

# 有机介质中酶催化合成己酸乙酯的研究

曾家豫<sup>1,2</sup>, 周兴辉<sup>1</sup>, 张继<sup>1,2</sup>, 唐功<sup>1</sup>, 高亚娟<sup>1</sup>

(1.西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070; 2.甘肃省高分子材料重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 本实验研究了有机介质中 CRL 脂肪酶催化己酸与无水乙醇合成己酸乙酯的酯化反应条件, 并利用红外光谱、GC-MS、气相色谱等现代方法对合成的产物进行了表征。结果显示, 合成的产物为己酸乙酯, 其纯度为 96.91%, 分子量 144。酯化反应在以正庚烷为反应介质, 反应温度为 311K, 己酸与无水乙醇的摩尔比为 1:1.3, 己酸浓度为 0.2mol/L 的条件下, 反应 24h 后, 转化率达到 94.6%。

**关键词:** 脂肪酶; 己酸乙酯; 有机介质; 酯化反应

## Study on Enzymatic Synthesis of Ethyl Caproate in Organic Medium

ZENG Jia-yu<sup>1,2</sup>, ZHOU Xing-hui<sup>1</sup>, ZHANG Ji<sup>1,2</sup>, TANG Gong<sup>1</sup>, GAO Ya-juan<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China;

2. Key Laboratory of Polymer Materials of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The synthesis of ethyl caproate catalyzed by candida rugosa lipase (CRL) in organic solvents was investigated, and the effects of reaction time, organic solvent, substrate concentration, and the molar ratio of acid to alcohol on ethyl caproate synthesis were examined systematically. Moreover, the structure, purity and molecular weight of the synthesized product were also characterized by IR, GC and GC-MS. The experimental results showed that the synthesized product is ethyl caproate, its molecular weight is 144, and its purity reaches 96.91%. When the esterification is carried out with the molar ratio of acid to ethanol of 1:1.3 at 38 °C for 24 h by using n-heptane as reaction medium, the yield of the esterification reaches 94.6%.

**Key words:** lipase; ethyl caproate; organic medium; esterification

中图分类号: TS264.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)06-0123-05

己酸乙酯常用作烟草香精, 也是浓香型曲酒的主体香味成分。己酸乙酯不仅用途广泛, 用量也较大, 仅浓香型白酒用的己酸乙酯产量在全国就达 3000 吨左右, 产值上亿<sup>[1]</sup>。目前已酸乙酯的生产通常采用化学合成法, 即在无机催化剂存在下进行合成, 如用硫酸或对甲苯磺酸作催化剂<sup>[2]</sup>进行合成。但是化学合成法存在诸多缺点, 比如副反应多, 后处理困难, 产品质量低等。近年来, 通过生物催化合成短链芳香酯已成为研究热点, 多种低分子量芳香酯已成功合成<sup>[3-5]</sup>。生物方法生产的芳香酯在美国的联邦法规和许多文献中都被认为是天然产物<sup>[6-7]</sup>。生物合成酯的方法主要有两种, 第一种方法是微生物合成法, 这种方法也存在着产物浓度低, 生产周期较长, 且产品不易分离等缺点, 较难适应大规模的工业生产<sup>[8]</sup>。第二种方法是酶催化合成法, 这是一种适合工业化生产的合成途径。酶能在常温、常压、

中性 pH 值等温和条件下高度专一有效地催化底物发生反应<sup>[9]</sup>。常温、常压、pH 值接近中性的条件对设备要求不高, 能耗也低, 符合国家大力提倡的降能减污的要求。另外酶法生产副反应少, 产生的三废也很少, 对环境友好。目前, 酶法合成己酸乙酯发展迅速, 1991 年荷兰的 Uniochem International 公司推出“Bioester”的系列生物酯商品<sup>[10]</sup>, 批次生产规模已上几吨。国内也开始关注这方面的研究<sup>[11]</sup>。

脂肪酶在有机相中催化化学反应也是近来发展起来的新技术, 1985 年, Klivanov 等<sup>[12]</sup>发现脂肪酶在近乎无水的环境下仍然可以表现出一定的催化活性, 基于此, 脂肪酶在有机相中催化得到了迅速的发展。现在, 它已经被广泛应用于有机合成、食品、精细化工甚至分析检测领域中<sup>[13-15]</sup>, 体现出了巨大的优势。

本实验主要研究加酶量、有机介质、底物浓度、

收稿日期: 2008-06-02

基金项目: 甘肃省教育厅科研项目(0601-28; 0501B-16)

作者简介: 曾家豫(1963-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物催化。E-mail: zengjy@nwnu.edu.cn

物料比和反应时间等因素对酶催化法合成己酸乙酯的影响,探讨和优化酶催化反应条件,以期提高酶催化法合成己酸乙酯的转化率。并利用红外光谱、GC-MS 定性检测等手段对合成的产物进行表征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

假丝酵母玫瑰脂肪酶(*Candida rugosa* lipase type VII, EC3.1.1.3) Sigma 公司。

乙醇、正己酸(分析纯) 天津信达试剂公司;其他试剂均为分析纯或化学纯。所有试剂使用前都用 3A 分子筛处理,使其脱去水分。

#### 1.1.2 仪器与设备

NEXUS 670型傅立叶变换红外光谱仪(FT-IR) 美国 Nicolet 公司; HP5890GC-5988MS 色质联用仪 美国惠普(HP)公司; GC-2010 气相色谱仪 日本岛津公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酯化反应

取 100ml 的具塞三角瓶,在瓶中加入一定量的正己酸、乙醇和 15ml 正庚烷及酶粉组成反应体系(体系中己酸和乙醇的浓度分别为 0.2、0.26mol/L),在 311K, 150r/min 的条件下旋转振荡反应 24h,每隔 6h 取样检测。

#### 1.2.2 脂肪酶活力的测定

脂肪酶的水解活性采用乳化橄榄油法测定<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.3 酯化反应转化率的测定

采用中和滴定法,定时吸取一定量的反应液,过滤,准确移取 0.5ml 加入到 50ml 锥形瓶中,加 10ml 水稀释。然后加两滴酚酞指示剂,用 0.025mol/L NaOH 滴定,记录消耗的 NaOH 体积( $V_1$ )。移取尚未反应的溶液 0.5ml,用同样方法测定反应前溶液消耗的 NaOH 体积  $V_0$ ,并计算酯合成转化率。

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

#### 1.2.4 产物的分离纯化

将反应液收集,抽滤除去反应液中的酶粉。然后向滤液中加入 0.06mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液,混匀之后将混合液加入到分液漏斗中,静置、分层,除去下层溶液,保留上层液。这样连续操作 2~3 次,除去残余的己酸和乙醇,剩余的溶液即为正庚烷和己酸乙酯。大气压  $1.0 \times 101.325\text{kPa}$ ,温度  $100^\circ\text{C}$ ,使用硅油浴加热,为使硅油受热均匀,采用电磁搅拌器搅拌,在单口圆底蒸馏烧瓶中加入上述剩余的溶液,然后进行精馏,得到产品己酸乙酯,当温度升高到  $100^\circ\text{C}$  以上时停止精馏。

#### 1.2.5 产物表征

#### 1.2.5.1 气相色谱-质谱分析

采用 HP5890GC-5988MS 色质连用仪,色谱柱 HP-5 ( $50\text{m} \times 0.25\text{mm}$ ,  $320\mu\text{m}$ ),接口温度  $250^\circ\text{C}$ ,离子源温度  $210^\circ\text{C}$ ,电离方式 EI,扫描质量范围(质荷比)33~500amu。

#### 1.2.5.2 红外光谱分析

采用溴化钾压片法。

#### 1.2.5.3 气相色谱分析

采用 GC-2010FID 检测器; SE-30 毛细管柱( $15\text{m} \times 0.25\text{mm}$ ,  $0.25\mu\text{m}$ );载气为氮气(纯度 99.99%);检测器温度  $180^\circ\text{C}$ ,柱温  $120^\circ\text{C}$ 。

$$\text{纯度}(\%) = \frac{\text{样品乙酸乙酯峰面积百分比}}{1 - \text{溶剂正庚烷峰面积百分比}} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 加酶量对酶催化酯合成反应的影响

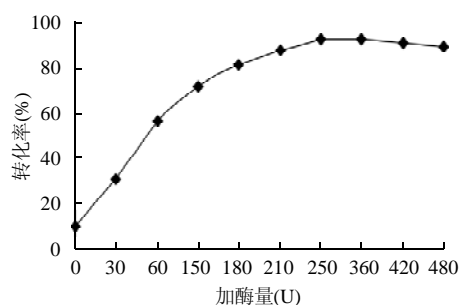


图1 加酶量对酶催化酯化反应的影响  
Fig.1 Effects of CRL amount on esterification

图1为在以 15ml 庚烷作溶剂,己酸浓度为 0.20mol/L,己酸与乙醇摩尔比为 1:1.3, 311K 时反应 24h 的结果。在酶量较少(少于 250U)时随着加酶量的增大转化率逐渐升高,在酶量达到(250U)后转化率达到最大,随着酶量的增加,转化率不再升高。这是由于在酶含量较低时,底物相对酶比较充足,酶被充分利用,底物迅速转化为产物,故转化率随着酶量的增加而增加;当酶量增加到一定的量(大于 250U)时,酶相对于底物过剩,转化率不再升高。

### 2.2 底物浓度对酶催化酯合成反应的影响

表1 底物浓度对酶催化反应的影响

Table 1 Effects of concentration of caproic acid and ethanol (their concentration ratio is 1:1) on esterification

底物浓度(mol/L)	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
转化率(%)	79.3	85.2	91.3	89.4	85.6

注:反应条件:己酸:乙醇=1:1;有机溶剂 15ml 正庚烷;加酶量:250U;反应温度:311K;摇床转速:150r/min;反应时间:24h。

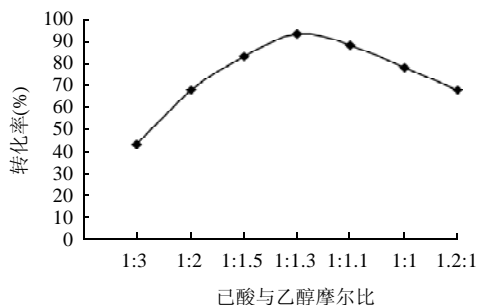
表1结果显示,在其他条件不变的情况下,己酸与乙醇的浓度在0.10~0.20mol/L的范围内转化率逐渐升高;当己酸与乙醇的浓度均为0.20mol/L时,己酸乙酯的转化率达到最高;当己酸与乙醇的浓度在0.20~0.30mol/L的范围内转化率逐渐降低。这是因为该反应属于可逆反应,随着底物浓度的增加,使得整个平衡向正反应(酯合成反应)方向移动,转化率随着底物浓度的增加而升高;当底物浓度增加到一定值(底物浓度大于0.20mol/L)时,底物对酶蛋白的抑制作用占了优势,使酯合成转化率随底物浓度的增加而降低。所以底物浓度应取0.20mol/L为宜。

### 2.3 底物的摩尔比对酶催化酯合成反应的影响

表2 底物摩尔比对酶催化酯化反应的影响

Table 2 Effects of mole ratio of caproic acid to ethanol on esterification

己酸浓度(mol/L)	乙醇浓度(mol/L)	己酸与乙醇摩尔比	转化率(%)
0.24	0.20	1.2:1	63.4
0.20	0.20	1:1.1	89.7
0.20	0.26	1:1.3	91.8
0.20	0.30	1:1.5	86.5
0.20	0.40	1:2	55.2
0.20	0.60	1:3	43.2



有机溶剂为15ml正庚烷;加酶量250U;反应温度311K;摇床转速150r/min;反应时间24h。

图2 底物摩尔比对酶催化酯化反应的影响

Fig.2 Effects of mole ratio of caproic acid to ethanol on esterification

图2结果显示,当己酸与乙醇摩尔比在1.2:1~1:1.3的范围内时转化率逐渐升高;在酸与醇摩尔比为1:1.3时转化率达到最高;当酸与醇摩尔比在1:1.3~1:3的范围内转化率逐渐降低。所以在1.2:1~1:3范围内酸与醇摩尔比以1:1.3为最佳。这是因为一元酸与一元醇参加的酯化反应,两种底物的摩尔比在理论上应为1:1,但由于该反应是典型的可逆反应,通常要加大一种底物的量来促使反应向正方向进行,所以增大反应物摩尔比可增大平衡转化率。但该反应属于酶催化反应,两底物中,酸过量(酸醇比为1.2:1)对酯合成不利,这与酸对酶的抑制作用有关;当醇适当增加(酸醇比为1:1.3)时,酯合成转

化率明显增大,但如果醇的量过大(酸醇比大于1:2)时,由于醇的抑制作用加强使转化率反而降低,所以酸醇物质的量比宜取1:1.3。

### 2.4 有机溶剂对酶催化酯合成反应的影响

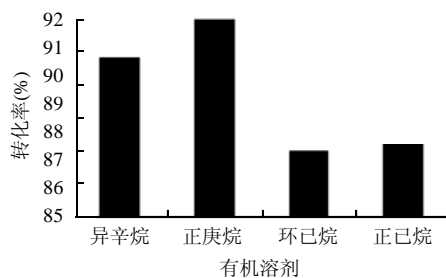


图3 有机溶剂对酶催化酯化反应的影响

Fig.3 Effects of various organic solvents on esterification

从图3中可以看到,在四种有机溶剂中环己烷的效果最差,正己烷和异辛烷效果较好,正庚烷效果最好,故溶剂宜选正庚烷。这是因为脂肪酶在有机溶剂中的活性大小与溶剂的疏水性大小有关,有些研究表明,溶剂的LogP值越高脂肪酶的催化能力越强<sup>[17-18]</sup>,这是因为强极性溶剂易夺取酶分子表面所吸附的必需水分子层,使酶失活<sup>[19]</sup>。正己烷、环己烷、正庚烷和异辛烷这四种溶剂中,LogP值高低顺序是:异辛烷>正庚烷>正己烷>环己烷,这与实验结果基本一致。在实验中也发现正庚烷作溶剂的效果好于异辛烷,这是因为在溶剂的LogP值很大时,溶剂对水的溶解度很低,微量的水就能使溶剂饱和,反应生成的水超过溶剂的溶解能力后会游离出来,聚集在酶的周围,使酶催化剂的传质性能下降,导致转化率降低。

### 2.5 反应温度对酶催化酯化合成反应的影响

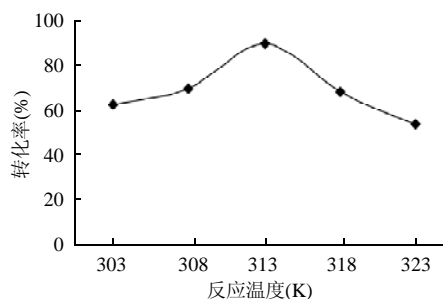


图4 温度对酶催化酯化反应的影响

Fig.4 Effects of reaction temperature on esterification

图4结果显示,在反应温度为303~311K的范围内,酯合成转化率逐渐升高;在反应温度为311~323K的范围内,酯合成转化率逐渐降低;在311K时酯合成转化率达到最大。故己酸与乙醇酯合成最适温度为311K。这是因为从化学平衡来考虑,对一般的反应在较低温度下

(298K)温度越高,反应速率越大,在一定的时间(24h)内转化率越高。但由于酯化反应是可逆反应,其逆反应(水解反应)是吸热反应,如果温度过高(超过323K时),平衡会向吸热反应(水解反应)方向移动,使转化率降低。另一方面,该反应是酶催化反应,随着温度的升高,酶蛋白逐渐变性而失活,引起酶反应转化率下降。所以反应温度应以313K为宜。

## 2.6 反应时间对酶催化酯合成反应的影响

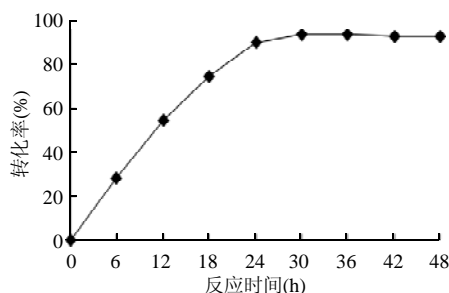


图5 反应时间对酶催化酯化反应的影响  
Fig.5 Effects of reactionon time on esterification

在实验所得的条件下,进行酯合成反应,每隔6h取样测定转化率,得到酯合成时间曲线(图5)。由图5可知,在上述反应条件下,酯合成转化率随时间增加而迅速上升,24h后达到最大值94.6%之后,之后随着反应时间的延长转化率不再明显增加。所以反应时间应确定为24h。

## 2.7 酶催化酯化反应产物的表征

### 2.7.1 红外光谱检测

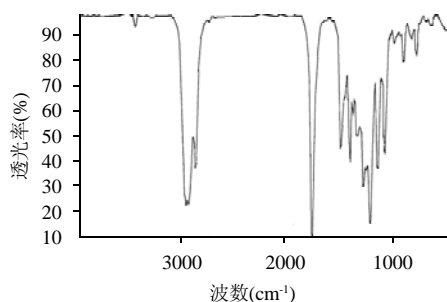


图6 产物的红外吸收图谱  
Fig.6 IR spectrum of esterification product

由图6可知:3600cm<sup>-1</sup>附近无乙醇的-OH特征吸收峰,1680cm<sup>-1</sup>与3200cm<sup>-1</sup>附近亦无己酸的羧基及羟基的特征吸收峰。故可以判断己酸、乙醇已除去。此外,在2958.41cm<sup>-1</sup>处还出现甲基(CH<sub>3</sub>-)的收缩吸收峰,2869.35cm<sup>-1</sup>处出现亚甲基(-CH<sub>2</sub>-)的伸缩吸收峰,1738.47cm<sup>-1</sup>处出现饱和脂肪酯(C=O)的强伸缩吸收峰,以及1177.15cm<sup>-1</sup>处出现脂肪酯(C-O)的强伸缩吸收峰,故认为有酯生

成。产物的红外光谱图与标准红外光谱图6基本一致,可以确定产物为己酸乙酯。

GC-MS定性检测取相同体积的标准品和分离纯化后的产物,把二者分别溶于相同体积的正庚烷中,混匀,进行气相色谱检测。

### 2.7.2 GC-MS 检测

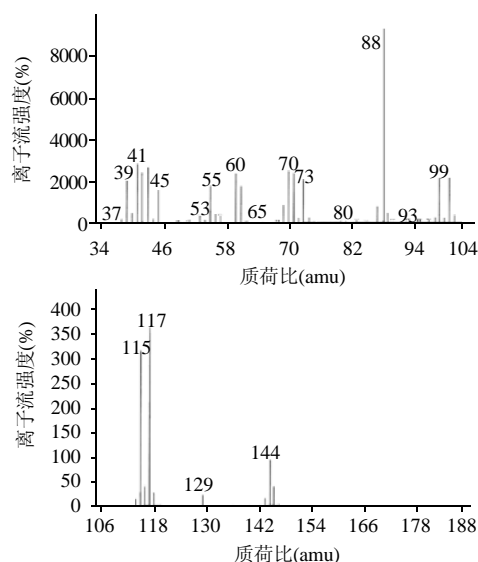


图7 产物的GC-MS定性分析  
Fig.7 Qualitative determination of esterification product by GC-MS

所测样品己酸乙酯C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>的分子量为144。基准峰m/z88相当于从分子离子中失去质量56,这表明从分子离子失去一个丁烯分子,可以推知裂解过程中羰基发生麦克拉夫悌重排失去丁烯。从m/z99(M-45)峰的丰度及存在m/z45峰来看应为乙氧基,样品应为乙酯。而图7中的确有这个乙酯m/z73峰。另外,羰基发生γ裂解,该裂解若α及β碳上无取代时将产生M-43离子,m/z101。m/z115是m/z101的高一级同系物,它的形成要求整个戊基为直链,因而可以推测化合物为己酸乙酯。

### 2.7.3 气相色谱检测

取相同体积的标准品和分离纯化后的产物,把二者分别溶于相同体积的正庚烷中,混匀,进行气相色谱检测。

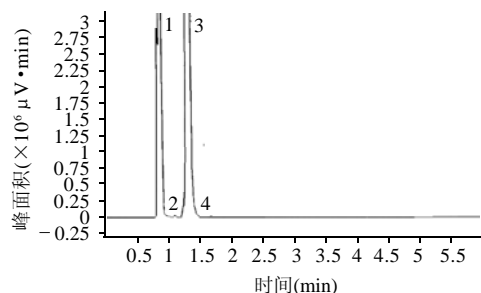


图8 标准品的气相色谱图  
Fig.8 GC spectrum of standard ethyl caproate sample

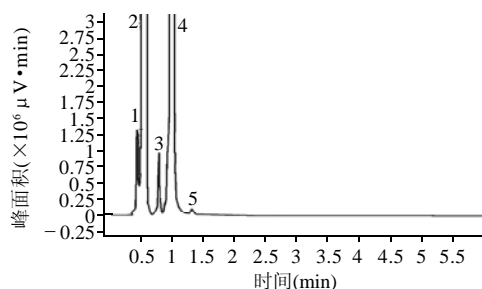


图9 产品的气相色谱图

Fig.9 GC spectrum of ethyl caproate product

表2 产物气相色谱图数据

Table 2 Determination data of GC spectrum of ethyl caproate product

峰号	保留时间 (min)	峰面积( $\mu\text{V} \cdot \text{min}$ )	峰高( $\mu\text{V}$ )	峰面积百分比(%)
1	0.724	4323285.0	1168344.6	0.4133
2	0.818	387804737.4	253152088.0	74.1477
3	1.054	1850963.7	926605.4	0.3539
4	1.237	128871348.5	55122603.3	25.0533
5	1.563	166220.5	64074.6	0.0318

由出峰时间可知,图8中的1号峰和图9中的2号峰均为溶剂正庚烷,图8中的3号峰和图9中的4号峰均为己酸乙酯。由图9可以看出产品的气相色谱图中杂质峰很小,故样品的纯度很高。通过表2峰面积百分比(溶剂正庚烷不计算在内)可以计算得到样品的纯度为96.91%。

### 3 结论

脂肪酶CRL在烷烃中催化合成己酸乙酯的最适反应条件如下:正庚烷为溶剂,反应温度311K,加酶量为250U,反应时间24h,吸水剂加入量为20mg/ml,己酸与乙醇摩尔比为1:1.3,己酸浓度为0.2mol/L。在优化条件下,己酸转化率达到94.6%,比文献[8]应用CRL脂肪酶催化己酸乙酯的合成提高了。同时对产物进行了分离提纯,得到了纯度较高的产品,能够适应于一般的用途。并用红外光谱、气质连用、气相色谱等现代方法对产物己酸乙酯的结构和纯度进行了表征,为酶催化己酸乙酯的工业生产提供了一定的科学依据。

### 参考文献:

- [1] 徐岩,章克昌.微生物脂肪酶合成白酒芳香酯的研究[J].中国酒,1997(4):33-34.
- [2] 徐大刚,肖禄生,蔡扬,等.用脂肪酶非水相生物催化合成己酸乙酯的研究[J].精细化工,2004,21(4):279-282.
- [3] 吕栓锁,方云,苏亚芬.酶催化合成高纯度甘油中碳酸单酯[J].精细化工,2004,21(4):265-268.
- [4] 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.
- [5] 杨本宏,吴克,郑敏,等.非水溶剂中 *Rhizopus arrhizus* 脂肪酶催化合成三种酯的最佳条[J].中国生物化学与分子生物学报,2003,19(5):572-575.
- [6] SHIEH C J, AKOH C C, YEE L N. Optimized enzymatic synthesis of butyrate with lipase AY from *Candida rugosa* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 51(3): 371-374.
- [7] WELSH F W, WILLIAMS R E, DAWSON K H. Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor[J]. Journal of Food Science, 1990, 55(6): 1679-1682.
- [8] 许岩,郭翔,张克昌.有机介质中酶法生物转化酒用芳香酯的研究[J].食品与发酵工业,1998,25(1):20-23.
- [9] 袁勤生,赵健.酶与酶工程[M].上海:华东理工大学出版社,2005.
- [10] EVGENY N V. Lipase[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994:271-288.
- [11] 张军,徐家立.固定化假丝酵母1619脂肪酶催化油酸油醇酯的合成[J].生物工程学报,1995,11(4):325-331.
- [12] KIRCHNER G, SCOLLAR M P, KLIBANOV A M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents[J]. J Am Chem Soc, 1985, 107: 7072-7076.
- [13] KLIBANOV A M. Improving enzymes by using them in organic solvents[J]. Nature, 2001, 409: 241-246.
- [14] VASILEVA N, GODJEVARGOVA T. Study of the effect of some organic solvents on the activity and stability of glucose oxidase[J]. Materials Science and Engineering C, 2005, 25: 17-21.
- [15] KAILASAPATHY K, LAM S H. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening[J]. International Dairy Journal, 2005, 15: 929-939.
- [16] STELLMACH B. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊,译.北京:中国轻工业出版社,1992.
- [17] KRISH S H, 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.
- [18] KAMIYA N, GOTO M. Preparation of surfactant-coated lipases utilizing the molecule imprinting technique [J]. J Ferment Bioeng, 1998, 85 (2): 237-239.
- [19] GANDHI N N, PATIL N S, SAWANT S B, et al. Lipase-catalyzed esterification[J]. Catal Rev-SciEng, 2000, 42(4): 439-480.