

酶催化蔗糖八乙酸酯与油酸乙酯 转酯化反应的研究

(广西工学院生物与化学工程系,柳州 545006)

吴洪达¹ 李军生³ 闫柳娟⁴

(柳州职业技术学院,柳州 545000)

张咸华²

摘要:在有机溶剂中,以脂肪酶 Novo435 为催化剂,蔗糖八乙酸酯与油酸乙酯通过转酯化反应合成了同时含有油酸酰基和乙酸酰基的混合型蔗糖酯,当蔗糖八乙酸酯与油酸乙酯的物质的量之比为 1:1 时,油酸乙酯的转化率达 95%。正交实验给出该转酯化反应的最适条件是:以叔戊醇为反应介质,反应温度为 40℃,脂肪酶用量为 5000U/1mmol 蔗糖酯,分子筛用量为 500mg/1mmol 蔗糖酯。

关键词:脂肪酶,酶催化合成,转酯化作用,蔗糖酯,蔗糖八乙酸酯,油酸乙酯

Abstract:The synthesis of sucrose ester containing ethanoyl and oleoyl was performed by transesterification between sucrose octaacetate and ethyl oleate in organic solvents, using lipases Novo435 as the catalyst. An ethyl oleate conversion of 95% can be obtained as molar ratio of sucrose octaacetate to ethyl oleate is 1:1. The result of orthogonal experiment indicated that the best transesterification condition is to use 2-methyl-2-butanol as solvent, reaction temperature 40℃, lipases 5000U and sieves 500mg to 1mmol sucrose ester.

Key words:lipase; enzymatic synthesis; transesterification; sucrose esters; sucrose octaacetate; ethyl oleate

中图分类号: TS201.2·5 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2005)02-0170-03

通过转酯化反应合成蔗糖酯的路线至少在如下几方面是可能的和便利的:首先,由于蔗糖酯的生成反应本身是可逆的,当两个具有中等链长或中等摩尔质量的分子在催化剂的作用下相遇时,通过交换酰基容易生成一个摩尔质量更大的或分子链更长的蔗糖酯和一个小分子副产物。从理论上说,这种酯交换反应常有较大的平衡常数。其次,蔗糖与长链脂肪酸直接反应生成蔗糖酯可能需要较高的活化能,导致反应必须在较高温度下进行,此时底物可能发生严重的副反应;而酯交换反应生成新蔗糖酯的活化能可能更低,在较低温度下就能实现反应。其三,蔗

糖经与小分子酸反应生成酯后,与长链脂肪酸或长链脂肪酸酯的相溶性增大,反应速度会大大提高。其四,由于小分子脂肪酸蔗糖酯与长链脂肪酸或长链脂肪酸酯更易溶于有机介质中形成均相,可以在较低温度下利用脂肪酶在非水介质中催化合成新蔗糖酯。鉴于上述原因,利用转酯化反应合成目标蔗糖酯的研究已经获得了许多成果^[1-5]。本研究以蔗糖八乙酸酯和油酸乙酯为底物,以脂肪酶 Novo435 为催化剂,以叔戊醇为溶剂,实现了蔗糖酯上部分乙酰基与油酸酰基的交换,合成了混合型蔗糖酯。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蔗糖、乙酸酐、碳酸钠、乙醇、叔戊醇、二甲基-2-丁酮、氯仿、油酸乙酯 均为分析纯;甲醇 色谱纯;水 三次蒸馏水;分子筛。

超级恒温槽(精度 $\pm 0.05^\circ\text{C}$),磁力搅拌器,高效液相色谱仪 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蔗糖八乙酸酯的制备 参考文献[6]合成蔗糖八乙酸酯,粗产品用乙醇水溶液重结晶多次,干燥后研碎得白色粉末。

1.2.2 液体原料预处理 所有加入反应体系中的液体原料均用分子筛搅拌处理 10h。

1.2.3 合成方法 在三颈瓶中称入蔗糖八乙酸酯粉末,加入溶剂搅拌溶解,再加入与蔗糖八乙酸酯等物质的量的油酸乙酯,最后加入一定量的分子筛和脂肪酶 Novo435。装上冷凝管后恒温磁力搅拌反应 5h,反应结束后减压过滤,洗涤,滤液定容后用高效液相色谱仪检测反应混合物中残留的蔗糖八乙酸酯和油酸乙酯,由油酸乙酯转化率分析反应最适条件。

2 结果与讨论

2.1 原料预处理的必要性

曾用市售溶剂溶解蔗糖八乙酸酯和油酸乙酯,按同样方法进行实验,结果发现油酸乙酯严重水解,

收稿日期: 2004-08-24

作者简介: 吴洪达(1958-),男,副教授,研究方向:有机合成。

基金项目: 广西科学基金资助项目(编号:桂科基 0236031)。

几乎看不到混合型蔗糖酯生成。故在后来的实验中均用分子筛对原料进行预处理。

2.2 反应条件的初步确定

选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验, 考察溶剂种类、酶用量、分子筛用量及反应温度对转酯化反应的影响, 实验方案如表 1。

表 1 蔗糖酯合成实验的四因素三水平方案

实验水平	因素			
	A 温度 (°C)	B 溶剂种类	C 酶用量 (mg)	D 分子筛用量 (mg)
1	40	叔戊醇	20	20
2	50	2-甲基-2-丁酮	40	40
3	60	氯仿	60	60

正交实验结果表明, 溶剂种类显著地影响转酯化反应, 叔戊醇是最好的反应介质; 以 2-甲基-2-丁酮为介质时, 油酸乙酯也有较高的转化率; 但氯仿并不适合作该反应介质。在正交实验所选水平范围内, 温度、酶用量、分子筛用量对油酸乙酯转化率的影响均不显著。当以叔戊醇为介质, 反应 5h, 反应温度在 40~60°C 范围内时, 油酸乙酯转化率均达 95% 以上。

油酸乙酯转化率随酶用量增加而增大, 但当酶用量由 20mg 增加到 60mg 时, 油酸乙酯转化率只提高了不到 4%。这可能是由于所用脂肪酶对该转酯化反应有高催化活性, 加之反应时间较长 (5h), 故酶用量对该转酯化反应的影响差异无法反映出来。

分子筛的作用是控制反应体系中的水活度, 从正交实验结果看, 油酸乙酯转化率随分子筛用量的增加而略有降低。为此, 曾选用正交实验的最适条件做一个反应体系中不加分子筛的对照实验, 结果发现, 酯的水解反应并没有出现, 油酸乙酯的转化率同样可达 96% 左右。故在后面的单因素实验中不再加入分子筛。

2.3 温度对转酯化反应的影响

以叔戊醇为溶剂, 按物质的量之比为 1:1 加入蔗糖八乙酸酯和油酸乙酯, 按 1mmol 蔗糖酯加入 500mg 酶 (酶活力 10U/mg) 的比例加入脂肪酶 Novo435, 在不同温度保温反应 5h。高效液相色谱仪检测油酸乙酯转化率。结果发现, 酶在 30~80°C 范围内均有很高的催化活性, 油酸乙酯转化率均为 95% 左右, 无明显区别。

2.4 反应时间对油酸乙酯转化率的影响

以叔戊醇为溶剂, 按物质的量之比为 1:1 加入蔗糖八乙酸酯和油酸乙酯, 按 1mmol 蔗糖酯加入 500mg 酶 (酶活力 10U/mg) 的比例加入脂肪酶 Novo435, 保温 40°C 反应一定时间。高效液相色谱仪检测油酸乙酯转化率, 结果如图 1。由图 1 可见, 反应 30min, 油酸乙酯转化率可过 45%; 反应 1h, 油酸乙酯转化率可达 93%; 此后延长反应时间, 油酸乙酯转化

率只稍有增加; 反应 8h, 转化率可达 96% 左右。

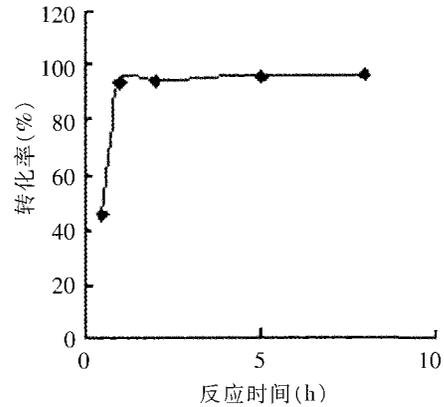


图 1 反应时间与油酸乙酯转化率的关系

2.5 底物配比的影响

以叔戊醇为溶剂, 按物质的量之比为 1:1、1:2、1:3、1:4 分别在四个反应器中加入蔗糖八乙酸酯和油酸乙酯, 按 1mmol 蔗糖酯加入 500mg 酶 (酶活力 10U/mg) 的比例加入脂肪酶 Novo435, 保温 40°C 反应 5h。高效液相色谱仪检测油酸乙酯转化率, 结果如图 2。检测产物混合物发现, 当蔗糖八乙酸酯与油酸乙酯的物质的量之比为 1:1 时, 主要生成产物是蔗糖八乙酸酯中有一个乙酰基被油酸酰基取代; 原料配比为 1:2 时, 主要产物是蔗糖八乙酸酯中有两个乙酰基被油酸酰基取代; 原料配比为 1:3 时, 主要产物是蔗糖八乙酸酯中有三个乙酰基被油酸酰基取代, 另有部分产物是二取代产物; 原料配比为 1:4 时, 主要产物是蔗糖八乙酸酯中有三个乙酰基被油酸酰基取代, 另有少量二取代产物。

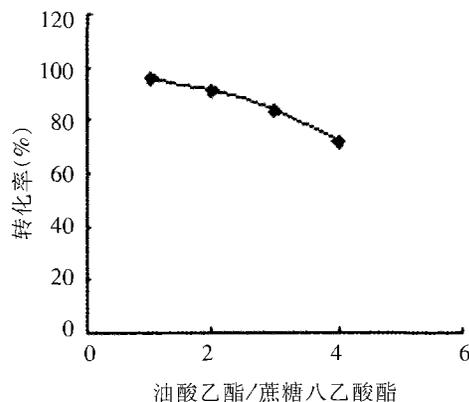


图 2 原料物质的量之比与油酸乙酯转化率的关系

3 结论

3.1 在该转酯化反应中使用的原料必须经干燥预处理, 以避免酯的水解。选用分子筛作干燥剂是适宜的。

3.2 该转酯化反应受溶剂种类显著影响, 叔戊醇和 2-甲基-2-丁酮均可用作溶剂, 但叔戊醇作溶剂更好。氯仿不能用作该转酯化反应的溶剂。

3.3 当以叔戊醇为溶剂时, 脂肪酶 Novo435 在 30~80°C 范围内均有很高的催化活性。当温度为 40°C 时, (下转第 186 页)

在上述确定的显色条件下测得的 OD 值与精氨酸的含量呈较明显的线性关系。

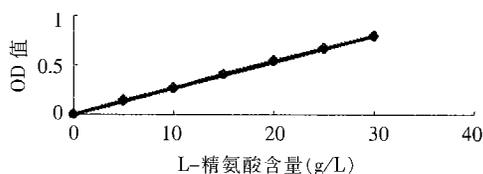


图9 L-精氨酸的标准曲线

2.5 方法的重现性研究

上述方法的重现性对于准确测定 L-精氨酸来说是十分重要的。本实验进行了五次平行测定,根据每次测定的标准曲线的斜率 k 计算出标准偏差 S ,如表 1 所示,标准偏差 S 为 0.0038,说明这种检测方法的重现性较好,能用于 L-精氨酸的定量测定。

表1 标准曲线斜率的标准偏差

L-精氨酸 含量(g/L)	测定次数				
	1	2	3	4	5
0	0	0	0	0	0
5	0.136	0.123	0.144	0.153	0.118
10	0.261	0.248	0.273	0.268	0.271
15	0.399	0.394	0.423	0.438	0.367
20	0.542	0.539	0.545	0.535	0.531
25	0.674	0.664	0.671	0.687	0.655
30	0.799	0.774	0.764	0.801	0.781
斜率 k	0.2681	0.2639	0.2584	0.267	0.2626
\bar{k}	0.264				
标准偏差 S	0.0038				

2.6 发酵液中 L-精氨酸的测定

2.6.1 测定步骤 将发酵液离心沉淀菌体和 CaCO_3 等固形物,并稀释至浓度为 5~30g/L,在确定的显色条件下测其 OD_{540} 值。

2.6.2 精氨酸含量的计算 由测得的 OD_{540} 值,根据曲线方程和稀释倍数即得发酵液中 L-精氨酸的含

(上接第 171 页)

反应 30min,油酸乙酯转化率可过 45%;反应 1h,油酸乙酯转化率可达 93%;此后延长反应时间,油酸乙酯转化率只稍有增加,反应 5h,转化率可达 95%。

3.4 在最适反应条件下进行转酯化反应,当蔗糖八乙酸酯与油酸乙酯的物质的量之比为 1:1 时,主要生成产物是蔗糖八乙酸酯中有一个乙酰基被油酸酰基取代;原料配比为 1:2 时,主要产物是蔗糖八乙酸酯中有两个乙酰基被油酸酰基取代;原料配比为 1:3 时,主要产物是蔗糖八乙酸酯中有三个乙酰基被油酸酰基取代,另有部分产物是二取代产物;原料配比为 1:4 时,主要产物是蔗糖八乙酸酯中有三个乙酰基被油酸酰基取代,另有少量二取代产物。

参考文献:

量。同时取两份发酵液样品,用氨基酸自动分析仪进行定量分析,由上述所确立的测定条件下得出的两个结果比由氨基酸自动分析仪得出的结果相应的低 1.7g/L 和 1.1g/L。这说明在此测定条件下定量测定 L-精氨酸较准确可靠。

3 结论

在 L-精氨酸的定量检测实验中,确立了最佳检测条件为 40g/LNaOH 溶液、80g/L 甲萘酚溶液、0.5mL/L 双乙酰溶液各 1mL 作为显色液,加入离心并适当稀释的发酵液 1 μ L,30 $^{\circ}$ C 水浴加热 15min 后测 OD_{540} 值。此方法非常灵敏,检测迅速,重现性和准确性都较好,并且测定条件较简单,受外界影响很小,作为实验室中精氨酸的定量检测很合适。

参考文献:

- [1] 路志强,龚建华.L-精氨酸产生菌诱变育种的研究[J].微生物学报,1988,28(2):131~135.
- [2] 王妙虎,王京华.L-精氨酸测定方法的研究[J].上海科技大学学报,1989(2):94~98.
- [3] Rosenberg, H, Ennor, A H, Morrison, J F. Chem[J],1955, 63:153~159.
- [4] Block R T, et al. A manual paper chromatography and paper electrophoresis[M]. New York Academic Press,1955.
- [5] 北京师范大学生物系生化教研室编.基础生物化学实验[M].北京:高等教育出版社,1994.
- [6] 蒙绮芳,赖碧清,等.L-精氨酸测定方法的研究[J].氨基酸和生物资源,1998,20(3):1~4.
- [7] 张楚富.猪毛水解液中精氨酸含量测定(氨基酸学术论文集)[M].武汉:武汉大学出版社,1983.
- [8] 伍时华,俞海青,等.发酵液 L-精氨酸测定的研究[J].发酵科技通讯,2001,30(4):12~15.

[1] 张卫,孙乃有,李建英.无溶剂法合成蔗糖酯的工艺研究[J].食品科技,2003(4):68~70.

[2] 章亚东,高晓蕾,蒋登高,刘诗飞,王自健.无溶剂法合成蔗糖硬脂酸酯的工艺研究[J].高等化学工程学报,2002,16(5):519~523.

[3] 谢德明,高大维,郑建仙.相转移催化合成蔗糖聚酯研究[J].中国油脂,1998,23(4):60~61.

[4] 李延科,张淑芬,杨锦宗.蔗糖酯的酶催化区域性合成[J].有机化学,2003,23(8):770~775.

[5] Manuel Ferrer, M Angeles Cruces, Manuel Bernabe, Antonio Ballesteros, Francisco J Plou. Lipase-Catalyzed Regioselective Acylation of Sucrose in Two-Solvent Mixtures [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999,65(1):10~16.

[6] 刘运凤,吾满江·艾力,文彬.八乙酸蔗糖酯的合成工艺研究[J].日用化学工业,2002,32(6):20~22.