

非水相中脂肪酶催化合成乙酸正己酯

杨本宏¹, 蔡敬民², 吴克², 潘仁瑞²

(1. 合肥学院化学与材料工程系, 安徽合肥 230022; 2. 合肥学院生物与环境工程系, 安徽合肥 230022)

摘要:研究了用海藻酸钠固定化的脂肪酶在有机溶剂中催化乙酸与正己醇之间的酯化反应。探讨了溶剂、醇酸摩尔比、温度、底物浓度等多种因素对脂肪酶催化乙酸正己酯合成反应的影响规律。研究结果显示,在优化的条件下,即溶剂为正庚烷、醇酸摩尔比为1:1、底物浓度为0.15mol/L、温度为70℃、pH为7.5、酶湿度为8.9%、吸水剂用量为0.20g/mL时,反应5h后,乙酸正己酯的转化率达88%。

关键词:脂肪酶,非水相,酯化反应,催化,乙酸正己酯

Abstract:Lipase-catalyzed synthesis of hexyl acetate by esterification between acetic acid and normal hexanol in organic solvents was studied, and the optimum condition for the esterification was investigated. The esterification reaction was carried out in n-heptane solvent at 70 °C at the substrate concentration of 0.15 mol/L and acid to alcohol molar ratio of 1:1. The 5 Å molecular sieves were added to the reaction system as water adsorbent at 0.20 g per milliliter solution. Under this condition, esterification conversion rate reached 88 % after reaction for 5 hours.

Key words:lipase; non-aqueous media; esterification; catalysis; hexyl acetate

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2006)06-0144-04

乙酸正己酯具有浓烈的水果香味,其毒性很小,是国内外允许使用的食用香精,广泛用于饮料、冰淇淋、糖果和烘制食品中。目前,工业上主要采用化学法合成乙酸正己酯,合成工艺所采用的催化剂主要包括浓硫酸^[1]、硫酸氢钠^[2]、氯化铁^[3]、固体超强酸 $S_2O_8^{2-}/TiO_2$ ^[4]和 $S_2O_8^{2-}/ZrO_2$ ^[5]等。尽管催化剂的不断改进,使得由乙酸和正己醇反应合成乙酸正己酯的效率不断提高,但是始终未能很好地解决化学合成自

身的缺陷。例如,化学合成生产工艺常涉及高温、高压及强酸、强碱,对设备要求高,易造成污染环境。近年来,随着人们对健康的关注和环保意识的增强,人们对天然产品的兴趣日益增长。与化学合成相比,生物催化是一种“绿色的”环境友好的合成工艺,它具有反应条件温和、催化效率高、催化专一性强等优点。因此,用生物催化剂取代化学催化剂生产与人们生活密切相关的日用化学品已成为必然的发展趋势。脂肪酶是三酸甘油酯水解酶,但在非水相体系中它却具有催化酸和醇反应合成酯的逆向催化功能^[6]。在含有微量水分的有机溶剂中,脂肪酶不仅不会失去其催化活性,而且还由于蛋白质分子内氢键作用的加强,增加了蛋白质的刚性,使酶的热稳定性显著增加^[7]。近年来,利用脂肪酶催化合成低分子量芳香酯已成为研究热点^[8-12],但至今未见合成乙酸正己酯的报道。本文以根霉脂肪酶为催化剂,以正庚烷为溶剂,对乙酸正己酯的酶法合成进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

脂肪酶制剂 本课题组自制,由德氏根霉菌(*Rhizopus delemar*)经固态发酵制备^[13],酶活力为96 IU/g粗酶粉(IU表示国际单位);冰乙酸、正己醇及其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化脂肪酶的制备 称取1g的海藻酸钠配成水溶液,另用pH5的HAc-NaAc缓冲溶液配制酶液,合并两溶液,使海藻酸钠浓度为2%、脂肪酶的总活力为150IU,充分搅匀。用注射器将溶液逐滴加入0.05mol/L、无菌的CaCl₂溶液中,固化45min后取出,洗净,在50℃下烘干,得颗粒状固定化酶(颗粒大小约为1mm)。酶活力约为60IU/g。

1.2.2 脂肪酶活力的测定

收稿日期: 2005-11-21

作者简介: 杨本宏(1962-),男,硕士,副教授,主要从事生物催化研究工作。

基金项目: 安徽省优秀青年科技基金项目(04043051)。

1.2.2.1 游离脂肪酶活力的测定 按文献[14]方法测定。以每分钟催化脂肪水解生成 $1\mu\text{mol}$ 脂肪酸的酶量定义为 1 单位酶活力。

1.2.2.2 固定化脂肪酶活力的测定 以 0.1g 固定化脂肪酶取代游离酶, 在 50°C 恒温水浴振荡器中 ($120\text{r}/\text{min}$) 保温, 按游离酶方法测定酶活力。

1.2.3 酯化反应 取 50mL 三角烧瓶, 加入 20mL 有机溶剂, 2g 固定化酶, 分别加入一定量的乙酸和正己醇, 在一定温度及 $120\text{r}/\text{min}$ 下恒温反应, 定时取样分析, 测定酯合成转化率。

1.2.4 酯合成转化率测定 以反应体系中酯化反应所消耗的有机酸量计算酯合成转化率, 方法如下: 定时吸 1.0mL 的反应液入 50mL 三角烧瓶, 加 1.0mL 水稀释, 加 1 滴酚酞指示剂, 用 $0.05\text{mol}/\text{L}$ NaOH 滴定 (可根据样品中酸浓度大小, 调节 NaOH 浓度大小), 记下消耗的 NaOH 体积 V_1 。移取尚未反应的溶液 1.0mL, 用同样方法测定空白值 V_0 。酯合成转化率按下面公式计算:

$$\text{酯合成转化率} = (V_0 - V_1) / V_0 \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 溶剂极性对酯合成的影响

选择五种常用的疏水性有机溶剂作为反应介质, 加入乙酸和正己醇, 使两底物浓度均为 $0.20\text{mol}/\text{L}$, 醇酸摩尔比为 1:1, 加吸水剂 2g, 在 50°C 恒温气浴中振荡 ($120\text{r}/\text{min}$) 反应 4h, 取样, 用 NaOH 溶液滴定剩余乙酸, 同时测定空白值, 计算酯合成转化率, 结果见表 1。

表 1 有机溶剂极性对酯合成的影响

有机溶剂	lg P	酯化率 (%)
三氯甲烷	2.0	30.2
环己烷	3.2	45.2
正己烷	3.5	45.9
正庚烷	4.0	50.4
异辛烷	4.7	47.4

P 溶剂在 1-辛醇/水体系中的分配系数。

一般而言, 固定化脂肪酶的催化活性与溶剂的疏水性参数 (lgP) 间有一定的相关性。在疏水性较强 (即 lgP 大) 的溶剂中, 酶的催化活力较高; 相反, 在亲水性较强 (lgP 小) 的溶剂中, 酶的催化活力较低。分析其原因, 酶在非水介质中进行催化作用时, 酶分子表面需要有一定的水分, 以维持其行使催化功能所必需的构象。这些必需水的主要作用是屏蔽酶蛋白质分子内带电基团间强烈的相互作用, 使酶分子处于具有一定柔性的活性状态。亲水性较强的有机溶剂较易剥夺酶分子表面的必需水, 导致酶分子结构柔性及活性中心动态结构的改变, 使酶分子处于刚性的非活性状态, 因而使酶的催化活性降低^[15]。

由表 1 可知, 在 lgP 值为 2~4 的有机溶剂中催化酯合成, 随着溶剂极性的降低, 酯化率增高, 且在 lgP 值 3.2~4.7 都有较高酯化率。当反应介质为正庚烷

时, 酯化率最高。但在 $\text{lgP} > 4.0$ 的非极性溶剂中, 却有所下降。这是因为酯化率大小除了与酶活力有关外, 还受另一因素影响, 即底物和产物在溶剂中是否容易扩散。显然, 溶剂疏水性太强, 使底物不容易从溶剂中扩散到酶分子周围, 也不利于产物分子从酶表面扩散出来, 从而表现出酯化率下降。

2.2 脂肪酶用量对酯合成的影响

以正庚烷作溶剂, 在体系中分别加入不同量的固定化脂肪酶, 反应 4h 后, 取样分析, 测定酯合成转化率。结果见图 1。

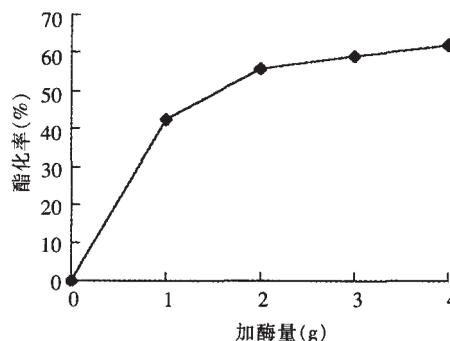


图 1 酶用量对酯合成的影响

在有机溶剂中, 固定化脂肪酶的添加量对酯化率在一定范围内有很大的影响。由图 1 可知, 反应体系中不加脂肪酶时, 无酯生成; 加入一定量的酶后, 乙酸己酯的生成速度随酶量增大而迅速增大, 说明该脂肪酶对酯化反应确有催化作用, 且催化效果十分明显。当加酶量大于 2g 后, 酯化率变化不大。考虑到生产成本, 加酶量选为 2g。

2.3 醇酸摩尔比对酯合成的影响

以正庚烷作溶剂, 加酶量为 2g, 分别加入不同摩尔比的醇和酸进行反应, 测定酯合成转化率, 结果见表 2。

表 2 醇酸摩尔比对酯合成的影响

醇酸摩尔比	1.4:1	1.2:1	1:1	1:1.2	1:1.4
酯化率 (%)	52.7	55.8	58.2	51.9	50.7

小分子醇类物质对酶蛋白有变性作用, 反应体系中过量的短链醇会使脂肪酶失活, 降低它的催化活性。另外, 醇分子可通过其疏水性侧链与脂肪酶活性中心周围的非极性氨基酸相互作用, 造成酶构象的局部扭曲, 不利于其与酸分子的结合^[16]。酸本身可以影响酶活, 而过量的酸又使反应体系的 pH 远远偏离脂肪酶的最适催化 pH, 从而降低了酶的催化活性, 影响最终酯化率。实验结果表明, 在利用不同醇酸摩尔比进行条件实验时, 发现当醇酸摩尔比为 1:1 时, 反应酯化率最高; 当体系中酸过量或醇过量时, 酯化率均有所下降。

2.4 底物浓度对酯合成的影响

在有机相中,酶催化反应是在吸附于酶表面的微水相中进行的,底物分子首先要从有机相进入水相,才能被酶分子催化。当底物浓度过低时,底物分子进入微水相的扩散速率较小,使得酯化反应动力小,合成转化率低;当底物浓度过高时,虽然可能使酯化反应动力加大,但由于底物抑制作用,即底物酸和醇对酶产生抑制,使其催化能力下降,造成酯合成转化率不升反降。酸、醇对酶的抑制,是因为它们是强极性溶剂,会夺取酶蛋白表面的吸附水,破坏酶的活性构象,使酶失活。

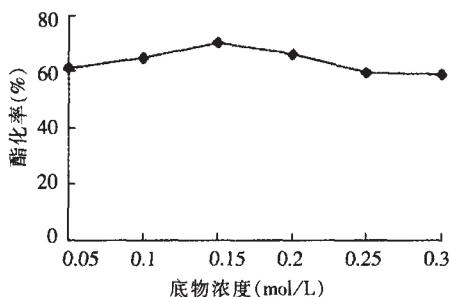


图2 底物浓度对酯合成的影响

在保持其它条件不变的情况下,在反应体系中加入不同浓度的底物,进行酯化反应,反应4h后,测定酯合成转化率。由图2可看出,底物浓度为0.15mol/L时酯化率最高。

2.5 温度对酯合成的影响

在保持其它条件不变的情况下,在40~100℃范围内,做不同温度对酯合成转化率的影响实验,结果见图3。

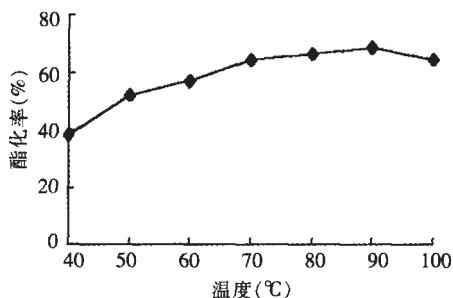


图3 温度对酯合成的影响

在酶的稳定温度范围内,温度的升高有利于提高反应速度,缩短反应时间。由图3可以看出,乙酸正己酯的生成速度随温度的升高而增大,至70℃时,趋势趋于平缓,当温度达100℃时,固定化脂肪酶的催化活性才略有下降。说明脂肪酶经海藻酸钠固定化后,热稳定性有了很大的提高。寇秀芬等^[17]利用 *Candida sp.* 脂肪酶合成二元酸酯时,曾实验在90℃下反应17h,酯化率仍达到92%,这表明脂肪酶是一类耐热性很好的酶,尤其在固定化之后。

2.6 pH对酯合成的影响

称取5份固定化脂肪酶,分别放入5种不同pH

的磷酸缓冲液中,搅拌处理30s,滤出,在50℃下烘干。分别以不同pH缓冲液处理过的固定化脂肪酶做酯合成实验,测定酯合成转化率,结果见图4。

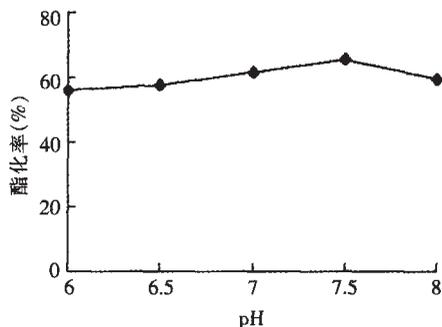


图4 pH对酯合成的影响

在有机溶剂中,酶活性与酶干燥前所在缓冲液的pH和离子强度密切相关,其最适pH与水相中酶的最适pH一致^[18]。因为在有机溶剂中,酶分子依靠其表面的必需水维持酶的活性构象,而只有处在具有适当的pH和离子强度下的必需水中,酶分子活性中心周围的基团才能处于最佳的离子化状态,有利于酶活性表现。由图4可看出,在有机相中,脂肪酶催化酯合成的活性受其最终所处缓冲液pH的影响较为显著。在pH7.5的缓冲液中搅拌制得的固定化脂肪酶活性最高,大于或小于这一pH,酶活性都会有所下降,从而引起酯合成转化率下降。

2.7 相对酶湿度对酯合成的影响

在有机溶剂中,酶活性与酶含水量有很大的关系^[19]。当酶的含水量低于最适水量时,酶构象过于“刚性”,从而失去催化活性;当含水量高于最适水量时,酶的结构柔性过大,酶的构象将向疏水环境下热力学稳定的状态转变,引起酶结构的改变和失活。只有在最适水量时,蛋白质结构的动力学刚性和热力学稳定性之间达到最佳平衡点,酶表现出最大活力。

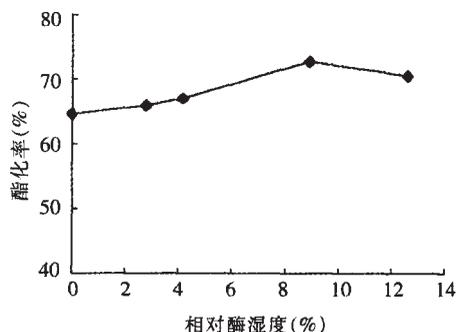


图5 相对酶湿度对酯合成的影响

将固定化脂肪酶放入pH7.5的磷酸缓冲液中浸泡后,滤出,在50℃下干燥不同的时间,得到不同相对湿度的固定化脂肪酶,分别加入反应体系,测定酯合成转化率。由图5可知,本固定化脂肪酶的相对含水量在8.9%左右时,酯合成转化率达到最大。

2.8 吸水剂用量对酯合成的影响

在酯化反应进行过程中,体系中不断有等摩尔的水产生,必须及时除去,否则会抑制反应的进一步进行。并且,固定化酶长时间暴露于含水量过高的有机溶剂中时,会破坏酶的微水环境,使酶的热稳定性下降,易于失活。所以,控制适宜的含水量是有机溶剂中酶催化的关键。由图6可看出,吸水剂(5Å分子筛)的加入量对酯化反应影响很大。表现出酯化率随吸水剂加入量的增加而不断上升,至4g时酯化率的增加趋于平缓。因为反应体系中,溶剂的体积为20mL,所以吸水剂加入量以0.20g/mL为佳。

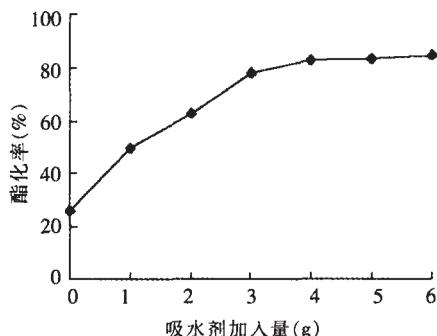


图6 吸水剂用量对酯合成的影响

2.9 酯化反应进程

在实验所得的最佳条件下,进行乙酸正己酯合成反应,每隔1~2h取样,测定转化率,得到酯合成进程曲线(图7)。由图7可知,在最佳反应条件下,酯合成转化率随时间增加而迅速上升,5h后,转化率趋于平衡,并达到最大值88%。

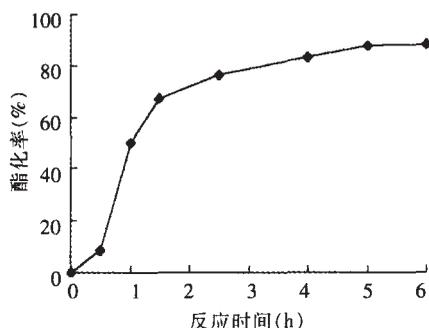


图7 反应时间对酯合成的影响

3 结论

乙酸正己酯是一种低分子量芳香酯,具有特殊的水果香味,应用广泛。本文以德氏根霉(*Rhizopus delemar*)脂肪酶为催化剂,在正庚烷溶剂中,研究了合成乙酸正己酯的条件。结果表明,自制的固定化脂肪酶对乙酸正己酯的合成起到很好的催化作用,反应条件温和,操作简单,合成转化率高。合成后,经过简单过滤,即可使产物与酶制剂得到分离。因为产物为有机溶剂的混合物,它们彼此沸点不同,因此,通过蒸馏即可实现目标产物与其他溶剂的分离。由此可见,本方法具有潜在的工业应用价值。

参考文献:

- [1] 徐克勋. 精细有机化工原料及中间体手册[M]. 北京:化学工业出版社,1998.
- [2] 朱蕾. 水合硫酸氢钠催化合成乙酸正己酯[J]. 许昌学院学报, 2003,22(2):47~48.
- [3] 王家荣,李力波,潘俊杰,等. 氯化铁催化合成乙酸正己酯工艺研究[J]. 化学工程师,1998,64:9~10.
- [4] 吴长增,宋晓平. 固体超强酸 $S_2O_8^{2-}/TiO_2$ 催化合成乙酸正己酯[J]. 应用化工, 2002,31(4):10~12.
- [5] 瞿俊峰,朱蕾,吴长增. 固体超强酸 $ZrO_2/S_2O_8^{2-}$ 催化合成乙酸正己酯[J]. 化学研究,2003,14(3):35~37.
- [6] Godtfredsen S E. Microbial Enzymes and Biotechnology [M]. Amsterdam: Elsevier Press,1990.255~273.
- [7] Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents [J]. J Biol Chem,1988,263(7):3194~3201.
- [8] 杨本宏,吴克,蔡敬民,等. 非水介质中脂肪酶催化合成正戊酸异戊酯研究[J]. 食品与发酵工业,2005,(4):21~24.
- [9] Hari K S, Divakar S, Prapulla S G, et al. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*[J]. J Biotechnol, 2001,87(3):193~201.
- [10] Soni K, Madamwar D. Ester synthesis by lipase immobilized on silica and microemulsion based organogels [J]. Process Biochemistry, 2001,36:607~611.
- [11] YANG Ben-hong, WU Ke, ZHENG Min, et al. *Rhizopus arrhizus* Lipase Catalyzed Syntheses of Three Esters in Nonaqueous Solvents[J]. Chin J of Biochem and Molecul Biol, 2003,19(5):572~575.
- [12] 冯雷刚,张国政. 非水相中酶法合成糖酯的研究[J]. 食品科技,2004(2):58~60.
- [13] 吴克,刘斌,蔡敬民. *Rhizopus sp* PW358 菌脂肪酶固态发酵生产[J]. 生物学杂志,2002,20(2):14~16.
- [14] Naka Y, Nakamura T. The effects of serum albumin and related amino acid on pancreatic lipase and bile salts inhibited microbial lipases[J]. Biosci Biotechnol Biochem,1992, 56:1066~1070.
- [15] Klibanov A M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents [J]. Trends of Biochem Sci,1989,14(4):141~144.
- [16] 崔玉敏,魏东芝,俞俊棠. 非水介质中酶促酯化反应机制及醇抑制动力学[J]. 华东理工大学学报,1999,25(4):363~366.
- [17] 寇秀芬,夏嘉宁,徐家立. 固定化脂肪酶合成二元酸酯[J]. 生物工程学报, 2000,16(1):116~117.
- [18] Klibanov A M. Enzymes that work in organic solvents [J]. Chemtech, 1986,16: 354~359.
- [19] Zaks A, Klibanov A M. The effect of water on enzyme action in organic media[J]. J Biol Chem,1988,263(17):8017~8021.