

文章编号: 1001-411X(2002)03-0084-03

# 山梨酸酯的合成与抗菌作用研究

黄志良<sup>1,2</sup>, 战 宇<sup>2</sup>, 宁正祥<sup>2</sup>, 郭新竹<sup>2</sup>

(1 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642; 2 华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 采用直接酯化法, 将山梨酸与四种醇反应, 合成了山梨酸甲酯、乙酯、丙酯、丁酯。合成产率达到 60%~70%。这几种化合物均表现出良好的抗菌活性, 与山梨酸相比较, 可延长微生物生长适应期 8~20 h, 并明显降低微生物生长量。

**关键词:** 山梨酸酯; 合成; 抗菌作用

**中图分类号:** TS202.3

**文献标识码:** A

研究开发广谱、高效、低毒的防腐保鲜剂在食品加工、果蔬贮藏等方面有重要实用价值。山梨酸是目前国内外广泛使用的一种防腐剂, 对霉菌、酵母及需氧菌均有抑制作用, 对哺乳动物的毒性极低。但山梨酸在应用上也有不足之处, 由于山梨酸是天然存在的有机酸, 易被微生物分解代谢, 抗菌作用时效短, 其抗菌作用也不够强, 对微生物抑制能力有限, 对乳酸菌及厌氧性芽孢菌无效, 只适宜在偏酸性的条件下使用, 使用范围受到很大限制。山梨酸酯是一类新型的山梨酸衍生物, 何建真等<sup>[1]</sup>对山梨酸乙酯进行了报道, 但对其合成与抗菌作用未进行深入研究, 山梨酸的其他酯类衍生物还鲜见有研究报道。本实验采用直接酯化法, 合成山梨酸甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等一系列酯, 研究了这几种山梨酸酯对不同种类微生物的抑制作用, 为山梨酸酯类衍生物的开发和应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用菌种: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由华南农业大学食品学院微生物教研室提供, 牛奶酸败菌取于华南农业大学乳品厂变质牛奶。

营养肉汤培养基: 牛肉膏 5 g、氯化钠 5 g、蛋白胨 10 g、葡萄糖 10 g, 加水至 1 000 mL, 调整 pH 为 7.6~7.8。用于大肠杆菌和牛奶酸败菌的培养。

豆芽汁培养基: 取黄豆芽 200 g, 切碎, 加水煮沸, 取汁, 加葡萄糖 20 g, 加水至 1 000 mL。用于啤酒酵母的培养。

山梨酸、甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、盐酸、硫酸、BF<sub>3</sub>·乙

醚、碳酸氢钠、乙醚等均为分析纯试剂。

### 1.2 山梨酸酯的合成

在装有冷却回流装置的圆底烧瓶中加入 11.2 g (0.1 mol) 山梨酸和 0.5 mol 上述 4 种醇之一, 0.02 mol 酯化反应催化剂, 其中盐酸 0.01 mol, BF<sub>3</sub> 0.01 mol。水浴加热, 使反应体系保持微沸, 回流反应 4 h。反应结束后, 倒入 200 mL 水中, 加入 50 mL 乙醚, 装入分液漏斗, 用  $\rho=10$  mg/L 的碳酸氢钠溶液和蒸馏水洗涤乙醚层至中性, 收集乙醚层。减压蒸去乙醚, 得浅黄色油状液体产物<sup>[3]</sup>。

### 1.3 微生物生长抑制实验

采用分光光度法<sup>[3]</sup>。在大小一致的三角瓶内加入 100 mL 营养肉汤培养基, 高压灭菌, 在无菌条件下, 接种处于平稳生长期的供试菌液 0.2 mL, 分别加入山梨酸酯和山梨酸, 使培养基中山梨酸酯和山梨酸达到所要求的浓度 ( $\rho=600$  mg/L), 并设一无添加抗菌剂的空白对照组。置于 37℃ 水浴摇床培养, 按一定时间间隔取出菌液, 测定其在 560 nm 下的吸光度。按下式计算接种后  $n$  h 的抑菌率 ( $I_R$ ):

$$I_R = \frac{\Delta A_{n,c} - \Delta A_{n,l}}{\Delta A_{n,c}} \times 100\%$$

$\Delta A_{n,c}$  和  $\Delta A_{n,l}$  分别是对照与处理样品在  $n$  h 的  $A_{560\text{ nm}}$  值和接种时 ( $n=0$ )  $A_{560\text{ nm}}$  的差值。

### 1.4 抗菌剂抑菌效果衰减函数的回归分析

一般情况下, 抗菌剂的抑菌效果是时间衰减函数  $I_R = I e^{-\mu t}$ , 式中  $I$  为抗菌剂在供试浓度下的最高理论抑菌率,  $\mu$  为衰减系数,  $I_R$  为抑菌率。利用抗菌剂在  $n$  时刻对应的抑菌率等一系列数据, 可回归分析得到衰减函数。从衰减函数可求知抗菌剂抗菌作用的半衰期  $T_{1/2}$  值。 $T_{1/2}$  可定义为防腐剂抑菌率下

降到初始抑菌率一半时所需要的时间<sup>[4]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 产物性质

在常温下, 产物为淡黄色油状液体, 各产物的熔点分别是山梨酸甲酯 6℃, 山梨酸乙酯 -22℃, 山梨酸丙酯 -33℃, 山梨酸丁酯 -65℃。

2.2 山梨酸酯的合成

2.2.1 催化剂对山梨酸酯合成的影响 本实验是采用直接酯化法合成山梨酸酯。直接酯化反应是醇羟基对羧酸的羰基碳的亲核加成—消除反应。羰基碳的正电性是亲核试剂对其进攻的原因, 酯化反应的难易与被酰化的官能团上孤对电子活性和酰化剂羰基碳的正电性有关。室温下, 直接酯化反应速度非常慢, 加热和使用催化剂是提高反应速度的有效方法, 直接酯化反应可用的催化剂有硫酸、盐酸、对甲苯磺酸、BF<sub>3</sub> 等<sup>[3]</sup>。

硫酸、盐酸、对甲苯磺酸等强酸型催化剂释放出 H<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> 首先进攻羧基中的羰基氧使其质子化, 提高了羰基碳原子的亲电能力, 有利于醇羟基氧的进攻, 形成新的碳氧键, H<sup>+</sup> 再与中间体上羟基氧结合, 形成𐝓盐, 使难于消除的 -OH 转变成较易消除的 H<sub>2</sub>O, 有利于形成产物<sup>[6]</sup>。HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 相比较, HCl 释放 H<sup>+</sup> 的活性高于 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl 应比 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 具有较强的催化活性, 但实际应用的浓盐酸中含有 64% 左右的水, 降低了 HCl 的催化活性。浓硫酸有强的脱水性和氧化性, 在本实验, 会使原料醇脱水形成醚, 山梨酸也会被氧化, 形成副产物, 不利于酯化反应进行, 故本实验未采用浓硫酸。对甲苯磺酸价格较贵, 一般实验很少使用。

BF<sub>3</sub> 是一种分子型路易斯酸催化剂, 其作用在于提供接受羧酸的羰基氧电子对的接受体, 增强了羰基碳的正电性, 有利于醇羟基的亲核进攻, 催化剂最低空轨道能级越低, 与羰基上氧电子对的配对能力越强, 越有利于酯化反应<sup>[7]</sup>。本实验研究了 0.02 mol 不同催化剂对山梨酸甲酯合成产率的影响, 结果见表 1。

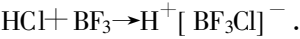
表 1 不同催化剂对山梨酸甲酯合成的影响

Tab. 1 The effect of catalyst on the synthesis of methyl sorbate

| 催化剂 catalyst               | HCl | BF <sub>3</sub> | HCl+BF <sub>3</sub> (1:1) |
|----------------------------|-----|-----------------|---------------------------|
| 合成产率                       |     |                 |                           |
| rate of synthesis yield/ % | 56  | 60              | 72                        |

由表 1 可见, 0.02 mol 的 HCl+BF<sub>3</sub>(0.01 mol HCl 与 0.01 mol BF<sub>3</sub>) 具有最高的催化效率, 说明 HCl 与

BF<sub>3</sub>同时使用, 催化效率比单独使用要高, 强酸型催化剂与分子型路易斯酸催化剂之间可产生增效作用, HCl 与 BF<sub>3</sub> 相遇时, 可按如下方式产生超强酸:



此超强酸为酯化反应极有效催化剂, 这也是 HCl 与 BF<sub>3</sub> 具有增效作用的原因。其他几种山梨酸酯的合成就采用 0.02 mol 的 HCl+BF<sub>3</sub> 作为催化剂。

2.2.2 投料比对山梨酸酯合成的影响 酯化反应为可逆反应, 根据质量作用定律, 使反应原料之一大大过量, 或将生成物不断从反应体系中分离, 可使反应进行更完全, 提高酯的收率。在本实验中, 加大了醇的量, 使 n(山梨酸):n(醇)=1:5。选择醇过量的原因是: 一醇的价格较低, 二醇是山梨酸的良好溶剂, 加大醇用量, 可保证反应在均相体系中进行, 产物也容易分离。如果让山梨酸过量, 则会有大部分山梨酸不溶。

2.3 山梨酸酯的抗菌活性

山梨酸、山梨酸酯对大肠杆菌、啤酒酵母、牛奶酸败菌的生长抑制实验结果见图 1、2、表 2、3。

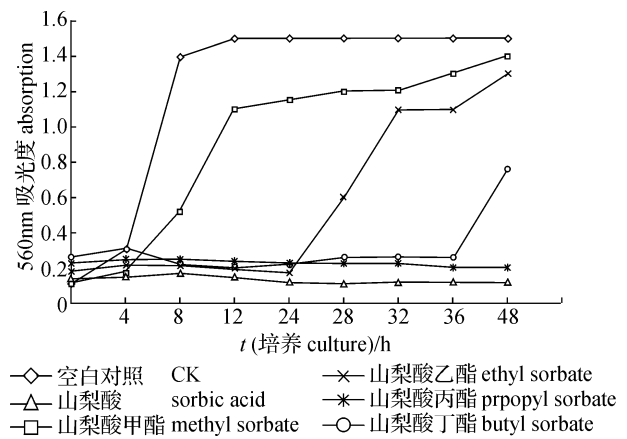


图 1 山梨酸酯对大肠杆菌的抑菌结果  
Fig. 1 The antimicrobial activity of sorbate ester on Escherichia coli

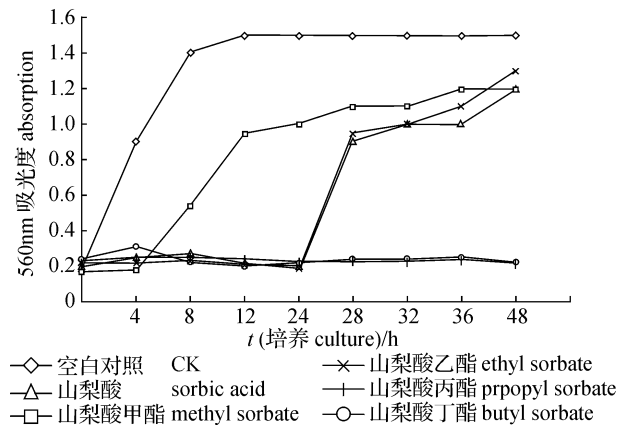


图 2 山梨酸酯对啤酒酵母的抑菌结果  
Fig. 2 The antimicrobial activity of sorbate ester on Saccharomyces cerevisiae

表 2 山梨酸酯对牛乳酸败菌的抑菌结果<sup>1)</sup>

Tab. 2 The antimicrobial activity of sorbate ester on milk spoilage microorganism

| t/h | CK   | 山梨酸<br>sorbic acid | 山梨酸甲酯<br>methyl sorbate | 山梨酸乙酯<br>ethyl sorbate | 山梨酸丙酯<br>propyl sorbate | 山梨酸丁酯<br>butyl sorbate |
|-----|------|--------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0   | 0.10 | 0.10               | 0.12                    | 0.12                   | 0.15                    | 0.14                   |
| 4   | 0.26 | 0.13               | 0.12                    | 0.12                   | 0.15                    | 0.13                   |
| 8   | 0.85 | 0.40               | 0.14                    | 0.12                   | 0.16                    | 0.14                   |
| 12  | 1.20 | 0.66               | 0.18                    | 0.14                   | 0.17                    | 0.15                   |
| 24  | 1.30 | 0.89               | 0.36                    | 0.39                   | 0.20                    | 0.18                   |
| 28  | 1.40 | 1.00               | 0.50                    | 0.55                   | 0.21                    | 0.26                   |
| 32  | 1.40 | 1.10               | 0.62                    | 0.65                   | 0.41                    | 0.46                   |
| 36  | 1.50 | 1.10               | 0.70                    | 0.74                   | 0.53                    | 0.56                   |
| 48  | 1.50 | 1.20               | 0.78                    | 0.90                   | 0.72                    | 0.67                   |

1)表中数据为 560 nm 吸光度

从图 1、2、表 2 可看出,与山梨酸相比较,几种山梨酸酯可有效延长微生物生长适应期(lag phase),微生物的生长量明显减小.牛乳酸败菌是很难抑制的一类菌群,其所含的微生物主要是细菌和酵母菌,如果防腐剂能有效抑制变质牛奶混合菌群的生长,其抑菌活性都较强.山梨酸对牛奶酸败菌的抑制作用很小,生长适应期仅为 4 h,而在几种山梨酸酯作用下,菌群生长适应期延长达到 12~24 h.

通过对山梨酸和山梨酸酯对牛乳酸败菌抑菌效果的衰减函数回归分析,得到抑菌效果参数见表 3.

表 3 山梨酸与山梨酸酯抗菌性能的比较

Tab. 3 The antimicrobial activity comparison of sorbic acid and sorbate ester

| 抗菌剂<br>antimicrobial agent | 最高理论抑菌率( <i>I</i> )                      | 衰减系数( $\mu$ )         | $T_{1/2}/h$ |
|----------------------------|------------------------------------------|-----------------------|-------------|
|                            | highest theoretical antimicrobial rate/% | attenuation parameter |             |
| 山梨酸 sorbic acid            | 77                                       | 0.0303                | 22.9        |
| 山梨酸甲酯 Methyl sorbate       | 110                                      | 0.0160                | 43.2        |
| 山梨酸乙酯 ethyl sorbate        | 117                                      | 0.0202                | 34.4        |
| 山梨酸丙酯 propyl sorbate       | 112                                      | 0.0113                | 61.6        |
| 山梨酸丁酯 butyl sorbate        | 112                                      | 0.0114                | 60.6        |

最高理论抑菌率反映了抗菌剂的抑菌强度,而衰减系数和半衰期反映了抑菌作用的稳定性.由表 3 可见,与山梨酸相比,山梨酸酯的半衰期更长,衰减

系数更小,理论抑菌率也提高了,说明山梨酸酯的抗菌性能要显著优于山梨酸.几种山梨酸酯相比较,丙酯、丁酯的抗菌活性要大于甲酯、乙酯.

山梨酸为机体正常存在的有机酸,是酶促合成的天然有机化合物,容易被微生物代谢分解,在菌体内难以长存,而微生物要分解山梨酸酯,首先要利用脂肪酶,将其分解为山梨酸和相应醇,再进一步分解,而微生物脂肪酶的活性一般都很低,分解山梨酸酯的速度比分解山梨酸慢得多,故山梨酸酯的抗代谢性增强,从而使抗菌活性提高,抗菌作用的时效更长.另一方面,山梨酸形成山梨酸酯后,其疏水性增强,更易渗透到微生物膜中,干扰膜的生理功能,也使抗菌活性提高.

3 结论

本实验研究了山梨酸酯的合成方法及其抗菌活性,合成了山梨酸甲酯、乙酯、丙酯、丁酯.山梨酸经酯化后抑菌强度显著增强,抑菌作用半衰期延长,稳定性大大提高,具有一定的开发应用前景.但本实验中采用的山梨酸酯的合成方法有待进一步改进,以提高合成效率.

参考文献:

[1] 何建真,王继燕,陈竞宇.山梨酸乙酯制备方法及其应用[J].广西化工,1998(2):30-32.  
[2] 段行信.实用精细有机合成手册[M].北京:化学工业出版社,2000.125-132.  
[3] 宁正祥,高建华,黄凯玲,等.溴代山梨酸和桂酸甲酯的合成及其抗菌特性研究[J].食品与发酵工业,1994,(1):39-43.  
[4] 宁正祥,谭龙飞,张德聪,等. $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和羰基化合物的分子结构特性与抗菌活性间的关系[J].应用化学,1996,13(1):38-42.  
[5] 徐寿昌.有机化学[M].北京:高等教育出版社,1993.330-340.  
[6] 蒋硕健,丁有骏,李明谦.有机化学[M].第2版.北京:北京大学出版社,1996.214-216.  
[7] 宁正祥,战宇.反丁烯二酸桂醇甘醇酯的合成与抗菌作用研究[J].食品科学,2001,22(2):17-20.

Research on the Synthesis and Antimicrobial Activity of Sorbate Ester

HUANG Zhi-liang<sup>1,2</sup>, ZHAN Yu<sup>2</sup>, NING Zheng-xiang<sup>2</sup>, GUO Xin-zhu<sup>2</sup>

(1 College of Food Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Food and Bioengineering, South China Univ. of Tech., Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Methyl, ethyl, propyl and butyl sorbates were synthesized by esterification of sorbic acid with four kinds of alcohol respectively. The rate of synthesis yield was 60%~70%. The antimicrobial activity of the four synthesized compounds was tested. The results show that these compounds can prolong the lag phase by 8~20 hours and effectively reduce the biomass of microorganism.

**Key words:** sorbate ester; synthesis; antimicrobial activity

【责任编辑 李晓丹】