

文章编号: 1001-7453(1999)02-0050-05

脂肪酶非水相转化失水山梨醇油酸酯

王 栋¹, 徐 岩¹, 章克昌¹, 倪永全²

(1. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 无锡轻工大学化工系, 江苏无锡 214036)

摘要: 失水山梨醇单油酸酯 (Span80) 可在非水相中用脂肪酶酶促转化合成. 比较不同来源的脂肪酶和不同的非水相系统后发现: 来源于假丝酵母的脂肪酶 Novozym 435 在无溶剂系统中有较高合成 Span80 的能力. 同时考察了水分对酯化反应的影响, 并对酯化反应的条件如底物摩尔比、用酶量等进行了研究. 与化学合成的产品比较, 各项指标基本接近, 但酶法合成的产品单酯含量较高, 达 80% 以上.

关键词: 脂肪酶; 非水相; 无溶剂系统; 合成; 失水山梨醇单油酸酯

中图分类号: TQ423.22 文献标识码: A

失水山梨醇单油酸酯 (Span80) 作为一种非常重要的非离子型表面活性剂, 不仅具有良好的乳化性和稳定性, 而且无毒、无刺激; 其具有生物可降解性, 对环境无害; 原料来源广泛, 价格便宜, 已广泛地应用在纺织、造纸、皮革、塑料、农药等许多领域. 其优质产品在食品、医药、化妆品中也有应用. 传统的 Span80 通过化学酯化反应获得, 反应需高温, 易使产品色泽加深, 且单酯含量不高. 异常环境—非水相酶促反应的研究, 近来发展很快. 这种方法具有高效性和特异性, 反应条件温和且副产物较少. 但是由于糖或糖醇与脂肪酸的溶解性质相差较大, 近来许多研究都涉及寻找溶剂来溶解这两种底物^[1]. 但由于所用溶剂大多有毒, 其产品应用于食品、医药等领域安全性不高. Sarney 等人利用叔丁醇和正己烷形成的低沸点共沸物以酶法转化失水山梨醇酯, 产率较高^[2], 但反应过程复杂. 有报导长链脂肪酸的酯化反应多在无溶剂系统中进行^[3,4], 具有避免溶剂相、方法简单、易放大产业化等优点. 酯化反应是可逆反应, 在封闭系统中反应达到平衡后, 产物不可能继续增加. 反应中产生的水不仅影响反应的平衡, 在有机溶剂中也直接影响酶的催化活性. 有报导用分子筛、减压蒸发等方法^[1,2,4]除去酯化反应产生的水, 使反应朝合成的方向进行. Sarney 等人^[2]和 Ducret 等人^[5]利用回流的方法减压蒸发除去水分, 回收溶剂. 本文报导了利用脂肪酶在无溶剂系统中, 采用开放系统合成 Span80 的研究结果.

收稿日期: 1998-09-23; 修订日期: 1999-03-11

基金项目: 江苏省科委应用基础研究资助项目

作者简介: 王 栋 (1971年 7月生), 男, 浙江绍兴人, 工学硕士, 助理研究员.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1) 脂肪酶: Lipozyme IM (immobilized *Aspergillus oryzae* lipase) Novo Nordisk 公司生产; Novozym 435 (immobilized *Candida antarctica* lipase) Novo Nordisk 公司生产; CCL (*Candida cylindracea* lipase) Sigma 公司生产; PPL (Porcine Pancreas, lipase) Sigma 公司生产.

2) 试剂: 油酸 分析纯; 高纯油酸 含量 93% 以上, 实验室自制; 山梨醇 含量 70%, 食品级, 靖江葡萄糖厂生产; Span-80 样品 食品级; 其他试剂均为国产分析纯.

3) 仪器: SHZ-22 水浴恒温振荡器.

1.2 分析及实验方法

1.2.1 失水山梨醇的制备 参见文献 [6].

1.2.2 酶法合成失水山梨醇油酸酯

1) 封闭系统酯化反应: 100 mL 的具塞三角瓶中加入 16.4 g (0.1 mol) 失水山梨醇, 2.8 g (0.1 mol) 油酸和 1 g 酶, 封口, 于水浴摇床适当温度下振荡 (150 r/min) 反应.

2) 开放系统酯化反应: 250 mL 的圆底烧瓶中, 加入 16.4 g (0.1 mol) 失水山梨醇和 2.8 g (0.1 mol) 油酸和 1 g 酶, 敞口, 于水浴摇床适当温度下振荡 (150 r/min) 反应.

1.2.3 酸转化率的测定 参见文献 [7].

1.2.4 产物的提取及固定化酶的回收

将 100 mL 正己烷分 3 次溶解反应产物, 过滤, 旋转蒸发除去溶剂, 得产品. 用 20 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液溶解不溶于正己烷的反应残留物 (包括固定化酶), 过滤得固定化酶, 再分别用 20 mL pH 7.0 的此磷酸缓冲液和 20 mL 正己烷各洗涤两次, 最后抽滤, 将得到的固定化酶置于 30°C 干燥器中放置 24 h 备用.

1.2.5 酸值、皂化值、羟值以及酯化

值的测定 按 GB 13481-92 方法测定.

1.2.6 产物的 HPLC 分析 参照文献 [8, 9], 分析结果见图 1.

2 结果与amp;讨论

2.1 脂肪酶酯化合成活力测定和酶活力单位定义

此酶活测定方法为改良的 NOVO 分析方法. 将等摩尔的月桂酸和 1-丙醇溶于正庚烷, 制备浓度为 0.7 mol/L 的反应底物. 取 5 mL 底物于 100 mL 的具塞三角瓶中, 60°C 预热 10 min, 加入 50 mg 酶制剂, 于 60°C 水浴摇床振荡反应, 转速为 200 r/min, 15 min 后加入 15 mL N, N-二甲基甲酰胺中止反应. 以酚酞为指示剂, 0.2 mol/L 的 KOH 溶液滴定剩余酸. 同时作空白对照.

在测定条件下, 每分钟消耗 1 μ mol 月桂酸所需酶量定义为 1 个脂肪酶酯化合成活力单

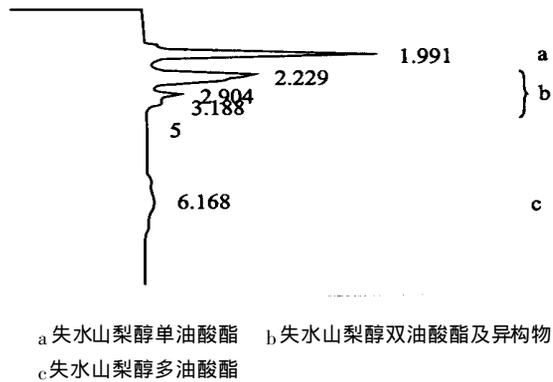


图 1 HPLC 分析 Span-80 样品中单酯、双酯及多酯的图谱

位 ($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$). 4种脂肪酶在其最适温度下活力测定的结果分别为 3 250. 9 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$, 4 261. 5 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$, 79. 0 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$, 99. 6 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$.

2.2 不同酶的酯化反应

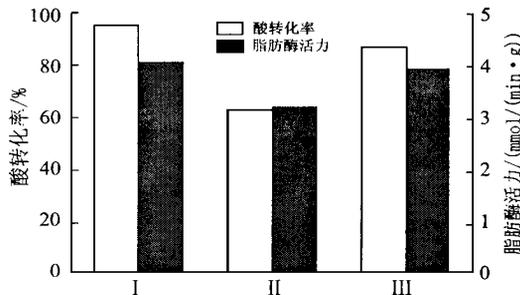
将 4种不同来源的脂肪酶在各自的最适温度下催化酯化反应,结果见表 1.不难发现,不同来源的脂肪酶催化酯化反应的能力有很大的差别,这与文献 [7]报导一致.在封闭系统中, Lipozyme IM 可使酸转化率达到 28. 4% .而 Novozym 435 在 60°C 下可使脂肪酸转化率超过 40% .以下主要以 Novozym 435 作为下一步的研究材料.

2.3 不同溶剂条件下的酯化反应

由于底物失水山梨醇在油酸中的溶解度极低,两者不可能混溶,形成油酸在上,失水山梨醇在下的两相.失水山梨醇是一种粘稠的胶状体,在极性不同的溶剂系统及水溶剂和无溶剂系统中利用 Novozym 435 催化酯化反应.有趣的是酸转化率在无溶剂系统中较其他溶剂高出许多,在溶剂反应中(包括水溶剂),酸转化率不超过 20% ,而无溶剂反应酸转化率却达 40% 以上.见图 2.可能的解释是:随着反应的进行,在振荡条件下两相混在一起,增加了底物与酶的接触,溶剂的存在,使得底物浓度相对稀释,影响了反应速度.虽然极性较强的溶剂可能会增加失水山梨醇的溶解度,但对酶的活性也有不良影响.随着酯化产生的水的积累,反应趋于平衡,转化率很难再有大的提高.

2.4 水对酯化反应的影响

为减小酯化产生的水的影响,在开放系统下进行酯化反应.对比封闭系统中的反应(图 3),转化率提高了约 75% .可见,水的存在对酯化反应有很大的影响.水不仅影响反应的平衡,对酶的活性也有影响.



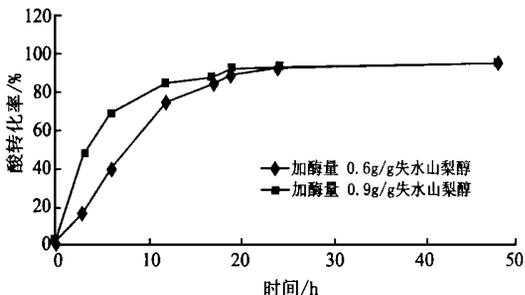
反应条件为:失水山梨醇 16.4 g,油酸 28.2 g,脂肪酶 5 g,溶剂 50 mL,水 3.6 mL;封闭系统, 60°C 水浴振荡 72 h,转速 150 r/min.

图 2 不同溶剂对酸转化率的影响

表 1 不同温度下脂肪酶催化失水山梨醇单油酸酯合成的酯化度

温度 / $^\circ\text{C}$	酸转化率 %				
	Lipozyme IM	Novozym 435	CCL	PPL	
70	26.8	22.2	1.8	12.11	
60	26.0	43.3	13.0	12.3	
50	28.4	22.5	7.5	9.0	
40	26.9	21.3	5.4	4.5	
30	/	/	1.5	0	

注:反应条件为失水山梨醇 16.4 g,油酸 28.2 g,脂肪酶 5 g,封闭系统,水浴振荡 72 h,转速 150 r/min.



反应条件:失水山梨醇 16.4 g,油酸 28.2 g,脂肪酶 5 g, 60°C ,无溶剂.

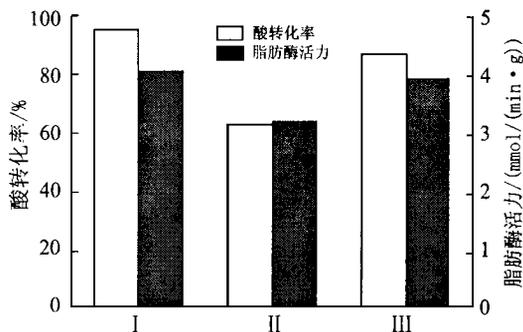
图 3 不同反应系统下油酸的转化率

反应体系在开放条件下反应 48 h 后(图 4I),加入等摩尔的水,封闭反应 24 h(图 4-II),再在开放条件下反应 24 h(图 4-III),分别测定酸转化率和脂肪酶活力(图 4).转化率从最初的 95% 降至 6% ,后又回升至 83% .而酶的相对活力由于水的影响从初期的 93.2% 下

降至 72.7%, 又回升至 90.3%。虽然水的存在使酶活下降, 但 70% 的酶活足以使反应继续。因此水的影响主要是对反应平衡的影响, 除去水可使平衡向合成的方向进行。

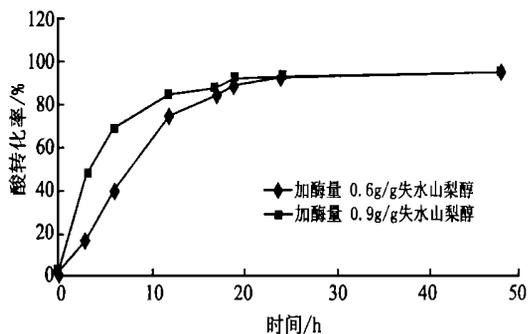
2.5 加酶量对酯化反应的影响

为进一步提高反应速度和酸转化率, 在羟基供体过量的条件下, 改变脂肪酶用量。随着用酶量的增加, 酸转化率进一步提高。从酯化反应的进程曲线 (图 5) 发现, 加大用酶量, 可以加快反应速度, 提高转化率。当反应进行到 24 h 左右时, 转化率达到 93% 左右。进一步提高转化率很困难, 至 48 h, 转化率仅再提高 1% ~ 2%。



注: 反应条件为 I 失水山梨醇 16.4 g, 油酸 28.2 g, 脂肪酶 20 g; 60°C, 反应 72 h, 无溶剂, 开放系统。
II 加水 3.6 g, 封闭系统, 再反应 24 h。
III 开放系统, 再反应 24 h。

图 4 水对酸转化率和脂肪酶活力的影响



反应条件: 失水山梨醇 32.8 g, 油酸 28.2 g, 60°C, 无溶剂开放系统。

图 5 酯化的时间曲线

2.6 产品的比较

用普通油酸和高纯油酸酶法合成失水山梨醇油酸酯, 与化学合成的产品比较 (表 2), 发现除酸值偏高外, 其他指标接近, 但单酯含量明显较高。HPLC 分析表明, 酶法合成的产品基本不含三酯和三酯以上的多酯。原料采用高纯油酸, 产品色泽可降低, 品质更好。

表 2 化学合成与酶法催化合成产品的比较

产品及指标	化学合成 ¹⁾	酶法合成 ²⁾	
		普通油酸	高纯油酸
酸价 / (KOH, mg/g)	4.64	9.88	9.60
皂化价 / (KOH, mg/g)	143.73	155.14	155.7
酯化价 / (KOH, mg/g)	139.09	145.26	146.1
羟价 / (KOH, mg/g)	180.22	202.2	205.0
酸转化率 / %	/	94.0	93.2
色度 (Gardner 值)	6	7	6
单酯含量 / %	49.87	70.44	72.75

注: 1) 工业级 2) 反应条件为失水山梨醇 32.8 g, 油酸 28.2 g, 每克失水山梨醇脂肪酶用量 0.6 g, 60°C 反应 48 h, 无溶剂开放系统。

3 结 论

- 1) 不同来源的脂肪酶催化酯化反应的能力有很大的差别。在封闭系统中, 无溶剂酯化反应较一些溶剂相中有较大的转化率。
- 2) 通过开放系统减少反应生成的水可使反应向合成的方向进行, 较大地提高反应的转化率。在羟基过量的条件下, 有利于酸的转化。
- 3) 加大用酶量, 可加快反应速度, 提高酯化反应转化率。

致谢 感谢 Novo Nordisk 公司北京办事处赠送脂肪酶样品。

参考文献:

- [1] CHOPINEAU J, MCCAFFERTY F D, THERISOD M, et al. Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oils catalyzed by lipases in nonaqueous medium [J]. **Biotechnol Bioeng**, 1988, 31: 208
- [2] SARNEY D B, BARNARD M J, VIRTO M, et al. Enzymatic synthesis of sorbitan esters using a low-boiling-point azeotrope as a reaction solvent [J]. **Biotechnol Bioeng**, 1997, 54: 351- 356
- [3] 徐岩. 溶剂相中微生物脂肪酶催化脂肪酸酯合成的研究 [D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1997.
- [4] 寇秀芬, 徐家立. 在无溶剂系统中固定化脂肪酶合成聚乙二醇 400月桂酸酯 [J]. 生物工程学报, 1997, 13(3): 289- 293
- [5] DUCRET A, GIROUX A, TRANI M, et al. Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure [J]. **Biotechnol Bioeng**, 1995, 48: 214- 221
- [6] 倪永全, 喻敏. 失水山梨醇单油酸酯质量改进的研究 [J]. 日用化学工业, 1996, 2: 1- 8
- [7] 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 [J]. 生物工程学报, 1995, 11(4): 325- 331
- [8] GRATIN N, WELLNER E, ASRIN A, et al. Analysis of sorbitan fatty acid esters by HPLC [J]. **JAACS**, 1983, 60(6): 1151- 1154
- [9] 倪永全, 喻敏, 周勤奋. 失水山梨醇单(叁)油酸酯的结构分析 [J]. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(2)

Lipase-Catalyzed Synthesis of Sorbitan Esters in Non-Aqueous Phase

WANG Dong¹, XU Yan¹, ZHANG Ke-chang¹, NI Yong-quan²

(1. School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Engineering Wuxi 214036; 2. Department of Chemical Engineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract Esterification of sorbitan and oleic acid by lipase in non-aqueous phase under mild reaction conditions was studied initially. Sorbitan was dehydrated previously by controlled chemical process. Lipase-catalyzed esterification was carried out in aqueous phase, organic solvent and solvent-free. The maximum conversion in solvent free system appeared to be higher, up to 90%. A comparison was made for four lipases from different sources, and Novozym(r)435 showed to have the highest catalytic activity. Water content had great influence on enzymatic conversion. Main reaction factors for lipase catalysis were also investigated, including the reaction temperature, reaction time and substrate molar ratio. The prepared oleic sorbitan esters were similar to the commercial products in acid number, hydroxyl number, saponification number and color. However the former have better quality than the latter. The preparative yield for sorbitan monoesters was about 70%, diesters less than 20%.

Key words Lipase; non-aqueous phase; solvent free; synthesis; Span80