

# 脂肪酶在微乳液和微乳液凝胶中催化辛酸辛醇的酯化反应

周国伟<sup>1</sup> 黄锡荣<sup>1</sup> 李越中<sup>2</sup> 李干佐<sup>1\*</sup> 胡 玮<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(山东大学胶体与界面化学教育部重点实验室 济南 250100)

<sup>2</sup>(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

关键词 油包水微乳液, 酶催化, 固定化酶, 微乳液凝胶, 动力学

中图分类号 O648.12 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0224-04

脂肪酶在合成反应中具有很高的区域选择性和立体选择性,已广泛用于食品工业和药物工业<sup>[1,2]</sup>,在有机介质中的脂肪酶催化反应已有较多研究<sup>[3,4]</sup>。微乳液一般由表面活性剂、助表面活性剂、油和水等组份组成,它是一种热力学稳定、光学透明、宏观均匀而微观不均匀的体系,能提供酶催化所需要的巨大油/水界面<sup>[5]</sup>。而将脂肪酶增溶于油包水(W/O)微乳液中的纳米级“水池”中,可使酶以分子水平分散<sup>[6]</sup>。图 1(a)从而可用来模拟细胞微环境中的反应。油包水微乳液中的酶可通过加入明胶而制成固定化酶,含明胶的微乳液凝胶(MBGs)最早是由 Haering<sup>[7]</sup>等于 1986 年制备的,其结构可看作是油包水微乳液镶嵌在明胶/水的网络中<sup>[6,8]</sup>。图 1(b)所制得的 MBGs 在非极性有机溶剂中很稳定,含酶的 MBGs 在有机溶剂中可用作固相催化剂。

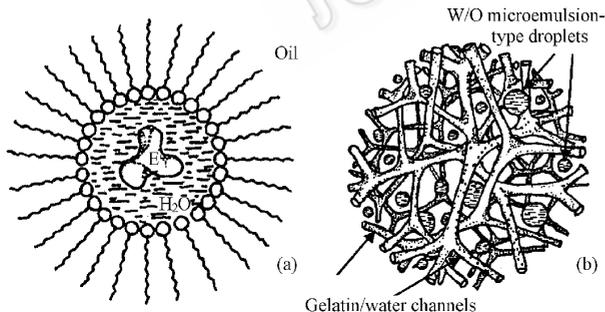


图 1 (a) 增溶酶的油包水微乳液结构和  
(b) 含明胶的微乳液凝胶结构

Fig. 1 (a) Schematic representation of the water-in-oil microemulsion droplet incorporated enzyme and  
(b) A proposed model for a gelatin-containing MBGs

本文研究了 AOT/异辛烷/水形成的油包水微乳液中解脂假丝酵母脂肪酶 *Candida lipolytica* lipase (CL 脂肪酶) 催化辛酸和辛醇的酯化反应,研究了动力学机理,并确定了动

力学常数,同时研究了含明胶的 MBGs 中固定化 CL 脂肪酶催化酯合成的性能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

*Candida lipolytica* lipase (CL 脂肪酶) 购于无锡酶制剂厂,酶比活力 88u/mg; 2-乙基己基琥珀酸酯磺酸钠 (AOT) 购于 Sigma 公司; 明胶 (Bloom300) 购于 Sigma 公司; 异辛烷为分析纯,进口分装,北京益利精细化学品有限公司; 水为 3 次蒸馏水; 其它试剂均为国产分析纯,所有有机溶剂用前均经 4Å 分子筛干燥。

### 1.2 方法

**1.2.1 油包水微乳液和含酶 MBGs 的制备:** 首先配制 0.1mol·L<sup>-1</sup> 和 0.38mol·L<sup>-1</sup> AOT/异辛烷本体溶液,加入 pH = 7.17 的磷酸缓冲液使最终含水量 W<sub>0</sub> (W<sub>0</sub> = [H<sub>2</sub>O] / [AOT]) 分别为 10 和 17,摇动数秒钟后可成透明的微乳液 a 和 b。MBGs 中固定化酶的制备是根据文献 [6] 制备的。在 25mL 烧杯中称取明胶 0.47g,加水 0.6g,室温溶胀 1h 后于 55°C 水浴加热搅拌,同时加入预保温的含 100mg CL 脂肪酶的微乳液 b 1.71g,继续搅拌使其冷却至室温,即得应力较好的 3.33cm<sup>3</sup> 凝胶,贮存于 -24°C 冰箱备用,用时用解剖刀切成大小均匀的 10 小块。MBGs 的组成为 m(g)/V(cm<sup>3</sup>): 明胶 14%、水 24%、AOT 8.9%、CL 脂肪酶 3%,其它为异辛烷。

**1.2.2 W/O 微乳液和 MBGs 中的酶催化反应:** 在 50mL 带塞三角瓶中加入 10mL 含不同辛酸、辛醇的微乳液 a, 100mg CL 脂肪酶,在 37°C 下,150r/min 振荡反应,于反应转化率达到 10% 左右时取样 1mL,加 2mL V(丙酮): V(乙醇) = 1:1 的溶液终止反应,以酚酞为指示剂,用 0.05mol/L NaOH 滴

定,以求反应初速度<sup>[9]</sup>。反应初速度定义为: $v_0$  = 每分钟每毫克酶脂肪酶减少的摩尔浓度。MBGs 中固定化酶的催化反应是在 50mL 带塞三角瓶中加入 10mL 含等摩尔酸和醇的异辛烷溶液,及上述制备的 MBGs,于 30℃,150r/min 振荡反应。24h 后停止反应,反应完后需再用 5mL 异辛烷将 MBGs 浸泡 2 次,每次 1h,将其吸附的未反应的少量脂肪酸浸泡出来,浸泡后的 MBGs 则重新贮存于 -24℃ 冰箱留待下次重复使用,检测同上。转化率定义为脂肪酶减少的毫摩尔数/反应初始时脂肪酸毫摩尔数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 W/O 微乳液中 CL 脂肪酶催化动力学参数的求算

对双底物的酶催化反应动力学机理可在固定其中一种底物浓度不变,改变另一种底物浓度测得其初速度来研究,可分为序列机制(Sequential)和乒乓机制(Ping-Pong)。通过作反应初速度和底物浓度的双倒数图,即 $[v_0]^{-1} \sim [S]^{-1}$ ,可以区别这两种机制,序列机制中所有直线相交于纵轴左侧一点,而在乒乓机制中所有直线是平行的<sup>[10]</sup>。 $[v_0]^{-1} \sim [S_1]^{-1}$ 图称作一级图形,将一级图形得到的 Y 轴截矩再对不同的 $[S_2]^{-1}$ 作图得到二级图形,由二级图形的截矩和斜率可分别求得 $1/v_{\max}$ 和 $K_{m2}/v_{\max}$ , $v_{\max}$ 为反应的最大速度, $K_{m2}$ 为第二底物的米氏常数。

微乳液中辛酸与辛醇合成反应是在[CL 脂肪酶]= $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  [辛酸]= $0.04\sim 0.20\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [辛醇]= $0.04\sim 0.20\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 中进行的。其结果列于图 2~5。图 2(a)为不同辛醇浓度下反应初速度随辛酸浓度的变化,图 2(b)为初速度与辛酸浓度的双倒数图,图 3 为由图 2(b)各直线外推到 Y 轴所得截矩对辛醇浓度倒数的二次作图。图 4(a)为不同辛酸浓度下反应初速度随辛醇浓度的变化,图 4(b)为

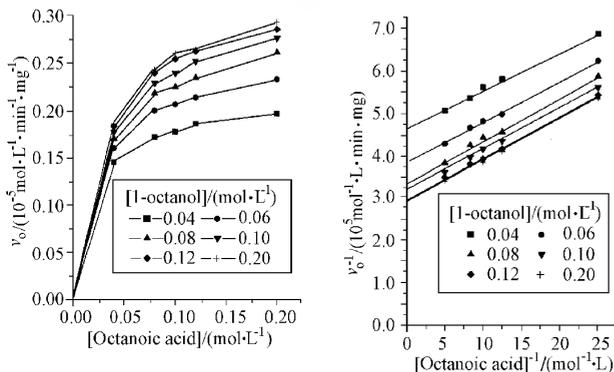


图 2 (a)油包水微乳液中一定辛醇浓度下酯化反应初速度与辛酸浓度的关系和(b)酯化反应初速度与辛酸浓度的双倒数图

Fig. 2 (a)Effect of octanoic acid concentration on the initial rate of esterification determined at fixed concentration of 1-octanol in W/O microemulsion and (b) double reciprocal plot of the initial rate of esterification versus octanoic acid concentration

([AOT]= $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [CL Lipase]= $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $W_0=10$ )

初速度与辛醇浓度的双倒数图,图 5 为由图 4(b)各直线外推到 Y 轴所得截矩对辛酸浓度倒数的二次作图。图 2(b)和图 4(b)中各直线相互平行,表明微乳液中 CL 脂肪酶催化辛酸辛醇的酯化反应符合双底物乒乓(Ping-Pong)Bi-Bi 机制。根据此机制,酶首先与辛酸结合成酶-辛酸复合物,此复合物进一步转变成酰基酶中间体并释放出水,辛醇再与此中间体结合形成辛酸辛酯<sup>[5]</sup>。由图 3 和图 5 两直线斜率和截矩可求出反应的最大速率 $v_{\max}=4.7098\times 10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ,米氏常数分别为: $K_{m\text{酸}}=4.9311\times 10^{-2}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , $K_{m\text{醇}}=4.7630\times 10^{-2}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

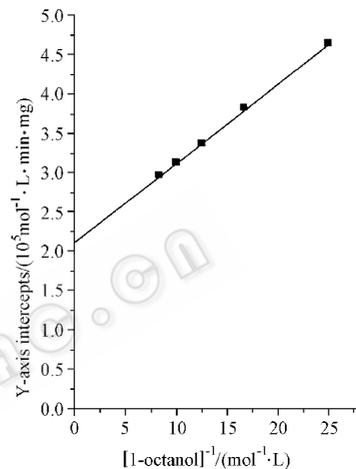


图 3 图 2(b)Y 轴截矩与辛醇浓度倒数的二次作图

Fig. 3 Secondary plot of Fig. 2(b)Intercepts versus reciprocal 1-octanol concentration

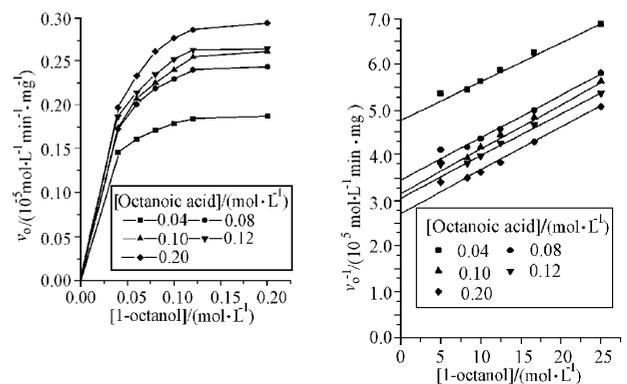


图 4 (a)油包水微乳液中一定辛酸浓度下酯化反应初速度与辛醇浓度的关系和(b)酯化反应初速度与辛醇浓度的双倒数图

Fig. 4 (a)Effect of 1-octanol concentration on the initial rate of esterification determined at fixed concentration of octanoic acid in W/O microemulsion and (b) double reciprocal plot of the initial rate of esterification versus

1-octanol concentration

([AOT]= $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [CL Lipase]= $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $W_0=10$ )

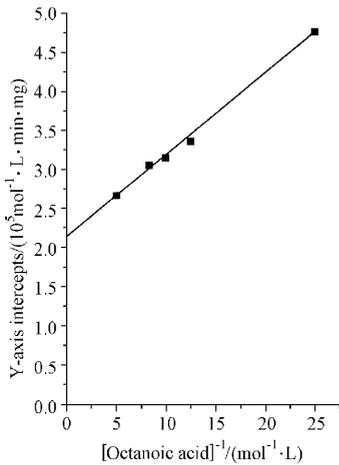


图5 图4(b)Y轴截距与辛酸浓度倒数的二次作图  
Fig.5 Secondary plot of Fig.4(b) intercepts versus reciprocal octanoic acid concentration

## 2.2 MBGs中固定化酶的催化反应

将酶固定在MBGs中以后,底物和产物由于受分配效应和扩散效应的影响而使得它们在MBGs中的微环境和宏观油相间产生了不等分配。对不含酶的MBGs做空白实验发现,大约30min以后,油相中底物酸的浓度不再变化,此时我们可以认为底物在MBGs相和油相中的分配效应和扩散效应达到平衡,即认为MBGs对底物和产物有吸附性,且此效应与底物浓度有关,因此每次反应完后,均需用异辛烷浸泡,以使吸附的底物和产物浸泡出来。

2.2.1 酸和醇的碳原子数对酯合成转化率的影响:图6为0.1mol·L<sup>-1</sup>不同碳原子数(n)的酸(C<sub>n-1</sub>H<sub>2n-1</sub>COOH)与

0.1mol·L<sup>-1</sup>辛醇反应24h后的转化率。由图看出,碳原子数较少(n<7)的酸与1-辛醇反应转化率较低。但在用0.1mol·L<sup>-1</sup>辛酸与0.1mol·L<sup>-1</sup>不同碳链的伯醇反应时,发现伯醇的碳原子数对酯化反应转化率影响不大,结果见表1。

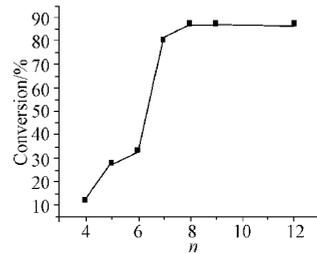


图6 不同碳链的酸与辛醇反应转化率的关系  
Fig.6 Percentage of esterification conversion of acid with 1-octanol versus carbon numbers of organic acid

表1 0.1mol·L<sup>-1</sup>辛酸与0.1mol·L<sup>-1</sup>不同碳链的伯醇反应的转化率

Table 1 The conversion of octanoic acid with alkyl alcohol(0.1mol·L<sup>-1</sup> each)

alcohol	1-octanol	1-heptanol	1-hexanol	1-pentanol	1-butanol
conversion/%	87.3	87.1	87.3	87.4	87.3

The reaction conditions are described in methods.

2.2.2 MBGs中固定化酶的操作稳定性:固定化酶的操作稳定性是合成过程很重要的参数。在20d内同一固定化酶连续反应10次,其酯化反应转化率仍能达到最初转化率的90%,其结果见表2。

表2 0.1mol·L<sup>-1</sup>辛酸与0.1mol·L<sup>-1</sup>辛醇反应的次数与转化率

Table 2 The conversion of octanoic acid and 1-octanol(0.1mol·L<sup>-1</sup> each) at run numbers

Run numbers	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
conversion/%	87.3	88.5	88.7	88.7	88.9	88.7	80.4	78.1	80.5	79.8

The reaction conditions are described in methods.

表明反应过程中没有酶的泄漏。反应进行多次后转化率有所降低,可能是由于酯化反应形成的副产物水进入微乳液“水池”,使微乳液含水量W<sub>0</sub>增大,超过酶催化所需的最佳含水量范围,从而引起酶活力的降低,转化率下降<sup>[5]</sup>。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] STAMATIS H, MACRIS J, KOLISIS F N. Esterification of hydrophilic dils catalysed by lipase in microemulsions, *Biotechnol Letters*, 1996, **18**(5): 541~546
- [2] PATEL R N, BANERJEE A, SZARKA L J. Biocatalytic synthesis of some chiral pharmaceutical intermediate by lipase, *J Am Oil Chem Soc*, 1996, **73**(11): 1363~1357
- [3] XU Y(徐岩), ZHAO C M(赵成明), ZHANG K C(章克昌). A kinetic study on enzymatic synthesis of ethyl hexanoate by immobilized lipase from *Mucor miehei* in heptane, *Chinese Journal of*

*Biotechnology*(生物工程学报), 1999, **15**(4): 533~536

- [4] WU W H, AKOH C C, PHILIPS R S. Lipase-catalyzed stereoselective esterification of DL-menthol in organic solvents using acid anhydrides as acylating agents, *Enzyme and Microbial Technol*, 1996, **18**(5): 536~539
  - [5] STAMATIS H, XENAKIS A, DIMTRIADIS E *et al.* Catalytic behavior of *Pseudomonas cepacia* lipase in W/O microemulsions, *Biotechnol Bioeng*, 1995, **45**(1): 33~41
  - [6] REES G D, JENTA T R J, NASCIMENTO MG *et al.* Use of water-in-oil microemulsions and gelation-containing microemulsion-based gels for lipase-catalysed ester synthesis in organic solvents, *Indian J Chem*, 1993, **32B**: 30~34
  - [7] HAERING G, LUISI P L. Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsions, *J Phys Chem*, 1986, **90**(22): 5892~5895
  - [8] ATKINSON P J, ROBINSON B H, HOWE A M *et al.* Structure
- © 中国科学院微生物研究所期刊编辑部 *organo-gels*, *J Chem Soc*

*Faraday Trans* ,1991 **87**(20) 3389~3397

214~219

- [ 9 ] XU Y (徐岩),ZHANG K C (章克昌),WANG Y F (王亚非). Flavor ester synthesis by microbial lipase in heptane phase ,*Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报),1998 ,**14**(2) :

- [ 10 ] STAMATIS H ,XENAKIS A ,MENGE U. Kinetic study of lipase catalyzed esterification reactions in water-in-oil microemulsions ,*Biotechnol Bioeng* ,1993 **42**(8) 931~937

## Esterification of Octanoic Acid with 1-octanol Catalyzed by Lipase in W/O Microemulsions and in Microemulsion-based Organogels

ZHOU Guo-Wei<sup>1</sup> HUANG Xi-Rong<sup>1</sup> LI Yue-Zhong<sup>2</sup> LI Gan-Zuo<sup>1\*</sup> HU Wei<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Key Laboratory for Colloid and Interface Chemistry of State Education Ministry ,Shandong University Jinan 250100 ,China )

<sup>2</sup>(State Key Laboratory of Microbial Technology ,Shandong University Jinan 250100 ,China )

**Abstract** The esterification reactions of octanoic acid with 1-octanol catalyzed by *Candida lipolytica* ( CL ) lipase was studied in water-in-oil microemulsions formed by water/bis( 2-ethylhexyl )sulfosuccinate sodium( AOT )/isooctane. The results of kinetic study showed that the reaction follows a Ping-Pong Bi-Bi mechanism. The values of apparent kinetic parameters were determined. Lipase has also been immobilized in gelatin-containing AOT microemulsion-based organogels ( MBGs ) for retention of catalytic activity. These lipase-containing MBGs proved to be a solid-phase catalysts for use in apolar organic solvents ,retaining its higher activity after many runs of esterification reactions.

**Key words** W/O microemulsion , enzyme catalysis , immobilized enzyme , microemulsion-based gels( MBGs ) , kinetics

Received :August 8 ,2000

This work was supported by grant from the State Natural Science Fund of China ( 29903006 ) .

\* Corresponding author. Tel 86-531-8564750 ; Fax 86-531-8565167 ; E-mail :coliw@sdu. edu. cn