

酶法合成糖及糖醇酯

寇秀芬 徐家立

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:以脂肪酸为酰基供体,糖和糖醇为酰基受体,利用吸附到涤纶布上的假丝酵母脂肪酶作催化剂,在含叔丁醇的系统中,研究了酯化反应条件。酯化最适温度和 pH 值分别为 40℃~45℃和 5.0~7.5。在酰基供体中,以亚油酸和油酸最好,C8 到 C22 的饱和脂肪酸的酯化程度相仿。在 23 种糖和糖醇中,果糖、木糖、海藻糖、山梨糖、木糖醇、甘露醇以及异丙基葡萄糖和甲基葡萄糖比其它酰基受体的酯化率高。糖醇的酯化程度明显高于相应的糖。此外,酰基供体与受体的摩尔比大于 2:1 时,有利于酯化。在由 3.0mmol(0.85g)油酸,0.2mmol 山梨醇(0.036g),3mL 叔丁醇和 30mg 固定化脂肪酶(600 u)组成的反应系统中,40℃ 震荡反应 48h,以等摩尔的底物计算,酯化程度达到 90% 以上。反应产物经薄层色谱鉴定为单酯和双酯。

关键词:糖和糖醇,脂肪酸,固定化脂肪酶,酯化

中图分类号:Q53,Q54 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)02-0193-97

糖和糖醇与脂肪酸酯化所生成的酯是非离子型表面活性剂中的主要类别。它们具有无毒、无味、无刺激和可被生物降解的优点。在食品、化妆品、医药、化工、农业等领域中有广泛用途和良好发展前景。

目前,化学法合成的这类产品,如蔗糖酯、Span80 和 Span85 等是在 120℃~240℃ 酸性条件下制备的,由于反应条件激烈,反应过程中发生糖和糖醇的缩合和内酯化等副反应,而且化学合成反应对酯键位置的选择性差,酯键数量难于控制,生成产物为多种酯的异构体和副产品的混合物^[1],并伴有难以解决的色泽加深问题。酶作为生物催化剂所具有反应条件温和及良好的区域和位置选择性,以及明显的立体专一性^[2,3],可合成高质量的糖及糖醇酯。这些纯度高色泽浅的产品,使用效果优良。有些糖酯还具有特殊的生理功能^[3],已越来越受到人们的重视。本文报道固定化脂肪酶在叔丁醇中合成糖及糖醇酯的酯化条件的初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂:异丙基葡萄糖、L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、核糖、纤维二糖、蜜二糖、黑曲糖、花生酸、芥酸和特戊醇为 Sigma 公司产品;甲基葡萄糖、山梨糖、果糖、D-阿拉伯糖、海藻糖和棉子糖为上海生化试剂公司产品,其他试剂均为北京化工厂产品。假丝酵母(*Candida* 1619)脂肪酶由本实验室制备,粉状,190000U/g。

作者简介:寇秀芬(1942-),女,河北省阜城县人,中国科学院微生物研究所副研究员,主要从事酶学研究

收稿日期:1998-07-17, **修回日期:**1999-02-24

1.1.2 仪器:震荡器:G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc. U.S.A. 薄层色谱扫描仪:Shimadzu Dual-Wavelength TLC Scanner CS-910,扫描波长 400nm。

1.2 方法

1.2.1 固定化酯肪酶:参照前文报道的方法^[4]以涤棉布为载体,吸附法制备。

1.2.2 反应 pH 的设定:将 50 μ L 0.2 mol/L 不同 pH 值的磷酸盐缓冲液分别滴加到 30 mg 载体上,室温风干后固定化脂肪酶液。

1.2.3 糖及糖醇酯的合成:基本反应体系为 100 mL 带塞磨口锥形瓶中,加入 3 mmol 酯肪酸,0.2 mmol 糖或糖醇,3 mL 叔丁醇,30 mg 固定化脂肪酶(600 U),40 $^{\circ}$ C 震荡反应。

1.2.4 酯化率的测定:反应结束后,用 0.2 mol/L 的 KOH 溶液滴定反应体系中残留的脂肪酸,以脂肪酸量的减少计算酯化率^[5]。

1.2.5 薄层色谱分析:将脂肪酸与糖或糖醇的酶法合成反应液配制成 10 mg/mL 的乙醇溶液,点样于 GF254 硅胶板(10 \times 10 cm)上,上样量 50 μ L,分二次展开,第一次用氯仿:甲醇:水(64:10:1),上行展开到 2.2 cm 处,取出的板经空气干燥后,再进行二次展开,用氯仿:甲醇:乙酸(97.5:2.5:1)溶液展开到 7.5 cm 处,将二次展开过的板干燥后喷 2.5% 的 H₂SO₄ 乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 下烘 5 min 显色。

2 实验结果

2.1 酰基受体对酯化的影响

在基础反应体系中,以油酸做酰基供体,与 23 种糖及糖醇反应的酯化程度列于表 1。所有糖醇的酯化率明显优于相应的糖。葡萄糖的衍生物,异丙基葡萄糖和甲基葡萄糖优于葡萄糖。在单糖中,果糖、木糖酯化程度较高,双糖中,以海藻糖、黑曲糖较好。

2.2 酰基供体对酯化的影响

在基础反应体系中,以山梨醇为酰基的受体,与含不同碳链长度的直链酯肪酸进行酯化反应 48h。在比较的 13 种脂肪酸中,不饱和脂肪酸亚油酸、油酸和芥酸的酯化程度都较好,以油酸的酯化程度为 100%,碳链长度 8 至 22 的饱和脂肪酸酯化程度相仿,相对酯化率为 74%~76%。

表 1 酰基受体对酯化的影响

Table 1 Effect of acyl acceptors on Esterification

Acyl acceptors	Relative conversion/% [*]	Acyl acceptors	Relative conversion/%
D-Glucose	100	Maltose	75
α -Methylglucopyranoside	200	Trehalose	175
Isopropylidene-glucofuranose	225	Nigerose	150
D-Sorbose	125	Cellobiose	50
D-Galactose	125	Lactose	100
D-Mannose	25	D-Melibiose	50
L-Rhamnose	75	Sucrose	50
D-Fructose	175	Raffinose	50
α -Xylose	175	Sorbitol	275
D-Arabinose	75	Mannitol	175
L-Arabinose	75	Xylitol	200
Ribose	25		

* Conversion of oleic acid was expressed as 100% when glucose used as acyl acceptor.

2.3 温度对酯化的影响

在基础反应体系中,以油酸和山梨醇作底物,在不同温度下进行酯化反应 24 h,结果见图 1。酯化反应合适的温度为 35℃~50℃(相对酯化率在 90% 以上)。

2.4 pH 对酯化的影响

在基础反应体系中,以油酸和山梨醇作底物,40℃ 下进行酯化反应,使用的固定化酶的 pH 值是预先设定好的,不同 pH 下的反应曲线见图 2。合适的反应 pH 在 5.0~7.5 范围内。

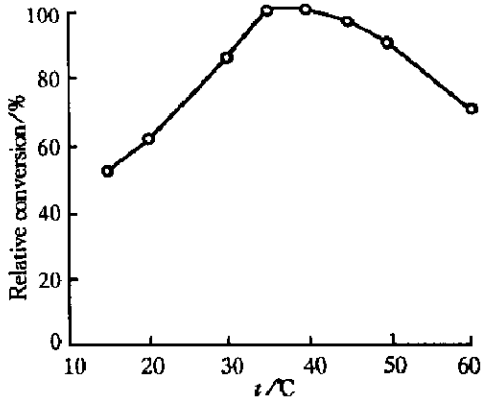


图 1 温度对酯化的影响

Fig. 1 Effect of temperature on esterification

Reaction system: 3.0mmol oleic acid, 0.2mmol sorbitol, 3mL tert-butanol, 30mg immobilized lipase (600u), shaken at 40°C for 24h under different temperature.

2.5 酰基的供体与受体摩尔比对酯化的影响

结果见图 3。油酸与山梨醇的摩尔比大于 2:1 时,随着酸与糖醇的摩尔比的增大,反应体系中参与反应的油酸量随之增加,摩尔比 15:1 以上,酯化程度变化不大。

2.6 溶剂对酯化的影响

在反应体系的两种底物中,糖和糖醇是溶于水的亲水底物,但脂肪酸具有很强的疏水性。水虽然是糖和糖醇的好溶剂,但水不利于酯化反应进行。在实验中使用了高浓度糖和糖醇的水溶液,仍没有酯化反应发生;又设法使脂肪酸溶解,希望能找到两类底物共溶的溶剂。在比较的 11 种溶剂中,烃类、芳香烃和氯代烃等溶剂虽然可使脂肪酸溶解,也不促进反应。只有叔丁醇和特戊醇是促进反应的较好的溶剂,它既溶解糖及

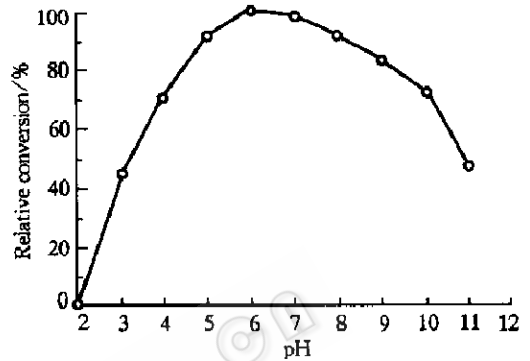


图 2 pH 对酯化的影响

Fig. 2 Effect of pH on esterification

Reaction system and conditions were the same as Fig. 1, the immobilized lipase with different pH values were used.

2.5 酰基的供体与受体摩尔比对酯化的影响

结果见图 3。油酸与山梨醇的摩尔比大于 2:1 时,随着酸与糖醇的摩尔比的增大,反应体系中参与反应的油酸量随之增加,摩尔比 15:1 以上,酯化程度变化不大。

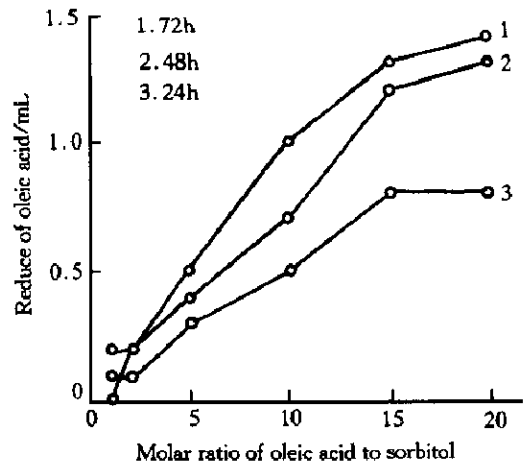


图 3 底物摩尔比对酯化的影响

Fig. 3 Effect of molar ratio of the substrates on esterification

Reaction system and conditions were the same as Fig. 1, the total amount of substrates was 0.87g, and the molar ratio of substrates changed.

糖醇,又可以溶解脂肪酸,而且不与脂肪酸发生反应,这与文献报道一致^[2]。在反应体系中,比较了叔丁醇的添加量,在加量1~20mL中,以加3mL的酯化率最高,用量超过3mL后,随添加剂量的增加,酯化程度降低。无溶剂时,虽也能发生反应,但酯化率程度要低得多。

2.7 不同酶量下的反应时程

在反应体系中,油酸与山梨醇的摩尔比设定为15:1,固定化酶的用量从200 u到2400 u,并以2400 u的自然酶做参比。酯化反应时程见图4。酶量为2400 u,24h酯化反应达平衡,用酶量为1200 u和600 u时,72h反应也能达到平衡点。而未经固定的自然酶,即使用酶量高达2400 u,还是几乎不发生酯化反应。

2.8 产物分析

山梨醇在反应过程中可能产生单酯、双酯甚至三酯,采用三种不同溶剂系统进行连续三次薄层谱展开^[6],结果未发现有三酯出现(图5)。

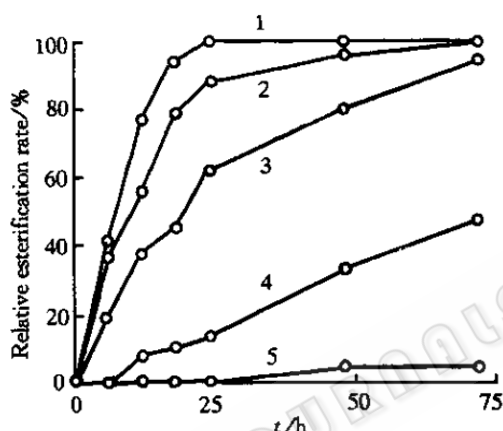


图4 酯化反应时程

Fig. 4 Time courses of esterification

Reaction system and conditions were the same as Fig. 1, the amount of immobilized lipase were:2400 u(1),1200 u(2),600 u(3),300 u(4). free lipase(2400 u)as check(5).

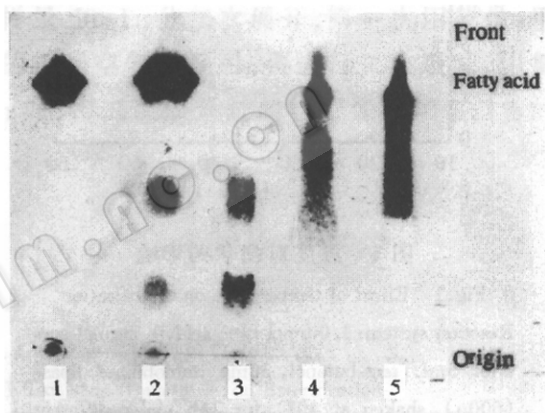


图5 产物的薄层色谱

Fig.5 Thin layer chromatogram of reactants

Samples: 1. 0h; 2. 48h; 3. Products; 4. Span 80; 5. Span 85.

固定化脂肪酶合成的山梨醇油酸酯为双酯(R_f 0.16)和单酯(R_f 0.44)。纯度明显高于化学法合成的同类产品 Span80 和 Span85。经薄层色谱扫描分析,得知产物中单酯量为49%,双酯量为51%。

3 讨论

假丝酵母(*Candida* 1619)脂肪酶经制备成固定化形式的酶以后,不仅催化聚乙二醇与脂肪酸合成酯类表面活性剂^[5],而且可以催化多种糖及糖醇形成糖及糖醇酯。在聚乙二醇与脂肪酸合成酯的反应中,烷烃、芳香烃能促进酯化反应,而在本研究中,这些溶剂却不能促进反应。而以叔丁醇作溶剂时,前者根本不发生反应,后者却反应得相当好,也许与底物在溶剂中的溶解性能有关。固定化脂肪酶在十分温和的条件下,合成了山梨醇油

酸酯,检出的产物只有单酯和双酯,从薄层色谱图可以明显看出,酶法产品的纯度比化学法生产的相应商品(Span 80 和 Span 85)要高。此外,还可以利用产品在两种或两种以上的混合溶剂中的相分配不同,将单酯和双酯分离开。

参 考 文 献

- [1] Akoh C C, Swanson B G. *J A O C S*, 1989, **66**:1295~1301.
- [2] Oosterom H G, Rantwijk F V, Sheldon R A. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, **49**, 328~333.
- [3] Park H G, Chang H N, Dordick J S. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, **779**, 595~600.
- [4] 张军,徐家立.生物工程学报,1995,11(4):711~714.
- [5] 寇秀芬,徐家立.生物工程学报,1996,12(增刊):183~189.
- [6] Ducret A Giroux A, Trani M, et al. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **48**: 214~221.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF SACCHARIDE AND SACCHARIDE ALCOHOL FATTY ACID ESTERS

Kou Xiufen Xu Jiali

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: Conditions for esterification in *tert*-butanol using fatty acid as acyl donor and saccharides or saccharide alcohols as acyl acceptors, immobilized lipase from *Candida* sp. 1619 as biocatalyst were investigated. Optimal temperature and pH for esterification were 40°C ~45°C and 5.5~7.5, respectively. Among the 13 acyl donors compared, the best ones are the linoleic acid and oleic acid. The similar conversion degree was obtained when using saturated fatty acids with carbon chain length from C8 to C22. Among the 23 saccharides and saccharide alcohols compared, D-fructose, D-Xylose, trehalose, D-sorbitol, xylitol, mannitol isopropylidoneglucofuranose and α -methylglucopyranoside showed much higher esterification degree than other acyl acceptors. In addition, the reaction degree of saccharide alcohols were substantially higher than that of the corresponding saccharides. The conversion was enhanced greatly when the molar ratio of acyl donor to acyl acceptor was higher than 2 to 1. In the case of using sorbitol and oleic acid as substrates, the reaction was carried out in 100ml conical flask and the reaction system consisted of 3.0mmol oleic acid (0.85g), 0.2mmol sorbitol(0.036g), 3mL *tert*-butanol, 30mg immobilized lipase(600u), shaken at 40°C. After reaction for 48h, more than 90% of sorbitol was esterified based on equal molar of substrates. The products were identified TLC as monoester and diester.

Key words: Saccharide and saccharide alcohols, Fatty acid, Immobilized lipase, Esterification