

微生物脂肪酶在正庚烷中合成短链芳香酯的研究

徐 岩 章克昌 王亚非

(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芳香酯的研究表明:脂肪酶在正庚烷中催化合成芳香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,选择了其中对己酸乙酯转化率在 85% 以上来自 *Mucor miehei*, *Candida rugosa* 和 *Porcine pancreas* 的脂肪酶对 7 个短链脂肪酸酯进行合成,其中 *Mucor miehei* 脂肪酶对这几个芳香酯 48 h 合成转化率均在 90% 以上,乙酸乙酯 21.28gL^{-1} , 丙酸乙酯 19.6gL^{-1} , 丁酸乙酯 26.61gL^{-1} , 戊酸乙酯 24.95gL^{-1} , 己酸乙酯产量 34.60gL^{-1} , 丁酸异戊酯 30.76gL^{-1} , 乙酸异戊酯 12.76gL^{-1} 。同时, *Mucor miehei* 脂肪酶在正庚烷批式反应中稳定性也较好,己酸乙酯半衰期为 1201h, 最少的乙酸乙酯也在 140h。并且还发现脂肪酶在正庚烷中分解酶活降低很多,但对其酯合成转化率没有直接的影响。

关键词 脂肪酶, 酯化, 正庚烷, 芳香酯

学科分类号 Q939.97

短链芳香酯是一类十分重要的芳香化合物,呈天然水果香味,它们广泛应用于食品、饮料、医药等工业。目前传统的生产方式是在无机催化剂存在条件下化学合成或从天然植物中分离提取方法来获得。尽管化学合成的方法目前还比较经济,随着人们对天然产物和高品质产品兴趣的逐渐增强,对化学合成产物警惕性日益增加,而从植物中去提取又无法满足日益增长的需求,因此转向用生物技术的方法生产。用生物技术生产可分成酶法和微生物法两种^[1]。其中酶法产生的芳香酯不仅可以被认为是高质量天然产品,而且酶法反应具有条件温和、转化率高等优点而吸引了许多人的研究^[2-6],被看成为是很有希望工业化的途径。近十几年来,由于酶在非水相反应理论不断进展和利用微生物脂肪酶酯化、转酯化应用的深入,国内外都开始注意在溶剂相中脂肪酸酯合成的研究^[7-11,15]。

本论文报道了用微生物脂肪酶酯化我国食品、饮料工业中几个常用短链脂肪酸酯的研究结果。旨在寻求新的生物合成的途径。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

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*) 无锡酶制剂厂, 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 3Å 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和单位: 用乳化液法, 4ml 4% 的 PVA(聚合度 1750) 橄榄油乳化液和 5ml 0.025mol/L pH7.0 磷酸缓冲液 1ml 酶液, 37℃ 反应 15min 后, 加入 15ml 95% 乙醇终止反应, 用 0.05mol/L NaOH 溶液滴定, 酚酞为指示剂。一个脂肪酶国际单位定义为: 在测定条件下, 每分钟释放出 1μg 分子脂肪酸的酶量。

1.2.2 脂肪酶合成酯反应体系: 100ml 具塞三角瓶中将 0.2mol/L 短链脂肪酸及 0.25mol/L 乙醇和 15ml 正庚烷组成酯化反应体系。加入脂肪酶酶粉, 30℃ 条件下 150 r/min 旋转振荡。定时取样检测。

1.2.3 脂肪酶合成能力的测定和转化率计算: 将过滤后的样品 100μl 加入 10ml 水溶液中, 用 0.025mol/L 的氢氧化钠溶液滴定未反应的脂肪酸, 以 3 滴体积百分数为 1% 的酚酞为指示剂。计算脂肪酶的酯合成活力。

1.2.4 半衰期的测定和计算^[8,14]: 以 48h 为批次反应时间, 每批反应结束, 将酶过滤, 用正庚烷洗涤, 快速冷冻干燥后进行下一批次反应。测定每一批次酯合成转化率, 半衰期即为转化率降至初始转化率的一半后, 用下列公式计算批次时间之和。

$$t_{1/2} = 0.693/kd, kd = \frac{2.303}{t} \lg\left(\frac{E_0}{E}\right)$$

其中, E_0 为开始时酯合成转化率, E 为时间 t 后酯合成转化率, kd 为衰减常数。

1.2.5 气相色谱检测产物组成: 用 25m 长的 SE-30 毛细管柱, 氢火焰检测器, 氮气为载气, 柱前压 5.88×10^4 Pa, 尾吹 30ml/min, 柱温条件是: 50℃, 3min, 10℃/min 至 150℃, 保持 2min。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 脂肪酶在同样条件下于正庚烷和水中合成己酸乙酯, 比较反应转化率。

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 48h 后, 可产生 13.98g/L 的己酸乙酯, 这个量远远地高于用微生物发酵生产^[12]。这是由于在有机相中, 酯化反应热力学平衡向着合成酯方向移动的结果^[13]。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能力。

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结果如下:

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

Table 1 The degree of esterification and concentration of ethyl hexanoate synthesized by MML, PPL, CRL1, CCL in n-heptane and water

Lipases	Degree of esterification and ester concentration in heptane				Degree of esterification and ester concentration in water				
	%	g·L ⁻¹		%	g·L ⁻¹		%	g·L ⁻¹	
		1h	48h		48h	168h			
MML	62.19	8.96	95.73	13.79	7.10	1.02	21.43	3.09	
PPL	9.5	1.98	90.00	12.96		“+”			
CRL1	57.83	8.26	85.26	12.28	4.7	0.68	4.50	0.65	
CLL	13.41	1.93	85.37	12.29	18.06	2.60	20.48	2.95	

“+” indicates trace.

Reaction condition: hexanoic acid 0.1 mol/L, ethanol 0.15 mol/L, n-heptane 15 ml, lipase activity: 1200u, 30°C

表 2 各种不同脂肪酶反应生成己酸乙酯的转化率和相对合成活力

Table 2 The esterification degree and relative activity of ethyl hexanoate synthesized by various microbial lipases

Lipases	Degree of esterification/%	Relative activity/%	Source	Degree of esterification/%	Relative activity/%
MML	93.50	100	PNL	18.19	19.45
CRL-1	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	CRL-2	30.23	32.33

Reaction condition: hexanoic acid 0.1 mol/L, ethanol 0.15 mol/L, n-heptane 15 ml, lipase: 240u, 30°C, 48h.

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。其中 MML, CRL-1, 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(图 2)。

2.4 对其他各种短链芳香酯合成结果

从实用角度, 我们选择了合成活力高, 且酶源易得的 MML, PPL 和 CRL-1 三种脂肪酶对几种食品、饮料、化妆品中常用的 2~6 个碳的脂肪酸乙酯以及乙酸和丁酸异戊酯合成结果如下:

从表 3 可以看出, 同一种酶由于底物酸或醇的不同, 酯化率是不同的。PPL 脂肪酶乙酸和丙酸相应的乙酸乙酯、丙酸乙酯、乙酸异戊酯的合成转化率比较低, 其余几个酯的酯化率都在 85% 以上。CRL-1 脂肪酶只是对乙酸的两个酯转化率较低。只有 MML 有

较宽底物选择,对这 C2-C6 酸的酯转化率表现全都很高,且乙酸乙酯、丙酸乙酯、己酸乙酯转化率都在 96% 左右。因此, MML 是比较合适的催化用酶,故对其稳定性作进一步的研究。

2.5 脂肪酶有机相中催化反应的稳定性

2.5.1 有机相中 MML 合成芳香酯活力的稳定性

选择 MML 酶测试其半衰期,通过对不同芳香酯合成的观察研究其在反应体系中的稳定性。

从表 4 中半衰期来看,随着碳数的增加脂肪酶合成的稳定性在增加,C4~C6 酸的芳香乙酯表现的要比 C2, C3 个碳的稳定性明显长许多,其中己酸乙酯、戊酸乙酯、己酸乙酯的半衰期都在 1000h 左右。

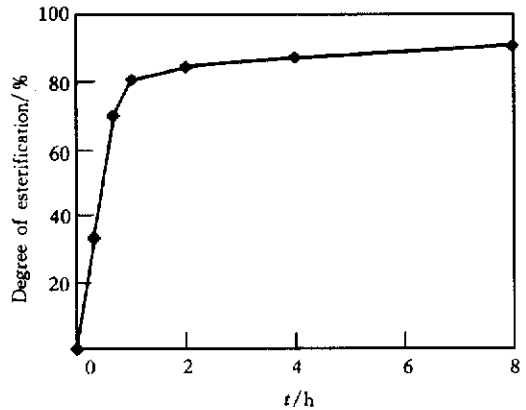


图 1 合成己酸乙酯反应时间进程

Fig. 1 Time course of esterification of ethyl hexanoate

Reaction condition: 15ml of heptane with 480u of MML and 0.25mol/L of n-hexanoic acid and 0.25mol/L of ethanol was shaken at 30°C

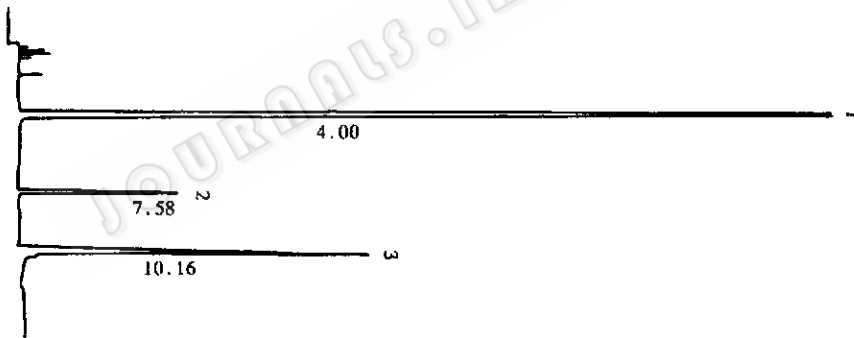


图 2 气相色谱检测己酸乙酯合成的图谱

Fig. 2 Determination of ethyl hexanoate esterification by gas chromatography

1. n-heptane, 2. 2-ethyl butyric acid(inner standard), 3. ethyl hexanoate

2.5.2 有机相中 MML 分解酶活的稳定性: 从表 5 可以发现: MML 的酯合成能力与水解活力之间直接关系不大。水解活力在第一次溶剂中反应后就下降了很多,只有初始的 1/10。其后的几批里,尽管还有下降,但幅度不大,而此期间脂肪酶的酯化转化率却没有变化。也就是说酶水解活力的降低并没有影响其酯合成的能力。

3 讨 论

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。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在庚烷溶

剂中酯合成转化率高,这与有机介质中酶结构变化而造成反应的热力学平衡转变有关^[13]。同时,脂肪酶酯合成能力与分解活力之间的关系也向我们指出,在选择高活力脂肪酶产生菌的筛子时往往都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。

表 3 其它短链芳香酯合成转化率和浓度

Table 3 Degree of esterification and concentration of other short chain flavor esters

Esters	MML		PPL		CRL-1	
	Degree/%	Conc./g·L ⁻¹	Degree/%	Conc./g·L ⁻¹	Degree/%	Conc./g·L ⁻¹
Ethyl acetate	96.73	21.28	23.33	5.13	6.50	1.43
Ethyl propionate	96.07	19.60	31.40	6.41	91.88	18.74
Ethyl butyrate	91.77	26.61	93.80	27.20	87.50	25.38
Ethyl valerate	95.97	24.95	85.71	22.28	92.90	24.15
Ethyl hexanoate	96.11	34.60	90.00	32.44	85.26	30.69
Isoamyl butyrate	97.35	30.76	93.51	29.55	95.77	30.26
Isoamyl acetate	93.75	12.76	39.02	5.07	53.30	6.93

Reaction condition: acetic acid 0.25mol/L, propionic acid 0.2mol/L, butyric acid 0.25mol/L, pentanoic acid 0.2mol/L, hexanoic acid 0.251/L, ethanol 0.25mol/L, pentanol 0.25mol/L, Lipase 1200u, 15ml n-heptane, 32°C, 48h

表 4 MML 酶批式反应合成短链脂肪酸酯的半衰期

Table 4 Half life period of MML in ester synthesis

Esters	Half life period/h
Ethyl acetate	140
Ethyl propionate	275
Ethyl butyrate	1108
Ethyl valerate	972
Ethyl hexanoate	1201
Isoamyl butyrate	586
Isoamyl acetate	450

Reaction condition: same as Table 3

表 5 MML 批式反应酯化己酸乙酯后分解酶活的稳定性

Table 5 The Stability of MML in Esterification and Hydrolysis

Cycle	Degree of esterification/%	Lipolytic activity/%
		100
1	94.05	10.6
2	93.48	9.27
3	91.78	7.50
4	90.49	5.38
5	91.05	6.32

Reaction condition: MML 1200u, 15ml n-heptane, hexanoic acid 0.25mol/L, ethanol 0.25mol/L, 48 hour as a batch

脂肪酶对不同酯的合成表现出不同的转化率主要是由底物醇、酸的极性所决定的。酸的碳数越少,极性越强,酯转化就越困难,且半衰期也短。酸的碳数偏长,酯转化程度就高,稳定性也好。同样,醇的碳数增加,酯转化率也高,丁酸异戊酯的合成是其中转化率和产物浓度最高的。

另外,我们也同样证实了反应体系中水的含量是影响酯合成的重要因素。在 MML 催化己酸乙酯批次反应中,48h 反应后,再延长 48h, MML 催化己酸乙酯合成转化率下降

了 9.1%。而在反应 48h 后,按 1g/15ml 加入分子筛去除反应体系中形成的水,转化率可由 95% 再上升 3.5%。如果在反应初始加入 5% 的水,酯合成转化率将下降 40% 左右。

此外,我们还进一步优化了溶剂相反应的条件,并探索了适合工业化的下游工程途径(详细另见报道)。

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 Armstrong D W, Gillies B, Yamazaki H. Natural Flavour Produced by Biotechnology Processing: Elsevier, 1989, 104~120
- 2 Gatfield I L. Bioformation of Flavour, Royal Society of Chemistry, 1992, 171~185
- 3 Gatfield I L, Sand T. United States Patent 4451565. 1984
- 4 Welsh F W, Williams R E, Dawson K H. Journal of Food Science, 1990, **55**:1679~1682
- 5 Shieh C J, Akoh C C, Yee L N. Biotechnology and Bioengineering, 1996, **51**:371~374
- 6 Langrand G, Rondot N, Triantaphylides C, Baratti J. Biotechnology Letter, 1990, **12**:581~586
- 7 Evgeny N V. Lipase: Cambridge University Press, 1994, 271~288
- 8 张 军,徐家立. 生物工程学报, 1995, **11**(4):325~331
- 9 Xu Y, Zhang K C. The Abstracts of 1st Global Conference of Young Chinese Biochemical Engineers. 1996; **31**:7~10.
- 10 Dordick J S. Principles and Applications of Nonaqueous Enzymology, Marcel Dekker, Inc, 1991:1~52
- 11 Halling P J. TIBTECH, 1989, **7**:50~52
- 12 Ruan W Q. The Proceedings of the 5th World Congress of Chemical Engineering. 1996, **2**:398~401
- 13 Zaks A, Klivanov A M. Science, 1984, **224**:1249~1251
- 14 郭 勇, 酶工程, 1994, 227~228
- 15 刘光焯, 卢世琦, 黄德英, 生物工程学报, 1995, **11**:288~290

Flavor Ester Synthesis by Microbial Lipases in Heptane Phase

Xu Yan Zhang Kechang Wang Yafei

(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 lipase from *Mucor miehei*, *Candida rugosa*, porcine pancreas were more active in synthesis of ethyl hexanoate with more than 85% of conversion. Among them, *Mucor miehei* lipase had more activities for ester synthesis of seven common short chain flavor esters with more than 90% substrate conversion. Maximum production by MML after 48h incubation was obtained with 21.28g/L for ethyl acetate, 19.60g/L for ethyl propionate, 26.61g/L for ethyl butyrate, 24.95g/L for ethyl valerate, 34.60g/L for ethyl hexanoate, 30.76g/L for isoamyl butyrate, 12.76g/L for isoamyl acetate respectively. In heptane, the MML showed better stabilities for short chain flavor ester synthesis with the longest 1201 hour half life in synthesis of ethyl hexanoate and the shortest 140 hours half life in that of ethyl acetate. It was observed that the decrease in lipolytic activity of lipase had not direct effect on its esterifying ability in heptane.

Key words Lipase, esterification, nonaqueous phase, flavor ester