

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0020 - 04

有机相酶促合成 *N*-月桂酰- β -氨基丙腈

夏咏梅, 许志国, 胡学铮, 胡学一, 方云

(江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:以月桂酸甲酯和 β -氨基丙腈为原料,在有机相中经脂肪酶催化合成 *N*-月桂酰- β -氨基丙腈(LAP)。在比较所用脂肪酶的催化活性的基础上,详细探讨了固定化脂肪酶 *Candida antarctica*(南极洲假丝酵母)CAL-2 催化该反应的影响因素。经筛选,适宜的反应条件为:70 °C, $n(\beta$ -氨基丙腈): n (月桂酸甲酯)=1:1,底物质量浓度为 35 g/L,加酶量为 200 U/g(以氨基丙腈的质量计),反应体系初始加水量为 3% 腈重。在此实验条件下反应 24 h 后, β -氨基丙腈的最高转化率为 96.8%。

关键词:酶催化;*N*-月桂酰- β -氨基丙腈;脂肪酶; β -氨基丙腈;有机相

中图分类号:Q 814.9;O 69

文献标识码:A

Lipase-Catalyzed Synthesis of *N*-Lauroyl- β -Amino Propionitrile in Organic Media

XIA Yong-mei, XU Zhi-guo, HU Xue-zheng, HU Xue-yi, FANG Yun

(School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Lipase-catalyzed synthesis of *N*-lauroyl- β -amino propionitrile in organic media was studied. The catalytic activities of some lipases in the reaction were examined. The factors affecting reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida antarctica* (CAL-2) were investigated. The optimal reaction conditions are: molar ratio of β -amino propionitrile to methyl laurate = 1:1, substrate concentration of 35 g β -amino propionitrile/L, 200 U/g β -amino propionitrile of lipase CAL-2 and 3% of water based on the initial mass of β -amino propionitrile at 70 °C. The highest conversion of β -amino propionitrile 96.8% was obtained under the optimal conditions after 24 h.

Key words: enzymatic synthesis; *N*-Lauroyl- β -amino propionitrile; lipase; β -amino propionitrile; organic media

N-月桂酰- β -氨基丙腈(LAP)是酰基氨基酸型表面活性剂 *N*-月桂酰- β -丙氨酸(盐)(LAA)的前体,LAP 经水解可以获得 LAA。LAA 是一种具有良好的抑菌、杀菌性能的表面活性剂,可广泛应用于食品、化妆品、制药、矿物浮选以及纺织等领域^[1~5]。化学法合成 *N*-月桂酰- β -丙氨酸(盐)通常采用如下路

线:首先将脂肪酸制备成脂肪酰氯,然后在室温下用脂肪酰氯与氨基酸在碱性催化剂作用下进行反应,得到脂肪酰基氨基酸盐,再经无机酸酸化提纯,最后中和得到目的产物。该方法的优点是总产率较高,但是污染较大,副产物多,产物色泽深。同时化学合成品直接用于食品、化妆品和制药的安全性始

收稿日期 2001-12-09; 修订日期 2001-12-19.

基金项目 江苏省科委基金项目(BJ 99036)资助课题.

作者简介 夏咏梅(1965-),女,江苏南京人,工学博士,副教授.

终使人心存疑虑,希望能由天然产物或生物制品替代之.与化学法合成相比较,酶法合成具有反应条件温和、底物转化率高、副反应少、安全性高等优点.Taeko Izumi 等^[6]曾经报道了相关的研究,但只是初步探讨了以一种固定化脂肪酶酶促合成 N-月桂酰- β -丙氨酸(钠)的反应可能性,而且工艺条件未经优化(加酶量与腈等重,相当于 7 000 U/g).因此,作者以月桂酸甲酯和 β -氨基丙腈为原料,以异丙醚为溶剂,选用几种脂肪酶为催化剂,合成 LAP,并对适宜反应条件进行了系统研究.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

脂肪酶由下列单位赠送:*Pseudomonas fluorescens* (荧光假单胞菌 PFL),橄榄油水解酶活 30 000 U/g, Amano 公司;*Pseudomonas sp* (假单胞属 AK),橄榄油水解酶活 25 000 U/g, Amano 公司;Lipase PPW,橄榄油水解酶活 400 000 U/g, Novo Nordisk 公司;Lipase 100T,橄榄油水解酶活 60 000 U/g, Novo Nordisk 公司;*Candida antarctica* (南极洲假丝酵母) CAL-1, 10 000 U/g, 北京中科院微生物研究所;*Candida antarctica* CAL-2, 橄榄油水解酶活 7 000 U/g, Novo Nordisk 公司. β -氨基丙腈,作者所在实验室自制;月桂酸甲酯:皂化价 262.1 mg/g,酸价 < 1 mg/g,海盐精细化工厂提供;异丙醚:AR,上海化学试剂公司提供;其它分析试剂均为 AR 级. β -氨基丙腈、月桂酸甲酯、异丙醚在使用前均经 4 Å 分子筛脱水.

1.2 实验方法

1.2.1 LAP 的酶促合成 将精确称量的 β -氨基丙腈和月桂酸甲酯(除特别说明外,原料摩尔比为 $n(\beta\text{-氨基丙腈}):n(\text{月桂酸甲酯})=1:1$)以及异丙醚、适量水或不同 pH 值的缓冲液置于具磁力搅拌、温控系统和回流冷凝装置的酶反应器中,混合均匀并升温至预定的反应温度后加入一定量的脂肪酶,控温反应一定时间.反应结束后立即在体系中加入异丙醇以终止反应.

1.2.2 β -氨基丙腈转化率的测定 本实验以 β -氨基丙腈的转化率来衡量酶促合成 LAP 的反应深度.在上述终止反应的产物中加入异丙醇,使反应产生的产物沉淀溶解,抽滤除去酶粉.在滤液中加入 6 滴 0.2% 的溴酚兰-异丙醇溶液指示剂,以盐酸异丙醇标准溶液滴定至等量点,同时作空白实验进行对照.

1.2.3 LAP 得率的测定 用氯仿溶解反应生成的 LAP 沉淀,过滤除去酶粉后,滤液用旋转蒸发器蒸除

氯仿等溶剂,所得白色固体用异丙醚洗涤,真空干燥后称重.

2 结果与讨论

2.1 酶种选择

为了选择对该反应具有良好催化能力的脂肪酶,首先用表 1 中的 6 种脂肪酶催化合成 LAP.反应条件为: $T=24\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t=24\text{ h}$, $n/n=1:1$,底物质量浓度 35 g/L,加酶量 7 000 U/g,初始加水量与腈等重.反应结束后测定 β -氨基丙腈的转化率,结果见表 1.

表 1 不同脂肪酶的催化活性比较

Tab.1 Catalytic activities of some lipases

酶 种	氨基丙腈转化率/%
PFL	52.7
AK	60.4
PPW	91.6
100T	90.9
CAL-1	89.3
CAL-2	96.3

实验结果表明:PPW、100T、CAL-1 和 CAL-2 均具有较好的催化活性.在以下反应中以 CAL-2 为酶催化剂,在维持原料 β -氨基丙腈仍具有较高转化率的前提下将加酶量初步减小至 3 000 U/g.

2.2 底物质量浓度的选择

为了确定底物质量浓度对反应的影响,实验中选择底物质量浓度分别为每升溶剂含 20、35、50、70、90 g β -氨基丙腈.当底物质量浓度超过 35 g/L 时,反应过程伴有黄色粘状物生成,表明有副反应发生.其原因可能是因为 β -氨基丙腈在溶剂不能完全溶解而部分地以小液滴形式存在于体系中,在高温下导致分解或聚合等副反应.因此,实验中的底物质量浓度确定为每升 35 g β -氨基丙腈(以下均以单位 g/L 表示).

2.3 初始加水量的影响

初始加水量对原料 β -氨基丙腈转化率影响的实验结果如图 1 所示.

从图 1 可知,在初始加水量为 β -氨基丙腈重的 0~6% 范围内, β -氨基丙腈转化率较高,并在初始加水量为 6% 腈重时达到最大值.此后,随着初始加水量增加, β -氨基丙腈转化率逐步减小.其主要原因可能是因为体系中过量水的存在会导致脂肪酶催化活性部分下降或丧失.因此,进一步实验时反应体系中最佳初始加水量暂取 β -氨基丙腈质量的 6%.

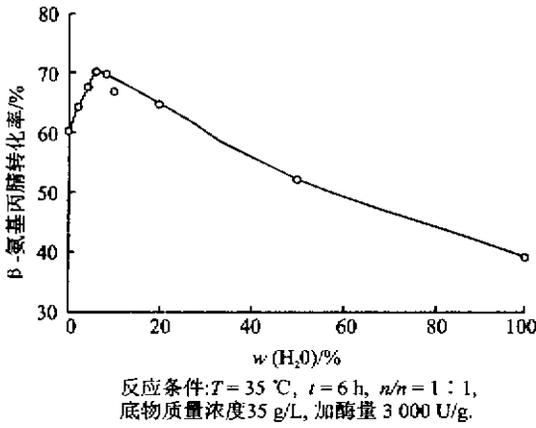


图1 初始加水量对 β -氨基丙腈转化率的影响

Fig.1 Effect of water content on the conversion of β -amino propionitrile

2.4 pH 值的影响

一般而言, pH 环境对酶的催化活性有一定影响. 本实验分别以 pH 值为 4、7、9 的缓冲液代替上述反应中所加的去离子水(6% 腈重), 在相同反应条件下测定 β -氨基丙腈的转化率, 结果分别为 66.6%、64.6% 和 64.9%, 而加去离子水的实验结果为 70.3%. 以缓冲液代替去离子水导致 β -氨基丙腈转化率下降的原因可能是因为在弱酸性条件下, 一部分 β -氨基丙腈以盐的形式存在, 分子体积增大因而不适合做脂肪酶 CAL-2 的底物; 而在弱碱性条件下脂肪酶 CAL-2 的催化活性受到影响或抑制, 从而导致 β -氨基丙腈转化率下降. 因此, 在以下反应体系中仍然加入去离子水来维持酶的催化活性.

2.5 温度的影响

酶是一种对温度比较敏感的催化剂, 温度升高会使反应速度加快但也会引起酶失活. 特别是在水环境中, 有时温度的微小变动即可能导致酶催化活性有较大的变化. 在较高温度下, 原料 β -氨基丙腈有可能会发生分解等副反应. 因此, 本实验分别考察了酶催化温度对 β -氨基丙腈转化率及对 LAP 得率的影响, 结果如图 2、图 3 所示.

由图 2 和图 3 可以看出, 反应温度接近 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 时 β -氨基丙腈的转化率最高, 且 β -氨基丙腈的转化率与目标产物 LAP 的得率具有良好的线性关系, 说明转化率与得率之间的差距主要是由洗涤过程中少量 LAP 溶解于异丙醚所造成的. 这说明所选用的脂肪酶 CAL-2 在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 的异丙醚中仍然保持了良好的催化活性. 因此, 反应的最佳温度选定为 $70\text{ }^\circ\text{C}$.

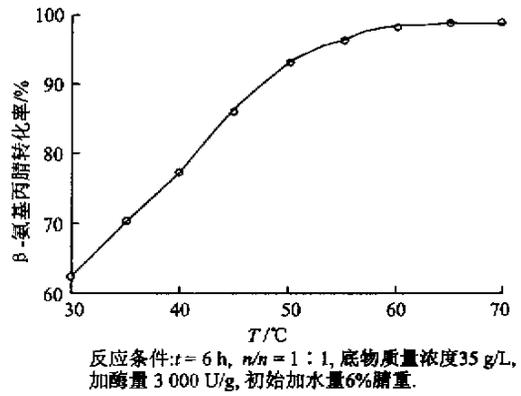


图2 温度对 β -氨基丙腈转化率的影响

Fig.2 Effect of temperature on the conversion of β -amino propionitrile

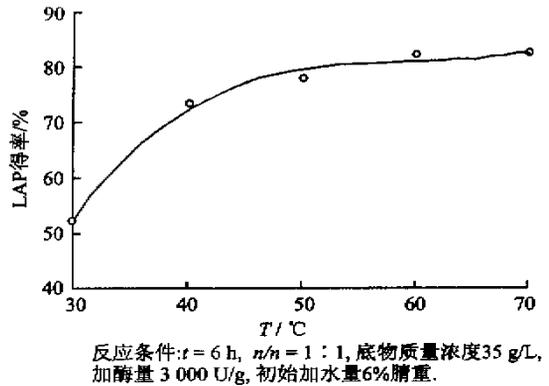


图3 温度对 LAP 得率的影响

Fig.3 Effect of temperature on the yield of LAP

2.6 加酶量的影响

在以上实验以及 Taeko Izumi 等^[6]的研究报道中, 加酶量均处于较高水平. 为了提高酶促反应的经济性, 实验中考察了不同加酶量对 β -氨基丙腈转化率—时间关系曲线的影响, 结果如图 4 所示.

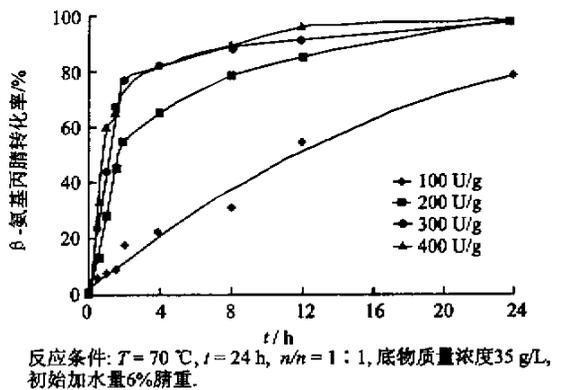


图4 加酶量对 β -氨基丙腈转化率的影响

Fig.4 Effect of dosage of enzyme on the conversion of β -amino propionitrile

由图 4 可以看出, 加酶量为 400 或 300 U/g 时, 24 h 后 β -氨基丙腈平衡转化率与 200 U/g 的差别不

大.因此,反应的最适加酶量应选择为 200 U/g.

2.7 低加酶量下初始加水量校正

由于实验所用的酶具有一定的湿度,脂肪酶 CAL-2 的含水量约为 2%(质量分数).换言之,即体系中的总水含量与加酶量有关.当加酶量由 2.2 节中的 3 000 U/g 降至 200 U/g 时,有必要对反应体系的初始加水量进行校验,实验结果如图 5 所示.

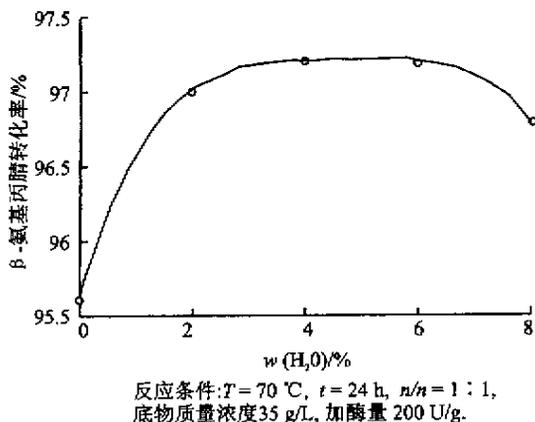


图 5 低加酶量下初始加水量的影响

Fig.5 Effect of water content in lower dosage of lipase

由图 5 可以得出,在初始加水量 2% ~ 6% 腈重之间,当加酶量为 200 U/g 时, β -氨基丙腈的转化率变化不大.由于在该反应中,水并不是反应过程所必需涉及的中间产物或最终产物,其作用仅仅是为了保持酶具有良好的催化活性.为此目的需要的

水量通常较小,过量水的存在反而会导致酶催化活性的下降或者丧失.从这一角度出发,将反应体系的初始加水量选择为 3% 腈重.

2.8 底物对酶的抑制性

酶是一种选择性催化剂,对底物的性质(如酸碱性、结构等)具有一定的要求,有些底物可能会造成酶催化活性的降低甚至丧失.本实验中分别用足够量的 β -氨基丙腈和月桂酸甲酯将 CAL-2 浸泡 1 h 后,用冷丙酮反复抽洗,再将此酶在低温真空下干燥.然后将上述处理过的 CAL-2 用于酶催化反应,测定 β -氨基丙腈的转化率并与空白反应结果对照, β -氨基丙腈的相应转化率分别为 72.0%、97.2% 和 96.9%.可见底物 β -氨基丙腈对 CAL-2 具有一定的抑制性.因此,反应加料顺序的选择应避免 CAL-2 与高浓度的 β -氨基丙腈长时间地直接接触.

3 结 论

PPW、100T、CAL-1 及 CAL-2 均具有较好的催化活性.以 CAL-2 酶促合成 LAP 的最适反应条件为: $T = 70\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 24\text{ h}$, $n(\beta\text{-氨基丙腈}):n(\text{月桂酸甲酯}) = 1:1$,底物质量浓度 35 g/L,加酶量 200 U/g,初始加水量为 3% 腈重.底物 β -氨基丙腈对 CAL-2 的催化活性具有一定抑制性.

致谢 感谢 Amano 公司的 Mr. T Mase, Novo Nordisk 公司的徐清女士,以及中科院微生物研究所的寇秀芬教授赠送了本实验所用的脂肪酶.

参考文献:

- [1] 王炳琴. 氨基酸酯的制备方法及应用[J], 氨基酸与生物资源, 1995, 17(4): 40 ~ 45.
- [2] IWATA MASAOKI, MURAMATSU KAZUHIRO, AGATA KAZUKO. Cosmetic Skin Cleanser Contain *N*-Acyl Amino Acid Salts and Anionic Surfactants [P]. Jpn Appl, 86/257 987. 1986 - 10 - 29.
- [3] WU WHEI MEI, MURAKAMI TERUO, YAMAJO RYOKO. Calcium Ion Sequestration by *N*-Acyl amino Acids within the Rectal Membrane and Enhancement of Sodium Ampicillion in Rat [J]. J Pham Sci, 1989, 78(6): 499 ~ 503.
- [4] BEGER JOERG, NOUMANN KENNATE. Modification *N*-Tenside [J]. Tenside, 1986, 23(3): 135 - 140.
- [5] TANIGUCHI HIROAKI, MARUYAMA TERUHITO. Antibacterial Fibers and Antibacterial Finishing of Fibers without Causing Discoloration [P]. Jpn appl, 810. 1991 - 04 - 25.
- [6] TAEKO IZUMI. Enzymatic Synthesis of *N*-Lauroyl- β -Alanine Homologs in Organic Media [J]. JAACS, 1997, 74(7): 875 - 878.

(责任编辑:秦和平)