皱褶假丝酵母脂肪酶催化合成 V_E 阿魏酸酯的研究

陈贵佺，郑二丽
（广州市凯虹香精香料有限公司，广东广州 510550）

摘要： 本文研究了反胶束体系中利用褶皱假丝酵母脂肪酶催化维生素 E 和阿魏酸乙酯合成维生素 E 阿魏酸酯的反应。通过单因素试验利用褶皱假丝酵母脂肪酶在 AOT-异辛烷-水反胶束体系中催化阿魏酸乙酯和维生素 E 反应 136h 生成 V_E 阿魏酸酯，并研究了含水率、转速、温度、缓冲液 pH 值、AOT 的浓度等反应条件对 V_E 阿魏酸酯合成的影响。通过均匀设计法设计实验，并对结果进行二次多项式逐步回归分析，得到一组最优合成的反应条件，即含水率 10、AOT 浓度 80 mmol/L、缓冲液 pH 值 5.0、温度 25 ℃、转速 270 rpm，V_E 阿魏酸酯的得率为 15.36%。

关键词： 丁二酸二(2-乙基己基)酯磺酸钠；V_E 阿魏酸酯；脂肪酶
文章篇号： 1673-9078(2013)2-376-379

Candida rugosa Lipase Catalytalzed Synthesis of Alpa-tocopheryl Ferulate

CHEN Gui-quan[1], ZHENG Er-li[2]
(Guangzhou Kaihong Flavor & Fragrance Co., Ltd.,Guangzhou 510550, China)

Abstract: In this paper, *Candida rugosa* lipase (CRL) catalyzed reaction of vitamin E and ferulic acid ethyl ester were studied to synthesize alpa-tocopheryl ferulate in the reverse micelle system. Through single factor test and the use of the enzyme in AOT-iso-octane-water reverse micelle system, vitamin E and ferulic acid ethyl ester were catalyzed to synthesize alpa-tocopheryl ferulate after the 136 h reaction. And the influential factors of the synthetic product, such as the moisture content, speed, temperature, buffer pH, AOT concentration reaction conditions, were studied. Through the uniform design experiment and quadratic polynomial stepwise regression analysis of the results, the optimal reaction conditions of synthetic product were gained as follows: moisture content 10%, AOT concentration of 80mmol/L, the buffer pH5.0, temperature 25 ℃, speed 270 rpm, under which the V_E Ferulate obtained was 15.36%.

Key words: AOT; alpa-tocopheryl ferulate; lipase

维生素 E 阿魏酸酯(Alpha-tocopheryl ferulate)是 V_E 的衍生物，由于丧失了自由的羟基而不具有 V_E 的抗氧化活性，在空气中较为稳定，因其可保护 α-生育酚的 6 位羟基，使 α-生育酚在储存和运输中稳定性增加[1]，同时它保持了阿魏酸诸多的生理活性[2~4]，克服了由于其烷烃链短而无法在油脂工业中应用的弊端。脂肪酶(lipase，EC3.1.1.3,甘油酯水解酶)，是一类特殊的酯键水解酶，主要水解由甘油和 12 个碳原子以上的不溶性长链脂肪酸形成的甘油酯[5]，脂肪酶(EC3.1.1.3)在洗涤剂、油脂化学、有机化工、制药等领域有着重要的作用[6]。与传统的化学法合成相比，酶催化方法具有反应条件温和、高效、专一、节约能源和不污染环境等优点，但脂肪酶催化反应的底物维生素 E、阿魏酸乙酯以及脂肪酶之间因溶解度差异而互不溶解，造成底物与底物及催化剂脂肪酶之间接触困难使反应较难发生，借助表面活性剂丁二酸二酯磺酸钠(AOT)在有机溶剂中构成低含水量的反胶束体系，不仅使底物阿魏酸乙酯分散，接触相对容易，而且由于反胶束体系扩大了油水形成的界面，在保护脂肪酶的活性的同时，还极大地提高了脂肪酶的催化活性。反胶束是一种由表面活性剂(有时还需有助表面活性剂)在含少量水的非极性溶剂中自发形成的透明或半透明的热力学稳定系统[7~8]。反胶束可以在有机溶剂中增溶水溶性化合物[9]，形成纳米级的微型水池[10]，将含反胶束的有机溶液与含脂肪酶的水溶液混和，脂肪酶即可增溶于反胶束的水池中[11]。

本文利用 AOT 形成的反胶束体系，将脂肪酶增溶到反胶束水池中，完成了其催化维生素 E 和阿魏酸乙酯进行酯交换合成 V_E 阿魏酸酯的反应，研究了反胶束体系中各因素对 V_E 阿魏酸酯合成的影响，并得到一组最佳的反应参数。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

高效液相色谱仪（安捷伦公司）；褶皱假丝酵母脂肪酶（Sigma 试剂有限公司）、阿魏酸（国药集团

收稿日期：2012-11-27

作者简介：陈贵佺(1984-)，男，工程师，硕士研究生，食品生物技术

公司）；维生素 E（Fluka 公司）；阿魏酸乙酯（盐城朗德公司）；丁二酸二(2-乙基己基)酯磺酸钠(AOT)（上海试剂二厂）；异辛烷为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 AOT 反胶束本体系的配制

取 0.0889 g 的 AOT，加入 2.5 mL 的异辛烷中，并用漩涡振荡器振荡分散于异辛烷中，待其呈乳浊状时加入 36 μL 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液（pH 值 5.5~8.0），继续搅拌至澄清透明，即得相应浓度的反胶束基本反应体系，常温保存备用。

1.2.2 V_E 阿魏酸酯的合成

在 10 mL 的具塞试管中加入 2.5 mL 的 AOT 反胶束本体系，2.0 mmol 阿魏酸乙酯，2.5 mmol 的 V_E，100 mg 的 CRL 脂肪酶，在温度 25 ℃~50 ℃、含水率（水含量和表面活性剂的摩尔比 W 即含水率）10~20、转速 120~270 rpm、pH 值 5.5~8.0 条件下，空气浴振荡反应 136 h 即得样品。

1.2.3 V_E 阿魏酸酯的 HPLC 定量分析

将反应生成的样品液于 10000 rpm 下离心 20 min 后，上清液用 0.22 μm 微孔过滤膜过滤两次，滤液用 HPLC 法进行分析。

色谱条件：流动相为 100%甲醇，流速为 0.4 mL/min，紫外检测器，检测波长 318 nm，色谱柱为 ODS-C18 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，柱温 30 ℃，进样量为 20 μL。

2 结果与分析

2.1 含水率对合成 V_E 阿魏酸酯的影响

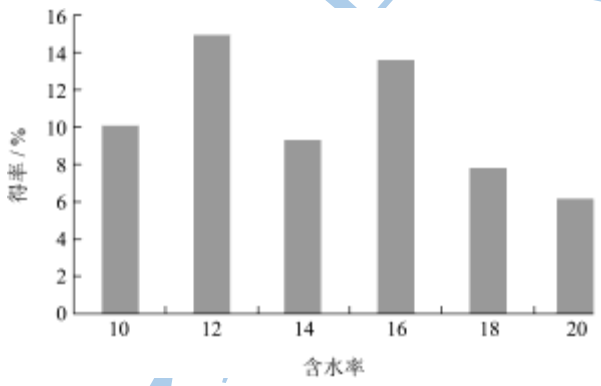


图 1 含水率对合成新产物的影响

Fig.1 Effect of moisture content on the synthesis of new product

如图 1 所示：含水率对 V_E 阿魏酸酯合成的影响呈“锯齿型”曲线的变化规律。在 W 为 12 和 16 时，V_E 阿魏酸酯生成最多，从反胶束的构成角度来说，含水率的高低直接决定着反胶束水池直径的大小，W 较小时，反胶束水池尺寸小，不能完全容纳脂肪酶分子，导致部分酶分子暴露在有机溶剂中失活；W 值太大，反胶束尺寸增大，酶分子虽然能完全增溶于反胶束水池内，但反胶束的稳定性下降，随着反应进行，反胶束之间不断碰撞，导致胶束重新组合，引起部分酶失活。从脂肪酶分子催化活性的角度而言，当 W 太小时，整个反应体系含水量低，反胶束水池中的绝大部分水以表面活性剂结合，用于反胶束的构成，而保持反胶束里酶活性构象所需要的自由水减少，影响酶活力的提高，且形成的反胶束的尺寸不能完全包含酶分子，导致酶的活力不高，随着 W 值的增大，维持酶构象的自由水增多，酶的活性增大，但 W 过大，形成的反胶束不稳定，容易受到剪切力的破坏，导致酶分子外露而失活。因此在本试验过程中选择 W 为 12 和 16 时较为合适。

2.2 转速对合成 V_E 阿魏酸酯的影响

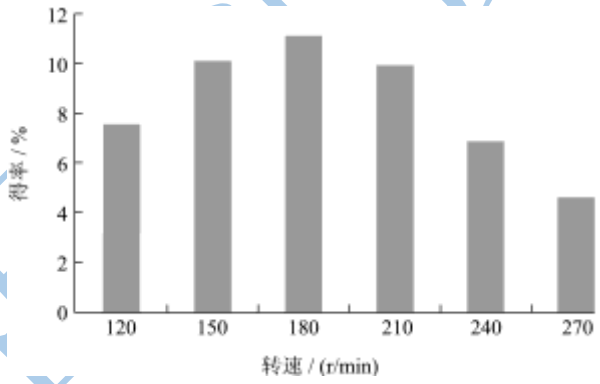


图 2 转速对合成新产物的影响

Fig.2 Effect of speed on the synthesis of new product

转速影响着酶催化反应的传质和传热，同时还会影响底物和酶的接触几率，但反胶束易受到剪切力的破坏，导致酶分子外露而失活。如图 2 可知转速对 V_E 阿魏酸酯合成的影响呈类似“钟罩”型的关系，转速在 150~210 r/min 时，V_E 阿魏酸酯生成最多。随着转速的增加，更多的底物与反胶束中的酶接触，增加了酶的活性，转速在 150~210 r/min 范围内时，酶的活力达到最大，但随着转速的进一步增加，反胶束的稳定性可能受到影响，各胶束之间的碰撞几率增加，导致反胶束之间重新并合和形成，使得部分酶在有机溶剂中失活。在试验过程中，考虑到传质和传热及反胶束的稳定性，控制转速在 150~210 rpm 时较为合适。

2.3 温度对合成 VE 阿魏酸酯的影响

如图 3 所示，在较低的温度范围内，随温度升高，反应速度加快，酶活性升高，转化率升高，温度为 30 ℃时，VE 阿魏酸酯合成达到了最高，符合酶催化反应的一般动力学规律，但超过 30 ℃后，难于保持酶的活性构象，酶活力降低，转化率降低，当温度升至 50 ℃时，VE 阿魏酸酯合成很少，说明假丝酵母脂肪酶活性对温度相对较敏感。因此在本实验中采用 30 ℃为

最适反应温度。

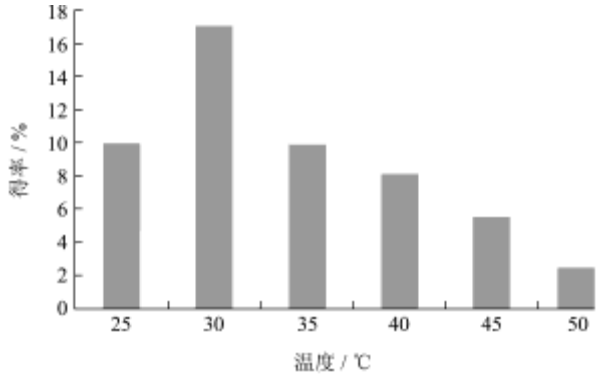


图 3 温度对合成新产物的影响

Fig.3 Effect of temperature on the synthesis of new product

2.4 缓冲液 pH 值对合成 VE 阿魏酸酯的影响

反胶束体系核心水团 pH 值决定酶分子和胶束膜所带电荷的种类，pH 值不仅决定酶的催化构象和在反胶束体系中的溶解能力等，而且其变化也可能引起酶分子与反胶束膜之间相互作用的改变，从而多方面地影响酶的催化活力[12]。

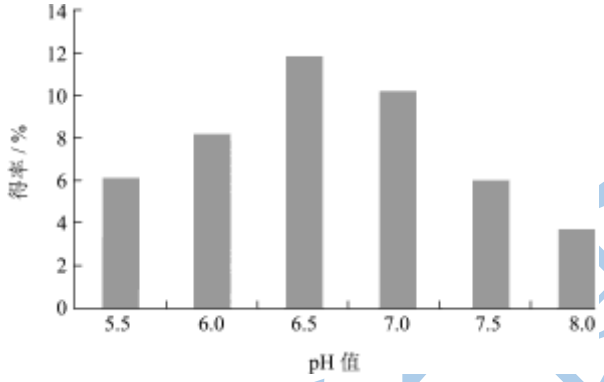


图 4 缓冲液 pH 值对合成新产物的影响

Fig.4 Effect of Buffer pH value on the synthesis of new product

如图 4 所示随着 pH 值的增加，V_E 阿魏酸酯合成增加，当 pH 值为 6.5 时达到最多，pH 值超过 6.5，随着 pH 值得增加而减少。脂肪酶分子上有许多酸性、碱性氨基酸的侧链基团，它随着 pH 值的变化处于不同的解离状态，直接影响底物的结合和进一步反应，从而影响酶的活性，即体系 pH 值的改变将引起酶构象的变化，导致酶的催化活力改变。本实验宜采用 pH 值为 6.5 的缓冲液。

2.5 AOT 的浓度对合成 V_E 阿魏酸酯的影响

表面活性剂的浓度关系到反胶束的形成，要保证在临界胶束浓度以上，才可以形成反胶束。AOT 浓度太低，无法形成反胶束溶液。如图 5 所示，V_E 阿魏酸酯的生成随着 AOT 的浓度增加而增加，但当 AOT 的浓度达到 60 mmol/L 时，VE 阿魏酸酯的生成趋势变缓，考虑到成本问题因此选择 60 mmol/L 浓度的 AOT 为最佳。

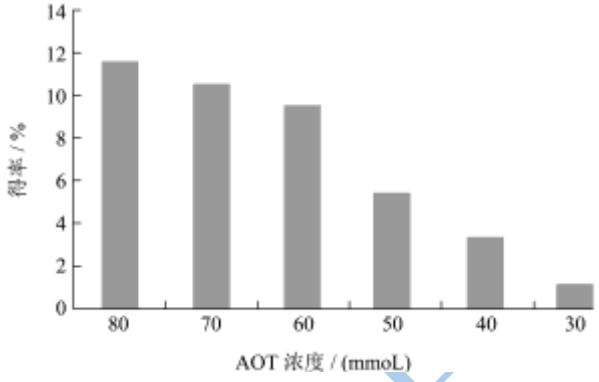


图 5 AOT 的浓度对合成新产物的影响

Fig.5 Effect of AOT concentration on the synthesis of new product

2.6 合成 V_E 阿魏酸酯的反应条件优化

表 1 均匀设计法实验结果表

Table 1 Uniform design experimental results Table

实验号	X_1 (含水率)	X_2 [AOT /(mmol/L)]	X_3 (pH)	X_4 (T/℃)	X_5 [转速 /(r/min)]	得率/%
1	14	60	5.5	30	270	11.4254
2	20	50	6	40	120	1.2289
3	18	70	7.5	45	240	6.5711
4	12	30	6.5	50	210	0.3750
5	16	40	8	25	180	2.8578
6	10	80	7	35	150	7.0873

将实验结果经 DPS 软件数据处理系统[28]二次多项式逐步回归分析，并对该模型进行显著性检验，结果见表 2。

得回归方程：

$$Y=52942.19143-260.55211666X_1*X_3+15.402253089X_2*X_3+7.113483419X_2*X_5-235.99944897X_3*X_4$$

相关系数 R=1，F 值=124999.8，显著水平 p=0.0021，剩余标准差 S=64.9403，说明该方程能很好地拟合 V_E 阿魏酸酯合成的反应过程。

表 2 用二次多项式逐步回归法处理的数据结果

Table 2 Using quadratic polynomial regression of the data processing results

因素	偏相关	t-检验	显著水平 p
X_1*X_3	-1	255.9585	0.0001
X_2*X_3	0.9998	55.9332	0.0003
X_2*X_5	1	913.3925	0.0001
X_3*X_4	-1	534.8879	0.0001

从表 2-2 各变量 t-检验值的大小，可以知道各变量对 V_E 阿魏酸酯合成的影响：X_2*X_5 最大，X_1*X_3、X_3*X_4 次之，X_2*X_3 最小。从以上结果中我们可以知道，因素之间存在交互作用，得到 V_E 阿魏酸酯的一组理论最优反应条件，即含水率 10、AOT 的浓度 80

mmol/L、pH 值 5.5、温度 25 ℃、转速 270 rpm。通过验证试验，该条件符合，V_E 阿魏酸酯的得率为 15.36%。

3 结论

通过均匀设计试验及二次多项式逐步回归分析，得到合成 V_E 阿魏酸酯的一组理论最优反应条件，即含水率 10、AOT 的浓度 80 mmol/L、pH 值 5.5、温度 25 ℃、转速 270 rpm，通过验证试验，该条件符合。

4 展望

本文在 AOT 反胶束体系里用褶皱假丝酵母脂肪酶催化制取维生素 E 阿魏酸酯，研究了酶的最适水解反应条件及其影响因素；并利用单因素和均匀设计试验进行初步优化。AOT 反胶束体系的研究与开发方兴未艾,其特异的性能吸引着人们去进一步开发和探索。随着研究的深入，反胶束技术在脂肪酶催化反应的应用必将会在更广阔的领域体现出其价值所在。

参考文献

[1] Giuliani S, Piana C, Setti L, et al. Synthesis of pentyl ferulate by a feruloyl esterase from Aspergillus niger using water-in oilmicroemulsions[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23: 325-331

[2] David L, Joseph A, Laszlo, et al. Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters [J]. JAOCS, 2000, 77(5): 513-519

[3] Brigelius-Flohe R, Kelly F J, Salonen J T, et al. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(4): 703-716

[4] 辛嘉英,郑妍,赵冠里,等.V_E阿魏酸酯的酶法合成及抗氧化性的研究[J].食品科学,2006,27(10):229-233

[5] 董恒涛,吴晓英,刘仁春,等.假丝酵母脂肪酶催化底物水解的初步研究[J].现代食品科技,2008,24(07):645-649

[6] 周琼,杨继国,王永华,等.一种新型脂肪酶的反应特性及动力学研究[J].现代食品科技,2007,23(09):8-13

[7] Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi [M]. Depigmenting effect of alphatocop-heryl ferulate on normal human melanocytes [J]. Pigment CellRes, 2000, 13Supp l8: 170-174

[8] Fang Xiao Yang, Alan J. Russel. Two step bio-catalytic conversion of to an ester an aldehyde in reverse micelles [J]. Bioteehnol. Bioeng, 1994, 43: 232.24

[9] 禹邦超,刘德立,应用酶学导论[M].武汉:华中师大出版社,1995,25-27

[10] Gavin E Crooks, Gareth D Rees, Brain H Robinson, et al. Comparision of hydrolysis and esterification behavior of humicola lanuginosa and rhizomucor miehei lipases in AOT stabilized Water in oi1 mieroemulsions: I. Effect of PH and water content on Reaction kinetics [J]. Bioteelmol.Bioeng, 1995, 48(l): 78-88

[11] 许建和,茅庆成,英徐根等.反胶团中脂肪酶催化性能的研究[J].生物工程学报,1991,7(4):345-350

[12] 朱浩,施靠等.反相胶束体系中的酶学研究[J].生物化学与生物物理进展,1998,25(3):204-210

[7] Krokida M K, Oreopoulou V, Maroulis Z B, et al. Effect of osmotic dehydration pretreatment on quality of French fries [J]. Journal of Food Engineering, 2001, 49: 339-345

[8] Krokida M K, Oreopoulou V, Maroulis Z B, et al. Effect of pre-drying on quality of French fries [J]. Journal of Food Engineering, 2001 49: 347-354

[9] Gupta P, Shivhare US, Bawa A S. Studies on frying kinetics and quality of French fries [J]. Drying Technology, 2000, 18: 311-321.

[10] Baumann B, Escher F. Mass and heat transfer during deep-fat frying of potato slices. I. Rate of drying and oil uptake [J]. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 1995, 28(4): 395-403

[11] Krokida M K, Oreopoulou V. Water loss and oil uptake as a function of frying time [J]. Journal of Food Engineering, 2000, 44: 39-46

[12] Vitrac O, Dufour D, Trystram G, et al. Characterization of heat and mass transfer during deep-fat frying and its effect on cassava chip quality [J]. Journal of Food Engineering, 2002, 53: 161-176

[13] Gamble M H, Rice P, Selman J D. Relationship between oil uptake and moisture loss during frying of potato slices from c.v. Record U.K.tubers [J]. International Journal of Food Science and Technology, 1987, 22: 233-241

[14] Southem C R, Chen X D, Farid M M, et al. Determining internal oil uptake and water content of fried thin potato crisps [J]. Food and Bioproducts Processing, 2000,78: 119-125

[15] Moreira R G, Palau J E, Sun X. Deep-fat frying of tortilla chips-an engineering approach [J]. Food Technology, 1995, 49: 146-150