文章编号:1673-1689(2007)02-0016-05

连续式酶反应器中脂肪酶催化合成麦芽糖月桂酸酯的研究

高 旭， 刘巧瑜， 张晓鸣， 冯 彪
(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘 要:利用连续式酶反应器(CSTR)、固定化脂肪酶催化合成麦芽糖月桂酸酯。确定了连续生产工艺的最佳条件:在丙酮介质中,起始反应器中麦芽糖的浓度为 50 mmol/L,月桂酸浓度为 200 mmol/L,加酶量为 10 g,每天添加 4 g 麦芽糖,200 mmol/L 的月桂酸丙酮溶液以 0.15 mL/min 进入反应器。本反应器的麦芽糖酯产量可以达到 12.32 g/(L·d),麦芽糖的转化率为 58%,高于间歇式生产,而且在生产中不需要添加分子筛。研究了产物的分离纯化方法,利用正己烷对产物进行 3 次洗涤、离心处理,得到的产物麦芽糖月桂酸酯纯度达到 94.16%。

关键词:连续式酶反应器;固定化脂肪酶;麦芽糖月桂酸酯
中图分类号:O 621.3 **文献标识码**:A

Immobilized Lipase-Catalyzed Synthesis of Lauroyl Maltose Using a Continuous Stirred Tank Reactor

GAO Xu， LIU Qiao yu， ZHANG Xiao-ming， FENG Biao
(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, lauroyl maltose was synthesized using a continuous stirred tank reactor through the immobilized lipase-catalyzed condensation of lauric acid and maltose. The optimal condition for continuous production in acetone is as follows: 50 mmol/L maltose, 200 mmol/L lauric acid and 10 g immobilized lipase were added to the reactor at the initral of the operation, 4 g/day of maltose was added, lauric acid dissolved in acetone at a concentration of 200 mmol/L was fed to the reactor at a flow rate of 0.15mL/min. The productivity of this reactor could be reach at 12.32 g/(L·d), which higher that that of the batch reaction. The conversion of maltose is 58%, and without molecular sieves included. The separation and purification of lauroyl maltose was also studied. When the reaction mixture being deacidified with hexnal followed by centrifugation for three times, the final product was purified to be 94.16% of lauroyl maltose.

Key words: Continuous stirred tank reactor; immobilized lipase; lauroyl maltose

收稿日期:2006-07-07.
基金项目:国家 863 项目(2006AA10Z312);江苏省高新技术资助项目(BG2005015);长江学者和创新团队发展计划资助(IRT0532).
作者简介:高旭(1984-),男,安徽安庆人,食品科学与工程硕士研究生.
通讯作者:冯彪(1953-),男,江苏无锡人,教授,博士生导师,法国博士,主要从事食品科学研究. Email:bfeng@sytu.edu.cn

万方数据

糖酯是一类用可再生资源合成的、无毒、易生物降解的非离子型表面活性剂，并且可以通过调控脂肪酸和糖的种类以及酰化的程度来合成不同HLB值的产物。虽然目前对麦芽糖酯的研究报道不多，但其在食品、化妆品等领域具有广阔的应用潜力[1-2]。目前市售的糖酯产品基本上是化学合成的，产物为复杂的混合物，要得到高纯度的产品需进行繁杂的分离工作。而酶催化合成糖酯具有反应选择性高、反应条件温和、副产物很少、产品容易分离纯化等优点。

目前国内外对糖酯的合成工艺研究以间歇式反应为主[3-4]，最近也有报道利用连续搅动反应器(Continuous Stirred Tank Rrector)[5]和填充床反应器(Packed-bed Reactor)[6]连续生产糖酯。相比而言，连续生产更适合于产业化。

作者利用CSTR连续生产麦芽糖月桂酸酯，对其连续生产工艺进行优化，并对产物的分离纯化进行了初步研究。

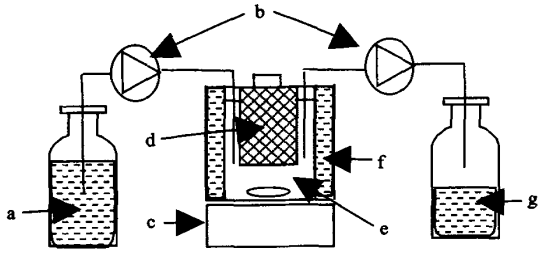
1　材料与方法

1.1　材料和试剂

固定化脂肪酶 Novezym 435，诺维信(中国)生物技术有限公司产品；1/16″分子筛(3A，4A)，上海恒业分子筛有限公司产品；麦芽糖、月桂酸为化学纯，丙酮、甲醇、正己烷等为分析纯。

1.2　主要仪器

CSTR，委托江南大学轻化设备有限公司制作(见图1)；HL-2S型恒流泵：上海青浦沪西仪器厂产品；磁力搅拌器：广州仪科实验室技术有限公司产品；TDL-40B型台式离心机：上海安亭科学仪器厂产品；AL204型电子天平：梅特勒－托利多公司产品；旋转蒸发器：上海亚荣生化仪器厂产品；Agilent 1100型高效液相色谱系统：美国安捷伦公司产品。



a：进料瓶，b：恒流泵，c：磁力搅拌器，d：水浴，e：反应器，f：铁篮，g：出料瓶

图1　连续合成麦芽糖月桂酸酯的连续搅动酶反应装置

Fig. 1　Scheme of CSTR for the continuous synthesis of Lauroyl Maltose

1.3　实验方法

1.3.1　*有机溶剂脱水*　将4A分子筛于250 ℃烘箱内活化6 h，置于干燥器中冷却后，在有机溶剂中加入活化分子筛，浸泡48 h以上备用。

1.3.2　*麦芽糖酯的连续合成*　连续生产装置如图1所示。取固定化脂肪酶5～20 g和3A分子筛0～20 g于反应器中的铁篮，在反应开始时向反应器中添加麦芽糖6.25～50 mmol，月桂酸50～125 mmol和250 mL丙酮。每天加入一定量麦芽糖和分子筛。100～500 mmol/L月桂酸丙酮溶液通过恒流泵以0.08～0.36 mL/min连续进入反应器中，置于50 ℃水浴中并用磁力搅拌器连续搅拌，收集每天的反应液。

1.3.3　*液相色谱定量分析*　HPLC：Agilent 1100 Series，Agilient公司产品；色谱柱：Zorbax SB-C18(5 μm，*D* 4.6 mm×250 mm)；流动相：*V*(甲醇)：*V*(水)＝90：10；体积流量0.8 mL/min，柱温30 ℃，UV检测器，检测波长210 nm，进样量为15 μL。

1.3.4　*产物的分离纯化*　取25 mL反应液旋转蒸发去除反应溶剂丙酮，丙酮回收利用，剩余固体加入正己烷溶解，溶液以4 000 r/min离心10 min，沉淀即为所得产物。酯含量用HPLC测定，酸含量用标准KOH-乙醇溶液滴定。

1.3.5　*麦芽糖酯的液质联用分析(HPLC-MS)*　麦芽糖月桂酸酯在Waters Platform ZMD 4000上进行MS分析。质谱条件：

离子方式 ESI＋，毛细管电压3.9 kV，锥孔电压55 V。

离子方式 ESI－，毛细管电压3.5 kV，锥孔电压21 V。

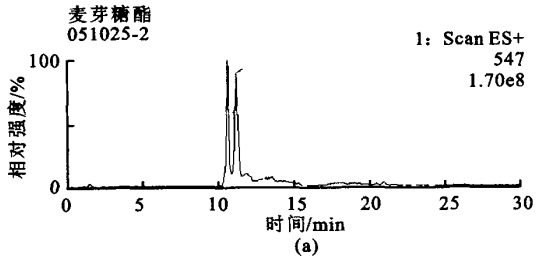
离子源温度 110 ℃；脱溶剂气温度 200 ℃；*m*/*z*：200～1 000。

光电倍增器电压 700 V；气体体积流量 4.2 L/h。

2　结果与讨论

2.1　麦芽糖酯的HPLC-MS鉴定

对反应液作HPLC-MS分析，结果见图2。



万方数据

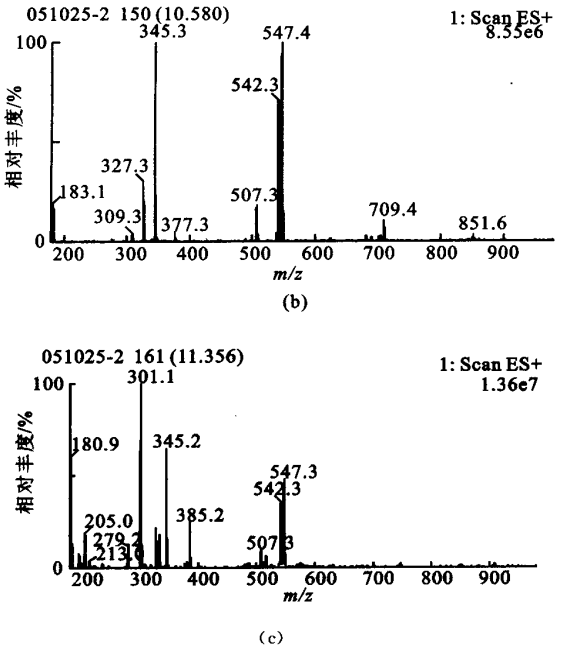


图2 月桂酸麦芽糖酯的MS图谱分析

Fig. 2 ESI-MS spectra of the lauroyl maltose

麦芽糖月桂酸单酯的相对分子质量为524.3，MS图谱中出现的547.3的峰为[M+Na]质谱信号。从反应液的HPLC-MS分析中可以看出，保留时间为10.58 min和11.14 min的组分为麦芽糖月桂酸单酯。

2.2 麦芽糖起始浓度对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

麦芽糖在丙酮溶液中的溶解度仅为0.41 mmol/L，大多数是不能溶解的，但只有溶解在丙酮中的麦芽糖才能参与反应，过高的麦芽糖浓度反而会降低反应的效率[7]。

在连续反应开始时分别添加25～200 mmol/L的麦芽糖，其后不再添加。从图3中可以看出，当加入麦芽糖的浓度太小时，产物浓度较低；而当麦芽糖起始浓度过高时，也会使产物浓度降低。当麦芽糖起始浓度为50 mmol/L时，反应液中麦芽糖酯浓度较大，所以起始反应时应选用麦芽糖浓度为50 mmol/L。

2.3 麦芽糖添加量对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

反应第一天加入50 mmol/L麦芽糖，两天后会发现反应器中未溶解的麦芽糖已经消耗完毕，为了维持连续生产，必须添加麦芽糖。每天向反应器中添加2～5 g麦芽糖，不同添加量下的产物浓度如图4所示。

实验结果表明当每天添加4 g麦芽糖时可以使反应维持在较高的产物浓度下连续进行。

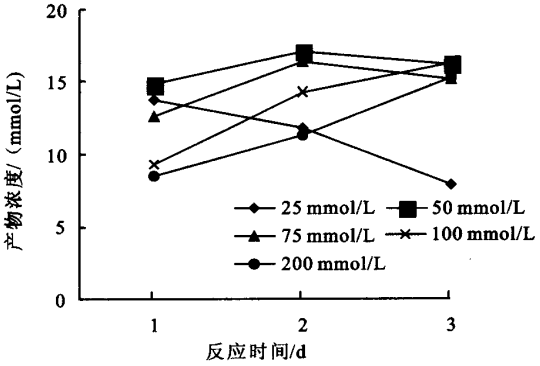


图3 不同麦芽糖起始浓度对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

Fig. 3 Effect of the initial maltose concentration on lauroyl maltose synthesis

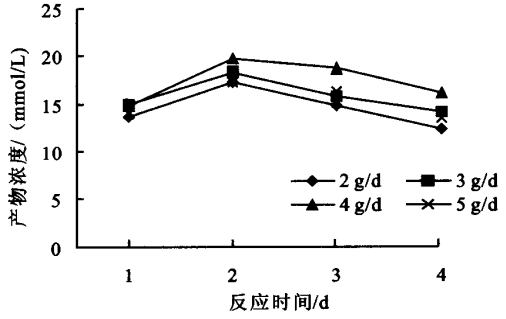


图4 不同麦芽糖添加量对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

Fig. 4 Effect of maltose amount on lauroyl maltose synthesis

2.4 月桂酸浓度对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

当改变脂肪酸浓度，就改变了反应底物的摩尔比，会影响糖酯的合成速率。

从图5中可以看出，当脂肪酸浓度从100 mmol/L上升到200 mmol/L时，产物浓度有了很大的提高。而300、400 mmol/L与200 mmol/L时相比基本相同，但月桂酸的浓度过大会给后续的分离工作带来难度，所以选择月桂酸的进料浓度为200 mmol/L。

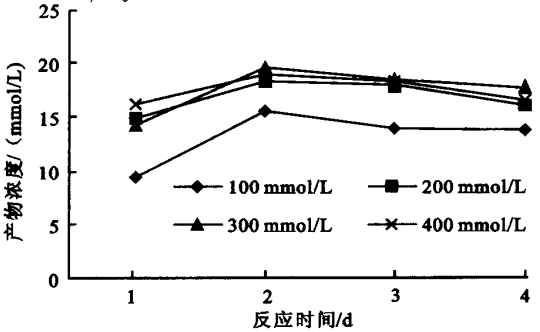


图5 不同月桂酸浓度对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

Fig. 5 Effect of lauric acid concentration on lauroyl maltose synthesis

万方数据

2.5　分子筛添加量对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

麦芽糖和月桂酸反应的副产物是水,添加分子筛能脱除反应中产生的水,使得反应向着合成方向移动,有利于糖酯的合成。但酶在完全无水的有机溶剂中不具有任何酶活力[8]。为了维持酶的分子构象和催化活性,酶分子周围必须存在一个水层。作者使用的脂肪酶来源于 *Candida antarctica*,当水分质量分数处于 0.85%～2.17%范围时,具有较好的酶活[9]。

实验开始时向反应的铁篮中放入 0～20 g 的分子筛,反应开始后每天更换同样量的分子筛。从图 6 中可以看出,反应器中不添加分子筛,可得到较高的产物浓度,添加分子筛后反而使得产物浓度降低。这是由于连续反应副产物水会随着料液的流出而不断带出,所以不需要添加脱水剂便可使酶处于适宜的水分活度下。

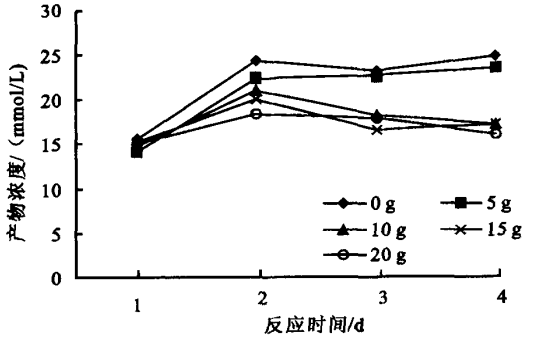


图 6　不同分子筛添加量对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

Fig. 6　Effect of molecular sieve amount on lauroyl maltose synthesis

2.6　酶添加量对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

由于目前脂肪酶的价格较高,酶的添加量的多少不仅关系到反应效率,同时也对能否实现工业化生产有着至关重要的影响,所以要确定能获得最大反应效率时的酶的最小添加量。

如图 7 所示,当加酶量选用 15、20 g 与选用 10 g 时,产物浓度没有明显提高,所以反应器中添加酶 10 g 即可,相当于 40 g/L。

2.7　进料体积流量对反应的影响

改变进料体积流量即改变月桂酸在反应器中的滞留时间。若滞留时间太短,原料尚未充分反应,产物浓度较低;而减慢流速,延长滞留时间会使产物浓度逐渐增大,当减慢到一定流量时,反应液会达到一个稳定状态,产物浓度不再增高。

实验结果表明,当进料体积流量达到 1.5 mL/min 时,产物浓度达到 28 mmol/L,继续降低进料体积流量产物浓度不再升高。此条件下每天收集反应液大约为 210 mL,产量为 3.08 g/d。

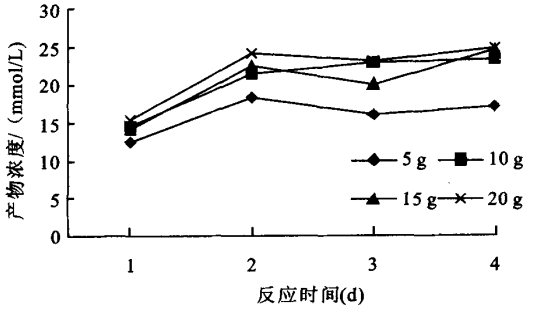


图 7　不同酶添加量对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

Fig. 7　Effect of lipase amount on lauroyl maltose synthesis

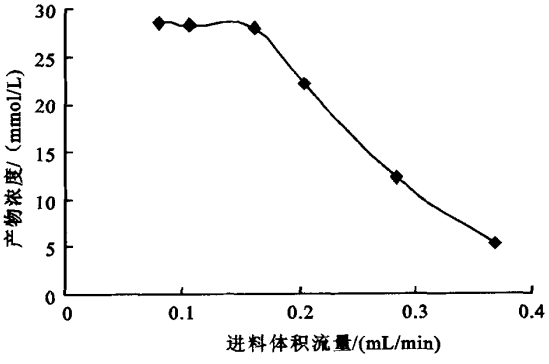


图 8　不同体积流量对麦芽糖月桂酸酯合成的影响

Fig. 8　Effect of flow rate on lauroyl maltose synthesis

2.8　产物的分离纯化

收集的反应液中成分主要为月桂酸和产物麦芽糖酯,以及很少量的麦芽糖,分离工作主要是脱除月桂酸。用柱层析法能很好地分离产物,但不适用于大规模的工业生产。作者选用可以在食品工业中运用的非极性强的溶剂正己烷来溶解月桂酸。

表 1　正己烷用量对分离效果的影响

Tab. 1　Effect of hexane volume on purification

$V_{正己烷}$: $V_{反应液}$	月桂酸质量/g	麦芽糖酯质量/g
1 : 4	无法形成沉淀	
1 : 2	0.068 2	0.145 2
1 : 1	0.061 2	0.132 4
2 : 1	0.024 4	0.121 6
4 : 1	0.022 7	0.121 2

万方数据

表2 二次离心时正己烷用量对分离效果的影响

Tab. 2 Effect of hexane volume on purification when centrifuged again

$V_{正己烷}$: $V_{反应液}$	月桂酸质量/g	麦芽糖酯质量/g
1 : 2	0.006 2	0.074 5
1 : 4	0.010 8	0.119 3
1 : 6	0.015 2	0.125 0
1 : 8	0.019 8	0.134 9
1 : 10	0.023 0	0.136 4

25 mL反应液中含有月桂酸为1.284 7 g,麦芽糖酯为0.171 4 g。从表1中可以看出,加入的正己烷越多,酸能更多的去除,但酯保留得越少,所以样品经过一次离心处理后不能得到理想的结果。选取酯保留率最高的样品进行二次离心处理,见表2,当$V_{正己烷}$: $V_{反应液}$ = 1 : 10时,即向一次处理后的沉淀加入2.5 mL正己烷,此时月桂酸含有0.023 0 g,与一次离心处理$V_{正己烷}$: $V_{反应液}$ = 1 : 4时基本一样,但酯的量多了12.5%。此时得到的产品月桂酸约占总量的14.43%。若要得到更纯的产品,可以继续用正己烷处理。为了使酯尽可能多的保留,正己烷的添加量应在能把沉淀完全分散的基础上,尽可能的少。所以第三次离心处理时,添加2.5mL正己烷,离心后的沉淀含有月桂酸为0.008 1 g,酯的质量为0.130 4 g,此时产品中的酸质量分数约为5.84%,酯质量分数约为94.16%。经过3次处理后,月桂酸脱除了99.37%,月桂酸酯保留了76.07%。离心后的正己烷上清液中可以将正己烷蒸出回收利用,残余的固体含有大量的酸和少量的酯,也可以继续进入反应器反应。

3 结 论

利用CSTR连续催化合成麦芽糖酯,确定了最佳的工艺条件:起始反应器中麦芽糖的浓度为50 mmol/L,月桂酸浓度为200 mmol/L,加酶量为10 g,每天添加4 g麦芽糖,200 mmol/L的月桂酸丙酮溶液以0.15 mL/min的体积流量进入反应器。该反应器的产量可以达到12.32 g/(L·d),麦芽糖转化率为58%,麦芽糖酯的产量大大高于间歇式生产,而且在生产中不需要添加分子筛。

对产物的分离纯化进行了初探,可以得到纯度为94.07%的麦芽糖酯产品。

参考文献:

[1] Philippe. Method for the preparation of D-maltose monoesters with a high 6-0′-ester content and their use in the cosmetic, dental-care, pharmaceuticals and food stuff fields: 欧洲专利:EP0566438,1993.

[2] Oka Okabe, Suganuma S, Tada M,et al. Disaccharide esters screened for inhibition of tumor necrosis factors-a release are new anti-cancer agents[J]. **Jpn J Cancer Res**,1999, 90:669−676.

[3] Manuel Ferrer, M Angeles Cruces,Francisco J Plou,et al. A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose leucrose,maltotriose and n-dodecyl maltosides[J]. **Tetrahedron**,2000,56:4053−4061.

[4] Francisco J Plou, M Angeles Cruces, Manuel Ferrer, et al. Enzymatic acylation of di-and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme,support and solvent[J]. **Journal of Biotechnology**,2002,96:55−56.

[5] Watanabe Y, Kuwabara K, Adachi S, et al. Production of saturated acyl L-ascorbate by immobilized lipase using a continuous stirred tank reactor[J]. **J Agric Food Chem**, 2003,51, 4628−4632.

[6] Kuwabara K, Watanabe Y, Adachi S, et al. Continuous production of acyl L-ascorbates using a packed-bed reactor with immobilized lipase[J]. **J Am Oil Chem Soc**, 2003,80:895−899.

[7] Zhang X, Kobayashi T, Watanabe Y, et al. Lipase-catalyzed synthesis of monolauroyl maltose through condensation of maltose and lauric acid[J]. **Food Sci Technol Res**, 2003,9:110−113.

[8] 古练权,马林. 生物有机化学[M]. 北京:高等教育出版社,1998.

[9] Peter Degn, Wolfgang Zimmermann. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*[J]. **Biotechnology and bioengineering**,2001,74:483−495.

(责任编辑:朱明)

万方数据