

非水体系中脂肪酶催化合成乳酸乙基糖苷酯的工艺研究

邹萍 魏东芝* 涂茂兵 郑洪

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要 在非水体系中,通过固定化脂肪酶催化合成一种新型 α -羟基酸衍生物-乳酸糖苷酯。考察了常压下有有机溶剂、酰基供体、不同种固定化酶、乙基糖苷的浓度、酶量和反应温度对反应的影响。研究表明在无溶剂体系中以乳酸丁酯作为酰基供体可有效地合成乳酸糖苷酯,固定化酶 Novozym435 和来源于 *Candida* sp. 菌株的细胞固定化酶,化学修饰的干酶粉均是合适的催化剂。最佳反应条件为:酶浓度 75g/L,乙基葡萄糖苷的浓度为 0.4mol/L,温度为 70℃,转速 200r/min,反应 50h,转化率可达 71%。在真空度为 0.09MPa 的压力下,反应温度 65℃,酶浓度 75g/L,乙基葡萄糖苷 0.35mol/L 时,反应初速率可达到 60.7($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$),40h 后转化率可达到 90%。反应产物经过萃取法和硅胶柱层析方法分离,纯度达到 95% (W/W)。

关键词 乳酸乙基糖苷酯,脂肪酶,转化率,初速度

中图分类号 Q814.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0094-05

α -羟基酸 (Alpha-hydroxy acids, AHAs) 是一类具有水化特性的物质,在化妆品领域已经广泛应用,具有改善皮肤结构,增加皮肤亮泽和韧性,减少皱纹和色斑的效用^[1-3]。然而 AHA 浓度在 10% 以上时,会对皮肤产生刺激性,同时使皮肤更容易被阳光晒伤^[4,5]。国外对酶催化丁基糖苷修饰乳酸 (AHAs) 的反应进行了一定的探讨^[6,7]。研究报道乙基糖苷能明显降低紫外线照射造成的皮肤损伤^[8],因此预测合成的乳酸乙基糖苷酯将有利于减轻乳酸的副作用。本文以乙基糖苷为底物,讨论了常压下溶剂酰基供体、底物浓度、酶量、不同固定化酶以及反应温度对反应的影响,并进一步探讨了反应压力对反应初速度和转化率的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂:Novozym 435 (Novo Nordisk),酶活为 7000PLU/g。细胞固定化酶、化学修饰的酶和纤维固定化酶(来源于 *Candida* sp. 的脂肪酶)由实验室自制。乳酸丁酯(L.R 级)经实验室精制,其余试剂均为分析纯,购自上海化学试剂公司。HPLC 级乙腈和甲醇。乙基葡萄糖苷自己合成并纯化。

1.1.2 实验仪器:高温振荡器(太仓科技器材厂);

旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);高压液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验室自制脂肪酶:(1)细胞固定化酶的制备。发酵液离心过滤,所得菌体中加入冷冻的丙酮或正己烷,搅拌后获得的菌体常温真空干燥并粉碎。其酶活为 1918.8u/g。(2)纤维固定化酶的制备。以棉纤维作为固定化材料,将棉纤维剪成小块,并浸在酶液中,浸泡 12h,取出后用水冲洗 2 次,40℃ 真空干燥。其酶活为 3020.5u/g。(3)化学修饰酶的制备。游离酶和非离子型表面活性剂溶于一定体积的正己烷,然后在 4℃ 下搅拌 24h,离心获得滤饼,真空干燥并粉碎。其酶活为 2312.4u/g。

1.2.2 乳酸糖苷酯的合成:(1)常压下酶法合成:在 25mL 的三角瓶中加入 3mL 乳酸丁酯,特定浓度的糖苷,50g/L 固定化酶,60 ~ 80℃,转速 200r/min,间隔取样 20 μ L,HPLC 检测。(2)减压下酶法合成:通常在 100mL 的茄形烧瓶中加 20mL 乳酸丁酯,7mmol 乙基糖苷,75g/L 固定化酶,温度为 65℃。旋转速度为 100r/min,间隔取样 20 μ L,HPLC 检测。

1.2.3 乳酸糖苷酯的分离纯化:(1)液液萃取法去除乳酸丁酯:反应终止后,过滤除去固定化酶。未反应的乳酸丁酯用液液萃取法去除:反应后混和液中

收稿日期:2001-07-06,修回日期:2001-10-24。

基金项目:上海市重点学科建设项目资助。

* 通讯作者。Tel:86-21-64252981;Fax:86-21-64250068;E-mail:dzhwei@ecust.edu.cn

加入1倍体积水和2倍体积正己烷,剧烈振荡15min后,静置30min,混和液分为两相,回收水相,减压蒸发除去水分后,再用10倍体积正己烷萃取一次去除残余的水分。减压干燥后,产品回收率达85%以上,接着进行硅胶柱分离。(2)硅胶柱分离去除乙基糖苷:通常的柱分离并不可行,所以设计一种简单有效的分离方法:柱高径比为50:2。先用乙酸乙酯装柱,再加入2~3mL水,使柱最上层硅胶水化4~5cm。这层胶主要用来吸附乙基葡萄糖苷。再用乙酸乙酯洗脱,分离得到的乳酸糖苷酯采用HPLC检测,纯度可达95%以上,回收率为90%左右。

1.2.4 HPLC检测:乙基葡萄糖苷和乙基糖苷酯用Shimadzu SPD-10AVP HPLC检测系统。Waters Spherisorb NH₂柱4.6×150mm,流动相:乙腈/水=90/10,流速1.0mL/min,柱温40℃,进样量为10μL,示差检测器RID-10Avp。

1.2.5 转化率的测定:以反应体系中酯化反应消耗的乙基糖苷的摩尔数比初始乙基糖苷的摩尔数,计算出转化率。

1.2.6 TLC分析:色谱展开剂(乙酸乙酯:甲醇:冰乙酸:水=6:3:0.5:0.5),展开后的硅胶薄板干燥后,喷20%的H₂SO₄溶液,在100℃下2min显色。

乳酸糖苷酯的R_f=0.836,乙基糖苷的R_f=0.760

1.2.7 IR与NMR分析:华东理工大学分析中心检测,红外光谱和核磁共振谱鉴定,检测仪器分别为Nicolet Magna-IR550和Bruker AM 500 spectrom-

eter,¹H-NMR以D₂O为溶剂。

2 结果与讨论

2.1 溶剂的影响

乳酸乙基糖苷酯既可以由乳酸作为底物进行直接的酯化反应获得,也可以由乳酸丁酯为底物进行的转酯反应得到。由表1看出,乙基糖苷能够溶解在极性较强的乳酸中,但是乳酸对Novozym 435脂肪酶的酶活有显著的影响,几乎没有反应。Gorman等研究表明有机溶剂剥夺反应中酶分子的结合水取决于有机溶剂的疏水性(log*P*)、介电常数和在水中的溶解性,溶剂极性越强,越易使酶脱水^[9]。由此推断可能的原因有:1)高浓度的乳酸改变了蛋白质的离子化状态,这种作用可能是乳酸溶解在酶周围的水相中并因此抑制了反应。2)乳酸剥夺了酶蛋白表面的水分,而水又是维持酶蛋白分子三维空间构型必不可少的,因此可使酶迅速失去催化活性。另外乳酸作为底物和溶剂时属于酯化反应,会产生水,可能导致糖苷酯的水解反应加速而不是酯的生成。相比较,非极性的溶剂如己烷和庚烷(log*P*值分别为3.5和4)对酶活的影响较小,但是底物乙基糖苷(易溶于极性溶剂)在这些溶剂中的低溶解度限制了反应的进行,产物得率低。而中间极性的溶剂如叔戊醇和乳酸丁酯既可以较好地溶解两个底物,反应也可以进行,得率比较高。结果表明乳酸丁酯既是底物又是溶剂时,即无溶剂体系此转酯反应效果最佳。

表1 有机溶剂对反应的影响

Table 1 Influence of solvent

Butyllactate	Reaction in presence of solvent			Reaction in solvent-free medium	
	Hexane	Heptane	2-Methyl-2-butanol	Lactic acid	Butyllactate
Conversion/%	8	5	12	0	30

Conditions: All reactions were performed using ethylglucoside (50mmol/L) and Novozym (25g/L) in 3mL solvent. When the reaction was carried out in presence of solvent (hexane, heptane, 2-methyl-2-butanol), butyllactate was fixed at 200mmol/L. The reaction time and the temperature were, respectively, 30h and 50℃.

2.2 酰基供体的影响

在酯化反应中,不同的酰基供体能够影响糖苷酯的产量。为此取乳酸、乳酸乙酯和乳酸丁酯作实验考察对乳酸糖苷酯合成的影响。结果表明(表2),酰基供体的醇链长度的增加可以提高反应的初速率和得率,主要是因为酰基供体使反应介质的疏水性逐渐增加:乳酸<乳酸乙酯<乳酸丁酯,从而对酶的影响减弱。如果酰基供体的亲水性太强,合成可能因为酶的失水而停止。Claon和Akoh在脂肪酶催化合成萜类酯的研究中报道了相似的结果,并指

明继续增大酰基供体碳链的长度,不会获得的更高的转化率,原因是供体较大的立体空间障碍影响与酶催化的活性位点匹配^[10]。此外它们酯化反应产生的副产物分别是水、乙醇和丁醇,极性依次减弱相应减轻对酶活的影响。

2.3 不同种固定化酶的影响

脂肪酶Novozym 435是目前最常见的用于酯类合成的固定化酶,而细胞固定化酶、纤维固定化酶和修饰酶是本实验室自制固定化脂肪酶。在此,比较4种酶催化乳酸糖苷酯的合成效率。

表2 酰基供体的影响

Table 2 Influence of acyl donor

Acyl donor	Lactic acid	Ethyllactate	Butyllactate
Initial rate/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0	5.5	21.1
Conversion/%	0	14.72	59.14

Conditions: All reactions were performed in 3mL acyl donor containing 0.16mol/L ethylglucoside and 50g/L Novozym. The mixture was incubated at 70°C, with magnetic stirring for 30h

结果(表3)表明:固定化酶种类的不同对此转酯反应是有影响的,Novozym 435,细胞固定化酶和修

饰酶催化效率较高,纤维固定化酶较差。可能的原因有:1)与固定化载体为底物所提供的微环境密切相关,当底物和载体的极性相近时,载体在酶分子周围所“缔造”的环境可以使得底物进攻酶的几率大大提高。2)固定化酶是否能以特定的活性构象稳定存在,而且在溶剂中保持良好的分散状态,减少扩散阻力。纤维的极性比乙基糖苷和乳酸丁酯弱,而且扩散阻力较大,导致纤维表面的底物浓度低而产物浓度高,反应初速率和转化率低。

表3 不同固定化酶催化反应的比较

Table 3 Comparison between different enzymes

Enzyme/(50g/L)	Novozym 435	Cell bound enzyme	Modified enzyme	Fibre bound enzyme
Conversion/%	67.66	50.99	51.63	40.98
Initial rate/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	25.2	21.6	21.6	15.1

Conditions: All reactions were performed in 3mL butyllactate containing 0.18mol/L ethylglucoside and 50g/L enzyme. The mixture were incubated at 70°C, with magnetic stirring for 50h

2.4 酶浓度的影响

提高酶的浓度可缩短相同转化率下所需的反应时间,但增加了工艺的成本。因此有必要寻求一个处于生产率和酶量之间的最佳配比。我们在 10g/L-150g/L 的浓度范围内作实验,对比各自的转化率和反应初速率,具体结果见表4,图1和图2。

表4 不同酶浓度对最终反应转化率的影响

Table 4 Effect of enzyme concentration on conversion

Novozym/(g/L)	Conversion/%	Reaction time/h
10	44.2	125
25	61.6	125
50	66.3	125
75	71.7	66
100	73.0	55
150	72.3	50

Conditions: 3mL butyllactate, 0.43mol/L ethylglucoside, 70°C with magnetic stirring until steady state (except for concentrations of 10, 25 and 50g/L).

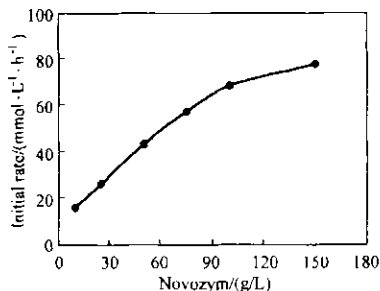


图1 不同酶浓度对反应初速率的影响

Fig.1 Effect of Novozym concentration on initial rates

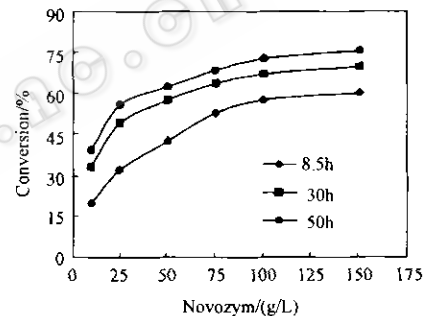


图2 不同酶浓度在反应相同时间下的转化率的比较

Fig.2 Comparison the conversion among different concentration enzyme at the same time

由表4和图1可知,在一定的反应时间内糖苷的转化率随酶浓度的增加而提高,图2表明反应相同的时间,酶浓度越高,转化率越大。然而实际上,酶的浓度改变不会影响反应平衡,因为低酶量下反应的时间不够,反应未达到平衡。在低酶浓度范围内,初速率几乎与酶浓度成正比,而当体系中酶浓度较高时,由于固定化酶内扩散的影响,周围的底物浓度不能成正比增加,反应速率呈缓慢上升的趋势。由此结果可知,对于初始糖苷浓度为 0.43mol/L, 75 g/L 的酶浓度是合适的,再提高酶浓度,也不能使反应时间降低太多,相应工艺成本却提高了。

2.5 底物糖苷浓度的影响

产物糖苷酯最终产量的多少取决于反应底物糖苷的转化率,所以有必要研究初始底物的浓度对反应转化率和初速率的影响。具体结果见图3。

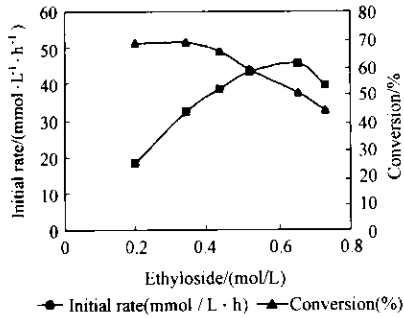


图3 不同乙基糖苷浓度对转化率和初速率的影响

Fig.3 Influence of initial ethylglucoside concentration on initial rates and yields

Conditions: 4mL butyllactate, 70°C, Novozym 50g/L, ethylglucoside (different concentration) with magnetic stirring until steady state

图3显示在低浓度范围内,反应初速率随底物浓度的增加而增加;但当糖苷浓度高于 0.65mol/L 时,反应初速率开始下降,当糖苷浓度为 0.65mol/L,反应的初速率达最大,为 $45.95\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。反应的转化率随着糖苷浓度的增加而降低,这表明此反应有底物糖苷的抑制效应。原因可能有:1)糖苷对于酶有底物抑制效应。2)反应平衡常数与反应体系中的副产物丁醇浓度有关,丁醇浓度越高,平衡向转酯反应反方向偏移。

2.6 反应温度的影响

固定化酶 Novozyme435 在 100°C 时仍保持较高的酶活。为此在其它条件不变的情况下,只改变反应温度观察其对反应初速率和最终转化率的影响,具体结果见图 4。结果显示反应初速率随温度的升高而加快。转化率也随温度的增加而增加,可能的原因是低温下 48h 内,反应并没有达到平衡,另一方面高温条件下,反应产物之一丁醇有可能部分挥发,

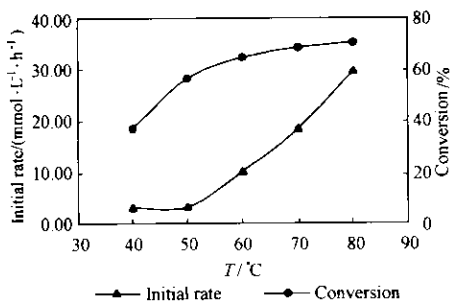


图4 不同温度对反应初速率和转化率的影响

Fig.4 Effect of temperature on initial rate and conversion

Conditions: 3mL butyllactate, 0.2mol/L glycoside, 50g/L Novozym, temperature 50 ~ 80°C, time 48h

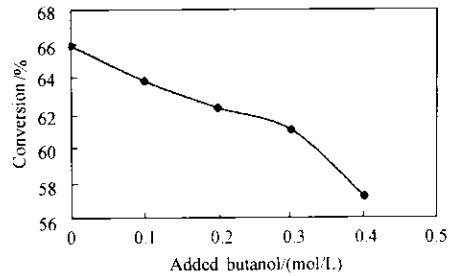


图5 丁醇浓度对反应转化率的影响

Fig.5 Effect of butanol concentration on conversion

Conditions: 3mL butyllactate, 70°C, Novozym 75g/L, Ethylglucoside 0.2mol/L, butanol (different concentration) with magnetic stirring and stopped after 50h

促使反应平衡向合成方向转移。图5表明体系中丁醇的浓度越高,反应的最终转化率越低,即产物抑制。

2.7 真空度为 0.09MPa 下的减压反应

2.6 实验证明在高温条件下,反应产物之一丁醇有部分挥发,促使反应平衡向合成方向转移。然而这种挥发只是部分的,结果转化率仅稍有提高,同时高温对于酶活也有一定的影响。常压下乳酸丁酯、水和丁醇的沸点分别是 186°C、100°C 和 118°C,由它们沸点的较大区别看出可以实现减压反应。即在减压条件下就可以实现较低的温度下去除副产物丁醇和体系中的水分,同时保持底物不挥发。结果表明(图6):真空度为 0.09Mpa 时,反应转化率有较大的提高,反应时间也相应缩短。最终转化率可以达到 90%左右,初速率为 $60.7\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。原因一方面去除转酯反应中产生的副产物丁醇,使反应平衡向合成的方向转移;另一方面能够去除反应体系初始的少量水分,减弱了乳酸丁酯和产物的水解反应。

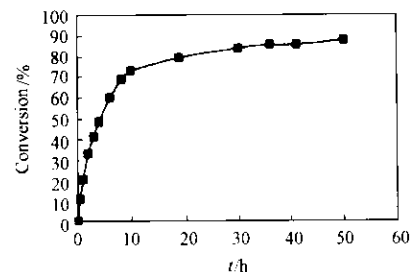


图6 减压下反应的转化率

Fig.6 The conversion of the reaction under reduced pressure

Conditions: Reaction was performed in 20mL butyllactate at 65°C, in the presence of 75g/L Novozym and 0.35mol/L ethyllactate under reduced pressure for 40h

2.8 产物结构的鉴定

乳酸糖苷酯的标准红外光谱表明在 1750cm^{-1} 附近有吸收峰,是酯键的特征吸收峰。乳酸糖苷酯的合成只有单酯,且结合在 6-C 位上,具体 NMR 氢谱图见表 5。

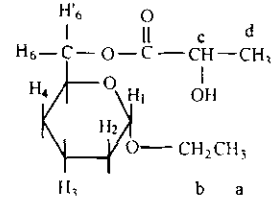


表 5 ^1H NMR 核磁共振谱

Table 5 Spectroscopic ^1H NMR-data Proton chemical shifts

Proton	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	H ₆	CH ₃ a	CH ₂ b	CHc	CH ₃ d
$\delta(\text{ppm})$	4.80	3.59	3.65	3.45	3.80	4.29	4.37	1.104	3.15 ~ 3.35	4.33	1.32

3 结 论

本文通过转酯反应,利用脂肪酶催化合成出乳酸糖苷酯,并对影响此反应的各种因素进行了系统的研究。发现在不加其它有机溶剂的条件下,以底物乳酸丁酯作溶剂,糖苷的转化率最高;可提供乳酸的酰基供体中乳酸丁酯最合适;从现在所筛选的脂肪酶来看,Novozym 435 和实验室自制的细胞固定化酶,化学修饰的干酶粉的催化效率较高。反应经初步优化得到的条件为:酶浓度 75g/L ,乙基葡萄糖苷的浓度为 0.4mol/L ,温度为 70°C ,转速 200r/min ,转化率可达 71% 。而在减压下反应,有效去除反应副产物丁醇,使反应平衡向合成的方向转移,同时去除了体系中的水分,相应消除了乳酸丁酯的水解反应使反应平衡向合成的方向转移,转化率可达到 90% 。

REFERENCES(参考文献)

[1] Enzo Berardesca, Howard Maibach. AHA Mechanisms of Action. *Cos-*

metics & Toiletries, 1995, 224: 30 ~ 31

- [2] Walter P. Smith. Hydroxy Acids and Skin Aging. *Cosmetics & Toiletries*, 1994, 109: 41 ~ 48
- [3] Anne Wolven Garrett. AHAs and More. *Global Cosmetic Industry*, 1997, Jan, 8
- [4] Don Davis. AHAs: Where's the Crisis. *Global Cosmetic Industry*, 2000, Apr, 8
- [5] Don Davis. Chessborad Move for AHAs. *Global Cosmetic Industry*, 2000, Aug, 8
- [6] Bosquet M P, Willemot R M, Monsan P. Enzymatic Synthesis of α -Butylglucoside Lactate. *Biotechnology Bioengineering*, 1999, 62: 225 ~ 234
- [7] Bosquet M P, Willemot RM, Emmanuel Boures P M. Lipase-catalyzed α -Butylglucoside Lactate Synthesis in Organic Solvent for Dermo-cosmetic Application. *Journal of biotechnology*, 1999, 68: 61 ~ 69
- [8] Horikoshi Toshino, Haratake Akinori, Ikemoto Takeshi, et al. Effects of Ethylglucoside Identified in Sake on Skin Treatment. *Nippon Keshohin Gijyutsusha Kaishi*, 1998, 32: 10 ~ 16
- [9] Lu Ann S, Gorman, Jonathan S, Dordick. Organic Solvent Strip Water off Enzymes. *Biotechnology Bioengineering*, 1992, 39: 392 ~ 397
- [10] Claon P A, Akoh C C. Enzymatic Synthesis of Geranyl Acetate in *n*-hexane with *Candida Antarctica* Lipase. *J Am Oil Chem Soc*, 1994, 71: 575 ~ 578

Studies on Lipase-catalyzed Synthesis of Ethylglucoside Lactate in Non-aqueous Phase

ZOU Ping WEI Dong-Zhi* TU Mao-Bing ZHENG Hong

(State Key Laboratory Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract Ethylglucoside lactate, a novel Alpha-Hydroxy Acids Derivative, was synthesized by transesterification in non-aqueous phase using immobilized lipase as biocatalyst. Based on the studies of the factors effecting initial rate and conversion under atmospheric pressure (solvent, acyl donor, different immobilized lipase, substrate concentration, enzyme concentration and temperature), the results show that solvent-free medium using butyllactate as acyl donor is suitable to the ester synthesis. The reaction conditions have been optimized as the following: the amount of enzyme = 75g/L , the ethylglucoside concentration = 0.4mol/L , 70°C , 200r/min , 50h , which the conversion was 71% . A 90% conversion and a $60.7\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ initial rate can be obtained under reduced pressure, which the conditions are enzyme 75g/L , ethylglucoside 0.35mol/L , 65°C , 200r/min and 40h . The product purified by extraction and SiO_2 chromatography was identified by infrared spectroscopy and ^1H NMR.

Key words ethylglucoside lactate, lipase, conversion, initial rate

Received: 07-06-2001

This work was supported by Key Subject Foundation of Shanghai.

* Corresponding author. Tel: 86-21-64252981; Fax: 86-21-64250068; E-mail: dzhtwei@ecust.edu.cn