

文章编号 :1009-038X(2000)04-0361-04

微乳凝胶固定化酶催化长链脂肪酸酯的合成

刘俊康, 刘 瑛, 胡学铮, 殷福珊

(无锡轻工大学化学与材料工程学院, 江苏无锡 214036)

摘 要 :研究了以 AOT(二(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠)/正庚烷/水/明胶组成的反相微乳凝胶固定化脂肪酶,在有机溶剂中催化棕榈酸和十六醇的酯化反应.反应在 25℃ 下进行,固定化脂肪酶重复使用 16 次后,平衡转化率仍可达 90%.反应既可用釜式反应器又适用柱式反应器.产物通过冷却的反应液后沉淀析出,回收率可达 65%,产品纯度高.

关键词 :微乳凝胶;固定化脂肪酶;酯化反应

中图分类号 :TQ645.56

文献标识码 :A

Synthesis of Long-chain Fatty Acid Ester by Lipase Immobilized by Microemulsion-based Organo-gel in Organic Media

LIU Jun-kang, LIU Ying, HU Xue-zheng, YIN Fu-shan

(School of Chemical and Material Engineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract : In this paper, the catalytical esterification of palmitic acid with 1-hexadecanol by lipase immobilized by microemulsion-base organo-gel that consisted of bis(2-ethylhexyl)sodium sulphsuccinate (AOT)/heptane/water/gelatin in apolar organic solvent was studied. The temperature of the reaction system was 25℃. After 16 times repeated uses, the percent conversion of palm acid was bigger than 90%. The catalyst can not only be used in batch reaction, but also be used in a packed bed of the immobilized lipase. The product can be deposited out by colding reaction solution. The rate of recovery of 1-hexadecanol palmitate was more than 65%. The purity of product was very high.

Key words : microemulsion-base organo-gels; immobilized lipase; esterification

自从 1984 年 Alexander M. Klinanov 等人发现酶在有机溶剂中仍有催化活性后^[1], Luisi 及其合作者制作出以 AOT/异辛烷/水/明胶组成的反相微乳凝胶^[2],并把生物酶固定在凝胶中.通过 ¹HNMR、CD、TEM、SEM 研究了凝胶的结构^[3],发现反相微乳凝胶固定化酶溶于反相胶束的小水滴中,保持了反相胶束体系中酶反应的优点.该凝胶不溶于大多数有机溶剂,在 30℃ 以下有一定的机

械强度,但遇水会溶胀破碎.用该凝胶固定脂肪酶在有机溶剂中催化脂肪酸和脂肪醇的酯化反应,具有反应体系简单、产物分离容易、反应条件温和、酶活性保持时间长、酶重复使用方便等优点.反应既可在釜式反应器中进行,又适合柱式反应器,便于生产规模的扩大^[4].国内从 20 世纪 90 年代起对有机溶剂中脂肪酶催化酯合成进行了一些研究^[5~7],但用反相微乳凝胶固定化酶在有机溶剂中催化酯

收稿日期 :1999-12-01;修订日期 :2000-04-04.

作者简介 :刘俊康(1964-)男,江苏吴县人,理学学士,副教授.

万方数据

化反应还未见报道.

脂肪酸酯是一大类重要的有机化合物,广泛应用于食品、饮料、饲料、化妆品及医药等日常用品中,直接从动植物中提取已无法满足日益增长的需求.为此,人们把研究目光转向生物方法来合成,酶催化合成的产品被公认为是“天然”产品.棕榈酸十六酯为蜡状的吸留性物质,是优良的柔润剂,可用于化妆品中,具有和皮肤的亲和性好、可生物降解等优点.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脂肪酶 100 000 U/mL,NOVO 公司提供;庚烷 分析纯,杭州炼油厂生产;AOT(二(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠) 上海试剂二厂生产;明胶 化学纯,上海化学试剂站分装厂分装;棕榈酸 化学纯,海盐日用化工厂生产;十六醇 化学纯,锡山洪声化工厂生产;其它脂肪酸和脂肪醇均为化学纯试剂.

TJ270-30 型红外分光光度计 天津光学仪器厂制造;WL-1 显微熔点测定仪 厦门教学仪器厂制造.

1.2 实验方法

1.2.1 含酶反相微乳凝胶的制备 在 50 mL 的具塞三角烧瓶中加入固体明胶、去离子水、AOT 和庚烷,在电磁力搅拌下,加热到 45~50 ℃,保温到明胶固体颗粒全部溶解后,加入一定量的酶液,搅匀后,冷却到 30 ℃ 以下,停止搅拌,放置一段时间即得到透明的含酶微乳凝胶.

1.2.2 脂肪酸酯的合成及分离方法 称取一定量的含酶微乳凝胶,制成一定大小的颗粒,放入 50 mL 的具塞三角烧瓶中,烧瓶放入烧杯中水浴恒温,在 25 ℃ 下,加入 25 mL 棕榈酸和十六醇的庚烷溶液,反应立即开始,用恒温电磁搅拌机搅拌.定时吸取 1 mL 反应液放入盛有 5 mL 体积比为 1:4 的苯/乙醇溶液的三角瓶中,以酚酞作指示剂,用 0.025 mol/L 的 NaOH 的乙醇溶液滴定反应液中的棕榈酸来确定反应进程.柱式反应是把含酶凝胶颗粒填充在一层析柱中,将棕榈酸和十六醇的庚烷溶液按一定速度滴加,用上述滴定方法确定流出液中棕榈酸的质量分数.反应达平衡后,收集产物到 150 mL 的具塞三角烧瓶中,把具塞三角烧瓶冷却到 7 ℃,棕榈酸十六酯的溶解度降低,有大量白色晶体析出,立刻减压过滤即得晶体,晶体用红外灯烘干(烘去庚烷)称重.

1.2.3 棕榈酸十六酯熔点的测定 将分离得到的干燥产品(晶体)放在表面皿中用玻棒研细后,取少许放在一薄玻璃片上,再用另一相同的玻璃片盖上,放在 WL-1 显微熔点测定仪上,慢慢升温,在放大镜中观察晶体熔化时温度计的读数,即为熔点.

1.2.4 棕榈酸十六酯红外光谱的测定 将上述分离得到的少量干燥产品(晶体)放进盛有烘干的 KBr 晶体的玛瑙研钵中,研细后压成盐片,在 TJ-270 型红外分光光度计上扫描得到红外谱图.

2 结果与讨论

2.1 固定化酶对酸、醇酯化反应的选择性

十六酸和十六醇分别和不同碳链的醇和酸的反应结果如表 1 所示.可知,十六酸和 8 种不同碳链长度的醇反应的初速度随着链长的增加呈下降的趋势,这和不同链长的醇(异丙醇除外)在凝胶中的扩散速度有关.不同链长的醇和十六酸反应的转化率基本相同,异丙醇等亲水性太强的醇反应初速度小,而且 48 h 的转化率也只有 23%.

表 1 十六酸和十六醇分别和不同碳链的醇和酸反应结果

十六酸			十六醇		
醇	相对初速度/%	24 h 转化率/%	酸	相对初速度/%	24 h 转化率/%
异丙醇	20	23 *	丁 酸	19.4	32.6
丁 醇	100	92.3	戊 酸	29	38.7
戊 醇	62.5	92.3	辛 酸	96.8	92.9
异戊醇	69.3	92	十二酸	85.5	93.9
癸 醇	62.5	93.5	十四酸	100	93.9
十四醇	55.7	93.2	十六酸	71	93.6
十六醇	37.5	93.2	油 酸	88.7	92.9
十八醇	34.1	93	十八酸	35.5	88.4

注: * 为 48 h 的转化率

十六醇和不同链长的酸的反应情况较复杂.从相对初速度来看,十四酸的反应速度最快,而辛酸、十二酸、十四酸、十六酸和油酸的相对初速度也较快,从 24 h 转化率的数据可以看出,丁酸和戊酸的转化率较小,其它酸的转化率都在 90% 左右.

反应相对初速度主要与酶的选择性和反应底物的扩散速度有关.从以上结果可以推出,该酶对中、长碳链的酸选择性较好,油酸由于扩散性比十八酸和十六酸好,所以反应相对初速度高.亲水性太强的丙醇、乙醇等能和水混溶,因此会进入凝胶的微乳液滴中,对酶分子的活性和结构都可能产生

影响,因此不但反应速度慢,而且转化率也较低.

2.2 含酶凝胶加入量对酯化反应速度的影响

不同凝胶量对 0.1 mol/L 的棕榈酸和十六醇的酯化反应的反应初速度的影响见表 2.当凝胶量为 1~7 g 时,它与相对反应初速度基本上成线性关系,回归出通过原点的线性方程为: $y = 10.673 x$ ($R^2 = 0.9979$).当凝胶量为 10 g 时,反应初速度开始向下偏离.这说明对 0.1 mol/L 的棕榈酸和十六醇的酯化反应来说,当凝胶量小于 7 g 时,反应主要是由动力学控制,内扩散可以忽略;当凝胶量大于 10 g 时,内扩散速度小于反应速度,这时内扩散影响就不可忽略.在工业生产中要根据反应速度和生产成本两因素来确定含酶凝胶的最佳用量.

表 2 凝胶用量对相对反应初速度的影响

Tab.2 The effect of organo-gel use level on relative reactive initial velocity

凝胶用量/g	相对反应初速度/%
1	12.5
3	33.3
5	54.3
7	73.3
10	100

2.3 微乳凝胶重复使用情况

微乳凝胶固定化酶的重复使用可大大降低成本.经 14 d 的重复使用发现,16 次反应的平衡转化率均达到 90% 以上,见表 3.且前 11 次达到平衡的时间都在 120 min 内,从第 12 次开始达到平衡的时间在 150 min 内.

表 3 微乳凝胶固定化酶的重复使用情况

Tab.3 The case of repetitive manipulation of lipase immobilized by microemulsion based organo-gel

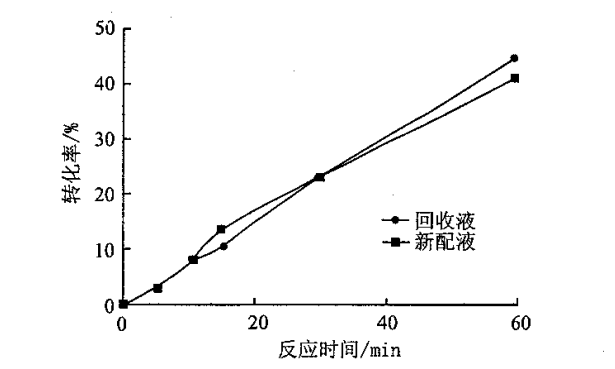
重复次数	反应平衡时间/h	重复次数	反应平衡时间/h
1	2	9	2
2	2	10	2
3	2	11	2
4	2	12	2.5
5	2	13	2.5
6	2	14	2.5
7	2	15	2.5
8	2	16	2.5

注:反应条件为酶质量浓度 10 mg/mL 的微乳凝胶 8 g,反应温度 25 ℃,搅拌速度 150 r/min,棕榈酸、十六醇浓度均为 0.10 mol/L.

2.4 反应液的重复使用情况

回收液的循环使用是该方法是否有实用意义的关键.加入棕榈酸和十六醇,配成酸和醇的浓度

均为 0.1 mol/mL 的庚烷溶液(以下简称回收液).新配的 0.1 mol/L 棕榈酸和十六醇溶液(以下简称新配液).分别用回收液和新配液作反应液进行反应 60 min 的反应进程见图 1.可以看出,回收液和新配液在 60 min 内反应速度基本相同,说明回收液中的棕榈酸十六酯对酶催化反应基本没有抑制作用,所以对反应速度几乎无影响.但反应的平衡转化率还是不同的,实验测出回收液的反应平衡转化率为 92.7%,而新配液的反应平衡转化率为 93.4%,说明棕榈酸十六酯对反应平衡有影响,产物的加入会使平衡向逆反应方向移动.



反应条件:酶质量浓度为 7.5 mg/mL 的微乳凝胶 5 g,反应温度 25 ℃,搅拌速度 150 r/min,棕榈酸、十六醇浓度均为 0.10 mol/L.

图 1 回收液和新配液的反应进程
Fig.1 The reactive progress curve of recuperated solution and new preparative solution

2.5 用流动柱反应器合成棕榈酸十六酯

用一根内径为 1.8 cm 的层析柱作为管式反应器,装柱后凝胶高度为 25 cm.在 25 ℃ 下试验了浓度为 0.10 mol/L 的棕榈酸和十六醇溶液在不同体积流量下的反应转化率,结果见表 4.在 30 mL/h 的体积流量时,反应转化率可达 93.5%,和釜式反应平衡转化率相同.此后,随着体积流量的提高,转化率逐渐降低.

体积流量为 30 mL/h 时,柱反应器的流出体积和棕榈酸浓度的关系见图 2.当流出体积为 25 mL 时,反应液开始流出.流出体积为 40 mL 后,反应趋于稳定.

表 4 不同体积流量下的反应转化率

Tab.4 The reactive percent conversion of different volumetric flow

体积流量/(mL/h)	转化率/%
30	93.5
40	92.0
70	79.8

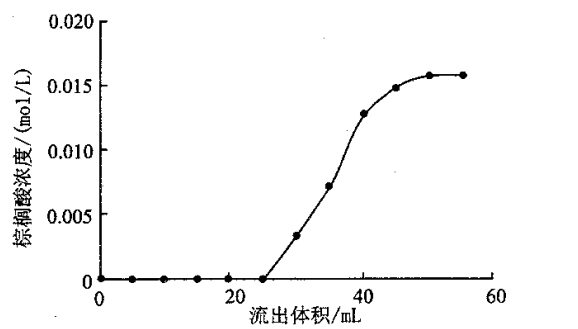


图 2 柱式反应流出曲线

Fig.2 The elution curve of cylindric reaction

2.6 分离回收和产品鉴定

反应液冷却到 7℃ 时 ,产品回收率达 65% ,见表5.

表 5 棕榈酸十六酯分离数据表

Tab.5 The data sheet of purifying palmitic acid 1-hexadester

反应液中棕榈酸浓度 ¹⁾ /(mol/L)	过滤母液中棕榈酸浓度 ¹⁾ /(mol/L)	产品中棕榈酸质量分数 ²⁾ /%	产品回收率/%
5.9×10^{-3}	4.6×10^{-3}	0.1	65

注 1) 用 0.025 mol/L NaOH 的乙醇溶液滴定测得 ; 2) 把产品溶解于庚烷中配成的溶液.

过滤后的母液可重复使用. 在过滤时 ,棕榈酸十六酯晶体吸附较多的庚烷 ,如能改用象压滤这样的过滤方式 ,可减少庚烷的吸附 ,从而使产品更纯. 用 WL-1 显微熔点测定仪测得产品熔点为 52~53

℃ 和棕榈酸十六酯文献值(53~54℃)基本相近. 用 TJ270-30 型红外分光光度计测定 ,未发现 O—H 伸缩振动峰(见图 3) ,可认定产品中棕榈酸和十六醇的量极少.

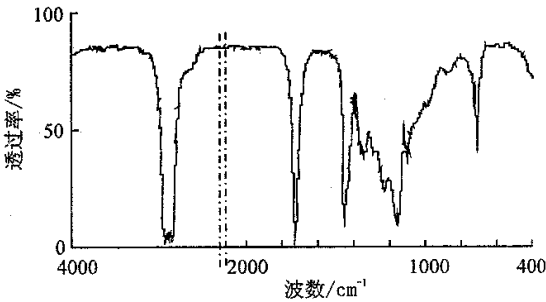


图 3 棕榈酸十六酯红外光谱图

Fig. 3 The IR spectrum of plamitic acid 1-hexadester

3 结 论

用反相微乳凝胶固定化脂肪酶 ,以庚烷作溶剂在 25℃ 下催化棕榈酸十六酯的合成 ,反应体系简单 ,生物催化剂重复使用 16 次 ,14 d 后反应平衡转化率仍可达 90% 以上 ,而反应达到平衡的时间只需 2~2.5 h ,增加凝胶量或提高凝胶中脂肪酶的质量浓度 ,反应完成时间还可进一步缩短 ;既可用于釜式反应器又可用于柱式反应器 ,两反应器的平衡转化率相同. 产物可通过冷却反应液来沉淀析出产物 ,产物回收率可达 65% 以上. 说明产品纯度较高 ,反应过程无强酸、强碱加入 ,可认为是绿色产品.

参考文献

[1] ZAKS A , KLIBANOV A M. Enzymatic catalysis in organic media at 100℃ [J]. Science , 1984 , 224 :1249.
[2] HAERING G , LUISI P L. Hydrocarbon gel fromwater in oil microemulsion[J]. J Phys chem , 1986 , 90 :5892~5895.
[3] REES G D , ROBINSON B H. Microemulsions and organogels : properties and novel applications[J]. Adv mater , 1993(9) :608~619.
[4] 崔正刚 ,殷福珊编. 微乳化技术及应用[M]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1999. 420~426.
[5] 谢志东 ,何炳林. 猪胰脂肪酶的固定化及其在有机相中催化丁酸甲酯和正丁醇的酯交换反应研究 [J]. 高等学校化学通报 , 1994(9) :1335~1339.
[6] 王栋 ,徐岩 ,章克昌等. 脂肪酶非水相转化失水山梨醇油酸酐 [J]. 无锡轻工大学学报 ,1999 ,18(2) :50~54.
[7] 徐岩 ,王亚非 ,章克昌. 有机相中微生物脂肪酶合成短链脂肪酸酯的研究 [J]. 无锡轻工大学学报 ,1998 ,17(1) :24~28.

(责任编辑 :李春丽)