

离子液体中脂肪酶活性调控对硬脂酸 淀粉酯合成的影响

Effects on the synthesis of starch stearate by regulating the
lipase activity in ionic liquids

苏安祥^{1,2,3} 代飞云^{1,2,3} 余梦菲^{1,2,3} 汤晓智^{1,2,3}

SU An-xiang^{1,2,3} DAI Fei-yun^{1,2,3} YU Meng-fei^{1,2,3} TANG Xiao-zhi^{1,2,3}

(1. 南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏 南京 210023; 3. 江苏高校粮油质量安全控制及深加工重点实验室, 江苏 南京 210023)

(1. Department of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing, Jiangsu 210023, China; 2. Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing, Jiangsu 210023, China; 3. Key Laboratory of Grains and Oils Quality Control and Processing, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

摘要:主要研究了离子液体中脂肪酶活性的调控对硬脂酸淀粉酯合成的影响。结果表明:在离子液体中添加不同水活度(A_w)的水合盐对脂肪酶催化活性有显著影响,水合盐对为 Na₂HPO₄·7H₂O 和 Na₂HPO₄·2H₂O 的混合物,即 A_w 为 0.61,添加量为 80%(水合盐对:淀粉质量比)时达到最佳的脂肪酶催化效果;冻干酶的 pH 值、添加量及冻干过程中冻干保护剂的存在对硬脂酸淀粉酯合成过程中脂肪酶活性同样影响显著,冻干酶催化反应的最适 pH 值为 7.1,最适添加量为 10.4%(冻干酶:淀粉质量比),脂肪酶和有机化合物等冻干保护剂的加入能保护冻干酶的催化活性,提高反应转化率,其中以聚乙二醇效果最佳。

关键词:离子液体;脂肪酶;硬脂酸淀粉酯;酶活性

Abstract: Effects of lipase activity regulation in ionic liquids on synthesis of starch stearate were investigated in the present study. The results showed that degree of substitution of starch stearate increased with increasing water activity and the amount of hydrated salts. When water activity reached 0.61, the amount of addition was 80%, the degree of substitution reached maximum value of 0.111. The catalytic capability of enzyme is sensitive to pH values, and the highest degree of substitution could be obtained when the lyophzyme in a buffer solution with pH 7.1, when proper additive quantity of lyo-

phozyme was 10.4%. The lipase that lyophilized with organic compounds such as Glycine and polyethylene glycol showed higher catalytic efficiency in ionic liquids than the enzyme without any protective agent. Lipase was found working most efficiently when polyethylene glycol was used as protective agent.

Keywords: ionic liquids; lipase; starch stearate; enzyme activity regulation

硬脂酸淀粉酯是一种长链脂肪酸淀粉酯,是由淀粉及其衍生物与硬脂酸、硬脂酸甲酯、硬脂酸酐或硬脂酸酐反应得到的酯化产品。传统的高取代度淀粉酯通常采用有机溶剂法制备,所用试剂均存在着毒性大、易挥发等缺点^[1-3]。离子液体为一类新型的非水相溶剂,具有环境友好、蒸气压低、不可燃性、可重塑性以及热稳定等特点^[4]。淀粉可以在多种离子液体中溶解^[5],众多学者^[6-10]研究表明脂肪酶在离子液体中具有活性,环境友好的离子液体做为“绿色溶剂”,采用酶为“绿色催化剂”合成脂肪酸淀粉酯成为发展绿色化学的有效途径。卢璇璇^[5]在离子液体中通过脂肪酶催化脂肪酸甲酯或脂肪酸与淀粉发生酯化反应合成了脂肪酸淀粉酯,证实了可以以离子液体为介质通过酶催化法合成淀粉酯。

在离子液体中酶法催化制备淀粉酯的研究很少,主要集中在方法是否可行的探索阶段^[11],没有对条件进行优化。这是由于一方面酶在非水相介质中不能溶解,存在底物和产物的扩散限制等^[11],另一方面在非水相介质中酶的构象可能发生改变或者构象过于僵硬导致活性降低,使其催化活性大大低于水相中的催化活性。非水相体系中水的活度(water activity, A_w)能直接反映出酶分子上水分的多少^[12]。

基金项目:江苏省自然科学基金项目(编号: BK2012471);江苏高校优秀科技创新团队(编号:苏教科【2013】10号);江苏高校优势学科建设工程资助项目(编号:苏政办发【2014】37号)

作者简介:苏安祥,男,南京财经大学实验师,硕士。

通讯作者:汤晓智(1977—),男,南京财经大学教授,博士。

E-mail: warmtxz@njue.edu.cn

收稿日期:2015-12-27

通过向反应体系中加入预先平衡好的硅胶、分子筛^[13]或水合盐对等^[14-15]能够使非水相酶反应体系处于“最佳含水量”,提高酶催化产率。离子液体无法用缓冲液进行 pH 值调整,因此利用冷冻干燥制备的非水介质用酶能够表现出“pH 记忆”(pH-Imprinting)的特点^[16],通过控制冻干酶的 pH 能够有利于酶活性的表现。Klibanov 等^[17]的研究表明冻干保护剂可以在一定程度上保护酶的活性中心和构象,降低底物传质障碍,影响酶在非水相中催化活性。Maruyama 等^[18]的研究证明聚乙二醇的加入能将冻干脂肪酶在离子液体中的催化活性提高 14 倍之多。

因此,本研究拟以离子液体为介质,采用脂肪酶催化合成硬脂酸淀粉酯。通过研究离子液体中添加水合盐对、控制冻干酶的 pH 值以及使用不同的冻干保护剂对合成淀粉酯取代度的影响,考察水合盐对 Aw、冻干酶 pH 以及冻干保护剂等因素对离子液体中脂肪酶催化活性的影响,优化离子液体为介质采用脂肪酶催化合成硬脂酸淀粉酯的条件,为在实际生产中应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

大米淀粉:食品级,芜湖好亦快食品有限公司;
硬脂酸甲酯:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
褶皱假丝酵母脂肪酶 CRL:700 U/mg,美国 Sigma-Aldrich 公司;
离子液体[BMIM]Ac、离子液体[BMIM]BF₄:上海成捷化学有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

磁力搅拌器:WSJB-03 型,河南中良科学仪器有限公司;
冷冻干燥机:4.5L 型,美国 Labconco 公司;

1.2 方法

1.2.1 硬脂酸淀粉酯取代度的测定 称取 0.50 g 硬脂酸淀粉酯,置于含有 50 mL 蒸馏水 250 mL 锥形瓶中,加入 3 滴酚酞指示剂,用 0.10 mol/L NaOH 溶液将溶液滴定至微红,红色不消失为终点,接着加入 0.50 mol/L NaOH 溶液 25 mL,室温下搅拌 2 h,皂化反应。皂化结束时,用蒸馏水将瓶壁上附着的碱液冲下去,再用 0.50 mol/L HCl 标准溶液进行滴定,红色消失为终点,滴定所消耗 HCl 标准溶液体积为 V,同时以原淀粉做空白试验,滴定消耗 HCl 标准溶液体积为 V₀。取代度按式(1)计算^[19]:

$$DS = \frac{163C(V_0 - V)}{1\,000M},$$

(1)

式中:
DS——取代度;
C——所用的 HCl 标准溶液浓度, mol/L;
M——样品质量, g;
V₀——原淀粉、酯滴定所消耗的 HCl 标准溶液体积, mL;
V——硬脂酸淀粉酯滴定所消耗的 HCl 标准溶液体

积, mL;
1.2.2 水合盐对 Aw 及其添加量对取代度的影响 称取烘干的淀粉 4.8 g,加入到 1-丁基-3-甲基咪唑醋酸盐(20 g)和 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐(76 g)的混合离子液体中, 120 ℃恒温搅拌 1 h;使其充分溶解后降温,加入 24 g 硬脂酸甲酯和 0.40 g 脂肪酶 CRL,再分别加入质量比为 40%(水合盐对:淀粉)的不同 Aw 的水合盐对, Aw 分别为 0.15 (Na₂HPO₄ · 2H₂O 和 Na₂HPO₄ 的混合物), 0.47 (Na₄P₂O₇ · 10H₂O 和 Na₄P₂O₇ 的混合物), 0.61 (Na₂HPO₄ · 7H₂O 和 Na₂HPO₄ · 2H₂O 的混合物), 0.76 (Na₂SO₄ · 10H₂O 和 Na₂SO₄ 的混合物), 0.85 (Na₂HPO₄ · 12H₂O 和 Na₂HPO₄ · 7H₂O 的混合物); 60 ℃下反应 3 h,冷却,无水乙醇洗涤 3 次,再用蒸馏水洗去水合盐对,得到的沉淀物在 40 ℃下干燥 48 h,测定产品取代度。

同时,通过调节加入水合盐对与淀粉的质量比分别为 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 研究水合盐对的添加量对取代度的影响,其余反应步骤参照上述方法。

1.2.3 冻干酶的 pH 及添加量对取代度的影响 称取 2.0 g 脂肪酶,分别加入到 10 mL 0.20 mol/L 不同 pH 值(pH 5.0, 5.7, 6.4, 7.1, 7.8)的磷酸缓冲液中,于冷冻干燥机中冷冻干燥后备用;硬脂酸淀粉酯合成步骤参照 1.2.2。

同时,通过调节冻干酶的添加量(0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60 g),研究其加入量对取代度的影响,其余参照 1.2.2。

1.2.4 冻干保护剂种类对取代度的影响 称取 2.0 g 脂肪酶分别加入到 10 mL 0.20 mol/L pH 7.1 磷酸缓冲溶液中,然后分别添加 0.40 g 甘氨酸、苯胺、β-环糊精、葡萄糖和聚乙二醇至酶液中混匀,冷冻干燥后备用;其余参照 1.2.2。

1.2.5 统计分析 所有数据均使用 Origin Lab 科学绘图和统计分析软件进行数据处理,运用方差分析(ANOVA)进行显著性分析,显著差异水平 P<0.05。

2 结果与分析

2.1 水合盐对 Aw 及添加量对取代度的影响

离子液体中添加不同 Aw 的水合盐对对取代度的影响见图 1。由图 1 可知,随着水合盐对 Aw 的增加,酶催化得到硬脂酸淀粉酯的取代度也增加。Aw 为 0.61 时,取代度达到最大值 0.104。然而当 Aw 继续增大时,取代度呈下降趋势。表明,在该离子液体中添加不同 Aw 的水合盐对对脂肪酶活性的影响不同,其中 Aw 为 0.61 时脂肪酶具有较高的活性。这是由水活度对酶活性的影响造成的,当水活度从非常少增多时,水充当酶结构的“润滑剂”,增大了酶分子的柔性,酶分子处于动力学有利的构象而促进催化;当水活度继续增加,过多的水分子吸附在酶的载体上对底物的内扩散起了一定的限制作用,或使粉末状酶形成胶状物,导致酶催化活性的下降^[17]。

Na₂HPO₄ · 7H₂O 和 Na₂HPO₄ · 2H₂O 的混合物(Aw 0.61)添加量对酶催化的影响见图 2。由图 2 可知,随着水合盐对添加量的增加,取代度会持续上升,当添加水合盐对质量比达到 80%(水和盐对:淀粉质量比)时达最大值 0.111,

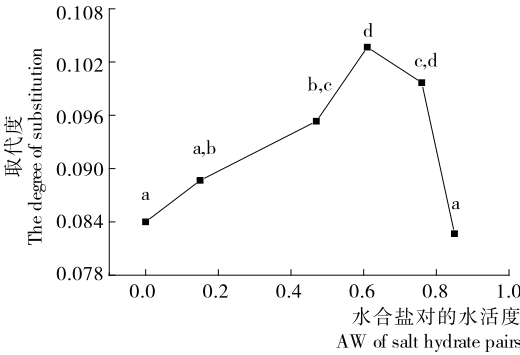


图 1 添加水合盐对的水分活度对取代度的影响
Figure 1 Effects of the Aw of salt hydrate pairs added on the degree of substitution

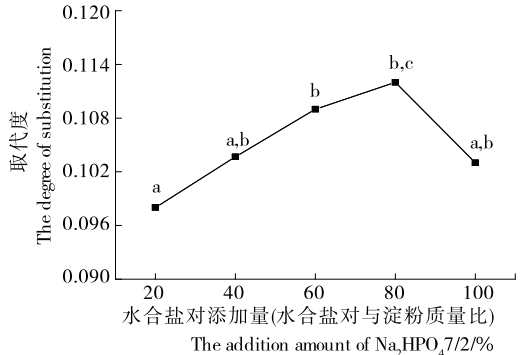


图 2 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的混合物 (Aw 0.61) 添加量对取代度的影响
Figure 2 Effects of the addition amount of a mixture of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Aw 0.61) on the degree of substitution

继续增大添加量则取代度开始降低。由于添加量范围不大,取代度变化较小,但是从变化趋势可以看出,在该离子液体中添加水合盐对质量比为 80% 时最有利于脂肪酶保持活性。酯合成反应过程中会生成少量的水,因此要保持较高的酶活性,反应体系必须维持一定的水活度,以消除由于水含量的增加而引起的酶活力改变。但当添加的水合盐对的量过大时,过多的固体盐对酶颗粒和反应物的接触造成阻碍,同时可能导致反应物粘度大,影响了底物与酶的活性中心结合。

2.2 冻干酶的 pH 值及添加量对取代度的影响

冻干酶的 pH 值对酶催化的影响见图 3。由于冻干酶冻干制备中有其他物质的加入,冻干酶并不是 100% 脂肪酶 CRL,所以同质量的冻干酶和脂肪酶 CRL 反应中硬脂酸淀粉酯的取代度不同。由图 2 可知,酶的催化能力受 pH 值影响显著。当冻干酶 pH 值为 7.1 时,合成得到的硬脂酸淀粉酯的取代度最高,高于或者低于该 pH 值均会引起取代度的显著降低($P<0.05$),因此 pH 7.1 下冻干得到的脂肪酶在该离子液体中具有最佳催化活性。其主要原因是特定的 pH 值下,酶分子活性中心周围的基团处于最佳的离子化状态,有利于酶发挥催化功能。

图 4 为冻干酶的添加量对于酶催化合成硬脂酸淀粉酯

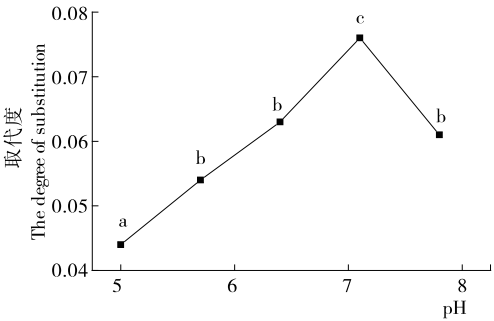


图 3 冻干酶的 pH 对于取代度的影响
Figure 3 Effects of the pH of lyophozyme on the degree of substitution

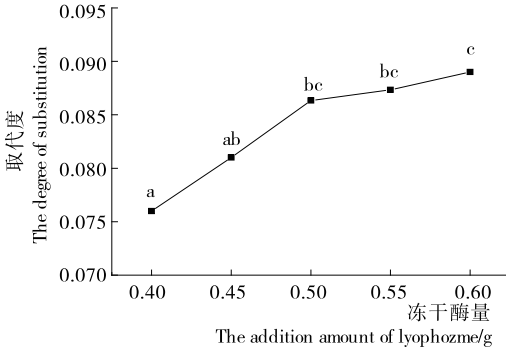


图 4 冻干酶的添加量对取代度的影响
Figure 4 Effects of the addition amount of lyophozyme on the degree of substitution

取代度的影响。由图 4 可知,在 pH 7.1 条件下,硬脂酸淀粉酯取代度随冻干酶添加量的增加而持续升高。当冻干酶添加量超过 0.5 g 时,继续增加酶量对所合成的硬脂酸淀粉酯取代度没有显著性的影响($P<0.05$),即冻干酶的最适添加量为 0.5 g (冻干酶:淀粉质量比为 10.4%)。

2.3 冻干保护剂对酶催化的影响

图 5 为使用不同冻干保护剂对冻干酶催化合成硬脂酸淀粉酯的影响。由图 5 可知,在离子液体中,脂肪酶和有机化合物如甘氨酸、聚乙二醇等冻干后得到的冻干酶比未加冻干保护剂制备得到的冻干酶催化合成淀粉酯具有较高的取代度。其中利用以聚乙二醇为冻干保护剂得到的冻干脂肪酶合成的硬脂酸淀粉酯取代度最高(0.123),比未加冻干保护剂的冻干酶催化合成的硬脂酸淀粉酯取代度提高 62%,表明聚乙二醇的存在能够较好地保持冻干脂肪酶的活性。这与 Secundo 等^[19]的研究结果一致。冷冻干燥是制备非水相催化用酶的一个重要手段,大多数酶能以冷冻干燥颗粒的形式在离子液体中表现出活性^{[11]7}。而冷冻干燥对酶的活性中心和二级结构都有一定损害作用,Maruyama 等^[18]的研究表明冻干保护剂可以在一定程度上保护酶的活性中心和构象,此外还可以降低底物传质障碍,从而影响酶在非水相中催化活性。因此本研究中聚乙二醇的加入可以在一定程度上保护脂肪酶的活性中心和构象,有效提高脂肪酶在离子液体中的分散性,增加酶分子与底物的接触机会,从而使冻干脂肪酶催化活性得到明显的提高。

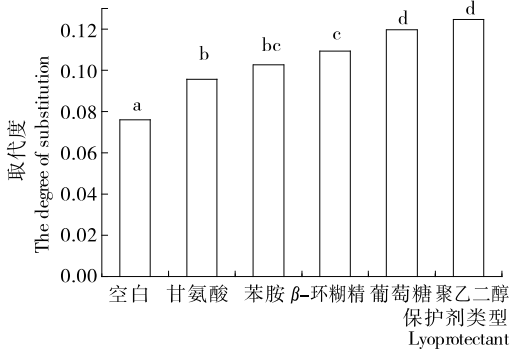


图 5 冻干保护剂对酶催化的影响

Figure 5 Effect of different lyoprotectant on enzyme catalysis

3 结论

本试验主要研究了在离子液体中脂肪酶活性的调控对于硬脂酸淀粉酯合成的影响。试验比较了不同 Aw、不同冻干酶 pH 值、不同冻干保护剂对脂肪酶催化活性的影响,发现 Aw 对酶活性影响明显,Aw 为 0.61 时酶活性最高。冻干酶 pH 值对取代度的影响显著,冻干酶 pH 值为 7.1 为最佳值。采用冻干剂制备冻干脂肪酶有利于酶活性的保护,其中以聚乙二醇为冻干保护剂效果最佳。本研究在理论指导的基础上对影响参数进行了优化,有利于为实际生产中的应用提供指导。限于时间和条件的限制,本试验在影响参数选择和参数数值范围上不够广泛,在后续工作中将做更深入的研究。

参考文献

[1] 李伟. 酶法合成单月桂酸丙二醇酯及其性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011: 20-28.

[2] 孙平, 陈健, 杨惠娟, 等. 酶法合成棕榈酸马铃薯淀粉酯[J]. 食品科技, 2012(4): 249-252.

[3] 王恺, 李书华. 柠檬酸酯淀粉最佳制备条件的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(4): 140-141.

[4] 钟涛, 乐长高, 谢宗波, 等. 碱性离子液体在有机合成中的应用研究进展[J]. 有机学, 2010, 30(7): 981-987.

[5] 卢璇璇. 离子液体介质中脂肪酶催化合成长链脂肪酸淀粉酯的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.

[6] LU Xuan-xuan, LUO Zhi-gang, YU Shu-juan, et al. Lipase-catalyzed synthesis of starch palmitate in mixed ionic liquids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36): 9 273-9 279.

[7] FERDJANI S, IONITA M, ROY B, et al. Correlation between thermostability and stability of glycosidases in ionic liquid[J]. Biotechnol Lett, 2011, 33(6): 1 215.

[8] ATSUSHI K, YUKI K, SHIORI I. Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester analogues in ionic liquid[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 148(2/3): 133-138.

[9] SUNG H H, MAI N L, YOON M K. Continuous production and in situ separation of fatty acid ester in ionic liquids[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 47(1/2): 6-10.

[10] 陆杨, 李在均, 蔡燕. 新型温控离子液体绿色介质生物催化合成乙酸辛酯香料[J]. 化学剂, 2010, 32(9): 793-798.

[11] 王永泽. 离子液体中脂肪酶催化酯交换合成和拆分的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.

[12] 王成涛, 丁晓英, 张佳婵, 等. 非水相介质杂醇油酶法转化天然酯类香料的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 19-22.

[13] SUNIL S, ERIK H. Control of water activity in lipase catalysed esterification of chiral alkanolic acids[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 58(1): 6-9.

[14] MAREK A, UWE T B. Improving ascorbyl oleate synthesis catalyzed by Candida antarctica lipase B in ionic liquids and water activity control by salt hydrates [J]. Process Biochemistry, 2009, 44(3): 257-261.

[15] ROSA C D, MORANDIM M B, NINOW J L. Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(23): 5 818-5 826.

[16] 钟遇安, 姜士, 吴炜亮, 等. 酶法制备丙二醇单酯的研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(5): 42-45.

[17] KLIBANOV A M. Improving enzymes by using them in organic solvents[J]. Nature, 2001, 409(6 817): 241-246.

[18] MARUYAMA T, NAGASAWA S, GOTO M. Poly (ethylene glycol)-lipase complex that is catalytically active for alcoholysis reactions in ionic liquids[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24 (16): 1 341-1 345.

[19] SECUNDO F, CARREA G. Lipase activity and conformation in neat organic solvents[J]. Journal of Moleucular Catalysis: Enzymatic, 2002, 19(20): 93-102.

信息窗

美国研究：明亮环境中用餐更健康

外出就餐时面对一众美食难免吃多,耽误减肥大计。但如果你挑选比较明亮的地方用餐,对美食诱惑的抵抗力会强一些,这是美国南佛罗里达大学一项研究的发现。

研究人员在 4 家餐馆调查了 160 名顾客的用餐情况,这些顾客中一半在光线充足的环境中就餐,另一半在光线昏暗的环境中就餐。研究人员发现,前一组顾客更爱点鱼、蔬菜等热量相对低的食物。根据销售记录计算,后一组顾客

点的食物热量比前一组多 39%。研究人员随后让 700 名大学生在或明或暗的屋子中用餐,同样发现在较暗屋子中用餐容易进食更多热量。研究人员据此得出结论,在明亮环境中用餐更容易做出健康选择,可能是这种环境更能让人保持清醒。研究人员之一布赖恩·万辛克说,在昏暗环境中用餐其实也有好处,可以让人放慢进食速度,细嚼慢咽。

(来源:www.foodmate.net)