

УДК 577.151

В. С. Гамаюрова, Н. И. Бильданова, М. Джамай

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БУТИЛПРОПИОНАТА

Ключевые слова: липазы, этерификация, сложные эфиры, конверсия.

В работе осуществлен энзиматический синтез душистого вещества бутилпропионата с применением ряда липаз Novozym 435, Novozym 40086 и Lypozyme TLIM. Показано, что все использованные липазы эффективно катализируют процесс этерификации. Конверсия через 3 часа ведения процесса составляет порядка 90%. Этерификация проводилась в органическом растворителе гексане. Продукт выделен и снят его спектр ИКС, подтверждающий образование эфира.

Key words: lipases, esterification, esters, conversion.

The enzymatic synthesis of the flavour substance of butyl propionate was carried out using a number of lipases Novozym 435, Novozym 40086 and Lypozyme TLIM. It is shown that all lipases used effectively catalyze the esterification process. Conversion after 3 hours of process maintenance is about 90%. The esterification was carried out in an organic solvent hexane. The product was isolated and its spectrum of IRS was removed, confirming the formation of the ether.

Введение

Бутилпропионат входит в реестр душистых веществ РФ, имеет запах эфирно-фруктовый с грибным оттенком и применяется в качестве ароматического вещества в пищевой промышленности [1]. Основной задачей в настоящей работе было показать возможность получения бутилпропионата ферментативным способом, поскольку последний имеет ряд преимуществ технологического, экологического и энергетического характера по сравнению с существующими химическими методами. Использование ферментативных методов, кроме указанных преимуществ, позволяет получать более чистые продукты, вследствие высокой специфичности ферментов и низких температур синтеза.

Ранее нами было проведено ряд синтезов душистых веществ из класса сложных эфиров и было показано, что наиболее подходящим растворителем для проведения процесса является гексан [2-4]. Очень интенсивно начали проводиться исследования по энзиматическому синтезу душистых веществ за рубежом [5,6].

Материалы и методы

В работе использовались следующие липазы фирмы Novozymes:

1. Novozym 435 – неспецифическая липаза, иммобилизована на силикагеле, продуцент *Aspergillus niger*.

2. Novozym 40086 – 1,3 липаза, иммобилизована на силикагеле, продуцент *Aspergillus oryzae*.

3. Lypozyme TLIM – 1,3 липаза, иммобилизована на силикагеле, продуцент *Aspergillus oryzae*.

Использовался спирт бутиловый марки «А», ГОСТ 6006-78, кислота пропионовая марки «Ч», гексан марки «ХЧ» с температурой кипения 69°C. Кислота в экспериментах использовалась в концентрации 0,1N, молярное соотношение кислота: спирт 1:2, концентрация ферментов варьировались 10 и 20 мг/мл, температура 30-35°C. Контроль

процесса осуществлялся по остаточному количеству кислоты в реакционной массе путем титрования водно-спиртовым раствором щелочи NaOH. Конверсия кислоты (В) рассчитывалась по формуле $V = \frac{K-O}{K} \times 100\%$, где К – количество раствора щелочи, пошедшее на титрование контроля; О – количество щелочи, пошедшее на титрование пробы.

После завершения процесса фермент отделялся от реакционной массы, и она подвергалась отгонке под вакуумом для удаления растворителя и избытка спирта.

Чистота продукта реакции определялась методами ИК спектроскопии и рефрактометрии. Показатель преломления определялся на рефрактометре ИРФ-20.

ИК спектр эфира снимали на Фурье-спектрометре «Инфралом ФТ-08» (Perkin Elmer) с приставкой НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения) «Алмаз KRS-5» (разрешение 1 см⁻¹, накопление 32 сканов, диапазон съемки 4000-400 см⁻¹).

Все эксперименты проводили в 6 повторностях, обработка результатов по программе «STATISTICA 6» показала среднюю стандартную ошибку 6,3%.

Результаты и обсуждение

Процесс проводили в гексане, так как он обладает наименьшим ингибирующим эффектом на ферменты. На рис. 1 приведены результаты ферментативного синтеза бутилпропионата с использованием ферментного препарата Novozym 435 при вариации концентрации его 10 и 20 мг/мл, температура 30 и 35°C.

Эти данные показывают, что через 0,5 часа конверсия кислоты составляет 74-82% в зависимости от концентрации фермента, и через 1 час при концентрации фермента 10 и 20 мг/мл процесс фактически завершен с конверсией около 90%. Увеличение концентрации фермента с 10 до 20 мг/мл ускоряет процесс на его начальных стадиях.

На рис. 2 приведены результаты ферментативного синтеза бутилпропионата с использованием фермента Novozym 40086.

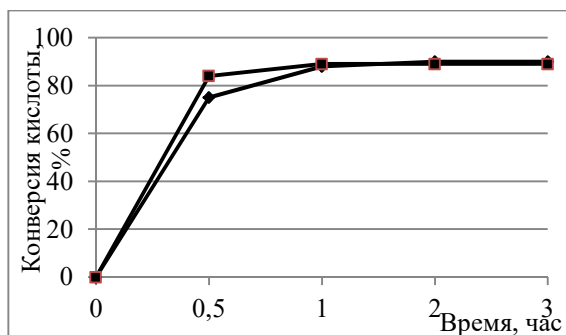


Рис. 1 – Контроль ферментативного синтеза бутилпропионата. Фермент – Novozym 435, количество 10 и 20 мг/мл, T=35°C

— 10 мг/мл — 20 мг/мл

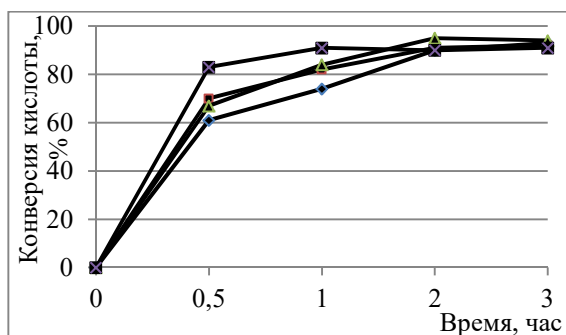


Рис. 2 – Контроль ферментативного синтеза бутилпропионата. Фермент – Novozym 40086, количество 10 и 20 мг/мл, T=30 и 35°C.

— 30°C, 10 мг/мл — 30°C, 20 мг/мл
— 35°C, 10 мг/мл — 35°C, 20 мг/мл

При использовании фермента Novozym 40086 эффективность этерификации составляет 90% конверсии через 2 часа процесса при T=30°C. Увеличение температуры процесса до 35°C способствует повышению конверсии на 5-10% (при низком содержании фермента, 10 мг/мл) и 9-13% при увеличении содержания фермента (20 мг/мл).

На рис. 3 приведены результаты ферментативного синтеза бутилпропионата с использованием ферментного препарата Lypozyme TLM. Эти данные показывают, что фермент Lypozyme TLM также активно осуществляет этерификацию пропионовой кислоты бутанолом. Максимальные выходы достигают через 3 часа процесса и составляют 90-92% конверсии кислоты.

Увеличение концентрации фермента ведет к ускорению процесса. Увеличение температуры процесса с 30 до 35°C ведет к незначительному увеличению конверсии кислоты при более высоком содержании фермента (20 мг).

После завершения процесса избыток спирта и растворитель были отогнаны под вакуумом, а продукт реакции был исследован методами ИКС и рефрактометрии.

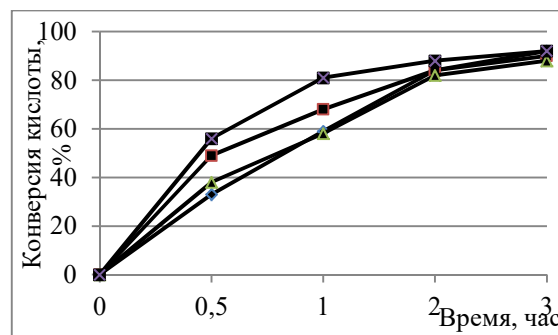


Рис. 3 – Контроль ферментативного синтеза бутилпропионата. Фермент – Lypozyme TLM, количество 10 и 20 мг/мл, T= 30 и 35°C

— 10 мг/мл, 30°C — 20 мг/мл, 30°C
— 10 мг/мл, 35°C — 20 мг/мл, 35°C

Был снят ИК-спектр бутилпропионата и пропионовой кислоты. Появление в спектре частоты валентных колебаний эфирной связи ν_{C-O} 1182,1 cm^{-1} , смещение частоты валентных колебаний $\nu_{C=O}$ 1736,6 cm^{-1} в эфире по сравнению с $\nu_{C=O}$ пропионовой кислоты $\nu_{C=O}$ 1708,5, а также отсутствие на спектре эфира частоты колебаний гидроксильных групп в области 3000-3200 cm^{-1} являются достоверными доказательствами получения чистого эфира бутилпропионата. Показатель преломления бутилпропионата $n_D^{20}=1,40000$.

Выводы

Все использованные ферменты способны эффективно катализировать процесс этерификации бутанола и пропионовой кислоты. На основании полученных данных можно подобрать нужную концентрацию ферментов и температуру процесса в соответствии с поставленными задачами. Спектр ИКС и рефрактометрия подтверждают получение чистого продукта бутилпропионата.

Литература

1. Е.В.Смирнов, Пищевые ароматизаторы, Изд. «Профессия», Санкт-Петербург, 2008, 725 с.
2. Е. В. Елизарова, М. Е. Зиновьева, В. С. Гамаюрова//Вестник Казанского технологического университета, 2006, №6, с. 69-72.
3. В. С. Гамаюрова, К. Л. Шнайдер, Матаз Дж. Джамай//Катализ в промышленности, 2016, т.16, №3, с. 64-68.
4. V.S. Gamayurova, K.L. Shnaider, S.K. Zaripova, M.J.Jamai//Journal of Advanced Chemical Sciences 2(2), 2016, p. 259-260.
5. Jitian Wang, Wei Du// Journal of Mol.Catalysis:B:Enzymatic, v.127, 2016, p.11-17.
6. A. Katogan, A. Kecskemeti, A. Srekeris// Journal of Mol.Catalysis: Enzymatic, v.127, 2016, p. 47-55.

В. С. Гамаюрова – д-р хим. наук, проф. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, gamaur@kstu.ru; Н. И. Бильданова – магистр той же кафедры; М. Джамай – асп. той же кафедры.

V. S. Gamayurova - Doctor of Chemistry, Professor of the Department of "Food Biotechnology" KNRTU, gamaur@kstu.ru; N. I. Bildanova - Master of the same Department; M. Jamay - postgraduate student of the same Department.