



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111763626 A

(43) 申请公布日 2020.10.13

(21) 申请号 202010535954.8

C12R 1/685 (2006.01)

(22) 申请日 2020.06.12

(71) 申请人 遵义市倍缘化工有限责任公司

地址 563115 贵州省遵义市汇川区沙湾镇
沙湾村(原3655厂)

(72) 发明人 张基明 杨长满 张洪滔 胡敬
黄泽琦 周婷婷

(74) 专利代理机构 贵州派腾知识产权代理有限公司 52114

代理人 周黎亚

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

C12N 11/14 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法,括以下步骤:(1)产酶菌筛选;(2)单宁酶生产;(3)酶固定:取石墨烯粉,经改性处理后,制得改性石墨烯粉;将改性石墨烯粉加蒸馏水,超声分散均匀,制成石墨烯悬浮液;向石墨烯悬浮液中加入单宁酶,搅拌处理,制得固定化酶;(4)溶剂处理:将固定化酶添加到有机溶剂苯中,并加入激活剂,搅拌均匀后,立即加入没食子酸和正丙醇,加热,保温,搅拌反应8-10h后,超声处理15-20min,继续搅拌反应7-8h,过滤,获得石墨烯滤渣和滤液;(5)反应后处理。本发明提供的方法,酯化反应时间短,没食子酸丙酯的收率较高,解决了现有技术中反应时间长、收率偏低的问题。

1. 一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 产酶菌筛选:将黑曲霉菌接种到筛选培养基,在28-30℃下培养6天,挑选出长势好的黑曲霉孢子;

(2) 单宁酶生产:将挑选的黑曲霉孢子,接种到生产培养基中培养,在在28-30℃下培养3天,将获得培养液按照常规技术经过滤、分离、葡萄糖凝胶色层析、真空冷冻干燥处理,制得单宁酶;

(3) 酶固定:取石墨烯粉,经改性处理后,制得改性石墨烯粉;将改性石墨烯粉加蒸馏水,超声分散均匀,制成石墨烯悬浮液;向石墨烯悬浮液中加入单宁酶,在40℃下搅拌处理40-50min,真空冷冻干燥制得固定化酶;

(4) 酯化反应:将固定化酶添加到有机溶剂苯中,并加入激活剂,搅拌均匀后,立即加入没食子酸和正丙醇,加温至40℃,保温,搅拌反应8-10h后,超声处理15-20min,继续搅拌反应7-8h,过滤,获得石墨烯滤渣和滤液;

(5) 反应后处理:石墨烯滤渣回充分重复使用;滤液按照常规方法进行回收有机溶剂苯、干燥处理,制得没食子酸丙酯。

2. 如权利要求1所述的固定化酶催化合成没食子酸丙酯的方法,其特征在于,所述筛选培养基、生产培养基的组成为:5g/L单宁酸、15g/L葡萄糖、0.5g/L MgCl₂、0.5g/L K₂HPO₄、0.6g/L NaNO₃、0.02g/L FeSO₄;黑曲霉菌、黑曲霉孢子均是按照5%接种量接种。

3. 如权利要求1所述的固定化酶催化合成没食子酸丙酯的方法,其特征在于,所述石墨烯粉的改性处理为:将石墨细粉放入其质量10倍的浓硫酸溶液中,在60-70℃下回流改性2h,冷却后,过滤后,水冲洗净石墨烯表面的浓硫酸,干燥,制得氧化石墨烯;再将氧化石墨烯加入等质量的水中,加入氧化石墨烯质量3%的聚丙烯酰胺,再加入聚丙烯酰胺质量5%的硫酸铵,在85℃下反应4h,过滤,洗涤,干燥,制得改性石墨烯。

4. 如权利要求1所述的固定化酶催化合成没食子酸丙酯的方法,其特征在于,所述步骤(3),石墨烯悬浮液的浓度为1g/ml,单宁酶的添加量为石墨烯质量的4倍。

5. 如权利要求1所述的固定化酶催化合成没食子酸丙酯的方法,其特征在于,所述步骤(4),激活剂为硫酸镁,添加量为固定酶质量的0.1-0.2%。

6. 如权利要求1所述的固定化酶催化合成没食子酸丙酯的方法,其特征在于,所述步骤(4),每升有机溶剂苯中加入0.05-0.1L的正丙醇、5-10mol的没食子酸、60-100g的固定酶。

7. 如权利要求1所述的固定化酶催化合成没食子酸丙酯的方法,其特征在于,所述步骤(4),搅拌反应的速度为150-200r/min。

8. 如权利要求1所述的固定化酶催化合成没食子酸丙酯的方法,其特征在于,所述步骤(4),超声处理的功率为40W。

一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法

技术领域

[0001] 本发明属于抗氧化剂制备技术领域,尤其涉及一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法。

背景技术

[0002] 没食子酸丙酯(Propyl gallate,简称PG)为白色至浅褐色结晶粉末或微乳白色针状结晶,化学名称为3,4,5-三羟基苯甲酸丙酯,具有良好的抗氧化性能,抗氧化性能较叔丁基羟基茴香醚(BHA)和2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)强,耐热性好,主要用于油脂或油基食品的抗氧化、水果及蔬菜的保鲜,可作为生物柴油及某些材料的抗氧化稳定剂或抗老化剂。没食子酸酯类化合物还具有显著的药理活性和生物活性,能有效地消除自由基,用于抗氧化和抗微生物等。因而,在药物、化妆品、饲料等领域也有着广泛的用途。

[0003] 没食子酸丙酯是食品和农业组织(FAO)/世界卫生组织(WHO)两大组织成为合成食品抗氧化剂之一,它具有杀菌、抑菌、防腐作用。PG还在治疗心脑血管疾病、抗血小板聚集、增强纤维蛋白和血栓溶解、扩张血管、增强冠动脉血流量等方面具有明显的作用。没食子酸丙酯作为脂溶性抗氧化剂,适宜在植物油脂中使用,对稳定豆油、棉籽油、棕榈油及氢化植物油有显著效果。我国规定用于油脂、油炸食品、干鱼制品、饼干、方便面、腌腊肉制品中,最大使用量为0.1g/kg。

[0004] 传统没食子酸丙酯的制备方法通常是以浓硫酸或对甲苯磺酸作催化剂,以没食子酸与正丙醇为原料进行酯化反应,用环己烷作夹带剂分离水,经结晶、提纯制得高纯度的没食子酸丙酯。传统制备没食子酸丙酯的方法存在以下缺点:(1)从制备没食子酸到没食子酸丙酯生产工艺繁琐,成本高,废水量大,难以治理;(2)以传统的浓硫酸作催化剂,收率较低,易使反应物没食子酸被氧化,副产品多,设备腐蚀严重,废液若不经处理直接排除,会对环境造成较大污染。(3)以对甲基苯磺酸作催化剂且加带水剂,虽然收率提高,但催化剂用量大,且不易回收,环境污染。

[0005] 由于传统没食子酸丙酯制备方法的缺点,人们开始对传统没食子酸丙酯制备工艺进行改进创新,研究出了不少关于没食子酸丙酯的新型制备工艺,例如微生物法催化合成没食子酸丙酯,这种方法虽然对环境友好,但反应时间长,收率偏低。如申请号为CN200410068174.8的专利提供了一种微生物法在有机相中合成没食子酸丙酯的方法步骤如下:1)将黑曲霉孢子培养得到的菌丝体收集过滤,用0.85% (w/v) NaCl溶液冲洗,在0.01~0.2mol/L pH2.2~5.8缓冲溶液中平衡后过滤,得到含水量为60~80% (w/w)的菌丝体;2)在有机溶剂苯体系中,每升有机溶剂中加入0.06~0.1L的正丙醇和4~10mmol的没食子酸,再在每升有机溶剂中加入20~50g的上述黑曲霉菌丝体,在搅拌速度150~220rpm和反应温度20~50℃下进行生物催化反应,反应时间为48~96h。该专利是采用特定的黑曲霉菌种才能实现,反应时间还是较长。如文《黑曲霉全细胞生物催化制备没食子酸丙酯的研究》(裴建军等)利用黑曲霉细胞作为全细胞生物催化剂,研究了催化没食子酸生成没食子酸丙酯的条件,探讨了有机溶剂、细胞预处理、底物浓度、反应时间和水分含量等因素在酶

催化没食子酸丙酯合成中的影响,结果表明,苯是最佳溶剂,而菌丝体的含水量在80%时得率最高。在此基础上,选择菌丝量、没食子酸浓度、正丙醇体积分数和反应时间进行了正交试验,在200r/min、40℃的转化条件下得到的较佳催化组合为:25mL锥形瓶中加入10mL苯、0.5g菌丝、7mmol没食子酸、0.73mL正丙醇组成的有机催化体系中,反应时间18h,产率为36.4%。由如文献《有机相生物催化酯转换合成没食子酸丙酯的研究》(聂光军)以印迹单宁酶为催化剂,以TA和正丙醇为底物,转酯合成PG。反应体系10mL,由1mL正丙醇、9mL正己烷和0.1mL的蒸馏水组成,反应在25mL的摇瓶中、40℃和200rpm的条件下运行24h。该技术是采用印泥技术提高的单宁酶的活性,生产成本高。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术中存在的上述技术问题,本发明提供了一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法,具体是通过以下技术方案实现的。

[0007] 一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 产酶菌筛选:将黑曲霉菌接种到筛选培养基,在28-30℃下培养6天,挑选出长势好的黑曲霉孢子;

[0009] (2) 单宁酶生产:将挑选的黑曲霉孢子,接种到生产培养基中培养,在在28-30℃下培养3天,将获得培养液按照常规技术经过滤、分离、葡萄糖凝胶色层析、真空冷冻干燥处理,制得单宁酶;

[0010] (3) 酶固定:取石墨烯粉,经改性处理后,制得改性石墨烯粉;将改性石墨烯粉加蒸馏水,超声分散均匀,制成石墨烯悬浮液;向石墨烯悬浮液中加入单宁酶,在40℃下搅拌处理40-50min,真空冷冻干燥制得固定化酶;

[0011] (4) 酯化反应:将固定化酶添加到有机溶剂苯中,并加入激活剂,搅拌均匀后,立即加入没食子酸和正丙醇,加温至40℃,保温,搅拌反应8-10h后,超声处理15-20min,继续搅拌反应7-8h,过滤,获得石墨烯滤渣和滤液;

[0012] (5) 反应后处理:石墨烯滤渣回充分重复使用;滤液按照常规方法进行回收有机溶剂苯、干燥处理,制得没食子酸丙酯。

[0013] 优选地,所述筛选培养基、生产培养基的组成为:5g/L单宁酸、15g/L葡萄糖、0.5g/L MgCl₂、0.5g/L K₂HPO₄、0.6g/L NaNO₃、0.02g/L FeSO₄;黑曲霉菌、黑曲霉孢子均是按照5%接种量接种。

[0014] 优选地,所述石墨烯粉的改性处理为:将石墨细粉放入其质量10倍的浓硫酸溶液中,在60-70℃下回流改性2h,冷却后,过滤后,水冲洗净石墨烯表面的浓硫酸,干燥,制得氧化石墨烯;再将氧化石墨加入等质量的水中,加入氧化石墨烯质量3%的聚丙烯酰胺,再加入聚丙烯酰胺质量5%的硫酸铵,在85℃下反应4h,过滤,洗涤,干燥,制得改性石墨烯。

[0015] 优选地,所述步骤(3),石墨烯悬浮液的浓度为1g/ml,单宁酶的添加量为石墨烯质量的4倍。

[0016] 优选地,所述步骤(4),激活剂为硫酸镁,添加量为固定酶质量的0.1-0.2%。

[0017] 优选地,所述步骤(4),每升有机溶剂苯中加入0.05-0.1L的正丙醇、5-10mol的没食子酸、60-100g的固定酶。

[0018] 优选地,所述步骤(4),搅拌反应的速度为150-200r/min。

[0019] 优选地,所述步骤(4),超声处理的功率为40W、频率为15kHz。

[0020] 本发明的有益效果在于:

[0021] 本发明采用改性石墨烯粉对单宁酶进行固化处理,一方面,改性后的石墨烯粉在有机溶剂苯中有良好的分散性,能吸附固定单宁酶,增加单宁酶与反应底物的接触性;另一方面,固化处理有利于提高酶的稳定性、活性,在反应过程中酶活性损失较小,提高了酶催化酯化反应的活性;而且,石墨烯粉中固定的单宁酶还回收循环使用。在反应过程中添加硫酸镁,可进一步提高单宁酶的活力,提高单宁酶的催化反应能力。本发明在反应一段时间后采用超声处理反应体系,提高固定酶的活性,降低反应体系对固定酶活性的影响,加快固定酶催化酯化反应的过程。

[0022] 本发明提供的方法通过固定化酶技术有效提高了单宁酶的活性,与反应底物之间的接触性,提高了单宁酶催化酯化反应的能力;缩短了酯化反应时间,提高了没食子酸丙酯的收率,解决了现有技术中反应时间长、收率偏低的问题。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体的实施方式来对本发明的技术方案做进一步的限定,但要求保护的范围不仅局限于所作的描述。

[0024] 实施例1

[0025] 一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法,包括以下步骤:

[0026] (1)产酶菌筛选:将黑曲霉菌接种到筛选培养基,在28-30℃下培养6天,挑选出长势好的黑曲霉孢子;

[0027] (2)单宁酶生产:将挑选的黑曲霉孢子,接种到生产培养基中培养,在在28-30℃下培养3天,将获得培养液按照常规技术经过滤、分离、葡萄糖凝胶色层析、真空冷冻干燥处理,制得单宁酶;

[0028] (3)酶固定:取石墨烯粉,经改性处理后,制得改性石墨烯粉;将改性石墨烯粉加蒸馏水,超声分散均匀,制成浓度为1g/ml的石墨烯悬浮液;向石墨烯悬浮液中加入改性石墨烯质量4倍的单宁酶,在40℃下搅拌处理40-50min,真空冷冻干燥制得固定化酶;

[0029] (4)溶剂处理:将6kg固定化酶添加到100L有机溶剂苯中,并加入固定酶质量0.1%的硫酸镁,搅拌均匀后,立即加入0.5mol没食子酸和5L正丙醇,加温至40℃,保温,150r/min搅拌反应10h后,超声处理20min,继续150r/min搅拌反应8h,过滤,获得石墨烯滤渣和滤液;

[0030] (5)反应后处理:石墨烯滤渣回充分重复使用;滤液按照常规方法进行回收有机溶剂苯、干燥处理,制得没食子酸丙酯。

[0031] 所述筛选培养基、生产培养基的组成为:5g/L单宁酸、15g/L葡萄糖、0.5g/L $MgCl_2$ 、0.5g/L K_2HPO_4 、0.6g/L $NaNO_3$ 、0.02g/L $FeSO_4$;黑曲霉菌、黑曲霉孢子均是按照5%接种量接种。

[0032] 所述石墨烯粉的改性处理为:将石墨细粉放入其质量10倍的浓硫酸溶液中,在60-70℃下回流改性2h,冷却后,过滤后,水冲洗净石墨烯表面的浓硫酸,干燥,制得氧化石墨烯;再将氧化石墨烯加入等质量的水中,加入氧化石墨烯质量3%的聚丙烯酰胺,再加入聚丙烯酰胺质量5%的硫酸铵,在85℃下反应4h,过滤,洗涤,干燥,制得改性石墨烯。

[0033] 所述步骤(4),超声处理的功率为40W、频率为15kHz。

[0034] 上述实施例1中没食子酸丙酯的产率为58.3% (以没食子酸计)。

[0035] 实施例2

[0036] 一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法,包括以下步骤:

[0037] (1) 产酶菌筛选:将黑曲霉菌接种到筛选培养基,在28-30℃下培养6天,挑选出长势好的黑曲霉孢子;

[0038] (2) 单宁酶生产:将挑选的黑曲霉孢子,接种到生产培养基中培养,在在28-30℃下培养3天,将获得培养液按照常规技术经过滤、分离、葡萄糖凝胶色层析、真空冷冻干燥处理,制得单宁酶;

[0039] (3) 酶固定:取石墨烯粉,经改性处理后,制得改性石墨烯粉;将改性石墨烯粉加蒸馏水,超声分散均匀,制成浓度为1g/ml的石墨烯悬浮液;向石墨烯悬浮液中加入改性石墨烯质量4倍的单宁酶,在40℃下搅拌处理40-50min,真空冷冻干燥制得固定化酶;

[0040] (4) 酯化反应:将8kg固定化酶添加到有机溶剂苯中,并加入固定酶质量0.12%的硫酸镁,搅拌均匀后,立即加入0.8mol没食子酸和8L正丙醇,加温至40℃,保温,200r/min搅拌反应8h后,超声处理20min,继续200r/min搅拌反应8h,过滤,获得石墨烯滤渣和滤液;

[0041] (5) 反应后处理:石墨烯滤渣回充分重复使用;滤液按照常规方法进行回收有机溶剂苯、干燥处理,制得没食子酸丙酯。

[0042] 所述筛选培养基、生产培养基的组成为:5g/L单宁酸、15g/L葡萄糖、0.5g/L MgCl₂、0.5g/L K₂HPO₄、0.6g/L NaNO₃、0.02g/L FeSO₄;黑曲霉菌、黑曲霉孢子均是按照5%接种量接种。

[0043] 所述石墨烯粉的改性处理为:将石墨细粉放入其质量10倍的浓硫酸溶液中,在60-70℃下回流改性2h,冷却后,过滤后,水冲洗净石墨烯表面的浓硫酸,干燥,制得氧化石墨烯;再将氧化石墨烯加入等质量的水中,加入氧化石墨烯质量3%的聚丙烯酰胺,再加入聚丙烯酰胺质量5%的硫酸铵,在85℃下反应4h,过滤,洗涤,干燥,制得改性石墨烯。

[0044] 所述步骤(4),超声处理的功率为40W、频率为15kHz。

[0045] 上述实施例2中没食子酸丙酯的产率为60.7% (以没食子酸计)。

[0046] 实施例3

[0047] 一种固定化酶法催化合成没食子酸丙酯的方法,包括以下步骤:

[0048] (1) 产酶菌筛选:将黑曲霉菌接种到筛选培养基,在28-30℃下培养6天,挑选出长势好的黑曲霉孢子;

[0049] (2) 单宁酶生产:将挑选的黑曲霉孢子,接种到生产培养基中培养,在在28-30℃下培养3天,将获得培养液按照常规技术经过滤、分离、葡萄糖凝胶色层析、真空冷冻干燥处理,制得单宁酶;

[0050] (3) 酶固定:取石墨烯粉,经改性处理后,制得改性石墨烯粉;将改性石墨烯粉加蒸馏水,超声分散均匀,制成浓度为1g/ml的石墨烯悬浮液;向石墨烯悬浮液中加入改性石墨烯质量4倍的单宁酶,在40℃下搅拌处理40-50min,真空冷冻干燥制得固定化酶;

[0051] (4) 酯化反应:将10kg固定化酶添加到100L有机溶剂苯中,并加入固定酶质量0.2%的硫酸镁,搅拌均匀后,立即加入1mol没食子酸和10L正丙醇,加温至40℃,保温,200r/min搅拌反应10h后,超声处理20min,继续200r/min搅拌反应8h,过滤,获得石墨烯滤渣和滤液;

[0052] (5) 反应后处理: 石墨烯滤渣回充分重复使用; 滤液按照常规方法进行回收有机溶剂苯、干燥处理, 制得没食子酸丙酯。

[0053] 所述筛选培养基、生产培养基的组成为: 5g/L 单宁酸、15g/L 葡萄糖、0.5g/L $MgCl_2$ 、0.5g/L K_2HPO_4 、0.6g/L $NaNO_3$ 、0.02g/L $FeSO_4$; 黑曲霉菌、黑曲霉孢子均是按照5%接种量接种。

[0054] 所述石墨烯粉的改性处理为: 将石墨细粉放入其质量10倍的浓硫酸溶液中, 在60-70℃下回流改性2h, 冷却后, 过滤后, 水冲洗净石墨烯表面的浓硫酸, 干燥, 制得氧化石墨烯; 再将氧化石墨烯加入等质量的水中, 加入氧化石墨烯质量3%的聚丙烯酰胺, 再加入聚丙烯酰胺质量5%的硫酸铵, 在85℃下反应4h, 过滤, 洗涤, 干燥, 制得改性石墨烯。

[0055] 所述步骤(4), 所述超声处理的功率为40W、频率为15kHz。

[0056] 上述实施例2中没食子酸丙酯的产率为61.1% (以没食子酸计)。

[0057] 实施例4

[0058] 实施例4与实施例1的区别在于单宁酶没有进行固定化处理, 反应过程中直接添加的单宁酶而不是固定化酶; 其余过程相同。

[0059] 实施例4中没食子酸丙酯的产率为41.3% (以没食子酸计)。

[0060] 实施例5

[0061] 实施例5与实施例1的区别在于酯化反应过程中没有添加激活剂; 其余过程相同。

[0062] 实施例5没食子酸丙酯的产率为46.7% (以没食子酸计)。

[0063] 实施例6

[0064] 实施例6与实施例1的区别在于酯化反应过程中没有采用超声进行处理, 其余过程相同。

[0065] 实施例6没食子酸丙酯的产率为52.6% (以没食子酸计)。

[0066] 在此有必要指出的是, 以上实施例和试验例仅限于对本发明的技术方案做进一步的阐述和理解, 不能理解为对本发明的技术方案做进一步的限定, 本领域技术人员作出的非突出实质性特征和显著进步的发明创造, 仍然属于本发明的保护范畴。