

脂肪酶催化的丁基苯酐的酰化反应的研究*

何腊平¹, 孙 颖^{1,2}, 徐 岩¹, 孙志浩¹

1 (江南大学生物工程学院教育部工业生物技术重点实验室, 江苏无锡, 214122)

2 (中国食品发酵工业研究院, 北京, 100027)

摘 要 在正己烷溶剂中脂肪酶 Novozym 435 可催化丁基苯酐的酸解和转酯化反应。对于酸解反应, 可以用饱和盐溶液预平衡法或者直接加水合盐来控制反应体系的水活度, 最适水活度为 0.62, 相应的丁基苯酐的转化率为 15.9%。对于转酯化反应, 适宜的反应体系是加水合盐到反应体系中, 最适水活度亦为 0.62, 相应的丁基苯酐的转化率为 49.4%。而且 Novozym 435 对外消旋的丁基苯酐具有拆分效果。

关键词 丁基苯酐, Novozym 435, 酸解, 转酯化, 水活度

3-丁基苯酐(NBP)又称 3-丁基-1(3H)异苯并呋喃酮, 是一种内酯。内酯的酰化是一类重要的化学反应, 具有广泛的应用, 如制备一些重要的化合物^[5]和拆分外消旋酯^[6, 7]。然而, 丁基苯酐的酶法酰化不管是用生物法还是化学法都没有报道。与化学法相比, 酶法酰化具有反应条件温和、高效和环境友好等优点。所以有必要对丁基苯酐的酶法酰化进行研究。而脂肪酶是一类底物范围宽且性质稳定的酶, 主要应用在水解, 酯化, 酰化反应中^[8]。对于酰化反应, 可以有有机酸作酰基供体的酸解反应或者以烯酯作酰基供体的转酯化反应。由于酶常常在疏水性有机介质中活性较高, 然而疏水性如果太强可能反而不利于酶活, 所以在本研究中我们选择正己烷为有机介质。

众所周知, 在酶的有机相介质催化中, 有机介质中的水活度是一个重要影响参数^[9]。水被认为是增加酶分子的柔性从而增大酶活力^[10]。然而, 高的水活度常常推动酰化反应向逆反应进行, 所以如何控制有机介质体系中的水活度就很关键。控制有机介质体系中的水活度有 2 个常用方法: 饱和盐的蒸汽预平衡法^[11]和直接加水合盐^[12, 13]到有机介质体系中去。

在本研究中, 研究了在正己烷介质中脂肪酶催化丁基苯酐的酰化可行性, 而且重点研究了控制水活度的 2 个方法对酰化的影响。

1 材料和方法

1.1 脂肪酶和化学试剂

(RS)-丁基苯酐(纯度大于 98%)由石家庄制药集团恩必普公司合成赠送, Novozym 435 (*Candida*

antarctica lipase B, immobilized on macroporous acrylic resin)由丹麦诺维信公司赠送, 其余化学试剂均为分析纯。

1.2 酶法反应

1.2.1 饱和盐蒸汽预平衡法

在反应前, 固定化酶和正己烷都分别用饱和盐溶液的蒸汽在密闭的容器中 25℃平衡 3 d。反应混和物由 1.9 mL 正己烷, 10 μL 丁基苯酐, 0.1 mL 乙酸乙烯酯(或乙酸), 和 0.06 g 脂肪酶(或 0.03 g Novozym 435)。反应混和物在 10 mL 密闭试管中 25℃和 150 r/min 反应 48 h。

1.2.2 直接加水合盐法

在反应前, 固定化酶和正己烷都分别用水合盐的蒸汽在密闭的容器中 25℃平衡 3 d。反应混合物由 1.9 mL 正己烷溶剂, 30 mg 水合盐, 10 μL 丁基苯酐, 0.1 mL 乙酸乙烯酯(或乙酸), 和 0.06 g 脂肪酶(或 0.03 g Novozym 435)。反应混和物在 10 mL 密闭试管中 30℃和 150 r/min 反应 48 h。

以上每个反应重复 3 次, 数据取试验平均值, 最大偏差<5%。

1.3 分析方法

丁基苯酐的含量采用气相色谱内标法, 根据丁基苯酐的浓度变化来计算其转化率。气相色谱仪(Agilent 6880, Agilent Technologies Company Ltd., Shanghai, China)GC, 配备 FID 监测器, 使用聚乙烯乙二醇柱(polyethylene glycol column, AC20, 30 m × 0.22 mm × 0.25 μm, SGE International Pty. Ltd., Australia)。检测器和 FID 温度都为 250℃, 起始温度 50℃, 接着以 10℃/min 的速度升温, 终温为 220℃保持 13 min, 载气为氮气(1.1 mL/min), 分馏比 20:1。

第一作者: 博士研究生。

*教育部长江学者和创新团队发展计划(编号: IRT0532)

收稿日期: 2007-07-09, 改回日期: 2008-01-16

1.4 旋光分析

转化液的旋光度以微量旋光仪(P-1020, JASO Corporation, Japan)检测。

2 结果和讨论

2.1 脂肪酶催化的丁基苯酐的酰化反应

表 1 不同来源的脂肪酶对丁基苯酐酰化的影响

脂肪酶		PPL	Novozym 435	AK	AY	PS	PS-C
转化率	酸解	1.3	12.1	— ^b	2.5	1.6	3.2
/%	转酯化	4.1	31.7	—	9.6	5.3	10.7

注：“—”指未检测到转化。

结果(见表 1)显示,脂肪酶 Novozym 435, PPL, PS, PS-C 和 AY 都能催化转化丁基苯酐(包括乙酸和乙酸乙烯酯分别参与反应体系的反应),然而只有 Novozym 435 的酶促酰化表现出了相对较高的转化率。因此,在随后只研究 Novozym 435 的酶促酰化反应。

2.2 反应体系水活度的不同控制方法对酰化的影响

2.2.1 饱和盐溶液蒸汽预平衡控制体系的起始水活度对酰化的影响

实验采用 LiBr ($a_w=0.06$), LiCl ($a_w=0.11$), KAc ($a_w=0.25$), $MgCl_2$ ($a_w=0.33$), K_2CO_3 ($a_w=0.43$), $Mg(NO_3)_2$ ($a_w=0.54$), NaCl ($a_w=0.75$) 和 K_2SO_4 ($a_w=0.97$)^[15] 饱和盐溶液。

从图 1 可见,对于酸解反应,当体系中的起始水活度 <0.54 时,丁基苯酐的转化率随着水活度的增大而增大直到达到最大值 14.9%;但是当体系中的起始水活度 >0.54 时,丁基苯酐的转化率随着起始水活度的增大而减小。因此,最适起始水活度是 0.54。

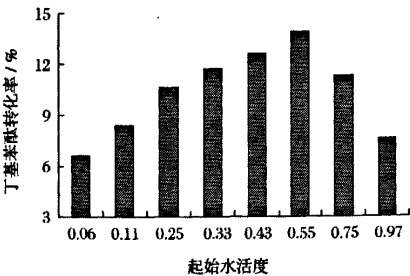


图 1 起始水活度对酸解的影响

图 2 表明,对于转酯化反应,丁基苯酐的转化率随着初始水活度的升高而增大,但转化率不高。

2.2.2 直接加水合盐控制水活度对酰化的影响

实验采用水合盐 LiCl · H₂O ($a_w=0.023$), Cu-

对几种不同来源的脂肪酶(已在商业上广泛应用)对丁基苯酐进行了催化转化,直接加 CuSO₄ · 5H₂O ($a_w=0.35$)^[14] 控制体系的水活度。

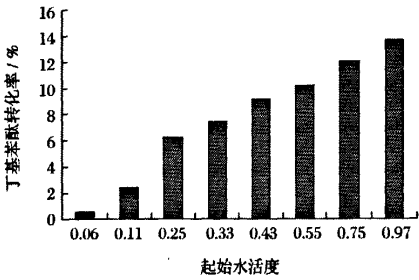


图 2 起始水活度对转酯化的影响

SO₄ · 5H₂O ($a_w=0.35$), ZnSO₄ · 7H₂O ($a_w=0.62$) 和 Na₂HPO₄ · 12H₂O ($a_w=0.85$)^[14]。

由图 3 可见,该体系与饱和盐溶液蒸汽预平衡控制体系的起始水活度对酸解的影响作用相似,丁基苯酐的转化率亦是随着直接加水合盐控制的水活度的增大而增大,在水活度为 0.62 时达到最大值 15.9%,以后减小。

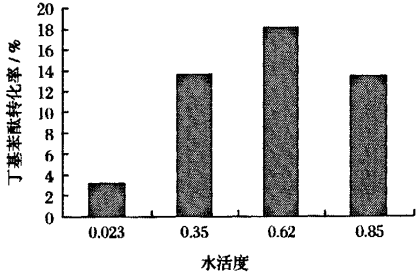


图 3 水合盐控制下的水活度对酸解的影响

从图 4 同样可以看出,当体系中的起始水活度 <0.62 时,丁基苯酐的丁基苯酐的转化率随着水活度的增大而增大,最大值 49.4%;但是当体系中的起始水活度 >0.62 时,丁基苯酐的转化率随着起始水活度的增大而减小。

2.2.3 水合盐体系对酸解的影响作用

表 2 表明,只要反应达到预平衡,反应体系是否

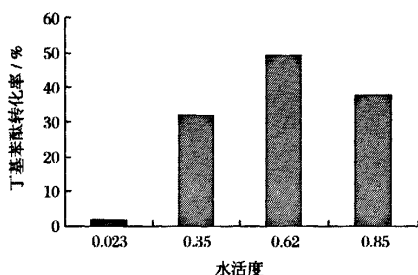


图4 水合盐控制下的水活度对转酯化的影响

添加水合盐对丁基苯酯的酸解转化的影响不大或者说基本上无影响。这主要是由于即使没有直接加盐

表2 水合盐体系下酸解反应的丁基苯酯的转化率的比较

水合盐	用水合盐的蒸汽预平衡, 体系中不加水合盐	直接用水合盐预平衡, 体系中加入水合盐
	丁基苯酯的转化率 / %	丁基苯酯的转化率 / %
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($a_w=0.35$)	11.7	11.5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($a_w=0.62$)	15.6	15.9
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($a_w=0.85$)	12.1	12.3

表3 水合盐体系下转酯化反应的丁基苯酯的转化率的比较

水合盐	用水合盐的蒸汽预平衡, 体系中不加水合盐	直接用水合盐预平衡, 体系中加入水合盐
	丁基苯酯的转化率 / %	丁基苯酯的转化率 / %
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($a_w=0.35$)	7.6	31.7
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($a_w=0.62$)	10.8	49.4
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($a_w=0.85$)	12.9	37.6

2.3 转化液的旋光检测

以上的各反应中,丁基苯酯的转化率都低于50%,有可能是Novozym 435在催化丁基苯酯的酯化反应的同时酯具有拆分作用。因此采用微量旋光仪对转化后的转化液微滤膜过滤然后检测旋光度,同时做对照实验进行了初步分析。反应条件为:反应前正己烷溶剂和脂肪酶分别用 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的蒸汽在密闭容器中预平衡3 d,反应混和物由57 mL干的正己烷、300 μL 丁基苯酯(或不添加)、3 mL 乙酸乙酯、0.3 g 水合盐 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.3 g Novozym 435组成。反应混和物在150 mL 密闭三角瓶中30 $^{\circ}\text{C}$ 和150 r/min反应48 h。结果显示对照组(未加丁基苯酯转化)的旋光度为0,而转化组(加外消旋的丁基苯酯进行转化)转化液的旋光度为-0.0123,表明Novozym 435确实对丁基苯酯具有拆分效果,这与Novozym 435对仲醇具有很强的拆分能力的报道^[16,17]相一致。由于左旋的丁基苯酯起主要作用,而用生物法对丁基苯酯进行拆分尚未见报道,所以有待对此进行深入研究。

3 结论

在催化丁基苯酯酯化(包括酸解和转酯化)的脂

到反应体系,但是由于酸解反应不需要水作为化学计量的反应物参与反应,所以反应自始至终也维持水活度不变。

2.2.4 水合盐体系对转酯化的影响作用

由表3可见,体系中是否加盐对丁基苯酯的转酯化有重要影响。当体系中不加盐时,丁基苯酯的转化率都不高;而当体系中加盐时,丁基苯酯转化率大幅度提高,且用水合盐 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 时的转化率达到最大值49.4%。说明对于丁基苯酯的转酯化体系中适宜添加水合盐,且用水合盐 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 较佳。

肪酶Novozym 435, PPL, PS, PS-C和AY中,只有Novozym 435表现出了高得多的催化效率。水活度对反应有重要的影响,用饱和盐溶液分别预平衡溶剂(包含反应物)和脂肪酶适合于丁基苯酯的酸解反应,适宜的水活度为0.62;而直接加水合盐到反应体系更适合于丁基苯酯的转酯化反应,反应的最适水活度为0.62。而且初步分析表明,Novozym 435对丁基苯酯具有对映异构选择性,为生物法拆分丁基苯酯的深入研究奠定了基础。

参考文献

- Barton D H R, Vries J X D. The constitution of sedanolide[J]. J Chem Soc, 1963, (2): 1 916~1 919
- MacLeod A J, MacLeod G, Subramanian G. Volatile aroma constituents of celery[J]. Phytochemistry, 1988, 27 (2): 373~375
- Zhu X Z, Li X Y, Liu J. Recent pharmacological studies on natural products in China[J]. European Journal of Pharmacology, 2004, 500: 221~230
- Qing C, Wang X L. Effects of chiral 3-n-butylphthalide on apoptosis induced by transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24 (8): 796~804
- Namekawa S, Suda S, Uyama H, et al. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactones to polyesters and its mechanistic Aspects[J]. International Journal of Biologi-

- cal Macromolecules, 1999, 25: 145~151
- 6 Brown S A, Parker M-C, Turner N J. Dynamic kinetic resolution: synthesis of optically active α -amino Acid derivatives[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2000, 11: 1 687~1 690
 - 7 Kondaveti L, F T Al-Azemi, et al. Lipase-catalyzed solvent-free kinetic resolution of substituted racemic E-Caprolactones[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2002, 13: 129~135
 - 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的研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(4): 21~24
 - 9 Páez B C, Medina A R, Rubio F C, et al. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33: 845~853
 - 10 Schmitke J L, Wescott C R, Klivanov A M. The mechanistic dissection of the plunge in enzymatic activity upon transition from water to anhydrous Solvents[J]. J Am Chem Soc, 1996, 118 (14): 3 360~3 365
 - 11 Matsumoto M, Odachi D, Kondo K. Kinetics of ring-opening polymerization of lactones by lipase[J]. Biochem Eng J, 1999, (4): 73~76
 - 12 Zhou R, Xu J H. Enantioselective synthesis of (S)- n -cyano-3-phenoxylbenzyl alcohol by lipase-catalyzed alcoholysis of racemic Ester in organic Medium[J]. Bio Chem Eng J, 2005, 23: 11~15
 - 13 Bai S, Guo Z, Liu W, et al. Resolution of (±)-menthol by immobilized candida rugosa lipase on superparamagnetic nanoparticles[J]. Food Chemistry, 2006, 96: 1~7
 - 14 Alston M J, Freedman R B. A Comparison of Lipase-catalysed ester and lactone synthesis in low-Water systems: analysis of optimum water activity. Biotechnol[J]. Bioeng, 2002, 77 (6): 641~650
 - 15 Persson M, Costes D, Wehtje E, et al. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30: 916~923
 - 16 Gustafsson J, Sandström J, Sterner O. enantioselective esterification of 5-hydroxy-2-methyl-6- (diethoxy-methyl)-1-cyclohexenecarbaldehyde. synthesis of both enantiomers of 6-methylbicyclo[4. 1. 0]hept- 2-Ene-1,2-eicarbaldehyde[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1995, (6): 595~602
 - 17 Rotticci D, Orrenius C, Hult K, et al. Enantiomerically enriched bifunctional sec-Alcohols prepared by *Candida Antarctica* Lipase B Catalysis[J]. Evidence of Non-Steric Interactions. Tetrahedron: Asymmetry, 1997, 8 (3): 359~362

The Study on the Acylation of 3-n-butylphthalide Catalyzed by Lipase

He Laping¹, Sun Jiong^{1, 2}, Xu Yan¹, Sun Zhihao¹

1 (Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education & School of Biotechnology, Jiangnan University, 1800 Lihu Road, Wuxi 214122, China)

2 (China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

ABSTRACT Lipase Novozym 435 could catalyze acidolysis and transesterification of 3-n-butylphthalide in hexane. The ways to control water activity by preequilibration with saturated salt solution and direct addition of salthhydrate were all available for the acidolysis of 3-n-butylphthalide. The optimum water activity was 0.62 and corresponding conversion of 3-n-butylphthalide was 15.9% for the acidolysis. The suitable reaction system was direct addition of salthhydrate to the reaction system of transesterification of 3-n-butylphthalide. The optimum a_w was also 0.62 and corresponding conversion of 3-n-butylphthalide was 49.4% for the transesterification. Furthermore, resolution of racemic 3-n-butylphthalide could be catalyzed by Novozym 435.

Key words 3-n-butylphthalide, Novozym 435, acidolysis, transesterification, water activity

我国18项食品包装袋规范2008年9月1日起实施

我国第一个规范包装用复合膜、袋的通则类国家标准将于2008年9月1日起实施,这项标准确定了判定复合膜、袋产品质量的18项要求。

该标准对产品外观质量的要求是:不应有划伤、烫伤、穿孔、异味、粘连、异物、分层、脏污;热封部位无虚封、平整、无明显气泡;搬动时不出现膜间滑动;答应有不影响使用的稍微暴筋;膜卷端面不平整度 $\leq 3\text{mm}$ 。同时,标准的检验规则要求食品包装复合膜、袋必须检测外观质量、规格、拉断力、热合强度、剥离力、卫生性能6项指标,其余各项由供需双方商定。