

文章编号:1673-1689(2009)01-0033-05

非水相酶法合成葡萄糖月桂酸单酯

高红霞^{1,2}, 冯磊^{*1,2}, 张晓鸣^{1,2}, 贾承胜^{1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为制备葡萄糖月桂酸单酯, 引入了苯基硼酸以增加葡剂中的溶解度并改善反应的专一性。通过考察各参数(溶剂类型、酸醇摩尔比、酶添加量、分子筛添加量及温度等)对转化率的影响, 确定了最佳工艺条件: 葡萄糖浓度 50 mmol/L, 葡萄糖和苯基硼酸摩尔比为 1:2, 反应溶剂为叔丁醇, 酸醇摩尔比为 3:1, 脂肪酶添加量为 20 g/L, 分子筛添加量为 100 g/L, 反应温度为 50 ℃, 反应时间 24 h, 反应体积为 10 mL, 葡萄糖月桂酸单酯转化率为 90.1%。

关键词: 苯基硼酸; 葡萄糖; 葡萄糖月桂酸单酯

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

Study on the Preparation of Lauroyl Glucose Esters

GAO Hong-xia^{1,2}, FENG Biao^{*1,2}, ZHANG Xiao-ming^{1,2}, JIA Cheng-sheng^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In the synthesis of lauroyl glucose esters, phenylboronic acid was introduced to increase the solubility of glucose and to improve the specificity of the reaction. Effects of different parameters on the conversion ratio, such as the solvents, the molar ratio of acid to sugar, the dosage of lipase and molecular sieves, and the temperature, were carefully investigated. The optimum conditions of synthesis were determined as follows: glucose 50 mmol/L, the molar ratio of glucose to phenylboronate is 1:2 (mol/mol), the molar ratio of lauric acid to glucose is 3:1, lipase 20 g/L, molecular sieve 100 g/L, 50 ℃, 24 h in 10 mL tert-butyl alcohol. A conversion ratio up to 90.1% was obtained.

Key words: phenylboronic acid, glucose, lauroyl glucose ester

糖酯是一类具有较宽亲水亲油平衡值(Hydrophile-Lipophile Balance, HLB)范围的非离子型乳化剂, 由于具有无毒、易生物降解及良好的表面活性, 在食品、医药和化妆品等行业有巨大的应用前景^[1-2]。传统的糖酯合成工艺是用化学法合成, 但由于糖环上—OH 众多, 用化学法合成选择性差, 产率不理想, 且需要在高温高压条件下进行, 耗费

巨大的能源, 易造成环境污染。近年来非水相酶法合成糖酯受到研究者的重视^[3-4], 该反应条件温和且脂肪酶具有高立体选择性、区域专一性和位置选择性, 可合成光学纯的糖酯。但在非水相酶法合成糖酯的工艺中, 一方面糖在有机溶剂中的低溶解度限制了糖酯产量的提高^[5]; 另一方面, 酶法合成糖酯的反应也不能完全避免二酯或多酯的产生。苯

收稿日期: 2007-11-30

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10Z312); 江苏省高新技术资助项目(BG2005015)。

* 通讯作者: 冯磊(1953-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事食品科学研究。

Email: bfeng@jiangnan.edu.cn

基硼酸增溶法是指引入苯基硼酸与糖缩合,提高糖的溶解度^[6-7]和反应的专一性^[5,8-11],以提高糖酯的产率,20 世纪 90 年代,Ikeda 等进行过该方面的研究,效果显著。但是目前国内还没有人进行过该方面的尝试。作者研究引入苯基硼酸作为助溶剂,收到了较好的效果,具有一定的理论意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

固定化脂肪酶 Novozym 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;苯基硼酸;宁波应发硼酸钠有限公司产品;葡萄糖、月桂酸为化学纯,叔丁醇、甲醇等试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 合成方法

1)苯基硼酸增溶葡萄糖:将葡萄糖、苯基硼酸和分子筛一起加入脱水叔丁醇溶剂中,在 50 ℃ 下反应 4 h,过滤除去分子筛,旋转蒸发除去溶剂,得到中间体备用。

2)月桂酸酯的合成:将中间体、月桂酸、分子筛和酶加入脱水叔丁醇溶剂中,在 50 ℃ 下反应 24 h,过滤除去分子筛,得到中间体 II。

取等量的水与中间体 II 混合,在 30 ℃ 水浴中水解 2 h。用旋转蒸发除去叔丁醇,在室温下冷却,葡萄糖月桂酸酯结晶即析出。

1.2.2 液相色谱定量分析·HPLC: LCsolution Ver 1. x,SHIMADZU 公司产品;色谱柱,Sunfire™ C18(5 μm,φ4.6 mm×150 mm);流动相,V(甲醇):V(水)=95:5;体积流量 1 mL/min,柱温 35 ℃,蒸发光检测器,进样量 2 μL。

2 结果与讨论

2.1 苯基硼酸的增溶作用

还原糖的有机硼酸酯最早是通过熔融技术制备的,随后葡萄糖的苯基硼酸酯应用到合成中,1,2:3,5-葡萄糖苯基硼酸通常用于制备伯羟基取代的葡萄糖衍生物。1974 年,Peter 等人^[7]合成了海藻糖、葡萄糖、果糖、甘油醛的苯基硼酸酯,并对其结构进行了核磁鉴定。葡萄糖的苯基硼酸易溶于有机溶剂。1993 年,Ikeda 等人^[5]研究了苯基硼酸增溶条件下 *Pseudomonas sp.* 脂蛋白酶催化作用下果糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、蔗糖、阿拉伯糖等多种糖与乙烯基丙烯酸的反应以及 1,2:3,5-葡萄

糖苯基硼酸酯与乙烯基丁酸、月桂酸、橄榄油、豆油等多种脂肪酸的反应,收到了良好的效果。1,2:3,5-葡萄糖苯基硼酸酯与乙烯基丁酸反应 24 h 后产率为 100%。葡萄糖与苯基硼酸反应的方程式如图 1^[5]:

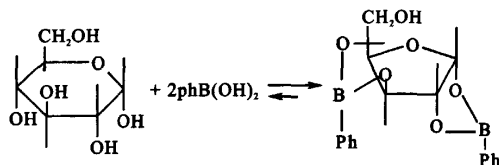


图 1 苯基硼酸与葡萄糖的反应

Fig. 1 Reaction of phenylboronic acid and glucose

苯基硼酸添加的结果是使糖在有机溶剂中本来很小的溶解度大大增加。图 2 是不同比例的葡萄糖与苯基硼酸反应后溶解度的增加情况。

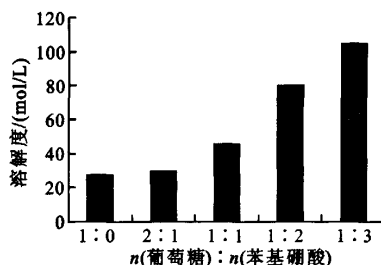


图 2 葡萄糖和苯基硼酸摩尔比对葡萄糖溶解度的影响

Fig. 2 Effect of molar ratio of glucose to phenylboronic acid on glucose solubility

从图 2 可以看出,不添加苯基硼酸时,葡萄糖在叔丁醇中的溶解度为 27.47 mmol/L。随着苯基硼酸所占比例的提高,葡萄糖在叔丁醇中的溶解度不断提高。当葡萄糖与苯基硼酸的摩尔比为 1:2 和 1:3 时,葡萄糖在叔丁醇中的溶解度提高到 80.21 mmol/L 和 104.46 mmol/L,大约为原来溶解度的 3~4 倍,可见苯基硼酸增溶的效果明显。但是葡萄糖月桂酸酯的转化率并不是一直随着溶解度的升高而升高的,HPLC 测定结果表明,n(葡萄糖):n(苯基硼酸)=1:2 时,葡萄糖月桂酸单酯的转化率最高,分析原因可能为转化率除了与溶解度有关外,还与立体选择性和空间位阻等因素相关;过量的苯基硼酸对酶还具有一定的抑制作用^[12];过量的苯基硼酸可能会同伯羟基进一步结合。

2.2 苯基硼酸对糖酯合成专一性的作用

尽管酶反应有较高的专一性,但糖环上面羟基众多,反应活性相差不大。当糖环上面的伯羟基反应后,酶仍然可以催化糖环上面其余的羟基与脂肪酸反应继续成酯。这样就造成了产物为单酯和二酯甚至多酯的混合物,给生产糖酯纯品带来了难度。本实验中,苯基硼酸增溶的过程,占据了糖环

上面伯羟基以外的其他羟基,从而提高了反应的立体专一性。这一效果可以从图 3 中看出:

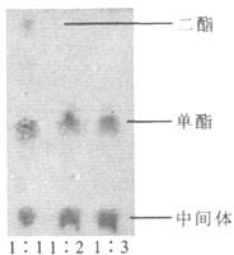


图 3 不同葡萄糖苯基硼酸摩尔比下合成糖酯的 TLC 分析结果

Fig. 3 The TLC analysis of molar ratio of glucose to phenylboronic on reaction

从图 3 可以看出,葡萄糖与苯基硼酸的摩尔比为 1:1 时,仍有少量的二酯生成,这是由于葡萄糖分子上的羟基没有全部与苯基硼酸缩合的缘故。当二者摩尔比提高到 1:2 时,二酯不再产生,说明缩合比较完全。TLC 分析和液相色谱分析结果均显示,若二者摩尔比进一步提高,单酯的产量并没有提高,所以选择 $n(\text{葡萄糖}):n(\text{苯基硼酸})=1:2$ 作为操作参数。

用 HPLC-MS 鉴定反应产物。葡萄糖月桂酸单酯的相对分子质量是 362,MS 图谱中出现的 385 为 $[M+Na]$ 的质谱信号,361 为 $[M-1]$ 的质谱信号,397 为 $[M+Cl]$ 的质谱信号,图 4 表明 12 min 附近出现的峰确实为葡萄糖月桂酸单酯。

2.3 间歇反应工艺条件的优化

苯基硼酸与葡萄糖生成的络合物中间体在脂肪酶的催化下与月桂酸反应成酯,反应方程式^[5]如图 5。

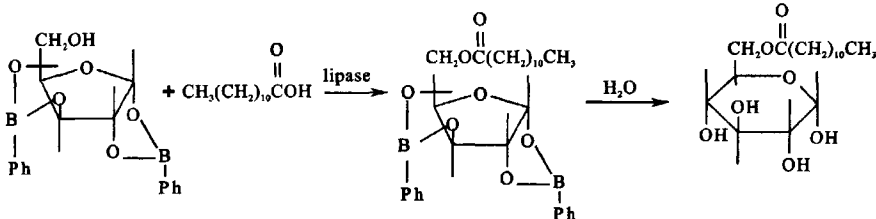


图 5 苯基硼酸-葡萄糖络合中间体与月桂酸的反应

Fig. 5 The reaction of 1,2:3,5-bis(phenylboronate) and lauric acid

苯基硼酸与糖的缩合体在中性和酸性的水溶液中不稳定,极易容易水解^[13],1,2:3,5-葡萄糖苯基硼酸酯与月桂酸反应所生成的酯上所带有的苯基硼酸也极易水解下来。对试验条件(葡萄糖 50 mmol, $n(\text{葡萄糖}):n(\text{苯基硼酸})=1:2$,脂肪酶用量为 20 g/L,酸醇摩尔比 3:1,分子筛用量为 80 g/L,反应温度 50 °C,反应时间 24 h,反应溶剂为叔丁醇,反应体积

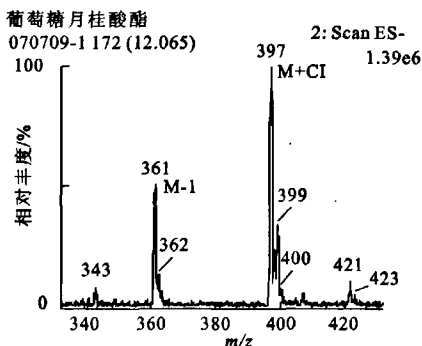
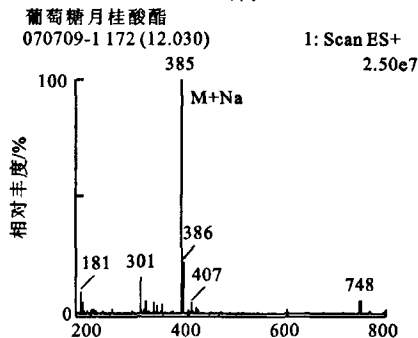
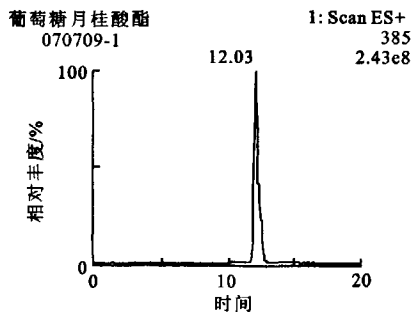


图 4 葡萄糖月桂酸酯的 HPLC-MS 图

Fig. 4 The MS spectra of monolauroyl glucose ester

10 mL)下的反应液在不同条件下进行水解,研究水解条件对葡萄糖酯产率的影响。如表 1 所示。

从表 1 可以看出,30~40 °C 条件下水解 2 h 以上,产率差别不大,都在 0.150 g(产率约 83%)左右波动。这说明温和的条件就足以使带有苯基硼酸的葡萄糖月桂酸酯水解完全。考虑生产的经济性,选择水解条件为 30 °C,2 h。

表1 水解条件对葡萄糖酯产率的影响

Tab.1 Effect of Hydrolysis condition on the yield of glucose

水解 温度/℃	葡萄糖酯产量/g			
	1 h	2 h	3 h	4 h
25	0.120	0.139	0.144	0.152
30	0.131	0.151	0.145	0.155
35	0.142	0.152	0.157	0.149
40	0.144	0.148	0.154	0.150

预实验结果表明,影响葡萄糖月桂酸酯单酯合成的主要因素为溶剂的类型、酸醇摩尔比、酶的添加量、分子筛的添加量及温度等,分别对上述因素进行考察,结果如下。

2.3.1 溶剂类型的影响 在葡萄糖 50 mmol/L,葡萄糖与苯基硼酸摩尔比为 1:2,脂肪酶用量为 20 g/L,酸醇摩尔比为 3:1,分子筛用量为 80 g/L,反应温度 50 ℃,反应时间 24 h 的条件下,考察了不同溶剂对转化率的影响,结果如图 6 所示。

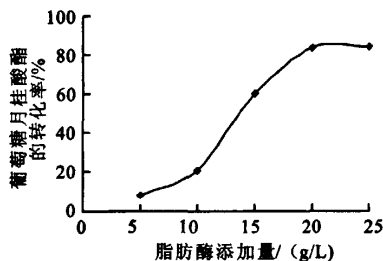


图6 溶剂类型对成酯反应的影响

Fig.6 Effect of kinds of solvent on the reaction of sugar ester

从图 6 可以看出,叔丁醇的反应速率和转化率最高,24 h 时转化率为 83.4%,所以在以后的实验中选择叔丁醇作为反应溶剂。

2.3.2 酸醇摩尔比的影响 在葡萄糖 50 mmol/L,葡萄糖与苯基硼酸摩尔比为 1:2,脂肪酶为 20 g/L,分子筛为 80 g/L,反应温度 50 ℃,反应时间 24 h 的条件下,考察了酸醇摩尔比对转化率的影响,结果如图 7 所示。

图 7 指出,酸醇摩尔比为 3:1 时,葡萄糖月桂酸单酯的转化率达到最大,为 83.4%。随着酸醇摩尔比的进一步提高,转化率没有升高反而略有下降。原因可能是,苯基硼酸与葡萄糖之间的络合是可逆的,酸醇摩尔比超过一定的值时,过多月桂酸可能破坏原有的平衡,改变络合反应的平衡点,进一步改变了缩合中间体的组成比例,从而造成了转化率的降低。

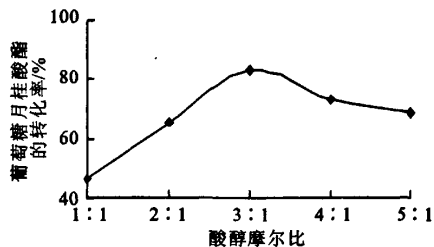


图7 酸醇摩尔比对成酯反应的影响

Fig.7 Effect of molar ratio of lauric acid to glucose on the reaction of sugar ester

2.3.3 脂肪酶添加量的影响 在葡萄糖 50 mmol/L,葡萄糖与苯基硼酸摩尔比为 1:2,酸醇摩尔比为 3:1,分子筛质量浓度为 80 g/L,反应温度 50 ℃,反应时间 24 h 的条件下,考察了脂肪酶添加量对转化率的影响,结果如图 8 所示。

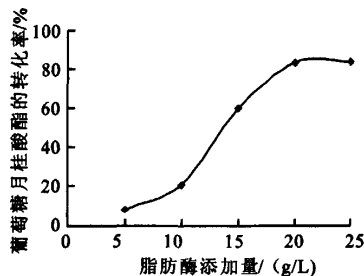


图8 脂肪酶添加量对成酯反应的影响

Fig.8 Effect of amount of lipase on the reaction of sugar ester

如图 8 所示,脂肪酶质量浓度低时,葡萄糖月桂酸酯的转化率随着脂肪酶添加量的增加大幅度提高,当脂肪酶添加量为 20 g/L 时,转化率趋于平衡,考虑到 Novozym435 价格较高,20 g/L 的脂肪酶添加量应是较经济的选择。

2.3.4 分子筛添加量的影响 在葡萄糖 50 mmol/L,葡萄糖与苯基硼酸摩尔比为 1:2,酸醇摩尔比为 3:1,脂肪酶添加量为 20 g/L,反应温度 50 ℃,反应时间 24 h 的条件下,考察了分子筛添加量对转化率的影响,结果如图 9 所示。

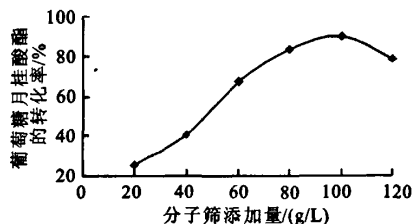


图9 分子筛添加量对成酯的影响

Fig.9 Effect of amount of molecular sieves on the reaction of sugar ester

图 9 表示随着分子筛添加量的增加,葡萄糖月桂酸酯转化率增加,当分子筛添加量为 100 g/L 时,葡萄糖月桂酸酯转化率最高,为 90.1%;但随着分子筛的进一步添加,葡萄糖月桂酸酯转化率略有下降。原因是脂肪酶催化合成要求极为严格的微水相环境,前体物质也极易见水分解;低分子筛质量浓度时,分子筛的加入适时地吸收了合成中生成的过量的水,保证了脂肪酶的活性和前体物质的完整性。当分子筛超过一定质量浓度时,过量的分子筛争夺了脂肪酶催化合成所必需的水分,导致了酶的部分失活,从而导致转化率的降低。

2.3.5 温度的影响 在葡萄糖 50 mmol/L,葡萄糖与苯基硼酸摩尔比为 1:2,酸醇摩尔比为 3:1,脂肪酶添加量为 20 g/L,分子筛添加量为 80 g/L,反应时间 24 h 的条件下,考察了温度对转化率的影响,结果如图 10 所示。

从图 10 看,温度为 50 ℃ 时,葡萄糖月桂酸酯的转化率最高。从反应动力学看,温度升高时,酶反应速度增加;但另一方面,当温度继续升高时,酶分子变性失活的速度也会增加,因此 50 ℃ 是 No-vozym435 的最适反应温度。

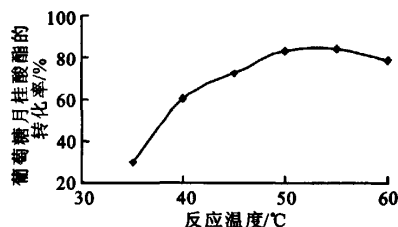


图 10 温度对成酯反应的影响

Fig. 10 Effect of temperature on the reaction of sugar ester

3 结 语

苯基硼酸的加入明显地提高了葡萄糖的溶解度和反应的专一性;最佳参数葡萄糖和苯基硼酸摩尔比为 1:2 时,葡萄糖在叔丁醇中的溶解度大约提高了 3 倍,且反应中只有葡萄糖月桂酸单酯生成。

葡萄糖 50 mmol/L,葡萄糖与苯基硼酸摩尔比为 1:2 条件下,溶剂为叔丁醇,酸醇摩尔比为 3:1,脂肪酶添加量为 20 g/L,分子筛添加量为 100 g/L,反应温度为 50 ℃,反应时间 24 h 的条件下,葡萄糖月桂酸酯转化率最高为 90.1%,该工艺条件为最佳工艺条件。

参考文献(References):

- [1] Arcos J A, Bernabe M, Cristina Otero. Quantitative enzymatic production of 6-O-Acylglucose Esters[J]. *Biotechnol Bioengin*, 1998, 57(5): 505-509.
- [2] Manuel Ferrer, Juan Soliveri. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from thermomyces lanuginosus and candida antarctica B, and their antimicrobial properties[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36: 391-398.
- [3] Sara Sabeder, Maja Habulin, Zeljko Knez. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters[J]. *Journal of Food Engineering*, 2006, 77(4): 880-886.
- [4] Lee Sang Hyun, Sung Ho Ha, Dung Thanh Dang, et al. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid sugar ester using super-saturated sugar solution in ionic liquids[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 131(2): S88.
- [5] Ikeda I, Klivanov A M. Lipase-catalyzed acylation of sugars solubilized in hydrophobic solvents by complicitation[J]. *Biotechnol Bioengin*, 1993, 42: 788-791.
- [6] Wood P J, Siddiqui I R. Characterization of boronic esters of arabinose and xylose[J]. *Carbohydr Res*, 1974, 32: 97-104.
- [7] Wood P J, Siddiqui I R. Synthesis P M R and mass spectra of some boronic esters of carbohydrates[J]. *Carbohydr Res*, 1974, 36: 247-256.
- [8] Schlotterbeck A, Lang S, Wray V, et al. Lipase-catalyzed monoacylation of fructose[J]. *Biotechnol Lett*, 1993, 15: 61-64.
- [9] Oguntimain G B, Erdmann H, Schmid R D. Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents[J]. *Biotechnol Lett*, 1993, 15: 175-180.
- [10] Scheckermann C, Schlotterbeck A, Schmidt M, et al. Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17: 157-162.
- [11] Steffen B, Ziemann A, Lang S, et al. Enzymatic monoacylation of trihydroxy compounds[J]. *Biotechnol Lett*, 1992, 14: 773-778.
- [12] Christian Scheckermann, Andrea Schlotterbeck, Michel Schmidt, et al. Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17: 157-162.
- [13] Michiaki Matsumoto, Kentaro Ueba, Kazuo Kondo. Separation of sugar by solvent extraction with phenylboronic acid and triethylmethylammonium chloride[J]. *Separation and Purification Technology*, 2005, 43: 269-274.

(责任编辑:杨萌)