

# 脂肪酶促糖酯合成研究进展

韩萍芳 安振明 欧阳平凯

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

**摘要:**对脂肪酶采取一定的预处理可以改善其催化活性、稳定性和选择性, 主要方法有固定化、分子印迹、表面活性剂或葡聚糖修饰等。同种脂肪酶对糖环上不同羟基的选择性由糖或糖苷的结构以及溶剂的极性来决定。反应的副产物水、甲醇等对反应转化率和酶活都有影响, 针对不同体系有分子筛吸附、减压低共沸蒸馏、饱和盐溶液控制水活度等解决方案。溶剂的选择是脂肪酶促糖酯合成反应的关键, 既要使 2 种底物都有可观的溶解度又不能对酶活有很大的负面影响, 当前的策略有复合溶剂、离子液体、无溶剂体系、对糖进行修饰、拟固态法和过饱和溶液等。

**关键词:**脂肪酶; 糖酯; 表面活性剂

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)S1-0004-04

## Research progress in lipase catalyzed synthesis of sugar ester

HAN Ping-fang, AN Zhen-ming, OUYANG Ping-kai

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Certain pretreatment of lipase can ameliorate its activity, stability and selectivity. Such pretreatment methods as immobilization, molecular bioimprinting, modification by synthetic detergent or dextran are introduced. Moreover, the regioselectivity in the enzymatic acylation of sugar is of particular interest. Studies which reveal that this regioselectivity can be mediated by the rational choice of organic solvents and by changing the ratio of reactants are reviewed. Byproducts of lipase catalyzed synthesis of sugar ester, water or alcohol, can limit the conversion and inhibit lipase's activity. Methods of overcoming those side-effects, which include continuous removal of byproducts by using molecule sieves or low-boiling-point azeotrope and controlling the water activity by adding salts, are discussed. The choice of solvents, if needed, is another crucial point in this enzymatic synthesis reaction, since sugar has poor solubility in hydrophobic solvents in which lipase has higher stability. The reported selection strategies about solvents include solvent mixtures, ionic liquids, solvent-free media, sugar derivatives, pseudo solid-phase, supersaturated solution, etc.

**Key words:** lipase; sugar ester; surfactant

糖酯是一类应用非常广泛的非离子型表面活性剂。传统的合成工艺是用化学法合成, 但糖是多羟基化合物, 化学合成的选择性差, 所以酯化特定羟基要有保护和去保护的步骤, 故工艺比较复杂; 化学合成还有诸如反应条件苛刻、副产物多、易焦化等不足。而脂肪酶的高度选择性可以克服以上缺点, 因而有很高的研究价值和很好的应用前景。

脂肪酶促合成糖酯反应除了用于合成非离子型表面活性剂之外, 在有机合成、医疗卫生、制药工业、化妆品工业也有广泛的用途。比如: 利用酶的区域选择性把糖上的特异羟基保护或者去保护, 为有机合成提供前体; 利用酶的立体选择性不对称合成或拆分手性化合物, 如合成四环素等抗生素中活性基团光学纯 2,6-双脱氧芳香基葡萄糖苷<sup>[1]</sup>; 转酯合成别霉素和轴霉素的中间体异丁基- $\beta$ -D-友霉素苷(isobutyl- $\beta$ -D-amicetoside)和异丁基- $\beta$ -L-友霉素

苷(isobutyl- $\beta$ -L-amicetoside)<sup>[2]</sup>等; 对某些水溶性的有生理活性的糖及其衍生物或类似物进行修饰, 得到脂溶性衍生物, 提高其生物利用度, 如类黄酮<sup>[3]</sup>、洋地黄皂苷<sup>[4]</sup>、人参皂苷<sup>[5]</sup>等; 对某些脂肪酸或衍生物作特定修饰, 使其具有一定水溶性, 如酚酸<sup>[6]</sup>、 $\alpha$ -羟基酸<sup>[7]</sup>、亚油酸<sup>[8]</sup>、维生素 A 及其衍生物<sup>[9]</sup>; 合成二聚糖酯、三聚糖酯和多聚糖酯<sup>[10]</sup>。笔者将讨论反应中几个值得注意的过程与参数。

## 1 脂肪酶的预处理

酶的固定化有利于酶在有机溶剂中的分散以及底物和酶活性位点的充分接触, 并且便于从体系中分离和再利用, 但载体对酶的活性和选择性都有很大影响。对于同一种酶 CAL-B 采取不同载体固定化后得到的固定化酶, 在同一体系、相同条件下得到的转化率相差非常大, 如用活化硅土固定化后只有

不到2%的转化率,而用聚丙烯作载体转化率达到84%<sup>[11]</sup>。再如把嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 得到的脂肪酶用3种载体,即 Accurel EP100(一种聚丙烯的商品名)、Eupergit C(一种特种丙烯酸酯,德国 Degussa 公司产品)、硅石粒固定化,催化蔗糖的酯化,结果表明 Eupergit C 固定化酶表现出很低的合成活力,聚丙烯固定化酶初始活力很高,但30 min后6位单酯浓度开始下降而生成了双酯(6,6'位和6,1'位),只有硅石粒固定化酶表现出很高的6位选择性和活力<sup>[12]</sup>。这些可能是由于不同载体具有不同表面结构,酶与它们的结合方式和结合位点的不同导致了酶空间结构发生了变化,从而影响了酶的活性和选择性。

对脂肪酶预先进行修饰或处理可改善酶的功能,如运用分子印迹技术用 *n*-辛基- $\beta$ -D-吡喃型葡糖苷(*n*-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside)对脂肪酶进行处理,可使酶的酯化能力和转酯能力大幅度提高<sup>[13]</sup>;用表面活性剂修饰可以提高酶在有机溶剂中的活性和稳定性<sup>[14]</sup>;用葡聚糖对部分脂肪酶进行修饰则可以提高其热稳定性<sup>[15]</sup>。酶的高成本和短寿命一直是限制酶催化在工业中应用的瓶颈,对酶进行修饰以提高其活力和稳定性将是突破这一瓶颈的策略之一。

## 2 酶对糖环上各羟基选择性

一般脂肪酶都是优先催化伯羟基的酯化,在伯羟基被保护的情况下,酶的选择性则要依据糖苷配基、溶剂等的性质而定。如1,6位被保护的吡喃型半乳糖苷,6位为三苯甲基,在非极性溶剂中,酯化主要发生在2位,而在极性溶剂中,则主要发生在3位。这可能是因为非极性溶剂中,三苯甲基的溶解自由能高和溶剂的亲合力强,因而更易暴露在溶剂中,从而带动糖环旋转,使得2位羟基和脂肪酶的活性位点靠近,主要生成2位酯化产物;同理,在极性溶剂中,三苯甲基将会避开溶剂而向酶表面非极性(疏水)部分靠拢,带动糖环使得3位羟基和酶的活性位点结合形成3位酯化产物<sup>[16]</sup>。Bruno等也通过一系列试验证明酶对仲羟基的选择性确实和糖苷配基、糖苷键的立体构型有很大关系<sup>[17]</sup>。

当体系中单酯浓度达到一定程度时,脂肪酶就会以单酯为底物,继续催化其酯化成为双酯、三酯,因此如何控制反应条件以得到目的产物也是人们经常讨论的焦点之一。主要策略是通过调节水含量、温度、底物配比等使体系中目的产物析出,降低其浓

度,同时增加底物的浓度,提高其对酶活性中心的竞争力;或者调节介质极性,提高酶的选择性<sup>[18]</sup>。

葡糖酰胺是一类适用于碱性环境下的表面活性剂,合成底物为氨基糖或其衍生物,这时酯化可能发生在氨基或羟基上生成酰胺或酯,通过控制氨基糖、脂肪酸的比值,改变底物的质子化状态,可以得到目的产物:当酸/胺摩尔比较高时,糖胺上的氨基被质子化而不能和酶酸复合体发生反应,这时产物主要是糖酯;当酸/胺摩尔比较低时( $<1$ ),则主要生成酰胺<sup>[19]</sup>。同时,酸/胺摩尔比也会改变酶活性中心 Ser、His、Asp 等氨基酸残基的质子化状态,从而影响酶的活性和选择性<sup>[20]</sup>。

要选择酰化或水解糖环上特异羟基,除了考虑选择不同来源的脂肪酶外,还要考虑溶剂的选择,考虑溶剂对酶立体结构的影响以及溶剂与底物间的相互作用,这些都会影响到酶的选择性。

## 3 溶剂及底物溶解性

在选择溶剂时,要考虑溶剂的毒性、溶剂对酶活的影响、底物的溶解度以及是否易于从产品中除去等因素。在二甲甲酰胺、二甲乙酰胺、二甲亚砜、吡啶等极性溶剂中,糖都有比较可观的溶解度,但这些溶剂对酶活都有强烈的抑制作用,在正己烷、丙酮、甲乙酮等非极性溶剂中,虽然酶的大部分活性得到了保持,但糖的溶解度却极低;在叔丁醇和叔戊醇中,酶可以保持大部分活性,且糖在其中也有一定溶解度,因而得到了广泛的应用,但值得一提的是,它们都有一定的毒性,在食品添加剂中的含量是被严格控制的。为克服糖在非极性有机溶剂中溶解度低的困难,人们采取了多种策略。

### 3.1 复合溶剂

把极性溶剂和非极性溶剂按一定比例混合,以期获得较高的酶活和底物溶解度。如在以蔗糖和相应的脂肪酸乙烯酯为底物转酯合成6-O-月桂酸蔗糖酯和6-O-棕榈酸蔗糖酯时,Ferrer等比较了不同溶剂和配比后得出了最佳溶剂是:2-甲基-2-丁醇与二甲基亚砜体积比为4:1,经过优化后,蔗糖的24 h转化率达到70%<sup>[21]</sup>;又如在Novozym-435催化合成肉豆蔻酸葡萄糖酯时,用叔丁醇/吡啶体积比=55:45的复合溶剂,葡萄糖溶解度和初始反应速率都是单纯用叔丁醇的4倍,且酶活可保持75%<sup>[22]</sup>。

### 3.2 离子液体

离子液体是一种在室温下呈液态的有机盐,它

们的性质和极性溶剂比较相似,葡萄糖在其中的溶解度是在丙酮中溶解度的 100 多倍,且不易引起酶的失活<sup>[23]</sup>。该法使得在挑选溶剂时多了一种选择,也是一个比较新颖的思路,但此溶剂不易用常规方法(如蒸发等)与底物、产物分离,因此在回收再利用、产品的分离纯化等方面还存在一些问题。

### 3.3 无溶剂体系

以液态脂肪酸或脂肪酸酯为介质,加入糖或糖苷、酶等直接反应。如以油酸为介质,Novozym-435 催化乙基葡萄糖苷酯化时,25 h 左右就得到了相当高的转化率(近 100%)<sup>[24]</sup>;但在以乳酸为介质,Novozym-435 催化丁基葡萄糖苷酯化时,却没有目的产物生成,可能是乳酸的酸性太强,酶活性位点关键氨基酸残基被质子化所致,另外强极性的乳酸还可以夺取酶中的水而致其失活,把乳酸换成乳酸丁酯即可得到满意的结果(81%的产率)<sup>[7]</sup>。该法可以简化后续分离工艺,但没有解决糖的低溶解度问题,因此仍需与其他方法结合,如把糖衍生化等。

### 3.4 对糖进行修饰

一般将糖修饰成糖苷,以增加在有机溶剂中的溶解度。如 60℃ 时葡萄糖和半乳糖在 2-甲基-2-丁醇中的最高质量浓度分别为 1.5 g/L 和 0.7 g/L,转化为丁基糖苷后,最高质量浓度都超过了 25 g/L<sup>[25]</sup>。该法解决了糖的低溶解度问题,但同时使得工艺复杂化。

### 3.5 拟固态法

反应体系中加入过量的糖,未溶解的固态糖可随时溶解以补充消耗掉的糖<sup>[26]</sup>。该方法能够尽可能地提高体系中糖的浓度,并且无须额外的工艺流程,对分离也不会带来什么困难,因此在找到合适溶剂之前不失为较好的方法。

### 3.6 过饱和溶液

回流煮沸 24 h 得到的葡萄糖 2-甲基-2-丁醇过饱和溶液浓度可达到 50 mmol/L,在 60℃、有葡萄糖晶体存在的情况下存放 24 h 仍然很稳定<sup>[27]</sup>。该法提供了更宽的底物浓度范围,在理论研究中有很大的利用价值,但在实际生产操作中具有成本高,效果不明显等弊端,限制了它的应用。

解决糖在有机溶剂中低溶解度问题的较早的方法还有固定化法、增溶剂法等,可参考文献[28]。

## 4 酯合成副产物的影响

酯合成反应的副产物是水,水的影响比较复杂,一方面它会影响到平衡、降低转化率,一方面酶又需要

一定量的水以保持催化活性和选择性,因而需要在尽量保持酶活性和选择性的前提下降低体系中水的含量,找到一最佳水含量和活度。

### 4.1 除去副产物的方法

#### (1) 分子筛

分子筛可以吸附水、甲醇等副产物,降低它们在体系中的浓度,提高转化率,考虑到酶需要一定浓度的水以维持高级结构,反应初始水的浓度较低,可以不加分子筛,待水含量积累到一定浓度影响目的产物的浓度进一步增高时再行加入<sup>[17]</sup>。

#### (2) 减压共沸蒸馏

溶剂(如丙酮、甲乙酮等)和水、甲醇等可以形成共沸物,选择一定的气压可以在酶的最适温度下将其从体系中蒸出<sup>[29]</sup>,蒸出的溶剂经分子筛脱水或膜法纯化后可以重新投入反应体系。

### 4.2 控制水活度的饱和盐溶液法

体系中影响平衡的是水的活度,只要把水的活度控制在一定范围内就可以既保持酶活又不会影响转化率,而一定浓度的盐溶液的活度都是特定值,因此向体系中加入某种盐即可达到控制水活度的目的<sup>[30]</sup>。这时应注意 2 个问题:一是加盐可能会导致体系黏度上升,增加外扩散的阻力;二是盐溶液中水的活度会随着温度的上升而增大。

## 5 结语

糖酯是可以完全生物降解的非离子型表面活性剂,无毒、无味、无刺激的优点使其在食品、医药、化妆品等领域有着广泛的用途。但酶催化合成糖酯运用于工业化生产也存在一些问题,如糖在有机溶剂中的低溶解度带来的低反应速率、脂肪酶的高成本和易失活等,这些都会使工业化生产的成本增加。目前化学法合成由于反应条件比较激烈,生成的酯键位置和数目难以控制,且有糖和糖醇的缩合、内酯化等副反应的发生,因而实际生成的产物是多种酯和副产物的混合物,而且产品有难以解决的色泽加深问题。运用酶催化合成法,这些问题都可以迎刃而解。

在表面活性剂领域中,衡量产品好坏的亲水亲油平衡值等标准与糖的酰化位点、产品的立体结构关系不是很密切,因此脂肪酶的区域选择性和立体选择性就没有了用武之地,而高成本等不利因素就尤为明显了,因此笔者认为脂肪酶促糖酯合成的应用研究应该侧重于制药、保健、化妆品等对产品纯度要求比较高,同时附加值也比较高的行业,以做到扬

长避短。

### 参考文献

- [1] Schmidt B, de Novo A. [J]. *Organic Letters*, 2000, 2(6): 791 - 794.
- [2] Noecker I. A, Martino J. A, Foley P. J, *et al.* [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, 9(2): 203 - 212.
- [3] Gayot S, Santarelli X, Coulon D. [J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 101(1): 29 - 36.
- [4] Danieli Bruno, Luisetti Monica, Steurer Sabine, *et al.* [J]. *Journal of Natural Products*, 1999, 62(5): 670 - 673.
- [5] Riva Sergio. [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 19/20: 43 - 54.
- [6] Stamatis H, Sereti V, Kolisis F. N. [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 11(4 - 6): 323 - 328.
- [7] Bousquet Marie-Pierre, Willemot Rene-Marc, Monsan Pierre, *et al.* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 62(2): 225 - 234.
- [8] Bousquet Marie-Pierre, Willemot Rene-Marc, Monsan Pierre, *et al.* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 63(6): 730 - 736.
- [9] Rejasse Barbara, Maugard Thierry, Dominique Legoy Marie. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(2): 312 - 320.
- [10] Park Oh-Jin, Kim Dae-Yun, Dordick Jonathan S. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 70(2): 208 - 216.
- [11] Martin Brett D, Linhardt Robert J, Dordick Jonathan S. [J]. *Biomaterials*, 1998, 19(1 - 3): 69 - 76.
- [12] Plou Francisco J, Cruces M Angeles, Ferrer Manuel, *et al.* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 96(1): 55 - 66.
- [13] González-Navarro Herminia, Braco Lorenzo. [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1997, 3(1 - 4): 111 - 119.
- [14] Tsuzuki Wakako, Kitamura Yoshiaki, Suzuki Tateo, *et al.* *Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters by Modified Lipase* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 64(3): 268 - 271.
- [15] de la Casa R M, Guisón J M, Sánchez-Montero J M, *et al.* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30(1): 30 - 40.
- [16] MacManus David A, Vulfson Evgeny N. [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20(3): 225 - 228.
- [17] Danieli Bruno, Luisetti Monica, Sampognaro Giannantonio, *et al.* [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1997, 3(1 - 4): 193 - 201.
- [18] Ferrer Manuel, Cruces M Angeles, Plou Francisco J, *et al.* [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(24): 4053 - 4061.
- [19] Maugard Thierry, Remaud-Simeon Magali, Petre Dominique, *et al.* [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998, 5(1 - 4): 13 - 17.
- [20] Maugard Thierry, Remaud-Simeon Magali, Monsan Pierre. [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1998, 1387(1 - 2): 177 - 183.
- [21] Ferrer Manuel, Cruces M Angeles, Bernabé Manuel, *et al.* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 65(1): 10 - 16.
- [22] Degn Peter, Zimmermann Wolfgang. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 74(6): 483 - 491.
- [23] Park Seongsoon, Kazlauskas Romas J. [J]. *J Org Chem*, 2001, 66(25): 8395 - 8401.
- [24] 涂茂兵, 魏尔芝, 郑洪. [J]. *华东理工大学学报*, 2002, 28(2): 176 - 179.
- [25] Coulon D, Ismail A, Girardin M, *et al.* [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998, 5(1 - 4): 45 - 48.
- [26] Li Yanzi, Rethwisch David G. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 79(1): 15 - 22.
- [27] Flores Maria Victoria, Naraghi Kaynoush, Engasser Jean-Marc, *et al.* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 78(7): 815 - 821.
- [28] 彭立凤. [J]. *粮油食品科技*, 1995, 7(5): 15 - 17.
- [29] Yan Youchun, Bornscheuer Uwe T, Schmid Rolf D. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 78(1): 31 - 34.
- [30] Kim Jae Eun, Han Jeong Jun, Yoon Jung Hae, *et al.* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 57(1): 121 - 125. ■

#### 中国·宣达实业集团有限公司

主要产品: 改性聚丙烯衬里截止阀; 轨道球阀; 金属硬密封蝶阀; 玻璃钢衬聚四氟乙烯管件; 强力稀酸专用泵; 高温调控蝶阀; 硫酸专用蝶阀; 短轴高温浓硫酸液下泵

电 话: 0577 - 67357828  
67359688

#### 中船重工集团第七〇七研究所(九江)

主要产品: 水过滤装置; L1620 系列过滤装置; 过滤小车; 国外滤器配套滤芯; 独立油液污染控制系统; 润滑油站; 液压系统用产品

电 话: 0792 - 8260034

#### 靖江市天和干燥机械制造有限公司

主要产品: TGDW 系列单层带式干燥机; TGQC 系列, TGFG 系列气流干燥; TCZPY 系列压力式喷雾干燥机; TGSZC 系列双锥回转真空干燥机; TGBLM 系列脉冲袋式除尘器; TGJRFY 系列燃油、燃气热风炉; TGBD 系列变性淀粉干法反应成套生产线

电 话: 0523 - 4835938 4895423 13505260326

#### 安捷伦科技有限公司

##### Agilent Technologies

主要产品: 安捷伦新一代的 GC/MS 和 LC/MS 产品可以检测食品中的污染物和残留物

网 址: [www.agilent.com/chem/foods](http://www.agilent.com/chem/foods)