

红曲霉胞外脂酶催化己酸乙酯合成研究

刘光焯 卢世珩 黄德英 吴衍庸

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

己酸乙酯是浓香型曲酒的主体香味成分,也是曲酒优质品率低的主要限制因素。60年代 Iwai^[1]发现在适当条件下脂酶可直接催化酸和醇合成酯。Langrand^[2]比较了各种脂酶合成短碳链羧酸酯的能力。我们在对酒窖生香微生物的研究中发现红曲霉、根霉具有较强的己酸乙酯合成能力,属首次报道^[3]。本文主要报道利用红曲霉的脂酶合成己酸乙酯条件试验的结果。

1 材料和方法

1.1 产酶菌株

产酶菌株 A-8 来源于名优曲酒厂大曲,由本所名酒组分离,鉴定为烟色红曲霉 (*Monascus fuliginosus*)。

1.2 脂酶生成及制备

采用麸曲固态培养产酶,培养成熟后用磷酸缓冲液 (pH6.4, 0.05mol/L) 浸提得粗酶液。再经 6000r/min 离心 20min 去沉淀,在上清液中加入饱和度为 60% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析,静置过夜后再经 13000r/min 离心,收集沉淀并透析去离子,冷冻干燥后用于己酸乙酯合成。冻干酶粉比活为 850u/g。

1.3 酯化反应

酯化反应在带玻塞的容器中进行,所用试剂均预先用 0.3 μm 分子筛处理脱去水分,反应温度 30℃,振荡速率 120r/min,一定时间后取样分析己酸乙酯生成量。

1.4 分析测定方法

脂酶活性分析、酸和酯的测定均如以前所述^[3]。

2 结果和分析

2.1 各种介质中的酯化作用

比较了蒸馏水、磷酸缓冲液和几种有机溶剂中的己酸乙酯合成,部分结果列于表 1。蒸馏水中反应 144h,酯化率 0.5%,磷酸缓冲液中无己酸乙酯生成;有机烷溶剂中反应 72h 后,转化率均大于 40%,环己烷中的酯化效果最好。

2.2 水分含量对酯化的影响

酯化结果如表 2 所示。己酸乙酯产量以不加水中最高,含水量 1g/L 的反应液中略低。含水量增高则己酸乙酯生成大大降低,但含水量 50g/L 的反应液中酯化效果较 10g/L 的好,此种趋势与 Monot^[4]

表 1 各种介质中己酸乙酯的合成

介质	己酸乙酯 (mol/L)	酯化率 (%)
磷酸缓冲液	0	0
蒸馏水	0.001	0.5
异辛烷	0.13	51
正庚烷	0.1	41
正己烷	0.17	68
环己烷	0.19	77

注:己酸、乙醇浓度均为 0.25mol/L,反应温度 30℃。

的酯化结果相近。

2.3 底物浓度对酯化的影响

结果见表 3。由表知己酸、乙醇浓度均为 0.25mol/L 时酯化率较高, 但己酸乙酯产量不高; 浓度均为 1.0mol/L 时己酸乙酯生成较多, 但酯化率太低; 因而己酸、乙醇浓度都以 0.5mol/L 为宜。

2.4 温度对酯化的影响

酯化反应在不同温度下进行。己酸、乙醇浓度均为 0.5mol/L, 其余条件同表 3。实验结果见图 1。结果表明酯化反应的温度范围在 20~35℃, 最适温度为 28℃, 在 15℃ 和 40℃ 时仅有微量己酸乙酯生成。

2.5 脂酶用量对己酸乙酯合成的影响

反应温度 28℃, 其余条件同 2.4 节。实验结果见图 2。己酸乙酯生成量随用酶量增加而增加。反应 48h, 用酶量 10g/L 的酯化率达 98%, 其已

表 2 水分含量对己酸乙酯合成的影响

含水量 (g/L)	己酸乙酯 (mol/L)	酯化率 (%)
0	0.17	68
1	0.165	66
10	0.03	12
50	0.07	28

注: 环己烷中反应, 己酸、乙醇浓度均为 0.25mol/L, 反应温度 30℃, 24h。

表 3 底物浓度对己酸乙酯合成的影响

底物浓度 (mol/L)	己酸乙酯 (mol/L)	酯化率 (%)
0.25	0.23	92
0.5	0.42	84
1.0	0.45	45
2.0	0.17	8

注: 环己烷中反应, 温度 30℃, 48h。

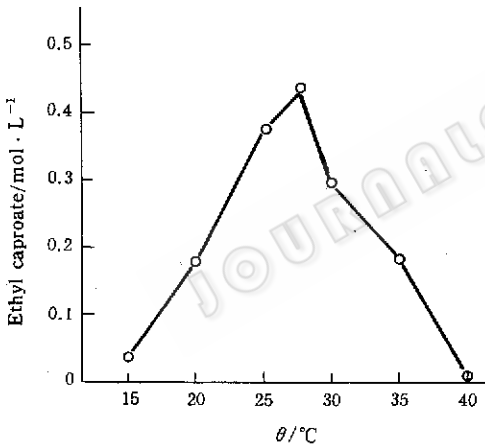


图 1 温度对己酸乙酯合成的影响

酸乙酯生成量为用酶量 5g/L 时的 1 倍多, 后者继续反应虽延长到 96h 以上, 方可达到前者的产酯水平。

2.6 脂酶在有机溶剂中的稳定性

试验用脂酶在有机溶剂中不溶解, 易于回收。用回收后的脂酶, 经连续 5 次重复使用, 己酸乙酯酯化率均维持在 90% 以上。

3 讨论

有机相中的酯合成反应易受溶剂种类的影响, 原因是在不同溶剂中, 酶的底物专一性发生了变化^[5]。本项实验经比较选择环己烷为反应介质, 其优点为己酸乙酯转化率高, 对脂酶无毒害作用, 溶剂本身价格较低, 反应规模易于扩大。但己酸乙酯的转化速率还需进一步加快, 提高酶制剂比活可能有利

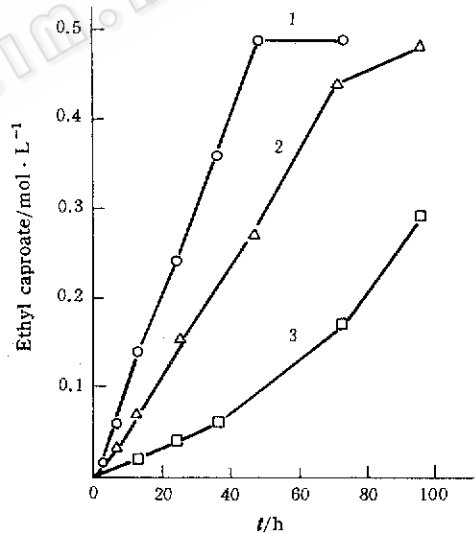


图 2 脂酶用量对己酸乙酯合成的影响
酶的用量如下: 1. 10%, 2. 5%, 3. 1%

于反应快速进行。应用己酸乙酯的酶促合成方法, 有望解决全液法浓香型曲酒生产工艺中的生香难题。相关研究正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Iwai M, Okumura S, Tsujisaka Y. *Agric Biol Chem*, 1980, **44**: 2731~2732.
- [2] Langrand G, Rodot N, Triantaphylides C *et al.* *Biotechnol Lett*, 1990, **12**: 581~586.
- [3] 卢世珩, 刘光焯等. *微生物学通报*, 1994, **21**: 23~26.
- [4] Monot F, Borzeix F, Bardin M *et al.* *Appl Microbial Biotechnol*, 1991, **35**: 759~765.
- [5] Nishio T, Kamimura M. *Agric Biol Chem*, 1988, **52**: 2631~2632.

Ethyl Caproate Synthesis by Extracellular Lipase of *Monascus fuliginosus*

Liu Guangye Lu Shiheng Huang Deying Wu Yanyong
(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

Abstract The ethyl caproate synthesis by lipase from *Monascus fuliginosus* was investigated in cyclohexane. The temperature for esterification ranged from 20°C to 35°C and the optimum reaction occurred at 28°C. The optimum concentration of ethanol and caproic acid was 0.5mol/L. Less moisture or more lipase amount favoured ethyl caproate synthesis. The conversion rate reached 98% under the optimum conditions after 48 hours.

Key words Ethyl caproate, lipase, organic solvent