

脂肪酶催化合成乳酸正丁酯过程中酯化率的预测模型

钟金锋¹, 覃小丽^{1,2}, 王永华²

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715) (2.华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 乳酸正丁酯是一种重要的绿色溶剂, 广泛应用于食品和化妆品等行业。研究乳酸正丁酯的酶法合成工艺并对其合成过程变化趋势进行有效的监控, 是实现高效生产合格产品的重要保证。本文介绍一种估算脂肪酶催化乳酸和正丁醇合成乳酸正丁酯过程中乳酸酯化率变化规律的预测模型。在选择适宜的底物摩尔比(正丁醇:乳酸=1.5:1)后, 基于乳酸正丁酯的酶法合成过程的反应时间、反应温度和酶添加量的变化趋势, 建立了乳酸酯化率的变化规律的预测模型, $Er(\%) = 0.168 \times D^{0.018} \times (T-7.5) \times \ln(1+100t)$, 实验值与预测值两者相近程度的曲线拟合相关系数 (R^2) 可达到 0.995, 结果表明, 在本实验范围下, 该模型可有效预测反应过程中乳酸酯化率的变化。本模型将为脂肪酶催化合成乳酸正丁酯的生产实践提供很好的指导。

关键词: 脂肪酶; 乳酸正丁酯; 酯化率; 绿色生产; 预测模型

文章编号: 1673-9078(2013)11-2612-2615

An Empirical Model for Predicting Conversion of the Synthesis of *n*-Butyl Lactate by Lipase-Catalyzed Esterification

ZHONG Jin-feng¹, QIN Xiao-li^{1,2}, WANG Yong-hua²

(1.College of Food Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(2.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Butyl lactate is an important green solvent, which was widely used in food and cosmetic industries. Enzymatic process for the synthesis of butyl lactate provides high-efficient manufacture. An empirical model for predicting conversion of the synthesis of *n*-butyl lactate by lipase-catalyzed esterification was proposed based on the relationships of reaction time, reaction temperature and lipase concentration in a given *n*-butyl alcohol/lactic acid molar ratio (1.5:1). The model of $Er, \% = 0.168 \times D^{0.018} \times (T-7.5) \times \ln(1+100t)$ was established, with a good correlation ($R^2 = 0.995$) between the experimental data and predicting data. Such data would be valuable for the process control and optimization during the synthesis of *n*-butyl lactate.

Key words: lipase; *n*-butyl lactate; conversion; green production; predicated model

乳酸正丁酯具有沸点高、溶解性能好, 是一种重要的清洁生产绿色溶剂, 广泛应用于树脂、涂料、油墨、食品、化妆品等行业^[1]。天然存在的乳酸正丁酯较少, 因此, 采用人工合成的制备方式是获取乳酸正丁酯的主要途径。比如, 采用无机酸作为催化剂合成乳酸正丁酯是工业界普遍使用的方法^[2-3], 但是, 该类制备方法存在副反应多、能耗高以及产物需要深

收稿日期: 2013-07-24

基金项目: 西南大学博士启动基金 (SWU112042); 中国博士后科学基金 (2013M531927); 中央高校基本科研业务费专项 (XDKJ2013B034, SWU113036); 重庆市基础与前沿研究计划项目 (cstc2013jcyjA80024)

作者简介: 钟金锋 (1984-), 男, 博士, 讲师, 主要从事食品营养化学、碳水化合物改性及其过程的优化控制研究

通讯作者: 覃小丽 (1984-), 女, 博士, 讲师, 主要从事食品化学和酶法催化改性油脂的相关研究; 王永华 (1973-), 女, 博士, 教授, 主要从事食品化学、食品酶工程的相关研究

度脱色等后处理步骤, 不利于产品的广泛应用, 特别需要指出的是, 化学法催化的反应温度较高, 容易造成脂肪酸的分解, 从而造成反应的副产品较多^[4]。酶法催化具有活性高、专一性好、副产物少、反应条件温和、后处理简单等特点, 与基于无机酸的化学催化法相比, 具有天然的优势, 因此, 酶法合成的产物在食品、化妆品和医药等对产品品质要求较高的行业中具有较好的应用前景^[5-8]。对于酶法催化反应来说, 反应底物的酯化率是脂肪酶催化反应过程的重要参数, 其与反应底物的转化效率以及产品的最终得率直接相关, 因此, 研究脂肪酶催化反应过程的酯化率变化, 对酶催化反应过程进行动态预测, 了解酶催化的反应机制, 为控制最终产品的质量提供重要依据。

目前, 文献报道了有关脂肪酶的催化机理遵循乒乓机制, 并以此为基础得到了多种反应速率变化动力学模型^[9-10]。许多报道都是针对短链醇和中长链酸的

酯化, 而关于短链醇与短链酸的酯化研究相对较少。不同的反应底物在相同脂肪酶的催化作用下, 其反应过程呈现的变化规律也存在差异性, 底物的酯化率变化趋势也会有所不同。覃小丽等^[1]用乳酸和正丁醇为底物, 在 Novozym 435 脂肪酶催化作用下, 成功地合成了乳酸正丁酯, 该反应产物的反应程度较高, 产物无需复杂的后续处理, 但是截止到目前, 关于脂肪酶催化合成乳酸正丁酯反应过程中酯化率变化规律的预测模型尚未见文献报道。本研究中, 我们以乳酸和正丁醇为底物, 采用典型的脂肪酶催化反应条件, 并改变不同的反应参数(乳酸和正丁醇的摩尔比, 反应时间, 反应温度和脂肪酶添加量)来充分考察乳酸酯化率的变化规律, 在此基础上建立起预测酯化率的数学经验模型, 为将来乳酸正丁酯的实际生产过程的工艺优化控制和品质控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Novozym 435 (*Candida Antarctica* Lipase B)购于 Novozymes 公司; 乳酸(85~90%)、正丁醇, 均为分析纯, 购自天津科密欧药品公司; 乙酸乙酯, 色谱纯, 购自阿拉丁试剂公司。

1.2 实验方法

脂肪酶活力的测定、乳酸正丁酯的合成及反应过程的酯化率测定见参考文献^[1]。脂肪酶催化合成乳酸正丁酯的酯化反应为: 将不同摩尔比的乳酸与正丁醇混合物置于 25 mL 的具塞锥形瓶中, 充分混合后加入适量的 Novozym 435, 置于一定温度的水浴振荡器(转速为 180 r/min)中反应, 定时取样并采用气相色谱法分析反应产物。同一条件进行两次平行试验, 以两次测定结果的算术平均值为最终测定结果。

酯化产物的气相色谱测定: 采用 Agilent 7890A 气相色谱仪, 测试条件: HP-5MS 毛细柱(30 m × 0.125 mm), FID 检测器, N₂作载气, 前检测器和进样口温度分别为 300 °C 和 250 °C。

乳酸酯化率的计算公式如下:

$$\text{乳酸酯化率}(\%) = \frac{\text{生成的乳酸正丁酯量}(\text{mol})}{\text{酯化用乳酸量}(\text{mol})} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 底物摩尔比(正丁醇/乳酸)和酯化率的关

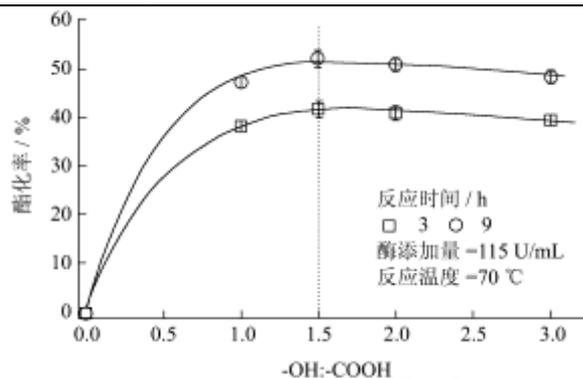


图1 不同底物摩尔比下酯化率的变化规律

Fig.1 Dependence of conversion under different *n*-butyl alcohol/lactic acid molar ratios

图1为 Novozym 435 脂肪酶催化乳酸和正丁醇合成反应中底物摩尔比(-OH:-COOH)与酯化率的关系示意图。从图中可以看出, 在给定的酶添加量和反应温度下, 乳酸酯化率随着醇酸摩尔比的增大而呈现先增大后减少的趋势, 而且在不同的反应时间均呈现类似的规律。很显然, 该酯化反应存在可逆反应。增大正丁醇的用量, 有利于底物生成乳酸正丁酯。但是, 随着正丁醇的用量增大, 醇抑制了酶的催化活性, 使得酯化反应速率下降, 酯化率降低。因此, 本文选取合适的醇酸摩尔比为 1.5:1。

2.2 反应时间与酯化率的关系

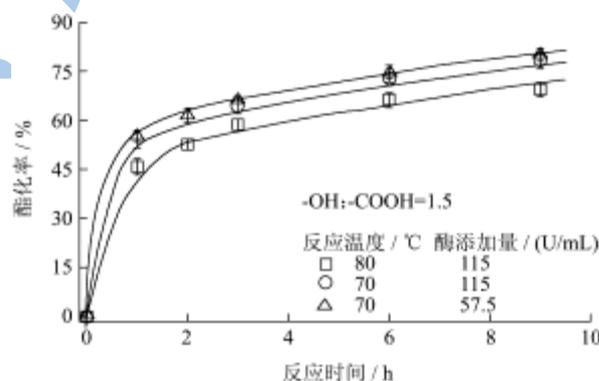


图2 不同反应温度和酶添加量下酯化率随着反应时间的变化规律

Fig.2 Dependence of conversion on reaction time under different reaction temperatures and lipase concentrations

图2是不同反应温度和不同酶用量情况下酶催化反应过程酯化率随着反应时间进行的变化规律示意图。从图中可以看出, 当酶添加量固定在 115 U/mL 的情况下, 在 80 °C 时酯化率略低于 70 °C 的酯化率, 这说明了较高的反应温度使酶活降低, 不利于乳酸正丁酯生成。同样, 固定反应温度为 70 °C 时, 较少的酶添加量能促进反应的速率的增加。当分别固定酶用量和反应温度的情况下, 酯化率随着反应时间的增加

而增加,且从表观上呈现一种对数关系。由于反应时间为零时采用直接的对数函数[Ln(X)]在数学上没有意义,所以选用 Ln(X+1)作为自变量进行拟合,结果表明,当 X=100t 时,乳酸的酯化率与 Ln(X+1)呈现很好的线性关系,且不同温度和酶用量时,直线关系仍然成立,如图 3 所示。因此,乳酸与正丁醇在酶催化反应过程中的酯化率随时间的变化关系可由下式表示:

$$Er / \% = k_1 \times \ln(1+100t) \quad (1)$$

注: Er-酯化率, %; t-反应时间, h; k₁-系数, h⁻¹; 100-常数。

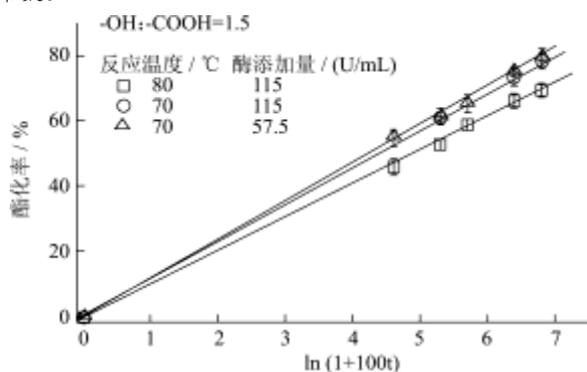


图 3 酯化率与 Ln(1+100t)的关系

Fig.3 Relationship between conversion and Ln(1+100t)

2.3 反应温度与酯化率的关系

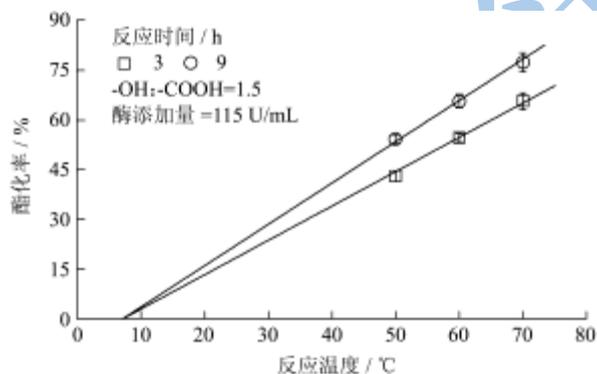


图 4 酯化率与反应温度的关系变化规律

Fig.4 Relationship between conversion and reaction temperature

图 4 是在固定醇酸摩尔比和酶添加量的情况下,酯化率与反应温度变化规律图。从图中可知,随着反应温度的提高,反应的酯化率逐渐增加,而且,在不同的反应时间下两者之间均呈现直线关系,从图中可以推出,在 7.5 °C 时,酯化率等于 0,我们后续的验证实验结果也表明,在 7.5 °C 时,反应体系中生成乳酸正丁酯的量接近于 0。因此,可以得到酯化率与反应温度之间的关系如下:

$$Er / \% = k_2 \times (T - 7.5) \quad (2)$$

注: Er-酯化率, %; T-反应温度, °C; 7.5-临界温度, °C; k₂-系数, °C⁻¹。

2.4 酶添加量与酯化率的关系

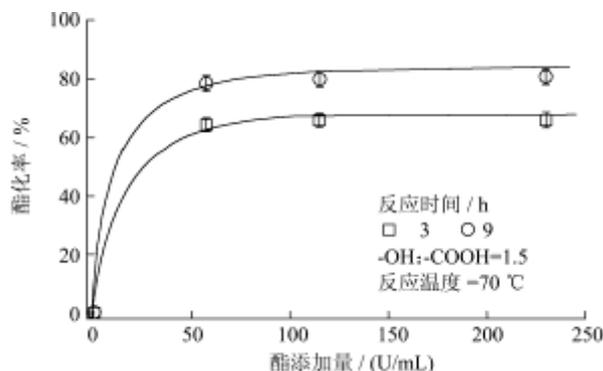


图 5 酯化率随酶添加量的变化规律

Fig.5 Relationship between conversion and lipase concentration

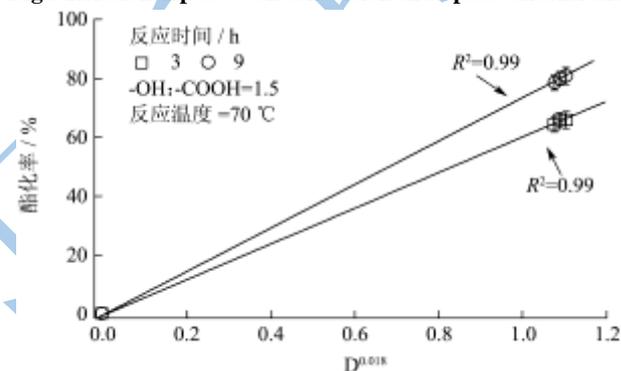


图 6 酯化率与酶添加量 (D) 的 0.018 次方的关系

Fig.6 Relationship between conversion and D^{0.018}

在不同酶添加量 (D) 的情况下,方程 (1) 的斜率是不同的,说明酶的添加量对该反应的酯化率有着较大的影响(如图 2 所示)。由图 5 可知,酯化率随着酶添加量增加呈现先急剧增大后变平稳的趋势,而且不同的反应时间下的变化规律呈现一致性。因此,在其他条件固定的情况下,以酯化率与酶添加量的 0.018 次方作图发现两者之间呈现直线关系,如图 6 所示。因此,酯化率与酶的添加量之间的关系可表示为:

$$Er / \% = k_3 \times D^{0.018} \quad (3)$$

注: Er-酯化率, %; D-酶添加量, U/mL; 0.018-方程常数; k₃-系数, (mL/U)^{-0.018}。

2.5 酯化率预测数学经验模型的建立与验证

根据等式 (1) ~ (3) 确立的反应时间、反应温度、酶添加量与酯化率之间的数学关系,即反应时间的衍生对数、反应温度、酶添加量的 0.018 次方均呈现直接线性关系,根据式子 (1) ~ (3) 和数学变换法则,由此可得到基于三种反应参数下的乳酸与正丁

酶在酶催化作用下乳酸酯化率与反应条件的总关系式可表示为:

$$Er / \% = kD^{0.018} (T - 7.5) Ln(1 + 100t) \quad (4)$$

注: Er -酯化率, %; D -脂肪酶添加量, U/mL; T -反应温度, °C; t -反应时间, h; k -方程系数, $(^{\circ}\text{C}\cdot\text{h})^{-1}\cdot(\text{mL}/\text{U})^{-0.018}$ 。

在改变上述反应参数(即反应温度、反应时间和酶添加量)的情况下,通过实验测得不同条件下的酯化率,代入该模型进行数值拟合,求得模型中的方程系数 $k = 0.168$ 。由图7可知,两者相近程度的曲线拟合相关系数(R^2)可达到0.995,由此可知,该模型可对上述实验范围内乳酸与正丁醇在酶催化酯化反应过程中乳酸的酯化率变化进行很好的预测。

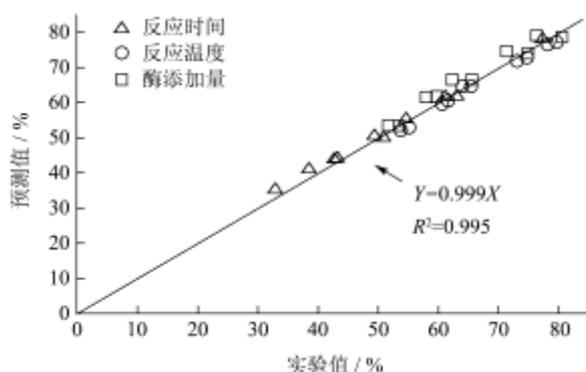


图7 实验测定与模型预测的酯化率之间的比较结果

Fig.7 Comparative result of conversion between experimental determined data and model predicted data

3 结论

本文研究确定了正丁醇与乳酸的适宜摩尔比为1.5:1后,系统地考察脂肪酶催化反应过程中的反应时间、反应温度和酶添加量对酯化率的影响,建立了该酯化反应过程中酯化率变化规律经验模型。通过对比酯化率的实验测定值和模型预测值后发现,两者的相关系数(R^2)可达0.995,说明该模型可很好地预测脂肪酶催化乳酸和正丁醇合成乳酸正丁酯的反应过程中酯化率的变化。

参考文献

[1] PIROZZI D, GRECO J R. Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(2): 94-100

[2] DASSY S, WIAME H, THYRION F C. Kinetics of the liquid phase synthesis and hydrolysis of butyl lactate catalysed by cation exchange resin [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1994, 59(2): 149-156

[3] LI K T, WANG C K, WANG I, et al. Esterification of lactic acid over $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ catalysts [J]. Applied Catalysis A: General, 2011, 392(1): 180-183

[4] PIROZZI D, GRECO G. Lipase-catalyzed transformations for the synthesis of butyl lactate: a comparison between esterification and transesterification [J]. Biotechnology Progress, 2006, 22(2): 444-448

[5] TORRES C, OTERO C. Part I. Enzymatic synthesis of lactate and glycolate esters of fatty alcohols [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(8): 745-752

[6] TORRES C, BERNAB M, OTERO C. Part II. Two enzymatic procedures for the selective synthesis of malic acid monoesters [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(8): 753-761

[7] KNEZ Z, KAVCIC S, GUBICZA L, et al. Lipase-catalyzed esterification of lactic acid in supercritical carbon dioxide [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2012, 66, 192-197

[8] 刘艳丰,黄惠华. α -亚麻酸单甘酯的合成工艺研究[J].现代食品科技, 2012, 28(1): 86-90

LIU Y F, HUANG H H. Lipase-catalyzed synthesis of monoglycerol rich in α -linolenic acid from linseed oil by response surface methodology [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(1): 86-90

[9] JANSSEN A E, SJURSNES B J, VAKUROV A V, et al. Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: correct model and solvent effects on parameters [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24(8): 463-470

[10] YADAV G D, BORKAR I V. Kinetic modeling of immobilized lipase catalysis in synthesis of n-butyl levulinate [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2008, 47(10): 3358-3363

[11] 覃小丽,邵佩霞,王永华.脂肪酶催化合成乳酸正丁酯的研究[J].食品工业科技, 2009, 20(8): 253-257

QIN X L, SHAO P X, WANG Y H. Study on the synthesis of n-butyl lactate by lipase-catalyzed [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 20(8): 253-257