

酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸

杨顺楷* 杨亚力

(中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 概述了黑曲霉单宁酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸的原理和方法、酶源菌种的分离和选育、工艺技术的特点、产品质量规格及在国内食品、医药行业相关部门的应用等。该酶法生产工艺具有原辅料来源易得、菌种单宁酶活力高、生产性能较稳定、生产成本低廉、工艺操作方便、产品质量优等特点。

关键词: 没食子酸; 酶法; 黑曲霉; 单宁酶; 五倍子单宁酸

Enzymatic Synthesis of Gallic Acid from Tannic Acid

YANG Shun-kai, YANG Ya-li

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Chengdu 610041, China)

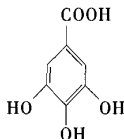
Abstract: The principle and method for enzymatic synthesis of gallic acid, isolation and selection of the *Aspergillus niger* strains, characteristics of this biotechnology, products quality of gallic acid and the uses in domestic food and pharmaceutical industries are briefly introduced. The process exhibits advantages of easily available raw materials, high tannin enzyme activity, stable production, low cost, easy operation and excellent product quality.

Key words: gallic acid; enzymatic process; *Aspergillus niger*; tannin enzyme; tannic acid

1 产品介绍

1.1 没食子酸的理化性质

没食子酸(Gallic Acid, GA), 又称倍酸, 五倍子酸, 为白色或淡黄色针状结晶或粉末, 通常是以一水合物的形式存在, 比重 1.694, 熔点 235 ~ 240℃ (分解)。加热至 100 ~ 120℃ 时, 失去结晶水; 加热至 200℃ 以上时, 失去 CO₂ 而生成焦性 GA; 易溶于热水、乙醚、乙醇、丙酮及甘油, 难溶于冷水, 不溶于苯、乙酸及氯仿; 大鼠皮下注射致死剂量为 4000mg/kg; 水溶液的 pH 值为 3 ~ 4; 具有强还原性, 有收敛性涩味, 能够还原金、银的盐类和费林氏溶液, 与三氯化铁作用产生蓝黑色沉淀, 当前主要以五倍子或塔拉为原料生产的精细化学品。结构式如下:



1.2 研究与开发背景

没食子酸应用范围很广, 可用于有机合成、染料、医药、食品、化工、制革、日化、农业、矿产等方面, 主要用于药物、染料、墨水制造, 也用做食品抗氧化剂、防腐剂、金属提取剂、紫外线吸收剂、消毒剂、止血收敛剂、显影剂、化学试剂、泥浆流化剂和葡萄糖生长剂等。以没食子酸为原料, 合成的主要产品及中间体有焦性没食子酸、没食子酸酯类化合物、三羟基苯甲酰胺、三甲氧基苯甲醛(TMB)和三甲氧基苯胺嘧啶(TMP)等。近年来, 美国微电子工业采用电子化学品级的高纯度没食子酸洗涤大规模集成电路板。目前, 没食子酸全国年产量约为 2000t, 产品除满足国内需求外, 还销往国外。

没食子酸的传统生产工艺是化学水解工艺, 即将五倍子用热水浸提, 滤除残渣, 得五倍子单宁酸溶液; 经浓缩, 浓度为 20% 左右的单宁溶液加入无机酸或碱进行直接水解, 水解产物为没食子酸和葡萄

* 收稿日期: 2004-12-28

作者简介: 杨顺楷, 男, 研究员, 主要从事工业生物催化及生物加工过程的研究与开发工作, 已发表论文 80 余篇。

糖,反应混合物再经分离、脱色、精制结晶、干燥,得到成品没食子酸。该工艺的主要缺点是:单宁水解不完全,没食子酸收率较低,产品质量不稳定,设备腐蚀严重,对低品位的五倍子原料如倍花等不能利用,生产成本低,脱色时活性炭用量多,更重要的是有机废液对环境污染严重。

酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸新工艺具有生物催化剂的制备和生物转化反应两个明显阶段的特点。与传统化学水解法相比,酶法最显著的特点是底物水解完全;水解副产物葡萄糖可作为能源与碳源被生物催化剂代谢,不仅提高资源的有效利用率,而且发酵废液易于处理,对环境友好;水解工

艺在常压条件下的生理水相中进行生产操作,反应条件温和,能耗低。生物反应器紧凑,产物组分单一,易于后加工处理及产品的深加工。

2 酶法转化生产没食子酸

2.1 原理和方法

单宁酶(EC 3.1.1.20)属于胞外诱导的酰基水解酶,是一种具有水解催化性能的生物催化剂,可高效、专一、定向裂解底物中的酯键、缩酚键和糖苷键。它已经在丝状真菌、酵母、细菌、植物和动物等体内发现,主要存在于曲霉属的黑曲霉中。单宁酶转化五倍子单宁酸生产没食子酸的反应过程见图1。

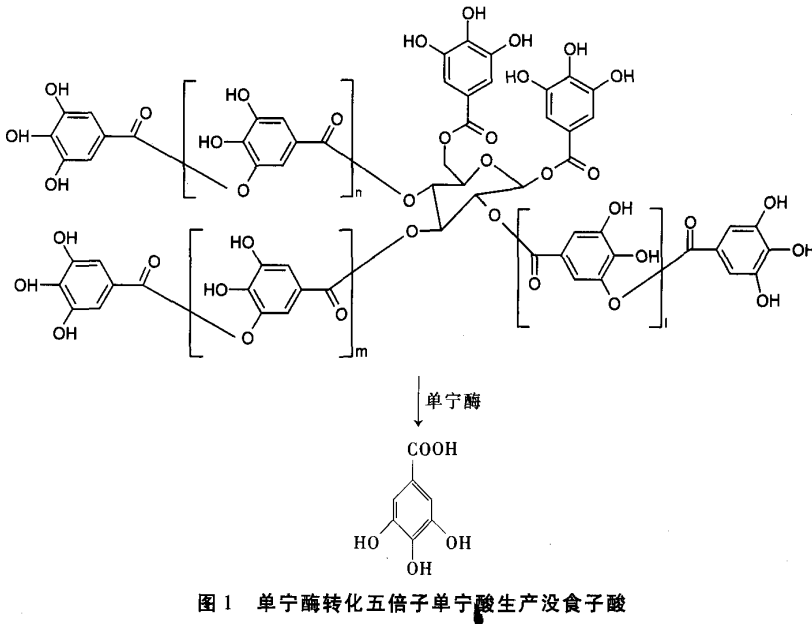


图1 单宁酶转化五倍子单宁酸生产没食子酸

2.2 酶源菌种的分离和选育

从我国西南地域天然源采样,经富集培养技术,定向分离具有高单宁酶活性的黑曲霉菌株;再经Ⅱ级发酵培养/生物转化筛选程序,选出一批高活性菌株;结合择优评估单宁酶活性生长培养物菌株,选择出供理化定向诱变的出发菌株进行紫外线照射和原生质体融合,结合结构类似物的平板选择和选择性诱导培养基的摇瓶 n 级筛选,最终获得一株高单宁酶活性产生菌黑曲霉(*Aspergillus niger* CIBAS Y-33)菌株,作为PAL酶源菌种供研制用。

2.3 酶法生产没食子酸新工艺

成都和倍生化有限公司于2002年12月与中国科学院成都生物研究所签订了“没食子酸酶法中试

技术开发项目”的技术开发合同,由此展开了对“酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸新工艺”项目的立项开发。2004年11月该项目通过了由四川省科技厅组织有关专家对本工艺的成果鉴定。在中间试验中没食子酸产品的主要工艺指标:①发酵液中没食子酸累积的浓度达到50~67g/L;②对五倍子单宁酸的转化率为92.1%,接近定量转化;③粗品经由大孔吸附树脂柱层析分离精制,产率为85.6%;④产品纯度:没食子酸含量为99.5%(抽检结果),符合GB5309-85中特级品要求,外观性状为白色结晶性粉末;⑤经测算,优化工艺后没食子酸产品单耗为2.5t/t,车间直接成本为5万元/t。

(下转第15页)

1.2 6-氯咪唑并[1,2-b]哒嗪的合成

6-氯-3-氨基哒嗪 21g、40%的一氯乙醛水溶液 163g 及 105mL 水在 170℃ 反应 7h, 冷却, 加入 1.5g 活性炭, 室温搅拌 1h, 过滤、水洗, 滤液中含 6-氯咪唑并[1,2-b]哒嗪 30.2g, 收率 98.1%。

以 6-氯-3-氨基哒嗪 1.296g, 13mL 乙醇, 一定量的 40% 的一氯乙醛水溶液反应合成 6-氯咪唑并[1,2-b]哒嗪的条件试验结果见表 2。

表 2 合成 6-氯咪唑并[1,2-b]哒嗪的条件试验结果

实例	反应温度/℃	反应时间/h	收率/%
1	175	6.5	85
2	175	5	86
3	175	4	90
4	176	3	91
5	175	4	95
6	175	3	98
7	175	3.5	96

1.3 咪唑并[1,2-b]哒嗪的合成

压力釜中加入含 6-氯咪唑并[1,2-b]哒嗪 30.2g 的水溶液 60mL, 10% Pd/C 催化剂 2.2g, 在 5kg/cm² 氢气压力下室温反应 5h, 滤去催化剂, 减压浓缩, 浓缩液中加入 100mL 异丙醇, 共沸去水约 34mL, 降温至 15℃ 维持 1h, 过滤, 用 60mL 异丙醇洗

涤滤饼, 干燥得 22.8g 咪唑并[1,2-b]哒嗪盐酸盐, 含量 100%, 收率 92.3%。

还可以采用的合成方法是: 200mL 压力釜中加入 6-氯咪唑并[1,2-b]哒嗪 5.723g, 甲醇 190mL, 三乙胺 6.07g, 5% Pd/C 1.5g, 在 30kg/cm² 氢气压力下室温反应 10h, 滤去催化剂, 减压浓缩去甲醇, 加入 15mL 水溶解析出结晶, 二氯甲烷萃取 (15mL × 3), 有机层用水 3.75mL 洗涤, 2g 无水硫酸钠干燥, 减压去溶剂, 得白色结晶 3.325g, 收率 90%, 纯度 98.5%。

2 用途

咪唑并[1,2-b]哒嗪主要作为合成头孢类抗生素的侧链中间体, 如头孢唑兰 (Cefozopran) 等, 头孢唑兰是由日本的武田药品公司开发的第四代头孢类抗生素, 用于严重的呼吸道、泌尿系统感染。

3 生产及需求

咪唑并[1,2-b]哒嗪目前主要为日本公司生产, 生产能力在 5t/a 左右, 国内由于开发头孢唑兰的需要, 有寻货的要求, 但未见生产报道。该中间体合成难度较大, 成为国内开发头孢唑兰的瓶颈。□

(上接第 13 页)

黑曲霉单宁酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸新工艺技术特点如下: ①原料五倍子和主要辅料来源方便, 市场采购容易, 原料资源丰富; ②生物催化剂黑曲霉细胞物的深层培养发酵、生物转化等工艺均具有工业化的可操作性, 工艺操作简便易行, 条件相对温和, 生产性能较稳定; ③产物回收率高, 基本达到定向转化, 增强了产品的市场竞争力; ④作为生物催化剂使用的黑曲霉菌丝物质可重复使用多次, 其酶水解活性基本保持同等水平; ⑤废黑曲霉菌丝体生物量大, 可进行综合开发高附加值的医药中间体麦角固醇、壳聚糖水处理剂等, 变“废”为“宝”; ⑥高单宁酶酶活/酶量的黑曲霉菌种遗传结构改良和更加有效的生物反应器应用存在较大研发空间, 故工艺过程的进一步优化配置及提高没食子酸的产率存在较大潜力。

该酶法生产没食子酸的新工艺是借助由中科院

成都生物所分离选育的一株黑曲霉菌株, 经 II 级种子罐-发酵罐通气搅拌液体深层培养, 制备具有高单宁酶水解活性的细胞培养物, 以此作为生物催化剂, 以一定比例投加底物, 保温反应, 直接水解底物生产目标产物没食子酸。当液体反应混合物中没食子酸积累浓度达到最高时, 终止反应, 进入中下游加工。经由板框压滤、调酸、活性炭脱色脱胶、过滤、真空浓缩、冷却结晶、过滤, 得没食子酸粗结晶。然后经由大孔吸附树脂柱层析精制, 得没食子酸成品。

酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸新工艺具有创新性, 技术水平已达到同类研究先进水平, 产品的市场优势明显; 新工艺具有资源利用率高, 能耗低, 对环境友好的特点, 具有典型的工业生物催化及生物加工过程的绿色化学化工的特点, 完全符合国家“以生物可再生资源为原料、对环境友好、过程高效的”循环经济产业政策与导向, 符合新世纪全球生物化工过程工业开发的发展方向。□