

混合溶剂中酶法催化合成木糖酯及其结构鉴定研究

冯广莉^{1,2}, 李晓凤², 张奔¹, 赵光磊¹

(1. 华南理工大学制浆与造纸国家重点实验室, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文建立了一种木糖酯合成的新方法, 利用正己烷/吡啶 (25:75, V/V) 双溶剂体系作为反应介质, 在溶解极性底物糖的同时保持酶的良好活性。采用固定化脂肪酶 Novozyme 435 在该体系中催化甲基丙烯酸乙烯酯和木糖的酯交换反应合成木糖酯。HPLC 检测结果表明, 当木糖与甲基丙烯酸乙烯酯的摩尔比为 1:10, 转速为 150 r/min 时该酶促反应具有较高的转化率, 反应 48 h 后木糖转化率高于 90%。GC-MS 和核磁共振碳谱 (¹³C-NMR) 鉴定表明, 在该反应条件下, Novozyme 435 可选择性催化木糖的 1',5'-羟基酰化, 得到产物为木糖的 1',5'-双酯。该研究为应用在食品、化学及造纸工业上的两性化合物的生产提供了一种有效并且环境友好的新方法。

关键词: 木糖; 有机溶剂; 脂肪酶; 糖酯; 生物催化

文章编号: 1673-9078(2013)6-1222-1226

A New Method for Enzymatic Synthesis of Xylose Diester in Two-solvent Medium and its Structural Identification

FENG Guang-li^{1,2}, LI Xiao-feng², ZHANG Ben¹, ZHAO Guang-lei¹

(1. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A new method for synthesis of xylose esters based on solvent strategy was developed in this paper. Binary organic solvent of n-hexane and pyridine (25:75, V/V) was used as reaction system to well dissolve sugar substrate and meanwhile maintain the enzyme activity. Immobilized lipase CAL type B, Novozyme 435, was chosen as a biocatalyst to synthesize xylose ester via acylation of xylose and vinyl methacrylate. HPLC analysis showed that the highest substrate conversion (>90%) was obtained when the ratio of xylose to vinyl methacrylate, shaking speed and reaction temperature were 1:10, 150 r/min and 30 °C, respectively. The products were structurally identified by GC-MS and ¹³C-NMR as a diester of xylose, 1', 5'- dimethacrylic xylose ester. This research provided an efficient and environmentally-friendly method with application potential in production of amphoteric compounds used in food, chemical and papermaking industries.

Key words: xylose; organic solvent; lipase; xylose ester; biocatalysis

糖类是自然界广泛存在的重要化合物, 是有机体维持生命活动的重要能量来源, 也是一种可降解、环境友好的天然材料。经过酰基化作用形成的糖酯化合物是糖类化合物的重要衍生物。糖酯类化合物一般呈白色或黄色, 为蜡状固体或者黏性液体^[1]。研究表明, 这一类化合物不仅具有生物可降解性、无毒等特点^[2], 还具有良好的理化特性, 包括乳化作用, 润滑作用, 增溶作用, 起泡和消泡等作用等^[1,3]。例如脂肪酸糖酯可作为乳化剂、增溶剂等用于冰激凌、汤类、含乳饮

收稿日期: 2013-02-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270636); 广东省教育厅科技创新项目 (2012CXZD0009、2012KJGX0006); 新世纪优秀人才项目 (NCET-12-0192)

作者简介: 冯广莉 (1988-), 女, 在读硕士研究生, 全细胞催化

通讯作者: 赵光磊, 男, 博士, 副研究员, 造纸化学品及生物质转化

料、牙膏和唇膏等食品或生活用品生产中^[4]。研究还表明, 有的糖酯类化合物还具有独特的生理活性, 包括杀虫、抗菌、抗肿瘤等功效; 此外, 糖酯化合物还是重要的化工原材料, 例如糖类的多丙烯酸酯是合成支链凝胶及生物相容性水溶性凝胶的重要原料^[5]; 高支链的含糖聚合物还可用来合成具有生物活性或生物降解性的生物膜, 有望用于替代目前难降解、有毒的合成膜材料^[6]。糖酯化合物目前已被广泛应用于食品、制药、化学品、化妆品和洗涤剂等行业中, 在人类生产生活中发挥着越来越广泛的作用。随着糖酯化合物新的理化及生物特性的发现, 其应用前景将益发广阔。

目前, 糖酯合成仍主要采用传统的化学法工艺。由于糖是多羟基化合物, 采用普通化学法合成往往选择性较差、副产物多。为了提高反应选择性, 有很多

研究学者报道了采用基团保护-脱保护的化学法,实现对糖环上特定羟基的选择性酯化,但这些方法缺点在于引入更多有毒溶剂,且步骤繁杂、工艺繁琐。不仅如此,化学法合成还存在诸如反应条件苛刻、环境不友好等不足^[7]。近年来,酶法因采用生物催化剂、操作步骤简单、反应条件温和及选择性高等优点,在有机合成领域得到了越来越多的关注^[8]。

自Klibonov等人首次报道了有机介质中酶催化糖酯合成以来,目前已有许多关于在无溶剂和有机溶剂体系中利用不同来源脂肪酶催化糖酯合成的报道^[9],这其中研究较为广泛且催化效果较好的酶制剂是南极假丝酵母脂肪酶的固定化酶Novozyme 435。已有研究证明该酶不仅具有较高的催化活性,且热稳定性高,如能最高耐受70~90 °C的温度范围^[10],极具工业应用潜力。然而,目前糖酯合成研究中遇到的突出问题是糖类物质在常规有机溶剂中溶解度低而采用强极性有机溶剂时又会容易使酶失活的问题,这在一定程度上制约着酶催化技术在糖酯合成领域中的应用进展。针对以上研究现状,本研究首次提出利用由疏水性有机溶剂和亲水性有机溶剂组成双溶剂体系作为反应介质,利用固定化脂肪酶Novozyme 435催化木糖酯化反应,高效合成木糖酯,以期为糖酯类化合物的合成开辟新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

D-无水木糖,购自上海源聚生物科技有限公司;固定化脂肪酶Novozyme 435,产自诺维信公司;甲基丙烯酸乙烯酯,购自西格玛奥德里奇公司;其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪,配备有Waters 515高效液相色谱泵和2410示差检测器;气相色谱-质谱联用仪,型号:7890A/5975C,美国安捷伦公司;Bruker AV600型核磁共振仪,瑞士布鲁克公司;低温水浴培养箱,型号LSHZ2-300,太仓市强乐实验设备厂;台式高速冷冻离心机,型号:TGL-16M;真空干燥仪:DZF-6020型,上海三发科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 反应体系的制备

所有试剂在反应前均于分子筛(0.05 g/mL试剂)中干燥12 h。于15 mL锥形瓶中加入60 mg木糖(0.2 mmol)和1.5 mL吡啶,待完全溶解后加入0.5 mL正己烷,2 mmol的酰基供体甲基丙烯酸乙烯酯,160 mg的脂肪酶Novozyme 425,置于温度为30 °C,转速

为150 r/min的水浴摇床上反应48 h。参照组不加酶。并取0 h、2 h、12 h、24 h、48 h的样品进行高效液相色谱检测。

1.3.2 产物的高效液相色谱检测(HPLC)

样品的前处理:0 h、12 h反应液样品用5 mmol/L H₂SO₄水溶液稀释50倍,24 h、48 h反应液样品用5 mmol/L H₂SO₄水溶液稀释25倍,13000 r/min下离心5 min,取上清液过0.22 μm膜后进样。

HPLC检测条件:柱子,BioRad Amines HPX-87H;示差检测器,检测器温度50 °C;柱温65 °C;流动相:5 mmol/L H₂SO₄水溶液;流速:0.5 mL/min;进样量:20 μL。

1.3.3 产物的气-质联用检测(GC-MS)

样品的硅烷化前处理:1、取50 μL三甲基氯硅烷和100 μL的六甲基二硅烷置于1.5 mL的离心管中,用漩涡振荡器振荡5 min,待用;2、取20 μL实验样品于1.5 mL离心管中,加入200 μL无水吡啶,漩涡振荡器振荡5 min;3、将220 μL的吡啶溶解液转移到硅烷化试剂(三甲基氯硅烷和六甲基二硅烷的混合液)中,漩涡振荡器振荡15 min后静置反应50 min。4、13000 r/min下离心5 min,取上清液,过0.22 μm膜后进样。

GC-MS检测条件:载气为1 mL/min He;DB-5毛细管色谱柱;平衡时间0.25 min,进样量为1 μL,毛细管温度以10 °C/min的速度从50 °C升到280 °C,保持5 min,检测时间为30 min;EI离子源;离子源温度为230 °C;电子能量为70 eV;质量扫描范围为35~550 amu。

1.3.4 木糖酯的分离纯化及结构鉴定

采用薄层色谱(TLC)进行产物的分离纯化。木糖吡啶溶液作参照点。

色谱条件的选择:1、展开剂一为乙酸乙酯/甲醇/水=17:2:1(体积比)^[11],展开剂二为氯仿/甲醇=8:1(体积比)^[12];2、显色剂一为脲/磷酸/正丁醇溶液,显色剂二为10%硫酸乙醇溶液。点有样品的硅胶板在展开剂中展开一定时间后,喷洒显色剂后于105 °C烘箱中烘烤5 min,观察显色效果。

产物的收集:取50×100 mm硅胶板四块,在离底部1 cm处点样,每板6个点,每点点样量为3 μL,放入合适的展开剂中,展开相同的时间,其中一块喷洒显色剂后烘烤显色,计算木糖及其糖酯的R_f值,根据产物的R_f值确定其余三个硅胶板中产物出现的区域,把含有产物的硅胶部分刮取收集,进行多次试验,计算收集约10 mg不同时间段的产物。用30 mL丙酮分三次溶解产物,离心取上清液。真空干燥12 h进行

NMR 分析。

NMR 检测条件: D₂O 作溶剂, 600 MHz。

2 结果与讨论

2.1 不同反应介质中底物溶解性

反应介质是酶法反应能否顺利进行的关键因素之一。一般而言, 糖易溶于极性溶剂中, 如二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺等, 但是酶在极性溶剂中却容易失活。在疏水性介质如正己烷中, 糖的溶解度较低, 这样会限制反应速度, 影响反应的底物转化率。尽管体系中过量的不溶性底物如糖结晶的存在理论上能增加糖的转化率, 但是糖结晶会影响酶的催化效率。有报道称体系中增加葡萄糖的量能抑制糖酯的进一步合成^[13]。为解决这一矛盾, 本研究选用了由不同极性溶剂所组成的双溶剂体系作为反应介质。双溶剂体系中的主要反应介质为吡啶, 其能较大地溶解反应底物木糖 (~53 mg/mL), 而体系中的另一组分正己烷有助于提高酶分子的结构稳定性, 减少极性溶剂吡啶对酶的毒害作用。

表 1 为不同溶剂的 $\lg P$ 值及底物在不同溶剂中的溶解情况。实验结果表明, 采用吡啶-正己烷混合液 (3:1, V/V) 较之正己烷大大提高了底物木糖的溶解度, 约为 40 mg/mL。 $\lg P$ 值是溶剂的疏水性参数, 一般而言, 溶剂 $\lg P$ 值越小, 则该溶剂夺取酶表面水分子的能力越强, 对酶的失活作用也越大。混合溶剂的 $\lg P$ 值计算公式为: $\varphi_a \lg P(a) + \varphi_b \lg P(b)$ (a 和 b 为混合溶剂系统中的两种溶剂, φ 为其体积分数)^[14], 由该表可以看出吡啶-正己烷混合液的 $\lg P$ 值介于吡啶与正己烷之间为 1.41。综合考虑吡啶-正己烷混合溶液的 $\lg P$ 值和对底物的溶解度, 该溶剂可望弥补吡啶对酶的强失活作用和正己烷对底物溶解度低的缺点。

表 1 反应底物木糖在不同溶剂中的溶解度

Table 1 Solubility of xylose in different organic solvents

溶剂	$\lg P$ 值	溶解度/(mg/mL)
吡啶	0.71	~53
正己烷	3.5	< 0.5
吡啶-正己烷混合液(3:1, V/V)	1.41	~40

2.2 酶促糖酯合成反应过程

采用吡啶-正己烷混合溶剂(3:1, V/V)为反应介质, 当木糖与甲基丙烯酸乙烯酯的摩尔比为 1:10, 转速为 150 r/min 时加入脂肪酶 Novzyme 435 催化该反应, 反应过程定时取样进行高效液相色谱检测, 对酶促木糖酯化反应进行了研究, 研究了该酶反应中底物转化率随反应时间的变化曲线。如图 1 所示, 随着反应时间

延长, 木糖转化率逐渐增加; 当反应进行到 24 h 时, 木糖转化率达到 68.53%; 当反应延长至 48 h 后超过 90% 的木糖被消耗。以上研究结果表明, 在吡啶/正己烷 (75/25, V/V) 双溶剂体系中, 脂肪酶 Novzyme 435 能够催化木糖和甲基丙烯酸乙烯酯的酰化反应, 且反应转化率较高。

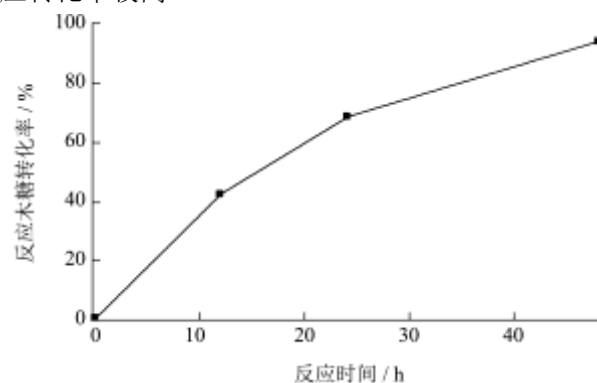


图 1 木糖和甲基丙烯酸乙烯酯的反应液中木糖的转化率随时间的变化情况

Fig.1 Time-course of the acylation of xylose with vinyl methacrylate

2.3 产物结构解析

2.3.1 产物的薄层色谱分析

薄层色谱(Thin Layer Chromatography, TLC)是一种微量、快速而简单的色谱法, 一方面适用于小量样品(几到几十微克, 甚至 0.01 μg) 的分离; 另一方面若在制作薄层板时, 把吸附层加厚, 将样品点成一条线, 则可分离多达 500 mg 的样品, 可用来精制样品。故此法特别适用于挥发性较小或在较高温度易发生变化而不能用气相色谱分析的物质。本研究对反应产物的薄层色谱分析研究了两种展开剂效果, 结果表明, 展开剂①乙酸乙酯/甲醇/水 (17:2:1, V/V/V) 的展开效果逊于展开剂②氯仿/甲醇 (8:1, V/V), 在展开剂②中, 木糖在起点基本不移动; 在加有酶的样品中在 $R_f = 0.4$ 处出现一显著碳化点, 初步判断为木糖酯。对分离产物的碳化显色结果表明, 脲/磷酸/正丁醇溶液做显色剂时木糖与木糖酯的碳化点不明显, 但以 10% 硫酸乙醇溶液为显色剂时显色明显, 且碳化点出现的位置相对稳定, 而当硫酸的浓度降低到 5% 硫酸乙醇溶液时, 显色不清晰, 且烘烤时间较长。因此, 确定反应产物的薄层色谱的条件为: 展开剂为氯仿/甲醇=8:1 (体积比); 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液。

2.3.2 产物的 GC-MS 分析

对反应产物进行硅烷化衍生后, 进行了 GC-MS 分析。根据 GC-MS 图谱中得到的色谱峰对应的质谱信息, 利用质谱数据库进行计算机检索, 经 GC-MS 离子流色谱图解析可知, 保留时间为 17.381 min 左右

的峰为 D-木糖的硅烷化产物, 对比保留时间 20 min 左右的产物峰, 如图 2 所示, 可知其质谱图中的分子离子峰都增加了 69, 如图 3 所示, 这与甲基丙烯酰基的量一致, 可以产物峰为 D-木糖在酶催化下生成的酯化产物所产生的峰。此外, 通过离子峰的峰度还可知有 D-木糖多酯产物的生成。

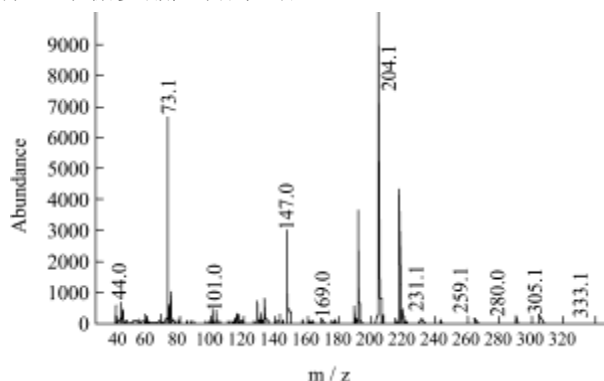


图 2 D-木糖硅烷化产物质谱图

Fig.2 Mass spectrogram of trimethylsilyl derivatives of D-xylose by trimethylsilylation(TMS)

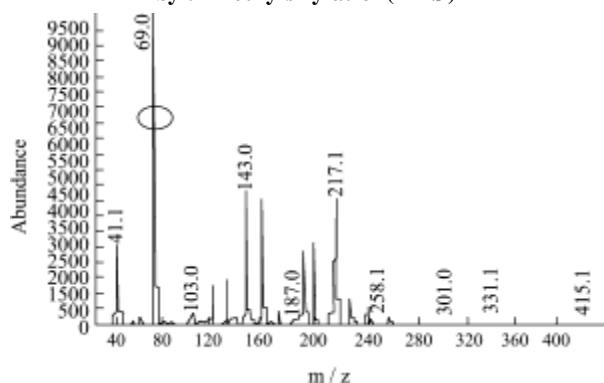


图 3 48 小时反应产物的硅烷化产物质谱图

Fig.3 Mass spectrogram of trimethylsilyl derivatives of the product by trimethylsilylation(TMS).

注: 反应条件: 150 rpm, 30 °C, 48 h.

2.3.3 产物的 ¹³C-NMR 分析

核磁共振技术可提供分子中氢或者碳原子的类型、数目、相互连接方式、周围化学环境乃至空间排列等结构信息。近年来随着超导脉冲傅立叶变化核磁共振仪及相关分析软件的不间断问世, 该技术日趋完善。目前, 对于分子量在1000以下、只需毫克级的物质, 单用核磁共振技术就可以正确判断其立体结构, 故该技术已成为有机合成领域不可或缺的工具之一。1980年, Yoshimoto^[15]等利用¹³C-NMR技术对糖类化合物及其酰化产物进行了结构分析并创立了可用于鉴定糖类化合物酰化产物结构的¹³C-NMR解析方法。该方法认为当糖类化合物的某一羟基发生酰化反应后, 该化合物的¹³C-NMR谱图中与该羟基直接相连的碳原子所对应的信号峰的化学位移会向低场移动, 而与该碳原子

相邻的碳原子的所对应的信号峰的化学位移则会向高场移动, 且位移量超过2 ppm; 反之, 可判定该羟基位点未发生酰化反应。

D-木糖为五碳糖, 形成呋喃构型。由表2所示的木糖及其酰化反应产物的¹³C-NMR谱数据可知, α-D-木糖产物的糖基C₅'向低场位移了2.8 ppm (由60.96 ppm移至63.70 ppm), 相邻碳原子C₄'的信号峰向高场位移了4.94 ppm (由69.39 ppm移至64.45 ppm); 此外C₁'向低场位移了3.41 ppm (由92.22 ppm移至95.63 ppm), 相邻碳原子C₂'的信号峰向高场位移了4.03 ppm (由71.45 ppm移至67.62 ppm), 位移量均符合判定标准。此外, 产物的核磁共振谱图中还出现了未酰化的木糖的谱图中所没有的四类信号峰, 分别是-CH₃, C=CH₂和C=O的峰。因此可以确定: 该酶促酰化反应发生在木糖部分的5'-羟基和1'-羟基上。1986年, Therisod和Klibanov等首次研究6-O-丁酰葡萄糖酯、6-O-乙酰葡萄糖酯、6-O-辛酰葡萄糖酯和6-O-乙酰半乳糖酯等的酶促合成研究中也采用了本研究所依据的¹³C-NMR解析方法^[16]。

表 2 木糖及其酰化反应产物的 ¹³C-NMR 谱数据

Table 2 ¹³C-NMR spectral data for xylose and its acylate

Carbon numbers	[δ(ppm)] ^a	
	Xylose	Xylose ester
Sugar moiety C1'	92.22	95.63
C2'	71.45	67.62
C3'	72.62	74.59
C4'	69.39	64.46
C5'	60.96	63.70
Acyl moiety CH ₃	-	17.40/17.40
CH ₂ =	-	127.12/127.13
-C=	-	135.73/135.67
C=O	-	169.45/169.53

注: ^a 化学位移以ppm度量; -表示未检测到。酰化产物为反应48h后所得样品。

综合GC-MS和核磁共振碳谱(¹³C-NMR)的分析结果可以确定酶促木糖与丙烯酸乙烯酯酰化反应的产物为木糖的1',5'-双酯。

2.4 酶促木糖酯化反应过程推导

糖酯类化合物为多羟基化合物, 不仅能够合成不同酰化位点的单酯, 还可以合成多酯如双酯和三酯等^[17]。结合前述的GC-MS和核磁共振的检测及图谱分析结果, 推测在本研究条件下, Novozym 435催化木糖酯化反应的反应过程如图4所示:

一般而言, 酶促催化糖类和乙烯基酯反应, 酰化位点为伯羟基, 即己糖的 C-6 位置和戊糖的 C-5 位置^[18]。Wakako Tsuzuki 等酶促 D-木糖和棕榈酸, 合成了

1-O-棕榈酸木糖酯^[19],说明 C-1 位羟基也可以发生酰化。本研究结果的酰化位点为 C-1 和 C-5 的双酯,与前人研究结果相一致。

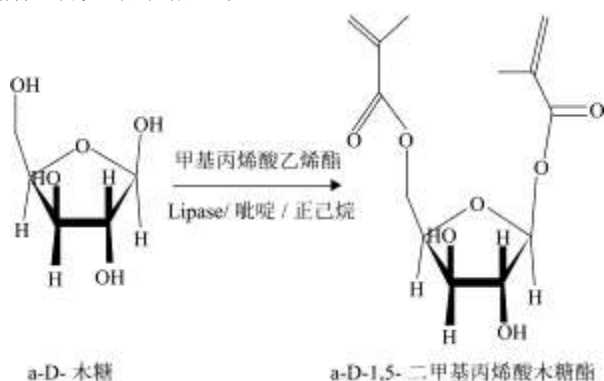


图4 Novozyme 435 促木糖和甲基丙烯酸乙烯酯酰化反应的过程

Fig.4 Acylation reaction of xylose and vinyl methacrylate catalyzed by lipase Novozyme 435

3 结论

本研究采用双溶剂体系中,用脂肪酶催化木糖和甲基丙烯酸乙烯酯发生酯基转移反应,成功合成了木糖二酯,反应 48 h 底物转化率达 90% 以上。综合 GC-MS 和核磁共振碳谱 (¹³C-NMR) 的分析结果可以确定酶促木糖与甲基丙烯酸乙烯酯酰化反应产物为木糖的 1',5'-双酯。该木糖酯合成工艺高效、环境友好,为合成可广泛应用于食品、化学及造纸工业上的两性化合物提供了新思路。今后可对反应条件需要进一步优化,例如糖与酰基化试剂的比率、反应体系中水分含量对反应选择性、反应产率的影响以及将反应底物从单糖扩展到二糖和多糖。

参考文献

- [1] Blecker C, Danthine S, P  r   M, et al. Enzymatically prepared n-alkyl esters of glucuronic acid: The effect of freeze-drying conditions and hydrophobic chain length on thermal behavior [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2008, 321: 154-158
- [2] Polar T, Linhardt R. Synthesis and applications of sucrose based esters [J]. *J Surf Deterg*, 2001, 4:415-421
- [3] Lee H S, Ha H S, Hiep M N, et al. Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid esters using ionic liquids mixtures [J]. *J Biochem*, 2008, 133:486-489
- [4] Watanabe T, Katayama S, Matsubara M, et al. Antibacterial mutants in the presence of sucrose [J]. *Curr Microbiol*, 2000, 41:210-213
- [5] Park D W, Haam S, Lee T G, et al. Chemoenzymic synthesis of sugar-containing biocompatible hydrogels: crosslinked poly (β -methylglucoside acrylate) and poly (methylglucoside methacrylate) [J]. *J Biomed Mater Res*, 2004, 71A: 497-507
- [6] Muthukrishnan S, Nitschke M, Gramm S, et al. Immobilized hyperbranched glycoacrylate films as bioactive supports [J]. *Macromol Biosci*, 2007, 6:658-666
- [7] 韩萍芳,安振明,欧阳平凯.脂肪酶促糖酯合成研究进展[J].*现代化工*,2004,24(1):4-7
- [8] Liu Q B, Janssen M H A, van Rantwijk F, et al. Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations [J]. *Green Chem*, 2005, 7:39-42
- [9] Klibanov A M. Improving enzymes by using them in organic solvents [J]. *Nature*, 2001, 409 (6817): 241-246
- [10] P W Owen, F Jianwen, L Zuyi. Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, 20:52-56
- [11] Masaru Kitagawa, Han Fan, Takao Raku, et al. Selective enzymatic preparation of vinyl sugar esters using DMSO as a denaturing co-solvent [J]. *Biotechnology Letters*, 1999, 21: 355-359
- [12] Ferreira L, Gil M H, Dordick J S. Enzymatic synthesis of dextran-containing hydrogels [J]. *BIOMATERIALS*, 2002, 23(19):3957-3967
- [13] Benoît Moreau, Georges Lognay, Christophe Blecker, et al. Chromatographic, spectrometric and NMR characterisation of a new set of glucuronic acid esters synthesised by lipase [J]. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2007, 11(1):9-17
- [14] L S Gorman, J S Dordick. Organic Solvents Strip Water Off Enzymes [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 39:392-397
- [15] Yoshimoto K, Itatani Y, Tsuda Y. ¹³C-Nuclear magnetic resonance spectra of O-acylglucose. Additivity of shift parameters and its application to structure elucidations [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28: 2065-2074
- [16] Michel Therisod, Alexander M. Klibanov. Facile Enzymatic Preparation of Monoacylated Sugars in Pyridine [J]. *J. Am. Chem. SOC.*, 1986, 108(18): 5638-5640
- [17] Junko Tsukamoto, Sophie Haebel, Gustavo P Valenca, et al. Enzymatic direct synthesis of acrylic acid esters of mono- and disaccharides [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, 83:1486-1492
- [18] E Castillo, F Pezzotti, A Navarro, et al. Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach [J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 102: 251-259
- [19] Wakako Tsuzuki, Yoshiaki Kitamura, Tateo Suzuki, et al. Synthesis of sugar fatty acid esters by modified lipase [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 64(3): 267-271

现代食品科技