

界面活性劑包覆脂解酵素於有機溶劑中催化油脂水解反應

Hydrolysis of Edible Oils by Surfactant-Coated Lipase in Organic Solvents

計畫編號：NSC89-2214-E-002-022

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：黃世佑 台大化工系教授

一、中文摘要

以界面活性劑包覆脂解酵素，可有效的於有機溶劑中保護酵素之活性。本研究以脂解酵素催化大豆油水解反應為探討模式。*Candida rugosa* 脂解酵素經界面活性劑包覆後，在有機溶劑中其催化活性及穩定性可明顯提高，在製備過程中，界面活性劑種類、界面活性劑／脂解酵素重量比，緩衝溶液 pH 均對 SCL 之產率、蛋白質含量、包覆率與水解能力有很顯著之影響。綜合探討各項因素後，pH 5.0，界面活性劑 Span 60 與脂解酵素以 4:1 之重量比合成之 SCL 具有最佳效果，其催化活性約為粉末狀脂解酵素之 3.5 倍。

在大豆油水解反應方面，於五種不同極性之有機溶劑中進行反應，並對反應溫度及水溶液之 pH 值進行討。結果顯示在 37°C 下，pH 7.0 之磷酸緩衝液及 isooctane 兩相系統中，SCL 擁有最佳催化水解能力。

為了表示 SCL 合成之效果，本研究定義兩種指標，即 Index (Y) 與 Index (C)，分別以產率、界面活性劑對脂解酵素之包覆率為考量依據，表現 SCL 合成後所擁有之活性。

關鍵詞：界面活性劑包覆脂解酵素、大豆油水解、水解反應率

英文摘要

Lipase coated with a specific surfactant can be protected from deterioration in organic solvents. This favors the enhancement of various enzymatic reactions carrying out in organic solvents.

In this work, lipolytic hydrolysis of soybean oil catalyzed by lipase was selected as a model reaction. After coating with the

surfactant, lipase from *Candida rugosa* increased its enzymatic activity and stability in the organic solvent remarkably. The kind of surfactant, the weight ratio of surfactant to lipase and the pH of buffer during the lipase modification process showed significant effects in the yield, protein content, coverage and hydrolysis activity of surfactant-coated lipase (SCL). Through a series of experiments the SCL prepared at buffer of pH 5.0 and weight ratio of Span 60 to lipase 4/1 showed the highest outcome of complex SCL. The activity showed by SCL was about 3.5 times that of the powdered lipase.

In the soybean oil hydrolysis reaction, five organic solvents of different hydrophobicity were employed as the reaction media, from which the best solvent was chosen for hydrolysis. Effects of reaction temperature and the pH of aqueous solution were also investigated. The result revealed that SCL possessed optimal catalytic activity at 37°C in the two-phase system composed of phosphate buffer of pH 7.0 and isooctane.

The indexes expressing the activity of SCL catalyzing the hydrolysis of soybean oil were proposed. One is the lipase activity retained after formation of SCL whose yield is taken into consideration, Index (Y). The another is the activity which considered the coverage of surfactant in the lipase, Index(C).

Keywords: Surfactant coated lipase, Hydrolysis of soybean oil, Conversion of hydrolysis

二、緣由與目的

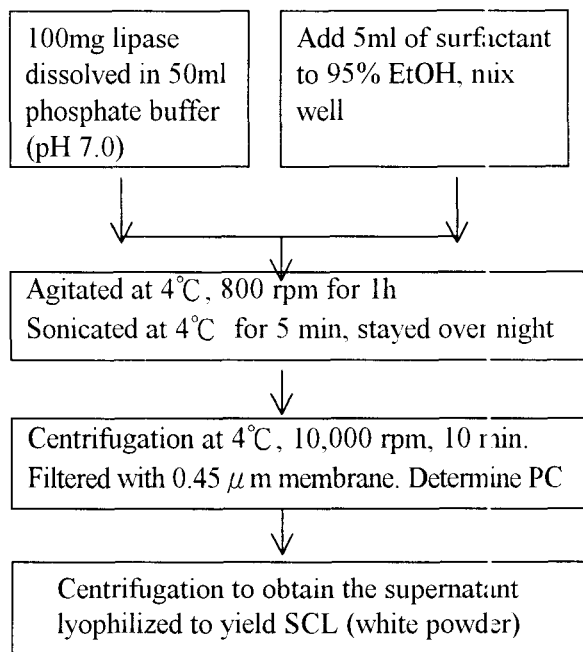
脂解酵素 (lipase) 在有機溶劑中可催化有機醇—酸之酯化、轉酯化及油酯之水解等反應而獲致高價之產物，為防止酯解酵素

直接與有機溶劑，酸、鹼直接接觸而降低其活性，有諸多保護酯解酵素的方法研究出。黃等[1]曾利用“界面活性劑包覆脂解酵素 (surfactant-coated lipase)”進行香葉醇 (geraniol) 與醋酸之酯化反應，使用非離子界面活性劑，Span 85，在 pH 5.2，異辛烷中獲得 97% 之酯化率 (36 小時內)。

本研究之目的為利用 surfactant-coated lipase (SCL) 應用於脂解反應，選擇大豆油 (soybean oil) 之水解反應，以製備之 SCL 催化水解率，探討製備 SCL 及水解反應之最佳條件。

三、研究方法

1. SCL 之製備



嘗試幾種界面活性劑 Spans (Sorbitan esters) 及 Tweens (polysorbates)，緩衝液酸鹼值、界面活性劑與脂解酵素重量比製備 SCL，以探求這些變因對 SCL 特性之影響。

2. 大豆油水解反應

水解反應選擇在有機溶劑及水溶液兩系統中以 SCL 催化大豆油之水解反應，其步驟如下：

(1) 將 10ml 有機溶劑，2ml 調好 pH 之磷酸緩衝溶液 (0.1M) 及 3g 大豆油加入 screw-cap test tube 中，在適當溫度之

shaker 中靜置 30 分鐘 (預熱)。

(2) 加入適量之 SCL 或脂解酵素，於適當溫度的 shaker (150 rpm) 中開始進行催化反應。

(3) 適當時間後取出分析脂肪酸含量，並以相同條件，但不加 SCL 進行空白試驗。實驗在磷酸緩衝液 2ml (0.1M, pH=7.0)，反應溫度 37°C，加入具有 10mg lipase 之 SCL (SCL 之催化能力分析) 或 50mg 之 SCL (水解反應之最適化)，在 10ml 異辛烷中反應 1 小時後取樣分析。改變 SCL 添加量，緩衝液酸鹼值、有機溶劑、溫度等變因，以了解 SCL 催化反應之最佳條件。

3. SCL 之熱穩定性

在不同溫度下，將 SCL 置於無基質存在之反應液中一小時，再加入基質使其反應，並與原本 (未浸泡) 之結果比較，觀察轉化率之差異。

4. 未被包覆之脂解酵素含量測定 [2]

將製備 SCL 時離心過後之上層溶液以 0.45 μm 之濾膜過濾，則溶液蛋白質含量，則可求出未被包覆之脂解酵素量 (此稱 solution depletion method)，此與加入脂解酵素總量之差即為被包覆脂解酵素 (complex lipase) 之量，本實驗蛋白質之含量以 Lowry 法測定。

5. 水解反應率 (Conversion) 之測定

採取滴定法測定水解所釋放出之游離脂肪酸，以 0.5N KOH 滴定。

游離脂肪酸毫莫耳數 = 0.5 × 力價 × (扣除 blank test 滴定 KOH 毫升數之 KOH 毫升數) ①

最初所加入大豆油酯鍵 (ester bond) 之毫莫耳數 = 加入大豆油克數 × $\frac{\text{大豆油之皂化價}}{\text{KOH 分子量}}$ ②

大豆之皂化價 (1 克油酯完全皂化所需 KOH 之毫克數) 191.8

Conversion = $\frac{\text{游離脂肪酸毫莫耳數}}{\text{最初所加入大豆油酯鍵}}$

四、結果與討論

1. 界面活性劑包覆脂解酵素 (SCL) 之特性及催化能力探討在不同界面活性劑、緩衝液酸鹼值、界面活性劑與脂解酵素重量比製備之 SCL 特性。另以 lipase (L)，界面活性劑(S)，SCL 產率(Y)，SCL 中蛋白質含量(PC)，Coverage (lipase 被包覆之比例，以 C 代表)獲得如下之關係式：

$$Y = \frac{\text{生成之 SCL 重}}{\text{加入之 surfactant 與 lipase 之總重}}$$

$$C = \frac{\text{SCL 中 lipase 之重}}{\text{起初所加 lipase 之總重}}$$

$$PC = \frac{\text{SCL 中 lipase 之重}}{\text{SCL 總重}}$$

由以上三式可得

$$\frac{C}{Y \cdot PC} = \frac{\text{加入之(L+S)重}}{\text{加入之 L 重}} \quad (4.1)$$

$$\frac{C}{Y \cdot PC} - 1 = \frac{S}{L}$$

由式(4.1)可看出三者間之關係，可依此判斷實驗之誤差。

(1) 界面活性劑之選擇

由六種市售之界面活性劑，經 SCL 製備並以之催化大豆油之水解反應求其產率，獲得 Span 60 之 Y (79.06) 及 Conversion (42.72%) 最高。界面活性劑的疏水性越強，基質大豆油較易接近 SCL，有利於反應之進行。由 Span 60 所製備之 SCL (S/L=4/1, pH 7.0) 其水解能力約高出粉末脂解酵素者 2.5 倍，而另外兩種界面活性劑 (Span 20, Tween 20)，雖有相當高之 PC，但其 conversion 甚低 (4.14% 及 3.05%)，因其親油性較弱，且在包覆過程對脂解酵素構形有所破壞。

(2) S/L 比對 SCL 特性之影響

在不同界面活性劑添加量，兩種 pH 值

所製備 SCL 之特性有些許的差異，但大致上有相同的趨勢。SCL 產率隨著界面活性劑與脂解酵素之比例增加而上升，在比例為 4 時達到最大產率 (約 80%)。而蛋白質含量與 coverage 呈現相反的趨勢，蛋白質含量隨著界面活性劑與脂解酵素之比例增加而增加，coverage 隨著比例增加而增加，此結果與 Yoshiaki 等 [2] 所提出之結果相同。

Table 1. Effect of S/L ratio on the characteristics of SCL

S/L Ratio	Yield (%)		PC (%)		Coverage (%)		C/Y/PC-1		Conversion (%)	
	pH5	pH7	pH5	pH7	pH5	pH7	pH5	pH7	pH5	pH7
1	52.08	54.40	12.82	14.24	14.82	15.88	1.22	1.05	61.06	43.87
2	70.33	62.79	9.03	10.15	21.34	19.83	2.36	2.11	58.67	43.19
3	75.34	70.05	7.19	7.08	22.28	20.96	3.11	3.22	60.46	49.75
4	80.67	79.06	6.32	6.07	27.55	25.32	4.40	4.28	63.05	42.72
5	78.73	77.73	5.57	5.32	29.47	27.68	5.72	5.69	61.97	42.67

(Preparation of SCL: Cr lipase and Span 60, pH 5.0; reaction conditions are the same as Table 4-1.)

(3) 緩衝溶液 pH 值對 SCL 特性之影響

採用五種不同 pH 值之磷酸溶液，pH 5~9，進行脂解酵素與由 Span 60 之 SCL 製備，結果如表 2。

Table 2. Effect of pH value of buffer on the characteristic of SCL

pH	Yield (%)	PC (%)	Coverage (%)	C/Y/PC-1	Conversion (%)
5	80.67	6.32	27.55	4.40	63.05
6	85.35	7.20	31.53	4.13	48.64
7	79.06	6.07	25.32	4.28	42.72
8	91.07	6.23	27.70	4.46	17.78
9	89.80	6.12	28.34	4.16	15.09

(Preparation of SCL: Cr lipase and Span 60, S/L=4/1; reaction conditions are the same as Table 1.)

由表中可看出在不同 pH 下所製備之 SCL，其產率、蛋白質含量及 coverage 差異均不大，然而用以進行水解反應時，轉化率卻有極大的差異 (63%~15%)，催化能力隨 pH 值之上升而降低，本研究顯示之最適 pH 值 5.0 與張 [3] 之研究相近 (最適 pH 5.0)。

(4) SCL 最佳製備條件之選擇

為了選擇最佳 SCL 製備條件，並考量產率、coverage 催化能力等因素，定義兩種活性表現指標：

$$\text{Index(Y)} [U/mg (S+L)] = \text{Yield} \times \text{單位}$$

SCL 重量之活性=加入單位質量(S+L) 形成 SCL 後擁有之活性…………… (4.2)

Index (C) [U/mg lipase] = Coverage x SCL 中單位 lipase 重量之活性=加入單位質量 L 形成 SCL 所擁有之活性……………(4.3)

活性(U)定義為在本實驗系統中(37°C, pH 7.0, isoctane), 大豆油水解每小時所釋放出之脂肪酸毫莫耳數。

由表 1 與表 2 之數據據(4.2)及(4.3)式計算 Index (Y)與 Index (C)得表 3 與表 4。

Table 3. Index (Y) and Index (C) of different S/L ratio

S/L Ratio	Index (Y) [U/mg(S+L)]		Index (C) [U/mg lipase]	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
1	0.0420	0.0350	0.0932	0.0975
2	0.0383	0.0293	0.1287	0.1032
3	0.0336	0.0256	0.1383	0.1298
4	0.0332	0.0211	0.1788	0.1197
5	0.0280	0.0181	0.1883	0.1211

(Preparation of SCL:Cr lipase and Sapon 60, pH 5.0; reaction conditions are the same as Table 1.)

Table 4. Index (Y) and Index (C) of different pH value of buffer

pH	Index (Y) [U/mg(S+L)]	Index (C) [U/mg lipase]
5	0.0332	0.1788
6	0.0308	0.1581
7	0.0211	0.1197
8	0.0104	0.0565
9	0.0085	0.0439

(Preparation of SCL:Cr lipase and Sapon 60, S/L=4/1; reaction conditions are the same as Table 1.)

在表 4 中, pH 5 時所製備之 SCL 在兩個 Index 都具有最佳效果,但在表 3 中卻發現兩種 Index 卻呈現不同的趨勢。Index(Y)隨著 S/L 比增加而變小, Index(C)則相反。在考量酵素價格遠高於界面活性劑及兩種 Index 所表現出之效果, S/L 比以 4/1 為最佳,而界面活性劑僅 Span 60 具有較強之催化能力及結果。

2. 水解反應

(1) 緩衝溶液酸鹼值對水解反應之影響

採五種不同 pH 值 (5~9) 之磷酸緩衝液以進行 SCL 催化水解反應。結果顯示在中性範圍內有較強之催化能力。此結果與一般相近,如 Pronk 等[4]以 Cr 脂解酵素催化 tributyrin 及大豆油之水

解,最佳 pH 值在 6.5 及 7.0 之間,另外許多以 Cr 脂解酵素催化水解反應的研究者皆在 pH 值為中性範圍有最佳催化能力。

(2) 最適有機溶劑之選擇

採用五種常見且具不同極性之有機溶劑,分別在其中以 SCL 進行水解反應,溶劑極性以 log P (P 為溶劑在正辛醇及水二不互溶相中之分配係數)為指標 [5]。實驗結果顯示,轉化率隨 log P 值增加而上升,即疏水性越強的有機溶劑中,將越有利於 SCL 催化大豆油之水解反應,在 isoctane (log P = 4.51)獲得最高轉化率 (23.58%)。

(3) 反應溫度對水解反應之影響

在四個不同溫度下以 SCL 及 free lipase (等量之 lipase) 催化水解反應之進行。SCL 在反應溫度 25°C 時,轉化率為 3.41%,隨著溫度的上升,轉化率也隨之增加,37°C 與 45°C 時之轉化率相差很小,約在 23%,溫度升至 55°C,轉化率大幅下降至 11.7%,酵素已有失活現象發生。比較 free lipase 與 SCL 之催化能力,除 25°C 外,之催化能力均高於 free lipase。

五、參考文獻

- [1] Huang, S.Y., Chang, H.L. and Goto, M. "Preparation of Surfactant Coated Lipase for the Esterification of Geraniol and Acetic Acid in Organic Solvents." *Enzyme and Microb. Technol.* **22**, 552-557 (1998).
- [2] Yoshiaki, S., Fukunage, K., Matsuno, T. and Nakao, K., "A Study on the Lipid-Coating of Lipase," *Biochemical Engineering J.* **2**, 137-143 (1998).
- [3] H.L. Chang: "Operation Strategies for Reversed Micellar Extraction of Enzyme Reaction in Organic Solvent with the Protection of Surfactant", Ph. D. Dissertation, Dept. of Chem. Eng., National Taiwan University (1996).
- [4] Pronk, W., Boswinkel, G. and Riet, L.V., "Parameters influencing Hydrolysis Kinetics of Lipase in A Hydrophilic Membrane

Bioreactor,” *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 214-220 (1992).

- [5] Laane. C., Boeren, S., Vos, K. and Vegger, C., “Rules for Optimization of Biocatalysts in Organic Solvents,” *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81-87 (1987).