

文章编号:1673-1689(2006)01-0120-07

有机相脂肪酶催化合成技术在食品及相关领域的应用

张晓鸣, 周健, 刘巧瑜, 倪婉星, 冯 翥

(江南大学 教育部食品科学与安全重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对有机相脂肪酶催化合成技术的研究及其在食品、化妆品、医药、精细化工领域的应用进行了综述, 表明有机相脂肪酶催化合成技术具有直接利用底物、反应条件温和、反应选择性高、产品容易分离纯化、产品具有绿色环保概念等优点。

关键词: 脂肪酶催化合成; 有机相; 应用

中图分类号: TQ 925; TQ 423

文献标识码: A

Application of Lipase-Catalyzed Synthesis in Organic Solvent for Food and Related Industry

ZHANG Xiao-ming, ZHOU Jian, LIU Qiao-yu, NI Wan-xing, FENG Biao

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The lipase-catalyzed synthesis in organic solvent has been studied extensively in recent years because of the direct use of unmodified substrates, moderate reaction conditions and high regioselectivity of the enzyme, as compared with chemical synthesis. It is favorable for purifying products, with the characteristics of "Cleanly production with clean technology" and represents the future of chemical industry.

Key words: lipase-catalyzed synthesis; organic solvent; application

酶有着普通催化剂无可比拟的优越性, 已广泛应用于食品、医药、轻纺、洗涤剂及化妆品等工业领域。这些应用大多数是在水溶液中进行的。但许多有价值的产品是水不溶的, 同时许多有用的化合物是普通化学方法无法合成的。因此, 人们希望找到一种合适的方法来生产这些高价值的重要产品。

酶工程的发展有两个途径: 一是改造酶本身, 如蛋白质工程等; 二是改造反应介质, 如采用非水介质、超临界流体等, 即溶剂工程等。1984 年, Zaks

A 和 Klivanov A. M.^[1] 首次发表了关于有机相介质中脂肪酶的催化行为及热稳定性的研究报告, 引起了广泛的关注。传统的酶学领域迅速产生了一个全新的分支——非水酶学。现在非水酶学方法在多肽合成、聚合物合成、药物合成以及立体异构体拆分等方面已经显示出广阔的应用前景^[2]。酶在有机介质中的催化作用大大拓宽了酶的应用范围, 是酶工程中一个有意义的研究领域。

收稿日期: 2005-06-30; 修回日期: 2005-08-28.

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2003018); 江苏省高新技术资助项目(BG2005015).

作者简介: 张晓鸣(1965-), 男, 江苏无锡人, 教授, 博士研究生导师.

1 有机相脂肪酶催化合成技术的研究

目前在非水介质中获得应用的酶包括氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类及异构酶类,其中脂肪酶是在有机相中催化反应种类最多、应用最广泛的酶类之一^[3]。

脂肪酶是工业上常用的酶之一,研究表明,在水溶液中它能催化油脂和其它酯类的水解反应,在有机介质中也能催化水解反应的逆反应——酯合成反应^[4~7]和酯交换反应^[8~9]。脂肪酶的这种性质显示它在有机合成中具有极大的应用潜力。脂肪酶作为生物催化剂可运用发酵技术获得,目前已实现商品化。如丹麦 Novo 公司生产的 Lipozyme 脂肪酶,无锡酶制剂厂生产的假丝酵母脂肪酶,南通酶制剂厂生产的青霉脂肪酶等。

1.1 非水相酶催化反应体系

非水相酶学的研究在最近 20 多年里取得了长足的发展,脂肪酶所应用的反应体系也有了较大的改善,主要集中在有机溶剂体系,还有微水条件下的无溶剂体系、微乳液体系、超临界流体介质和体系等。

1.1.1 有机溶剂体系 有机相酶催化反应体系,最先采用的是有机溶剂或有机溶剂与水的混合物。有机溶剂主要是通过酶分子周围的水来影响酶的催化活性,溶解于酶周围水分子层的有机溶剂与酶直接结合会导致酶受抑制或失活;有机溶剂夺去酶分子表面的必需水分,导致酶活下降;因此,溶剂的疏水性越强,对酶活的影响越小。

研究表明^[10],酶的结构在水相和有机相中并没有显著的变化,然而适当的水对酶的催化作用是必需的,且不同酶的必需含水量不同,在有机相酶催化反应体系中存在相应的最适水分含量。Aleky^[11]研究了 3 种不同的酶在不同的有机溶剂中的酶反应,发现在溶解度限制范围内,酶活都随着有机溶剂中水分含量的增加而提高,且达到最大酶活所需的水分含量,疏水溶剂比亲水溶剂少。

1.1.2 反胶束体系 在水/有机溶剂两相体系和微水有机溶剂单相体系中,仅有少数的酶能保持催化活性。由于反胶束体系能较好地模拟酶的天然环境,因而在反胶束体系中^[12],大多数酶能够保持活性和稳定性,甚至表现出“超活性”。

表面活性剂溶解于有机溶剂,能够增溶一定量的水,根据水、表面活性剂、有机溶剂三相浓度不同,形成圆球状或圆柱状反胶束微粒,形成所谓“油包水”的结构。酶在反胶束体系中的活力主要由三

方面的因素决定:核心水团的大小、表面活性剂的种类及反胶束微粒的浓度。由于反胶束模型和组成对酶活性有影响,调节反胶束的特性可使酶更适用于特定的反应,提高反应速度。如将 Tween 系列的非离子表面活性剂按 m (二(2-乙基己基)磺化琥珀酸钠 AOT): m (吐温 Tween)=16:1 加入 AOT 反胶束中^[13],可使 *C. viscosum* 脂肪酶活性提高 3 倍;将乙醇作助表面活性剂加入 AOT 反胶束中,可使角质酶稳定性提高 45 倍。

由于反胶束酶组成灵活,热力学稳定,传质阻力小,产物易于回收,目前反胶束体系酶反应广泛应用于有机相中脂肪酶催化的酯交换反应、肽和氨基酸的合成以及酶法合成酚及芳香胺聚合物的反应^[14~17]。另外,反胶束中的脂肪酶催化立体选择性酯化反应对映体的拆分也有重大意义。

1.1.3 超临界流体 有机溶剂酶反应产物中,不可避免地残留了部分有机溶剂,对食品和医药造成污染,限制了有机相酶反应的应用。超临界流体是一种超过临界温度和临界压力的特殊物质,物理性质介于液体和气体之间。超临界流体作为酶反应中间介质,具有明显的优点:1) 有似液体的密度、似气体的扩散性和粘度,因此显示出较大的溶解能力和较高传递特性,从而大大降低酶反应的传质阻力,提高酶反应速率;2) 反应底物的溶解性对超临界的操作条件(如温度、压力)特别敏感,通过简单改变操作条件或附加其它设备,可达到反应物和底物分离的目的;3) 无毒、不可燃、化学惰性、易与反应物及底物分离、价格便宜等,这些优点和特点使其在工业上,尤其是在食品与发酵行业上的应用,具有广阔的发展前景^[18]。

水、超临界流体、酶是构成反应体系的 3 个要素。目前研究的超临界流体中的酶反应主要是酯化、酯交换、醇解、水解、氧化等反应。研究最多的是脂肪酶,超临界 CO₂ 中脂肪酶催化乙酸乙酯和异戊醇的醇解反应,用超临界 CO₂ 代替庚烷作反应介质,反应速度提高 3 倍。另外,通过消旋混合物的拆分或手性合成来生产纯的旋光异构体,也是超临界流体酶反应的一个诱人的应用前景。

1.1.4 无溶剂系统 一般来说,酶反应都是在溶有底物的溶剂中进行的均相反应,选择对底物溶解性好又不使酶失活的合适溶剂比较困难。无溶剂系统^[12]是指反应体系中没有附加的溶剂,只含有反应物和酶。无溶剂系统具有突出的优点:可避免有机溶剂引起的毒性及易燃问题,这对于食品、化妆品、药物的生产尤为重要。无溶剂系统增大了底物

浓度,减少了反应的体积,提高了产物的浓度;终产物易于分离纯化。

目前,采用无溶剂系统进行酯的合成很普遍,如甘油酯、糖酯、丁酸香叶酯的合成以及橄榄油的内酯化反应等。底物摩尔比、反应温度、机械搅拌速度以及水活度等都会影响无溶剂系统的酶反应。在利用脂肪酶催化蔗糖单酯的合成中,加入固体水合物 $\text{Ba}(\text{OH})_2$,使反应混合物的水活度保持在 0.4,明显提高了产量和酶的区域专一性。

1.1.5 低共熔多相体系 无溶剂系统只适合于底物为液体的反应。Gill^[19]等首先采用低共熔多相体系进行酶促肽合成。低共熔混合物,是指两种或两种以上的混合物,在一定组分比率下会表现出比纯组分熔点低的低共熔点,并且多相共存。一定组分比率的底物以及适量的水,有时还要加入一定量的辅助剂,就形成酶反应的低共熔多相体系。这一体系的酶反应具有避免使用有机溶剂,适于进行食品、药物、化妆品等生产,并且环境友好,能获得高浓度的产物,酶易于回收再利用等优点。

目前低共熔多相体系主要用于生物活性肽、调味肽的合成。酶和底物的选择、底物比率、辅助剂的选择、酶用量、水含量等,可影响低共熔多相体系的酶反应。一定量的辅助剂可以改善低共熔体系的形成以及固相在液相中的分散,大大提高反应产率。辅助剂一般是亲水的含氧有机溶剂,如醇、酯、醚等,体积分数为 8%~44%(体积分数)。

1.2 有机相酶催化合成反应体系的水分控制

有机相环境中酶催化合成反应体系中水分的控制是一个难点。酯化反应的副产物是水,水的影响比较复杂。水在有机相酶催化反应中起关键作用,脂肪酶催化合成对水的要求很严,其主要影响有以下几个方面:1)对酶的影响,靠近或结合在酶活性部位的水分对保持酶的微水相环境是必需的。强极性溶剂、亲水性过强的低相对分子质量底物或强脱水剂都可能攫取保持酶活所必需的水,从而使酶失活,但过多的水也会降低酶的催化活力;2)对产物平衡转化率的影响,反应体系中水的积累会降低平衡转化率,抑制热力学平衡向有利于合成的方向移动,还可能导致产物的水解;3)对底物溶解度的影响,Watanabe 等^[6]研究表明底物溶解度和溶剂中的水分浓度之间存在如下的关系: $C_s = \alpha \exp(\beta C_w)$;4)对产物组成的影响,在合成脂肪酸糖酯的反应中,脱水过强会导致不希望的二酯或三酯等副产物形成,既降低了目标产物单酯的得率,又降低其纯度,增加分离纯化难度。因此,有机相脂肪

酶催化反应体系的水分控制是一个非常复杂的课题,还有很多理论有待研究,必须采用一个适宜的动力学脱水过程以达到最适的热力学脱水效果。

有机相脂肪酶催化反应中常用的控制水分的方法有很多种^[20,21],如在反应过程中采用减压法使副产物水等蒸发从而使平衡移动;用吸附的办法脱水,如加入氧化铝、硅胶、沸石、分子筛等,这类方法比较常见;其他方法还有添加饱和盐溶液;加入强酸性阳离子交换树脂等。所有这些方法目前都还处于试验阶段,存在很多缺陷。如蒸发法,利用水与有机溶剂形成共沸体系后减压时容易去除的原理,通常认为该方法可应用于较大规模的反应体系。但实际使用中局限性很大,一般只适用于醇类溶剂,对于食品安全许可的两种溶剂(己烷和丙酮)则不合适,因为其沸点都比水低得多,减压蒸发时溶剂首先逸出,脱水效果不佳。

吸附法尤其是分子筛脱水是目前应用最广泛的方法。因为分子筛脱水效果相对比较好,成本低廉,且容易分离和再生。但使用不当也有不利的一面,如由于脱水太强烈而导致酶必需的结合水的去除,使酶失活^[22]或脱水太强烈而导致副产物的形成等。

2 有机相脂肪酶催化合成技术在食品及相关领域的应用

有机相脂肪酶催化在食品、制药、精细化工、有机合成等领域有广阔的应用前景,世界各国都对有机相脂肪酶催化合成活性物质的技术非常重视。有机相脂肪酶催化合成技术在食品及其相关领域的应用研究主要有以下几个方面。

2.1 天然抗氧化剂及健康食品

不饱和脂如 EPA、DHA、花生四烯酸等,因为对人们健康有益,在食品、化妆品、医药方面应用潜力很大。但实际上目前应用还很有限,因为这些不饱和脂肪酸极易氧化,使油脂产生异味,并有毒副作用。延迟油脂氧化最简单的办法是加入抗氧化剂,如 BHA、BHT 等,但因怀疑其有致癌作用,现用量已经下降。人们更愿意用天然、安全的抗氧化剂,如抗坏血酸,常以抗坏血酸棕榈酸酯溶液或反相胶囊方法应用。但这两种方法的效率不高,主要因为易氧化成分和抗氧化剂的接触不好。有意义的解决办法是通过形成酯键把多不饱和脂肪酸和抗坏血酸紧密结合在一起。脂肪酶催化反应由于选择性高,反应条件温和,比化学反应更适合上述目的,而且避免了底物的改变。脂肪酸 VC 酯^[23,24],本身可作为营养性添加剂、乳化剂,还是一

种有效的抗氧化剂,对自身或其他不饱和脂肪酸都有很好的保护作用。

2.2 油脂化学工业

单甘酯(有时包括二甘酯)是一类重要的食品级乳化剂,可以通甘油和游离脂肪酸或其他酰化基团在有机相经脂肪酶催化合成。中等链长的三酰化甘油酯,由于中等链长(M)和长链(L)酰化基团的代谢不同,每种类型均有其特殊的营养价值,所以人们希望能制备具有两种不同链长的三酰化甘油,特别是长链脂肪酸在 *sn*-2 位的 MLM 型产物。这类化合物的制备可以通过酸解反应和内酯化反应来实现。但 MLM 三酰化甘油的最好制法是两步法,首先在有机相脂肪酶催化生成 2-单甘酯,然后进一步经脂肪酶催化合成 *sn*-1,3 中等链长脂肪酸酯,*sn*-2 位长链脂肪酸酯的最终产物。三酰化甘油中 EPA,DHA 的强化可以通过甘油和多不饱和脂肪酸或其酯在有机相经脂肪酶催化转化而实现^[25]。

2.3 生物柴油

生物柴油是一类以天然植物油为原料制成的脂肪酸单酯,具有清洁、可再生、安全性好等优点,是一种真正的绿色能源,可完全替代矿物油作为燃料^[34]。生物柴油的特点有:1) 优良的环保特性。生物柴油含硫量低,可使二氧化硫和硫化物的排放减少约 30%。生物柴油不含对环境造成污染的芳香烃。与普通柴油相比,其尾气中有毒有机物排放量仅为 10%,颗粒物为 20%,CO₂ 和 CO 排放量仅为 10%。生物柴油可达到美国“清洁空气法”所规定的健康影响检测的要求。检测表明,使用生物柴油可降低 90% 的空气毒性。美国加利福尼亚一大学所作的研究表明,与使用柴油相比,使用生物柴油可降低 94% 的患癌率;2) 较好的发动机低温启动性能,无添加剂冷凝点达 -20℃;3) 较好的润滑性能,可降低油泵、发动机缸体和连杆的磨损率,延长其使用寿命;4) 较好的安全性能,其闪点高,不属于危险品;5) 良好的燃料性能,其十六烷值高,燃烧性能优于普通柴油;6) 具有可再生性,生物柴油作为一种可再生能源,其资源不会枯竭。

目前生物柴油主要用化学法生产,即用动物和植物油脂与甲醇或乙醇等低碳醇在酸性或碱性催化剂和高温(230~250℃)下进行转酯化反应,生成相应的脂肪酸甲酯或乙酯,再经洗涤干燥即得生物柴油。化学法合成生物柴油具有以下缺点:工艺复杂,醇必须过量,后续工艺必须有相应的醇回收装置;能耗高、色泽深,脂肪中含有不饱和脂肪酸,高

温下容易变质;酯化产物难于回收,成本高;生产过程有废碱液排放。

为解决上述问题,人们开始研究用生物酶法合成生物柴油^[26],制备相应的脂肪酸酯。酶法合成生物柴油具有条件温和、醇用量小、无污染物排放;副产品甘油较易回收,操作方便;反应物中的游离脂肪酸能完全转化成酯等优点。

2.4 天然风味物质

短链脂肪酸的乙基或异戊基酯等具有强烈的水果香味,是食品、饮料、化妆品和制药中广泛应用的香味、风味剂。天然提取物或发酵法生产的天然风味酯由于产量低,价格高,商业上难于推广应用,目前正在研究利用脂肪酶催化合成技术满足人们对天然风味物质不断增加的需要,该方法比化学法反应专一,条件温和,比微生物发酵法产量高^[27,28]。常见产品见表 1。

表 1 固定化酶催化合成的酯产品

Tab. 1 Ester productions by immobilized lipase catalyzed synthesis

酯	转化率/%
丙酸乙酯	76
丁酸乙酯	100
己酸乙酯	44
庚酸乙酯	84
辛酸乙酯	100
月桂酸乙酯	52
异丁酸乙酯	72
异戊酸乙酯	3
乙酸异丁酯	25
乙酸异戊酯	24
丁酸异戊酯	91

2.5 天然表面活性剂与乳化剂

天然表面活性剂严格而言,应该是由植物或动物来源的产品经过提取、沉淀或蒸馏等简单加工获得的,有机合成产物不属此列。实际使用的表面活性剂中满足这些要求的产品不多,原因在于其生产成本,天然表面活性剂其分离提取过程非常麻烦,费用远远超过相当的合成表面活性剂的生产成本。因此,天然表面活性剂经常是广义地理解,只要是用天然原材料通过生物转化技术合成的表面活性剂通常多称为天然表面活性剂。恰当的例子就是糖或氨基酸的脂肪酸酯。

脂肪酸糖酯化合物是在自然界中广泛存在的一类在细胞膜上承担物质传输和能量传递的具有重要生理活性的物质,同时该类物质还具有两亲结构,能降低水的表面张力形成胶束,是一类重要的

非离子生物表面活性剂。糖酯是由碳水化合物分支作为亲水基团,一个或多个脂肪酸作为疏水基团组成的非离子表面活性剂,广泛应用于食品、化妆品、医药、洗涤剂、纤维工业中^[29]。

目前,糖酯大规模的生产方法一般是利用碳酸钾作催化剂,在不同的反应条件下酯交换合成,其中最常用的方法有 Snell 法、无溶剂法和微乳胶法等。由于糖是多羟基化合物,化学合成的选择性很低,反应又多是在高温下碱性催化,反应条件比较激烈,实际生成的产物可能是单酯、二酯、多酯和副产物的混合物,而且生产中存在色泽加深问题^[30],所以传统化学法合成的糖酯在食品中的应用受到了很大限制。

脂肪酶催化合成糖酯是近几年出现的合成糖酯的新方法,由于脂肪酶具有高立体选择性、区域专一性和位置选择性,因而可合成化学法难以合成的、具有光学活性的糖酯,而且反应条件温和,很少或几乎没有副反应,产品易于纯化、色泽浅,能耗低,这些为乳化剂的进一步扩大应用提供了可能性^[31~33]。

国内外在脂肪酶催化糖酯合成领域,特别是在合成工艺的优化方面,已做了很多研究,为糖酯的进一步开发、应用提供了可能性^[34~36]。目前酶法合成糖酯的工艺主要有二类。一类是由脂肪酸和糖进行酯化反应,如 Ghoul 等用 C8-C18 的脂肪酸合成果糖酯^[35],Yan 等合成葡萄糖脂肪酸单酯^[37];另一类是通过糖和脂肪酸酯的转酯化反应合成,如 Ferrer 等以蔗糖和相应的脂肪酸乙烯酯为底物转酯化合成 6-O-月桂酸蔗糖酯和 6-O-棕榈酸蔗糖酯^[38]。

2.6 护肤产品

维生素 A 及其衍生物在化妆品如护肤产品等方面极具商业潜力,VA 还是重要的添加剂,广泛用于食品、饲料的营养强化。但 VA 非常不稳定,很容易被空气氧化或由于紫外线失活,而且 VA 对于皮肤刺激性较强。通过把 VA 转化为 VA 酯可以减少光致降解和刺激。多种化学方法可以合成视黄醇酯,但产量较低,且最终产物中有化学残留。在有机溶剂中用酶催化的生物学方法来生产视黄醇酯^[39],能有效地进行区域选择性和对映体选择性的酯化或转酯化。

皮肤角质层的弹性取决于其组分,水和吸湿性物质,很多水化润肤剂和润湿剂用于软化增厚的表皮,滋润皮肤。短链 α -羟基酸如乳酸,羟基乙酸被认为是特别好的脱落剂和润湿剂。但是 α -羟基酸(AHAs)穿透到表皮的速度太快,过高质量分

数(高于 10%)使用对皮肤有刺激性。为解决这个问题,可以把 AHAs 嫁接到亲油性适中的基团上。两性分子如烷基配糖物可以作为较好的 AHAs 载体,从而能渗透到表皮的内细胞空间。葡萄糖基和 α -羟基酸之间形成的酯键很容易被表皮酯酶水解,从而实现 AHAs 有效而缓慢地释放到皮肤中^[40]。

2.7 含糖单体和生物可降解的含糖聚合物

高相对分子质量的含糖聚合物是生物可降解的,含有大量的羟基基团,可用作生产高溶胀凝胶、粘度增强剂、药物传输基质的材料。脂肪酶催化各种单糖和乙烯基丙烯酸酯的酯化反应生成 6-丙烯酸酯,通过化学聚合,形成水溶性的聚丙烯酸酯,进一步交联可得到不溶材料,具有自身质量 50 倍的吸水能力。Park 等用 Novozym-435 合成了蔗糖 6,6'-O-二乙烯基己二酸酯和海藻糖 6,6'-O-二乙烯基己二酸酯,利用这些二酯作为单体进一步酶促合成相对分子质量 22 000 左右的直链聚合物^[41]。日本学者合成了 6-O-乙基己二酸葡萄糖酯和 6-O-乙基癸二酸葡萄糖酯^[42~43]。张晓鸣等利用最简便便宜的乙基乙酸合成了 6-O-乙基乙酸葡萄糖,在此基础上合成了相对分子质量在 5 000 左右的水溶性聚合物^[44]。

脂肪酸纤维素酯被认为是潜在的生物可降解塑料。纤维素和脂肪酸都来源广泛,价格相对低廉。目前商品纤维素酯是通过酸酐和硫酸催化的异相化学反应产生的,但这种反应局限于四碳或四碳以下的短链酯。当酰基分支含 6 个或更多个碳原子时纤维素酯的热塑性明显改善,这种酯可以通过纤维素的葡萄糖基团的羟基和长链饱和脂肪酸直接酯化,如用酸性氯化物、吡啶催化异相反应。但酶法生产纤维素酯比化学法有更多优点,有机相中的酶催化反应尤其是脂肪酶已经广泛地用于脂肪醇、萜烯醇、糖等各种物质的立体、区域选择性酯化反应^[45]。

3 结语

与化学合成法相比,酶催化合成有许多优越性:反应选择性高,条件温和;产品容易分离纯化,反应过程中副产物很少;产品具有很强的绿色环保概念,可谓是“用干净的技术生产干净的产品”。

非水相脂肪酶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,脂肪酶催化合成的工业化尝试还不多。随着基因工程和蛋白质工程的发展,脂肪酶成本将不断降低,而酶活和稳定性不断增高,酶法清洁生产的优越

性必将促进这一领域的突破性发展,有机相脂肪酶催化生物转化技术代表了未来产业的发展方向。

参考文献

- [1] Zaks A, Klibanov A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents[J]. **J Biol Chem**, 1988, 263:3194—3201.
- [2] 古练权, 马林. 生物有机化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [3] Coulon D, Ghoul M, Girardin M, et al. Comparison of direct esterification and transesterification of fructose by *Candida Antarticalipase*[J]. **Biotechnology Letters**, 1995, 17(2): 183—186.
- [4] Chamouleau F, Coulon D, Girardin M, et al. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2001, 11:949—954.
- [5] Degn P, Pedersen L H, Duus J, et al. Synthesis of Maltooligosaccharide esters by two enzymatic reactions[J]. **Biotechnology Letters**, 1999, 21:275.
- [6] Watanabe Y, Miyawaki Y, Adachi S, et al. Synthesis of lauroyl saccharides through lipase-catalyzed condensation in microaqueous water-miscible solvents[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2000, 10:241—247.
- [7] Adachi S, Nagae K, Matsuno R. Lipase-catalyzed condensation of erythritol and medium-chain fatty acid in acetonitrile with low water content [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 1999, 6:21—27.
- [8] Ferrer M, Cruces M A, Bernb M, et al. Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1999, 65:10—16.
- [9] Yan Y, Bornscheuer U, Cao L, et al. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters: removal of byproducts by azeotropic distillation[J]. **Enzyme and Microbiology Technology**, 1999, 25:725—728.
- [10] 崔玉敏, 魏东芝, 俞俊棠. 水在有机相酶催化反应中的作用[J]. 生物工程进展, 1999, 19(1):54—61.
- [11] Zaks A, Klibanov A M. The effect of water on enzyme action in organic media[J]. **J Bio Chem**, 1988, 263:8017—8021.
- [12] 周晓露, 宗敏华, 姚汝华. 促进非水相酶反应的研究进展[J]. 分子催化, 2000, 14(6):452—460.
- [13] Jorba X, Clapes P, Torres J L, et al. Ethyl acetate modified AOT water-in-oil microemulsions for the α -chymotrypsin catalyzed synthesis of a model dipeptide derivative[J]. **Colloids Surf A**, 1995, 96: 47—52.
- [14] Wescott C R, Klibanov A M, The solvent dependence of enzyme specificity[J]. **Biochem Biophys Acta**, 1994, 1206:1—9.
- [15] Zaks A, Empie M, Gross A. Potentially commercial enzymatic processes for the fine and specialty chemical industry[J]. **Trends Biotechnol**, 1998, 6(11):272—275.
- [16] Hayes D G, Gulari E. Formation of polyol-fatty acid esters by lipase in reverse micellar media[J]. **Biotech Bioeng**, 1992, 40:110—118.
- [17] Rao A M, John V T, Gonzalez R D, et al. Catalytic and interfacial aspects of enzymatic polymers synthesis in reversed micellar systems[J]. **Biotech Bioeng**, 1993, 41: 531—540.
- [18] 林志勇, 裘爱泳, 王兴国. 超临界二氧化碳下酶法酯交换反应研究进展[J]. 中国油脂, 1997, 22:26—30.
- [19] Gill I, Vulfson E. Enzymic catalysis in heterogenous eutectic mixtures of substrates[J]. **Btch April**, 1994, 12:118—122.
- [20] Gbicza L, Kabiri B A, Keoves E, et al. Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal [J]. **Journal of Biotechnology**, 2000, 84:193—196.
- [21] Sophie C, Russell J. Tweddell, J S, et al. Water activity control: a way to improve the efficiency of continuous lipase esterification [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1998, 60(3):362—368.
- [22] Sylvain L, Marie D L. Working at controlled water activity in a continuous process: the gas/solid system as a solution [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1995, 45(5): 387—397.
- [23] Bousquet M P, Willemot R M, Monsan P, et al. Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acid glucoside esters for dermo-cosmetic applications[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1999, 63(6):730—736.
- [24] Humeau C, Girardin M, Rovel B, et al. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 1998, 5:19—23.
- [25] Frank D, Gunstone. Review Enzyme as biocatalysts in the modification of natural lipids[J]. **J Sci Food Agric**, 1999, 79: 1535—1549.
- [26] 蔡志强, 邬国英, 林西平, 等. 固定化脂酶催化合成生物柴油的研究[J]. 中国油脂, 2004, 29(8):29—32.
- [27] Krishna S H, Divakar S, Prapulla S G, et al. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2001, 87:193—201.
- [28] Krishna S H, Karanth N G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study[J]. **Biochimica et Biophysica**

- Acta**, 2001, 1547:262—267.
- [29] Sodermana O, Johanssonb U. Polyhydroxyl-based surfactants and their physico-chemical properties and application[J]. **Current Opinion in Colloid&Interface Science**, 2000,4:391—401.
- [30] Ducret A, Giroux A, Trani M, et al. Enzymaticpreparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acid in organic media under reduced pressure[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1995, 48(3): 214—221.
- [31] Arcos J A, bernabe M, CristinaOtero. Quantitive enzymatic production of 6-o-acylglucose esters[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1998,57(5):505—509.
- [32] Arcos J A, Charles G, Otero C. Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2001,73(2): 104—110.
- [33] Coulon D, Girardin M, Ghoul M. Enzymaticsynthesis of fructose monooleate in a reduced pressure pilot scale reactor using various acyl donors[J]. **Process Biochemistry**, 1999,34:913—918.
- [34] 张念湘,曹淑桂,董桓,等. 有机相中脂肪酶催化糖酯合成的研究[J]. **高等化学学报**, 1996,17(9):1404—1407.
- [35] Soultani S, Engasser J M, Ghoul M. Effect of acyl donor chain length and sugarracyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2001, 11:725—731.
- [36] Watanabe Y, Miyawaki Y, Adachi S, et al. Continuous production of acyl mannosides by immobilized lipase using a packed-bed reactor and their surfactant properties[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2001, 8:213—216.
- [37] Yan Y, Bornscheuer U T, Stadler G, et al. Regioselective lipase-catalyzed synthesis of glucose ester on a preparative scale [J]. **Eur J Lipid Sci Technol**, 2001, 103:583—587.
- [38] Ferrer M, Cruces M A, Bernab M, et al. Lipase-catalyzed regioselectiveacylation of sucrose intwo-solvent mixtures[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1999, 65(1): 10—15.
- [39] Maugard T, Legoy M D. Enzymatic synthesis of derivatives of vitaminA in organic media[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2000, 8:275—280.
- [40] Bousquet M P, Willemot R M, Monsan P, et al. Enzymatic synthesis of α -butylglucoside lactate: Anew α -hydroxy acid derivative[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1999,62(2):225—234.
- [41] Park O J, Kim D Y, Dordick J S. Enzyme-catalyzed synthesis of sugar-containing monomers and linear polymers[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2000,70:208—216.
- [42] Kitagawa M, Tokiwa Y. Synthesis of polymerizable sugar ester possessing long spacer catalyzed by lipase from *Alcaligenessp.* and its chemical polymerization[J]. **Biotechnol Lett**, 1998,20:627—630.
- [43] Shibatani S, Kitagawa M, Tokiwa Y. Enzymatic synthesis of vinyl sugar ester in dimethylformamide[J]. **Biotechnol Lett**, 1997,19:511—514.
- [44] 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.
- [45] Sereti V, Stamatis H, Pappas C, et al. Enzymatic acylation of hydroxypropyl cellulose in organic media and determination of ester formation by diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy 496[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2001,72(4):495—500.

(责任编辑:朱明)

(上接第98页)

参考文献:

- [1] David J, Daniel A, Duane W. Myoglobin interspecies structural differences: effects on autoxidation and oxygenation[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1986,249:106—115.
- [2] 王海燕,彭增起. 肌红蛋白的功能特性[J]. **肉类工业**, 2001,242:36—40.
- [3] Inger M, Arve Iversen, Grete Skrede. Quantitative determination of myoglobin and haemoglobin in beef by high-performance liquid chromatography[J]. **Meat Science**, 1990,28:313—320.
- [4] Jay B Fox. The chemistry of meat pigments[J]. **Food Processing**, 1966,14:207—210.
- [5] Renerre M, Anton M. Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles[J]. **Meat Science**, 1992,32:331—342.
- [6] Trout G R. Variation in myoglobin denaturation and color of cooked beef, pork and turkey meat as influenced by pH, sodium chloride, sodium triphosphate and cooking temperature[J]. **J Food Sci**, 1989,54:536.
- [7] 孙京新,周光宏,徐幸莲,等. 猪肉中氧合肌红蛋白分离、纯化及其氧化特性研究[J]. **食品科学**, 2002,23:27—31.
- [8] Renerre M, Anton M. Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles[J]. **Meat Science**, 1992,32:331—342.

(责任编辑:朱明)