

超声辅助酶法合成魔芋葡甘聚糖油酸酯研究

马素换, 郭萍梅, 黄凤洪

(中国农业科学院 油料作物研究所, 油料油脂加工技术国家地方联合工程实验室, 油料脂质化学与营养
湖北省重点实验室, 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 武汉 430062)

摘要:研究了超声辅助酶法合成魔芋葡甘聚糖油酸酯的工艺条件。以酯化率为评价指标, 系统研究了超声频率、超声功率、反应温度、反应时间、反应介质初始水分活度、酶与底物浓度比对超声辅助酶法合成魔芋葡甘聚糖油酸酯的影响, 并在此基础上进行了 $L_{18}(3^7)$ 正交实验优化合成工艺。结果表明, 最佳工艺条件为: 超声频率 20 kHz, 超声功率 220 W, 反应温度 50 °C, 反应时间 8 h, 反应介质初始水分活度 0.65, 酶与底物浓度比 1:1。在最佳条件下酯化率达到 83.40%。与无超声辅助酶催化工艺相比, 反应时间 8 h, 酯化率由 9.48% 提高到 83.40%, 超声对提高酯化反应作用显著。

关键词: 超声辅助; 酶催化; 酯化; 魔芋葡甘聚糖油酸酯

中图分类号: TS229; TS218

文献标识码: A

文章编号: 1003 - 7969(2018)05 - 0066 - 05

Synthesis of konjac glucomannan oleate by ultrasound - assisted enzymatic method

MA Suhuan, GUO Pingmei, HUANG Fenghong

(Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Hubei Key Laboratory of Lipid Chemistry and Nutrition, Oil Crops and Lipids Process Technology National & Local Joint Engineering, Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

Abstract: The ultrasound - assisted enzymatic synthesis conditions of konjac glucomannan oleate were studied. With esterification rate as evaluation index, the effects of ultrasonic frequency, ultrasonic power, reaction temperature, reaction time, medium initial water activity and concentration ratio of enzyme to konjac glucomannan on ultrasound - assisted enzymatic synthesis of konjac glucomannan oleate were investigated. Then the synthesis conditions were optimized by $L_{18}(3^7)$ orthogonal experiment. The results showed that the optimal conditions were obtained as follows: ultrasonic frequency 20 kHz, ultrasonic power 220 W, reaction temperature 50 °C, reaction time 8 h, medium initial water activity 0.65 and concentration ratio of enzyme to konjac glucomannan 1:1. Under the optimal conditions, the esterification rate reached 83.40%, much higher than 9.48% of enzymatic process without ultrasound - assist at reaction time 8 h, so the effect of ultrasound on esterification was remarkable.

Key words: ultrasound - assist; enzymatic catalysis; esterification; konjac glucomannan oleate

魔芋葡甘聚糖(Konja glucomannan, 简称 KGM) 是由葡萄糖和甘露糖以 $\beta - 1,4$ 糖苷键结合而成的

一种多糖, 属于多羟基化合物^[1]。KGM 因脂溶性和稳定性差, 限制了其应用范围^[2]。研究发现, 对 KGM 上的羟基进行酯化修饰后不仅能提高 KGM 衍生物的稳定性, 而且可以改善其生物活性, 如抑菌、抗凝血等^[3-4]。油酸广泛存在于天然油脂资源中, 具有来源广、疏水性强的特点, 并具有降低胆固醇、预防动脉粥样硬化和冠心病等保健作用^[5]。采用酯化法将油酸与 KGM 糖苷上的一OH 进行耦合得

收稿日期: 2017 - 09 - 07

基金项目: 青年科学基金项目(31601515)

作者简介: 马素换(1989), 女, 硕士, 研究方向为粮食、油脂与植物蛋白工程(E-mail)962383174@qq.com。

通信作者: 郭萍梅, 副研究员(E-mail)guopingmei@caas.cn。

到 KGM 糖基油酸酯,不仅能改善产品的稳定性和亲水亲油性,而且有望发展成一类具有营养保健功效的食品乳化剂^[6]。

糖酯的合成方法有化学法和酶法,其中酶法具有反应条件温和、选择性高、绿色环保、操作简单等特点,可以选择性地酯化糖苷中某个特定的羟基^[7-8]。因此,酶法已成为近年来糖酯类乳化剂合成的主要技术途径。已有研究表明,超声辅助酶法催化法方法简单、反应时间短,而且可以显著提高反应效率^[9-11]。本实验将超声波辅助技术应用于酶法催化生产魔芋葡甘聚糖油酸酯中,系统探讨了超声功率、超声频率、反应温度、反应时间、反应介质初始水分活度、酶与底物浓度比对油酸与魔芋葡甘聚糖酯化反应的影响,为魔芋葡甘聚糖油酸酯的开发利用提供一些数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验方法

1.1.1 原料与试剂

魔芋葡甘聚糖(KGM)(食品级,纯度 $\geq 95\%$)、油酸、脂肪酶 Novozym435、4 Å 分子筛(使用前经高温活化)、0.1 mol/L HCl 标准溶液、75%乙醇溶液和无水乙醇、0.5 mol/L KOH 标准溶液、正己烷、环己烷、正丁醇、酚酞指示剂、叔丁醇、无水乙醇等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

XS205 万分之一电子天平:瑞士 Mettler Toledo 公司;DU800 型紫外分光光度计:德国 Beckman Coulter 公司;KQ-500DB 型数控超声波清洗器;纯水制备机:美国 Millipore 公司;SC-V 型多频率化学发生器;DF-101SZ 恒温加热磁力搅拌器;101-2AB 型电热鼓风干燥箱;TH2-C 型恒温振荡器;HD-3A 型智能水分活度测量仪。

1.2 实验方法

1.2.1 超声辅助酶法合成魔芋葡甘聚糖油酸酯^[12-13]

称取一定量 KGM 和油酸至烧杯中,加入有机溶剂叔丁醇在 45 °C 下预热 5 min,混合均匀,然后加入脂肪酶 Novozym435,开启超声处理器,在一定超声频率和超声功率下进行酯化反应,并测定酯化率。同时以酯化率为指标,对超声功率、超声频率、反应温度、反应时间、反应介质初始水分活度、酶与底物浓度比进行单因素实验,研究不同因素对酯化反应的影响,每次实验进行 3 次。在此基础上,采用正交实验优化确定魔芋葡甘聚糖油酸酯的最佳合成

条件。

1.2.2 酯化率的测定

酸值依据 GB 1668—2008 测定。按下式计算酯化率。

$$\text{酯化率} = \frac{AV_0 - AV}{AV_0} \times 100\%$$

式中: AV_0 、 AV 分别为酯化前后的酸值。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 超声功率对酯化反应的影响

当反应温度 45 °C、超声频率 20 kHz、反应时间 7 h,反应介质(叔丁醇)初始水分活度 0.72、酶与底物(KGM)浓度比 1:1 时,不同超声功率对酯化反应的影响如图 1 所示。

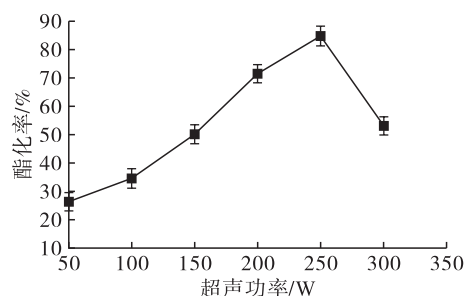


图 1 超声功率对酯化反应的影响

由图 1 可知,随超声功率增大酯化率呈现增加趋势,250 W 下的酯化率最高,达到 84.78%,然而酯化率的大小并不与超声功率大小成正比,当超声功率提高到 300 W 时,酯化率降到 53.09%,明显低于 250 W 时的酯化率。其原因可能是过大的超声功率,空化产生的冲击波破坏了酶分子使酶活力下降,进而影响酯化反应效率^[14]。因此,最佳超声功率为 250 W。

2.1.2 超声频率对酯化反应的影响

当反应温度 45 °C、超声功率 250 W、反应时间 7 h、反应介质初始水分活度 0.72、酶与底物浓度比 1:1 时,不同超声频率对酯化反应的影响如图 2 所示。

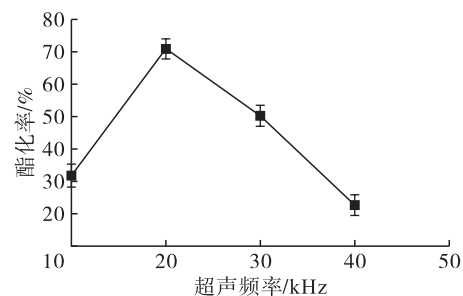


图 2 超声频率对酯化反应的影响

由图 2 可知,随着超声频率的增大,酯化率呈现

先增后降的趋势,当超声频率为 20 kHz 时,酯化率最高,达到 70.88%。超声频率超过 20 kHz 时,酯化率急剧降低,其原因可能是超声频率适当增加时,酶和反应底物碰撞机会增大,反应速率加快,当超声频率过大时导致酶分子构象改变^[15-16],实验中观察到反应溶液变浑浊,可能是因为酶从载体上脱落失活,进而影响酯化反应的进程。因此,选择 20 kHz 为最佳超声频率。

2.1.3 反应温度对酯化率的影响

当超声功率 250 W、超声频率 20 kHz、反应时间 7 h、反应介质初始水分活度 0.72、酶与底物浓度比 1:1 时,不同反应温度对酯化反应的影响如图 3 所示。

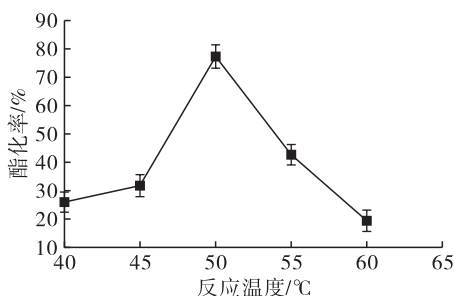


图 3 反应温度对酯化反应的影响

由图 3 可知,当反应温度为 50 °C 时,酯化率最高,达到 77.32%。从反应动力学角度讲,温度越高,反应速度越快,但当反应温度超过 50 °C 时,酯化率反而下降,反应温度升高到 60 °C 时,酯化率仅为 19.38%。原因可能是,过高的反应温度使酶活性降低^[17],从而影响了酯化反应。因此,最佳反应温度选取 50 °C。

2.1.4 反应时间对酯化率的影响

当超声功率 250 W、超声频率 20 kHz、反应温度 50 °C、反应介质初始水分活度 0.72、酶与底物浓度比 1:1 时,不同反应时间对酯化反应的影响如图 4 所示。

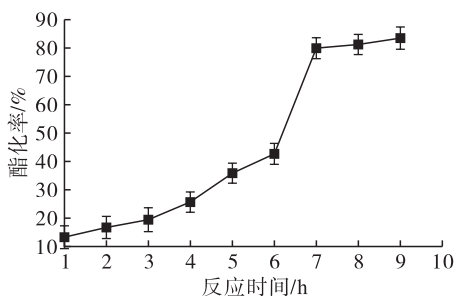


图 4 反应时间对酯化反应的影响

由图 4 可知,随着反应时间的延长,酯化率逐渐升高,反应时间超过 7 h 后,酯化率呈缓慢增加趋势,反应 9 h 时,酯化率仅从 7 h 的 79.92% 升高到

83.49%,考虑到能耗和成本等因素,选取超声反应时间为 7 h。

2.1.5 反应介质初始水分活度对酯化反应的影响

当超声功率 250 W、超声频率 20 kHz、反应温度 50 °C、反应时间 7 h、酶与底物浓度比 1:1 时,不同反应介质初始水分活度对酯化反应的影响如图 5 所示。

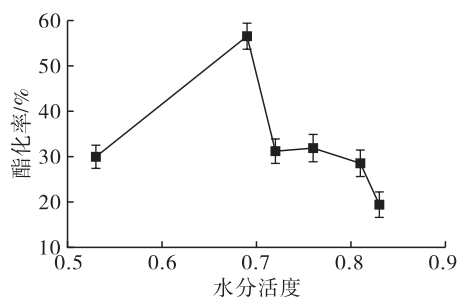


图 5 反应介质初始水分活度对酯化反应的影响

由图 5 可知,随反应介质初始水分活度增大,酯化率先增大后降低。反应介质初始水分活度为 0.69 时,酯化反应效果最好,酯化率最高。过高的水分活度,会造成酶的活性降低,从而影响反应效果。因此,反应介质初始水分活度选择 0.69。

2.1.6 酶与底物浓度比对酯化反应的影响

当超声功率 250 W、超声频率 20 kHz、反应温度 50 °C、反应时间 7 h、反应介质初始水分活度 0.69 时,不同酶与底物浓度比对酯化反应的影响如图 6 所示。

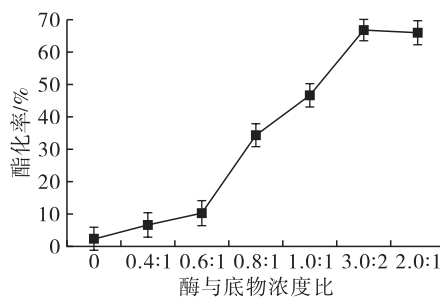


图 6 酶与底物浓度比对酯化反应的影响

由图 6 可知,酶催化对酯化反应影响显著,在相同的反应条件下,不添加酶,反应进行 7 h 时,酯化率仅为 2.39%,当酶与底物浓度比小于 3:2 时,随着酶与底物浓度比的增加,酯化率不断增加;继续增加酶与底物浓度比,酯化率增加趋于平稳。综合考虑酯化反应效果和酶的用量,选取酶与底物浓度比 3:2 为宜。

2.2 正交实验

根据单因素实验结果,采用正交实验对魔芋葡甘聚糖油酸酯的超声波酶促酯化工艺参数进行优化,实验设计及结果如表 1 所示。

表1 实验设计及结果

实验号	A 超声频率/kHz	B 超声功率/W	C 反应温度/℃	D 反应时间/h	E 反应介质初始水分活度	F 酶与底物浓度比	G 空白	酯化率/%
1	15	190	45	6	0.65	1:1	0	13.78
2	15	220	50	7	0.69	3:2	0	52.21
3	15	250	55	8	0.72	2:1	0	64.35
4	20	190	45	7	0.72	2:1	0	65.58
5	20	220	50	8	0.65	1:1	0	83.40
6	20	250	55	6	0.69	3:2	0	58.41
7	25	190	50	6	0.69	2:1	0	60.56
8	25	220	55	7	0.72	1:1	0	68.95
9	25	250	45	8	0.65	3:2	0	78.49
10	15	190	55	8	0.69	1:1	0	67.96
11	15	220	45	6	0.72	3:2	0	82.70
12	15	250	50	7	0.65	2:1	0	77.92
13	20	190	50	8	0.72	3:2	0	45.05
14	20	220	55	6	0.65	2:1	0	81.19
15	20	250	45	7	0.69	1:1	0	47.28
16	25	190	55	7	0.65	3:2	0	65.08
17	25	220	45	8	0.69	2:1	0	77.30
18	25	250	50	6	0.72	1:1	0	20.81
k_1	59.82	53.00	60.86	52.91	66.64	50.36		
k_2	63.49	74.29	56.66	62.84	60.62	63.66		
k_3	61.87	57.88	67.66	69.43	57.91	71.15		
R	3.66	21.29	11.00	16.52	8.74	20.79		

由表1可知,各因素对酯化率的影响程度为:超声功率>酶与底物浓度比>反应时间>反应温度>反应介质初始水分活度>超声频率。理论优化方案为 $A_2B_3C_3D_3E_1F_3$,但正交表中以方案5($A_2B_2C_2D_3E_1F_1$)酯化率最高。为了验证最佳条件参数,对理论最优方案和正交表方案5在同等实验条件下进行了比较,结果为正交方案5酯化率83.40%,高于理论最优方案酯化率80.28%。

在相同反应时间下,实验进行了超声辅助和无超声辅助对酯化反应影响的比较,结果如图7所示。

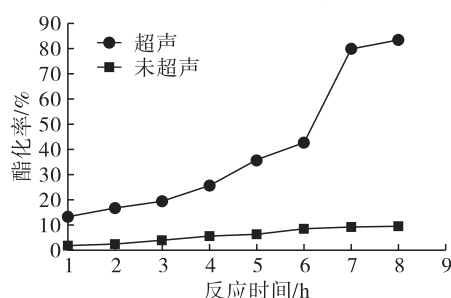


图7 超声与未超声实验对比

由图7可知,在反应时间8 h,超声辅助反应酯化率可达83.40%,而无超声辅助反应酯化率仅为9.48%,实验证明超声对提高酯化反应作用显著。

3 结论

超声技术是一种操作简单、成本低的技术,应用

超声技术可以改善酶促反应,既缩短了反应时间又增大了反应的转化率。通过本实验得出超声辅助酶法合成魔芋葡甘聚糖油酸酯的最佳反应条件为:超声频率20 kHz,超声功率220 W,反应温度50℃,反应时间8 h,反应介质初始水分活度0.65,酶与底物浓度比1:1。在最佳条件下酯化率为83.40%。与无超声辅助酶催化工艺相比,反应时间8 h,酯化率由9.48%提高到83.40%,超声对提高酯化反应作用显著。

参考文献:

- [1] 李斌,汪超. 国外魔芋葡甘聚糖结构及其溶液行为研究进展[J]. 包装与食品机械,2003,21(5):23-26.
- [2] ZHANG C, CHEN J D, YANG F Q. Konjac glucomannan, a promising polysaccharide for OCDDS [J]. Carbohydr Polym, 2014,104:175-181.
- [3] BO S, MUSCHIN T, KANAMOTO T, et al. Sulfation and biological activities of konjac glucomannan [J]. Carbohydr Polym, 2013,94: 899-903.
- [4] 赵培城,张晶晶,周绪霞,等. 魔芋葡甘露聚糖及其衍生物在食品工业中的应用[J]. 核农学报,2015,29(1): 101-105.
- [5] 毕艳兰. 油脂化学[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [6] 张灏,彭冬梅,王振虎,等. 油酸糖酯的酶法合成及表面

(下转第91页)

最佳条件为选用 IAC - AZ 型免疫亲和柱,柱吸附容量 4 μg ;乙腈 - 甲醇 - 水(体积比 46:46:8)为流动相,流速 1.0 mL/min;乙腈 - 水(体积比90:10)为提取溶剂。该方法在 0 ~ 250 ng/mL 的范围内呈良好的线性关系,检出限为 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$,精密度 RSD 为

0.942% ~ 1.758%,平均回收率为 92.46%。因此,该方法可以用于玉米油中 F-2 毒素的定量检测。

采用免疫亲和柱作为样品前处理方法,可以获得纯净的样品提取物,减少了有机溶剂乙腈的使用量,具有准确快速、方便重复使用等特点。

表 4 F-2 毒素的加标回收实验

实验号	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%
1	8.73	87.30	45.99	91.98	479.6	99.92
2	8.87	88.70	46.65	93.30	469.5	93.90
3	8.90	89.00	46.33	92.66	475.3	95.12
4	8.96	89.60	47.70	95.40	469.5	93.90
5	8.93	89.30	47.05	94.10	464.0	92.76
平均	8.88	88.80	46.74	93.49	471.58	95.12

参考文献:

- [1] 郑荣,毛丹,张道广,等. HPLC 法测定常用食品中玉米赤霉烯酮[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(11):2266 - 2267.
- [2] 裴娅晓,刘玉兰,许利丽,等. 碱炼脱除玉米油中玉米赤霉烯酮(ZEN)的研究[J]. 中国油脂,2016,41(5):56 - 60.
- [3] 隋凯,李军,卫锋,等. 免疫亲和柱 - 高效液相色谱法检测玉米中的玉米赤霉烯酮[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(6):657 - 658,690.
- [4] 吴文达,王宝杰,蔡兰芬,等. 薄层色谱和高效液相色谱联合检测玉米赤霉烯酮的方法研究[J]. 畜牧与兽医,2010,42(7):17 - 20.
- [5] 孟卫芹,武玉香,唐世云,等. 玉米油中玉米赤霉烯酮的 ELISA 测定[J]. 现代食品科技,2013(6):1431 - 1433.
- [6] 谢丹,邓春丽,赵云峰,等. 北京地区部分市售食用植物油中玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇的污染状况分析[J]. 食品安全质量检测学报,2016(5):2105 - 2113.
- [7] 罗小虎,包清彬,杨潇,等. 高效液相色谱法测定玉米赤霉烯酮的方法研究[J]. 食品科技,2010,35(1):266 - 270.
- [8] 尹青岗,王锋,周洪杰,等. 高效液相色谱法对玉米中玉米赤霉烯酮的测定[J]. 中国粮油学报,2009,24(7):138 - 141.
- [9] 刘苗,甘平胜,朱惠扬,等. 全自动固相萃取 - 气相色谱 - 三重四级杆质谱法检测蔬菜中 23 种农药残留[J]. 中国食品卫生杂志,2016(4):471 - 476.
- [10] 张继斌,汪咏曾,王昕,等. 免疫亲和柱同时净化 - HPLC 法测定高粱中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮[J]. 粮食科技与经济,2013,38(6):19 - 20.
- [11] 张宇. 脂肪酶催化猪油合成 L - 抗坏血酸脂肪酸酯性能测定[J]. 中国粮油学报,2013,28(9):109 - 113.
- [7] YANG Z, HUANG Z L. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids[J]. Catal Sci Technol, 2012(2):1767 - 1775.
- [8] GUMELA A M, ANNUAR M S M, HEIDELBERG T, et al. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters[J]. Process Biochem, 2011(46):2079 - 2090.
- [9] 彭杨,穆青,魏微,等. 超声辅助脂肪酶催化 L - 抗坏血酸脂肪酸酯的合成[J]. 食品科学,2011,32(12):101 - 105.
- [10] 黄振华,刘晨光. 酶催化的多糖酯化反应研究进展[J]. 食品科学,2011,32(21):283 - 289.
- [11] 张宇. 脂肪酶催化猪油合成 L - 抗坏血酸脂肪酸酯[J]. 南京:南京农业大学,2010.
- [12] 马素换,郭萍梅,黄凤洪. 魔芋葡甘聚糖及其油酸酯化物的体外抗氧化初步研究[J]. 中国油脂,2017,42(9):55 - 59.
- [13] 廖启金,李光吉,丁锐,等. 非水介质中酶催化葡甘聚糖的转酯化反应[J]. 天然产物研究与开发,2006(18):198 - 202.
- [14] 杨白靖,俞志刚. 超声辅助提取技术在天然产物提取中的应用[J]. 食品与机械,2011,27(1):170 - 174.
- [15] 徐小丽,曹雁平. 超声技术在食品工业中的研究进展[J]. 食品科技,2006,7(4):1 - 4.
- [16] 胡爱军,李立,郑捷,等. 超声波作用下棕榈油酯交换反应的研究[J]. 中国油脂,2015,40(2):36 - 40.

(上接第 69 页)