

# 毕赤酵母表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B 全细胞催化合成葡萄糖月桂酸酯

郑穗平, 任昌琼, 韩双艳, 林影

华南理工大学生物科学与工程学院 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广州 510006

**摘要:** 利用表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* lipase B, CALB)的毕赤酵母细胞为全细胞催化剂, 以葡萄糖为酰基受体, 月桂酸为酰基供体, 在非水相体系中催化合成糖酯。用硅胶柱层析对产物进行初提, 再用制备液相色谱进一步分离纯化, 并用高效液相色谱-质谱鉴定纯品性质。对该酶法合成糖脂反应体系进行了优化, 其中考察了有机溶剂种类、复合溶剂体系中二甲基亚砜(DMSO)体积百分比、酶量、底物摩尔比、水活度和温度等几个影响酯化反应的因素。结果表明: 在 5 mL 反应体系中, 以叔戊醇/二甲基亚砜(DMSO30%, V/V)为反应介质, 添加初始水活度为 0.11 的全细胞催化剂 0.5 g, 葡萄糖 0.5 mmol/L, 月桂酸 1.0 mmol/L, 60°C 下反应 72 h 后, 葡萄糖月桂酸单酯的转化率达到 48.7%。

**关键词:** 酵母表面展示, 南极假丝酵母脂肪酶 B, 全细胞催化剂, 糖酯

## Synthesis of glucose laurate monoester catalyzed by *Candida antarctica* lipase B-displaying *Pichia pastoris* whole-cells

Suiping Zheng, Changqiong Ren, Shuangyan Han, and Ying Lin

Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** We developed a new enzymatic-catalyzing producing process of glucose laurate monoester. In the process we used *Candida antarctica* lipase B-displaying *Pichia pastoris* whole-cells as biocatalyst, glucose as the acyl acceptor and lauric acid as the acyl donor. The product glucose laurate monoester was purified by silica gel column chromatography and preparative liquid chromatography, and identified by liquid chromatography-mass spectrometry. Then we optimized the process from various aspects, such as solvent composition, ratio of dimethyl sulfoxide to 2-Methyl-2-butanol (V/V), catalyst dosage, substrate concentration, water activity and temperature. The optimal reaction conditions were: glucose 0.5 mmol/L, lauric acid 1.0 mmol/L, ratio of 2-Methyl-2-butanol to Dimethyl sulfoxide is 7:3 in 5 mL volume, temperature 60°C, the best initial water activity of whole-cells biocatalyst is 0.11. The maximum glucose conversion could be 48.7% after 72 h.

**Keywords:** yeast displaying, *Candida antarctica* lipase B, whole-cell biocatalyst, sugar ester

高级脂肪酸糖酯具有两亲结构, 是一类重要的高效无毒非离子表面活性剂, 广泛应用于食品、医

**Received:** September 25, 2009; **Accepted:** November 17, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. G02B1070230).

**Corresponding author:** Ying Lin. Tel: +86-20-39380698; Fax: +86-20-39380698; E-mail: feylin@scut.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. G02B1070230)资助。

药和化工等行业,具有无毒、无嗅、无刺激、易生物降解等优点<sup>[1-2]</sup>。糖酯合成传统上采用化学法,但存在高能耗、高三废以及废物难以处理等缺点,相比而言,酶法合成糖酯则具有反应条件温和、选择性好、产率高、符合绿色化学和环境友好的特点,日益受到人们的重视。采用游离酶为催化剂合成糖酯<sup>[3-4]</sup>,存在酶的分离、再生以及循环使用的困难,因此目前应用于糖酯合成的酶制剂主要有商业化的固定化脂肪酶 Novozym435<sup>[5]</sup>,但其较高的成本限制了其在酶法合成糖酯中的工业应用,开拓新酶源显得迫在眉睫。基于酵母细胞表面展示技术可制备得到表面展示脂肪酶的酵母全细胞催化剂,具有固定化酶的特性及优点,而且制备方法简单,易于回收与再生利用<sup>[6-7]</sup>,为降低酶法合成糖酯工艺的生产成本提供了新的思路。

目前已有报道用凝集素锚定系统将 CALB (*Candida antarctica lipase B*, 以下均称 CALB)展示在酿酒酵母表面,得到对短链脂肪酸(C2~C8)具有较高催化活力的全细胞催化剂,但对长链脂肪酸催化活力较低<sup>[8]</sup>。还有利用絮凝素 Flo1p 将 CALB 展示在酿酒酵母表面催化正丁醇与脂肪酸的酯化反应<sup>[9]</sup>。本实验室已报道将酿酒酵母表面展示 CALB 用于高效催化合成己酸乙酯<sup>[10]</sup>。与酿酒酵母体系相比,毕赤酵母能进行高密度发酵,从而利用毕赤酵母展示 CALB 将在一定程度上降低全细胞催化剂的成本。目前尚未有用酿酒酵母或毕赤酵母表面展示 CALB 全细胞催化剂合成糖酯的相关研究报道。

本研究基于酵母细胞表面展示技术,用表面展示 CALB 的毕赤酵母细胞为催化剂,在非水相体系中催化合成表面活性剂糖酯,初步确定了合成葡萄糖月桂酸单酯的最优反应体系,建立了糖酯定性和定量分析的研究平台。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株

毕赤酵母重组菌株 GS115-KNS-CALB,为本实验室构建及保存。

#### 1.1.2 培养基

无氨基酸酵母氮源 YNB(Yeast nitrogen base)、

蛋白胨(PEP)均购自 Difco 公司;酵母抽提物(YE)购自 Oxford 公司;YPD(Yeast extract peptone dextrose medium)、BMGY(Buffered glycerol-complex medium)、BMMY(Buffered methanol-complex medium)等培养基均按 Invitrogen 公司毕赤酵母表达操作手册配方配制。

#### 1.1.3 试剂

一水葡萄糖(于 70°C 烘箱中放置 24 h)、月桂酸、叔丁醇、叔戊醇(2M2B)、丙酮、二甲亚砜(DMSO)均为分析纯,以上有机溶剂均用 4Å 分子筛脱水 24 h 以上,4Å 分子筛(将 4Å 分子筛于 400°C 马弗炉中活化 4 h,置于干燥器中冷却待用)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 全细胞催化剂的制备

将培养于 YPD 琼脂固体平板上的毕赤酵母重组菌株接种至 YPD 液体培养基中,30°C、250 r/min 培养 24 h,以 1%的接种量转接到新鲜 BMGY 培养基中,30°C、250 r/min 培养 24 h,然后在 4°C、8000 r/min 离心 10 min 得到菌体,转入 BMMY 培养基中,30°C、250 r/min 培养 5 d,每隔 24 h 加入 0.5%(V/V)甲醇诱导。然后收集发酵菌体,离心,用双蒸水洗 2 次,最后用少量双蒸水重悬,通过真空冷冻干燥得到全细胞催化剂干粉。

#### 1.2.2 全细胞脂肪酶水解活力的测定

采用吸光度测定脂肪酶活力<sup>[11]</sup>。检测全细胞催化剂干粉的酶活:用 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)配置浓度为 2 mmol/L 的 pNPB 作为酶反应底物,其中添加 0.5%的 Triton-X 100。然后向 0.5 mL 的菌体重悬液中加入 0.5 mL 浓度为 2 mmol/L 的底物溶液,45°C 下反应一定时间,测定  $OD_{405}$  值。每个样品均测定 3 个平行样,用未携带 CALB 基因的 pPIC9K 空载体转化得到的重组毕赤酵母菌体 GS115-pPIC9K 作空白对照。一个酶活力单位为每分钟水解底物生成 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚所需的酶量<sup>[12]</sup>,测得冻干粉水解酶活为 306 U/(g-dry cell)。

#### 1.2.3 全细胞催化剂和底物的水活度预平衡

全细胞催化剂和底物在装有饱和盐溶液的密闭容器中预平衡 72 h,得到具有一定初始水活度的全细胞催化剂,所用的饱和盐溶液包括:LiBr( $a_w=0.06$ ),LiCl( $a_w=0.11$ ),MgCl<sub>2</sub>( $a_w=0.33$ ),Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>( $a_w=0.53$ ),NaCl( $a_w=0.75$ ),K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>( $a_w=0.97$ )<sup>[13]</sup>。

### 1.2.4 全细胞催化剂合成葡萄糖月桂酸单酯

25 mL 具塞玻璃三角瓶中加入葡萄糖、月桂酸和 5 mL 脱水有机溶剂, 置于恒温摇床中预平衡 30 min, 取出加入一定量的全细胞催化剂、1.2 g 4 Å 分子筛, 一定温度下 200 r/min 反应 72 h。反应结束后离心取反应液上清, -20°C 保存待测。

### 1.2.5 产物的分离及纯化

硅胶柱直径 2.5 cm, 高 40 cm。洗脱液组成: 甲苯:乙酸乙酯:甲醇:水=50:25:22.5:1(V/V/V/V), 洗脱速度为 2.0 mL/min, 收集洗脱液 10 mL/管, 薄层色谱(TLC)检测, 合并具有相同组分的洗脱液, 旋转蒸发除去有机溶剂得到糖酯初品。TLC 展开剂<sup>[14]</sup>: 甲苯:乙酸乙酯:甲醇:水=50:25:22.5:1(V/V/V/V), 显色剂<sup>[15]</sup>: 1.59 g  $\alpha$ -萘酚溶于 51 mL 无水乙醇、18 mol/L 浓硫酸 6.5 mL 和 4 mL 水, 80°C 显色 5 min。

将硅胶柱分离纯化所得初品, 经过制备高效液相色谱(Waters1525)进一步分离纯化, 制备色谱柱 XBridge 100 mm×19 mm, C18, 5  $\mu$ m OBD<sup>TM</sup>, 流动相为 85% 甲醇, 流速为 5 mL/min。Waters fraction column III 馏分收集器自动收集。合并相同组分的流动相, 旋转蒸发除去有机溶剂。真空干燥至恒重得到糖酯纯品, 用于进一步的分析鉴定。

### 1.2.6 产物的 HPLC-MS 鉴定

液相部分: 1100 液相色谱仪(安捷伦公司), 色谱柱 Xbridge100×2.1 mm, 5  $\mu$ m, 流动相为甲醇:水=80:20, 流速为 0.5 mL/min。

质谱部分: 离子方式为 APCI(大气压喷雾离子源), 质量范围为 50~1000 m/z, 毛细管电压-121V, 雾化气(N<sub>2</sub>)压力 124 kPa, 干燥气(N<sub>2</sub>)流速 20 psi。干燥气(N<sub>2</sub>)温度 300°C, 气化室温度 350°C, 正离子方式检测, 全扫描监测。

### 1.2.7 产物的 HPLC-ELSD 定量检测

HPLC-ELSD(Waters2695-2424)进行定量检测, 色谱柱 Xbridge 250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m, 流动相为甲醇:乙酸乙酯:水=53%:35%:13%(V/V/V), 流速 1 mL/min, 柱温 35°C, 漂移管温度 55°C, N<sub>2</sub> 流速 30 psi, 增益 10。葡萄糖月桂酸单酯为标准品制作校正曲线。葡萄糖月桂酸单酯转化率=(Me/Mg)×100%<sup>[15]</sup>。(Me: 反应体系中葡萄糖月桂酸单酯的质量; Mg: 反应体系

中葡萄糖的质量)。

## 2 结果

### 2.1 分离纯化产物的鉴定

分离纯化后的葡萄糖月桂酸单酯经 HPLC-ELSD 检测, 得到单一色谱峰 A(图 1), 其纯度达 95%<sup>[15]</sup>。对色谱峰 A 的 HPLC-MS 分析结果见图 2。图 2 中出现的[M-1]、[M-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>]、[M+Na]质谱信号峰, 分别为 199.1、361.1 和 394.1 峰, 所对应的 M 值与葡萄糖月桂酸单酯的分子量 362 相符合。

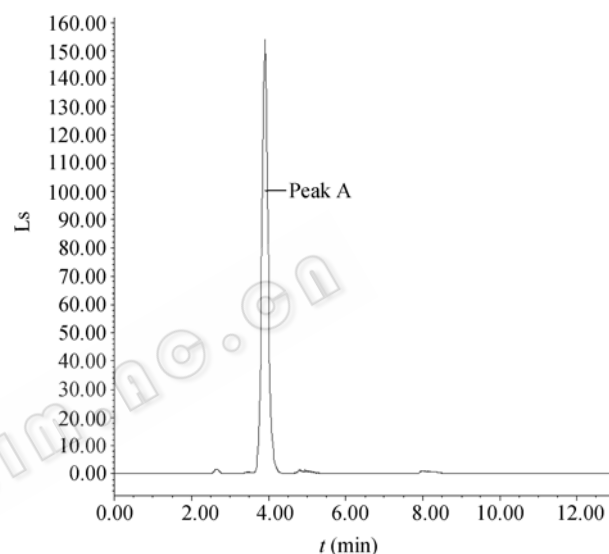


图 1 纯化产物的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC chromatographic analysis of the purified product.

### 2.2 溶剂体系对全细胞催化剂合成葡萄糖月桂酸单酯的影响

反应介质是酶非水相催化的一个关键性影响因素, 影响酶的催化活性、稳定性、底物特异性和酶催化反应速率等。本研究中首先考察了 6 种不同的有机溶剂体系对酵母表面展示 CALB 全细胞合成葡萄糖月桂酸单酯的影响。有机溶剂体系: 丙酮、叔丁醇、叔戊醇、丙酮+DMSO、叔丁醇+DMSO 和叔戊醇+DMSO, 复合溶剂体系中 DMSO 所占体积比均为 20%。研究结果表明, 复合有机溶剂体系中, 全细胞催化剂的酯化效率远远大于单一有机溶剂体系, 其中在叔戊醇/DMSO 的复合溶剂体系中转化率最高(表 1)。DMSO 有助于提高葡萄糖在体系中的溶解度, 此结果与 Plou 等<sup>[16]</sup>的研究结果一致。

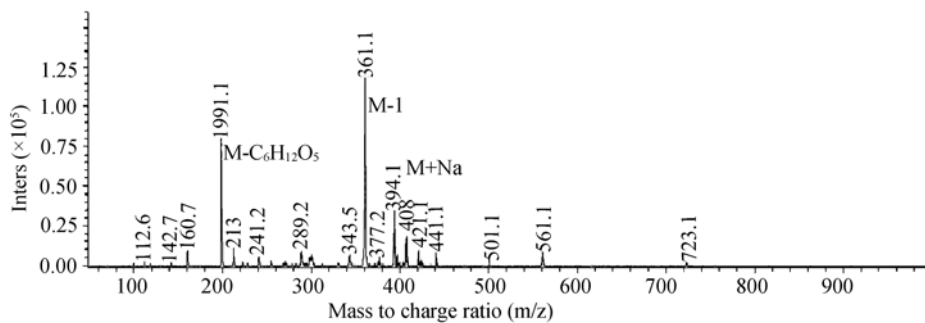


图 2 纯化产物的 HPLC-MS 谱图

Fig. 2 HPLC-MS chromatographic analysis of the purified product.

表 1 不同溶解系对全细胞催化剂酯化合成葡萄糖月桂酸单酯的影响

Table 1 Effect of different organic solvents on esterification catalyzed by whole cell catalyst

Organic solvent	Concentration (g/L)	Conversion (%)
t-butyl alcohol/DMSO	11.618	9.76
2M2B/DMSO	26.75	22.48
Acetone/DMSO	10.06	8.45
2M2B	2.7	2.25
Acetone	1.3	1.13
t-butyl alcohol	2.7	2.24

Reaction conditions: glucose 0.6 mmol/L, lauric acid 1.2 mmol/L, whole-cell catalyst 0.3 g, total volume 5 mL (DMSO percentage 20% (V/V)), 1.2 g molecular sieve, 55°C, 200 r/min, 72 h.

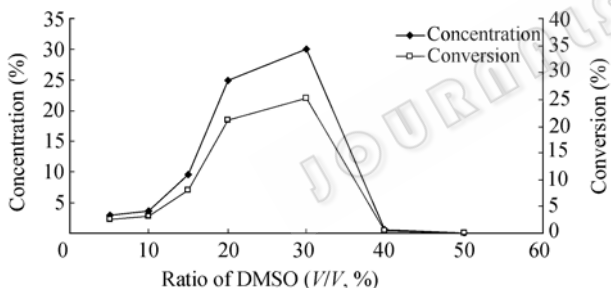


图 3 不同 DMSO 体积比对全细胞催化剂合成葡萄糖月桂酸单酯的影响

Fig. 3 Effect of different DMSO ratio on esterification catalyzed by whole cell catalyst. Reaction conditions: glucose 0.6 mmol/L, lauric acid 1.2 mmol/L, whole-cell catalyst 0.3 g, 1.2 g molecular sieve, total volume 5 mL, 55°C, 200 r/min, 72 h.

### 2.3 全细胞催化剂添加量对葡萄糖月桂酸单酯合成的影响

由图 4 可知,随着酶浓度的增加,葡萄糖月桂酸单酯的转化率提高,当酶量由 0.05 g 增加到 0.3 g 时,转化率的增加较大;但酶量由 0.4 g 增加到 0.6 g 时,转化率增加不显著。原因可能是在 DMSO 体积比一定的条件下,反应体系中的糖维持一定的溶解度,当酶量超过 0.4 g 后,由于底物浓度的限制,尽

管酶量增加但转化率并不会显著提高。此外在高酶浓度的催化体系中,催化剂很难维持均匀悬浮状态,存在传质阻力。从图 4 中可知,在此反应中 0.5 g 是比较合适的浓度,再提高酶浓度,葡萄糖酯的转化率并没有显著提高,而成本却会大大增加。

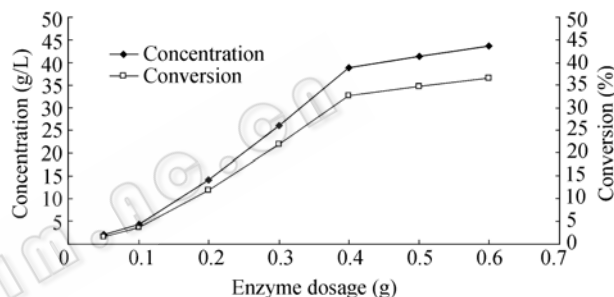


图 4 不同全细胞催化剂添加量对合成葡萄糖月桂酸单酯的影响

Fig. 4 Effect of the amount of lipase on esterification catalyzed by whole cell catalyst. Reaction conditions: glucose 0.6 mmol/L, lauric acid 1.2 mmol/L, total volume 5 mL, DMSO percentage 30%(V/V), 1.2 g molecular sieve, 55°C, 200 r/min, 72 h.

### 2.4 底物浓度对全细胞催化剂合成葡萄糖月桂酸单酯的影响

在非水相体系中,底物溶解并扩散至酶的活性位点,该过程受底物浓度的影响。底物浓度过高,酶催化活性位点饱和,底物转化率降低。Cauglia 等<sup>[17]</sup>研究发现脂肪酸浓度过高会降低 Novozym435 催化合成葡萄糖酯的反应速率。底物浓度过低,酶未能充分发挥催化活性,糖酯合成效率降低。本研究中葡萄糖与月桂酸的摩尔比固定为 1:2,逐渐提高葡萄糖的浓度,发现转化率有显著提高。当葡萄糖为 0.5 mmol/L、月桂酸为 1.0 mmol/L 时,转化率达到最高(38.4%) (图 5);但当底物浓度继续增加,葡萄糖转化率下降。所以最适底物浓度为:葡萄糖为 0.5 mmol/L,月桂酸 1.0 mmol/L。

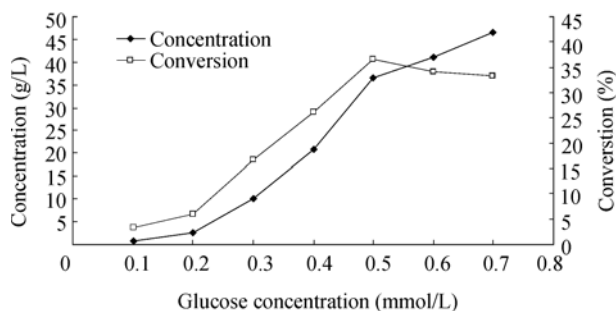


图 5 不同底物浓度对全细胞催化剂合成葡萄糖月桂酸单酯的影响

Fig. 5 Effect of different glucose concentration on esterification catalyzed by whole cell catalyst. Reaction conditions: molar ratio of lauric acid to glucose fixed to 2, CALB 0.5 g, total volume 5 mL, DMSO percentage 30%(V/V), 1.2 g molecular sieve, 55°C, 200 r/min, 72 h.

## 2.5 水活度对全细胞催化剂合成葡萄糖月桂酸单酯的影响

非水相酶促反应中, 脂肪酶需要一定量的结合水维持其活性构象。脂肪酶催化的酯化反应中有副产物(水)产生, 通常反应体系中加入分子筛以除去体系中产生的水, 使反应平衡向合成方向进行。Chamouleau 等<sup>[18]</sup>研究了不同初始水活度条件下 Novozym435 合成果糖棕榈酸酯, 发现酶初始水活度越高, 反应初速度降低, 反应平衡向着水解方向进行, 并阻碍了脂肪酸从有机溶剂体系向酶活性位点转移, 导致酯化合成效率降低。电镜观察不同水活度条件下固定化脂肪酶表面都有一层水膜, 阻止疏水底物接近酶<sup>[19]</sup>。但体系中介质的水活度过低, 酶的催化活性会降低。本研究用饱和盐预平衡的方法控制全细胞脂肪酶与底物的初始水活度<sup>[13]</sup>, 用于催化合成葡萄糖月桂酸酯。由表 2 可知, LiCl 饱和溶液 ( $a_w=0.11$ )处理后的全细胞催化剂合成糖酯产率最高。

## 2.6 温度对全细胞催化剂合成葡萄糖月桂酸单酯的影响

有机相中固定化酶具有较高的热稳定性, 随着温度的升高, 酶催化效率明显升高, 但其酶活力损失较大<sup>[20]</sup>, 不利于酶的循环利用, 从而增加了成本。温度对底物和产物的溶解度也有一定的影响, Arcos 等<sup>[21]</sup>研究发现, 随着温度的升高, 葡萄糖和单酯溶解度均增加, 导致少量二酯产生。从图 6 可知, 该全细胞催化剂在 60°C 仍有较高的合成活力, 催化合成葡萄糖月桂酸单酯效率最高, 说明此催化剂具有较

表 2 不同水活度对全细胞催化剂合成葡萄糖月桂单酯的影响

Table 2 Effect of different initial water activities on esterification catalyzed by whole cell catalyst

Initial water activity ( $a_w$ )	Saturated salt solutions	Concentration (g/L)
0.06	LiBr	35.7
0.11	LiCl	49.9
0.33	MgCl <sub>2</sub>	40.34
0.53	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	35.31
0.75	NaCl	27.48
0.97	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5

Reaction conditions: glucose 0.5 mmol/L, lauric acid 1.0 mmol/L and CALB 0.5 g, total volume 5 mL, DMSO percentage 30%(V/V), 1.2 g molecular sieve, 55°C, 200 r/min, 72 h. The enzyme, substrates and solvents were pre-equilibrated separately with the water vapour of saturated salt solution.

高的温度耐受性。但温度高于 60°C 时, 酶有结块现象, 且反应体系中产物色泽较深。为实现该酶的重复利用, 选择 60°C 为较优反应温度。

## 2.7 葡萄糖月桂酸单酯合成的反应进程曲线

综合以上各单因素优化的结果, 在 5 mL 反应体系中, 选择叔戊醇与 DMSO 的复合有机溶剂为反应介质, 反应体系中 DMSO 与叔戊醇的体积比为 30%, 全细胞催化剂 0.5 g, 全细胞催化剂初始水活度 0.11, 葡萄糖 0.5 mmol/L, 月桂酸 1.0 mmol/L, 反应温度 60°C, 在此条件下, 反应 72 h 后葡萄糖月桂酸单酯的转化率达到 48.7%。在同样条件下, 还比较了本实验室自制全细胞催化剂与 Novozym435 合成葡萄糖

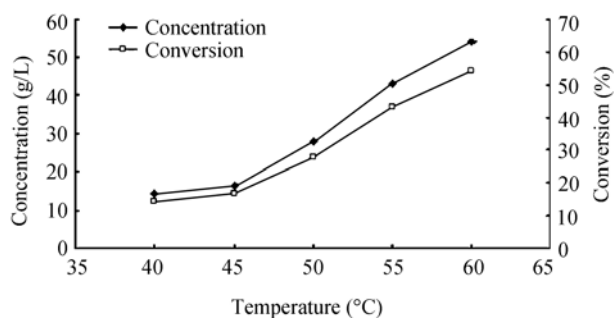


图 6 温度对全细胞催化剂合成葡萄糖月桂酸单酯的影响

Fig. 6 Effect of temperature on esterification catalyzed by whole cell catalyst. Reaction conditions: glucose 0.5 mmol/L, lauric acid 1.0 mmol/L, CALB 0.5g, total volume 5 mL, DMSO percentage 30%(V/V), 1.2 g molecular sieve, 200 r/min, 72 h. The enzyme, substrates and solvents were pre-equilibrated separately with the water vapour of saturated solutions (LiCl,  $a_w=0.11$ ).

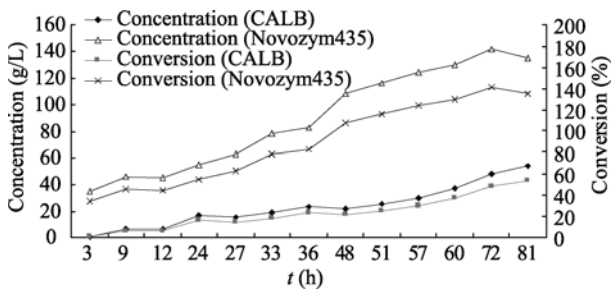


图 7 脂肪酶催化合成葡萄糖月桂酸单酯反应进程曲线

Fig. 7 Time course of esterification catalyzed by whole cell catalyst and Novozyme 435. Reaction conditions: glucose 0.5 mmol/L, lauric acid 1.0 mmol/L, 0.5 g CALB or Novozym435, total volume 5 mL, DMSO percentage 30% (V/V), 1.2 g molecular sieve, 200 r/min, 81 h. The enzyme, substrates and solvents were pre-equilibrated separately with the water vapour of saturated salt solution ( $\text{LiCl}$ ,  $a_w=0.11$ ).

月桂酸单酯的催化效率。由图 7 可知,全细胞催化剂与 Novozym435 合成葡萄糖月桂酸单酯有一定的差距,可能的原因是全细胞催化剂比酶活小,单位重量酵母细胞表面展示的 CALB 蛋白较少,而且单因素之间的交互作用没有进一步优化,全细胞催化剂合成糖酯的催化效率有进一步提高的空间。

### 3 讨论

利用全细胞生物催化剂合成糖酯,既无需酶的分离纯化,又避免了在纯化过程中的酶活损失,更节省了大量的设备投资和运行费用。酵母细胞由于具有相对刚性的细胞壁,在有机化合物和有机溶剂存在的条件下,仍能保持其结构,它具有固定化酶的优点,与自由酶相比,其水解活性、合成活性、耐热性以及耐有机溶剂的能力大大提高。

本研究应用表面展示 CALB 的毕赤酵母细胞作为全细胞催化剂合成非离子表面活性剂葡萄糖月桂酸单酯,对反应体系进行了优化,同时建立了一个糖酯的分离纯化与分析检测的研究平台。分别考察了有机溶剂、酶量、底物浓度、水活度和温度等因素对全细胞催化剂催化效率的影响。以上各因素主要从底物溶解度和酶活性两个方面影响糖酯合成,其中有机溶剂是显著影响因素。在极性较强的有机溶剂如吡啶、N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷中,糖虽具有较高的溶解度,但这些有机溶剂对酶活都有强烈的抑制作用,可剥夺酶分子表面结合的结合

水,导致酶分子因不能充分水化而失活。Gorman 等<sup>[22]</sup>报道了有机溶剂剥夺酶分子表面结合水的过程。酶在正己烷、丙酮、叔丁醇和叔戊醇等溶剂中能保持大部分活性,但糖的溶解度极低。有研究表明<sup>[23]</sup>,Novozym435 在 20%DMSO 的叔戊醇体系中合成蔗糖酯产量最高,Degn 等<sup>[20]</sup>在 20% DMSO 的叔丁醇复合溶剂体系中,葡萄糖溶解度最高,反应 24 h 后残余酶活最低;当 DMSO 体积比小于 20%时,葡萄糖溶解度减小,酶反应速率降低,反应 24 h 后残余酶活相对较高。所以在复合有机溶剂中,两种极性不同的溶剂按适当的比例混合可在显著提高糖溶解度的同时,降低其对酶活力的损失。本研究采用叔戊醇/DMSO 的复合有机溶剂体系,DMSO 的体积为 30%时,全细胞催化剂合成葡萄糖月桂酸单酯的转化率最高(图 3),继续增加体系中 DMSO 的体积,酶活力损失严重,几乎检测不到产物的生成。

研究报道,在不同反应体系中,Novozym435 催化合成糖酯转化率相差较大。Flores 等<sup>[24]</sup>在叔戊醇反应体系中,利用 Novozym435 催化合成葡萄糖月桂酸单酯,葡萄糖转化率为 75%。Moreau 等<sup>[15]</sup>以丁醇为有机溶剂,以 Novozym435 为催化剂,分别在 10 mL 和 500 mL 叔丁醇中合成葡萄糖月桂酸酯,48 h 后葡萄糖转化率分别只有 7%和 32%。

在相同条件下,展示 CALB 的毕赤酵母全细胞催化剂与商品化 Novozym435 在合成糖酯效率上还有一定的差距,可能是由于载体性质的差别。Yu 等<sup>[25]</sup>报道了固定化 CALB 催化合成葡萄糖硬脂酸单酯的反应机制,研究表明其遵循乒乓的动力学机制,脂肪酶首先被一分子脂肪酸酰化,释放一分子水,随后将酰基转移到糖羟基上形成酯键。在此过程中,固定化 CALB 的支持介质对非水相催化效率有较大影响。Cao L 等<sup>[26]</sup>报道用不同材料固定 CALB,固定化材料的疏水性越高,其合成葡萄糖棕榈酸酯的效率越高。酵母细胞表面具有亲水性,在非水相体系中合成糖酯需要克服载体亲水性的限制,可通过增加锚定系统的疏水性解决,这部分工作本实验室正在进行中。此外可通过提高展示系统蛋白表达量,进行毕赤酵母的高密度发酵,提高单位干重细胞酶活,以进一步提高其非水相催化合成糖酯的效率。

生物催化剂在工业生产中有广阔的应用前景。展示南极假丝酵母脂肪酶的毕赤酵母全细胞催化剂能在非水相体系中有效地合成糖酯, 为其实现进一步工业化扩大生产奠定了基础。为进一步提高全细胞生物催化剂的催化效率, 可加强对该细胞的培养、预处理和反应放大过程的研究, 以解决酶法合成扩大化的瓶颈问题。

## REFERENCES

- [1] Maag H. Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes. *J Am Oil Chem Soc*, 1984, **61**(2): 259–267.
- [2] Sarney DB, Vulfson EN. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol*, 1995, **13**(5): 164–172.
- [3] Kennedy JF, Kumar H, Panesar PS, *et al*. Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, **81**(6): 866–876.
- [4] Chang SW, Shaw JF. Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. *Nat Biotechnol*, 2009, **26**(3/4): 109–116.
- [5] Karmee SK. Lipase catalyzed synthesis of ester-based surfactants from biomass derivatives. *Biofuels Bioprod Bioref*, 2008, **2**(2): 144–154.
- [6] Kondo A, Udea M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**(1): 28–40.
- [7] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*, 2001, **92**(5): 405–416.
- [8] Kato M, Fuchimoto J, Tanino T, *et al*. Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(3): 549–555.
- [9] Tanino T, Ohno T, Aoki T, *et al*. Development of yeast cells displaying *Candida antarctica* lipase B and their application to ester synthesis reaction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(6): 1319–1325.
- [10] Han SY, Pan ZY, Huang DF, *et al*. Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, **59**(1/3): 168–172.
- [11] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, *et al*. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *J Bacteriol*, 1991, **173**(15): 4836–4841.
- [12] Pan ZY, Han SY, Lin Y, *et al*. Expression of *Candida antarctica* lipase B on yeast surface and synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(4): 673–678.
- [13] 潘志友, 韩双艳, 林影, 等. 南极假丝酵母脂肪酶 B 的酿酒酵母表面展示及其催化己酸乙酯的合成. *生物工程报*, 2008, **24**(4): 673–67.
- [13] Ma L, Persson M, Adlercreutz P, *et al*. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**(7): 1024–1029.
- [14] Soultani S, Engasser JM, Ghoul M. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *J Mol Catal B: Enzym*, 2001, **11**(4/6): 725–731.
- [15] Moreau B, Lognay GC, Blecker C, *et al*. Synthesis of novel D-glucuronic acid fatty esters using *Candida Antarctica* lipase in tert-butanol. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(5): 419–424.
- [16] Plou FJ, Cruces MA, Ferrer M, *et al*. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *J Biotechnol*, 2002, **96**(1): 55–66.
- [17] Caglia F, Canepa P. The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on ‘sugar esters’ production. *Bioresour Technol*, 2008, **99**(10): 4065–4072.
- [18] Chamouveau F, Coulon D, Girardin M, *et al*. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J Mol Catal B: Enzym*, 2001, **11**(4/6): 949–954.
- [19] Lima FV, Pyle DL, Asenjo JA. Factors affecting the esterification of lauric acid using an immobilized biocatalyst: enzyme characterization and studies in a well-mixed reactor. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **46**(1): 69–79.
- [20] Degn P, Zimmermann W. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **74**(6): 483–491.
- [21] Arcos JA, Bernabé M, Otero C. Quantitative enzymatic production of 6-O-acylglucose esters. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **57**(5): 505–509.
- [22] Gorman LAS, Dordick JS. Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **39**(4): 392–397.
- [23] Ferrer M, Cruces MA, Bernabé M, *et al*. Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **65**(1): 10–16.
- [24] Flores MV, Naraghi K, Engasser JM, *et al*. Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl 2-butanol. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **78**(7): 815–821.
- [25] Yu JG, Zhang JS, Zhao A, *et al*. Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp.. *Catal Commun*, 2008, **9**(6): 1369–1374.
- [26] Cao L, Bornscheuer UT, Schmid RD. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *J Mol Catal B: Enzym*, 1999, **6**(3): 279–285.