

文章编号: 1001-3555(2011)03-0262-07

无溶剂体系脂肪酶催化合成阿魏酸油醇酯

董立峰¹, 王艳¹, 辛嘉英^{1,2*}, 陈林林¹, 夏春谷²

(1 哈尔滨商业大学 食品科学与工程省重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2 中国科学院兰州化学物理研究所 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 对无溶剂体系中阿魏酸的转酯化疏水改性进行了研究, 确立了减压反应器(0.001 MPa)中 Novozym 435 脂肪酶催化阿魏酸乙酯和油醇进行转酯化反应合成新型抗氧化剂阿魏酸油醇酯的方法. 发现水活度(a_w) 明显影响转酯反应, 阿魏酸油醇酯产率在 $a_w < 0.01-0.75$ 范围内随着水活度的增加而降低, 推测底物阿魏酸乙酯和产物阿魏酸油醇酯的水解是该转酯反应的竞争性抑制因素. 同时以阿魏酸油醇酯的产率为考察指标, 探讨了温度、加酶量、搅拌器转速、反应时间、水活度、底物摩尔比等因素对转酯化反应的影响. 确定了脂肪酶催化阿魏酸油醇酯合成的最佳反应条件为: 5.0 mmol 油醇, 1.0 mmol 阿魏酸乙酯, 70 mg Novozym435 脂肪酶, 水活度小于0.01, 反应温度为 60 °C, 转速为 200 r/min, 反应时间为 96 h, 此时阿魏酸油醇酯的产率可达 65%. 固定化酶反复使用多次后, 活性没有明显损失.

关键词: 阿魏酸乙酯; 油醇; 阿魏酸油醇酯; Novozym435 脂肪酶; 无溶剂体系

中图分类号: O643.32

文献标识码: A

阿魏酸(4-羟基 3-甲氧基肉桂酸)是一种水溶性的天然酚酸, 具有抗氧化、抗炎、抗衰老、抗癌、清除自由基等多种生物活性^[1,2]. 由于阿魏酸在疏水环境中的不溶性和不稳定性, 大大限制了其在食品和化妆品工业中的应用^[3,4]. 为了更好的发挥阿魏酸的抗氧化性并扩大其应用范围, 有必要对阿魏酸进行疏水改性. 与脂肪醇等脂溶性分子结合, 可有效地提高阿魏酸的油溶性和稳定性, 既保持了阿魏酸的抗氧化活性, 又克服了阿魏酸分子本身亲水性强而难以在疏水环境中发挥作用的弊端, 其反应机理如图 1 所示. 目前, 利用脂肪醇对阿魏酸进行酶催化疏水改性主要集中在阿魏酸与短链或中链脂肪醇的酯化反应, 与长链脂肪醇合成的报道较少, 而后者更易参与脂肪酶催化的反应^[5,6]. 若直接用阿魏酸与长链脂肪醇进行酯化反应, 阿魏酸的强亲水性会大大抑制脂肪酶的催化活性, 采用一些酯化

衍生物进行转酯化反应有望解决这一问题. 因此本文在无溶剂体系中, 选用阿魏酸乙酯作为酰基供体, 进行脂肪酶催化的转酯化反应合成阿魏酸脂肪醇酯, 发现副产物乙醇和副反应水解反应可能为该转酯化反应的限制性因素, 其反应过程如图 2 所示. 考察了反应参数对转酯产率的影响, 进一步提高了阿魏酸油醇酯的产率.

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

阿魏酸乙酯(>99%), 苏州畅通化学试剂有限公司; 十六醇、十八醇、油醇、二十二醇, 上海晶纯试剂有限公司; 固定化南极假丝酵母脂肪酶 NOV435(10,000 U/g), 美国 Sigma 公司; 甲醇(HPLC 纯), Fisher 公司; 3 Å 分子筛, 大连催化剂厂; 薄层色谱扫描仪(KH-2000 型), 薄层电动点样



图 1 油醇与阿魏酸乙酯反应机理

Fig. 1 The sequential reaction sequence of transesterification of ethyl ferulate with oleyl alcohol

收稿日期: 2011-04-28; 修回日期: 2011-06-15.

基金项目: 黑龙江省教育厅重点项目(11551Z007)及黑龙江省教育厅科技创新团队计划项目(2010td04).

作者简介: 董立峰, 男, (1986-), 硕士研究生.

* 通讯联系人, E-mail: xinjiaying@yahoo.com.cn.

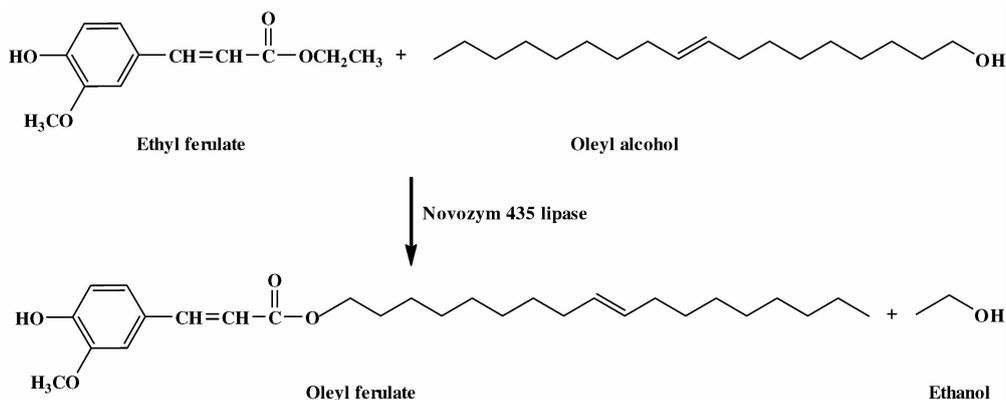


图2 阿魏酸油醇酯的合成途径

Fig. 2 Reaction scheme of lipase-catalyzed transesterification of EF with oleyl alcohol

器(SP-II型),上海科贺生化科技有限公司;高效液相色谱,Agilent Technologies.

1.2 脂肪酶催化合成阿魏酸脂肪醇酯转酯化反应

将阿魏酸乙酯与脂肪醇以不同的摩尔比混合获得反应液,将其与脂肪酶分别通过3 Å分子筛吸附或饱和盐溶液预平衡获得不同的水活度,添加到250 mL旋转蒸发瓶中.使用旋转蒸发装置作为反应器,在一定温度和真空度下反应不同时间后取样分析.反应完成后,采用经分子筛平衡除水的正己烷($a_w < 0.01$)反复冲洗固定化酶颗粒,将回收的固定化酶进行下一批反应.

1.3 水活度控制方法

反应使用的任何底物和酶均按文献[7]方法采用如下饱和盐溶液或固体吸附剂在25 °C下预平衡或吸附至少48 h获得不同的水活度:固体吸附剂3 Å分子筛($a_w < 0.01$),LiBr饱和盐溶液($a_w: 0.05$),LiCl饱和盐溶液($a_w: 0.11$),CH₃COOK饱和盐溶液($a_w: 0.23$),(MgNO₃)·6H₂O饱和盐溶液($a_w: 0.54$),NaCl饱和盐溶液($a_w: 0.75$),KCl饱和盐溶液($a_w: 0.85$),K₂Cr₂O₇饱和盐溶液($a_w: 0.98$).

1.4 反应进程检测和产率分析

采用薄层层析(TLC)进行反应进程监测.分别吸取反应样品和对照样品2.5 μL,点在GF254硅胶板上,在展开剂体积比为二氯甲烷:苯:乙醚:正己烷为5:3:1.5:0.08中展开,展开方法为上行法,展开距离为14 cm,检测波长为254 nm.检测产物阿魏酸脂肪醇酯、底物阿魏酸乙酯、副产物阿魏酸的含量变化.

采用高效液相色谱(HPLC)(Waters

Alliance2695)按照文献描述方法进行产率分析^[8].样品经丙酮稀释10倍后进一步用甲醇稀释20倍,上样量10 μL.色谱柱为X-Terra C₁₈反相柱(5 μm, 150 × 2.1 mm),流动相是A(99%水,1%冰乙酸),B(100%甲醇),梯度洗脱程序为:0 min 50% A + 50% B, 30 min 100% B + 0% A,保持15 min.流速是1 mL/min,温度为35 °C,检测波长为254 nm.

阿魏酸脂肪醇酯产率根据文献按各物种峰面积(A)进行计算^[9-11]:

$$\text{产率}\% = \frac{A_{\text{阿魏酸脂肪醇酯}}}{(A_{\text{阿魏酸脂肪醇酯}} + A_{\text{阿魏酸乙酯}} + A_{\text{阿魏酸}})} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 脂肪醇的种类对转酯化反应的影响

脂肪酶催化的转酯化反应是否能够快速有效地进行,底物的选择至关重要.选择4种具有一定代表性的长链脂肪醇进行了研究,实验结果如表1所示:由表1可以看出,在相同条件下,不同的脂肪醇与阿魏酸乙酯转酯化合成阿魏酸脂肪醇酯的产率是不一样的.产率与脂肪醇的链长及其饱和度有关,在一定的链长范围内产率随着链长的增加而升高,阿魏酸十八醇酯的产率要比阿魏酸十六醇的产率高4.8%.但是二十二醇在此条件下不能发生转酯化反应,因为60 °C时二十二醇仍然为固态很难与阿魏酸乙酯发生反应.然而将温度升高到二十二醇的熔点以上(75 °C)时,转酯化反应同样可以进行,而且阿魏酸二十二醇酯的产率也可高达32.8%.这一结果说明,转酯化反应的产率不仅与所用脂肪醇的链长有关还与脂肪醇的物理状态有关.通过对比具有相同链长的阿魏酸十八醇酯和油

醇阿魏酸酯的产率,发现后者要比前者高出 12.7%。这一结果表明了碳链的饱和程度是影响产率的主要因素。

表 1 不同的脂肪醇对酶催化合成阿魏酸脂肪醇酯的影响

Table 1 The effect of fatty alcohol on lipase-catalyzed transesterification of EF with fatty alcohol

fatty alcohol	physical state	the melting point(°C)	temperature(°C)	yield(%)
1-Hexadecanol	crystallization	50	60	35.7
1-Octadecanol	crystallization	59.4 ~ 59.8	60	40.5
Oleyl alcohol	liquid	0 ~ 5	60	53.2
1-Docosanol	crystallization	68 ~ 72	60	0.0
			75	32.8

Reaction conditions: $a_w < 0.01$, 5.0 mmol fatty alcohol and 1.0 mmol EF catalyzed by 70 mg Novozym 435 lipase at 200 r/min and 60 °C for 96 h

2.2 反应方式对转酯反应及酶稳定性的影响

脂肪酶催化阿魏酸乙酯与油醇转酯反应的副产物乙醇容易引起脂肪酶失活。如何有效地排除反应体系中的乙醇,对提高阿魏酸油醇酯的产率和维持脂肪酶的活性均具有重要意义。如图 2 和图 3 所示,在旋转蒸发装置中减压条件下(0.001 MPa),反应 96 h 后阿魏酸油醇酯的产率高达 65%,比常压条件下高出 12%。而且减压条件下固定化脂肪酶反复使用 9 次后,产率仍然可以高达 62%。而常压条件下,脂肪酶使用 3 次后活性开始大幅度下降。可见采用减压条件进行反应,可以除去反应体系中乙醇,从而提高产率并保持脂肪酶活性是一种切实可行并效果比较明显的方法。

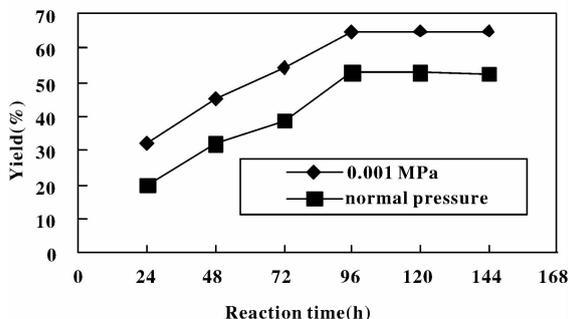


图 3 常压和减压条件对转酯反应的影响

Fig. 3 Effect of normal pressure and vacuum-rotary evaporation procedure on transesterification of EF with oleyl alcohol

(Reaction conditions: $a_w < 0.01$, 5.0 mmol oleyl alcohol and 1.0 mmol EF catalyzed by 70 mg Novozym 435 lipase at 200 r/min and 60 °C for 96 h.)

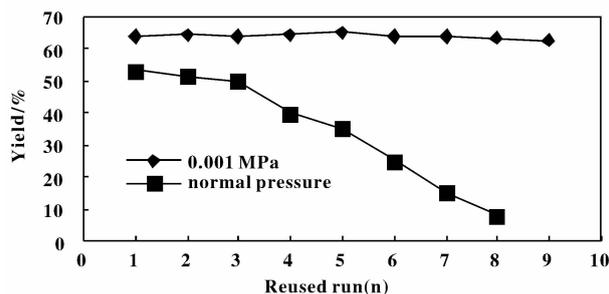


图 4 酶的反应次数对转酯反应的影响

Fig. 4 Repetitive batch transesterification conducted under normal pressure and vacuum-rotary evaporation procedure (Reaction conditions: $a_w < 0.01$, 5.0 mmol oleyl alcohol and 1.0 mmol EF catalyzed by 70 mg Novozym 435 lipase at 200 r/min and 60 °C for 96 h.)

2.3 水活度对转酯化反应的影响

在转酯反应中,反应体系中水活度是一个重要的参数,它即影响着脂肪酶的催化活性,同时也决定着反应平衡。在无溶剂体系中,大部分水是来自于酶和反应底物,通过 3 Å 分子筛或饱和盐溶液将酶和底物预平衡,阿魏酸乙酯和油醇转酯反应的初始水活度可以被控制在 < 0.01 到 0.75 之间。从图 4 可以看出,在不同的初始水活度 (< 0.01 到 0.75) 下进行转酯反应,初始水活度对酶催化效率有明显的影响。当水活度从 < 0.01 上升到 0.1 时,阿魏酸油醇酯的产率经历了一个缓慢上升和缓慢下降的过程,然而,当初始水活度从 0.1 继续上升到 0.75 时,产率却随着水活度的上升而急剧下降。转酯反应产

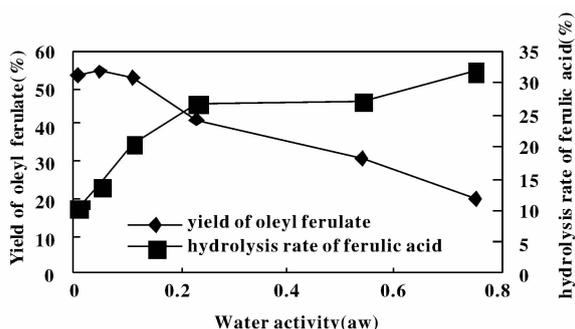


图5 水活度对转酯反应的影响

Fig. 5 Effect of aw on transesterification of EF with oleyl alcohol (Reaction conditions: 5.0 mmol oleyl alcohol and 1.0 mmol EF catalyzed by 70 mg Novozym 435 lipase at 200 r/min and 60 °C for 96 h)

率的下降很可能是由于水作为反应底物直接参与反应导致的,也可能是,水积累在酶的表面上导致了油醇的疏水基团向酶分子的靠近受到了限制.虽然初始水活度为0.05时,产率最高,但是为了最大限度的减少副反应的发生,最终选定初始水活度为<0.01时进行转酯化反应,因为此时水解副产物阿魏酸最低.

2.4 温度对酶催化合成阿魏酸油醇酯的影响

在酶催化反应中,温度直接影响着酶的催化活性和稳定性,同时也是反应底物的存在状态、整个反应体系黏度和反应热力学平衡的重要影响因素,因此是优化无溶剂体系中脂肪酶催化转酯化反应的主要控制因素.如图5所示:反应温度由40 °C升高到60 °C时反应产率随着温度升高而增大,反应温

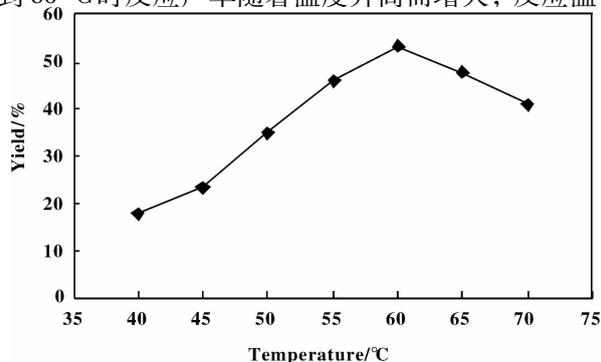


图6 温度对转酯反应的影响

Fig. 6 Effect of temperature on transesterification of EF with oleyl alcohol

(Reaction conditions: aw < 0.01, 5.0 mmol fatty alcohol and 1.0 mmol EF catalyzed by 70 mg Novozym 435 lipase at 200 r/min for 96 h)

度达到60 °C时产率最高(53%).这主要是由于随着温度的升高,酶活力增加,同时反应介质黏度降低,外扩散阻力减小更有利于传质.然而继续升高温度产率开始下降,这主要是由于过高的温度使得酶活性下降.因此,本文选择60 °C为该反应的最适温度,这与固定化脂肪酶 Novozym 435 的最适温度为60-70 °C的特性相一致.

2.5 加酶量对转酯反应的影响

在实际工业生产中酶的成本始终是使其应用受到限制的一个主要因素.由于酶的价格比较昂贵,同时也是影响产率的一个重要因素,所以对酶添加量的研究是十分必要的.如图6所示:在底物浓度一定的情况下,考察了酶添加量变化的影响.当酶添加量从2%增加到5% (w/w)时,阿魏酸油醇酯的产率也随之增加,在酶与底物质量比为5% (70 mg)时产率达到最大(48.6%).这说明此范围内的酶添加量可以很好的克服反应体系的内扩散限制作用.当酶的添加量从5%继续增加到7%,阿魏酸油醇酯的产率反而有所下降,并且体系内阿魏酸的含量开始迅速增加.这可能是由于酶的表面有一层水化层,加入过多的酶就会向体系中引入过多的水,从而使体系的初始水活度提高,阿魏酸乙酯和阿魏酸油醇酯的水解反应增强,致使阿魏酸油醇酯的产率下降.这一现象进一步说明了酶的添加量不仅影响着反应速率,在某种程度上也影响着反应平衡.因此,选定酶的添加量以酶与底物质量比为5%为宜.

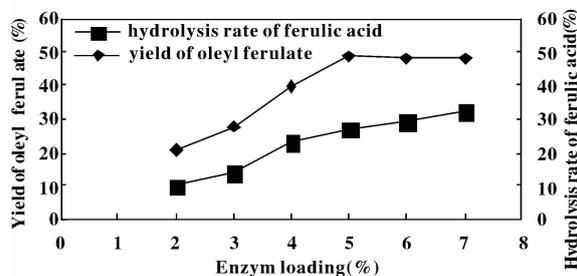


图7 加酶量对转酯反应的影响

Fig. 7 Effect of lipase loading on transesterification of EF with oleyl alcohol

(Reaction conditions: aw < 0.01, 5.0 mmol oleyl alcohol and 1.0 mmol EF catalyzed by Novozym 435 lipase at 200 r/min and 60 °C for 96 h.)

2.6 底物摩尔比对转酯反应的影响

反应混合物中各底物比决定着反应体系的物理

化学特性,是影响反应平衡的重要参数.理论上,过多的油醇会促使反应平衡向产物合成方向转变,当摩尔比为2:1时,需要提供更多的溶剂(油醇)来溶解固态的阿魏酸乙酯.在研究中,将阿魏酸乙酯的量固定为1.0 mmol,变化油醇的量研究对转酯反应的影响.从图7可以看出:酰基供体和酰基受体的比例影响着转酯化反应的程度.当油醇/阿魏酸乙酯的摩尔比从2:1上升至5:1时,阿魏酸油醇酯的产率也不断上升并达到最大(48.5%),这一现象可以用反应热力学平衡来解释,大量的油醇使反应平衡向酯合成方向移动,而且,反应底物是通过一个很窄的疏水通道进入脂肪酶的活性位点,两个高移动性的蛋白区域在活性位点通道的入口被识别,这两个蛋白区域决定着脂肪酶催化反应过程中催化位点的可进入性.其中一个蛋白区域具有盖子的作用,另一个蛋白区域则具有改变疏水通道的大小、形状和入口处的表面疏水性.因此,增加油醇和阿魏酸乙酯的比例使得反应介质 Lop 值升高,从而使疏水性增强,这就使得脂肪酶的活性位点充分暴露出来有益于反应的进行.然而,进一步增加油醇的量从5:1到7:1,阿魏酸油醇酯的产率却有微小的下降.当摩尔比超过5时产率的下降可能是由于过量的油醇使得脂肪酶周围的微环境底物浓度过高,而且油醇和酶的表面和活性位点通道相互作用,限制了亲水的阿魏酸乙酯向催化位点的靠近.因此,阿魏酸乙酯与油醇的摩尔比为1:5是最适合的摩尔比,并用于以后的反应中.

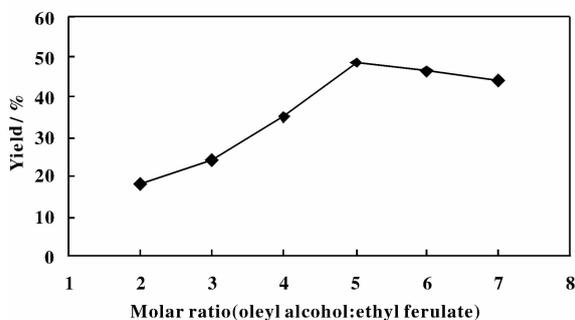


图8 底物摩尔比对转酯反应的影响

Fig. 8 Effect of substrates molar ratio on transesterification of EF with oleyl alcohol

(Reaction conditions: $aw < 0.01$, 1.0–8.0 mmol oleyl alcohol and 1.0 mmol EF catalyzed by 70 mg Novozym 435 lipase at 200 r/min and 60 °C for 96 h)

2.7 反应器转速对转酯反应的影响

反应器转速的大小关系到反应体系的传质,选择适宜的转速既可达到所需的传质效果,又可以节约能耗.转速对该转酯反应的影响如图8所示:当转速低于200 r/min时,产率随搅拌器转速的增加而增加.这说明当转速为100 r/min–200 r/min时,底物的外扩散为反应的限制因素.当转速超过200 r/min时,再提高转速对产率的影响甚微,这说明200 r/min的转速已经基本消除了外扩散限制,反应转化率不再受转速的影响.这有可能是此时底物与酶活性中心接触的速度很慢,远小于底物和产物传质的速度而成为整个反应的限速步骤.从图8我们也可以看出反应体系中阿魏酸的量随着转速的加快在不断的增加,因此高转速造成的水解反应也是影响产率的一个因素.因此,搅拌器转速应以200 r/min为宜.

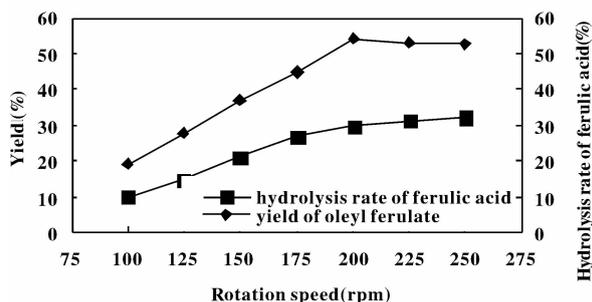


图9 反应器转速对转酯反应的影响

Fig. 9 Effect of rotation speed on transesterification of EF with oleyl alcohol

(Reaction conditions: $aw < 0.01$, 5.0 mmol oleyl alcohol and 1.0 mmol EF catalyzed by 70 mg Novozym 435 lipase and 60 °C for 96 h.)

2.8 反应时间对转酯反应的影响

确定适宜的反应时间可以在最短的时间内得到最高的产率,避免实验时间的浪费,从而提高了工作效率.反应时间对反应的影响如图9所示:随着反应时间的增加,转酯反应转化率不断增大,在96 h时反应达到平衡,其产率也达到最大.随着反应时间的继续增加,反应体系的平衡点也稍微向左移动.这可能是由于随着时间的延长,反应产物和底物发生了一定程度的水解,而此时随着体系黏度的增加酶催化活性降低和底物浓度减小导致的.

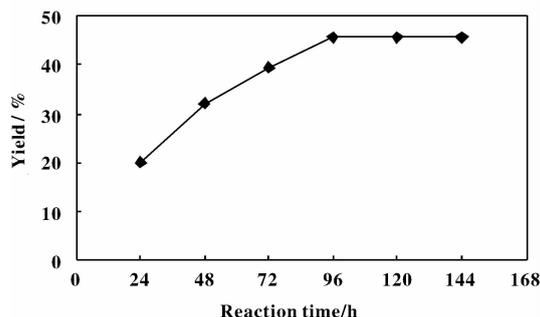


图 10 反应时间对转酯反应的影响

Fig. 10 Effect of reaction time on transesterification of EF with oleyl alcohol

(Reaction conditions: $a_w < 0.01$, 5.0 mmol oleyl alcohol and 1.0 mmol EF catalyzed by 70 mg Novozym 435 lipase at 200 r/min and 60 °C.)

3 结 论

本文采用无溶剂体系合成了一类新型的阿魏酸疏水性改良产品-阿魏酸脂肪醇酯. 固定化脂肪酶 Novozym 435 在无溶剂体系中可以催化阿魏酸乙酯与不同的长链脂肪醇发生转酯化反应生成疏水性的阿魏酸长链脂肪醇酯. 通过对几种长链脂肪醇的筛选, 发现油醇作为疏水因子更易发生反应并且在温和的条件下产率最高. 通过减压旋转蒸发的方法可以有效的除去反应副产物乙醇, 解决了乙醇对反应的限制性问题, 并对保持脂肪酶的活性也有至关重要的作用. 在减压条件下, 酶最少可以反复使用9次而仍具有较高的活性, 为进一步进行深入研究和工业化生产奠定了良好的基础.

参考文献:

- [1] Kroom PA, Williamson G. *Biotechnology and Applied Biochemistry*[J], 1996, **23**: 263 - 267
- [2] Faulds CB, Williamson G. *Applied Microbiology and Biotechnology*[J], 1995, **43**(6): 1 082 - 1 087
- [3] Srinivasan M, Sudheer A R, Menon V P. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*[J], 2007, **40**(2): 92
- [4] Ou S, Kwok K C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*[J], 2004, **84**: 1 261 - 1 269
- [5] Sabally K, Karboune S, Yeboah F K, et al. *Applied Biochemistry and Biotechnology*[J], 2005, **127**(1): 17 - 27
- [6] Stamatis H, Sereti V, Kolisis F N. *Journal of the American Oil Chemists' Society*[J], 1999, **76**(12): 1 505 - 1 510
- [7] Wehtje E., Costes D., Adlercreutz P. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*[J], 1997, **3**(5): 221 - 230
- [8] Sun S. D., Shan L., Liu Y. F., et al. *Biotechnology Letters*[J], 2007, **29**(12): 1 947 - 1 950
- [9] Compton D. L., Laszlo J. A., Berhow M. A. *Journal of the American Oil Chemists' Society*[J], 2000, **77**(5): 513 - 519
- [10] Laszlo J. A., Compton D. L., Eller F. J. *Green Chemistry*[J], 2003, **5**(4): 382 - 386
- [11] Laszlo J. A., Compton D. L. *Journal of the American Oil Chemists' Society*[J], 2006, **83**(9): 765 - 770

Lipase-Catalyzed Synthesis of Oleyl Ferulate in Solvent-Free System

DONG Li-feng¹, WANG Yan¹, XIN Jia-ying^{1,2*}, CHEN Lin-lin¹, XIA Chun-gu²

(1 Key Laboratory for Food Science & Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin, 150076, China;

2 State Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, 730000, China)

Abstract: Lipase-catalyzed synthesis of a new-type of antioxidant in solvent-free system was studied. Using Novozym435 as catalyst, transesterification of ethyl ferulate (EF) with different fatty alcohol to form fatty ferulate in solvent-free system was investigated. According to the yield of transesterification, ethyl ferulate (EF) with oleyl alcohol (OA) was chosen as the optimized substrate. The influences of reaction temperature, the ratio of enzyme to substrate, agitation speed, reaction time, water activity, the molar ratio of substrates, vacuum-rotary evaporation procedure and the stability of enzyme on the yield of oleyl ferulate were studied in detail. The process was optimized for the enzymatic synthesis of oleyl ferulate using a vacuum-rotary evaporation procedure under following conditions: 5.0 mmol oleyl alcohol, 1.0 mmol ethyl ferulate, 70 mg Novozym 435, water activity (a_w) < 0.01, at 60 °C, 200 r/min agitation and 0.001 MPa for 96 h. The optimized conditions applied to the transesterification of ethyl ferulate with oleyl alcohol obtain oleyl ferulate yield of 65%. The enzyme can be reused several times without significant loss of activity.

Key word: ethyl ferulate; fatty alcohol; fatty ferulate; Novozym435 lipase; solvent-free system