

# 脂肪酶合成聚乙二醇<sub>400</sub>油酸单酯和双酯的影响因素

寇秀芬 徐家立

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 研究了固定化假丝酵母(*Candida sp.*)-1619 脂肪酶合成聚乙二醇<sub>400</sub>油酸单酯与双酯的影响因素。不同摩尔比的底物反应 6h 都有单酯和双酯生成。酸与醇的摩尔比为 0.25:1 到 2:1 时,生成单酯与双酯的比例在 3.5:1 到 4:1 的范围内;当酸与醇的摩尔比达到 3:1 至 8:1 时,单、双酯的生成量相仿。反应达平衡时(24h),不同摩尔比底物的反应产物都是双酯。在含己烷的反应体系中,反应平衡时有单酯存在,摩尔比为 2:1 时,反应物中单、双酯比达到 1:3.2。

**关键词** 固定化脂肪酶,聚乙二醇<sub>400</sub>油酸单酯和双酯

**分类号** Q132 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0301-04

前文报道了固定化假丝酵母(*Candida sp.*)-1619 脂肪酶合成聚乙二醇脂肪酸酯化条件<sup>[1]</sup>,及在无溶剂系统中酯化条件的优化<sup>[2]</sup>。聚乙二醇<sub>400</sub>脂肪酸酯是一种非离子表面活性剂,无毒、无味、对皮肤无刺激作用、可以被生物完全降解,广泛用于洗涤剂,化妆品,纺织,农业,医药等领域。实验中发现,在酯化程度较高的情况下,产物为聚乙二醇<sub>400</sub>脂肪酸双酯。但是,单酯和双酯亲油和亲水的性能有差异,应用的领域、范围也不同。聚乙二醇<sub>400</sub>脂肪酸单酯分子中含有一个亲水羟基,有更好的乳化性能和乳化稳定性。通过改变底物的克分子比、控制反应时间和反应体系中添加己烷,可以使酯化反应趋向合成单酯。本文报道这一研究的结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂:** 聚乙二醇 400(PEG<sub>400</sub>),油酸,己烷为北京化工厂产品;脂肪酶( $19 \times 10^4$ u/g)为本实验室制备。

**1.1.2 仪器:** 震荡器为 G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc. U. S. A.;薄层色谱扫描分析仪为日本岛津 CS-910 双波长扫描仪,波长 400nm 处扫描。

### 1.2 方法

**1.2.1 固定化脂肪酶:** 按文献[3]报道的方法,以涤棉布为载体,吸附法制备。每克固定化脂肪酶 20000 单位。

**1.2.2 PEG<sub>400</sub>油酸酯的合成:** 反应体系中的油酸和 PEG<sub>400</sub>总量为 2.36g,改变 2 种底物

的量使其摩尔比不同,加入 100mg 固定化脂肪酶(2000u)和 0.2mL 水,在 100mL 锥形瓶中,40℃ 震荡(150r/min)反应。

**1.2.3 酯化率的测定:** 以反应体系中脂肪酸量的减少计算酯化率<sup>[1]</sup>。

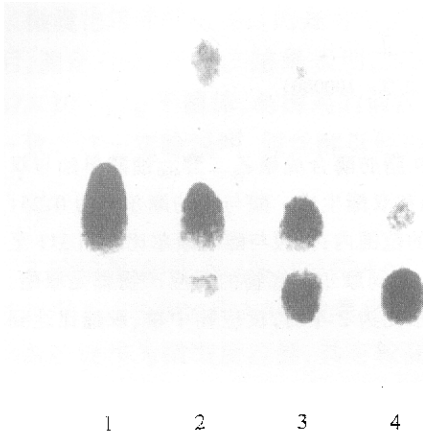


图 1 不同反应时间反应物的薄层色谱

Fig.1 TLC of products from different reaction times

Reaction system: 5.0mmol oleic acid, 2.5mmol PEG<sub>400</sub>, 20mg Immobilized lipase (400u), 0.2mL water, in 100mL conical flask without plug, shaken at 40℃ for 1.0h, 2.6h, 3.12h, 4.24h.

24 h, 结果(见图 1)可见,反应 6 h 产物中有单酯也有双酯。但是,随反应时间的延长,产物中的单酯逐渐减少,而双酯逐渐增加。当反应达平衡时(24 h),反应产物是双酯。

## 2.2 摩尔比对单、双酯形成的影响

在反应体系中,油酸与 PEG<sub>400</sub>的摩尔比分别从 0.25:1 到 8:1。反应 6h 后,分别取摩尔比为 0.25:1, 2:1 和 4:1 的反应液进行薄层色谱检测并进行薄层扫描分析,结果(见图 2)可见,在反应 6h,不同底物摩尔比的反应产物中都有单酯和双酯。摩尔比从 0.25:1 到 2:1,单酯和双酯的比例在 3.5:1 到 4:1 的范围内。酸与 PEG<sub>400</sub>的摩尔比达 4:1 时,单酯与双酯的比例相仿,摩尔比提高到 8:1,所得结果与摩尔比为 4:1 时相近。

## 2.3 有机溶剂对单、双酯形成的影响

在油酸和 PEG<sub>400</sub>的摩尔比为 0.25:1, 2:1 和 4:1 的反应体系中,添加 5mL 己烷,分别反应 6h。薄层色谱检测和扫描分析的结果表明,在己烷中,不论醇过量还是酸过量时,形成单、双酯比例近 6:1。即使延长反应时间,反应达平衡时(24h),以化学计量的反应产物中仍有近 30%的单酯(单、双酯比例为 1:3.2)这和无溶剂反应体系中全部是双酯的结果不同(参阅 2.1)。

## 2.4 PEG<sub>400</sub>油酸双酯的水解

不同水解反应时间的样品,经薄层色谱分析,产物为 PEG<sub>400</sub>油酸单酯和油酸(图 3)。

**1.2.4 薄层色谱分析:** 按前文报道的方法进行<sup>[2]</sup>。30μL 样品(20mg/mL)点样于 GF<sub>254</sub> 硅胶板上(10cm × 10cm),分 2 次上行展开。第 1 次用氯仿:甲醇:水(60:10:1)溶液展开到 2.2cm 处,第 2 次氯仿:甲醇:乙酸(97.5:2.5:1)溶液展开到 7.5cm 时取出,干燥后,喷 2.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 乙醇溶液后,105℃ 10 min 显色。

**1.2.5 双酯的水解:** 在 100 mL 锥形瓶中加入 0.8g PEG<sub>400</sub> 油酸双酯,0.8 mL 0.1 mol/mL 磷酸盐缓冲液(pH 8.0),100mg 固定化脂肪酶(2000u),40℃ 震荡反应。

## 2 实验结果

### 2.1 反应时间对单、双酯形成的影响

在油酸与 PEG<sub>400</sub>的摩尔比为 2:1 (化学计量)反应体系中,反应 6, 12 和

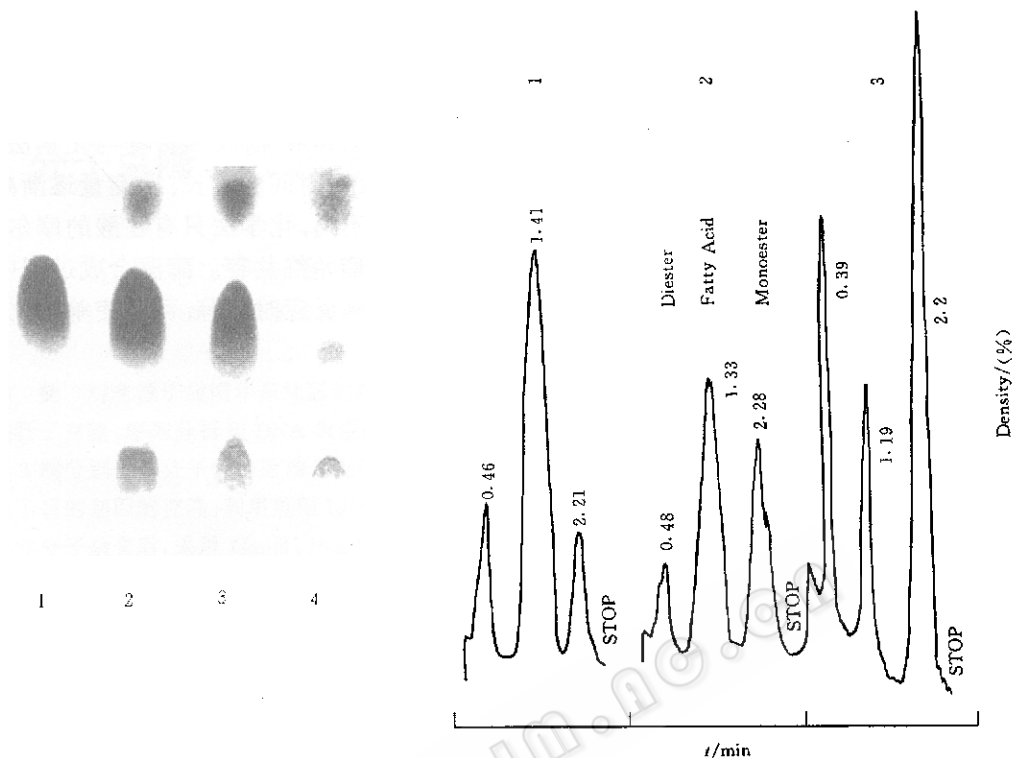


图2 不同摩尔比反应物的薄层色谱(a)和 TLC 扫描图谱(b)

Fig. 2 TLC of products from different molar ratio of substrates(a) and TLC scanning chromatogram(b)

The molar ratio of oleic acid to PEG<sub>400</sub> were 0.25:1 to 8:1, shaking at 40°C for 6h.

Molar ratio of oleic acid to PEG<sub>400</sub>: 1. Oleic acid, 2. 4:1, 3. 2:1, 4. 0.25:1

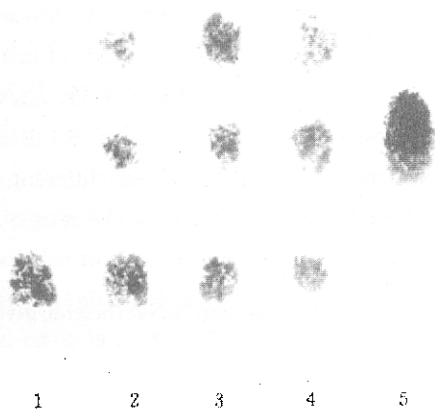


图3 聚乙二醇<sub>400</sub>油酸双酯水解产物的薄层色谱

Fig. 3 TLC of hydrolyzed products from PEG<sub>400</sub> oleate diester

Reaction system: 0.8g diester, 0.8mL 0.1mol/L phosphate buffer(pH 8.0), 100mg immobilized lipase, shaken at 40°C. 1. 0h, 2. 2h, 3. 4h, 4. 8h, 5. Oleic acid

### 3 讨 论

固定化假丝酵母(*Candida sp.*)-1619 脂肪酶催化聚乙二醇<sub>400</sub>和油酸形成酯。在无溶剂系统不同底物摩尔比条件下,反应 6h 产物中均有单酯和双酯,反应产物与化学法制备的相仿<sup>[4]</sup>。单酯在实验所用的反应体系中不稳定,随反应时间的延长,单酯量逐渐减少,反应达平衡时,反应产物都是双酯,这个结果与化学法不同,化学法只有在酸的摩尔数较高时,最终结果双酯比例才升高<sup>[4]</sup>,反应液中单酯和双酯始终共存。酶法合成过程中,通过酯化条件的调节,例如:添加溶剂,或采用醇过量,控制反应时间等,可以使单酯比例明显增加,但还不能做到反应物全部为单酯。

### 参 考 文 献

- [1] 寇秀芬,徐家立. 生物工程学报, 1996, 12(增刊): 131~135.
- [2] Kou X. F., Xu J. L. 生物工程学报. 1997, 13(3): 289~293.
- [3] 张 军,徐家立. 生物工程学报. 1995, 11(4): 325~331.
- [4] R. W. 约翰逊, E. 费里兹 著, 陆用海, 胡征宇译. 工业脂肪酸的应用. 北京: 中国轻工出版社, 1992, p. 228.

## Factors Influencing the Synthesis of Polyethelene Glycol<sub>400</sub> Oleate Mono- and Diester by Lipase

Kou Xiufen Xu Jiali

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

**Abstract** The factors influencing the synthesis of polyethelene glycol<sub>400</sub> oleate mono- and diesters by immobilized lipase from *Candida sp.*-1619 were investigated. Mono- and diesters were formed after 6h reaction with different molar ratio of the substrates. The ratio of monoester to diester formed was in the ranging of 3.5:1 to 4:1, when the molar ratio of acid to PEG<sub>400</sub> was from 0.25:1 to 2:1. Almost equal amounts of mono- and diesters were produced when the molar ratio of acid to PEG<sub>400</sub> was 3:1 to 8:1. Only diester was found in reaction mixture with different molar ratio of the substrates when the equilibrium of reaction have been reached (22h). The ratio of mono- to diester was 1:3.2 in the reaction system containing hexane even the molar ratio of substrates was 2:1.

**Key words** Immobilized lipase, solvent-free system, polyethelene glycol<sub>400</sub> oleate, monoester and diester