离子液体-超临界 CO₂ 两相体系中葡萄糖月桂酸酯的合成

张志霞^{①②}, 常盼盼^{①②}, 全灿^③, 唐韶坤^{①②*}

① 天津大学化工学院, 绿色合成与转化教育部重点实验室, 天津 300072;

② 天津化学化工协同创新中心, 天津 300072;

③ 中国计量科学研究院, 北京 100029

* 联系人, E-mail: shktang@tju.edu.cn

2015-05-10 收稿, 2015-05-25 接受, 2015-06-05 网络版发表

国家自然科学基金(21328601)资助

摘要 糖脂是一类无毒、无刺激性、生物兼容和可生物降解的非离子型表面活性剂, 被广泛应用于石油回收、碳氢化合物的生物降解、食品、化妆品、医药、洗涤剂等行业. 本文在离子液体-超临界 CO₂ 两相体系中采用南极假丝酵母脂肪酶 B 催化合成葡萄糖月桂酸酯, 采用薄层色谱法(TLC)、FTIR、¹³C NMR 等手段对产物进行分析表征, 通过单因素法研究了反应时间、压力、温度、底物流速、酶浓度、离子液体用量等对葡萄糖转化率的影响. 在优化工艺条件下, 葡萄糖转化率高达 99.5%. 此过程反应转化率高、反应时间短, 能够保证酶的高活性, 同时酶与离子液体易分离回收并循环使用, 具有常规方法无可比拟的优势.

关键词

糖脂
酶催化
离子液体
超临界 CO₂
两相体系

糖脂是一类无毒、无刺激性、可生物兼容和降解的非离子型表面活性剂^[1]. 它具有乳化、分散、增溶、起泡和润湿的作用, 可被广泛应用于石油回收、碳氢化合物的生物降解、食品、化妆品、医药、洗涤剂等行业. 糖脂的合成方法主要有化学合成和酶催化合成. 与传统的化学合成方法相比, 酶催化合成具有反应条件温和、原料价廉、区域选择性高、易分离和纯化等优点, 但与此同时, 有机溶剂的使用易导致酶的失活^[2-8]. 为解决此问题, 研究者开始寻找新的溶剂, 而离子液体因其不挥发性、好的化学和热稳定性、高离子导电率、环境友好等诸多性能吸引了研究者的广泛关注^[9,10]. Ganske 和 Bornscheuer^[11] 在 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐和叔丁醇两相体系中合成葡萄糖脂肪酸酯, 转化率可以达到 90%. Ha 等人^[12] 通过一种新的手段使得葡萄糖可以在离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑三氟甲烷磺酸盐和 1-丁基-3-甲基咪唑三氟甲烷磺酸盐中达到过饱和状态, 从而实现了葡萄糖和月桂酸的酯化反应. 此外, 人们还将目光转向兼具气体和

液体优异物性、绿色高效环保的超临界流体如超临界 CO₂^[13]. Randolph 等人^[14] 在 1985 年首次提出了在超临界 CO₂ 中进行生物酶催化反应. Habulin 等人^[15] 在超临界 CO₂ 中, 以生物酶作催化剂合成了不同的糖酯并探索了酶的抗菌能力. 近年来, 人们开始将生物酶催化的溶剂转向超临界 CO₂ 和离子液体混合的二元体系, 希望通过两者不同物化性质的结合达到弥补不足放大优点的效果. 一方面, 超临界 CO₂ 作为流动相的加入有利于反应物的回收、产物的分离和离子液体的重复使用^[16,17]; 另一方面, 超临界 CO₂ 会和酶的表面物质发生反应导致酶的活性降低^[18], 或是升压/降压的过程中使得酶的构象发生变化^[19], 而离子液体的加入可以对酶起到很好的保护作用^[20]. 然而迄今为止, 将此两相体系的酶催化反应用于糖酯的合成还未见研究报道.

基于以上考虑, 本文在离子液体-超临界 CO₂ 的两相体系中进行葡萄糖和月桂酸乙烯酯酶催化合成葡萄糖月桂酸酯的连续反应, 一方面借助超临界 CO₂

引用格式: 张志霞, 常盼盼, 全灿, 等. 离子液体-超临界 CO₂ 两相体系中葡萄糖月桂酸酯的合成. 科学通报, 2015, 60: 2567-2572

Zhang Z Z, Chang P P, Quan C, et al. Sugar ester synthesis in binary system consisting of ionic liquids and supercritical carbon dioxide (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 2567-2572, doi: 10.1360/N972015-00328

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N972015-00328>

优异的传递性质有效促进反应体系的传质行为, 提高该反应速率和转化率, 同时超临界CO₂优异的萃取能力有助于实现反应产物糖酯与离子液体和酶的直接分离, 解决了酶和离子液体的回收和再利用难题; 另一方面, 离子液体的加入对脂肪酶起到很好的保护作用, 解决了超临界CO₂易导致酶失活的问题. 研究了反应压力、温度、底物流速、酶浓度、离子液体用量等反应条件对葡萄糖转化率的影响, 并通过薄层色谱法(TLC), FTIR, ¹³C NMR等手段对合成产物进行定性分析.

1 实验

(i) 试剂与仪器. 南极假丝酵母脂肪酶B(Novozym 435, Sigma-Aldrich); 离子液体1-丁基-3-甲基咪唑三氟甲磺酸盐([Bmim]CF₃SO₃, 中国科学院兰州化学物理研究所); 月桂酸乙酯(分析纯, 东京化成工业株式会社); 葡萄糖(分析纯)、叔戊醇(分析纯)、硫酸(色谱纯)、果糖(分析纯)、 α -萘酚(分析纯)、硅藻土等均购自天津市光复精细化工研究所; CO₂(天津六方工业有限公司); 超临界萃取仪(Applied Separations); 薄层色谱板(天津思利达科技有限公司).

(ii) 超临界CO₂-离子液体两相体系中葡萄糖月桂酸酯的合成. 实验装置如图1所示. 葡萄糖(100 mg)与月桂酸乙酯按摩尔比1:1.5混合并溶解在叔戊醇(500 mL)中配成底物溶液加入贮槽(12)中, 一定量的Novozym 435、[Bmim]CF₃SO₃和2 g硅藻土按一定比例充分混合均匀后装填入超临界反应柱(6)中, 硅藻土主要起吸附固定Novozym 435和[Bmim]CF₃SO₃的作用, 钢瓶(1)中的CO₂经冷槽(2)、CO₂泵(3)进入反应柱并加压升温至设定的温度、压力条件, 之

图1 反应装置示意图. 1, CO₂钢瓶; 2, 冷却槽; 3, CO₂泵; 4, 压力表; 5, 进口阀; 6, 反应柱; 7, 恒温箱; 8, 出口阀; 9, 节流微调阀; 10, 产品收集器; 11, 湿式流量计; 12, 底物贮槽; 13, 溶剂泵

Figure 1 Schematic diagram of the reaction unit

后打开溶剂泵(13)以一定流速连续通入底物溶液, 当出口处有反应液流出后开始计时, 每隔0.5 h取样, 2 h后停止反应, 将反应后溶液中的叔戊醇通过旋转蒸发除去, 产物待后续分析表征.

(iii) 分析与表征. 采用高效液相色谱检测产物中的葡萄糖含量, 进而计算反应转化率. 液相色谱仪(L6-P6, 北京普析), 色谱柱为ICSep Coregel-87H(300 nm $\times$ 7.8 mm), 流动相为0.005 mol/L的硫酸溶液, 流速0.6 mL/min, 样品进料为每次20 μ L, 柱温35 $^{\circ}$ C, 采用ShodexRI100示差折光检测器, 检测器漂移管温度为38 $^{\circ}$ C.

糖酯的分离纯化与薄层色谱法检测: 使用硅胶柱层析法对产物进行分离纯化, 其中洗脱剂为甲苯/乙酸乙酯/甲醇/水=10:5:4.5:0.2(体积比). 使用薄层色谱法对糖酯进行定性跟踪检测, 其中硅胶板为GF254薄板, 展开剂与洗脱剂一致, 显色剂为 α -萘酚, 105 $^{\circ}$ C薄层显示色谱带.

采用傅里叶变换红外光谱仪(VERTEX70型, Bruker)在波长400~4000 cm⁻¹范围内对样品进行分析. 产物的¹³C NMR谱用核磁共振波谱仪(INOVA 500, Bruker)记录, 使用DMSO-*d*₆溶解样品.

2 结果与讨论

本研究以南极假丝酵母脂肪酶B为催化剂在离子液体-超临界CO₂两相体系中合成生物型表面活性剂葡萄糖月桂酸酯, 重点考察反应时间、压力、温度、底物流速、酶浓度、离子液体用量等对葡萄糖转化率的影响, 并优化确定适宜反应条件.

2.1 反应温度对葡萄糖转化率的影响

固定以下反应条件: 压力10 MPa, 酶浓度0.02 g/g硅藻土, 离子液体浓度2 mL/g硅藻土, 底物流速0.2 mL/min, 考察不同温度下葡萄糖转化率的变化, 结果如图2所示. 由图2(a)可知, 在不同温度下葡萄糖浓度随时间的变化呈现相似的趋势, 在反应初期(0~60 min)葡萄糖浓度发生明显变化, 这可能是由于反应初期底物需要一定的平衡时间与超临界CO₂-离子液体两相体系混合并逐渐渗透到酶的活性中心进行催化反应. 60 min之后连续反应渐趋于稳态, 反应120 min以后葡萄糖浓度几乎不再随时间而变化, 表明此连续反应稳定时间为120 min. 因此以后的实验均控制反应时间在120 min取样检测葡萄糖的转化率.

图2 不同温度下葡萄糖的转化率

Figure 2 The influence of reaction temperature on the glucose conversion rate

由图2(b)可知,当反应温度从40℃逐渐升高到60℃,反应转化率随温度的升高而增大.温度达到60℃时转化率达到最大,此时转化率为93.3%.这是因为随着温度的升高,酶的活性升高,有利于酯化反应的进行;而且在此温度范围内,脂肪酶维持了较高的催化活性.当继续升高反应温度到70℃时,虽可加速反应进程,但温度过高造成酶失活,导致转化率下降.综上所述,该反应的最佳反应温度为60℃.

2.2 反应压力对葡萄糖转化率的影响

固定其他反应条件:温度60℃,酶浓度0.02 g/g硅藻土,离子液体浓度1 mL/g硅藻土,底物流速0.2 mL/min,考察不同压力下葡萄糖转化率的变化,结果如图3所示.在最佳反应温度60℃下,当反应压力从8 MPa逐渐升高到10 MPa,反应转化率随压力的升高而急剧升高.压力的升高使得超临界CO₂的密度升高,从而增强了反应物特别是月桂酸乙烯酯与离子液体-超临界CO₂两相体系的相溶性,提高了体系中的反应物浓度,促进了葡萄糖转化率的提高.当压力

图3 不同压力下葡萄糖的转化率

Figure 3 The influence of reaction pressure on the glucose conversion rate

继续增至15 MPa时,葡萄糖的转化率达到最大值,为99.5%.随后随着压力继续增大,葡萄糖的转化率变化不大.因此该反应的最优反应压力确定为15 MPa.

2.3 底物流速对葡萄糖转化率的影响

固定其他反应条件:温度60℃,压力15 MPa,酶浓度0.02 g/g硅藻土,离子液体浓度1 mL/g硅藻土,考察不同底物流速下葡萄糖转化率的变化,结果如图4所示.当底物流速为0.2 mL/min时,葡萄糖转化率最高,达到99.5%.当底物流速为0.1 mL/min时,过低的底物流速造成体系中反应物浓度较低,反应速率较慢,反应达到平衡所需的时间增长,故同样反应2 h对应的葡萄糖转化率反而较低;当底物流速较高时,底物在反应柱内的停留时间很短,底物来不及到达酶活性中心进行反应就被带出,影响了产物的

图4 不同底物流速下葡萄糖的转化率

Figure 4 The influence of substrate flow on the glucose conversion rate

生成,也造成葡萄糖转化率的下降.因此确定最优底物流速为0.2 mL/min.

2.4 酶浓度对葡萄糖转化率的影响

固定其他反应条件:温度60℃,压力15 MPa,离子液体浓度1 mL/g硅藻土,底物流速0.2 mL/min,考察不同酶浓度下葡萄糖转化率的变化,结果如图5所示.当脂肪酶的加入量从0.005 g/g硅藻土增大到0.015 g/g硅藻土时,反应转化率随酶的加入量的增大而急剧增大.之后随酶浓度的继续增加,葡萄糖转化率增加幅度开始减缓.当酶浓度为0.02 g/g硅藻土时,葡萄糖转化率高达99.5%.因此确定最优酶浓度为0.02 g/g硅藻土.

2.5 离子液体用量对葡萄糖转化率的影响

固定其他反应条件:温度60℃,压力15 MPa,酶浓度0.02 g/g硅藻土,离子液体浓度1 mL/g硅藻土,底物流速0.2 mL/min,考察不同离子液体浓度下葡萄糖转化率的变化,结果如图6所示.葡萄糖转化率随离子液体量的增加而稳步升高.当离子液体加入量为1 mL/g硅藻土时,葡萄糖的转化率高达99.5%.文献[18]报道超临界CO₂会和酶表面的游离胺基团发生反应生成氨基甲酸盐类物质导致酶的活性降低,而体系中离子液体的加入恰恰对酶起到了很好的保护作用,从而使得葡萄糖转化率提高.因此确定最优离子液体用量为1 mL/g硅藻土.

2.6 最优条件下的连续操作

在上述实验确定的最优条件下(温度60℃,压力

图5 不同酶浓度下葡萄糖的转化率

Figure 5 The influence of enzyme dosage on the glucose conversion rate

图6 不同离子液体用量下葡萄糖的转化率

Figure 6 The influence of IL dosage on the glucose conversion rate

15 MPa,底物流速0.2 mL/min,酶浓度0.02 g/g硅藻土、离子液体用量为1 mL/g硅藻土)进行较长时间的连续操作,以考察该连续反应的时空稳定性,结果如图7所示.葡萄糖转化率在0~60 min变化很快,60 min后连续操作达到稳态,60~480 min葡萄糖浓度一直维持在99.5%左右;480 min以后,由于长时间与溶剂的接触导致酶的活性下降,葡萄糖转化率开始降低,实验进行到660 min时葡萄糖转化率仅为56.0%.因此,此反应宜控制连续反应时间在480 min以内.

2.7 反应产物的结构表征

葡萄糖、月桂酸乙烯酯以及纯化后产物的FTIR光谱如图8所示,其中3147~3476 cm⁻¹是O-H键的伸缩振动峰,2923 cm⁻¹为甲基的C-H伸缩振动峰,2852 cm⁻¹为亚甲基C-H的伸缩振动峰,1733 cm⁻¹是酯的C=O吸收特征峰,1473 cm⁻¹为C-O的伸缩振动

图7 最优条件下连续操作的葡萄糖转化率

Figure 7 The glucose conversion rate under the optimal conditions

图8 葡萄糖(a)、月桂酸乙烯酯(b)和合成产物(c)的FTIR谱图
Figure 8 The FTIR spectra of glucose (a), vinyl laurate (b) and synthetic product (c)

峰, 1010 cm^{-1} 是羟基中C—O键的伸缩振动峰, 1174 cm^{-1} 为C—O—C 酸的的部分的非对称伸缩振动吸收, 1473 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_2-$ 的弯曲振动吸收, 1267 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_3$ 的弯曲振动吸收, 1633 cm^{-1} 为C=C的特征吸收峰, 通过对葡萄糖、月桂酸乙烯酯以及纯化后产物的3种物质红外谱图的对比, 可以看出合成产物谱图中既有O—H键的伸缩振动峰, 又有C=O键的特征吸收峰, 同时少了C=C的特征吸收峰, 因此可以表明葡萄糖和

月桂酸乙烯酯之间发生了酯交换反应。

反应产物的 ^{13}C NMR(126 MHz , DMSO): δ 173.57(s), 92.96(s), 73.53(s), 72.85(s), 71.22(s), 69.80(s), 64.56(s), 40.60(d, $J = 16.2\text{ Hz}$), 34.12(s), 32.01(s), 29.67(d, $J = 12.1\text{ Hz}$), 29.43(s), 29.14(s), 25.16(s), 22.80(s), 14.64(s). 其中92.96, 73.53, 72.85, 71.22, 69.80, 64.56代表葡萄糖中的6个碳, 173.57处则表示RCOOR中的碳, 因此纯化后的物质中出现了酯键和葡萄糖的6个碳, 说明葡萄糖和月桂酸乙烯酯发生了酯交换反应, 生成了葡萄糖月桂酸酯。

3 结论

本文采用离子液体-超临界 CO_2 连续两相体系, 以脂肪酶催化葡萄糖和月桂酸乙烯酯的酯交换反应, 在确定的最优反应条件即反应温度 60°C 、压力 15 MPa 、底物流速 0.2 mL/min 、脂肪酶用量 0.01 g/g 硅藻土、离子液体用量 1 mL/g 硅藻土下, 葡萄糖转化率高达99.5%。此过程充分利用了超临界流体、离子液体两种绿色溶剂的优点, 既有效提高了反应速率和转化率, 同时也解决了糖酯合成中普遍存在的酶活性低、产物分离以及酶和离子液体的回收再利用等难题, 具有常规方法无可比拟的优势。

参考文献

- Mulligan C N, Wang S. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. *Eng Geol*, 2006, 85: 75–81
- Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants—From energy-saving materials to gene delivery carriers. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94: 187–201
- Gumel A M, Annuar M S M, Heidelberg T, et al. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochem*, 2011, 46: 2079–2090
- Randhawa K K S, Rahman P K S M. Rhamnolipid biosurfactants—Past, present, and future scenario of global market. *Frontiers Microbiol*, 2014, 5: 454
- Therisod M, Klibanov A M. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J Am Chem Soc*, 1986, 108: 5638–5640
- Riva S, Chopineau J, Kieboom A P G, et al. Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. *J Am Chem Soc*, 1988, 110: 584–589
- Flores M V, Naraghi K, Engasser J M, et al. Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl 2-butanol. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78: 815–821
- Degn P, Zimmermann W. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 74: 483–491
- Zhao H, Malhotra S V. Applications of ionic liquids in organic synthesis. *Aldrichim Acta*, 2002, 35: 75–83
- Park S, Kazlauskas R J. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *J Org Chem*, 2001, 66: 8395–8401
- Ganske F, Bornscheuer U T. Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids. *Org Lett*, 2005, 7: 3097–3098
- Ha S H, Hiep N M, Lee S H, et al. Optimization of lipase-catalyzed glucose ester synthesis in ionic liquids. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010, 33: 63–70
- Lozano P, Garcia-Verdugo E, V Luis S, et al. (Bio) catalytic continuous flow processes in scCO_2 and/or ILs: Towards sustainable (bio) catalytic synthetic platforms. *Current Org Synth*, 2011, 8: 810–823

- 14 Randolph T W, Blanch H W, Prausnitz J M, et al. Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol Lett*, 1985, 7: 325–328
- 15 Habulin M, Šabeder S, Knez Ž. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity. *J Supercrit Fluids*, 2008, 45: 338–345
- 16 Dzyuba S V, Bartsch R A. Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO₂ systems. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 148–150
- 17 Lozano P, García-Verdugo E, Piamtongkam R, et al. Bioreactors Based on monolith-supported ionic liquid phase for enzyme catalysis in supercritical carbon dioxide. *Adv Synth Catal*, 2007, 349: 1077–1084
- 18 Mesiano A J, Beckman E J, Russell A J. Supercritical biocatalysis. *Chem Rev*, 1999, 99: 623–634
- 19 Lozano P, Avellaneda A, Pascual R, et al. Stability of immobilized α -chymotrypsin in supercritical carbon dioxide. *Biotechnol Lett*, 1996, 18: 1345–1350
- 20 Lozano P, De Diego T, Carrié D, et al. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *J Mol Catal A Chem*, 2004, 214: 113–119

Sugar ester synthesis in binary system consisting of ionic liquids and supercritical carbon dioxide

ZHANG ZhiXia^{1,2}, CHANG PanPan^{1,2}, QUAN Can³ & TANG ShaoKun^{1,2}

¹ Key Laboratory for Green Chemical Technology of Ministry of Education, School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

² Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), Tianjin University, Tianjin 300072, China;

³ National Institute of Metrology, Beijing 100029, China

Sugar fatty acid esters are non-ionic biosurfactants which have intriguing features such as nontoxic, biocompatible, nonirritant, biodegradable and so on. It can be widely used in oil recycling, hydrocarbon bioremediation, food, cosmetic, pharmaceutical and detergent industries. The conventional methods for biosurfactants preparation mainly include chemical synthesis and enzymatic synthesis. Lipase-catalyzed synthesis of sugar fatty in organic solvent has achieved a wide range of research. In order to mitigate the enzyme deactivation in organic solvent, ionic liquids (ILs) have been recently applied into biocatalysis of sugar esters with numerous advantages including enhanced reactivity, stability of enzyme and high regioselectivity. However, there still exist drawbacks especially in difficult recoveries of enzyme and ILs, high viscosity and so on. Most recently, interests have focused on enzyme catalysis in biphasic system consisting of supercritical CO₂ and ionic liquids. In this paper, lipase-catalyzed synthesis of lauroyl glucose ester by transesterification of glucose with vinyl laurate was performed in biphasic system consisting of supercritical CO₂ and ILs. The products of lauroyl glucose ester were identified by thin layer chromatography (TLC), FTIR and ¹³C NMR. The effects of reaction pressure, temperature, substrate flow rate, enzyme dosage and IL dosage on the glucose conversion rate were investigated. The highest glucose conversion up to 99.5% could be achieved at the optimal conditions ($T = 60^{\circ}\text{C}$, $P = 15\text{ MPa}$, substrate flow rate = 0.2 mL/min, enzyme loading = 0.02 g/g celite and ILs loading = 1 mL/g celite). The continuous reaction in the binary system could last for 8 h at high enzyme activity. It is also anticipated that the combination of the two kinds of green solvents will make contributions to environmentally benign enzymatic synthesis.

sugar ester, enzymatic synthesis, ionic liquid, supercritical CO₂, biphasic system

doi: 10.1360/N972015-00328