脂肪酶 Novozym 435 催化合成单月桂酸甘油酯

严子君, 张鑫, 吴祚骛, 吴凯群*, 王玉良

四川大学化学学院, 成都 610065

摘要: 生物酶催化的有机化学反应具有选择性高、反应条件温和、环境友好等优点, 本项目通过对酶催化合成单月桂酸甘油酯的反应条件和产物分离条件进行详细研究, 将酶催化反应引入本科实验教学, 使学生学习先进的知识技术。本项目的合成部分采用月桂酸 : 甘油 = 1 : 3.5 (摩尔比)的投料比、5%酶用量, 在52 °C反应80 min; 回收脂肪酶后, 洗涤除去甘油, 蒸馏除去叔丁醇, 最后用石油醚重结晶可得到纯度90%以上的高含量产品, 分离产率47%–53%, 实验的稳定性和重现性好, 很适合作为一个大学本科有机实验项目。

关键词: 生物酶; Novozym 435; 单月桂酸甘油酯

中图分类号: G64; O6

Enzymatic Synthesis of Glycerol Monolaurate Catalyzed by Lipase Novozym 435

Zijun Yan, Xin Zhang, Zuoao Wu, Kaiqun Wu*, Yuliang Wang

College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610065, P. R. China.

Abstract: The potential of biocatalysis has been recognized as an efficient and green tool for modern organic synthesis due to its high selectivity, mild reaction conditions and sustainability. The enzyme-catalyzed synthesis of glycerol monolaurate were investigated in this study. The optimized reaction takes place with a 1 : 3.5 molar ratio of lauric acid to glycerol in the presence of 5% enzyme catalyst at 52 °C for 80 min. The product with 90% purity was obtained in 47%–53% yield via several separation steps. This enzymatic synthesis shows high stability and good repeatability, and is a suitable organic chemistry experiment for undergraduate laboratory teaching.

Key Words: Lipase; Novozym 435; Glycerol monolaurate

1 引言

1.1 生物酶催化技术引入化学类本科实验教学的意义

生物酶催化技术是生物有机化学的热点内容之一。生物酶催化的有机化学反应, 具有更好的反应选择性, 更温和的反应条件, 更加绿色环保等优点, 因而得到了快速的发展, 在有机合成中获得了广泛的应用^[1]。目前, 生物酶催化技术已可以用于生产医药^[2]、食品添加剂^[3]等多种类型产品。

将新技术、新方法引入本科实验教学, 有利于学生学习到最先进的知识与技术。酶催化合成技术, 是对传统有机化学实验内容的补充和发展, 可以使有机化学实验的项目更为丰富; 通过这类新实验项目的学习, 学生可以直观地认识酶催化合成技术的优越性, 并对这种先进技术产生一定的兴趣; 这对于培养具有最新知识结构的本科学生, 是非常重要的。

1.2 拟选用的实验项目及背景情况

为了充分体现酶催化反应选择性好等优点,本项目选择了月桂酸与含有三个羟基的甘油在 Novozym 435 催化下合成单月桂酸甘油酯(简称单酯)的反应。该反应是一个可逆反应,传统直接酯化法生成较多的双月桂酸甘油酯(简称双酯)等副产物,主产物含量不高,难以用重结晶方法获得合格的产品。采用酶催化技术提高反应选择性,就有可能解决这个问题;拟采用的酶催化剂 Novozym 435 是一种目前已广泛使用的工业脂肪酶,这一类酶能够催化酯的合成、水解、醇解及转酯化反应^[4],已被应用于食品、医药卫生、有机合成和生物能源等领域^[5-8]。

本实验项目的主产物单月桂酸甘油酯,是一种非离子型表面活性剂,有着良好的乳化性能,在 pH 4-8 的范围内有抑菌活性^[9],另外对于艾滋病毒也具有一定抗性^[10]。合成产品中的杂质主要是双月桂酸甘油酯,没有副作用,不要求完全除去,按照相关标准,单月桂酸甘油酯含量达到 70% 可以用于化妆品行业,90% 以上的高含量产品可以作为防腐剂和乳化剂^[11]应用于食品、药品等行业。

用月桂酸和甘油直接酯化,是合成单月桂酸甘油酯的方法之一。早期有文献报道,采用直接酯化法能够获得较好的含量,但可能是受当时测试技术和方法限制,其得到的结果在后面的文献研究中不能重现。后来,2004 年杨宏杰等^[12]对直接酯化法进行了较为系统的研究,采用了对甲苯磺酸、硫酸、磷酸等催化剂或无催化剂反应,得到的单月桂酸甘油酯含量大多数在 50% 左右,其中使用对甲苯磺酸的综合效果最佳,单酯含量可达 57.3%。游利琴等^[13,14]尝试使用磷钨酸和固体超强酸 Nafion-H 为催化剂,得到的单酯含量分别可达到 61.3%、64.1%;梁准成^[15]以 NaHSO₄ 为催化剂,得到的单酯含量为 63.0%。传统直接酯化法普遍存在的缺点是:反应温度较高;反应的选择性低,主产物含量低,须进行分子蒸馏才能使含量达到 90% 以上成为高含量产品,但分子蒸馏的设备复杂,能耗大,高温下产生的微量杂质,使产品色泽较深并伴有焦糊味^[16,17];直接酯化法的分离提纯中还产生大量废水,不符合绿色环保的理念。

为了解决反应选择性低、后处理复杂的问题,有文献先让甘油的两个羟基与硼酸^[17]或丙酮^[18]生成中间体,再与月桂酸反应,最后水解去保护,这两种方法可直接分离得到含量达 90% 的高含量产品。但这类方法比传统直接酯化法多了保护基团的接枝和脱除,导致成本上升,且产生的三废比直接酯化法更多,对环境非常不利。另有文献采用缩水甘油^[19]作原料来合成单月桂酸甘油酯,尽管也能获得较好的实验结果,但缩水甘油作原料成本过于昂贵,无法实际应用。

有文献报道^[20-22]采用生物酶技术催化合成单月桂酸甘油酯,并用色谱方法检测反应混合物发现,反应的选择性高于传统直接酯化方法,反应条件也较为温和。但几篇文献中均没有报道反应混合物的分离提纯,未形成完整的合成技术,酶催化法是否能够用常规实验室分离方法获得 90% 以上高含量产品仍然是未知的。

1.3 解决问题的方法与思路

为了将酶催化合成技术引入本科实验教学,使学生认识到酶技术的优越性,本文拟对酶催化直接酯化合成单月桂酸甘油酯的反应作进一步的研究,获得一个可以应用于本科实验教学的完整的合成与分离提纯方法:

(1) 根据本科实验教学的特点,补充进行反应条件的研究,选择适当的酶用量确保反应时间小于 1.5 小时,再优选反应时间使产物组成有利于后面的分离提纯;

(2) 根据反应混合物的组成,研究分离提纯方法,获得主产物含量超过 90% 的高含量产品;最后综合考虑产率与纯度,选用最合适的分离提纯条件。

2 实验部分

2.1 实验目的

- (1) 学习酶催化合成单月桂酸甘油酯的方法;
- (2) 学习酶催化技术的先进性。

2.2 实验原理

用月桂酸与含有三个羟基的甘油进行酯化反应，甘油中的两个末端羟基具有较高的反应活性，主要生成单月桂酸甘油酯和双月桂酸甘油酯；单酯含量达到 90% 以上的产品，可应用于食品、药品等行业。反应式如下：

传统方法可采用的催化剂有对甲苯磺酸、硫酸、磷酸、磷钨酸、固体超强酸 Nafion-H、 NaHSO_4 等。普遍存在的缺点是：反应温度较高；反应的选择性低，主产物含量低，须进行分子蒸馏才能获得 90% 以上高含量产品，高温下产生的微量杂质，使产品色泽较深并有焦糊味；分离提纯中产生大量废水，不符合绿色环保的理念。

生物酶催化的有机化学反应，反应的底物首先与酶以非化学键的方式结合，酶分子中的催化基团再来完成反应，然后产物与酶脱离。酶分子结合部位的化学基团及酶分子空腔结构等因素，影响酶与不同反应底物的结合能力，因此酶对于底物的结合不是随机的，而是有选择性的，最终反应结果就有更好的化学选择性。如果有适当的脂肪酶，使单酯与酶的结合能力低于甘油与酶的结合能力，进一步酯化产生的双酯量就会低于传统的普通酸催化剂。采用 Novozym 435 催化剂，刚好能够满足这样的反应选择性要求。

2.3 试剂

月桂酸(分析纯)，甘油(分析纯)，脂肪酶 Novozym 435 (创科生物科技有限公司，酶比活力 $10000 \text{ u}\cdot\text{g}^{-1}$)，叔丁醇(分析纯)，石油醚(沸程：60–90 °C)，无水硫酸镁(分析纯)。

2.4 实验仪器

电子分析天平(佑科仪器仪表有限公司)、磁力加热搅拌器(赛默飞世尔公司)、圆底烧瓶、球形冷凝管、磁力搅拌子、分液漏斗、砂芯漏斗、旋转蒸发仪(英峪高科仪器厂)、循环水式真空泵(予华仪器有限公司)。

2.5 实验步骤/方法

在 25 mL 圆底烧瓶中，加入 2.0 g (0.010 mol) 月桂酸、3.2 g (0.035 mol) 甘油、4.0 mL 叔丁醇和 0.10 g 脂肪酶 Novozym 435，在 52 °C 水浴中加热，搅拌反应【注释 1】，转速控制在 $350 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 左右，80–90 min 后停止加热。

在反应液中加入 2 mL 叔丁醇，抽滤，再用 $2 \times 1 \text{ mL}$ 叔丁醇洗涤酶后，回收脂肪酶。在滤液中加入 4 mL 水，摇晃，再加入 30 mL 石油醚，充分振荡，静置，分去水层【注释 2】，再用 $2 \times 1.5 \text{ mL}$ 水洗涤后，可除去甘油。用无水硫酸镁干燥，过滤，70 °C 下减压蒸馏，蒸去其中的叔丁醇、石油醚，得到单月桂酸甘油酯粗品(约 2.3 g)。在粗品中加入 5 mL 石油醚，70 °C 水浴加热，搅拌溶解，在室温下放置 5 min 后，放入冰盐浴中冷却 10 min，砂芯漏斗抽滤【注释 3】，并用 1.5 mL 冰冻石油醚洗涤一次，抽干，得产品约 1.30–1.45 g，产率 47%–53%，含量 90% 以上。

【注释】

1) 此搅拌方法易磨碎脂肪酶，影响其活性，如果需要将酶回收给学生实验二次利用，可以采用摇床进行反应；

2) 使用分液漏斗水洗除去甘油时，若前面加入溶剂和水量不正确，有时出现分层困难，可加入适量乙酸乙酯帮助分层；

3) 砂芯漏斗被产物堵塞时，可用热水浸泡。

3 结果与讨论

3.1 参照文献确定投料比和溶剂量

本研究中参照了文献^[4]报道的研究结果稍作变通确定两个实验参数,在后续研究中,采用甘油与月桂酸摩尔比为 3.5 : 1,按照每 1 g 甘油质量加入反应溶剂叔丁醇体积 1.25 mL。

3.2 酶用量的选择

文献[22]加入催化剂用量为月桂酸和甘油总重量的 0.8%,完成反应的时间需 15 h,时间太长显然不适合本科实验教学;文献[4]加入催化剂用量为甘油重量的 12%,0.5 h 即能基本完成反应,但对于酶催化反应来说,该用量有点偏多。

为了选择适合实验教学的酶用量,我们探究了酶用量为月桂酸质量的 3.5%到 6.5%的反应情况。结果如图 1 所示。

图 1 酶用量的影响

甘油 : 月桂酸(摩尔比) = 3.5 : 1; 叔丁醇 : 甘油(体积质量比) = 1.25 : 1; $t = 1$ h

随着酶用量的增加,反应在 1 h 内的转化率和产率都呈现上升趋势。当酶用量在 4.5% 时,1 h 反应的转化率和产率即可达到 67% 和 56%,已经能较好地促进该反应的进行,因此,只要酶用量为 4.5% 以上即可以满足实验教学的要求。

3.3 反应时间的影响

取不同反应时间下的反应液,用 HPLC 方法测试月桂酸的转化率和单月桂酸甘油酯的产率,结果如图 2 所示。

图 2 反应时间的影响

甘油 : 月桂酸(摩尔比) = 3.5 : 1; 叔丁醇 : 甘油(体积质量比) = 1.25 : 1; 酶用量 5%

随着时间的增加,转化率、单酯和二酯的量都在增加(两条曲线的差值即可反映二酯生成的量),平衡转化率和产率大约在 84%和 71%。在 80 min 时,反应就已经接近平衡,产率已达 68%,产率随时间变化已经非常缓慢,对于学生实验来说,反应时间控制在 80–90 min 即可。

3.4 酶的回收

酶催化合成单月桂酸甘油酯的文献均未报道分离提纯,我们只能根据反应混合物的状况自己设计纯化方案。反应结束后的混合体系中含有固体和液体两部分,其中,固体为酶 Novozym 435;液体含有:月桂酸、甘油、叔丁醇、单月桂酸甘油酯和二月桂酸甘油酯。

首先用过滤方法分离出固体的酶。再用 4 mL 叔丁醇分两次洗涤可把酶上残留的反应液洗入滤液中。

3.5 洗涤除去甘油

滤液各组分中,甘油沸点较高,不能通过蒸馏除去;残留的甘油在后续重结晶时不能除去,影响产品质量。

将混合物溶解于石油醚并水洗可以有效除去甘油,经高效液相色谱分析,第一次洗涤后即可除去大部分甘油,第二次洗涤后甘油残留已经很少,再经第三次洗涤后,即可完全除去甘油。

3.6 蒸馏除去叔丁醇和石油醚

叔丁醇的沸点为 82.4 °C,石油醚的沸程为 60–80 °C,有机层干燥后在 70 °C 左右减压蒸馏即可将它们完全除去。

3.7 重结晶

蒸去溶剂后的粗品中,含有主产物、月桂酸和二月桂酸甘油酯,三种组分极性大小为:单月桂酸甘油酯 > 月桂酸 > 二月桂酸甘油酯。考虑用非极性溶剂石油醚将月桂酸和二月桂酸甘油酯除去。如表 1 所示,重结晶溶剂用量关系到最终产品的含量和产量。当石油醚用量较少时(4 mL),重结晶并不能除去大部分月桂酸和二月桂酸甘油酯;而增加石油醚用量至 5 mL 左右时,即可除去较多月桂酸和二月桂酸甘油酯,同时也能使单月桂酸甘油酯损失较小,经过一次洗涤即可使产品中单月桂酸甘油酯含量达 90%的标准。第二次洗涤仍能洗去部分杂质,使单酯含量升高至 91.53%,但产率会有所下降,故最终选择使用 5 mL 石油醚重结晶并洗涤一次。

表 1 不同体积石油醚的重结晶结果

石油醚/mL	第一次洗涤	单酯含量/%	产率/%	第二次洗涤	单酯含量/%	产率/%
4	1.5 mL 石油醚(冰)	87.17	54.20	1.5 mL 石油醚(冰)	90.60	50.07
5	1.5 mL 石油醚(冰)	90.67	52.88	1.5 mL 石油醚(冰)	91.53	50.44

3.8 产物结构确定

合成的产品经过柱色谱分离后,进行了核磁共振氢谱和质谱分析,¹H NMR谱图显示氢的积分面积与1-单月桂酸甘油酯应有的氢个数相同,同时各个氢之间发生耦合的情况与1-单月桂酸甘油酯结构中各基团取代位置相符;另外,高分辨质谱(电喷雾)(HRMS-ESI)图显示其测定分子量与1-单月桂酸甘油酯的精确计算分子量相符,确认其结构为1-单月桂酸甘油酯。

3.9 与传统方法的比较

酶催化法与传统的直接酯化法结果对比,可发现以下优点:(1)酶催化法反应选择性好,通过一次重结晶就能使终产品含量达到 90%以上,满足该产品在各领域的使用要求,而传统催化剂直接酯化法无法做到;(2)反应以及分离提纯过程中无需高温,能耗低,所得产品没有因高温导致的色泽加深和糊味,质量更好;(3)分离提纯过程中不产生大量废水,对环境更为友好。

4 结语

通过对脂肪酶 Novozym 435 催化合成单月桂酸甘油酯的反应条件选择和产物分离提纯方法研究,在合成部分采用 1:3.5 的投料比、5%酶用量情况下,在 52 °C 反应 80–90 min 可以顺利完成反应;回收脂肪酶后,萃取除去甘油,蒸馏除去叔丁醇,最后用石油醚重结晶可得到含量 90%以上的高含量产品,分离产率 47%–53%。

本项目内容的先进性、反应条件、实验过程,都适合作为本科有机实验教学的内容。本实验在引入本科实验教学时,适用于和化学相关专业的学生进行酶催化实验技术的训练,如:化学学院、生命科学院、药学院、基法学院等,一堂课参与实验的学生人数可达 15–20 人,可单人进行,完成本实验约需 5–6 学时,一学期可运行两轮。在该实验的教学中不仅可对学生进行基本实验操作的训练,如:回流、萃取和重结晶,同时还可以让学生直观地认识到酶催化合成技术的优越性,如:反应条件温和、反应选择性高等,有效地培养学生的最新知识结构,达到教学目标。

5 创新性/特点/特色声明

本项目具有以下优点:

- (1) 酶法可用常规分离得到高含量单月桂酸甘油酯,而传统方法不行;
- (2) 反应条件温和,比传统方法能量消耗更低,产品质量更好;
- (3) 产生的废水量远远低于传统方法,对环境友好。

参 考 文 献

- [1] 刘环宇,林森,梅德胜. 江西化工, **2003**, No. 3, 1.
- [2] 徐礼生,王治元,刘均忠,张宏娟,刘茜,焦庆才. 精细化工, **2013**, 30 (4), 370.
- [3] Yu, S.; Yu, L.; Yu, B.; Sun, W.; Liu, C.; Yang, M.; Cui, F. *Agri. Sci. & Technol.* **2013**, 14, 169.
- [4] 崔海萍. 脂肪酶催化合成月桂酸单甘酯和乙酸癸酯[D]. 大连: 大连理工大学, 2012.
- [5] Pawongrat, R.; Xu, X. B.; H-Kittikun, A. *Food Chem.* **2007**, 104, 251.
- [6] 孟祥河. 功能性甘油二酯的酶促酯化合成及其减肥功能的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [7] 张春鸣. 单辛酸甘油酯的酶法合成及性质研究无锡[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [8] 罗文玲,汪钊,郑建永,章银军. 酶催化在香精香料中的应用[D]. 浙江: 浙江工业大学, 2008.
- [9] 冯凤琴,张辉,王莉,何勇. 光学学报, **2008**, 28 (2), 326.
- [10] Li, Q. S.; Estes, J. D.; Patrick, S. M.; Duan, J. L.; Brosnahan, A. J.; Southern, P. J.; Reilly, C. S.; Peterson, M. L.; Schultz-Darken, N.; Brunner, K. G.; *et al. Nature* **2009**, 458, 1034.
- [11] 宋国胜,郭祀远,蔡妙颜,郑必胜. 食品科技, **2002**, No. 1, 37.
- [12] 杨宏杰. 月桂酸单甘酯合成与提纯的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [13] 游利琴,肖咏梅,张风雷. 广东化工, **2011**, 38 (9), 273.
- [14] 游利琴,王宏雁. 粮油食品科技, **2012**, 20 (4), 54.
- [15] 梁准成. 月桂酸单甘酯类衍生物的合成及性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
- [16] 胡朝阳. 产脂肪酶菌株的筛选及酶法合成单甘酯[D]. 广西: 广西大学, 2004.
- [17] 高永辉,曹伯锋. 合成化学, **2000**, 8 (2), 104.
- [18] 谷玉杰,马石刚,吕剑. 日用化学工业, **2006**, 36 (1), 12.
- [19] 赵国钧. 上海化工, **1999**, 24 (20), 23.
- [20] Pereira, C. C. B.; da Silva, M. A. P.; Langone, M. A. P. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, 114, 433.
- [21] 马清仪,陈洪,杜毅,许平. 过程工程学报, **2004**, 4 (1), 37.
- [22] 栗俊田,杨万斌,张莹,王海堂. 广东化工, **2018**, 45 (16), 33.