

# 有机相中微生物脂肪酶合成 短链脂肪酸酯的研究

徐 岩 王亚非 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

**摘要** 用微生物脂肪酶在溶剂相中合成短链脂肪酸酯的研究表明: 脂肪酶在正庚烷中催化合成短链脂肪酯转化率比水相中有明显的优势。在10个不同来源的商品脂肪酶中, 来自 *Mucor miehei*, *Candida rugosa* 和 Porcine pancreas 的脂肪酶合成酯转化率较高, 其中 *Mucor miehei* 脂肪酶对己酸乙酯48 h 合成转化率达94%, 己酸乙酯产量33.84 g/L。同时就底物酸和醇的碳链长度对酯转化率的影响进行了研究。

**关键词** 脂肪酶; 酯化反应; 非水相; 短链脂肪酸酯

**中图分类号** TQ 929

## 0 前 言

近十几年来随着酶在非水相反应理论不断深入, 利用酶反应条件温和、转化率高等优点, 微生物脂肪酶新的应用领域被不断开拓<sup>[1, 2]</sup>。

短链芳香脂呈天然水果香味, 是香精、香料的重要组份。广泛应用于食品、饮料、医药等工业。目前的生产方式主要是在无机催化剂存在条件下化学合成, 还有极少量是从天然植物中分离提取。尽管化学合成的方法目前还比较经济, 但是人们对天然产物和高品质产品兴趣的逐渐增强, 而从植物中提取又无法满足日益增长的需求的情况下, 人们转向用生物技术的方法生产。用生物技术生产可分成微生物法和酶法两种<sup>[3]</sup>。微生物直接发酵合成的芳香酯由于代谢产物复杂, 生产周期长, 产物浓度低, 提取分离困难等无大规模工业化应用。酶法产生的芳香酯被认为是高质量天然产品, 加上酶法反应条件温和、转化率高等优点而吸引了许多人的研究<sup>[4-8]</sup>, 被看成为是很有希望工业化的途径。荷兰的 Unichema International 公司于1990年发明专利, 并在第2年推出“Bioester”的系列生物酯商品, 批次生产规模已上几吨, 另外 Croda Universal Ltd 用 *Candidal rugosa* 生产蜡酯<sup>[9]</sup>。国内也开始注意脂肪酸酯合成的研究<sup>[10, 11]</sup>。

我们用微生物脂肪酶在溶剂相中酯化合成我国食品、饮料工业中常用短链脂肪酸酯, 旨在寻求新的生物合成的途径。

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料与amp;仪器

**1.1.1 脂肪酶** MML (*Mucor miehei*) Novo Nordisk 公司, CRL1 (*Candida rugosa*) Sigma 公司, CSL (*Candida sp*) 国产, PPL (Porcine pancreas) Sigma 公司, CLL (*Candida lipolytica*) 无锡酶厂, CRL2 (*Candida rugosa*) Amano Seiyaku 公司, PSL (*Pseudomonas sp*) Amano Seiyaku 公司, PNL (*Phycomyces nitens*) Takeda Yakuhin 公司, MJL (*Mucor javanicus*) Amano Seiyaku, ANL (*Aspergillus niger*) Novo Nordisk 公司。

**1.1.2 化学试剂** 均为国产试剂产品,使用前用3 Å分子筛除水。

**1.1.3 摇床** HYG 回转式恒温调速摇瓶柜,上海医药工业研究院

**1.1.4 气相色谱仪** SP-3700,北京分析仪器厂

## 1.2 方法

**1.2.1 脂肪酶水解活力测定** 用乳化液法,4 ml 4%的PVA(聚合度1750)橄榄油乳化液和5 ml 0.025 mol/L pH 7.0磷酸缓冲液1 ml 酶液,37 °C反应15 min后,加入15 ml 95%乙醇终止反应,用0.05 mol/L NaOH溶液滴定,酚酞为指示剂。

**1.2.2 脂肪酶合成酯反应体系** 100 ml具塞三角瓶中将0.25 mol/L短链脂肪酸及0.25 mol/L乙醇和15 ml正庚烷组成酯化反应体系。加入酶粉,30 °C条件下150 r/min旋转振荡。定时取样分析检测。

**1.2.3 脂肪酶合成活力的测定和转化率计算** 将过滤后的样品100 μl加入10 ml水溶液中,用0.025 mol/L的氢氧化钠溶液滴定未反应的脂肪酸,以3滴1%酚酞为指示剂。计算脂肪酶的酯合成活力。

**1.2.4 气相色谱检测产物组成** 用25 m长的SE-30毛细管柱,氢火焰检测器,氮气为载气,柱前压5.88 Pa,尾吹30 ml/min,柱温条件是:50 °C,3 min,10 °C/min至150 °C,保持2 min。2-乙基正丁酸为内标,检测产物的含量。

# 2 实验结果

## 2.1 脂肪酶在水相和溶剂相中合成芳香酯能力比较

用MML, PPL, CRL1, CLL脂肪酶在同样反应条件下于正庚烷和水中合成己酸乙酯,比较反应转化率。见表1。

表1 脂肪酶在正庚烷和水中生成己酸乙酯的转化率和浓度

脂肪酶	正 庚 烷				水			
	1 h		48 h		1 h		48 h	
	酯转化率 (%)	浓度 /g L <sup>-1</sup>						
MML	48.57	17.49	96.26	34.65	7.10	2.56	21.43	7.71
PPL	+		34.48	12.41	+		+	
CRL1	3.50	1.26	72.40	26.06	4.70	1.69	4.50	1.62
CLL	3.50	1.26	5.5	1.98	18.06	6.50	20.48	7.37

+ 表示痕量

由表1可见,这四个酶在庚烷中催化合成己酸乙酯不论从转化率,还是反应的速度来看都明显地高于在水相的结果。其中, MML 在48 h 后,可产生34.65 g/L 的己酸乙酯,这个量远远地高于用微生物发酵生产<sup>[12]</sup>。这是由于在有机相中,酶催化反应的热力学平衡从分解反应转向其逆反应酯合成方向进行的结果<sup>[13]</sup>。另外,在相同的酶分解活力条件下,不同的酶表现出不同的酯化活力。

## 2.2 合成芳香酯的脂肪酶筛选

在研究中,我们比较了10种不同微生物来源的脂肪酶合成己酸乙酯的转化结果见表2。

表2 脂肪酶生成己酸乙酯的转化率和相对合成活力 %

脂肪酶	酯转化率	相对转化率	脂肪酶	酯转化率	相对转化率
MML	93.50	100	PNL	18.19	19.45
CRL1	86.25	92.25	MJL	16.00	17.11
PPL	89.02	95.21	ANL	8.50	9.09
CLL	32.56	34.82	PSL	87.06	93.11
CSL	61.2	65.45	CRL2	30.23	32.33

反应条件: 己酸浓度0.1 mol/L, 乙醇浓度0.15 mol/L, 正庚烷15ml, 脂肪酶0.1 g, 30 ~ 48 h 反应

从表2可见:不同的脂肪酶由于合成酯活力不同,己酸乙酯转化率是不同的。即使是同种微生物不同生产厂家的脂肪酶产品,如CRL 脂肪酶,酯合成的能力相差也较大。因此,脂肪酶品种是影响转化率的关键。其中MML, CRL1, PPL 和 PSL 酯化活力较高。

## 2.3 酯化反应的时间进程

用对己酸乙酯合成活力最高的MML 催化合成己酸乙酯,其反应进程见图1。

对合成的产物用气相色谱分析,见图2。

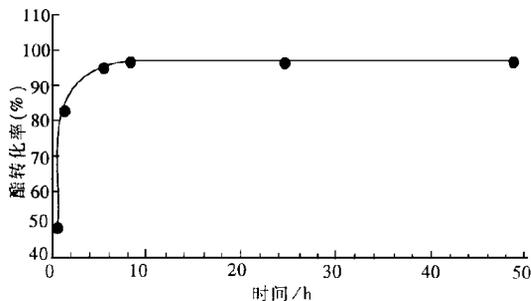


图1 合成己酸乙酯反应时间进程

反应条件: 0.1 g MML 加入含有0.25 mol/L 己酸和0.25 mol/L 乙醇的15 ml 庚烷中, 32

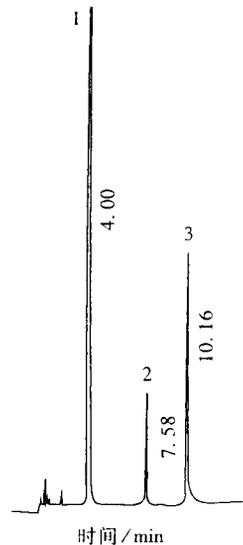


图2 气相色谱检测己酸乙酯合成的图谱

1- 正庚烷溶剂; 2- 2-乙酸正丁酸(内标); 3- 己酸乙酯

## 2.4 醇和酸碳链长度对合成转化率的影响

通过选择 C2~C8 的酸和 C1~C8 的伯醇来观察溶剂相中酶反应底物碳链长度对酯合成转化率的影响。从图3 结果可见, 底物醇、酸的碳链越长, 酯合成转化率越高。并且, 底物酸的影响要比醇来的大。乙酸酯转化率几乎不受醇碳数的影响。丙酸甲酯、乙酯的转化率很低, 其丙酯以上转化程度就很高。而丁酸从乙酯开始转化的程度就很高了。醇碳数几乎不影响戊酸以上的酯转化程度, 酯转化率也很高。

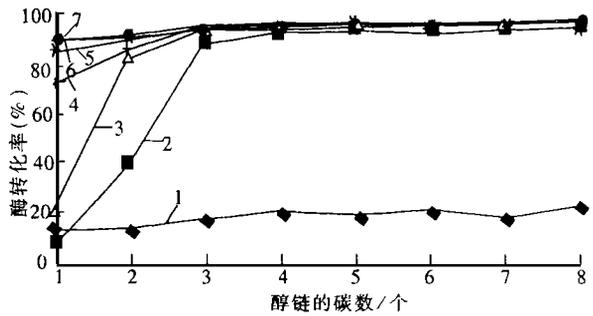


图3 醇和酸链长对酯合成的影响

1—乙酸; 2—丙酸; 3—丁酸; 4—戊酸;  
5—己酸; 6—庚酸; 7—辛酸

## 3 讨 论

1) 在研究中, 我们注意到溶剂相酶催化反应的关键还是脂肪酶的选择。不同微生物来源的脂肪酶在合成能力上相差很大。尽管脂肪酶催化的水解和酯化是一个反应的不同方向, 但水解活力表现高的酶并不能表明其酯合成活力强, 这与有机介质中酶结构变化而造成反应的热力学平衡方向的转变有关<sup>[14]</sup>。实验中, 我们观察过不加脂肪酶的反应情况, 同样的条件下, 虽然会有少量酯合成, 但量少到常规方法检测不出来。这也从另一个角度说明脂肪酶及其选择的重要性。

在溶剂相反应中, 脂肪酶合成活力与分解活力之间的关系还向我们提示了这么一个问题, 我们在选择高活力脂肪酶产生菌的筛子时往往是以其分解酯活力为标准的, 如何选择适合溶剂相中高酯化活力脂肪酶产生菌的筛选标准值得进一步研究。

2) 溶剂中酶微环境里, 脂肪酶对不同酯的合成表现出不同的转化率另一重要影响因素是底物醇、酸的极性。酸的碳数越少, 极性越强, 酯转化就越困难。酸的碳数增加, 酯转化程度普遍就高。醇的碳数影响就没有酸碳数的影响来的大。

3) 在此体系中, 其它一些影响因素另文报道。

致 谢

感谢 Novo Nordisk 北京办事处和中科院微生物所徐家立研究员赠送酶样品。

## 参 考 文 献

- 1 Dordick J S Principles and Applications of Nonaqueous Enzymology. New York: Marcel Dekker Inc, 1991: 1~52
- 2 Bell G, Halling P J. Biocatalyst behaviour in low water systems, TIBTECH, 1995, 13: 468~473
- 3 Armstrong D W, Gillies B, Yamazaki H. Natural Flavour Produced by Biotechnology Processing. New York: Elsevier Science Publishers B. V. 1989, 104~120
- 4 Gatfield I L. Bioformation of Flavour, Royal Society of Chemistry. UK: Cambridge, 1992, 171~185
- 5 Gatfield et al. Enzyme mediated Synthesis of Esters and Lactones. United States Patent 4451365. 1984

- 6 Welsh F W, Williams R E, Dawson K H. Lipase Mediated Synthesis of Low Molecular Weight Flavor. *Journal of Food Science*, 1990, 55: 1679 ~ 1682
- 7 Shieh C J, Akoh C C, Yee L N. Optimized Enzymatic Synthesis of Geranyl Butyrate with Lipases AY from *Candida rugosa*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 51: 371 ~ 374
- 8 Langrand G, Rondot N, Triantaphylides C, Baratti J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipase, *Biotechnology Letter*, 1990, 12: 581 ~ 586
- 9 Evgeny N Vulfson. *Lipase*. Cambridge University Press, UK. 1994, 271 ~ 288
- 10 张军, 徐家立. 固定化假丝酵母1619脂肪酶催化油酸油醇酯的合成. *生物工程学报*, 1995, 11(4): 325 ~ 331
- 11 刘光烨, 卢世珩, 黄德英, 等. 红曲霉胞外酯酶催化己酸乙酯合成研究. *生物工程学报*, 1995, 11(3): 288 ~ 290
- 12 Ruan W Q. The Proceedings of the 5th World Congress of Chemical Engineering. San Diego, 1996, (2): 398 ~ 401
- 13 Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science*, 1984, 224: 1249 ~ 1251
- 14 郭勇. 酶工程. 北京: 中国轻工业出版社, 1994, 227 ~ 228

## Short-Chain Aliphatic Ester Synthesis by Microbial Lipases in Nonaqueous Phases

Yan Xu      Kechang Zhang      Yafei Wang

( School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** Lipase mediated synthesis of flavor esters in heptane exhibited obviously higher productivity as compared with that in aqueous phase. Screening ten commercial lipases showed that lipases from *Mucor miehei*, *Candida rugosa*, porcine pancreas were more active in esterification. Among them, *Mucor miehei* lipases had higher activity for ester synthesis of ethyl hexanoate with 94% substrate conversion and 33.84 g/L in 48 h incubation. The effect of chain length of carboxylic acid and n-alcohol upon the degree of esterification has been obtained.

**Key words** lipase esterification; nonaqueous phase; short-chain aliphatic ester

(责任编辑: 陈 娇)