



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102492736 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 13

(21) 申请号 201110384282. 6

(22) 申请日 2011. 11. 28

(73) 专利权人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市下城区潮王路
18号

(72) 发明人 孟祥河 潘秋月 陆丽梅

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

代理人 黄美娟 王兵

(51) Int. Cl.

C12P 7/62 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 200206505 A, 2002. 01. 24, 全文.

CN 1441848 A, 2003. 09. 10, 全文.

CN 101215587 A, 2008. 07. 09, 全文.

CN 101560527 A, 2009. 10. 21, 全文.

孙尚德等. 阿魏酸甘油酯的酶法合成方法的研究. 《中国粮油学会油脂分会第十六届学术年

会论文选集》. 2007, 第 141 页 1. 2. 1.

曾平. N- 酰基氨基酸型表面活性剂的合成与应用进展. 《应用科技》. 2008, 第 16 卷 (第 24 期), 13-15.

李可彬等. 酶催化 1-0- 甘氨酸-3-0- 十四烷酰化甘油的合成. 《四川理工学院学报 (自然科学版)》. 2009, 第 22 卷 (第 5 期), 68-72.

审查员 王宽

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种 N- 乙酰基谷氨酸甘油酯的酶合成方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 N- 乙酰基谷氨酸甘油酯的酶合成方法, 所述方法为: 以 N- 酰基氨基酸和甘油为底物, 30 ~ 80°C, 反应 1 ~ 96h, 反应结束后反应液后处理, 获得所述的 N- 乙酰基谷氨酸甘油酯; 所述酯化酶为固定化脂肪酶 Novozyme 435、固定化脂肪酶 Lipozyme RMIM、固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM、木瓜蛋白酶、脂肪酶 FAP15 (日本田野制药公司)、酰基转移酶 (Acyase) 或胰蛋白酶; 本发明反应条件温和, 不使用有机溶剂、原料经济、产品生物相容性高、质量好, 易于规模化生产。

1. 一种 N-乙酰基谷氨酸甘油酯的酶合成方法,其特征在于所述方法为:以 N-乙酰基谷氨酸和甘油为底物,无溶剂条件下,在固定化脂肪酶 Novozyme435 的作用下,70 ~ 80℃,反应 72 ~ 96h,反应结束后对反应液进行后处理,获得所述的 N-乙酰基谷氨酸甘油酯;所述 N-乙酰基谷氨酸和甘油的摩尔比为 1:20 ~ 30;所述酶的质量用量以底物总质量计为 0.5 ~ 10%。

2. 如权利要求 1 所述的 N-乙酰基谷氨酸甘油酯的酶合成方法,其特征在于所述反应液后处理方法为:反应结束后,分别加入反应液体积 1.5 倍的 5%NaCl 溶液和反应液体积 2 倍的 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液,搅拌至无气泡生成,过滤,滤液冷却至室温,用有机溶剂萃取,收集有机相,干燥至恒重,获得所述的 N-乙酰基谷氨酸甘油酯;所述有机溶剂为正己烷、氯仿或乙酸乙酯。

一种 N-乙酰基谷氨酸甘油酯的酶合成方法

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种 N-乙酰基谷氨酸甘油酯的合成方法,特别涉及一种 N-乙酰基谷氨酸甘油酯的酶合成方法。

(二) 背景技术

[0002] 卵磷脂和溶血卵磷脂是药品、高档食品和化妆品中最常用、最典型的乳化剂,其源于天然、环境友好,毒性低、生物降解性高,并和许多药物成分相容性好。其主要缺点是水溶解度低,来源有限(菜籽油、大豆油中磷脂含量仅为 0.3-2.5%),价格昂贵。目前使用的多数表面活性剂为化学合成,对水环境影响不利,生物降解性、生物相容性差。因此,高效、易生物降解、生物相容性好的表面活性剂的开发需求日益迫切。开发以氨基酸为原料的经济的、具有卵磷脂类似性质的,同时具有明显水溶性或抗微生物活力的表面活性剂,无疑具有明显的优势。

[0003] 目前基于氨基酸型的磷脂表面活性剂类似物主要有线性结构(单链),双链结构(或双子)及类甘油酯结构(磷脂模拟物)三类。目前国内外氨基酸型表面活性剂的开发主要集中在前两类,以天然饱和脂肪酸、醇、胺及不同氨基酸通过酯键、酰胺键连接缩合获得。其极性头和疏水尾各一个,因此其 HLB 值调整空间不大。而类甘油酯结构可看作是单甘酯、二甘酯和磷脂的类似物,这类表面活性剂由 1 分子极性头和 2 分子或 1 分子疏水尾通过甘油碳骨架连接构成,通过改变结合的氨基酸(极性头)种类或脂肪酸(疏水尾)种类及个数,可方便地调节其 HLB 值及在水、油中的溶解度。

[0004] 现有技术中有关于含羟基的甘氨酸,酪氨酸和碱性的精氨酸的化学\酶法报道,无二羧基的谷氨酸甘油酯合成报道。本发明选择水溶解度高、来源经济的谷氨酸作为极性头,采用酶法无溶剂体系中合成氨基酸甘油酯,为基于氨基酸原料的天然磷脂类似物的合成提供中间体。本发明的特点是反应条件温和,不使用有机溶剂、原料经济、产品生物相容性高、质量好,易于规模化生产。

(三) 发明内容

[0005] 本发明目的是提供一种 N-乙酰基谷氨酸甘油酯的酶合成方法,该方法反应条件温和,不使用有机溶剂、原料经济、产品生物相容性高、质量好,易于规模化生产。

[0006] 本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种 N-乙酰基谷氨酸甘油酯的酶合成方法,所述方法为:以 N-酰基氨基酸和甘油为底物,无溶剂条件下,在酶的作用下,30~80℃,反应 1~96h,反应结束后反应液后处理,获得所述的 N-乙酰基谷氨酸甘油酯;所述酶为固定化脂肪酶 Novozyme 435、固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM、固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM、木瓜蛋白酶、脂肪酶 FAP15(日本田野制药公司)、酰基转移酶(Acylase)或胰蛋白酶。

[0008] 所述底物中 N-酰基氨基酸与甘油的物质的量比为 1:5~30。

[0009] 所述酶优选为固定化脂肪酶 Novozyme 435 或固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM。

[0010] 所述酶的质量用量以底物总质量计为 0.5 ~ 10%，所述酶的种类不同，活力范围亦不相同，酶活力的定义标准也不相同。

[0011] 所述反应液后处理方法为：反应结束后，分别加入反应液体积 1.5 倍的 5% NaCl 溶液和反应液体积 2 倍的 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液，搅拌至无气泡生成，过滤，滤液冷却至室温用有机溶剂萃取，收集有机相，干燥至恒重，获得所述的 N-乙酰基谷氨酸甘油酯；所述有机溶剂为正己烷、氯仿或乙酸乙酯。

[0012] 进一步，所述的 N-乙酰基谷氨酸甘油酯的酶合成方法，所述方法按以下步骤进行：将 N-酰基氨基酸和甘油以物质的量比为 1 : 20 ~ 30 混合后作为底物，升温至 70℃，无溶剂条件下，在固定化脂肪酶 Novozyme 435 的作用下，pH6.0 ~ 9.0 的磷酸缓冲溶液中，30 ~ 70℃，反应 96h，反应结束后，分别加入反应液体积 1.5 倍的 5% NaCl 溶液和反应液体积 2 倍的 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液，搅拌至无气泡生成，过滤，滤液冷却至室温用有机溶剂萃取，收集有机相，干燥至恒重，获得所述的 N-乙酰基谷氨酸甘油酯；所述固定化脂肪酶 Novozyme 435 的质量用量以 N-酰基氨基酸和甘油总质量计为 5 ~ 10%，所述有机溶剂为氯仿或乙酸乙酯，所述磷酸缓冲液的质量用量为 N-酰基氨基酸和甘油总质量的 10 ~ 50%，优选 20%。

[0013] 本发明是无溶剂体系，甘油既为反应物又作溶剂，50 ~ 70 度粘度大大降低。

[0014] 本发明所述酯化率按如下方法计算：

[0015] 酯化率 = (酯化的氨基酸量 / 反应前总氨基酸量) * 100%

[0016] 反应结束后，反应液中加入 5% NaCl 溶液用以提高溶液的极性，减少产物氨基酸甘油酯的溶解度，同时加入 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液用于中和未反应的 N-酰基谷氨酸，生成钠盐，过滤，滤液用有机溶剂萃取，N-酰基谷氨酸钠盐和甘油进入 NaCl 水溶液中，而产物 N-酰基谷氨酸甘油酯转入有机相中实现富集。

[0017] 与现有技术相比，本发明的有益效果主要体现在：本发明选择水溶解度高、来源经济的 N-乙酰基谷氨酸作为乳化剂的极性部分，采用酶法无溶剂体系中合成氨基酸甘油酯，为基于氨基酸原料的天然磷脂类似物的合成提供中间体，本发明反应条件温和，不使用有机溶剂、原料经济、产品生物相容性高、质量好，易于规模化生产。

(四) 具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述，但本发明的保护范围并不仅限于此：

[0019] N-乙酰基谷氨酸，N-乙酰基谷氨酰胺，N-苯甲酰基精氨酸 (99%) 均为上海晶纯试剂有限公司。甘油，AR，国药集团上海化学试剂公司；脂肪酶 Lipozyme RM IM，脂肪酶 Lipozyme TL IM，脂肪酶 Novozyme 435 均为诺维信酶制剂有限公司，木瓜蛋白酶（广西南宁生物工程有限公司），脂肪酶 FAP15（日本天野制药公司），Acylase（日本天野制药公司）；胰蛋白酶（中国医药上海化学试剂公司）。

[0020] 实施例 1

[0021] 将 0.9458g (5mmol) N-酰基氨基酸置于夹层烧杯中，加入 9.2g (100mmol) 甘油，升温至 50℃，无溶剂条件下，分别添加 0.2029g 酯化酶（固定化脂肪酶 Novozyme 435、固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM、固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM、木瓜蛋白酶、酰基转移酶

(Acylase) 或胰蛋白酶), 反应 24h, 反应结束后, 反应液中分别加入 5% NaCl 溶液 30ml 和 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液 40ml, 搅拌 20 ~ 30min 至无气泡生成, 过滤, 滤液冷却至室温 (25℃) 后用乙酸乙酯萃取, 收集有机相, 干燥至恒重, 获得所述的 N-乙酰基谷氨酸甘油酯, 将产物用流动相适当稀释, 采用 Waters 1525 高效液相色谱分析, 测定酯化的 N-酰基氨基酸量, 并计算酯化率, 结果见表 1; 色谱柱为 Lichrospher 100 RP-18(5 μm), Lichro CART 250-4 的柱子在系统中分析, 流动相为 0.05% 的乙酸水溶液, 流速 0.8ml/min, 柱温 30℃, 紫外检测器, 检测波长 215nm。

[0022] 表 1 不同来源商品酶对底物酯化率的比较

	酶	酯化率(%)
[0023]	Novozyme 435	35.62
	Lipozyme TL IM	34.83
	Lipozyme RM IM	29.36
[0024]	Acylase	3.92
	木瓜蛋白酶	5.62
	胰蛋白酶	4.28

[0025] 不同酶催化剂在无溶剂体系中催化 N-乙酰基谷氨酸、甘油合成 N-酰基谷氨酸甘油酯的酯化率见表 1。数据表明, 实验条件下固定化脂肪酶 (固定化脂肪酶 Novozyme435、固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM、固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM) 的酯化活力明显优于游离的蛋白酶 (木瓜蛋白酶、酰基转移酶 (Acylase) 或胰蛋白酶), 一方面原因可能是固定化酶热稳定性强, 同时由于载体的存在提高了底物与酶的接触面积, 因此活力较高。固定化酶中固定化脂肪酶 Novozyme 435 催化活力最高, 这与诸多文献中有关固定化脂肪酶 Novozyme435 多功能性及高活性的报道是一致的。固定化脂肪酶 Lipozyme TLIM 虽然也表现出较高的酯化率, 但实验发现反应结束后完全破碎, 这应是其载体吸水溶胀再加上搅拌研磨所致。此外, 固定化脂肪酶 Lipozyme RMIM 的酯化活力也可接受。令人意外的是抱有很大希望的木瓜蛋白酶的活力表现差强人意, 应是其活性中心的半胱氨酸容易氧化失活造成的。

[0026] 实施例 2

[0027] 0.9458g N-酰基谷氨酸, 9.2g 甘油, 0.2029g 固定化脂肪酶 Novozyme435, 不同温度下 (30℃、40℃、50℃、60℃、70℃), 反应时间 24 小时, 其他实验操作同实施例 1, 结果见表 2。

[0028] 表 2 温度对 Novo 435 催化谷氨酸、甘油酯化反应活力的影响

	温度 (℃)	24h 酯化率(%)
	30	15.51
[0029]	40	25.02
	50	35.62
	60	39.97
	70	48.66

[0030] 不同温度下, 固定化脂肪酶 Novozyme 435 催化 N-酰基谷氨酸、甘油酯化反应 24 小时产率如表 2 所示。显而易见, 温度对酯化率的影响十分显著, 温度从 30℃ 提高至 70℃, 酯化率提高 3 倍多。一方面高温下酶的催化活力提高, 另一方面 N-酰基谷氨酸在甘油中的溶解度虽温度升高而增加, 底物有效浓度增加, 因而反应效率大大提高。此外温度升高反应

体系粘度降低,传质改善也是重要原因。通常来讲固定化脂肪酶 Novozyme 435 的最适温度在 70–80℃,但考虑高温下催化剂活力损失快,选择 70℃作为最适温度。

[0031] 实施例 3

[0032] 0.9458g N-酰基谷氨酸,9.2g 甘油,不同添加量的固定化脂肪酶 Novozyme 435(质量用量以 N-酰基谷氨酸和甘油总质量计为 0.5、1%、2%、3%、5%、10%),温度 70℃,反应时间 24 小时,其他操作同实施例 1,结果见表 3。

[0033] 表 3 酶用量对酯化率的影响

	酶添加量 (w/w %)	24h 酯化率(%)
	0.5	43.87
	1	43.93
[0034]	2	48.95
	3	51.63
	5	57.24
	10	65.96

[0035] 酶添加量试验结果表明,酶用量 0.5–3%范围内终产物含量增加并不明显,即使酶用量增加至 10%,酯化率也仅从 50%提高至 65%。这可能是酶用量相对氨基酸含量已经饱和,因此继续提高酶的用量效果并不明显。此外反应体系无溶剂而甘油用量多因此粘度较大,传质效率不高,尽管酶用量增加,不能有效传质也是酯化效率低的重要原因。

[0036] 实施例 4

[0037] 0.9458g N-酰基谷氨酸,甘油的质量根据甘油与 N-酰基谷氨酸的摩尔比 (5 : 1、10 : 1、20 : 1、30 : 1) 添加,温度 70℃,固定化脂肪酶 Novozyme435 添加量为 N-酰基谷氨酸和甘油总质量的 2%,反应 24 小时,其他操作同实施例 1,结果见表 4。

[0038] 表 4 甘油、谷氨酸摩尔比的影响

	甘油/氨基酸摩尔比	24 小时酯化率(%)
	5	14.29
[0039]	10	27.13
	20	48.95
	30	57.65

[0040] 一般认为酶催化氨基酸、甘油酯化的机理是首先酶与酰基供体 – 氨基酸结合脱水并形成酶 – 氨基酰基复合物,然后羟基供体 – 甘油攻击酶 – 氨基酰基复合物,生成酯类产物,释放水分子,同时酶游离出来。其中第二步反应,水分和与甘油竞争酶 – 氨基酰基复合物,回复生成氨基酸造成无效循环。据此,要提高反应转化率,酶的用量首先要饱和氨基酸,其次甘油用量要过量,一方面促使反应平衡向酯化方向移动,同时降低水分竞争造成的无效反应。另外相对于 N-酰基谷氨酸,甘油更加廉价易得,过量甘油可提高 N-酰基谷氨酸的利用率,从而降低成本。研究尝试不同比例的影响,发现较高甘油 / 氨基酸摩尔比有利于提高 N-酰基谷氨酸的酯化率。但甘油过低氨基酸不溶解,因而反应效率低。甘油过高也会造成后续的回收成本,同时反应器的利用率亦不高,综合考虑 20 ~ 30 : 1 是合适的。

[0041] 实施例 5

[0042] 0.9458g N-酰基谷氨酸,9.2g 甘油,0.2029g Novozyme435,70℃下,反应时间 1 ~ 96 小时,其他操作同实施例 1,结果见表 5。

[0043] 表 5Novo 435 催化 N-酰基谷氨酸、甘油酯化反应不同时间的产率

	反应时间	酯化率(%)
	1	2.89
	2	7.52
	3	10.72
	5	14.62
[0044]	8	21.98
	12	32.95
	24	42.86
	48	64.94
	72	78.07
	96	86.76

[0045] 延长反应时间, N-酰基谷氨酸酯化率增加明显。反应 24 小时酯化率为 42.86%, 时间延长至 96 小时酯化率接近 90%, 考虑到 N-酰基谷氨酸在反应中的微量分解 (5-8%), 故认为 96 小时的反应时间可基本实现 N-酰基谷氨酸的转化。

[0046] 实施例 6

[0047] 0.9458g N-酰基谷氨酸, 甘油 9.2g, 温度 70°C, 固定化脂肪酶 Novozyme435 添加量为反应物的 2%, 不同 pH 的磷酸缓冲溶液 2mL, 反应 24 小时, 其他操作同实施例 1, 结果见表 6。

[0048] 表 6 添加不同 pH 的磷酸缓冲溶液时 24h 酯化率

	pH	酯化率 (%)
	无缓冲溶液	40.88
	6.0	78.88
	6.5	63.01
[0049]	7.0	57.62
	7.5	64.01
	8.0	64.17
	8.5	62.76
	9.0	70.94

[0050] 通常酯化反应体系中, 过量水分的存在对积累产物是不利的。然而必要的水分尤其适当的缓冲溶液是保持固定化脂肪酶活力构象所必需的, 从而表现出最佳催化活力。无缓冲溶液时 24 小时酯化率约为 40%, 添加 pH6-9 的缓冲溶液均能显著提高反应速度接近 15-40%。其中尤以 pH 6.0 缓冲溶液效果最佳, 24 小时酯化率 80%, 说明此缓冲溶液为 Novozyme 435 提供了较佳的离子环境, 因此表现出极高的活力。此外, 缓冲溶液改善反应速率的效果也与其对 N-酰基谷氨酸的增溶作用有关, 溶液中 N-酰基谷氨酸分子的有效浓度增加, 其反应速度也会相应提高。

[0051] 实施例 7

[0052] 实验操作同实施例 1, 反应结束后, 反应液分别加入正己烷、氯仿、乙酸乙酯萃取, N-酰基谷氨酸钠盐和甘油进入 NaCl 水溶液中, 而产物 N-酰基谷氨酸甘油酯转入有机相中实现富集。不同溶剂萃取效果列于表 7。

[0053] 表 7 不同有机溶剂对 N-酰基谷氨酸甘油酯纯度的影响

	萃取溶剂	N-酰基谷氨酸甘油酯的纯度	产率 (相对理论产量)
	正己烷	90.86	62.9%
[0054]	乙酸乙酯	84.52	86.3%
	氯仿	88.37	84.6%

[0055] 综合考虑产物的纯度和产物的回收率,选择氯仿为最佳萃取溶剂。