

固定化脂肪酶催化聚乙二醇脂肪酸酯的合成

寇秀芬 徐家立

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 固定化假丝酵母(*Candida* sp.)-1619 脂肪酶催化脂肪酸和不同聚合度的乙二醇形成酯。其中以聚乙二醇 400(PEG400)的酯化率较高, $C_{10} - C_{18}$ 的饱和脂肪酸与 PEG 400 反应的酯化率相仿。反应体系中, 月桂酸与 PEG400 的摩尔比大于 2:1 时有利于酯化反应, 作用的最适温度为 40℃, 最适 pH 为 6.0。在比较的 30 种添加有机溶剂中, 饱和烷烃、芳香烃能促进反应, 使酯化率提高 20% 左右。反应开始添加 5 μ l 水有利于酶的作用, 外加水量超过适量时, 随外加水量的增加酯化率下降。在由 2.5mmol 月桂酸, 1.25mmol PEG400, 10mg 固定化脂肪酶(100u), 5ml 己烷, 5 μ l 水组成的反应体系中, 40℃ 振荡反应 22h, 酯化率达 49.8%。经薄层色谱, 气相色谱鉴定, 产物为聚乙二醇 400 月桂酸酯。

关键词 固定化假丝酵母脂肪酶, 酯化, 聚乙二醇 400 月桂酸酯

酶在有机溶剂中催化化学反应是 80 年代发展起来的新兴研究领域, 进展很快, 有些应用已进入商品化^[1,2]。用脂肪酶在有机相中已合成了糖酯等表面活性剂^[3,4], 作为食品乳化剂已引起人们的关注^[5,6]。我们用固定化假丝酵母-1619 在己烷中酯化脱水缩合制备了聚乙二醇 400 月桂酸酯, 该化合物是一种非离子型表面活性剂, 毒性低微, 可作分散剂, 乳化剂, 柔软剂, 纺织和染色的助剂及家用洗涤剂的添加剂。这种产品的传统生产方法是用月桂酸与环氧乙烷通过化学加成反应^[7]或在高温、高压有催化剂存在下由月桂酸和聚乙二醇 400 直接酯化制得^[8]。而用脂肪酶在常温、常压, 十分温和的条件下合成了该化合物。本文报道固定化脂肪酶合成聚乙二醇 400 月桂酸酯的酯化条件。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂: 月桂酸, 聚乙二醇(PEG), 乙烷等为北京化工厂产品。

1.1.2 仪器: 振荡器为 G24 Environmental Incubator Shaker, 美国 New Brunswick Scientific Co. Inc. 转速为 150r/min。

1.2 方 法

1.2.1 固定化脂肪酶, 以涤棉布为载体, 用吸附法制备: 定量的载体与共固定物混合, 烘干后, 按 1g 载体加 1ml 的酶液(10 000u)上酶, 40℃ 干燥 24h。

1.2.2 聚乙二醇月桂酸酯的合成。基础反应体系: 100ml 带塞的锥形瓶中, 加入 2.5mmol 月桂酸, 1.25mmol 聚乙二醇 400, 10mg 固定化脂肪酶(100u), 5ml 己烷, 5 μ l 水,

40℃ 振荡反应 22h。

1.2.3 酯化率的测定: 反应结束后, 加入 7.5ml 乙醇, 以酚酞为指示剂, 用 0.2mol/L KOH 滴定, 以反应体系中的脂肪酸减少计算出酯化率。

1.2.4 产物的提取: 反应液中加入 20ml 己烷, 以酚酞为指示剂, 用 5mol/L NaOH 中和残留的脂肪酸, 分层后取上层提取液, 在 60℃ 水浴中抽真空去掉己烷, 得白色膏状产物。

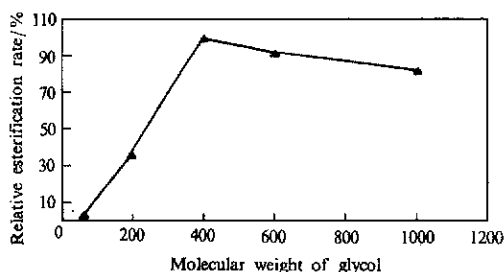


图 1 乙二醇的分子量对酯化的影响

Fig. 1 Effect of molecular weight of glycol on esterification

Reaction system: 1. 25mmol PEG 200, 400, 600 and 1000, 2. 5mmol lauric acid, 10mg (100units) immobilized lipase 5ml hexane, 5 μ l water, 40℃ shaken for 22h

行酯化反应, 结果以聚乙二醇 400 (PEG400) 的脂化率最高。聚乙二醇 600 和聚乙二醇 1000 也有较高的酯化率(图 1)。

2.2 不同脂肪酸对酯化反应的影响

在基础反应体系中, 用各种不同的脂肪酸与 PEG400 进行反应, 结果见图 2。由图 2 可见, 从丁酸到癸酸随着碳链的增长酯化率升高, $C_{10} \sim C_{18}$ 的饱和脂肪酸酯化率相仿, C_{20} 以上的脂肪酸随着碳链的增长酯化率降低。不饱和脂肪酸中, 油酸、亚油酸都有较高的酯化率。

2.3 温度对酯化反应的影响

在基础反应体系中, 不同温度下进行酯化反应, 发现酯化的合适温度为 35 ~ 50℃ (相对酯化率在 90% 以上), 最适温度为 40℃。

2.4 pH 对酯化反应的影响

用二种方法制备不同的 pH 梯度。一种是将 50 μ l 不同 pH 的磷酸盐缓冲液 (0.1mol/L) 加到 10mg 固定化酶上, 室温干燥 1d 后使用。另一种是将上述不同 pH 梯度的缓冲液 50 μ l, 在反应前加入到基础

1.2.5 产物分析: a. 薄层层析: 产物溶于乙醇中 (10mg/ml), 取 30 μ l 点样于硅胶 GF254 薄板上, 上行展开 (30min)。展开剂为石油醚: 乙醚: 乙酸 (80:30:1), 取出的薄板干后, 喷 20% 硫酸, 置 105℃ 下显色。b. 气相色谱分析: 日本岛津 GC-7A 气谱议, SE-30 柱, 进样量 5 μ l, 载气体为氮气, 流速 33ml/min, 柱温 250℃。

2 实验结果

2.1 乙二醇的分子量对酯化的影响

在基础反应体系中, 醇部分为乙二醇, 聚乙二醇 200, 400, 600 和 1000 与月桂酸进

行酯化反应, 结果以聚乙二醇 400 (PEG400) 的脂化率最高。聚乙二醇 600 和聚乙二醇 1000 也有较高的酯化率(图 1)。

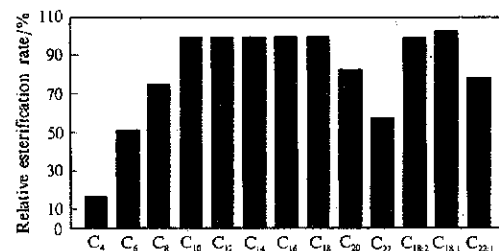


图 2 不同脂肪酸对酯化反应的影响

Fig. 2 Effect of different fatty acids on esterification
Reaction system: 2. 5mmol fatty acid 1.25mmol PEG 400, 10mg (100 units) immobilized lipase, 5ml hexane, 5 μ l water, 40℃, shaken for 22 h

Fatty acids: Butyric acid (C₄), Caproic acid (C₆), Caprylic acid (C₈), Capric acid (C₁₀), Lauric acid (C₁₂), Myristic acid (C₁₄), Palmitic acid (C₁₆), Stearic acid (C₁₈), Arachidic acid (C₂₀), Behenic acid (C₂₂), Oleic acid (C_{18:1}), Linoleic acid (C_{18:2}), Erucic acid (C_{22:1})

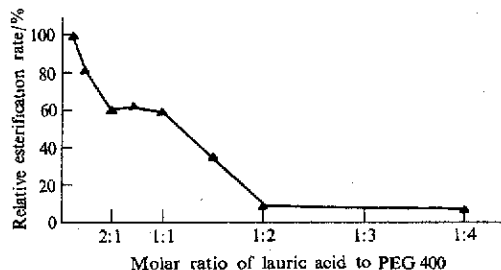


图3 底物摩尔比对酯化反应的影响

Fig. 3 Effect of molar ratio of substrates on esterification
Reaction system: 2.5mmol lauric acid, 10mg immobilized lipase (100u), 5ml hexane, 5 μ l water, amount of PEG400 from 0.3mmol to 10mmol 40 $^{\circ}$ C shaken for 22 h.

反应体系中,结果发现,两种不同方法制备的 pH 梯度的酯化率趋势相符,合适的 pH 为 5.0~7.0(相对酯化率在 90% 以上),最适 pH 为 6.0。

2.5 底物摩尔比对酯化反应的影响

在基础反应体系中,改变 PEG400 的用量,使两种底物的摩尔比不同,结果见图 3。在脂肪酸与 PEG 400 的摩尔比大于 2:1 时,有利于酯化反应。但是,摩尔比小于 1:1 时,酯化反应明显受阻。

2.6 有机溶剂对酯化反应的影响

在基础反应体系中,以同体积的不同有机溶剂代替己烷,反应结果见表 1。从表 1 中可见,在实验比较的 30 种有机溶剂中,饱和烷烃,芳香烃对酯化有促进作用,而氯代烃中,只有在四氯化碳中可以进行反应。

表 1 有机溶剂对酯化反应的影响

Table 1 Effect of solvents on esterification

Solvents	Esterification rate/%	Solvents	Esterification rate/%
None	39.3	Dichloromethane	0.0
Benzene	40.0	Trichloromethane	0.0
Toluene	45.5	Carbon tetrachloride	24.8
Xylene	46.3	Trichloroethylene	0.0
n-Hexane	49.8	Tetrachloroethane	0.0
Cyclohexane	45.6	Tert-butyl alcohol	0.0
Heptane	48.8	Isopropyl alcohol	0.0
Octane	49.6	Acetone	0.0
Trimethyl pentane	49.6	Pyridine	0.0
Nonane	46.6	Dimethyl sulfoxide	0.0
Decane	48.8	Formamide	0.0
Dodecane	48.8	Acetonitrile	0.0
Tridecane	48.0		
Tetradecane	46.4		
Hexadecane	47.6		
Squalane	44.6		
Petroleum ether	48.0		
Paraffin liquid	43.0		

2.7 添加水量对酯化反应的影响

在以前的实验中,发现水明显地影响油酸油醇酯的水解^[10]。反应体系中添加不同量的水取代基础反应体系中所含的水(5 μ l),结果见图 4。当反应体系中外加水量超过 5 μ l 时,随外加水量的增加酯化率降低。

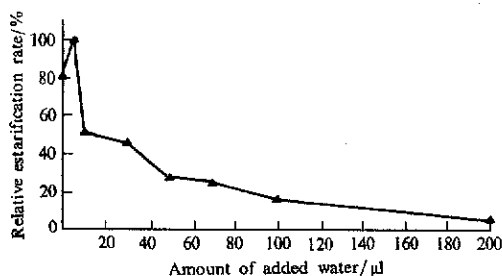


图 4 外加水量对酯化反应的影响

Fig. 4 Effect of added water on esterification

Reaction system: 2. 5mmol lauric acid, 1. 25mmol PEG400, 10mg immobilized lipase (100u), 5ml hexane, amount of added water: from 0 to 200 μl , 40 $^{\circ}\text{C}$ shaken for 22 h

2.8 酯化反应时程

在基础反应体系中,固定化酶的用量为 20, 50, 100, 200, 400 单位的酯化反应时程见图 5。由图 5 可见,400 单位的酶量,8h 酯化率达最高水平(50%),用 20 单位的酶量,延长反应时间,48h 酯化率也能达到同样水平。

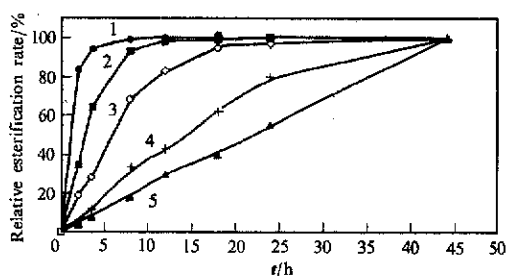


图 5 酯化反应时程

Fig. 5 Time courses of esterification

1. 400u, 2. 200u, 3. 100u, 4. 50u, 5. 20u

Reaction system: 2. 5mmol lauric acid, 1. 25mmol PEG400, 5ml hexane, 5 μl water, enzyme amounts from 20u to 400u, 40 $^{\circ}\text{C}$ shaken



图 6 反应产物的薄层色谱

Fig. 6 Thin layer chromatogram of reaction product

1. Lauric acid, 2. Product, 3. Reaction mixture

Development system: Petroleum ether: Diethyl ether: Acetic acid(80:30:1) Visualization by 20% H_2SO_4

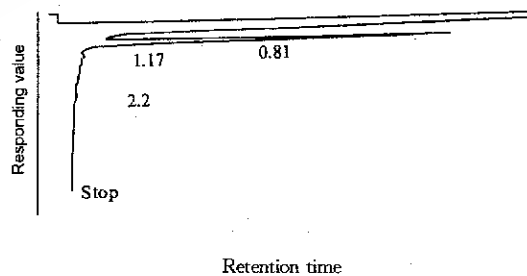


图 7 反应产物的气相色谱

Fig. 7 The gas chromatogram of reaction product

SE-30 column, 5 μl samples, Carrier gas: N_2 , flow rate: 33ml/min, Column temperature: 250 $^{\circ}\text{C}$

2.9 产物分析

酯化率为 49.8% 的反应液,经薄层色谱检测,分别出现 R_f 值为 0.57 和 0.96 的二个点,碱中和残留的脂肪酸后,己烷提取产物的 R_f 值为 0.96,标准月桂酸 R_f 值为 0.57(图 6)。己烷提取产物经气相色谱分析出现单一峰(图 7)。

3 讨 论

随着反应的进行,PEG400 月桂酸酯在反应体系中不断积累,由于 PEG400 和月桂酸的亲水、亲脂性不同,使酯化反应体系的状态发生变化,这也许是酯化率不能进一步提高的原因之一。此外,酯化反应中生成的水也影响酯化率的提高。

在外加水的实验中,外加水量超过 $5\mu\text{l}$ 时,水解反应明显影响反应平衡,随着外加水量的增加酯化率降低,看来水是一个很重要的影响反应平衡的因素。在本实验反应体系中,酯化率只能达到 50% 左右,但也看出,有过量脂肪酸存在时,有利于反应向酯化方向进行,要进一步提高酯化水平,还要优化酯化条件,如通过反应过程不断去掉生成水,改变底物摩尔比等途径,以打破反应平衡,使酯化率进一步提高,这些研究结果将在下文中报道。

参 考 文 献

- [1] Zaks A, Russel A. J Biotechnol. 1988, 8:259~279.
- [2] Hirata H, Higuch K. J Biotechnol. 1990, 14(2):157~167.
- [3] Douglas, B Sarney, Evgeny, Vulfson N. TIBTECH, 1995, 13(5):164~172.
- [4] Mutua Lydiam, Akoh Casimir G. J Am Oil chem Soc. 1993, 70(1):43~46.
- [5] Fregapene G, Sarney D B, Vulfson E N. Enzyme Microb Technol. 1991, 13:796~800.
- [6] Vulfson E N, Baw B A. J Chem Biotechnol. 1993, 56:409~413.
- [7] 赵国玺编. 表面活性剂物理化学, 北京:北京大学出版社, 1991, p. 95.
- [8] 殷宗泰编. 精细化工概论, 北京:化学工业出版社, 1985, p. 45.
- [9] 张 军, 徐家立. 吉林大学自然科学学报, 1993, (特刊)p. 4~5.
- [10] 张 军, 徐家立. 生物工程学报, 1995, 11(4):325~331.

Synthesis of Polyethylene Glycol Fatty Acid Esters by Immobilized Lipase

Kou Xiufen Xu Jiali

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Immobilized lipase from *Candida* sp. 1619 on trueran was used to catalyze fatty acids and polyethylene glycols(PEGs) to form the corresponding esters. Among them, the highest esterification rate was obtained with PEG400 as alcohol. The nearly same esterification rates were obtained when fatty acids with carbon chain length from $C_{10} \sim C_{18}$ reacted with PEG400. The esterification of lauric acid with PEG400 at a molar ratio of more than 2:1 showed good results. The optimal reaction temperature and pH was 40°C and 6.0, respectively. Among the added solvents, hydrocarbons and aromatic hydrocarbons increased the esterification rate up to 20%. It was in favor to start the reactions by adding $5\mu\text{l}$ of water, but the esterification rates decreased with increasing the amount of added water. In the reaction system that composed of 2.5mmol lauric acid, 1.25mmol PEG400, 100units immobilized lipase(10mg), 5ml hexane and $5\mu\text{l}$ water, shaken at 40°C for 22 h, the esterification rate reached 49.8%. The esterified product was identified as PEG400 laurate by means of TLC and GC.

Key words Immobilized lipase, esterification, PEG400 laurate