

文章编号: 1673-1689(2010)04-0526-07

糖酯酶促合成转化率的影响因素分析

刘巧瑜¹, 张晓鸣^{* 2}

(1. 仲恺农业工程学院 轻工食品学院, 广州 510225; 2. 江南大学 食品学院, 无锡 214122)

摘要: 糖酯是典型的非离子型生物表面活性剂, 具有多种用途和功能特性, 广泛应用于食品、医药和化妆品等领域。酶促合成的糖酯较化学合成的具有更安全、更好的应用前景。为指导糖酯酶促合成工艺的优化, 本文论述了反应器、反应体系、水分含量、反应温度、底物和酶等主要因素对糖酯酶促合成转化率的影响。

关键词: 糖酯; 酶促合成; 转化率; 分析

中图分类号: TS 202

文献标识码: A

Factor Analysis of Conversion Ratio in Enzyme-Catalyzed Synthesis of Sugar Esters

LIU Qiao-yu¹, ZHANG Xiaoming^{* 2}

(1. College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: As a specific non-ionic surfactant, sugar esters widely used in food, cosmetics, and pharmaceutical industries. Sugar esters originated from enzyme-catalyzed synthesis process exhibited many advantages, such as more safe and better prospective. The manuscript summarized the factors that affect the sugar esters production by enzyme reaction, including the reactor, reaction media, substrates, etc.

Key words: sugar esters, enzyme-catalyzed synthesis, conversion, analysis

糖酯是以碳水化合物分支为亲水基团, 一个或多个脂肪酸作为疏水基团组成的酯类化合物。糖酯分子中同时具有亲油和亲水基团, 是一类典型的非离子型生物表面活性剂。糖酯的 HLB 值为 1~16, 可做水包油型(O/W)和油包水型(W/O)乳化剂^[1]。目前糖酯广泛应用于食品^[2-3]、医药^[2]、发酵^[3]、化妆品^[4]、洗涤剂^[5]、化肥^[3]等领域, 也可作为

无热量脂的代用品^[6], 一些糖酯及其衍生物还具有抑菌、抗病毒和抗肿瘤等活性^[7-8]。近年来, 全球仅蔗糖酯和葡萄糖酯的年产量就达到了 6 000 吨^[9]。

化学合成是糖酯工业生产中目前采用的唯一方法。由于化学合成的糖酯色泽深、纯度低、有一定毒性^[10], 目前正在研究取代糖酯化学合成的方法, 其中酶促合成法最常用。根据反应机理的不

收稿日期: 2009-05-17

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

作者简介: 刘巧瑜(1977-), 女, 湖北荆门人, 工学博士, 讲师。主要从事表面活性剂的研究。

* 通信作者: 张晓鸣(1965-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士生导师。主要从事生物化学方面的研究。

Email: xmzhang@jiangnan.edu.cn

同,酶法合成糖酯的反应主要有糖与脂肪酸的酯化反应^[11]及糖与脂肪酸酯的转酯化反应^[12],其中转酯化反应可分为醇解、酸解和酯交换等3种类型。影响糖酯酶促合成转化率的因素很多,其中主要有以下6个方面。

1 糖酯酶促合成反应器

根据操作方式不同,糖酯酶促酯化反应器可分为间歇式反应器和连续式反应器。

1.1 间歇式反应器

间歇式反应器在反应过程中没有底物的补充和产物的导出,底物和产物的浓度随反应时间的变化而变化,仅适用于多品种、小批量、反应速率慢的反应过程。目前对酶催化合成糖酯的工艺研究尚处于探索阶段,酶促合成糖酯时大多选用间歇式反应器^[13-15]。

1.2 连续式反应器

连续式反应器以一定的流量不断补充新鲜的底物,同时以相同的流量不断地导出反应液,使反应连续稳定进行。连续反应器可克服间歇反应器因底物消耗或产物积累所导致的反应只能在有限时间内进行的缺点,可提高生产效率,是实现糖酯酶法合成工业化的有效途径^[16]。根据流体混合方式的不同,典型的连续反应器可以分为连续搅拌式反应器(Continuous Stirred Tank Reaction, CSTR)和连续活塞式反应器(Continuous Plug Flow Reactor, CPFR)或填充床反应器(Packed-bed Reactor, PDR)^[17]。

糖在有机溶剂中的溶解度通常较低,为维持尽量高的酯化速度,反应器中的糖往往过量。只有溶解于溶剂中的糖才能更好地与酸和酶接触,并参与酯化反应。连续搅拌可促进糖的溶解,加快传质速度,故CSTR是在有机溶剂中酶促合成糖酯时优先选择的反应器。目前,已采用CSTR连续或半连续合成了曲酸月桂酸酯^[18]、麦芽糖月桂酸单酯^[19]和抗坏血酸饱和脂肪酸酯^[20]等糖酯。

不同的糖在有机溶剂中的溶解度差异极大,故有人采用PDR作为糖酯酶促合成的反应器。用PDR连续合成不同链长的脂肪酸抗坏血酸酯时,产物的转化率可达14%~17%,整个反应可持续10d^[21]。PDR还成功地合成了脂肪酸赤藓糖酯^[21]及甘露糖等己糖脂肪酸酯^[22]。

2 反应体系

底物和酶的良好接触是酯化反应正常进行的

基本条件,因此需选择合适的介质将底物与酶尽量制备成均相体系。常用作糖酯酶促合成反应的介质体系主要有以下3种。

2.1 有机溶剂体系

有机溶剂易产生微水环境,抑制酶的水解活性,是酶促合成糖酯时最常用的反应介质。水溶性的和非水溶性的有机溶剂均可作为酶促合成糖酯的反应介质,但对酶的性质和酯化反应速度有不同的影响。丙酮、乙腈和叔丁醇等水溶性溶剂有利于糖等亲水性底物的溶解,但可能攫取酶分子中保持其催化活性所必需的水,降低酶的活性,甚至使其失活^[23-24]。甲苯、己烷和异辛烷等非极性溶剂有助于保持酶的催化活性,但不利于糖的溶解,酯化反应速度极缓慢^[25]。有机溶剂的极性对产物的平衡转化率也有一定的影响。以脂肪酶催化合成木糖油酸酯时,将溶剂由叔丁醇换成己烷后,二酯和三酯的平衡转化率均降低,而单酯的转化率提高^[26]。

不同的酶和底物的性质不同,因此用不同的酶催化合成糖酯时需选用不同的有机溶剂。猪胰脂肪酶在吡啶中可催化三氯乙醇脂肪酸(C2~C12)与葡萄糖、半乳糖、甘露糖和果糖的酯化,枯草杆菌蛋白酶可在吡啶或二甲基亚砜(DMSO)中催化蔗糖、麦芽糖、乳糖和纤维二糖或麦芽三糖~麦芽七糖等的酯化反应^[27]。

由于糖和脂肪酸的溶解特性差异极大,单一的有机溶剂很难将两者制备为均一的体系。将两种有机溶剂混合,尽管有利于糖和脂肪酸的溶解,但可导致溶剂分子极性的改变,从而影响糖酯的转化率,如木糖油酸二酯的转化率随着溶剂极性的下降而增大^[26]。为促进酶与底物的接触,可对底物或酶进行一定的前处理,目前常用的方法主要有:

1) 糖修饰法。将糖经过一定的修饰,增大其在溶剂介质中的溶解度,可提高糖酯的酶促合成速度。常用的糖修饰法有缩酮式和烷基糖苷式。缩酮式修饰的糖酯化后,需在温和的酸性条件下脱去丙酮叉,才能得到相应的糖酯。该法可提高糖酯的产率,但需进行丙酮叉基团引入和脱除反应,在一定程度上增大了糖酯合成过程的复杂性^[28]。引入烷基修饰基团的反应很简单,且一些酶促反应的产物本身就是良好的表面活性剂,无需再脱去修饰基团,因此较缩酮式修饰更有应用前景^[27]。

2) 硼酸-糖复合物法。糖与有机硼酸能形成可溶于多种非极性有机溶剂的硼酸-糖复合物,该复合物酯化后在极温和条件下水解即可得到相应的糖酯。例如,葡萄糖与苯基硼酸形成的苯基硼酸

葡萄糖复合物在叔丁醇中用脂肪酶催化,可与乙烯酯、脂肪酸或植物油发生酯化或转酯反应,得到转化率较高的糖酯^[27]。

3) 酶或糖的固定化。将酶或糖固定化可促进酶与糖的充分接触,提高酯化反应的速度和糖酯的转化率。将单糖固定在硅胶上,然后用来自于南极假丝酵母菌(*Candida antarctica*)和皱褶假丝酵母菌(*C. rugosa*)的两种脂肪酶催化合成月桂酸糖酯,均可提高糖酯的转化率,同时均100%的在6-OH位上酰化^[29]。将脂肪酶和单糖共同吸附于亲水性硅胶上,还可破坏糖的晶体结构,便于糖摆脱晶格的束缚而进入酶的活性中心,增强糖与酶的接触,从而提高糖酯的转化率^[30]。

2.2 无溶剂体系

无溶剂体系(Solvent-free System)不使用或仅使用少量的有机溶剂,可避免溶剂对酶和产品使用安全性的影响。“固-固”反应体系(Solid to Solid System)是酶促合成糖酯反应中一种常用的无溶剂体系^[27],主要由不溶的反应物和产物组成。在无溶剂体系中,酶促反应仍在液相中进行,因此液相的形成对“固-固”反应体系至关重要^[27]。反应过程中,部分底物首先溶解于液相中,然后在酶的催化下生成产物。由于液相的体积很小,生成的产物很快从液相中析出,从而推动反应的持续进行^[31]。液相主要通过添加微量的在反应温度条件下呈液态的“助溶剂”形成,它的作用是将糖和酸制备成均匀的溶液体系^[32]。

助溶剂通常是水、有机溶剂或水与有机溶剂的混合物。一定量的助溶剂可改善液相的组成,调节液相的体积、粘度、组成和各组分的比例及固相在液相中的分散量和分散程度,可提高反应速度和产物的产率。在酯化反应后期,由于产物的大量析出,混合物固化现象明显,传质受到限制,酯化反应速度降低,添加助溶剂可明显提高反应速度^[27]。助溶剂的lgP值对酯化反应的转化率和产物的产率具有重要影响,极性较强的助溶剂可促进糖的溶解和产物的析出,从而有利于反应的进行^[31]。

2.3 离子液体

离子液体(Ionic Liquids)是由有机阳离子和无机或有机阴离子构成的低熔点盐类,在室温或较低温度(<100℃)下呈液态。离子液体是一种非水相的溶剂,具有不挥发、对热和化学反应稳定及对环境友好等特性。离子液体的极性、疏水性、粘度和溶解性可通过对阳离子和阴离子的适当修饰来调节。葡萄糖和蔗糖在以1-烷基-3-甲基咪唑为阳

离子的离子液体中的溶解度远大于在叔丁醇中的^[27]。与有机溶剂相比,离子液体可提高乙酸葡萄糖酯的酯化选择性^[33]。

3 水分含量

水在糖酯酶促合成反应中具有双刃剑的作用^[34]。一方面,靠近或结合于酶活性中心的水是酶的必需水分,有利于保持酶的酯化催化活性,水也可促进糖的溶解。另一方面,水又是酯化反应的副产物,水的大量生成可降低酯化反应速度,甚至促进酯化物的水解,还可能降低酶的酯化催化活性^[9,35]。

及时脱除反应中产生的水可提高酯化反应速度。常用的脱水法有吸附剂吸附脱水法^[13,36-37]、共沸蒸馏法^[38]、真空脱气法^[39]和蒸发法^[9]。吸附剂法操作简单,吸水剂可重复使用,是糖酯合成研究中最常用的方法^[36]。硅胶和分子筛是最常用的两种脱水剂。相对而言,分子筛具有高效的吸附性和很高的化学稳定性,且成本低廉,容易分离和再生,故常用作糖酯酶促合成反应中的脱水剂^[13,36],但分子筛也具有一定的催化和化学吸附作用,可能促进不稳定底物的降解以及二酯的形成等酯化反应的副反应的发生^[36]。蒸发法可连续操作,故可用于糖酯的酶促工业化生产中^[9]。

4 反应温度

提高反应温度可提高底物的溶解度、降低溶液的粘度,加快传质过程,促进底物与酶的有效接触,加快化学反应的速度^[37]。酶的催化活性也与温度密切相关^[38]。固定其它反应条件,仅改变反应液的温度,在离子液体[60%(BMIM)(BF₄)+40%叔丁醇]中用Nov435脂肪酶催化合成葡萄糖月桂酸单酯时,40、50和60℃时月桂酸的转化率分别为18%、60%和11%^[33]。底物对最适酯化反应温度也有一定的影响,如在上述体系中以C6、C10和C12酸合成葡萄糖酸酯时,60℃时的转化率明显地较50℃时的高^[33]。在几乎无水的有机介质中,酶尤其是固定化酶可维持其刚性构象而具有更高的热稳定性,可耐受更高的温度,故酶促合成糖酯时的温度较水解反应的高^[30]。

5 底物

不同链长的脂肪酸中电子和原子的空间排列不同,因此可影响糖酯的转化率^[39-40]。受脂肪酸碳

链上电子密度的影响, 以非共轭酸为底物酶促合成糖酯时的最大速度与米氏常数的比值 (V_{\max}/K_m) 约比共轭酸的高 10 倍^[39]; 直链脂肪酸的约比支链脂肪酸的高 10 倍^[40]。以 C4~ C12 的脂肪酸为底物, 在叔丁醇和嘧啶 (9: 11, v/v) 组成的混合介质中用 Nov 435 催化合成蔗糖酯时, 初始酯化速度和糖酯的产率随着脂肪酸链长的缩短而上升^[33]。

由于只有溶解于溶剂的糖才能有效地参与酯化反应, 而不同的糖在有机溶剂中的溶解度不同, 因此糖也可对酯化反应速度产生重要的影响。如 30℃ 时, 葡萄糖在 2-甲基丁醇中的溶解度约是蔗糖的 3 倍^[41], 以 2-甲基丁醇为溶剂合成棕榈酸糖酯时, 葡萄糖棕榈酸单酯的转化率远高于蔗糖棕榈酸单酯的^[7]。麦芽糖在有机溶剂中的溶解性较蔗糖好, 当反应条件相同时, 麦芽糖的酯化速度和转化率均较蔗糖的高^[41]。

6 酶

用于催化糖酯合成的酶主要有脂肪酶和蛋白酶等水解酶。脂肪酶可通过催化酯化反应和转酯化反应合成糖酯, 其中最常用的脂肪酶有来源于南极假丝酵母菌 (*C. antarctica*) 的游离脂肪酶 (CAL-B) 及固定化脂肪酶 (Nov 435)^[36]、来源于念珠假丝酵母菌 (*C. cylindracea*) 的脂肪酶 (CCL) 以及猪胰脂肪酶 (PPL)^[33]。蛋白酶一般通过催化转酯化反应合成糖酯, 主要有来源于杆菌属 (*Bacillus*) 的碱性蛋白酶, 它们可在极性较强的 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 和吡啶等有机溶剂中催化糖酯的合成^[27]。 α -糜蛋白酶也可在无溶剂体系中催化合成苯丙氨酸葡萄糖酯^[42]。常见的催化糖酯合成的酶的种类

与来源见表 1^[27]。

表 1 常见的催化糖酯合成的酶

Tab. 1 Enzymes usually used in enzymatic synthesis of sugar esters

酶	来源
脂肪酶	<i>C. antarctica</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. cylindracea</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus arrheus</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Porcine pancreas</i>
蛋白酶	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>

不同来源的脂肪酶在结构上具有明显差异, 部分脂肪酶的结构特征参数见表 2^[43]。由于活性中心等结构上的不同, 不同脂肪酶具有不同的酯化催化活性。以 Nov 435、Lipozyme IM 以及来自假单胞菌 (*Pseudomonas*) 和皱褶假丝酵母菌 (*C. rugosa*) 的脂肪酶催化乳酸和辛酸合成糖酯时, 仅 Nov 435 催化的反应体系中有糖酯的生成^[44]。

酶的酯化催化活性及选择性与酶的来源有关, 还可能受到反应介质和底物等的影响^[45]。高 LogP 值的溶剂有利于保持脂肪酶的酯化催化活性^[40]。在含 20% 二甲亚砜的 2-甲基丁醇中, 以棕榈酸乙酯为底物催化合成麦芽糖酯时, Nov 435 催化的平衡转化率高于固定化嗜热真菌 (*T. lanuginosus*) 脂肪酶催化的, 但后者的初始转化率较前者高^[7]。与脂肪酶相同, 蛋白酶的酯化催化活性与选择性也依赖于溶剂的性质。在同样的反应条件下, 碱性蛋白酶在嘧啶中表现出极高的酯化催化活性, 而在叔丁醇和甲苯中无酯化催化活性^[46]。

表 2 部分脂肪酶的结构特征参数

Tab. 2 Structural characteristic parameters of some lipases

脂肪酶来源	氨基酸残基数	相对分子质量/D	尺度/ (10^{-10}m)	三元组催化中心	pI
<i>C. cylindracea</i>	534	57, 223	64.9 × 97.5 × 175.5	His(449)-Ser(209)-Glu(341)	4.4
<i>C. rugosa</i>	534	57, 744	64.9 × 97.5 × 175.5	His(449)-Ser(209)-Glu(341)	4.9
<i>G. candidium</i> iv	544	60, 000	65 × 60 × 45	His(483)-Ser(217)-Glu(364)	4.56
<i>G. candidium</i> ⊕	544	60, 000	59.4 × 84 × 56	His(483)-Ser(217)-Glu(364)	4.3~4.6
<i>R. miehei</i>	269	29, 472	71.6 × 75 × 55	Ser(144)-His(267)-Asp(203)	-
人胰脏	449	-	48.3 × 93.9 × 122.1	Ser(152)-His(263)-Asp(176)	-

酶的固定化或修饰可提高酶的酯化催化活性、稳定性和选择性。酶的固定化有利于提高酶在有机溶剂中的分散性, 促进底物与酶活性位点的充分接触, 还有利于酶的回收和再利用。由于不同的固

定酶的载体具有不同的表面结构, 故酶与载体的结合方式和结合位点不同, 从而对固定化酶的活性和选择性产生一定影响^[47-48]。用表面活性剂修饰也可提高酶在有机溶剂中的催化活性和稳定性, 部分

脂肪酶用葡萄糖修饰可提高其热稳定性^[49]。

3 结 语

糖酯酶促合成中, 反应器、反应体系、水分含量、反应温度、底物和酶是影响糖酯酶促合成转化率的六大因素。糖酯酶促合成技术在食品及相关

领域的研究目前已有报道, 但大都还处于应用基础研究阶段, 糖酯酶促合成的工业化尝试还不多。随着新型反应器的应用, 反应体系的建立, 酶性质的优化和成本的降低, 酶法清洁生产的优越性必将促进糖酯酶促合成的突破性发展。

参考文献 (References):

- [1] Ganske F, Bornscheuer U T. Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing inorganic liquids and t-BuOH [J]. **J Mol Catal B: Enzym.**, 2005, 36 (1): 40– 42.
- [2] 张灏, 严梅荣, 彭冬梅. 麦芽糖脂肪酯的制备研究[J]. **食品科学**, 2006, 27 (11): 257– 259.
ZHANG Hao, YAN Mei-rong, PENG Dong-mei. Study on preparation of maltose fatty acid ester [J]. **Food Science**, 2006, 27 (11): 257– 259. (in Chinese)
- [3] 张晓鸣, 周健, 刘巧瑜, 等. 有机相脂肪酶催化合成技术在食品及相关领域的应用[J]. **食品与生物技术学报**, 2006, 25 (1): 120– 125.
ZHANG Xiao-min, ZHOU Jian, LIU Qiao-yu, et al. Application of lipase-catalyzed synthesis in organic solvent for food and related industry [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25 (1): 120– 125. (in Chinese)
- [4] Prevot A B, Pramauro E, Gallarate M, et al. Determination of micelle/water partition coefficients of cosmetic preservatives: Optimisation of the capillary electrophoretic method [J]. **Analytica Chimica Acta**, 2000, 412: 141– 148.
- [5] Philippe M. Method for the preparation of D-maltose monoesters with a high 6-O-ester content and their use in the cosmetic, dental-care, pharmaceuticals and food stuff fields: France, Patent EP0566438[P]. 1993– 07– 26.
- [6] Fanun M, Leser M, Aserin A, et al. Sucrose ester microemulsions as microreactors for model maillard reaction [J]. **Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp**, 2001, 194: 175– 187.
- [7] Watanabe Y, Katayama S, Matsubara M, et al. Antibacteria carbohydrate monoesters suppressing cell growth of *Streptococcus* mutants in presence of sucrose [J]. **Curr Microbiol**, 2000, 41: 210– 213.
- [8] Niraula B, King T C, Misran M. Evaluation of rheology property of dodecyl maltoside, sucrose dodecanoate, Brij 35p and SDS stabilized O/W emulsion: effect of head group structure on rheology property and emulsion stability [J]. **Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects**, 2004, 251: 59– 74.
- [9] Ferrer M, Soliveri J, Plou J F, et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipase from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties [J]. **Enzyme Microb Technol**, 2005, 36: 391– 398.
- [10] Adachi S, Kobayashi T. Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugar and fatty acids in water-miscible organic solvent [J]. **J Biosci Bioeng**, 2005, 99 (2): 87– 94.
- [11] Sakaki K, Aoyama A, Nakane T, et al. Enzymatic synthesis of sugar esters in organic solvent coupled with pervaporation [J]. **Desalination**, 2006, 193: 260– 266.
- [12] Pedersen N R, Halling P J, Pedersen L H. Efficient transesterification of sucrose catalysed by the *metalloprotease thermolysin* in dimethylsulfoxide [J]. **Febs letters**, 2002, 519: 181– 184.
- [13] Arcos, J A, Bernab M, Otero C. Quantitative enzymatic production of 6-O-acylglucose esters [J]. **Biotechnol Bioeng**, 1998, 57: 505– 509.
- [14] Watanabe Y, Miyawaki Y, Adachi S, et al. Synthesis of lauroyl saccharides through lipase-catalyzed condensation in microaqueous water-miscible solvents [J]. **J Mol Catal B: Enzym.**, 2000, (10): 241– 247.
- [15] Zhang X, Kobayashi T, Adachi S, et al. Lipase-catalyzed synthesis of 6-O-vinylacetyl glucose in acetonitrile [J]. **Biotechnol Lett**, 2002, 24: 1097– 1100.
- [16] Adachi S, Kobayashi T. Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugar and fatty acids in water-miscible organic solvent [J]. **J Biosci Bioeng.**, 2005, 99 (2): 87– 94.

- [17] Piao J, Adachi S. Enzymatic preparation of fatty acid esters of sugar alcohols by condensation in acetone using a packed-bed reactor with immobilized *Candida Antarctica* lipase[J]. **Biocatal Biotransform**, 2005, 97: 386– 392.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Piao J, Kobayashi T, Adachi S, et al. Continuous synthesis of lauroyl or oleoyl erythritol by a packed-bed reactor with an immobilized lipase [J]. **Process Biochem**, 2004, 39: 681– 686.
- [22] Watanabe Y, Miyawaki Y, Adachi S, et al. Continuous production of acyl mannoses by immobilized lipase using a packed-bed reactor and their surfactant properties[J]. **Biochem Eng J**, 2001, (8): 213– 216.
- [23] Soutani S, Engasser J M, Ghoul, M. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters[J]. **J Mol Catal B: Enzym**, 2001, 11: 725– 731.
- [24] Castillo E, Pezzotti F, Navarro A, et al. Lipase-catalyzed synthesis of oxytilol monoesters: solvent engineering approach [J]. **J Biotechnol**, 2003, 102: 251– 259.
- [25] Watanabe Y, Miyawaki Y, Adachi S, et al. Synthesis of lauroyl saccharides through lipase-catalyzed condensation in microaqueous water-miscible solvents[J]. **J Mol Catal B: Enzym.**, 2000, (10): 241– 247.
- [26] Castillo E, Pezzotti F, Navarro A, et al. Lipase-catalyzed synthesis of oxytilol monoesters: solvent engineering approach [J]. **J Biotechnol**, 2003, 102: 251– 259.
- [27] 陈志刚, 宗敏华, 娄文勇. 非水介质中酶促糖酯合成研究进展[J]. **分子催化**, 2007, 21 (1): 90– 95.
CHEN Zhigang, ZONG Minhua, LOU Wenrong. Process of lipase-catalyzed synthesis sugar esters in non-aqueous medium [J]. **Journal of Molecular Catalysis**, 2007, 21 (1): 90– 95. (in Chinese)
- [28] Ward O P, Fang J, Li Z. Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid [J]. **Enzyme Microb. Technol**, 1997, 20 (1): 52– 56.
- [29] Tsitsimpikou C, Daflos H, Kolis F N. Comparative studies on the sugar esters synthesis catalysed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* lipases in hexane [J]. **J Mol Catal B: Enzym**, 1997, 3 (4): 189– 192.
- [30] 张念湘, 曹淑桂, 董恒, 等. 有机相中脂肪酶催化糖酯合成的研究[J]. **高等学校化学学报**, 1996, 17 (9): 1404– 1407.
ZHANG Nianxiang, CAO Shugui, DONG Heng, et al. Studies on synthesis of monosaccharide esters catalyzed by lipases in organic solvents[J]. **Chemical Journal of Chinese universities**, 1996, 17 (9): 1404– 1407. (in Chinese)
- [31] Cao L, Fisher A, Bornscheuer U T, et al. Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid esters[J]. **Biocatal. Biotransform**, 1996, 14: 269– 283.
- [32] Julitte F, Yves Q, Jean-Paul M, et al. Co-melting of solid sucrose and multivalent cation soaps for solvent-free synthesis of sucrose esters[J]. **Tetrahedron Letters**, 2007, 48: 4111– 4114.
- [33] Ganske F, Bornscheuer U T. Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing inorganic liquids and t-BuOH [J]. **J Mol Catal B: Enzym**, 2005, 36 (1): 40– 42.
- [34] Antczak T, Patura J, Szczepan Antczak M, et al. Sugar esters synthesis by a mycelium-bound *Mucor circinelloides* lipase in a micro-reactor equipped with water activity sensor[J]. **J Mol Catal B: Enzym**, 2004, 29: 155– 161.
- [35] Naoe K, Ohsa T, Kawagoe M, et al. Esterification by *Rhizopus delemar* lipase in organic solvent using sugar ester reverse micelles[J]. **Biochem Eng J**, 2001, (9): 67– 72.
- [36] Zhou J, Tao G, Liu Q, et al. Equilibrium yields of mono- and dilauroyl mannoses through lipase catalyzed condensation in acetone in the presence of molecular sieve[J]. **Biotechnol Lett**, 2006, 28: 395– 400.
- [37] Yan Y, Bornscheuer U T, Cao L, et al. Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid esters[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1999, 25: 725– 728.
- [38] Šaš, Maja H, Željko. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters [J]. **J Food Eng**, 2006, 77 (4): 880–

886.

- [39] Charton M. Contributions of steric, electrical and polarizability effects in enantioselective hydrolyses with *Rhizopus nigricans*: a quantitative analysis [J]. **J Org Chem**, 1987, 52: 2400–2403.
- [40] Kobayashi T, Adachi S, Matsuno R. Lipase-catalyzed condensation of *p*-methoxyphenethyl alcohol and carboxylic acids with different steric and electrical properties in acetonitrile [J]. **Biotechnol Lett**, 2003, 25: 3–7.
- [41] Tsavas P, Polydorou S, Fafila I, et al. Solubility of glucose in mixtures containing *t*-pentanol, dimethylsulfoxide, acid, ester and water [J]. **J Chem Eng Data**, 2002, 47: 807–810.
- [42] 黄成红, 徐迪, 黄仲立, 等. 无溶剂体系中蛋白酶催化氨基酸糖酯合成研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(1): 69–72.
HUANG Cheng-hong, XU Di, HUANG Zhong-li, et al. Protease-catalyzed synthesis of monosaccharide amino acid ester in solvent-free system [J]. **acta scientiarum naturalium universitatis sunyatseni**, 2006, 45(1): 69–72. (in Chinese)
- [43] 郭铮, 张根旺. 脂肪酶的结构特征和化学修饰[J]. 中国油脂, 2003, 28(7): 5–10.
GUO Zhen, ZHANG Geng-wang. Structural Characteristics and chemical modification of lipase [J]. **China Oils and Fats**, 2003, 28(7): 5–10. (in Chinese)
- [44] Pirozzi D, Guido G J. Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate [J]. **Enzyme Microb Technol**, 2004, 34: 94–100.
- [45] Plou F J, Cruces M A, Ferrer M, et al. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent [J]. **J Biotechnol**, 2002, 96(1): 55–66.
- [46] Xiao Y M, Wu Q, Cai Y, et al. Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents [J]. **Carbohydr Res**, 2005, 340: 2097–2103.
- [47] Francisco R J, Neptuno R, Francisco G, et al. Cinnamic carbohydrate esters: new polymeric support for the immobilization of horseradish peroxidase [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2004, 58: 79–88.
- [48] Szczesna-Antczak M, Antczak T, Rzycka M, et al. Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in nonaqueous media [J]. **J Mol Catal B: Enzym**, 2004, 29: 163–171.
- [49] Pablo D M, Fernando M A, Sergio P M, et al. Heptyl oleate synthesis as useful tool to discriminate between lipases, proteases and other hydrolases in crude preparations [J]. **Enzyme Microb Technol**, 2002, 31(3): 283–288.

(责任编辑: 杨萌)