: SE-54 (50 m  $\times$  0.2mm); 程序升温: 120°C (停 1min) 5°C/min  $\rightarrow$  230°C。

## 结果与讨论

### (一) 反应微乳液的制备

本实验选用正丁醇为助表剂,  $W_s/W_A = 1/2$ 。油相一般是直链正烷烃, 微乳液区域大小与烷链的碳数有关。当表面活性剂、助表剂和水的量一定时, 烃中含碳数量增加时, 对助表剂的斥力加强, 会导致微乳液区域面积减小。此外, 油相含量增大到一定数值时, 仅出现 W/O 型微乳液。所以, 为获得多而稳定的微乳液, 选用 AS 和 SDS 为表面活性剂、正辛烷为油相, 通过制作相图, 选取最佳油水比, 缓冲液, 制备反应微乳液体系。水测定法得到拟三元相图 1 和相图 2。

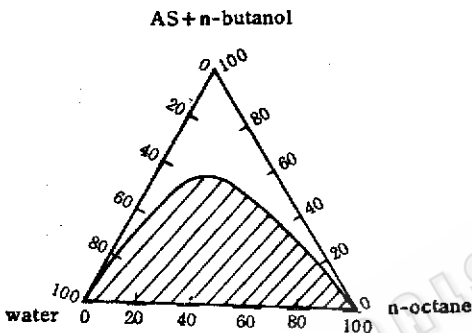


图 1 AS/正丁醇/正辛烷/水体系拟三元相图  
Fig.1 Pseudo-ternary phase diagram of quaternary system: AS/*n*-butanol/*n*-octane/water  
Weight ratio of AS to *n*-butanol is 1/2;  $T = 25^\circ\text{C}$ ; The shading area is microemulsion

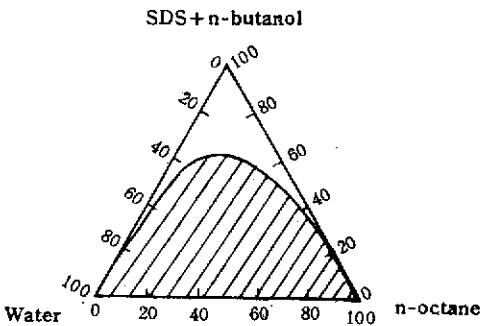


图 2 SDS/正丁醇/正辛烷/水体系拟三元相图  
Fig.2 Pseudo-ternary phase diagram of quaternary system: SDS/*n*-butanol/*n*-octane/water  
Weight ratio of SDS to *n*-butanol is 1/2;  $T = 25^\circ\text{C}$ ; The shading area is microemulsion

从相图 1 和相图 2 可知: AS/正丁醇/正辛烷体系和 SDS/正丁醇/正辛烷体系形成的微乳液区域都较大, 利于制备反应微乳液, 但是, 这两个体系均直接连续地由 W/O 型过渡到 O/W 型微乳液, 要注意防止微乳液类型发生转化, 甚至破坏。根据相图, 选取含油量  $R_{1/2}$  为 5% 制备 AS 的 O/W 型反应微乳液, 其最大含水量可超过 80%, 选取  $R_{1/2}$  为 90%, 制备 SDS 的 W/O 微乳液作为反应体系。此外, 为控制反应体系的 pH 值, 以 pH 8.0 缓冲液滴定制备 O/W 微乳液。实验表明, 用 Tris-HCl 缓冲液较  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液效果好, 配得 AS O/W 微乳液稳定性良好, 经放置半年依然澄清透明。故采用 Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液滴定制备 AS 的 O/W 微乳液。

## (二) 扁桃酸乙酯的水解

1. 脂肪酶在 AS 的 O/W 微乳液中的催化作用: 通常, 脂肪酶在缓冲液中能催化水解反应, 为了解其在 O/W 型微乳液中的作用, 将脂肪酶 CCL 及 PPL 加入 AS/正丁醇/正辛烷的 O/W 微乳液中, 催化扁桃酸乙酯水解反应。反应 48h, 提取分离产物, HPLC 测定其酸酯含量, 计算反应转化率, 结果见表 1。

可见, 脂肪酶 CCL、PPL 在 AS 的

表 1 在 AS/正丁醇/正辛烷的 O/W 微乳液中脂肪酶催化扁桃酸乙酯水解活性

Table 1 Catalysis of ethyl mandelate hydrolysis by lipases in AS/*n*-butanol/*n*-octane oil-in-water microemulsion.

Lipases	Reaction systems	
	Tris-HCl buffer/ <i>n</i> -octane biphasic system	AS/ <i>n</i> -butanol/ <i>n</i> -octane oil-in-water microemulsion
CCL	49.16%	60.23%
PPL1	56.06%	65.85%
PPL2	51.72%	61.60%

O/W 微乳液中仍具有催化活性,其活性均高于相应的正辛烷/Tris-HCl(pH8.0)缓冲液两相体系中的活性。下述实验均用 CCL。

## 2. AS的O/W微乳液中CCL催化酯水解的时间进程

为进一步了解O/W型AS微乳液对脂肪酶催化作用的影响,在AS/正丁醇/正辛烷的O/W微乳液以及正辛烷/Tris缓冲液两相体系中,进行扁桃酸乙酯水解反应,反应一定时间后,提取产物,进行硅胶柱层析分离,得到扁桃酸,结果见图3。

图3表明:在AS/正丁醇/正辛烷的O/W微乳液中比在正辛烷/Tris缓冲液两相体系中扁桃酸乙酯水解进程快,该微乳液的存在利于酯的水解,酶活性并不因微乳液中AS、正丁醇的存在而受损害。究其原因,一方面可能是微乳液的存在利于酯的分散,增加了酯与酶的接触,从而促进水解;另一方面,可能是产物乙醇一经生成,即作为助表剂,参与微乳液油水界面的构成,促使反应朝水解方向进行。

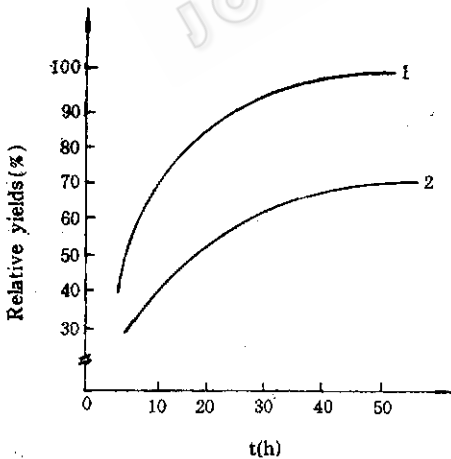


图3 CCL催化扁桃酸乙酯水解反应进程  
Fig.3 Time courses of hydrolysis of ethyl mandelate catalyzed by CCL

- (1) AS/n-butanol/n-octane oil-in-water microemulsion
- 2; n-octane/Tris-HCl buffer biphasic system

当反应进行48h后,柱层析分离得扁桃酸,测定其旋光值,结果见表2。

表2 扁桃酸乙酯水解48h产物的旋光值  
Table 2 Optical activity of the product after hydrolysis of ethyl mandelate for 48h

Optical activity	Reaction systems	
	Tris-HCl buffer/ n-octane biphasic system	AS/n-butanol/ n-octane oil- in-water microemulsion
$(\alpha)_D^{20}(\text{C}_{10}\text{H}_2\text{O})$	-151.3	-149.8
%e.e.	97.5	97.2

由表2可知,CCL催化扁桃酸乙酯水解作用在AS/正丁醇/正辛烷的O/W型微乳液中仍保持有较好的立体选择性。

## (三) W/O型微乳液中CCL催化 $\alpha$ -溴丙酸丁酯化反应

多水的体系不利于酯化反应进行,在W/O微乳液(即反胶束)中进行 $\alpha$ -溴丙酸酯化反应。

W/O微乳液中含水量以 $W_o$ 表示, $W_o$ 为表面活性剂和含水的摩尔比, $W_o = |\text{水}| / |\text{表面活性剂}|$ 。

反胶束中的水不同于庞体水(bulky aqueous water)<sup>[14]</sup>。在一定 $W_o$ ,胶束水核中的水均通过氢键紧密键合于表面活性剂极性头部。随着 $W_o$ 增大,水的流动性增加,其物化性质越接近庞体水(bulky aqueous water)。在W/O微乳液中进行催化作用,含水量 $W_o$ 是影响酶活性的关键因素<sup>[15]</sup>,存在一最适 $W_o$ ,使酶活性最大。最佳 $W_o$ 取决于表面活性剂和酶的性质。常见的酶促W/O微乳液体系是AOT/辛烷反胶束体系,在该体系中酶活性与 $W_o$ 的关系符合钟形曲线(bell-shaped curve)。

AOT加入有机溶剂中即可形成稳定的胶束,不需补加助表剂来增加溶解水量。而我们根据拟三元相图制备SDS/正丁醇/

正辛烷的W/O微乳液, 利用CCL, 以正丁醇为反应底物, 进行 $\alpha$ -溴丙酸丁酯化反应, 对该反应体系中CCL的催化作用进行考察。并与 $W_o$ 为11和大于60的两个AOT/正辛烷体系进行了比较, 正辛烷/水两相体系作为平行反应体系。

在下述溶液体系进行酯化反应:

(1) SDS/正丁醇/正辛烷的W/O微乳液, 含水9.09%(w/v),  $W_o = 42$ 。

(2) AOT/正辛烷/水的乳状液, 含水9.09%(w/v),  $W_o \gg 60$ 。

(3) AOT/正辛烷的W/O微乳液,

含水1.00%(w/v),  $W_o = 11$ 。

(4) 正辛烷/水的两相体系, 含水9.09%(w/v)。

其中, [总酸] = 0.12 mol/L, [总正丁醇] =  $1.09 \times 10^{-3}$  mol/L, [总酶] = 5.45 mg/ml。

在(1)、(2)、(3)溶液中投入反应原料, 控制反应时间使反应转化率在10%以内, 提取产物, GC分析其中酸和酯的含量, 从转化率对反应时间作图, 即得一定酶, 底物浓度下的最大反应速率( $V_m$ ), 结果见表3。

表3 SDS微乳液, AOT乳状液及两相体系中CCL催化 $\alpha$ -溴丙酸酯化反应速率  
Table 3 Maximum esterification rates of  $\alpha$  bromopropionic acid catalyzed by CCL in SDS microemulsion, AOT-emulsion and biphasic system

$V_m$ mol/L·h	Reaction systems		
	SDS/n-butanol/n-octane water-in-oil microemulsion	AOT/n-octane emulsion	Water/n-octane biphasic system
	$4.82 \times 10^{-3}$	$3.99 \times 10^{-4}$	$2.03 \times 10^{-4}$

从表3可知, 当反应体系中含水量、底物浓度、酶浓度相同时, 在SDS/正丁醇/正辛烷的W/O微乳液中, CCL催化酯化反应速率约为在正辛烷/水两相体系中的24倍, 该SDS的W/O微乳液利于CCL起催化作用。而在AOT/正辛烷的W/O乳状液中, CCL催化反应速率与两相体系相近, 因为在含水量达9.09%(w/v)时,  $W_o \gg 60$ , AOT/正辛烷微乳胶束结构已经不存在, 此体系中水的性质与庞体水(bulky aqueous water)接近, 不利于酶促酯化反应的进行。

在SDS/正丁醇/正辛烷的W/O微乳液中酯化反应6h, 层析分离得44mg R- $\alpha$ -溴丙酸丁酯, 旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ 为18.2 (Cl,  $CHCl_3$ ), 光学纯度达99%。说明CCL在SDS的W/O微乳液中不仅能催化酯化反应, 其催化立体选择性也很好。

为进一步证实CCL在SDS的W/O微

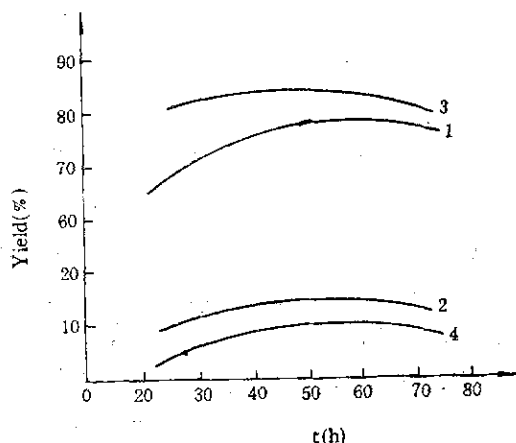


图4  $\alpha$ -溴丙酸酯化反应进程  
Fig.4 Time courses of  $\alpha$ -bromopropionic acid esterification

1. SDS/n-butanol/n-octane W/O microemulsion
2. AOT/n-octane emulsion
3. AOT/n-octane w/o microemulsion
4. Water/n-octane biphasic system

乳液中的催化作用, 与AOT/正辛烷的W/O微乳液( $W_o = 11$ )进行比较, 在(1)、(2)、(3)、(4)溶液中进行反应, 提取产物, HPLC测定其酸酯含量, 得反应时间与转化率关系曲线(见图4)。

图4表明CCL在SDS/正丁醇/正辛烷的W/O微乳液中的活性远大于其在两相体系中的活性, 同时, 在AOT/正辛烷

的W/O微乳液( $W_o = 11$ )中, CCL的催化活性较在SDS的W/O微乳液( $W_o = 42$ )中还要大。这是因为AOT体系中含水量减小到一定量时, 能形成稳定乳状液, 酶就可进入胶团水核中, 避免了酶与有机溶剂的直接接触, 减少酶变性的可能, 并增强了酶与底物的接触, 从而促使反应得以有效进行。

### 参 考 文 献

- [1] 李于佐, 杨伟华: 石油学报, 35(4):64, 1983.
- [2] Martinek, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 28:485, 1977.
- [3] Berezin, I. V. et al.: *Biocatalysis*, 9:1, 1987.
- [4] Luisi, P. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, 106:7285, 1984.
- [5] Tsai, S. W.: *Biotechnol. Bioeng.*, 33:206, 1991.
- [6] Mackay, R. A.: *Surfactants in Solution*, 3:1911, 1984.
- [7] Rattray, J. B. M.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 61:1701, 1984.
- [8] Qembou, B. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 106:2687, 1984.
- [9] European Patent, 1986, 25.
- [10] Menger, F. M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 100:4376, 1978.
- [11] Dekker, M.: *Anal. Biochem.*, 178:217, 1989.
- [12] Martinek, K. et al.: *J. Biochem.*, 155:453, 1986.
- [13] Martinek, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 981:161, 1989.
- [14] Castro, M. J. M. et al.: *Biotech. Adv.*, 6:151, 1988.
- [15] Ruckenstein, E.: *Biotech. Lett.*, 12:817, 1990.
- [16] 天津酶制剂厂等: 微生物酶制剂, 天津人民出版社, pp. 94—96, 1971.

## Catalysis of Hydrolysis of Ethyl Mandelate and Esterification of $\alpha$ -bromopropionic Acid by Lipase in Microemulsions

Xiao Huiping Liu Jun Li Zuyi

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai 200032)

*Candida cyclindracea* lipase was added into "sodium dodecyl sulfonate (AS)/n-butanol/n-octane" oil-in-water microemulsion and "sodium dodecyl sulfate (SDS)/n-butanol/n-octane" water-in-oil microemulsion to catalyze hydrolysis of ethyl mandelate and esterification of  $\alpha$ -bromopropionic acid with n-butanol respectively. The catalytic activity of CCL in the above microemulsions was higher than that in traditional oil/water biphasic systems. After hydrolysis for 48h, the conversion rate of reaction reached 90% and S-mandelic acid,  $[\alpha]_D^{20}$ -149.8( $C_{10}$ ,  $H_2O$ ), optical purity ca. 97%, was isolated. While esterification for 6h, the conversion rate of reaction reached 45%, and (R)- $\alpha$ -bromopropionic acid butyl ester,  $[\alpha]_D^{20}$  18.2( $Cl$ ,  $CHCl_3$ ), optical purity ca. 99%, was obtained.

**Key words** Microemulsion; lipase; hydrolysis; esterification