

文章编号 :1009-038X(2002)05-0447-05

无溶剂体系酶促合成甘油中碳酸偏酯

刘雪峰¹, 王征远², 胡学一¹, 方云¹, 章克昌³

(1. 江南大学 化学与材料工程学院,江苏 无锡 214036 ;2. 扬州职工大学 化工系,江苏 扬州 225002 ;3. 江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 214036)

摘 要 :根据中碳酸转化率的大小,对 5 种不同来源的固定化脂肪酶筛选,其中固定化脂肪酶 SSW 的酶催化转化率最高,辛酸和癸酸转化率分别为 91.5% 和 93.5% ;对脂肪酶 SSW 酶促合成甘油辛酸偏酯的反应条件优化,适宜反应条件为:敞口反应器中反应温度 55 ℃,每克酸加酶量 100 U/g,辛酸/甘油投料摩尔比 1:1.1,甘油初始加水量 4%(质量分数)。实验范围内中碳酸品种对脂肪酶 SSW 不显示基质特异性。

关键词 :脂肪酶;甘油中碳酸偏酯;酶促反应

中图分类号 O 643.3

文献标识码 :A

Enzymatic Synthesis of Medium-Chain Partial Glyceride in a Solvent-Free System

LIU Xue-feng¹, WANG Zheng-yuan², HU Xue-yi¹, FANG Yun¹, ZHANG Ke-chang³

(1. School of Chemical & Material Engineering, Southen Yangtze University, Wuxi 214036, China ;2. Department of Chemical Engineering, Workpeople college of Yangzhou, Yangzhou 225002, China ;3. School of Biotechnology, Southen Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract :Enzymatic synthesis of medium-chain partial glyceride were studied in a solvent-free system. According to the conversion of medium-chain carbon acid, lipase SSW was the best one among five kinds of lipases. Effect of reaction conditions on conversion of caprylic acid was investigated as well as mole ratio of substrates, temperature, initial dosage of water added to glycerin, manner of dewatering. The optimum conditions were as follows: in an opened reactor at 55 ℃, dosage of enzyme 100 U/g acid, mole ratio of acid to glycerin 1:1.1, initial dosage of water added to glycerin 4%. Lipase SSW didn't display substrate specificity to medium-chain acids in experiments.

Key words :lipase; medium-chain partial glyceride; enzymatic synthesis

甘油中碳酸酯包括辛酸和癸酸的甘油单酯、双酯和三酯,又分为以三酯为主或以偏酯为主两种形式。癸酸偏酯对溶解人体胆结石有显著作用,也可

用于预防和治疗腹泻,还可用作亲油性药物和营养物的溶剂或载体^[1]。中碳酸偏酯被认为是安全的防腐剂^[2],广泛应用于食品和个人护肤品生产领域。

收稿日期 2002-04-01; 修订日期 2002-06-21.
基金项目 国家“九五”攻关项目资助课题(NO. 96-C03-02-05).
作者简介 刘雪峰(1973-),男,江苏靖江人,发酵工程博士研究生。

随着人们对天然产品的青睐,直接从植物中提取甘油中碳酸酯已无法满足人们日益增长的需要.目前获取甘油中碳酸酯的方法有化学合成法和提取法等.化学合成法是甘油与中碳酸在酸催化剂存在下,用氮气保护 160~180 ℃ 反应,历经中和、脱臭、脱色和过滤等多步操作,产品不仅得率低、色泽深,而且存在“三废”排放和催化剂的残留使产品致毒等问题.无溶剂体系酶促合成^[3]技术不仅具有酶催化反应条件温和、选择性好、底物转化率高等优点,而且还大大简化了化学合成法产品的后处理过程.本文主要探讨无溶剂法酶促合成甘油中碳酸偏酯.

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

脂肪酶 SSW 和脂肪酶 CLL:无锡酶制剂厂赠送;脂肪酶 L13:NOVO 公司赠送;脂肪酶 PPW 和 PEL:南通生化制药厂赠送;辛酸、癸酸(化学纯):上海星火化工厂产品;甘油(分析纯):上海振兴化工一厂产品;实验室自制亚沸蒸馏水,电导率 7.8×10^{-5} S/cm;超级恒温水浴箱:上海标本仪器厂制造;95-1 型磁力搅拌器:江阴科学仪器厂制造.

1.2 实验方法

1.2.1 酶活测定 采用橄榄油水解酶活方法测定实验中所用脂肪酶的水解活性.

1.2.2 甘油中碳酸偏酯合成及脂肪酸转化率测定 将合适投料比的中碳酸和甘油(含适量水),置于一敞口反应器中,磁力搅拌,水浴恒温,加入一定量脂肪酶.反应过程中体系自由挥发脱水,定期取样,用乙醇溶解,再用 0.05 mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定体系中残余的中碳酸,计算中碳酸的转化率.

1.2.3 粗产品中甘油单酯和甘油量的测定 产品中甘油单酯和甘油量测定参照文献[4]进行.

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶的筛选

用橄榄油水解酶活测定法分别测定了 5 种不同来源的脂肪酶的酶活,并且在辛酸(或癸酸)与甘油摩尔比为 1:1.1,辛酸加酶量 100 U/g,甘油初始加水量 4%(质量分数),反应温度分别为 55 ℃(辛酸)和 60 ℃(癸酸),反应时间 24 h 的反应条件下,根据中碳酸转化率的大小,对 5 种固定化脂肪酶进行筛选,结果见表 1.

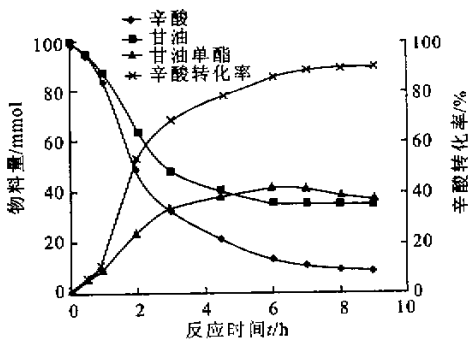
表 1 脂肪酶水解酶活和无溶剂体系中碳酸的酶催化转化率

Tab.1 Hydrolytic activity of lipases and enzymatic conversion of medium-chain acids in a solvent-free system			
脂肪酶	酶活/(U/g)	辛酸转化率/%	癸酸转化率/%
PPW	20 000	24.6	32.4
L13	40 000	53.6	60.8
SSW	7 500	91.5	93.5
PEL	540	12.5	14.3
CLL	3 200	7.3	7.7

由表 1 数据可以看出,固定化脂肪酶 SSW 在无溶剂体系中对辛酸和癸酸都具有较高的催化能力,反应后辛酸和癸酸都有较高的转化率,分别为 91.5%和 93.5%.因此选择采用固定化脂肪酶 SSW 作为实验用的酶催化剂.

2.2 物料平衡

酶促合成反应的物料平衡结果见图 1.



反应条件:55 ℃,辛酸与甘油摩尔比为 1:1;加水量 4%;辛酸加酶量 100 U/g,敞口反应器

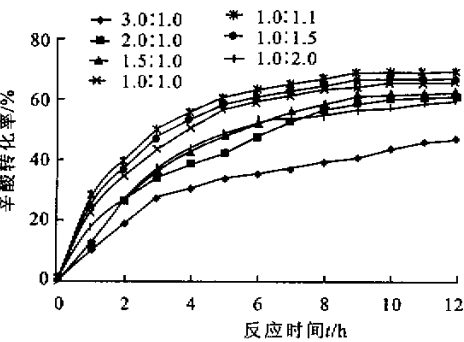
图 1 物料平衡

Fig.1 Mass balance of enzymatic synthesis

图 1 结果表明,反应时间 9 h 时,辛酸转化率达 90%,柱层析结果表明,此时甘油辛酸单酯的量是双酯的 2 倍;反应 6~7 h 时,甘油辛酸单酯量最高,随着反应的继续,单酯含量稍有下降,双酯含量增多.因为在甘油与中碳酸的酯化反应中,甘油与中碳酸反应最初生成甘油中碳酸单酯,它可以与中碳酸继续反应生成甘油中碳酸双酯.随着反应时间延长,将会有甘油三酯生成.因此酯化反应时间是合成甘油偏酯的重要反应条件,控制适宜的反应时间可以得到纯度较高的甘油中碳酸偏酯.

2.3 酸醇比对中碳酸转化率的影响

实验验证了不同辛酸/甘油投料摩尔比对辛酸转化率的影响,结果见图 2.



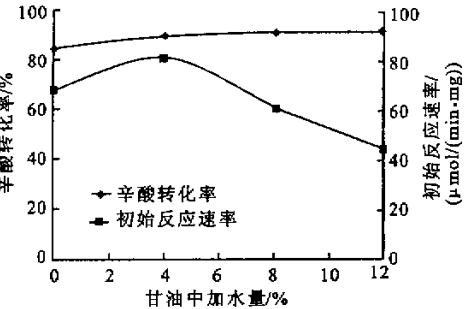
反应条件 40 ℃ ;加水量 4 % ;辛酸加酶量 100 U/g ;敞口反应器

图 2 辛酸与甘油摩尔比对辛酸转化率的影响
Fig.2 Effect of mole ratio of caprylic acid to glycerin on conversion of acid

由图 2 可以看出 ,对于辛酸/甘油不同摩尔比条件下的反应 ,辛酸的酯化转化率也各不相同 ,表明酶促酯化反应过程中 ,脂肪酸与醇的投料比不同将会影响辛酸的转化率 .辛酸/甘油投料摩尔比为 1:1.1 时 ,辛酸的转化率最高 ,表明辛酸/甘油最适投料摩尔比为 1:1.1 .

2.4 初始加水量对辛酸转化率和初始反应速率的影响

适量的水存在有利于保持酶催化所必需的构象^[5] ,此外水又是酯化反应的副产物 ,过量的水存在将促使反应向酯水解的方向移动 .对不同的反应体系都会存在一个最适初始加水量 .其他反应条件不变 ,在每 100 g 甘油中加入不同量(水所占质量分数分别为 0 % 4 % 8 %和 12 %)的水 ,考察初始加水量对辛酸转化率和初始反应速率的影响 ,实验结果见图 3 .



反应条件 55 ℃ ;辛酸/甘油摩尔比 1:1 ;辛酸加酶量 100U/g ;敞口反应器

图 3 初始加水量对辛酸转化率和酯化初始反应速率的影响

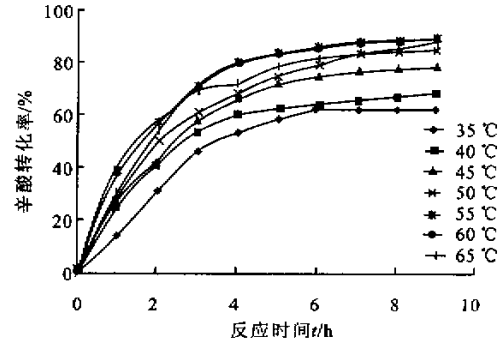
Fig.3 Effect of initial water content in glycerin on conversion and initial rate

在敞口反应器中 ,加水量对无溶剂酶促反应体

系中辛酸的酯化转化率没有显著影响 ,但明显影响初始反应速率 ,即影响反应达到平衡的时间 .在本实验范围内 ,加水量为 4 % 时 ,辛酸酯初始反应速率达最大值 ,随着加水量的增加 ,初始反应速率呈明显降低趋势 .实验结果表明 ,适宜加水量为 4 % .

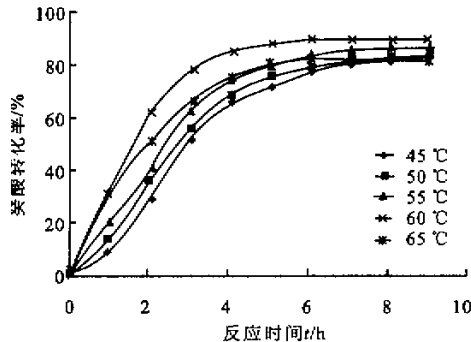
2.5 反应温度对辛酸、癸酸转化率的影响

在不同反应温度下进行脂肪酶 SSW 酶促辛酸、癸酸酯化反应 ,测定不同温度条件下酸的转化率 ,实验结果如图 4 5 所示 .



反应条件 辛酸/甘油摩尔比 1:1 ;辛酸加酶量 100 U/g ;加水量 4 % ;敞口反应器

图 4 温度对辛酸转化率的影响
Fig.4 Effect of temperature on conversion of caprylic acid



反应条件 癸酸/甘油摩尔比 1:1 ;辛酸加酶量 100 U/g ;加水量 4 % ;敞口反应器

图 5 温度对癸酸转化率的影响

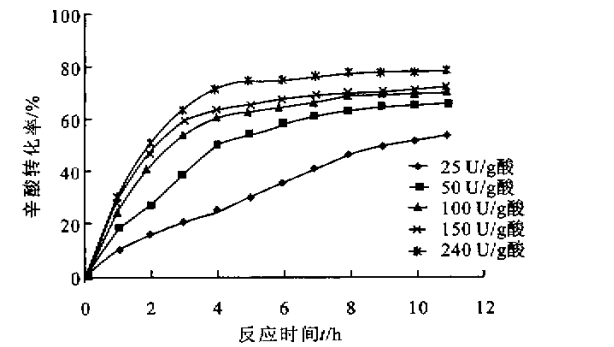
Fig.5 Effect of temperature on conversion of capric acid

由图 4 结果可以看出 ,在 35 ~ 55 ℃ 温度区域 ,反应 9 h 辛酸的酯化转化率随温度升高而增加 ,温度为 55 ℃ 时辛酸转化率最高 ,达 89.8 % .但是温度继续升高辛酸的酯化转化率反而下降 ,这可能是高温下酶容易失活的缘故 ,表明此反应的最适反应温度为 55 ℃ .从图 5 也可以看出 ,有与图 4 相类似的结果 ,癸酸酯化的最适反应温度是 60 ℃ .

2.6 加酶量对辛酸酯化转化率的影响

在加酶量不同、其它反应条件相同的情况下 ,

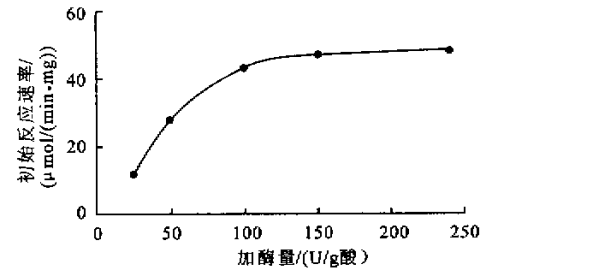
辛酸酯化转化率的测定结果见图 6.可以看出,酶量的增加有利于辛酸的酯化转化,但当酶量达到每克酸 100 U/g 以上时,酶量对辛酸转化(反应 10 h)影响不显著,且初始反应速率也无显著增大(见图 7),故本实验考虑加酶量采用 100 U/g.



反应条件 40 ℃,辛酸/甘油摩尔比 1:1,加水量 4%,敞口反应器

图 6 加酶量对辛酸转化率的影响

Fig.6 Effect of lipase dosage on conversion of caprylic acid



反应条件 40 ℃,辛酸/甘油摩尔比 1:1,加水量 4%,敞口反应器

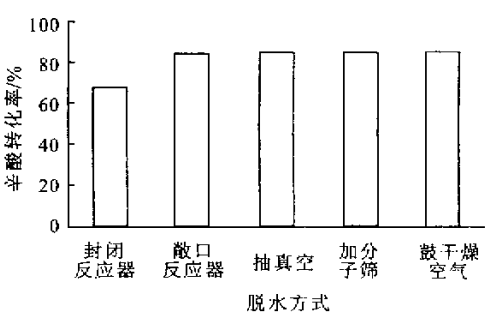
图 7 加酶量对辛酸酯化反应初始速率的影响

Fig.7 Effect of lipase dosage on initial rate

2.7 不同脱水方式对转化率的影响

考虑到酯化反应副产物水的负面效应^[5,6],设计了 4 种不同的脱水方式即抽真空、外加 4 Å 分子筛、鼓入干空气和敞口反应器,考察脱水方式对中碳酸转化率的影响,并将其与不脱水的封闭反应方式作比较,结果见图 8.

实验结果表明,不脱水的封闭反应器中,辛酸的转化率仅为 68%,而在脱水反应器中辛酸的转化率大于 80%,明显高于不脱水的.这是因为过量水的存在,不仅不利于化学反应向生成酯的方向进行,而且它还会导致酶失活^[5,6].但是脱水方式对辛酸转化率无明显影响.本实验采用敞口反应器,即反应过程中体系自由脱水.



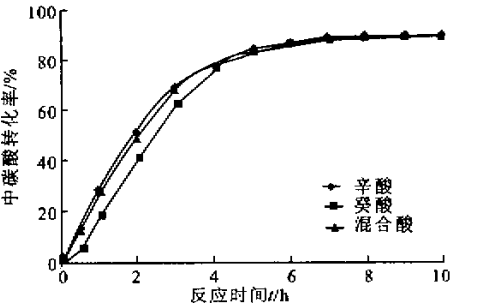
反应条件 50 ℃,辛酸/甘油摩尔比 1:1,加水量 4%,辛酸加酶量 100 U/g

图 8 不同脱水方式对辛酸转化率的影响

Fig.8 Effect of manner of dewatering on conversion of caprylic acid

2.8 辛酸、癸酸、混合中碳酸转化率比较

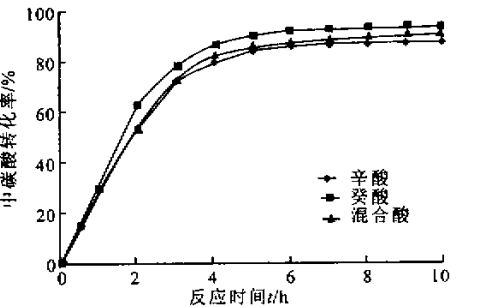
工业中碳酸主要来源于油脂水解产物的分馏切割,是辛酸与癸酸质量比约 1:1 的混合物.其它反应条件一致,分别在 55 ℃ 和 60 ℃ 进行酶促甘油酯化,3 种酸的转化率测定结果见图 9,10.



反应条件:中碳酸/甘油摩尔比 1:1,加水量 4%,辛酸加酶量 100 U/g,敞口反应器;反应温度 55 ℃

图 9 3 种中碳酸的转化率

Fig.9 Conversion of three kinds of Medium-chain acid at 55 ℃



反应条件:脂肪酸/甘油摩尔比 1:1,加水量 4%,辛酸加酶量 100 U/g,敞口反应器;反应温度 60 ℃

图 10 3 种中碳酸的转化率

Fig.10 Conversion of three kinds of Medium-chain acid at 60 ℃

从图 9,10 结果可以看出,在同一种酶——脂肪酶 SSW 催化条件下,3 种中碳酸与甘油酯化反应的转化率随反应时间的变化规律相似,无论是达到反应平衡的时间,还是反应结束(10 h)时,酸的总转化率都只是稍有或几无差异.实验结果表明,实验中所选脂肪酶 SSW 对辛酸、癸酸以及混合中碳酸没有基质特异选择性差别,催化性能也没有表现出显著不同.

3 结 论

根据中碳酸转化率的大小对 5 种不同来源的

固定化脂肪酶进行筛选,其中固定化脂肪酶 SSW 的酶催化转化率最高,辛酸和癸酸转化率分别为 91.5%、93.5%.对脂肪酶 SSW 酶促合成甘油辛酸偏酯的反应条件的研究表明,适宜反应条件为:在敞口反应器中,反应温度 55 ℃、加酶量 100 U/g、辛酸/甘油投料摩尔比为 1:1.1、甘油初始加水量 4%.实验范围内中碳酸品种对脂肪酶 SSW 不显示基质特异性.

参考文献:

[1] KIM S M, RHEE J S. Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1991, 68: 499–503.

[2] BABAYAN V K. Medium-chain length fatty acid esters and their medical and nutritional applications[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1981, 58: 49–51.

[3] 田桂玲, 邢国文, 叶蕴华. 在非水介质中进行酶促反应的几个重要问题[J]. *有机化学*, 1998, 18: 11–19.

[4] 曹宗顺, 卢凤琦. 高碘酸氧化法测定甘油单硬脂酸酯的含量[J]. *日用化学工业*, 1993, 5: 257–258.

[5] 崔玉敏, 魏东芝, 俞俊棠. 水在有机介质酶催化反应中的作用[J]. *生物工程进展*, 1999, 19: 54–58.

[6] 姚鹏, 马润宇, 王立新. 非水相中的酶催化[J]. *化工进展*, 1998, 17: 3–7.

(责任编辑: 李春丽)

(上接第 442 页)

参考文献:

[1] 龚院生, 姚惠源. 米糠中生理活性物质的研究[J]. *中国粮油学报*, 2000, (6): 14.

[2] 龚院生, 姚惠源. 米糠中活性因子 γ -谷维醇降血脂功能研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2000, (8): 37.

[3] 龚院生, 姚惠源. 米糠中 γ -谷维醇抗脂质氧化作用[J]. *粮食与饲料工业*, 2000, (11): 40.

[4] 龚院生, 孙震, 姚惠源. 米糠 γ -谷维醇对小鼠抗氧化和抗肿瘤作用的研究[J]. *动物科学与动物医学*, 2002, (2): 26.

[5] CUVELIER MARIE-ELISABETH, RICHARD HUBERT, BERSET CLAUDTTE. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(2): 324–325.

[6] CAO GUOHUA, VERDON CARL P, ALAN H B, *et al.* Automated assay of oxygen radical absorbing capacity with the COBAS FARA II[J]. *Clinical Chemistry*, 1995, 41(12): 1738–1744.

[7] 胡天喜, 陈季武, 许建营等. 云芝糖肽和灵芝多糖清除活性氧的作用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1992, 24(5): 465–470.

[8] 范小兵, 李慈娟, 沙大年等. 邻菲罗啉化学发光体系测定羟基自由基的建立[J]. *基础医学与临床*, 1998, 18(6): 68–71.

[9] BURTON G W, INGOLD K U. Autoxidation of biological molecules 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro[J]. *J Am Chem Soc*, 1981, 103: 6472–6477.

[10] STANLEY Z DZIEDZIC, BERTRAM J F HUDSON. Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils[J]. *Food Chemistry*, 1983, 12: 205–212.