

固定化磷脂酶 Lecitase[®] Ultra 催化 合成果糖月桂酸单酯的研究

付敏, 赵谋明, 刘宁, 仇超颖, 赵强忠

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要:利用固定化磷脂酶 Lecitase[®] Ultra 在脱水叔戊醇中催化合成果糖月桂酸单酯。对该酶法合成果糖单酯反应体系进行了优化, 考察了加酶量、酸糖摩尔比、分子筛添加量、糖浓度和时间等几个影响酯化反应的因素。结果表明: 在 4 mL 反应体系中, 固定化磷脂酶 Lecitase[®] Ultra 添加量 25 g/L、酸糖摩尔比 4:1、果糖 250 mmol/L、分子筛添加量 100 g/L、43 °C 下反应 48 h 果糖月桂酸单酯的转化率达到 69.45%。

关键词: 固定化磷脂酶 Lecitase[®] Ultra; 果糖月桂酸单酯; 叔戊醇; 分子筛

文章编号: 1673-9078(2012)9-1153-1156

Synthesis of Monolauroyl Fructose Catalyzed by Immobilized Lecitase[®] Ultra

FU Min, ZHAO Mou-ming, LIU Ning, QIU Chao-ying, ZHAO Qiang-zhong

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Production of monolauroyl fructose catalyzed by immobilized Lecitase[®] Ultra in anhydrous 2-methyl-2-butanol was investigated in this study. The process parameters was optimized as follows: reaction medium 4 mL, biocatalyst 25 g/L, glucose 250 mmol/L, lauric acid 1000 mmol/L, molecular sieves load 100 g/L, temperature 43 °C. The maximum monolauroyl fructose conversion could reach 69.45% after 48 h.

Key words: immobilized Lecitase[®] Ultra; monolauroyl fructose; 2-methyl-2-butanol; molecular sieves

糖酯是一类重要的高效无毒非离子表面活性剂, 具有无毒、无臭、无刺激、易生物降解等优点^[1,2], 因而广泛应用于食品、医药和化工等行业。果糖酯具有一定的抗菌性, 在所有糖酯中, 果糖酯具有最强的细菌抑制效应^[3]。

糖酯的合成方法有化学法和酶法。化学法相对酶法合成生产能耗高且产品的酯化位置和酯化度不易控制; 在化学合成进程中, 高温及碱性催化剂下导致产品色泽较深, 易产生有毒的副产物; 酶法合成果糖酯主要是在中等极性的有机溶剂中(如丙酮, 叔戊醇, 叔丁醇等)反应, 脂肪酶催化脂肪酸和果糖酯化合成果糖酯; 任昌琼等^[4]研究了利用重组脂肪酶全细胞催化单糖酯的合成, 结果显示以果糖为酰基受体时单酯转

化率最高。

水作为非水相酶催化的副产物需及时除去以获得较快的反应速度和较高的转化率, 常用方法有减压蒸馏法^[5]、分子筛法^[6]、减压共沸蒸馏膜分离法^[7]、渗透蒸发^[8]、微波^[9]和饱和盐离子溶液法^[10]。分子筛^[11]除水不需要特殊的工艺流程, 且能重复使用, 成本低廉, 因此得到了广泛的利用。

磷脂酶 Lecitase[®] Ultra (E.C.3.1.1.32) 是 Novozymes 公司推出的一种微生物来源的磷脂酶。该酶是一种羧酸酯水解酶, 同时具有脂肪酶活性和磷脂酶活性。和同类脂肪酶相比, 该类酶的脂肪酶活力高, 价格便宜, 具有很好的应用前景。该酶在工业上主要用于植物油脱胶^[12], 由于酶活高, 且热稳定性较好, 因此具有重要的工业应用价值。

在本试验中首次利用固定化磷脂酶 Lecitase[®] Ultra 催化合成果糖月桂酸单酯, 以无水叔戊醇为反应介质配以分子筛除去副产物水, 以月桂酸为酰基供体, 在较短的时间内即得到了较高的转化率。固定化磷脂酶 Lecitase[®] Ultra 催化合成果糖月桂酸单酯成本低,

收稿日期: 2012-04-27

基金项目: 863 科技计划项目(2010AA101505); 粤港招标项目(2009A020700003)

作者简介: 付敏(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术

通讯作者: 赵强忠(1976-), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向食品生物技术和食品乳化剂

转化效率高,因此在工业上有良好的应用前景。

1 材料与方

1.1 试验材料

磷脂酶 *Lecitase*[®] Ultra, 丹麦诺维信公司; 大孔吸附树脂, 天津海光化工有限公司; D-果糖, 上海伯奥生物科技有限公司; 月桂酸, 天津市大茂化学试剂厂; 4Å 分子筛, 天津市福辰化学试剂厂; 叔戊醇(AR 级), 上海阿拉丁公司; 甲醇, 氯仿等均为分析纯。

1.2 主要仪器

754 型分光光度计, 上海第三分析仪器厂产品; S20 pH 计, 瑞士梅特勒-托利多公司; DZF-6000 型真空干燥箱, 上海益恒实验仪器有限公司; THZ-82A 恒温振荡器, 常州澳华仪器有限公司; Waters 600 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; 蒸发光散射检测器 3300 (ELSD 3300), 美国 Alltech 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 磷脂酶 *Lecitase*[®] Ultra 的固定化

参考文献^[13,14]。

1.3.2 制备脱水有机溶剂

将 4Å 分子筛置于 105 °C 烘箱内活化 10 h, 再置于干燥器内冷却至室温, 备用; 之后, 再将活化后的 4Å 分子筛按照每升溶剂添加 80 g 的量加入到叔戊醇中, 密封放置 72 h, 过滤除去分子筛, 得脱水有机溶剂。

1.3.3 固定化磷脂酶 *Lecitase*[®] Ultra 催化合成果糖月桂酸单酯

25 mL 具塞玻璃瓶中加入 90 mg 果糖, 100~300 mg 月桂酸和 4 mL 脱水叔戊醇, 置于恒温摇床中预平衡 1 h, 100~400 mg 4Å 分子筛, 8~200 mg 固定化磷脂酶, 43 °C 下, 160 r/min 反应 0~120 h, 同时做空白对照试验。

1.3.4 HPLC-ELSD 定量分析方法

色谱柱 XBridge C18 (5 μm, 4.6×150 mm), 流动相 甲醇/水=90:10 (V/V), 流速 0.5 mL/min, 柱温 20 °C, 进样量 10 μL, ELSD 漂移管温度 40 °C, 载气流速 1.5 L/min。

1.3.5 果糖月桂酸酯转化率计算

果糖月桂酸单酯转化率 = 果糖月桂酸单酯的量 (mmol) / 果糖的添加量 (mmol) × 100%。取 3 次平行测定的平均值。

2 结果与讨论

本文以果糖为酰基受体, 月桂酸为酰基供体, 由固定化磷脂酶 *Lecitase*[®] Ultra 催化合成了果糖酯, 反应简式如下:



2.1 最适酶添加量的研究

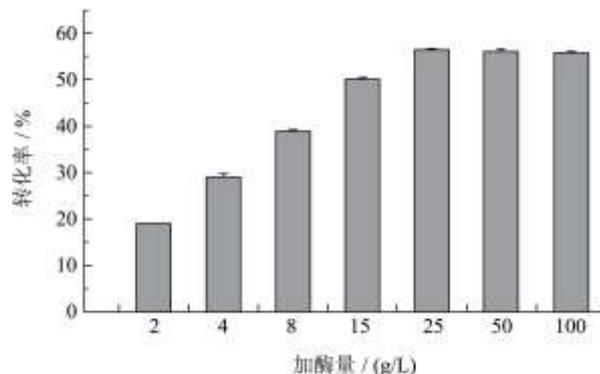


图 1 酶用量对果糖月桂酸单酯转化率的影响

Fig.1 Effect of the amount of enzyme on conversion of monolaurate fructose catalyzed by immobilized *Lecitase*[®] Ultra

注: 反应条件: 溶剂为叔戊醇, 酸糖摩尔比 3:1, 分子筛 50 g/L, 糖浓度 125 mmol/L, 43 °C 反应 24 h。

考察了酶用量从 2 g/L 到 100 g/L 对果糖单酯转化率的影响, 如图 1。当加酶量低于 25 g/L 时, 果糖单酯的转化率随加酶量的增加而增大; 继续增加酶的添加量, 转化率并没有进一步提高, 但是相应的生产成本却增加了。这是因为当脂肪酶用量太少时, 酶的活力不足以使体系中的反应液酯化完全, 随着酶用量的增加, 磷脂酶 *Lecitase*[®] Ultra 催化酯化反应的效率也提高, 当脂肪酶用量进一步增大时, 产物对酶的抑制作用等不利因素在反应中起主导作用, 使酶催化的效率降低。因此在叔戊醇溶剂中合成果糖月桂酸单酯时, 固定化磷脂酶 *Lecitase*[®] Ultra 的合理用量为 25 g/L。

2.2 最适酸糖摩尔比的研究

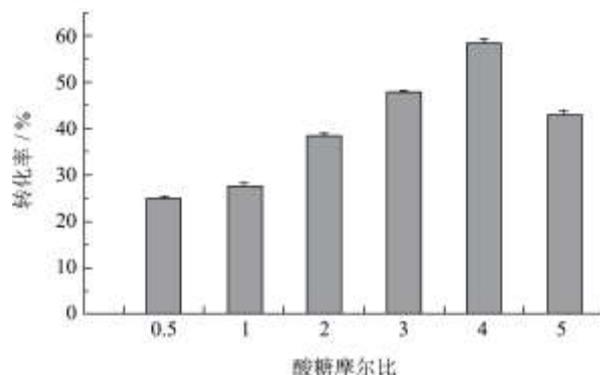


图 2 月桂酸与果糖摩尔比对果糖月桂酸单酯转化率的影响

Fig.2 Effect of molar ratio of lauric acid to maltose on the conversion of monolaurate fructose catalyzed by immobilized *Lecitase*[®] Ultra

注: 反应条件: 溶剂为叔戊醇, 加酶量 25 g/L, 分子筛 50 g/L, 糖浓度 125 mmol/L, 43 °C 反应 24 h。

考察了酸糖摩尔比从 0.5:1 到 5:1 对果糖单酯转化率的影响。由图 2 可知, 当酸糖摩尔比低于 4:1 时, 其转化率随酸糖摩尔比的增加而升高; 但酸糖摩尔比高于 4:1 时, 产物的转化率出现稍微降低。在酸糖摩尔比较低时, 提高其比例, 相对就增加了底物浓度, 增加了底物与酶接触的机率, 因此有助于提高脂肪酶催化酯化; 然而, 由于脂肪酸与糖为互不溶体系, 在溶剂的作用下形成均相体系, 当脂肪酸的比例远远大于糖时, 就会打破这种均相体系, 从而导致体系的实际底物浓度低于其表观浓度, 致使产物转化率降低。另外, 脂肪酶的立体专一性也可能由于脂肪酸的增加导致竞争性抑制导致酯化催化活性降低。因此在叔戊醇溶剂中合成果糖月桂酸单酯时, 月桂酸与果糖的最适摩尔比为 4:1。

2.3 最适分子筛添加量的研究

水对于脂肪酶催化酯化反应来说具有双重意义: 酶的活性部位所形成的微水环境能够保持酶的稳定及反应活性; 但是过量的水会使得磷脂酶催化酯化反应热力学平衡向水解反应方向移动。

分子筛是脂肪酸糖酯合成中经常使用的一种脱水工具, 能有效调节反应体系的水分, 从而使得反应向合成的方向移动^[1]。

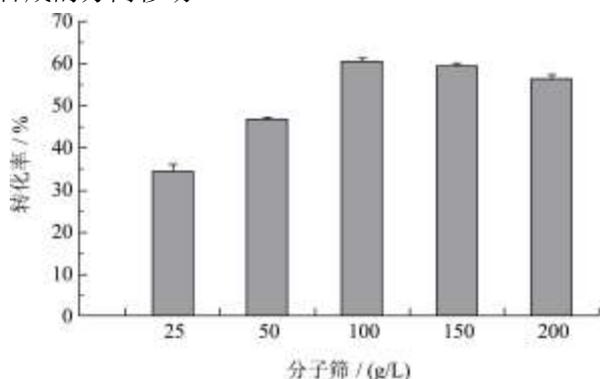


图 3 分子筛添加量对果糖月桂酸单酯转化率的影响

Fig.3 Effect of the amount of molecular sieve on the conversion of monolauryl fructose catalyzed by immobilized Lecitase® Ultra

注: 反应条件: 溶剂为叔戊醇, 加酶量 25 g/L, 酸糖摩尔比 4:1, 糖浓度 125 mmol/L, 43 °C 反应 24 h。

考察了分子筛添加量从 25 g/L 到 200 g/L 对果糖单酯转化率的影响。由图 3 可知, 添加分子筛能够提高单酯的转化率, 在添加 100 g/L 时, 果糖月桂酸单酯的转化率最高, 但继续增大添加量时, 单酯的转化率慢慢降低。这是因为在反应初期, 分子筛可以有效地将反应体系中的水去除, 这样使得磷脂酶 Lecitase® Ultra 催化反应向合成方向移动, 利于合成产物的生成; 然而分子筛的添加量增加到一定程度, 将夺取脂

肪酶表面的水化层, 影响酶催化反应活性, 导致产物转化率的降低。因此在叔戊醇溶剂中合成果糖月桂酸单酯时, 分子筛的最适添加量为 100 g/L。

2.4 最适果糖浓度的研究

糖作为磷脂酶 Lecitase® Ultra 催化酯化的一种底物, 其添加量对转化率有着重要的影响。一般情况下, 只有溶解在溶剂中的果糖才能有效地参与到酯化反应中。

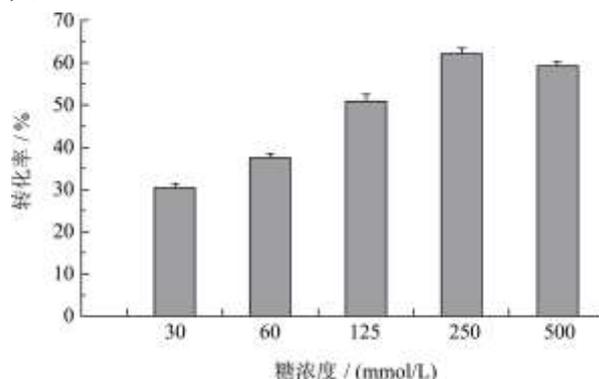


图 4 果糖浓度对果糖月桂酸单酯转化率的影响

Fig.4 Effect of concentration of fructose on the conversion of monolauryl fructose catalyzed by immobilized Lecitase® Ultra

注: 反应条件: 溶剂为叔戊醇, 加酶量 25 g/L, 分子筛 100 g/L, 酸糖摩尔比 4:1, 43 °C 反应 24 h。

考察了糖浓度从 30 mmol/L 到 500 mmol/L 对果糖单酯转化率的影响, 见图 4。本试验是在固定酸糖摩尔比为 4:1 的条件下, 逐渐提高果糖的浓度, 果糖月桂酸单酯转化率有显著提高; 当果糖的添加量达到 250 mmol/L 时, 单酯转化率达到最大, 继续增大果糖的浓度, 单酯转化率开始下降。这是由于另外一种底物月桂酸并未增加的情况下, 果糖浓度的适当增加, 可以增加底物与酶的结合概率, 有助于产物生成量的增加; 然而果糖浓度过大, 就会相对降低月桂酸的有效浓度, 再加上糖与单酯的竞争性抑制, 从而在一定程度上阻碍了酯化反应的进行^[15]。因此在叔戊醇溶剂中合成果糖月桂酸单酯时, 果糖的最适浓度为 250 mmol/L。

2.5 最适反应时间的研究

反应时间是影响化学平衡的重要参数。本试验考察了反应时间从 1 h 到 120 h, 果糖单酯转化率的变化, 由图 5 可知, 随着时间的延长, 单酯转化率不断升高, 当反应进行到 48 h 时, 单酯转化率高达 69.45%, 并进入平衡期; 随着反应的进一步进行, 单酯的转化率略有下降。这可能是由于糖在有机溶剂中溶解度较低, 因此反应开始时转化率较低, 随着反应进行, 不溶性固体糖逐渐溶解, 使反应平衡持续向产物方向移动, 故转化率增加。但是酶促合成反应是一个可逆的平衡

反应,随着反应进行,酯合成转化率增大的同时,生成的水量也逐渐增大,若不及时除去副产物水,反应有可能逆向进行。因此在叔戊醇溶剂中合成果糖月桂酸单酯时,最适反应时间为48 h。

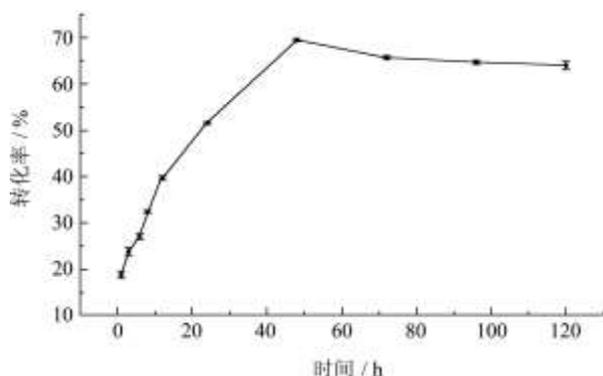


图5 果糖月桂酸单酯的合成时间曲线

Fig.5 Time course of monolauroyl fructose synthesis

注:反应条件:溶剂为叔戊醇,加酶量 25 g/L,分子筛 100 g/L,酸糖摩尔比 4:1,糖浓度 250 mmol/L,43 °C 反应。

3 结论

在叔戊醇溶剂中,利用固定化磷脂酶 Lecitase[®] Ultra 催化合成果糖月桂酸酯单酯,固定化磷脂酶 Lecitase[®] Ultra 添加量 25 g/L,酸糖摩尔比 4:1,果糖 250 mmol/L,分子筛添加量 100 g/L,43 °C 下反应 48 h 果糖月桂酸单酯的转化率达到 69.45%。为进一步提高磷脂酶 Lecitase[®] Ultra 的催化效率,可以从优化磷脂酶 Lecitase[®] Ultra 的固定化过程,原料预处理和反应放大过程的研究,以解决酶法合成扩大化的瓶颈问题。

参考文献

[1] Maag H. Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1984, 61(2): 259-267

[2] Sarney D B, Vulson EN. Application of enzymes to the synthesis of surfactants [J]. Trends Biolechnol, 1995, 13(5): 164-172

[3] Watanabe T, Katayama S, Matsubara M, et al. Antibacterial carbohydrate monoesters suppressing cell growth of Streptococcus mutans in the presence of sucrose [J]. Current Microbiology, 2000, 41(3): 210-213

[4] 任昌琼,郑穗平,林影,等.重组脂肪酶全细胞催化单糖酯的

合成[J].现代食品科技,2009,25(9):1035-1038

- [5] Li Yan-zi, Rethwisch D G. Scale-up of pseudo solid-phase enzymatic synthesis of α -methyl glucoside acrylate [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 79(1): 15-22
- [6] Samia Soultani, Jean-Marc Engasser, Mohamed Ghoul. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters [J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2001, 11(4-6): 725-731
- [7] Antczak T, Patura J, Szczesna-Antczak M, et al. Sugar ester synthesis by a mycelium-bound Mucor circinelloides lipase in a micro-reactor equipped with water activity sensor [J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2004, 29 (1-6): 155-161
- [8] Yan You-chun, Bornscheuer U T, Schmid D. Efficient water removal in lipase-catalyzed esterifications using a low-boiling-point azeotrope [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 78(1): 31-34
- [9] Bélafi-Bakó K, Dörm N, Ulbert O, et al. Application of pervaporation for removal of water produced during enzymatic esterification in ionic liquids [J]. Desalination, 2002, 149: 267-268
- [10] Saifuddin N, Raziah A Z. Enhancement of lipase enzyme activity in nonaqueous media through rapid three phase partitioning and microwave irradiation [J]. Journal of Chemistry, 2008, 5(4): 864-71
- [11] Degn P, Zimmermann W. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from Candida antarctica [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 74(6): 483-91
- [12] Yang B, Wang Y H, Yang J G. Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2006, 83(7): 653-658
- [13] 付敏,赵谋明,刘宁,等.吸附-涂层法固定化磷脂酶Lecitase[®] Ultra研究[J].食品工业科技,2011,32(10):277-280
- [14] 李脉,杨继国,杨博.磷脂酶 A1 酶活测定方法的研究[J].现代食品科技,2007,23(8):80-82
- [15] 张文斌.甘露糖月桂酸酯的酶法选择性合成[D].江苏无锡:江南大学食品学院,2009