文章编号：1001-3555(2008)03-0260-05

无溶剂体系中酶促合成糖酯

胡　俊，王海玲，朱　凯，徐　宁，韩萍芳[1)]
（南京工业大学　制药与生命科学学院，江苏 南京 210009）

摘　要：以固定在阴离子树脂上的脂肪酶 Novozym435 为催化剂，在无溶剂体系中研究了果糖与月桂酸的直接酯化反应. 对反应条件进行了优化，在加水量 30 μL、pH 值 7.5、月桂酸与果糖摩尔比 5∶1、加酶量与底物质量比 17%、温度为 60 ℃、反应 48 h，达到最大相对转化率为 75.6%（以果糖月桂酸双酯计算），比不加水时的 49.2% 有了较大的提高. 产物经 TLC 分析，果糖月桂酸单酯 Rf 值为 0.44，果糖月桂酸双酯 Rf 值为 0.79，^{13}C NMR 鉴定，产物主要是 1-β-D-呋喃果糖月桂酸单酯和 1, 6-β-D 呋喃果糖月桂酸双酯. 与传统有溶剂反应相比，无溶剂反应更易于后期分离纯化，并节省了溶剂，降低了生产成本.

关　键　词：无溶剂；脂肪酶；果糖月桂酸酯；直接酯化
中图分类号：O643.32　　**文献标识码：**A

糖酯类化合物是一类广泛应用于食品、医药、化工等行业的非离子型表面活性剂. 这种两亲性化合物具有良好的乳化性和稳定性，它具有无毒、无臭、无刺激、易生物降解等优点[1].

糖酯的合成方法主要有传统的化学法和生物酶催化法，化学法合成通常需要在高温、高压条件下进行，反应条件苛刻，易发生副反应，对酯键位置的选择性差，酯键数量难于控制，反应需要的高温易导致底物和产物的焦化、碳化，使产物色泽过深. 酶作为催化剂有反应条件温和、酯键选择性强等优点[2~8]，符合当今“绿色化学”的潮流，已经成为糖酯合成领域的研究热点.

国内报道的无溶剂酶催化酯化反应很少，国外报道的多以酯交换反应和以醇或糖苷为酰基受体，而以直接酯化和以糖为酰基受体的报道较少，本文以固定在大孔阴离子树脂上的固定化脂肪酶 Novozym435 为催化剂，在无溶剂体系中采用直接酯化的方法以果糖为酰基受体，月桂酸为酰基供体合成了果糖月桂酸酯，反应方程式如图 1 所示.

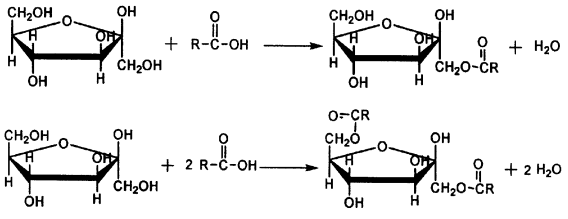

图 1 果糖酯的合成

Fig. 1 The scheme of synthesis of fructose esters

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

脂肪酶 Novozym435（Candida Antarctica B，固定在阴离子树脂上）购于诺维信（中国）公司；AvanceAV-500 核磁共振波谱仪（瑞士 Bruker 公司）、果糖、月桂酸为化学纯，乙醚、乙醇均为分析纯；4A 分子筛；DSHZ-300 恒温水浴振荡器（江苏太仓实验设备厂）；G 型硅胶板、100 ~ 200 目（粒径 76 ~ 120μm）硅胶粉购于青岛海洋化工；硅胶层析柱.

1.2 实验方法

1.2.1 果糖月桂酸酯的合成　　在 25 mL 具塞三角瓶中加入 5 mmol 的月桂酸，在恒温水浴摇床中平衡 30 min 后加入 1 mmol 果糖、200 mg Novozym435 脂肪酶和 30 μL 的水，在 60 ℃，振荡频率 200 rpm 中反应 4 h 后加入 0.4 nm 分子筛 20 粒（约 0.85 g）吸收反应生成过量的水，48 h 后终止反应，同时做空白对照实验.

收稿日期：2007-10-29；修回日期：2008-01-02.
基金项目：江苏省高校自然科学基金资助项目(06KJB530041).
作者简介：胡　俊，男，生于 1981 年，硕士生.
1）通讯联系人，e-mail：hpf@njut.edu.cn.

1.2.2 转化率的测定　　用 30 mL 调整过 pH 值的乙醚：乙醇 = 1∶1(v/v)混合溶液终止反应并溶解体系剩余的月桂酸，以酚酞为指示剂，0.1 mol/L 的 NaOH 溶液滴定反应体系中剩余游离的月桂酸的量，以月桂酸的减少量计算月桂酸的转化率[9]和相对转化率(以果糖月桂酸双酯计算).

转化率(%) = (1-反应后剩余月桂酸的滴定数/空白的滴定数) ×100%

相对转化率(%) = 转化率/月桂酸理论最大转化率 ×100%

1.2.3 pH 记忆酶的制备　　将 Na_2HPO_4、NaH_2PO_4 溶液分别配置成不同 pH 值的缓冲溶液，加到固定化脂肪酶后，离心，取沉淀物后冻干，即得不同 pH 值的固定化酶[1]

1.2.4 产物提取　　产物经硅胶层析柱分离，流动相为乙酸乙酯：甲醇 = 9∶1(v/v)，TLC 监控.

1.2.5 产物的定性分析　　产物经 TLC 分析，将果糖溶液、月桂酸和果糖月桂酸的丁酮溶液点样于 G 型硅胶板，上行展开. 展开剂：甲苯：乙酸乙酯：甲醇：水 = 10∶5∶4.5∶0.2(v/v/v/v)，显色剂：1.59 gα-萘酚溶于 51 mL 无水乙醇，加入 6.5 mL 18 mol/L 浓硫酸和 4 mL 水；^{13}C NMR ($CDCl_3$，500 MHz，TMS 内标)分析.

2 结果与讨论

2.1 加水量对酯化反应的影响

在无溶剂体系中，特别是固体物质参与的反应，加入一定量的辅助剂可以加快体系中液相的形成，提高转化率[10]，添加适量的水可以给反应体系提供一个液相，使果糖首先溶解在液相中，增大了果糖与熔融的月桂酸之间的接触面积，同时由于液相体积很小，生成的产物很快从液相中析出，从而推动反应持续进行. 添加不同量的水对月桂酸相对转化率的影响如图 2 所示.

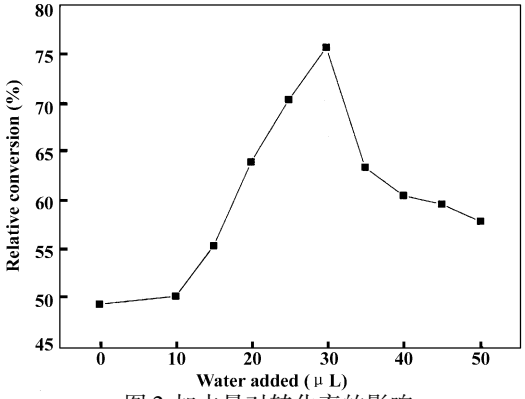

图 2 加水量对转化率的影响

Fig. 2 Effect of water added on conversion

Reaction conditions: 5 mmol lauric acid, 1 mmol fructose, 0.85 g molecule sieves 200 mg immobilized lipase, pH 7.5, shaken at 60 ℃ for 48 h

由图 2 可见，相对转化率随加水量的增大而增大，加水量为 30 μL 时，相对转化率最大达到 75.6% 较不加水时的 49.2% 有了较大的提高，加水量大于 30 μL 时，随加水量的增大相对转化率降低. 这是由于过量的水，使产物水解，从而转化率下降，这与铁翠娟等人的结果一致[11].

2.2 pH 值对酯化反应的影响

用制备好的具有不同 pH 值(6.0 ~ 8.5)的固定化酶进行酯化反应，结果如图 3 所示.

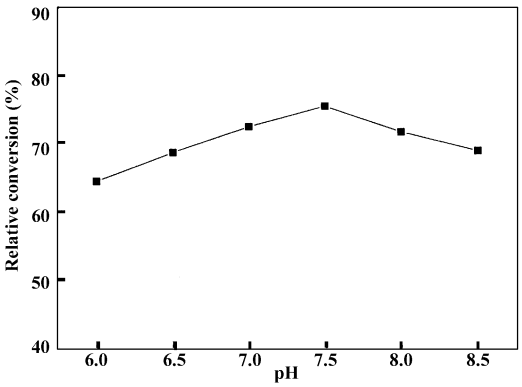

图 3 pH 值对转化率的影响

Fig. 3 Effect of pH on conversion

Reaction conditions: 5 mmol lauric acid, 1 mmol fructose, 0.85 g molecule sieves 200 mg immobilized lipase, 30 μL water, shaken at 60 ℃ for 48 h

反应在 pH 值为 7.5 时相对转化率达到最大，体系呈弱碱性. 这是由于用带负电荷载体(阴离子聚合物)制备的固定化酶会吸引溶液中的阳离子，包含 H^+，结果使固定化酶扩散层 H^+ 浓度比外围高，这样外围溶液中 pH 必须向碱性偏移，才能抵消微环境的作用，使酶表现出最大活力[12]，使 Novozym435 在微碱性的环境中活力比较高，而且 Novozym435 的 pH 适宜范围比较大，在不同的条件下具有较强的适应性[13]，所以在此 pH 值范围内对酶的影响不会太大.

2.3 底物摩尔比对酯化反应的影响

酶催化的酯化反应是可逆反应，通过改变底物摩尔比可以达到打破反应平衡，使反应向酯合成的

方向进行. 不同底物摩尔比对相对转化率的影响见图4.

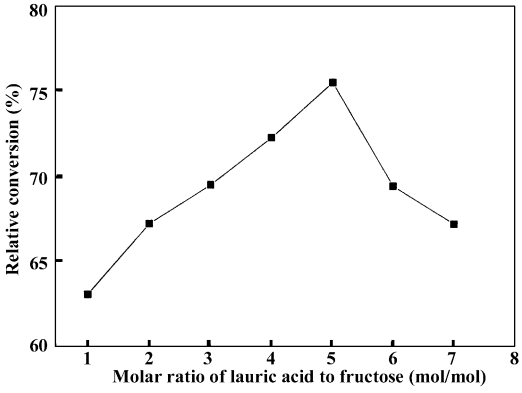

图4 底物摩尔比对转化率的影响

Fig. 4 Effect of substrates molar ratio on conversion
Reaction conditions: 200 mg immobilized lipase, 0.85 g molecule sieves , 30 μL water, pH 7.5, shaken at 60 ℃ for 48 h

固定果糖的量不变，通过改变月桂酸的量配成不同摩尔比. 当体系中的月桂酸不足时反应向负方向进行，此外，过少的月桂酸熔融后不足以提供体系所需的液相，使底物间接触面积变小，影响传质，导致月桂酸相对转化率较低. 随月桂酸的量增大，相对转化率逐渐增大，月桂酸与果糖摩尔比为5时相对转化率达到最大，大于5时相对转化率有所下降，这是由于月桂酸的量相对过多会产生大量的游离脂肪酸，使脂肪酶周围微水相酸化或从脂肪酶表面剥夺部分必需水，导致酶部分或全部失活，导致最终月桂酸的相对转化率下降，这与 Mardhaoui 等人的结果一致[14].

2.4 加酶量对酯化反应的影响

在实际工业生产中酶的成本问题始终是最为关心的问题，由于酶的价格较贵，酶量不足会影响转化率，过多的酶会大大提高生产成本，这样使最佳的酶投放量变的十分有意义. 在底物质量一定的情况下，以不同的底物质量比的加酶量考察了加酶量对相对转化率的影响. 在底物量一定的情况下，增加酶用量相对转化率也随之增加，在酶与底物质量比为17%(200 mg)时相对转化率达到最大，过多的酶反而使相对转化率下降，这是由于过多的酶使反应初始生成的副产物水增加，过多的水会使反应向负反应进行，并且可能导致酶失活；另外，过多的酶可能导致反应体系固相的凝聚，和产物单酯中间体的沉淀，从而使底物与固定化酶接触变少，这与 Maja Habulin 等人的结果一致[15].

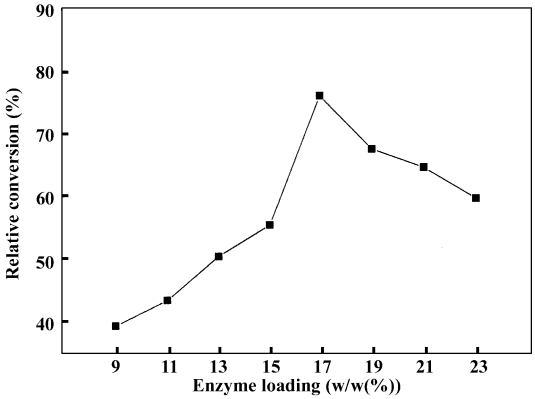

图5 加酶量对转化率的影响

Fig. 5 Effect of enzyme loading on conversion
Reaction conditions: 5 mmol lauric acid, 1 mmol fructose, 0.85 g molecule sieves 30 μL water, pH 7.5, shaken at 60 ℃ for 48 h

2.5 反应温度对酯化反应的影响

温度对酶活有很大影响，由此影响转化率，温度对酯化反应的影响如图6所示，由图6可见，当

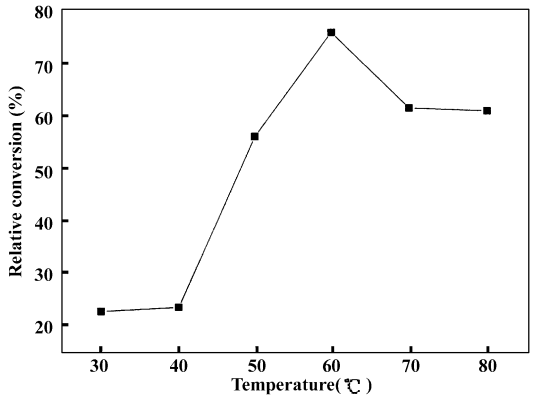

图6 温度对转化率的影响

Fig. 6 Effect of reaction temperature on conversion
Reaction conditions: 5 mmol lauric acid, 1 mmol fructose, 0.85 g molecule sieves 30 μL water, pH 7.5, 200 mg immobilized lipase, shaken for 48 h

温度在30 ℃和40 ℃时的相对转化率很低，这是因为温度没有达到月桂酸的熔点(43～46 ℃)，月桂酸呈固体形式，这样底物之间接触面积小，传质受到影响，从而使反应较难进行[10]. 在温度高于月桂酸熔点时，月桂酸处于流动状态，可与固态的糖充分接触，相对转化率随温度的增加而增加，最适温度为60 ℃. 过高的温度不仅使产物颜色加深变褐，还使酶部分失活，相对转化率下降.

2.6 反应时间对酯化反应的影响

由图7可以看出酯化反应相对转化率随时间的

增加而增大，在 48 h 时反应达到平衡，之后的相对转化率变化平缓.

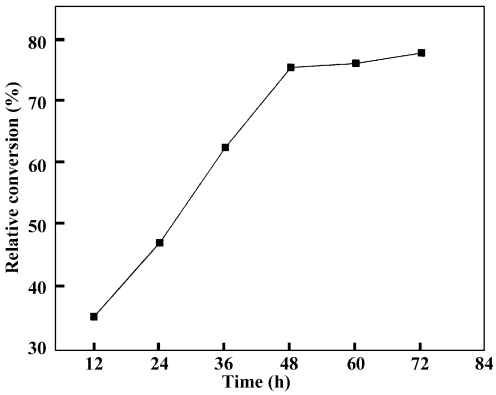

图 7 反应时间对转化率的影响

Fig. 7 Effect of react time on conversion

Reaction conditions: 5 mmol lauric acid, 1 mmol fructose, 0.85 g molecule sieves 30 μL water, pH 7.5, 200 mg immobilized lipase , shaken at 60 ℃

2.7 产物的定性分析

产物经过滤、硅胶柱层析纯化得两种淡黄色油状物，由 TLC 和^{13}C NMR 分析，结果见图 8 和表 1，由图 8 得果糖月桂酸单酯Rf值为0.44，果糖月桂酸双酯 Rf 值为 0.79；由表 1 得所得产物与文献[16]报道的基本一致.

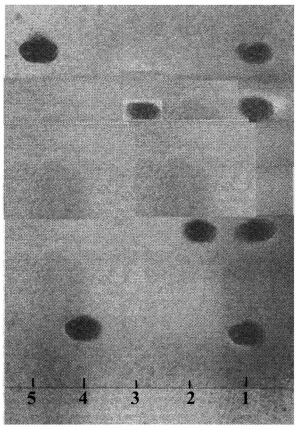

图 8 产物的薄层色谱分析

Fig. 8 Thin layer chromatography of products

表 1 产物的^{13}C NMR 数据

Table 1 ^{13}C NMR data(δ) for products

Compounds	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C = O	C = O
1-β-mono-D-fructopyranose laurate[16]	66.7	98.1	69.8	71.4	70.8	64.6	171.6	
Product	66.5	96.9	69.3	77.5	77.3	65.6	171.2	
1, 6-β-di-D- fructopyranose laurate[16]	66.8	101.7	78.0	77.1	80.2	65.	174.9	175.4
Product	65.1	100.7	76.4	77.3	79.2	64.9	174.0	174.4

3 结　　论

3.1 由于脂肪酸和糖不能互溶形成均相，所以糖酯的合成是一种较难进行的反应，尤其是在固液两相中反应的无溶剂体系，本文以添加适量水的方法使固态的糖形成高浓度的糖溶液，增加了糖与熔融态的月桂酸的接触面积，使转化率有了较大的提高.

3.2 优化了反应条件，在加水量 30 μL、pH 值 7.5、月桂酸与果糖摩尔比 5∶1、加酶量与底物质量比 17%、温度为 60 ℃、反应 48 h，月桂酸达到最大相对转化率为 75.6%.

3.3 产物经 TLC 和^{13}C NMR 分析得，果糖月桂酸单酯 Rf 值为 0.44，果糖月桂酸双酯 Rf 值为 0.79，产物主要为 1-β-D-呋喃果糖月桂酸单酯和 1, 6-β-D 呋喃果糖月桂酸双酯.

参考文献：

[1] Feng Lei-gang(冯雷刚), Zhang Guo-zheng(张国政). *Food Sci. Technol.*(食品科技)[J], 2004, **2**: 58 ~ 60

[2] Han Ping-fang(韩萍芳), An Zheng-ming(安振明), Ou Yang Ping-kai(欧阳平凯). *Mod. Chem. Indus.*(现代化工)[J], 2004, **24**: 4 ~ 7

[3] Chen Zhi-gang(陈志刚), Zong Min-hua(宗敏华), Lou Wen-yong(娄文勇). *J. Mol. Catal.*(China)(分子催化)[J], 2007, **21**(1): 90 ~ 95

[4] Yang Sheng-yuan(杨胜远), Lu Zhao-xin(陆兆新), Lu Feng-xia(吕凤霞), *et al. J. Mol. Catal.*(China)(分子催化)[J], 2007, **21**(6): 556 ~ 560

[5] Xin Jia-ying(辛嘉英), Zheng Yan(郑　妍), Wu Xiao-mei(吴小梅), *et al. J. Mol. Catal.*(China)(分子催化)[J], 2006, **20**(6): 574 ~ 578

[6] Dong Ya-qin(董亚琴), Meng Chun(孟　春), Shi Xian-ai(石贤爱), *et al. J. Mol. Catal.*(China)(分子

催化)[J], 2006, **20**(4): 351 ~354
[7] Xin Jia-ying(辛嘉英), Zhao Yong-jie(赵永杰), Xia Chun-gu(夏春谷), *et al*. *J. Mol. Catal.*(China)(分子催化)[J], 2006, **21**(1): 76 ~83
[8] Yan Xiang-hui(严祥辉), Xue Ping(薛 屏), Lu Guan-zhong(卢冠忠). *J. Mol. Catal.*(China)(分子催化)[J], 2006, **20**(5): 473 ~481
[9] Chaabouni M K, Ghamgui H, Bezzine S, *et al*. *Process Biochemistry*[J], 2006, **41**(7): 1 692 ~1 698
[10] Erbeldinger M, Ni X W, Halling P J. *Enzyme and Microbial Technology*[J], 1998, **23**(1 ~2): 141 ~148
[11] Tie Cui-juan(铁翠娟), Kou Xiu-feng(寇秀芬), Xu Jia-li(徐家立). *Chin. J. Catal.*(催化学报)[J], 2002, **23**(1): 81 ~84
[12] Luo Gui-ming(罗贵民). Enzyme engineering(酶工程)[M]. Beijing: Chemical Engineering Press(北京: 化学工业出版社), 2003. 69 ~70
[13] Zhao Tian-tao(赵天涛), Gao jing(高静), Li Wei-jie(李伟杰). *J. Mol. Catal.*(China)(分子催化)[J], 2005, **19**(2): 155 ~160
[14] Ardhaoui M, Falcimaigne M, Ognier S, *et al*. *Biotech Lett.*[J], 2004, **110**(3): 265 ~272
[15] Sabeder S, Habulin M, Knez Z. *J. Food Engineer.*[J], 2006, **77**(4): 880 ~886
[16] Arcos J A, Bernabe M., Otero C. *Enzyme and Microbial Technology*[J], 1998, **22**(1): 27 ~35

Synthesis of Sugar Ester by Enzyme in a Solvent-free System

HU Jun, WANG Hai-ling, ZHU Kai, XU Ning, HAN Ping-fang
(*Nanjing University of Technology*, *College of Life Science and Pharmaceutical Engineering*, *Nanjing* 210009, *China*)

Abstract: Reaction conditions for the direct esterification in a solvent-free system using lauric acid as the acyl donor and fructose as the acyl acceptor, the lipase Novozyme435 immobilized on anion resin as the biocatalyst were investigated. The best result was obtained by direct esterification from 30 μL of the water added, in pH 7.5, with 5: 1 molar ratio of lauric acid to fructose and 17% (w/w) enzyme, at 60 ℃, for 48 h. The maximum relative conversion reached 75.6% based on the diester of fructose laurate. The products were analyzed by TLC and ^{13}C NMR, the result indicated that the products were 1-β-mono-D-fructopyranose laurate with 0.44 Rf and 1, 6-β-di-D-fructopyranose laurate with 0.79 Rf. Compared with the traditional reaction in solvent, the solvent-free system was easier to be separated and purified, saved the solvent, and reduced the cost of produce.

Key words: Solvent-free; Lipase; Fructose laurate; Direct esterification