

# 非水相脂肪酶催化阿魏酸双甘酯的合成

辛嘉英<sup>1,2</sup>, 郑妍<sup>1</sup>, 吴小梅<sup>2</sup>, 夏春谷<sup>2</sup>, 李树本<sup>2</sup>

(1. 哈尔滨商业大学生物工程系, 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:** 在有机相和无溶剂反应体系中进行不同来源的脂肪酶催化阿魏酸与油酸甘油酯转酯反应的比较研究。通过筛选发现固定化脂肪酶 Novozym435 因其独特的催化专一性减少了副产物, 提高了目标产物的产率。同时研究了不同反应介质对转酯反应的影响, 结果表明在无溶剂反应体系中, Novozym435 脂肪酶催化阿魏酸乙酯与油酸甘油酯的转酯反应目标产物得率较高, 与甲苯作为反应介质的体系相比酶的操作稳定性得到了明显提高。

**关键词:** 阿魏酸; 阿魏酸双甘酯; 脂肪酶; 转酯反应

中图分类号: Q559; TQ225.24

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2006)10-0052-03

## Synthesis of feruloylated diacylglycerols by lipase-catalyzed transesterification in non-aqueous medium

XIN Jia-ying<sup>1,2</sup>, ZHENG Yan<sup>1</sup>, WU Xiao-mei<sup>2</sup>, XIA Chun-gu<sup>2</sup>, LI Shu-ben<sup>2</sup>

(1. Department of Bioengineering, 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:** Feruloylated diacylglycerols was synthesized by various lipases in both organic phase and solvent-free system, and the transesterification reactions in those two different solvent systems were compared. It is found that the high yield and less by-products in the reaction catalyzed by Novozym435 made it a more appropriate catalyst for the transesterification reaction. Comparing with the organic reaction system, the solvent-free system showed its unique predominance as a reaction medium. The Novozym435 lipase catalyzed reaction in a solvent-free system was repeated fifth times with the recycling of enzyme and has good operational stability.

**Key words:** ferulic acid; feruloylated diacylglycerols; lipase; transesterification

阿魏酸是存在于高等植物中的酚类化合物, 因具有多种生理活性而应用在医药、食品及化妆品等领域。但阿魏酸亲水性较强而妨碍了其在油品中的应用及发挥生理功能<sup>[1-4]</sup>。采用酶法催化合成的阿魏酸双甘酯(FDO)是阿魏酸和油酸甘油酯通过酯化反应生成的脂溶性阿魏酸衍生物。它既保持了阿魏酸的生理活性和双甘酯独特的优势, 同时也克服了阿魏酸分子本身亲水性强而难以在油品中发挥其功效的弊端, 可以应用在食品、药品及化妆品行业作为新型天然油脂抗氧化剂和紫外吸收剂<sup>[5-6]</sup>。笔者根据油酸甘油酯在常温下是液态的特点, 将其同时作为底物和反应介质, 即在无溶剂清洁反应体系中酶直接作用于底物, 研究了阿魏酸与油酸甘油酯的转酯反应, 利用酶催化的方法一步生成了阿魏酸双甘

酯。通过与传统的有机相中的酶催化反应的比较发现, 在无溶剂反应体系 Novozym435 催化转酯反应效果比较理想, 在生成的产物中阿魏酸双甘酯为主要产物。

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂及仪器

阿魏酸, 苏州畅通化学试剂有限公司; 油酸甘油酯, 分析纯, 上海第二化学试剂厂; 皱褶假丝酵母脂肪酶 (*Candida rugosa* lipase)、猪胰脂肪酶 (*Porcine pancreas* lipase)、麦胚脂肪酶 (wheat germ lipase)、固定化南极假丝酵母脂肪酶 (Novozym435, *Candida antarctica* lipase), 均产自 Sigma 公司。

HZQ-F160A 高低温恒温摇床, 上海一恒科学仪

收稿日期: 2006-07-13

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-05-0358); 黑龙江省自然科学基金 (B200403); 黑龙江省教育厅基金 (160134), 哈尔滨市科学基金 (2004AFXXJ031)

作者简介: 辛嘉英 (1966-), 男, 博士, 教授, 主要从事生物催化的研究, 0451-84838194, xinjy1966@hotmail.com。

器有限公司;KH-2000型薄层色谱扫描仪;紫外-可见分光光度计,HP8453,采用 BIOSEP SEC2S3000; BURKE 120 HK 红外光谱仪。质谱仪为 Waters ZQ 4000 型,质谱条件:毛细管电压 3 kV;扫描范围 200~900 ( $m/z$ );电离电压 (cone) ES + 10 V、30 V, ES - 10 V、30 V。

## 1.2 实验步骤

### 1.2.1 反应底物阿魏酸乙酯的合成<sup>[7]</sup>

5 g 阿魏酸与 50 mL 无水乙醇在 3 mL 亚硫酸氯催化下,80℃回流加热并连续搅拌 5 h,将反应液转蒸发除去溶剂得到淡黄色油状物质,将其溶于少量乙醚中,用饱和的碳酸氢钠溶液萃取 3 次。旋转蒸发除去乙醚,将得到的液态物质静止至大量的白色结晶析出得到阿魏酸乙酯。

### 1.2.2 不同介质酶促阿魏酸双甘酯的合成

有机相反应体系:25 mL 的三角瓶中加入 2.0 mmol 阿魏酸乙酯、2.0 mmol 油酸甘油酯、有机介质 10 mL,加入 140 mg CRL 脂肪酶、一定量硅藻土,或 220 mg 固定化的 Novozym435 脂肪酶,在不同温度下空气浴振荡反应。反应体系在加酶前用分子筛除水 48 h。

无溶剂反应体系:根据油酸甘油酯为液态的特点同时作为反应底物和介质在 25 mL 三角瓶的中加入 2.0 mmol 阿魏酸乙酯、2.0 mmol 油酸甘油酯、140 mg CRL 脂肪酶和一定量硅藻土,或 220 mg 固定化的 Novozym435 脂肪酶,在不同温度下空气浴振荡反应。反应体系在加酶前用分子筛除水 48 h。

### 1.2.3 产物的 TLC 检测

吸取 2.5  $\mu$ L 样品点样于荧光硅胶板,展层液根据均匀实验设计筛选展开剂体系的最佳溶剂组分<sup>[8]</sup>。各个组分之间的最佳溶剂配比为  $V(\text{苯}):V(\text{乙醚}):V(\text{二氯甲烷}):V(\text{正己烷}) = 3.306:1.655:4.871:0.017$ ,展开方法为上行法,展开距离 14 cm,检测波长 254 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应介质及脂肪酶的筛选

选择不同来源的脂肪酶(采用近似活性的使用量),在不同有机介质(仅考察  $0.2 < \text{Lg}P < 3$  的有机

溶剂,因为有机溶剂  $\text{Lg}P < 0.2$  时,脂肪酶失活;有机溶剂  $\text{Lg}P > 3$  时阿魏酸乙酯在有机相中析出)和无溶剂体系催化转酯反应( $P$  表示一种有机溶剂在正辛醇和水两相溶液中的分配系数)。以阿魏酸乙酯是否减少判断脂肪酶有无催化活性。反应条件为阿魏酸乙酯与油酸甘油酯的底物摩尔比为 1:1、温度 50℃、转速 180r/min、反应 120 h,结果如表 1。

表 1 不同脂肪酶在不同反应介质中催化转酯反应相对活性

反应介质	$\text{Lg}P$	酶的相对活性			
		Novozym435	CRL	PPL	WGL
丙醇	0.28	-	-	-	-
四氢呋喃	0.49	-	-	-	-
丁醇	0.81	-	-	-	-
苯	1.98	+	-	-	-
四氯化碳	2.02	-	+	-	-
氯仿	2.21	-	-	-	-
甲苯	2.53	+	+	-	-
辛醇	2.89	-	-	-	-
无溶剂		+	+	-	-

从表 1 可以看出 Novozym435 脂肪酶和 CRL 脂肪酶在甲苯和无溶剂反应体系中同时具有催化反应的活性,为比较 2 种脂肪酶在不同介质反应的催化效果分别选择这 2 种体系做进一步的研究。由于 Novozym435 脂肪酶和 CRL 脂肪酶具有不同的位置专一性,根据阿魏酸乙酯的减少仅仅可以判断是否发生转酯反应(或水解反应),而不能确定生成产物即为目标产物。所以必须对生成物进行进一步的分析判断。

### 2.2 脂肪酶不同位置专一性的影响

脂肪酶的位置专一性是指脂肪酶区分油酸甘油酯 2 个外部位置(第一酯键)和内部位置(第二酯键)的能力<sup>[9]</sup>,根据脂肪酶位置专一性不同催化转酯反应所得的产物应有区别。将实际反应 2 种脂肪酶催化的反应液分别离心滤去酶后进行薄层层析扫描得到不同的扫描图,可以发现在 CRL 脂肪酶催化的反应 5.5~12.5 cm 之间共有 5 种物质的吸收峰,对照红外、质谱和紫外光谱,推测其依次为阿魏酸、2-阿魏酸甘油酯、阿魏酸单甘酯或其异构体、阿魏酸乙酯

(上接第 51 页)

[9] Gaynor S G, Matyjaszewski K. Step-growth polymers as macroinitiators for "living" radical polymerization: synthesis of ABA block copolymers [J]. *Macromolecules*, 1997, 30: 4241 - 4243.

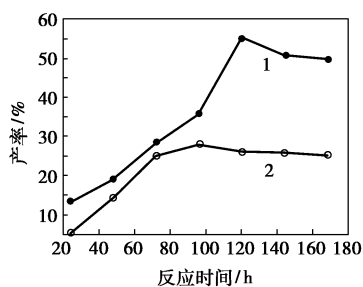
[10] Fatiha C, Maryam T, Severian D, et al. In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(1): 107 - 116.

[11] 卢从华, 罗传秋, 曹维孝. 壳聚糖的改性及其应用 [J]. *高分子通报*, 2001(12): 46 - 53. ■

和阿魏酸双甘酯,而 Novozym435 催化的反应产物与 CRL 催化相比少了第 2 号吸收峰(阿魏酸甘油酯),与理论推测基本一致。Novozym435 脂肪酶与 CRL 相比确实减少了副产物种类,以下将考察在不同介质对 Novozym435 催化转酯反应的影响。

### 2.3 甲苯和无溶剂体系对转酯反应的影响

在甲苯和无溶剂体系(50℃)分别进行 Novozym435 脂肪酶催化阿魏酸乙酯与油酸甘油酯转酯反应,根据阿魏酸双甘酯的生成量选择较理想的反应介质。从图 1 可看出甲苯作为介质的体系中反应 96 h 时生成阿魏酸双甘酯的量相对较高,此后略有减少。与其对应在无溶剂反应体系中阿魏酸双甘酯在 120 h 时产量较高,与甲苯中反应达到最高含量相比多用 24 h。这可能是因为反应在无溶剂体系中进行与在甲苯中反应相比黏度较高,需要克服传质阻力时间较长。尽管如此,在无溶剂体系生成阿魏酸双甘酯的量明显要高于在有机相甲苯中进行的。笔者认为转化率高是因为无溶剂体系中底物浓度大的缘故。在 2 种反应体系中达到各自生成目标产物含量最高时均又略有降低,可能是反应时间较长导致部分产物自身发生水解。通过比较发现在无溶剂体系中反应目标产物的产率高于甲苯中反应,而且可以通过提高温度来减小底物黏度并克服扩散传质阻力,减少反应时间。



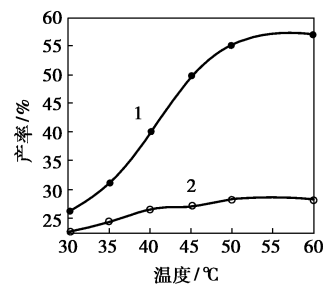
1—无溶剂;2—甲苯为溶剂

图 1 不同反应介质对转酯反应 FDO 生成量随时间变化的关系

### 2.4 反应温度对转酯反应的影响

通过实验发现随着温度的增加,在甲苯中反应的目标产物增加的量较为缓慢而在无溶剂体系中目标产物急剧增加(如图 2)。较高的反应温度可以降低无溶剂体系下传质黏度,加快底物分子热运动的速度,提高由反应体系向固定化酶表面运动的传质系数。适当提高反应的温度,可提高酶的活性,有助于反应向正反应方向进行;另一方面,过高的反应温度使酶活降低并减少酶的使用寿命。实验发现,至

少在 50℃还没有发现酶活力的丧失,主要是由于在几乎无水的反应体系中,由温度引起的热失活被大大削弱了,这是无溶剂体系酶催化反应的一个显著优点。当温度继续增加时产物增加缓慢,同时底物阿魏酸乙酯水解加剧。综合考虑反应温度 50℃为宜。

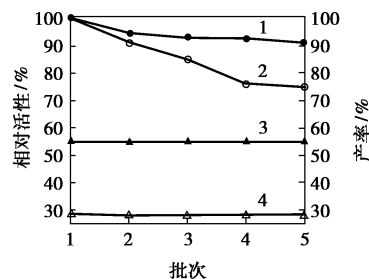


1—无溶剂;2—甲苯为溶剂

图 2 不同温度对阿魏酸双甘酯产率的影响

### 2.5 不同反应介质中酶操作稳定性及目标产物含量的比较

在甲苯与无溶剂反应体系分别进行脂肪酶催化阿魏酸乙酯与油酸甘油酯转酯的反复批式反应,考察脂肪酶的操作稳定性及 FDO 含量的变化,结果见图 3,表明 Novozym435 在无溶剂反应体系中催化反应与在甲苯中反应相比有相对较高的操作稳定性,同时发现在 2 种体系批式反应过程中 FDO 的含量并没有随着酶活性降低而发生变化。



1—相对活性(无溶剂);2—相对活性(甲苯为溶剂);  
3—产量(无溶剂);4—产量(甲苯为溶剂)

图 3 Novozym435 脂肪酶在不同反应介质中操作稳定性及产物含量变化的比较

## 3 结语

Novozym435 催化阿魏酸乙酯与油酸甘油酯的转酯反应在无溶剂反应体系中能有效进行。无溶剂反应体系保证了酶的活性及操作稳定性,在不同批次反应中并未因为脂肪酶周围环境的变化而影响其作用底物专一性的选择。在无溶剂体系用酶法合成的阿魏酸双甘酯含量超过了阿魏酸单甘酯,成为主要

(下转第 56 页)

生产的 LPG 经气体分离后的 C<sub>4</sub> 组分,其组成如表 2 所示。

表 1 HZSM-5 催化剂的物性参数

比表面积/ m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	孔体积/ cm <sup>3</sup> ·g <sup>-1</sup>	最可几孔 半径/nm	堆密度/ kg·m <sup>-3</sup>	压碎强度(径向)/ N·cm <sup>-1</sup>
285	0.28	1.92	695	132

表 2 试验原料(LPG)组成 %

	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>5+</sub>
摩尔分数	0.06	0.28	1.95	62.06	32.03	3.62

## 1.2 工艺条件及物料平衡

GTA 的工艺研究是在装有 100 mL 催化剂的固定床中试装置上进行的<sup>[8]</sup>,试验工艺条件如表 3 所示,产品物料平衡列于表 4。

表 3 GTA 中试工艺条件

反应温度/℃	质量空速/h <sup>-1</sup>	反应压力/MPa	反应时间/d
530	0.25	0.10	9

表 4 产品物料平衡 %

	气体		液体					
	干气(H <sub>2</sub> )	液化气	C <sub>5</sub>	苯	甲苯	乙苯	二甲苯	重芳烃
质量分数	21.2(2.4)	25.6	1.0	10.5	22.0	0.8	13.1	5.8

从表 4 可知,液体产品除 C<sub>5</sub> 组分外均为芳烃,因此液体产品经脱戊烷后,不需芳烃抽提即可得到苯、甲苯和二甲苯(含乙苯)等产品。C<sub>5</sub> 组分和重芳

烃可作为高辛烷值汽油的调和组分或另作他用。

## 2 工程开发

### 2.1 技术方案的选择

以液化气为原料生产芳烃的试验结果表明,催化剂因生焦而快速失活,单程运行周期仅 10 天左右就需对催化剂进行烧焦再生。对此,有以下 3 种工艺方案可供选择:

(1)固定床间歇再生方案。利用 1 台或 2 台串联的反应器,当反应进行一段时间,催化剂活性明显下降后停止进料,通入再生气体进行催化剂烧焦再生,催化剂再生结束后再切换为反应操作,如此进行反应、再生循环。该工艺的特点是流程简单、设备少,但是切换频繁,操作不稳定,且催化剂利用率低。

(2)固定床循环再生方案。设置 4 台反应器,每 2 台为一组,轮换操作,2 台装置用于反应、2 台装置用于再生,达到连续反应的目的。该方案的特点是反应、再生均能连续进行,装置操作和产品质量都比较稳定,催化剂利用率高;但与第 1 种方案相比,工艺流程较为复杂,并且增加了设备投资。

(3)移动床连续再生方案。采用类似移动床连续重整的方案,催化剂被连续送入再生系统,再生后连续送至反应系统。该方案的特点是反应和再生工序均连续操作,装置开工率高,操作稳定,产品质量好,催化剂利用率高,但是工艺流程复杂,投资大。

比较上述 3 种工艺方案,固定床循环再生方案具有投资少,开工率高,产品质量相对稳定等优点,比较适合较小规模的装置。作为 10 万 t/a 工业装

(上接第 54 页)

产物,大大超过了目前化学方法合成双甘酯的量。但是目前对生成的混合物仍然需要分子蒸馏这样设备投资大、成本高的方法<sup>[10]</sup>,采用更简单的方法提高阿魏酸双甘酯的产率,同时能够找到更加简单的方法将混合物分离是需要解决的问题。

## 参考文献

- [1] Tsuno T, Kadota M. Application to the cosmetics as an ultraviolet ray absorbent of ferulic acid[J]. *Fragrance Journal*, 2002, 30(7):137-74.
- [2] Asao H. Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on cyclooxygenase-2 promoter activity[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10(4):1189-196.
- [3] National Institute of Advanced Industrial & Technology. Animal cell cyclic AMP level increasing agent or cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor comprising polymer of ferulic acid: JP, 2002003386 [P]. 2002-09-01.
- [4] Giuliani S, Piana C, Setti L, et al. Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23:325-331.
- [5] Meng X H, Sun P L, Yang K, et al. Synthesis of diacylglycerol using immobilized 1,3-regiospecific lipase in continuously operated fixed bed reactors[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(3):425-429.
- [6] David L, Joseph A, Laszlo et al. Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters[J]. *JAACS*, 2000, 77(5):513-519.
- [7] Wang R T, Zhou S Y, Liu L N, et al. Improved synthesis of ethyl ferulate[J]. *China New Medicine*, 2004(3):2.
- [8] Ban Y D, Sun Y Q, Wang Y P. The optimization of the thin-layer chromatography solvent system for sulfa drugs[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 1992, 10:103-105.
- [9] Nie R, Xu Y, Wang D. Progress in improving the asymmetric enantioselectivity of lipase for catalyzing asymmetric reaction[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2002, 2(6):570-576.
- [10] Liu S L, Bi Y L, Yang T K. Synthesis of monoglycerides and their application[J]. *Journal of Cereal & Oils*, 2001, 11:30-31. ■