

无溶剂体系中脂肪酶催化红花油水解反应

甘争艳^{a,b} 吾满江·艾力^{b*} 贾殿增^a 夏木西卡马尔^b

(^a新疆大学化学化工学院 乌鲁木齐; ^b中国科学院新疆理化技术研究所 乌鲁木齐 830011)

摘要 研究了无溶剂体系中脂肪酶催化的红花油水解反应,考察了水与油比、加酶量、反应温度、pH 值、添加 CaCl_2 等因素的最适值随反应时间变化的规律,并测试了水解率为 9% 及 78% 的 2 种水解产物中的脂肪酸与酯的碘值及酯中单甘酯含量,检验了脂肪酶在脂肪酸种类及甘油酯键位置上的专一性。结果表明,反应 1 h 时各因素的最适合值为 $m(\text{水})/m(\text{油})=0.5/1$ 、 $m(\text{酶})/m(\text{油})=5/100$ 、反应温度为 35°C 、 $\text{pH}=7.0$ 、添加质量分数为 0.2% CaCl_2 ; 而反应 24 h 时各因素的最适合值为 $m(\text{水})/m(\text{油})=1/1$ 、 $m(\text{酶})/m(\text{油})=1/100$ 、反应温度为 26°C 、 $\text{pH}=7.6$ 而且不加 CaCl_2 。所用脂肪酶对脂肪酸的种类及甘油酯键的位置均无专一性。

关键词 水解,红花油,无溶剂体系,脂肪酶

中图分类号: O643 TQ645

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2006)08-0902-05

红花油中富含亚油酸,亚油酸在工业生产和医疗保健上具有广泛用途。由红花油水解获得亚油酸有多种方法,其中酶催化法具有催化效率高、反应条件温和、副反应少和产品质量好等优点,近年来日益受到重视。如何提高酶催化效率,是降低生产成本,实现其工业化的关键所在。酶催化性能不仅取决于酶蛋白分子自身结构,也取决于反应环境条件,因而在实践中,除了通过蛋白质基因工程对酶分子进行改造外,还可以利用反应条件控制酶的性质,进而控制酶催化反应。近年来,已有不少探索酶反应条件的研究^[1,2],但对于最适条件随反应时间的变化,至今未见文献报道。本文以国产黑曲霉脂肪酶催化红花油水解,富集亚油酸,研究了反应时间变化时,各因素的最适合值随之而发生的变化,实验中选择无溶剂体系作为酶催化环境,不仅可避免有机溶剂的毒性、易燃及后期分离困难等问题^[3,4],同时,酶可直接作用于底物,提高底物浓度,而且产物分离纯化过程简单、步骤少^[5]。脂肪酶的脂肪酸专一性和甘油酯键位置专一性对于确定水解工艺及产品结构,具有重要意义。本文所用脂肪酶来源于黑曲霉,研究了所用脂肪酶在脂肪酸种类及甘油酯键位置上的专一性,文献对其专一性的报道并不一致^[6,7]。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

脂肪酶 LIPASE LVK (粗酶粉,深圳市绿微康生物工程有限公司),活力为 $25\ 000\ \text{U/g}$ 红花油(市售,亚油酸含量为 79.89%); 其它试剂均为分析纯。ZD-8802 型摇床(太仓市科教器材厂); Orion 828 型酸度计(美国奥立龙)。

1.2 实验方法

将红花油及一定比例的酶水(或缓冲液)溶液分别加入 $50\ \text{mL}$ 锥形瓶中,放入摇床,加热到反应所需温度,快速将二者混合,同时启动摇床以 $200\ \text{r/min}$ 的速度振荡并记时。到预定时间后取出。加入无水乙醇终止反应,以 $0.5\ \text{mol/L}$ KOH-乙醇溶液滴定,酚酞指示终点,分析脂肪酸含量,计算水解率 X 。

$$X(\%) = \frac{AV_t - AV_0}{SV - AV} \times 100\%$$

式中, AV_0 、 AV_t 分别为 0 时和 t 时水解体系的酸值(按 GB/T 5530-1998 方法测定); SV 为红花油的皂化值(按 GB/T 5534-1995 方法测定); AV 为红花油的酸值。

1.3 水解产物中脂肪酸与混合酯的分离方法

向洗去酶粉后的水解产物中加入 0.5 mol/L KOH 乙醇混合溶液, KOH 优先与游离脂肪酸形成水溶性皂^[8], 然后加入水、石油醚及适量乙醇, 可将脂肪酸皂与混合酯分离; 再向脂肪酸皂的水溶液中加入 6 mol/L HCl 调节 pH 值至 2 石油醚提取得到游离脂肪酸。

1.4 单甘酯质量分数的分析

由于所用红花油的不饱和度较高(碘值按 GB/T 5532-1995 方法测定为每克红花油中含 1.45 g 碘), 直接用常规方法^[9]测定产物中单甘酯含量误差较大, 实验中加入足量的 ICl₃冰乙酸溶液, 使不饱和键转化为饱和键, 消除了不饱和键的干扰, 使其适用于不饱和酯的测定。

精确分去脂肪酸的酯类混合物 0.05 ~ 0.06 g 2 份质量相同的样品于具塞三角瓶中, 加入氯仿及 0.1 mol/L ICl₃冰乙酸混合溶液各 10 mL, 摇匀置暗处反应 50 min 后, 其中一份加入 KI 溶液及去离子水, 用 0.1 mol/L Na₂S₂O₃ 滴定(按 GB/T 5532-1995 方法测定), 滴定量为 V₁; 另一份加入 0.07 mL 体积分数为 56% 高氯酸溶液及 25 mL 质量分数为 0.3% 高碘酸-冰乙酸溶液, 35 min 后, 以上述同样方法滴定至终点, 体积计为 V₂, 同时作空白, 体积计为 V₀。按下式计算单甘酯含量:

$$x(\%) = \frac{354.56 \times 10^{-3} \times (V_0 - V) \times c}{2m} \times 100\%$$

式中, $V = V_2 - V_1$; m 为称取样品质量, c 为 Na₂S₂O₃ 摩尔浓度, 354.56 为单亚油酸甘油酯的分子量。

2 结果与讨论

2.1 水油比对红花油水解反应的影响

水是反应中的重要成分, 它关系到油-水界面的大小、脂肪酶的浓度、水解反应进行的程度等, 图 1 是反应时间 1 h 及 24 h 时, 水-油比对水解率关系图。图中可见, 在酶用量等条件一定的情况下, 反应时间为 1 h $m(\text{水})/m(\text{油}) = 0.5$ 时, 得到最大水解率; 而反应 24 h $m(\text{水})/m(\text{油}) = 1$ 时, 水解率最大, 最大水解率向高水油比条件移动。原因可能是水用量越少, 相对酶浓度越高, 油水界面上作用于底物的酶越多, 但油不能被水充分饱和, 油水界面相对较小; 水用量越大, 反应越容易向正向进行, 但同时酶被稀释。反应时间长, 后者作用显著, 反应时间短, 前者影响更显著。在选择水解条件时, 应根据所需水解时间来确定合适的水-油比例。

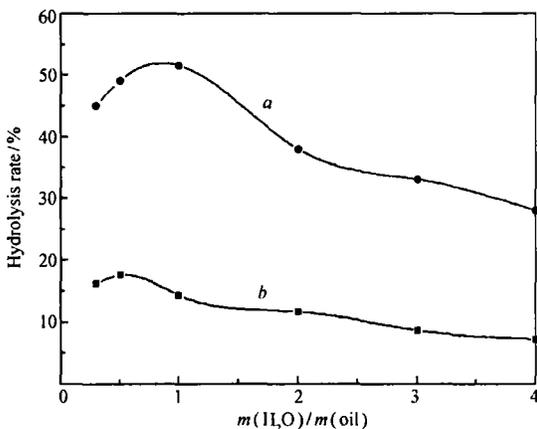


图 1 水油比对水解率的影响

Fig 1 Effect of water content ($m(\text{H}_2\text{O})/m(\text{oil})$)

on the hydrolysis rate
 $m(\text{enzyme})/m(\text{oil}) = 1:100$
30 °C, 200 r/min, pH = 7.0
reaction time h: a. 24; b. 1

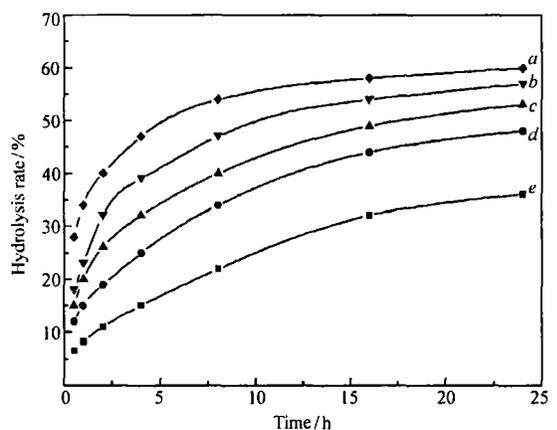


图 2 不同酶量下时间与水解率关系图

Fig 2 Plots of hydrolysis rate versus reaction

time at various enzyme content

36 °C, $m(\text{H}_2\text{O})/m(\text{oil}) = 1:1$

$\omega(\text{CaCl}_2) = 0.2\%$, pH = 7.0, 200 r/min

$m(\text{enzyme})/m(\text{oil})$: a. 10%; b. 5%; c. 2%; d. 1%; e. 0.2%

2.2 酶用量对红花油水解反应的影响

图 2 为不同酶量时时间-水解率关系图。图中可见, 随反应时间延长, 水解率上升趋势逐渐减慢, 在酶用量较大时, 这种趋势更明显。这是因为酶用量较小时, 酶在溶液中分散均匀, 能充分与底物接触, 而在高酶用量条件下, 酶粉容易团聚, 影响了酶与底物的接触, 起有效作用的酶浓度并没有表观浓度高, 导致水解率的提高与酶量的增加不成正比。综合衡量, 在较短时间反应 (1 h) 时, $m(\text{酶})/m(\text{油}) = 5:100$ 较合适, 而长时间反应 (24 h) 时, $m(\text{酶})/m(\text{油}) = 1:100$ 更为经济。

2.3 温度对红花油水解反应的影响

由图 3 可见, 随反应温度逐渐升高, 水解率呈现先增加, 达一最大值后又逐渐降低的趋势, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 酶完全失活。但反应时间不同, 最大水解率所对应的温度不同。反应时间为 0.1、1、8 和 24 h 时, 最高水解率对应的温度分别为 40 、 35 、 30 和 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在短时间反应条件下, 最大水解率对应温度较高; 随反应时间延长, 最大水解率对应温度向低温的方向移动, 说明最适温度与酶作用时间的长短有关, 这是因为一方面酶促反应与非酶的化学反应相同, 当温度升高, 活化分子数增多, 反应速度加快; 另一方面, 由于酶是蛋白质, 随着温度升高酶逐步变性, 酶活力减少而降低了酶的反应速度。最适温度是上述温度对酶反应的双重影响的结果。在低于最适温度时, 前一种效应为主, 在高于最适温度时, 后一种效应为主, 因酶活性迅速丧失, 反应速度很快下降^[10]。

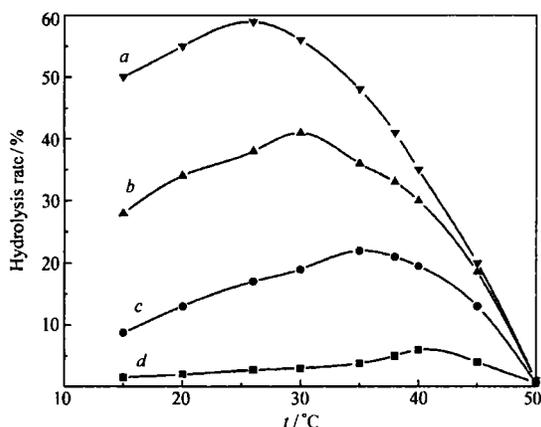


图 3 温度对水解率的影响

Fig 3 Effect of temperature on the hydrolysis rate
 $m(\text{H}_2\text{O})/m(\text{oil}) = 1:1$ $m(\text{enzyme})/m(\text{oil}) = 1:100$
 $\omega(\text{CaCl}_2) = 0.2\%$ $\text{pH} = 7.0$ 200 r/min
 reaction time/h: a. 24 b. 8 c. 3 d. 0.1

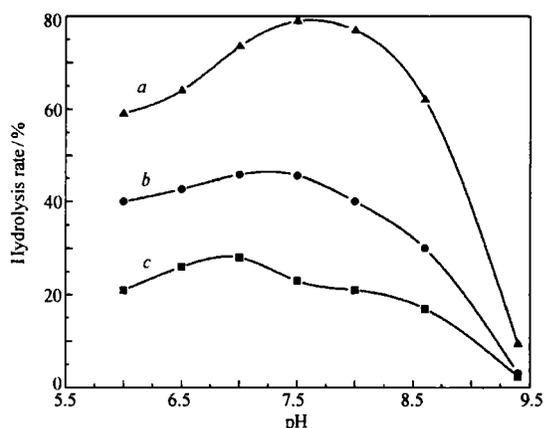


图 4 pH 值对水解率的影响

Fig 4 Effect of pH on the hydrolysis rate
 $m(\text{H}_2\text{O})/m(\text{oil}) = 1:1$ $m(\text{enzyme})/m(\text{oil}) = 5:100$
 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 r/min $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 0.2\text{ mol/L}$
 reaction time/h: a. 24 b. 3 c. 1

2.4 pH 值对红花油水解反应的影响

图 4 考察反应时间 1、3 和 24 h 时, 缓冲液的 pH 值对水解率的影响。从图中可以看出, 反应时间 1 h 时, 缓冲液的 $\text{pH} = 7.0$ 时, 获得最大水解率, 且水解率比相同条件下水溶液中高; 而反应时间 24 h 时, 缓冲液的 $\text{pH} = 7.6$ 时的水解率最大, 且明显高于水溶液中的水解率。图 4 结果说明, 在合适的缓冲液介质中反应能提高水解率, 同时也说明随反应时间延长, 最大水解率所对应 pH 值向较高值方向移动, 表明酶的最适 pH 值并不是一个常数, 只是在一定条件下才有意义, 这与文献所述一致^[11]。pH 值对水解速率的影响可能是因为反应环境的酸碱度会影响酶蛋白构象, 同时还会影响酶分子侧链上极性基团以及底物分子的解离, 从而影响酶反应速度^[11]。在油脂水解过程中, 随着反应进行, 不断有游离脂肪酸生成, 体系中 H^+ 浓度增加, pH 值难以稳定在最适值, 而在长时间反应时, 使体系的初始 pH 值略高些, 有利于反应后期体系的 pH 值接近最适值, 使水解率相对较高。

2.5 添加剂 CaCl_2 对红花油水解反应的影响

Sharon 等^[12] 的研究表明, 一些金属离子能增强酶催化油脂水解的活力。图 5 为添加 CaCl_2 对水解率的影响。图 5 曲线 a、b 分别为加质量分数为 0.2% CaCl_2 (总反应物质量比) 和不加 CaCl_2 时的时间-水

解率关系。从图中可以看出, 反应时间为 1 和 8 h 时, 有添加剂 CaCl_2 的水解率分别为 14.8% 和 29%, 相应无添加剂的水解率分别为 11% 和 24%, 差别较显著; 反应 24 h 时二者水解率分别为 34.2% 和 33.5%, 差别很小。添加剂 CaCl_2 对水解反应的影响主要表现在反应开始后一段时间内, 长时间则对水解无明显促进作用。在反应时间较短时, 可通过加入 CaCl_2 提高反应速度, 而在反应时间较长时, 则不需加 CaCl_2 。

2.6 产物测试及脂肪酶水解专一性分析

由于红花油中含 7.71% 的饱和脂肪酸 (棕榈酸和硬脂酸), 含 79.89% 的亚油酸, 选择水解率与此二值接近的样品进行分离测试较有代表性。对水解率 9% 和 78% 的水解产物中脂肪酸 (FFA) 与酯 (ESTER) 进行分离, 分别测试酸值 (AV) 和碘值 (IV), 并测定酯中单甘酯含量 (MG%), 结果见表 1。

原料每克红花油中碘值为 1.45 g 每克红花油中混合脂肪酸的酸值约为 200 mg (KOH)。

表 1 水解产物分离及测试结果

Table 1 Separation and determination of hydrolysa te

Hydrolysis rate %	AV (FFA) / (mg · g ⁻¹)	AV (ESTER) / (mg · g ⁻¹)	IV (FFA) / (mg · g ⁻¹)	IV (ESTER) / (mg · g ⁻¹)	MG %
9	196.3	0.85	143.2	144.5	7.6
78	192.5	1.36	142.4	143.6	23.5

表 1 结果可见, 分离出的脂肪酸的酸值 > 190 mg /g 而酯的酸值 < 1.5 mg /g 说明水解产物中酸与酯分离得较为纯净。2 种水解率的产物所分离出的脂肪酸与酯的碘值差别很小, 且与原料碘值很接近, 表明所用脂肪酶对饱和及不饱和脂肪酸酯的水解上没有专一性。水解率 9% 的产物中, 单甘酯含量为 7.6%。在水解率 78% 的产物中, 单甘酯含量为 23.5%, 而对于理想的酯键位置专一性水解, 二者应分别接近 0 及 100%, 这表明所用脂肪酶在水解红花油中并无酯键位置专一性。

参 考 文 献

- 1 MIAO De Xun(缪德焜), WEI Chi Li(尉迟力), LI Shu Ben(李树本). *China J Mol Catal* (分子催化) [J], 1994, 8: 458
- 2 Tenkanen M, Konkanen H, Isoniemi R et al. *Appl Microbiol Biotech* [J], 2002, 60: 120
- 3 Selmi B, Contier E, Engan F et al. *Enzyme Microb Tech* [J], 1997, 20: 322
- 4 Selmi B. *J Am Oil Chem Soc* [J], 1998, 75(6): 691
- 5 Candhi N N, Sawant S B, Joshi J B. *Biotechnol Bioeng* [J], 1995, 56: 1
- 6 Linfield W M. *J Am Oil Chem Soc* [J], 1984, 61: 191
- 7 Tsaneo Y. *J Am Oil Chem Soc* [J], 1987, 64: 1697
- 8 Tatum V, Chow C K. *Food Sci Tech* [J], 1992, 53: 337
- 9 LÜ De Shui(吕德水), SHIM ing X iao(石明孝), JIN Gang(金刚). *China Surf Detergent Cosmetics* (日用化学工业) [J], 1996(3): 39
- 10 LUO Jiu Fu(罗九甫). *Enzyme and Enzyme Engineering* (酶和酶工程) [M]. Shanghai(上海): Shanghai Jiaotong University Press(上海交通大学出版社), 1996: 194
- 11 XIONG Zhen Ping(熊振平). *Enzyme Engineering* (酶工程) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1989: 28

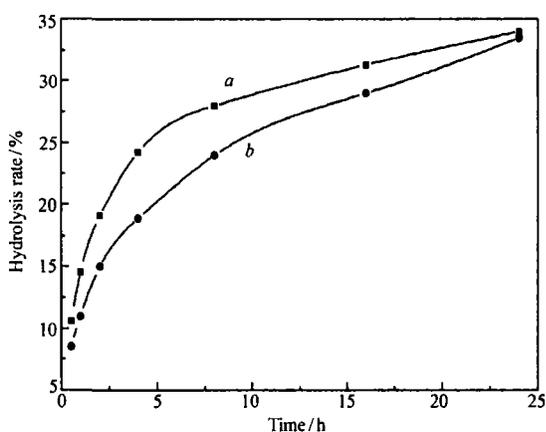


图 5 CaCl_2 对水解率的影响

Fig 5 Effect of CaCl_2 on the hydrolysis rate

$$m(\text{H}_2\text{O})/m(\text{oil})=1$$

$$m(\text{enzyme})/m(\text{oil})=0.5/100 \quad \text{pH}=7.0 \quad 35^\circ\text{C}, 200 \text{ r/min}$$

$$\omega(\text{CaCl}_2) \%: a: 0.2 \quad b: \text{non}$$

12 Sharon C. Nakazato, M. Ogawa, H. I. et al. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* [J], 1998, 21: 292

Lipase Catalyzed Hydrolysis of Safflower Oil in a Solvent free Medium

GAN Zheng Yan^{a,b}, WUMAN JIANG E li^{b*}, JIA Dian-Zeng^a, Xianxi Kan ar^b

^a College of Chemical Engineering, Xinjiang University, Urumqi

^b Xinjiang Research Institute of Physical and Chemical Technology,

Chinese Academy of Sciences Urumqi 830011)

Abstract Enzymatic hydrolysis of safflower oil catalyzed by a lipase from *Aspergillus niger* was investigated in a solvent free system, and the effect of reaction time on the hydrolysis was studied. In addition, the selectivity of the lipase was also examined by testing the monoglycerides content in the ester and the iodine values (IV) of the fatty acid and the ester. The experiment showed that the optimum conditions for an 1 h reaction were $m(\text{H}_2\text{O})/m(\text{oil})=0.5$, $m(\text{lipase})/m(\text{oil})=5/100$, 35°C , $\text{pH}=7.0$ and 0.2% CaCl_2 and the optimum conditions for an 24 h reaction were $m(\text{H}_2\text{O})/m(\text{oil})=1$, $m(\text{lipase})/m(\text{oil})=1/100$, 26°C , $\text{pH}=7.6$ and no CaCl_2 . The lipase has no selectivity on either the fatty acid or the site of the ester bond on the acylglycerol.

Keywords hydrolysis, safflower oil, solvent free medium, lipase

启 事

本刊面向科研院所、大专院校和工矿企业, 发行面已覆盖全国包括港澳台地区, 并一直由中国国际图书贸易总公司向国外发行。在本刊刊登广告极有利于拓宽其产品的销售面。同时可以通过本刊代为厂家向用户单位在改进产品质量或开发新产品起咨询作用。

本刊自 1983 年创刊以来, 其文章被国内外 13 种权威文摘刊物及数据库逐期摘引, 有其广泛的影响。刊发广告, 有利于提高其产品及其厂家的知名度, 进一步开拓市场, 扩大销售量。

欢迎来函来电, 商定广告事宜。

中国科学院长春应用化学研究所《应用化学》编辑部

地址: 长春市人民大街 5625 号, 邮编 130022

联系电话: (0431) 5262016 5262330

E-mail: yhx@ciac.jl.cn