

有机介质中脂肪酶催化合成棉籽糖脂肪酸酯

唐天城, 李文霞, 刘军锋, 申晓林, 邓建琦, 邓 利

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要:为促进棉籽糖酯的规模化生产和高值化利用,以棉籽糖和脂肪酸为原料,通过脂肪酶催化合成棉籽糖脂肪酸酯,对酰基供体进行了选择,考察了脂肪酶种类、溶剂种类、加酶量、溶剂初始含水量、反应温度、溶剂用量对脂肪酶催化效率的影响,通过薄层色谱、超高效液相色谱-串联质谱和傅里叶红外光谱对产物进行分析鉴定,并对制备的棉籽糖月桂酸酯的亲水亲油平衡(HLB)值、乳化能力、乳化稳定性和抑菌活性进行测定。结果表明:选择月桂酸为酰基供体;脂肪酶催化合成棉籽糖月桂酸酯的最优工艺条件为棉籽糖与月桂酸物质的量比1:5、叔戊醇为反应溶剂、溶剂初始含水量2%,溶剂用量60 mL(基于0.5 g棉籽糖)、脂肪酶LS-20添加量40%(以底物总质量计)、反应温度40℃,在此条件下反应6 h,棉籽糖转化率可达45.12%;酶促合成的产物为3种不同取代位置的棉籽糖月桂酸单酯,乳化能力和乳化稳定性分别为78.77%和84.48%,HLB值为11.5,具有制备水包油型乳液的潜力;棉籽糖月桂酸酯较商用糖酯具有更好的抑菌效果。综上,所制备的棉籽糖月桂酸酯具有优异的乳化性能、乳化稳定性和抑菌活性,有规模化制备的潜力。

关键词:棉籽糖月桂酸酯;月桂酸;有机介质;非离子生物表面活性剂;抑菌活性

中图分类号:TS201.2;TQ423.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2025)09-0048-09

Synthesis of raffinose fatty acid esters by lipase catalysis in organic media

TANG Tiancheng, LI Wenxia, LIU Junfeng, SHEN Xiaolin,

DENG Jianqi, DENG Li

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract:To enhance the large-scale production and high-value application of raffinose fatty acid esters, raffinose fatty acid esters were synthesized by lipase catalysis from raffinose and fatty acids. Acyl donors were selected, and the effects of lipase types, solvent types, lipase dosage, initial water content of solvent, reaction temperature, and solvent dosage on lipase catalytic efficiency were studied. Thin layer chromatography, ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and Fourier-transform infrared spectroscopy were used to analyze and identify the products. In addition, the HLB value, emulsifying capacity, emulsion stability and antibacterial activity of the prepared raffinose laurate were determined. The results showed that lauric acid was selected as the acyl donor. The optimal process conditions for the lipase-catalyzed synthesis of raffinose laurate were obtained as follows: molar ratio of raffinose to lauric acid 1:5, *tert*-amyl alcohol as the reaction solvent, initial water content of solvent 2%, solvent dosage 60 mL (based on 0.5 g raffinose), LS-20 lipase dosage 40% and reaction temperature 40℃. Under these conditions, the reaction lasted for 6 h and the raffinose conversion rate reached 45.12%. The enzymatic synthesis products were three different positional isomers of raffinose monolaurate with emulsifying capacity and emulsion stability of 78.77% and 84.48%, respectively, and

an HLB value of 11.5, indicating the possibility of preparing oil-in-water emulsions. Raffinose laurate had superior antibacterial properties to commercial sugar esters. In conclusion, the produced raffinose laurate exhibits good emulsifying capacity,

收稿日期:2024-06-21;修回日期:2025-05-07

基金项目:广东省重点领域研发计划项目(2022B1111080003)

作者简介:唐天城(1998),男,在读博士,研究方向为酶催化(E-mail)tangtiancheng@buct.edu.cn。

通信作者:邓 利,教授,博士(E-mail)dengli@buct.edu.cn。

emulsion stability, and antibacterial activity, and it has the potential for large-scale production.

Key words: raffinose laurate; lauric acid; organic media; non-ionic biosurfactant; antibacterial activity

碳水化合物脂肪酸酯作为一种新型非离子生物表面活性剂,可以由碳水化合物和脂肪酸通过酯化反应合成^[1],其已广泛应用于食品、药品和化妆品等行业^[2-3]。通过改变脂肪酸的碳链长度和糖基上的羟基数量,可以在较宽的范围内调节碳水化合物脂肪酸酯的亲水亲油平衡(HLB)值^[4]。相较于化学催化法,酶法合成碳水化合物脂肪酸酯具有区域选择性高、反应条件温和、无毒物排放等优点^[5]。而非水介质^[6]如混合溶剂^[7]和离子液体^[8]可通过提高碳水化合物的溶解度来促进酶催化合成碳水化合物脂肪酸酯。因此,脂肪酶催化合成碳水化合物脂肪酸酯正受到越来越多的关注,并成为研究的热点^[9-10]。

研究表明,糖脂对微生物具有抑制作用^[11],且对革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌具有更高的抑制活性^[12]。一般来说,糖脂的抑菌活性取决于碳水化合物的性质,脂肪酸的数量、类型,以及酯化程度^[13]。目前,糖脂生产原料的研究主要集中在单糖和二糖,包括蔗糖^[14]、果糖^[15]、海藻糖^[16]等,而有关三糖的报道较少^[17],这可能是由于三糖具有更丰富的羟基,导致其在有机溶剂中的溶解度较低,难以选择合适的溶剂体系。棉籽糖是一种功能性三糖,由半乳糖、葡萄糖和果糖组成^[18]。Carvalho^[19]、Pérez-Victoria^[20]等探究了酶催化合成的棉籽糖单酯和松三糖单酯的溶解膜蛋白能力和溶血活性,在膜生物化学中具有一定的实用性。Li等^[17]使用不同碳链长度的脂肪酸乙烯基酯和棉籽糖合成了一系列6-O-酰基棉籽糖酯,分析了其表面活性剂特性,但并未涉及酶催化反应条件、过程参数和糖脂抑菌活性的研究。因此,本研究比较了不同脂肪酶、酰基供体和反应溶剂对棉籽糖脂肪酸酯合成的影响,并在此基础上考察了加酶量、溶剂初始含水量、反应温度、溶剂用量对脂肪酶催化效率的影响,进一步优化了棉籽糖脂肪酸酯的制备工艺。此外,还对以月桂酸为酰基供体合成的棉籽糖脂肪酸酯的HLB值、乳化能力、乳化稳定性和抑菌活性进行了测定,以期为后续棉籽糖酯规模化生产和高值化利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

棉籽糖,苏州天科公司;所有脂肪酸,天津富辰化学试剂厂;脂肪酶 Novozyme RMIM、Novozyme

TLIM、Novozyme 435,诺维信(中国)生物技术有限公司;脂肪酶 LS-20,北京凯泰生物技术有限公司;分子筛(4 Å)、叔丁醇等,北京化工公司;大豆油,食品级,益海嘉里金龙鱼食品集团股份有限公司;蔗糖酯,食品级,杭州金鹤来食品添加剂有限公司;Tween 80,分析纯,天机福晨化学试剂厂;Span 85,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;大肠杆菌(革兰氏阴性菌)和金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)由北京化工大学生命科学与技术学院微生物实验室提供;牛肉膏、蛋白胨和酵母粉均为生化试剂,OXID公司;其他试剂均为分析级或HPLC级。

FJ300-S 数显高速分散均质机,北京天创尚邦仪器设备有限公司;Varian 3100 傅里叶变换红外光谱仪,瓦里安公司;Xevo G2 QTof 超高效液相色谱四极杆飞行时间串联质谱,Waters公司。

1.2 实验方法

1.2.1 棉籽糖脂肪酸酯的合成

称取0.5 g棉籽糖于150 mL具塞磨口锥形瓶中,按棉籽糖与脂肪酸物质的量比1:5加入脂肪酸,量取一定体积的有机溶剂(一定的初始含水量)加入反应体系,70℃水浴磁力搅拌30 min使底物充分溶解。冷却至室温后,向反应体系中加入一定量的脂肪酶,并于一定温度的水浴恒温磁力搅拌反应一定时间。反应结束后加入等量甲醇,使脂肪酶失活,终止反应。

1.2.2 棉籽糖转化率的测定

通过蒸发光高效液相色谱法(HPLC-ELSD)对棉籽糖转化率进行测定。取1.2.1反应后的溶液(反应液),于8 000 r/min离心5 min,采用0.45 μm微孔滤膜过滤上清液后待测。色谱条件:反相C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,100 Å,Agela Technologies);蒸发光散射检测器(ELSD,Alltech 2000);流动相为甲醇,流速1.0 mL/min;漂移管温度60℃;载气流速1.6 L/min;上样量20 μL。通过脂肪酸标准曲线方程计算样品中脂肪酸含量,按照棉籽糖与脂肪酸消耗量为1:1的关系转化为棉籽糖的变化量,计算棉籽糖转化率。

1.2.3 棉籽糖月桂酸酯的分离纯化

将反应液高速离心,除去体系中的酶以及未溶解的底物后,60℃减压旋蒸浓缩除去反应溶剂,得到淡黄色固体。将20% NaCl溶液与正丁醇按照体

积比 1:1 混合均匀后,按照固液比 1:15 加入上述淡黄色固体进行萃取,取上层有机溶液,重复上述操作 2~3 次以除去体系中的棉籽糖。将上层有机溶液与饱和 Na_2CO_3 溶液按照体积比 1:1 进行混合,取上层有机溶液,重复上述操作 2~3 次以除去体系中的月桂酸。加入无水 Na_2SO_4 至不再产生块状沉淀,以除去体系中多余的水。60℃减压旋蒸除去溶剂得到棉籽糖月桂酸酯产品。

1.2.4 棉籽糖月桂酸酯的分析鉴定

1.2.4.1 薄层色谱法(TLC)

取反应液,通过 TLC 进行分析。用氯仿-乙酸乙酯-甲醇-乙酸(体积比 50:50:5:0.1)作为展开剂,其中痕量乙酸以防止拖尾。显色剂为磷钼酸-乙醇溶液(10 g 磷钼酸溶解于 100 mL 乙醇),于 110~120℃加热显色,蓝色斑块即为各个物质对应的条带。测定各条带的比移值(R_f ,斑点中心至点样原点的距离与溶剂前沿至点样原点距离的比值),通过比移值对各个条带产物进行定性分析。

1.2.4.2 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS)

用甲醇溶解棉籽糖月桂酸酯样品至质量浓度为 50~100 mg/L,待 UPLC-MS 测定。

UPLC-MS 条件:流动相为乙腈,流速 0.3 mL/min;Acquity C18 色谱柱(50 mm×2.1 mm,2.1 μm ,Waters);阴离子模式;ESI 质量扫描范围(m/z)500~1 200。

1.2.4.3 傅里叶红外光谱(FT-IR)分析

取 1~2 mg 1.2.4.1 分离得到的棉籽糖月桂酸酯样品,与 200 mg 左右溴化钾固体研磨混合均匀,研磨颗粒度小于 2 μm 以消除光的散射作用。利用压片机将混合固体粉末制成透明均匀的薄片,室温条件下用傅里叶红外光谱仪在 400~4 200 cm^{-1} 波段进行扫描分析。

1.2.5 棉籽糖月桂酸酯表面活性剂特性分析

1.2.5.1 HLB 值测定

根据 Yan 等^[21]的方法测定棉籽糖月桂酸酯的 HLB 值。将 Span 85 和 Tween 80 以不同比例混合,得到 HLB 值已知的混合物。然后将无水 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)与苯以体积比 100:5 混合得到混合溶剂。将 0.05 g 不同 HLB 值的标准品分别加入到 10 mL 混合溶剂中,并在室温下振荡,以水滴定至出现浑浊为终点,得到浊点滴定体积与 HLB 值的标准曲线方程。按上述方法以棉籽糖月桂酸酯代替标准品进行实验,由标准曲线方程计算其 HLB 值。

1.2.5.2 乳化能力及乳化稳定性测定

将棉籽糖月桂酸酯溶解于去离子水中,配制质量浓度为 0.2 mg/mL 的溶液。取 10 mL 棉籽糖

月桂酸酯溶液,加入 5 mL 大豆油,采用数显高速均质机在 13 500 r/min、25℃下均质 2.5 min,记录乳液的总高度(H_1)和乳液层的高度(H_2)。静置 45 min 后,以 1 100 r/min 离心,记录乳液总高度(H_3)和乳液层高度(H_4)。乳化能力(Y_1)和乳化稳定性(Y_2)分别按式(1)和式(2)计算。

$$Y_1 = H_2/H_1 \times 100\% \quad (1)$$

$$Y_2 = H_4/H_3 \times 100\% \quad (2)$$

1.2.6 棉籽糖月桂酸酯的抑菌实验

将棉籽糖月桂酸酯、蔗糖酯分别配制质量浓度为 2.0 g/L 的溶液,121℃灭菌 15 min。将细菌种子液稀释 10^6 倍后与糖脂溶液等体积混合,空白对照为等体积无菌去离子水与稀释后的细菌种子液混合。将上述混合液在 37℃下孵育 2~4 h。配制牛肉膏蛋白胨固体培养基并灭菌处理,倒板,待琼脂凝固后取 100 μL 上述糖脂与菌悬液的混合液进行平板涂布,37℃恒温培养 24 h,进行菌落计数。以上实验均在无菌条件下进行操作,同时每组设置 3~5 个平行实验,结果取平均值。

将质量浓度为 2.0 g/L 的棉籽糖月桂酸酯用无菌去离子水进行稀释,得到质量浓度分别为 0.8、1.2、1.6 g/L 的棉籽糖月桂酸酯溶液。按上述操作分别对不同质量浓度的棉籽糖月桂酸酯溶液进行抑菌实验。

2 结果与讨论

2.1 酰基供体的选择

棉籽糖的转化率往往会受到酰基供体碳链长度的影响,为进一步提高棉籽糖的转化率,采用脂肪酶 LS-20,在棉籽糖与脂肪酸物质的量比 1:5、叔戊醇为溶剂、溶剂用量 50 mL、溶剂初始含水量 2%、加酶量 40% (以底物总质量计)、反应温度 45℃条件下,研究了不同酰基供体(月桂酸、豆蔻酸和棕榈酸)对棉籽糖转化率的影响,结果如图 1 所示。

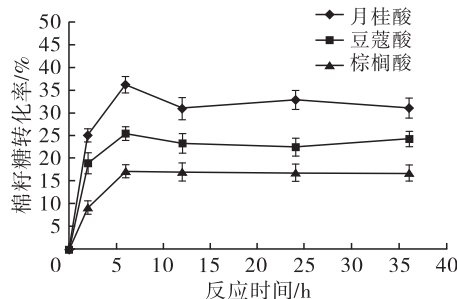


图 1 酰基供体碳链长度对棉籽糖转化率的影响

Fig. 1 Effect of carbon chain length of acyl donor on conversion of raffinose

由图 1 可知,尽管采用不同酰基供体棉籽糖转

化率随反应时间延长的变化是相似的,但是随着酰基供体碳链长度的增加,棉籽糖转化率不断降低。酶对不同碳链长度的脂肪酸催化活性的差异反映了酶结合位点的结构特性,从而导致底物特异性^[22]。当脂肪酸碳链长度增加时,其不正确的折叠方式会导致出现更多的空间冲突,从而阻碍产物的形成。因此,选择月桂酸为酰基供体。

2.2 棉籽糖月桂酸酯的合成工艺条件优化

2.2.1 脂肪酶种类对棉籽糖月桂酸酯合成的影响

许多具有区域选择性的脂肪酶/蛋白酶已被用作特定脂肪酸/糖产品的酶促合成中的关键生物催化剂^[23]。米黑根毛霉、南极假丝酵母、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、链霉菌、圆柱假丝酵母和粘性色杆菌等微生物是催化效率高的脂肪酶的主要来源^[24],金属蛋白酶如嗜热菌蛋白酶等在蔗糖、麦芽糖和含麦芽糖的低聚糖的酰化中也表现出区域选择性^[25]。因此,为了获得特定的产物,脂肪酶的选择是必要的。在棉籽糖与月桂酸物质的量比 1:5、叔戊醇为溶剂、溶剂初始含水量 2%、溶剂用量 50 mL、加酶量 40%、反应温度 40℃ 条件下,研究了脂肪酶种类对棉籽糖转化率的影响,结果如图 2 所示。

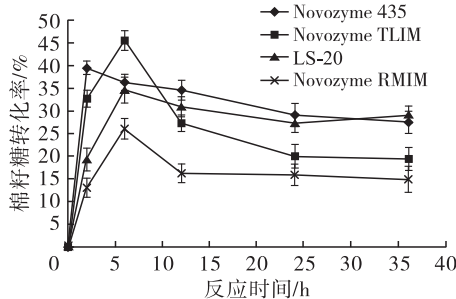


图 2 脂肪酶种类对棉籽糖转化率的影响
Fig. 2 Effect of lipase types on conversion rate of raffinose

由图 2 可知,采用 Novozyme 435、Novozyme TLIM、Novozyme RMIM 和 LS-20 4 种脂肪酶,棉籽糖转化率均随反应时间延长呈先升高后降低的变化趋势。Novozyme 435 在反应 2 h 时棉籽糖转化率(39.85%)达到最大;其他体系均在反应 6 h 时棉籽糖转化率达到最大,其中 Novozyme TLIM 的棉籽糖转化率最高,为 45.29%,但是反应 6 h 后其棉籽糖转化率迅速降低,表现出较强的水解反应效率。LS-20 在反应 6 h 时棉籽糖转化率(34.42%)达到最大,6 h 后其棉籽糖转化率缓慢降低并基本趋于平衡。综合脂肪酶催化棉籽糖酯化合成反应催化效率与经济成本等因素,在后续实验中选择 LS-20 作为催化用酶。

2.2.2 溶剂种类对棉籽糖月桂酸酯合成的影响

综合考虑溶剂的疏水性(log *P*)、棉籽糖在溶剂中的溶解性以及脂肪酶 LS-20 在溶剂中的水解酶活及酯化酶活,在预实验的基础上,以丙酮、甲苯、叔丁醇、叔戊醇、DMF、二甲基亚砜(DMSO)为溶剂,采用脂肪酶 LS-20,在棉籽糖与月桂酸物质的量比 1:5、溶剂初始含水量 2%、溶剂用量 50 mL、加酶量 40%、反应温度 40℃、反应时间 6 h 条件下,研究了溶剂种类对棉籽糖转化率的影响,结果如图 3 所示。

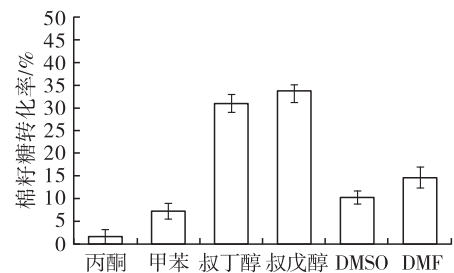


图 3 溶剂种类对棉籽糖转化率的影响
Fig. 3 Effect of solvent types on conversion rate of raffinose

由图 3 可知,叔戊醇中棉籽糖转化率显著高于其他溶剂。这是因为在叔戊醇中棉籽糖不仅具有良好的溶解性,脂肪酶还能保持良好的酯化活性。尽管溶剂 DMSO 和 DMF 中棉籽糖的溶解度优于其他几种溶剂,但是脂肪酶在这两种溶剂中的酯化酶活较差。因此,选择叔戊醇为反应体系的溶剂。

2.2.3 加酶量对棉籽糖月桂酸酯合成的影响

采用脂肪酶 LS-20,在棉籽糖与月桂酸物质的量比 1:5、叔戊醇为溶剂、溶剂初始含水量 2%、溶剂用量 50 mL、反应温度 40℃ 条件下,考察加酶量对棉籽糖转化率的影响,结果如图 4 所示。

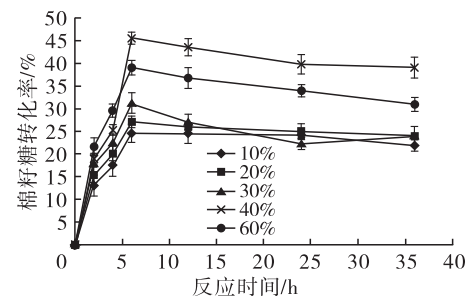


图 4 加酶量对棉籽糖转化率的影响
Fig. 4 Effect of lipase dosage on conversion rate of raffinose

由图 4 可知,随着加酶量的增加,2 h 内反应速率迅速增加,各个反应体系均在反应 6 h 时棉籽糖转化率达到最大,但是加酶量 40% 的体系棉籽糖转

化率高于加酶量 60% 的。加酶量 10% ~ 30% 的反应体系中棉籽糖转化率都保持在较低水平,并且差异不大。显然,更多的脂肪酶表现出丰富的活性位点和充分的底物可及性,因此棉籽糖的转化率更高。但脂肪酶用量过多会使体系黏度增加,导致底物向活性位点转移的效果较差^[26]。因此,选择加酶量为 40%。

2.2.4 溶剂初始含水量对棉籽糖月桂酸酯合成的影响

反应体系中加入适量的水可以提高脂肪酶的催化效率^[27]。采用脂肪酶 LS-20,在棉籽糖与脂肪酸物质的量比 1:5、叔戊醇为溶剂、溶剂用量 50 mL、加酶量 40%、反应温度 40℃ 条件下,考察溶剂初始含水量对棉籽糖转化率的影响,结果如图 5 所示。

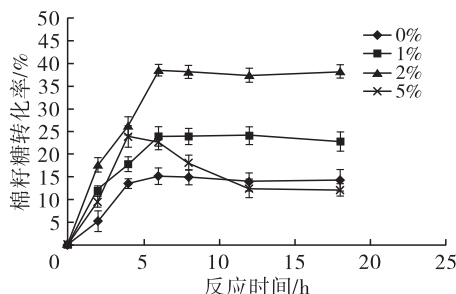


图 5 溶剂初始含水量对棉籽糖转化率的影响

Fig. 5 Effect of initial water content of solvent on conversion rate of raffinose

由图 5 可知:棉子糖转化率随着溶剂初始含水量的增加而增加,当溶剂初始含水量增加到 2% 时,棉子糖转化率最高;之后继续增加溶剂初始含水量会抑制酯化过程,使棉籽糖转化率降低。这可能是合适的含水量可以通过增加活性中心的灵活性来提高酶活性,而过量的水会导致酶活性中心的改变,使催化活性降低^[28]。因此,选择溶剂初始含水量为 2%。

2.2.5 反应温度对棉籽糖月桂酸酯合成的影响

温度是影响棉籽糖转化率的关键因素之一,脂肪酶的最适温度为 30 ~ 50℃^[29]。采用脂肪酶 LS-20,在棉籽糖与月桂酸物质的量比 1:5、叔戊醇为溶剂、溶剂初始含水量 2%、溶剂用量 50 mL、加酶量 40% 条件下,考察反应温度对棉籽糖转化率的影响,结果如图 6 所示。

由图 6 可知,在不同反应温度条件下,棉籽糖转化率随着反应时间的延长均先升高后降低。其中,反应温度 40℃、反应时间 6 h 条件下棉籽糖转化率最高,约为 43%。因此,选择反应温度为 40℃。

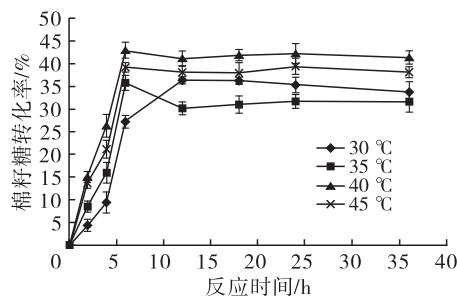


图 6 反应温度对棉籽糖转化率的影响

Fig. 6 Effect of temperature on conversion rate of raffinose

2.2.6 溶剂用量对棉籽糖月桂酸酯合成的影响

采用脂肪酶 LS-20,在棉籽糖与月桂酸物质的量比 1:5、叔戊醇为溶剂、溶剂初始含水量 2%、加酶量 40%、反应温度 40℃ 条件下,考察溶剂用量对棉籽糖转化率的影响,结果如图 7 所示。

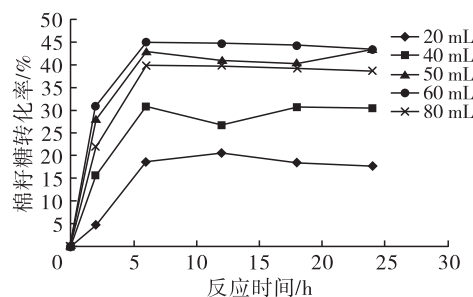


图 7 溶剂用量对棉籽糖转化率的影响

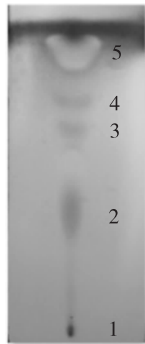
Fig. 7 Effect of solvent dosage on conversion rate of raffinose

由图 7 可知,在 20 ~ 80 mL 范围内,随着溶剂用量的增加棉籽糖转化率先升高后降低,溶剂用量为 50 ~ 60 mL 时,棉籽糖转化率变化较小。相比较而言,溶剂用量为 60 mL、反应 6 h 时,棉籽糖转化率最大,为 45.12%。这表明较低的溶剂用量使得棉籽糖的溶解量减少,不利于反应在有机相中的进行。相反,过多的溶剂用量使底物浓度较低,减少了底物与酶的有效接触,降低了反应效率。因此,选择溶剂用量为 60 mL。

综上,脂肪酶催化合成棉籽糖月桂酸酯的最优工艺条件为棉籽糖与月桂酸物质的量比 1:5、叔戊醇为反应溶剂、溶剂初始含水量 2%、溶剂用量 60 mL(基于 0.5 g 棉籽糖)、脂肪酶 LS-20 添加量 40%、反应温度 40℃,在此条件下反应 6 h,棉籽糖转化率可达 45.12%。

2.3 棉籽糖月桂酸酯的分析鉴定

棉籽糖月桂酸酯的 TLC、UPLC-MS 和 FT-IR 分析结果分别如图 8、图 9、图 10 所示。



注:1. 棉籽糖; 2. 棉籽糖月桂酸单酯 A1; 3. 棉籽糖月桂酸单酯 A2; 4. 棉籽糖月桂酸单酯 A3; 5. 月桂酸
Note:1. Raffinose; 2. Raffinose monolaurate A1; 3. Raffinose monolaurate A2; 4. Raffinose monolaurate A3; 5. Lauric acid

图 8 棉籽糖月桂酸酯的 TLC 结果
Fig. 8 TLC results of raffinose laurate

由图 8 可知,反应液中各组分(1~5)明显分离,Rf 值分别为 0.036、0.364、0.636、0.727、0.873,出现了 3 种产物(A1、A2、A3)。

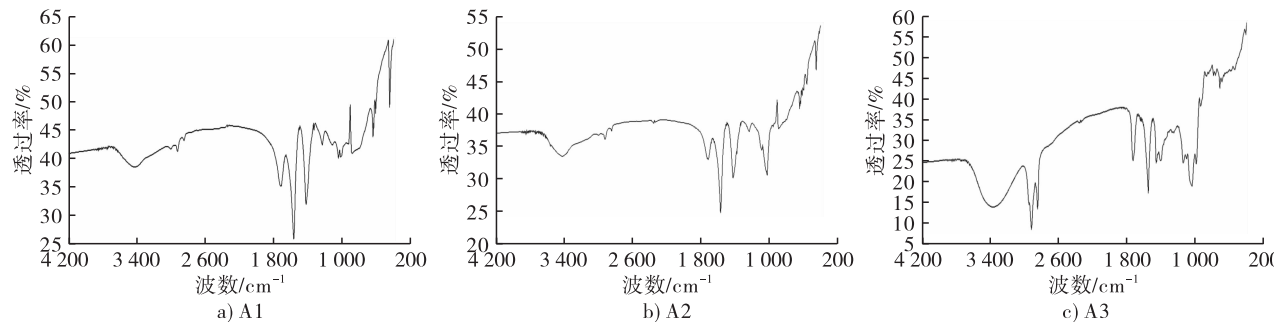


图 10 棉籽糖月桂酸酯的 FT-IR 结果
Fig. 10 FT-IR spectra of raffinose laurate

如图 10 所示,3 600 ~ 3 200 cm^{-1} 为棉籽糖上—OH 特征吸收峰,1 200 ~ 1 020 cm^{-1} 为 C—O—C 的特征吸收峰,1 870 ~ 1 650 cm^{-1} 为 C=O 特征吸收峰,说明 3 个条带均为酯化产物。

综上,体系中 3 个产物均为棉籽糖月桂酸单酯,为 3 种不同位置取代的同分异构体。

2.4 棉籽糖月桂酸酯的表面活性剂特性

2.4.1 HLB 值

经测定,制备的棉籽糖月桂酸酯的 HLB 值为 11.5,这表明该棉籽糖单酯为水包油型乳化剂,具有良好的水相分散能力,能形成稳定的乳液^[30]。

2.4.2 棉籽糖月桂酸酯的乳化能力及乳化稳定性

比较了棉籽糖月桂酸酯与市售表面活性剂蔗糖酯、Tween 80、Span 85 的乳化能力和乳化稳定性,结果如图 11 所示。

由图 11 可知,棉籽糖月桂酸酯的乳化能力和乳化稳定性分别为 78.77% 和 84.48%,与市售表面活

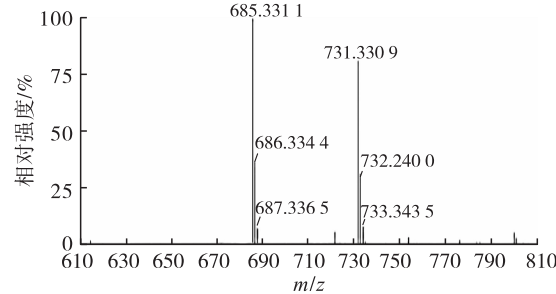


图 9 棉籽糖月桂酸酯的 UPLC-MS 结果
Fig. 9 UPLC-MS results of raffinose laurate

由图 9 可知,产物负离子化后得到 $[\text{R}-\text{COOH}]^-$ 的相对分子质量为 731.33。初步证实在脂肪酶 LS-20 催化的棉籽糖月桂酸酯合成反应中,生成了棉籽糖月桂酸单酯,并未检测到二酯、三酯等多酯化产物。虽然只形成单酯,但由于脂肪酶的立体选择性,可能会产生单酯的不同异构体。

性剂无显著差异,因此棉籽糖月桂酸酯具有潜在的应用前景。

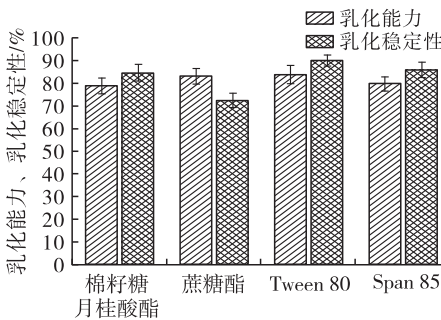
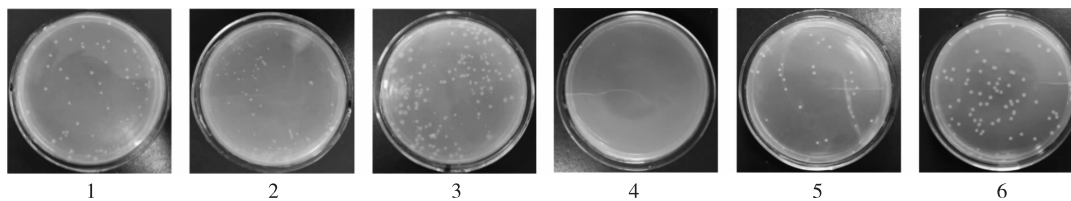


图 11 棉籽糖月桂酸酯的乳化能力和乳化稳定性
Fig. 11 Emulsifying capacity and emulsion stability of raffinose laurate

2.5 棉籽糖月桂酸酯的抑菌能力

为比较棉籽糖月桂酸酯与蔗糖酯的抑菌效果,对质量浓度为 2.0 g/L 样品溶液的抑菌活性进行了评估,结果如图 12 所示。



注:1. 大肠杆菌 - 棉籽糖月桂酸酯;2. 大肠杆菌 - 蔗糖酯;3. 大肠杆菌 - 对照;4. 金黄色葡萄球菌 - 棉籽糖月桂酸酯;5. 金黄色葡萄球菌 - 蔗糖酯;6. 金黄色葡萄球菌 - 对照

Note:1. *E. coli* - raffinose laurate; 2. *E. coli* - sucrose ester; 3. *E. coli* - control; 4. *S. aureus* - raffinose laurate; 5. *S. aureus* - sucrose ester; 6. *S. aureus* - control

图 12 棉籽糖月桂酸酯对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Fig. 12 Antibacterial activity of raffinose laurate against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

由图 12 可知,棉籽糖月桂酸酯对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有抑菌活性,特别是对金黄色葡萄球菌表现出更为优异的抑菌活性。这可能是棉籽糖月桂酸酯对革兰氏阳性菌细胞壁肽聚糖的影响大于对革兰氏阴性菌细胞壁脂质的影响。与蔗糖酯相比,棉籽糖月桂酸酯的抑菌活性更明显,它们之间抑

菌活性的差异可能是糖基结构的差异造成的。

由于棉籽糖月桂酸酯表现出优异的抑制金黄色葡萄球菌活性,因而研究了不同质量浓度棉籽糖月桂酸酯对金黄色葡萄球菌的抑菌效果,结果如图 13 所示。

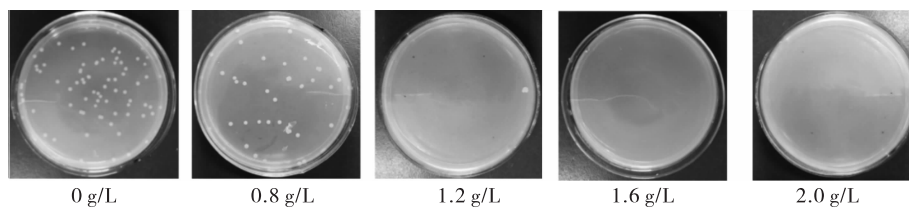


图 13 棉籽糖月桂酸酯质量浓度对金黄色葡萄球菌生长抑制的影响

Fig. 13 Effect of mass concentration of raffinose laurate on the inhibition of *Staphylococcus aureus* growth

由图 13 可知,随着棉籽糖月桂酸酯质量浓度的增加,其对金黄色葡萄球菌的抑菌效果显著提高,质量浓度为 1.2 g/L 时菌落数为 1,基本抑制了金黄色葡萄球菌的生长,质量浓度为 1.6、2.0 g/L 时均未见菌落生长,说明完全抑制了金黄色葡萄球菌的生长。综上,可以将 1.2 g/L 作为棉籽糖月桂酸酯对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度。与 Zhang 等^[31]通过脂肪酶催化棉籽糖与乙烯基酯合成的 6-O-酰基棉籽糖月桂酸酯的抑菌结果相比,通过棉籽糖和月桂酸直接酯化合成的棉籽糖月桂酸酯具有更低的抑菌浓度。这可能是由于该产品为 3 种不同位置取代的同分异构体的混合物,具有协同抑菌作用,但是这需要进一步研究讨论。

3 结 论

本研究以棉籽糖和月桂酸为底物,通过 LS-20 脂肪酶催化合成棉籽糖月桂酸酯,并优化了反应条件。通过 TLC、FT-IR 和 UPLC-MS 对产物进行了鉴定分析,并研究了产物的 HLB 值、乳化性能和抑菌活性。结果表明:棉籽糖与月桂酸物质的量比 1:5、叔戊醇为溶剂、溶剂初始含水量 2%、溶剂用量 60 mL(基于 0.5 g 棉籽糖)、LS-20 脂肪酶添加量

40%、反应温度 40 °C 条件下反应 6 h,棉籽糖月桂酸酯的转化率最高,为 45.12%;通过对产物的进一步分析鉴定,确定了通过酶法合成的棉籽糖月桂酸酯由 3 种棉籽糖月桂酸单酯组成,其 HLB 值为 11.5;此外,将产物与市售表面活性剂蔗糖酯进行比较发现,其不仅具有良好的乳化能力和乳化稳定性,且能够很好地抑制金黄色葡萄球菌的活性,最低抑菌浓度为 1.2 g/L。综上,通过优化酶法制备棉籽糖月桂酸酯的工艺条件使得其具有规模化生产的潜力,其作为一种具有良好乳化能力、乳化稳定性和抑制金黄色葡萄球菌活性的表面活性剂在药物应用方面具有潜在价值。

参考文献:

- [1] ARCENS D, GRAU E, GRELLIER S, et al. 6-O-glucose palmitate synthesis with lipase: Investigation of some key parameters[J]. *Mol Catal*, 2018, 460: 63-68.
- [2] NAYAK A, DUNNE J, KINSELLA M, et al. Development of a rapid quantitative method of analysis of carbohydrate fatty acid ester reaction mixtures using ¹H qNMR[J/OL]. *Carbohydr Res*, 2024, 540: 109143 [2024-06-21]. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109143>.
- [3] PÉREZ B, ANANKANBIL S, GUO Z. Chapter 10: Synthesis

- of sugar fatty acid esters and their industrial utilizations [M]// AHMAD M U. Fatty acids. Champaign, IL: AOCS Press, 2017: 329 – 354.
- [4] ZAGO E, JOLY N, CHAVERIAT L, et al. Enzymatic synthesis of amphiphilic carbohydrate esters: Influence of physicochemical and biochemical parameters [J/OL]. Biotechnol Rep, 2021, 30: e00631 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00631>.
- [5] MIRANDA F C, OLIVEIRA K S G C, TARDIOLI P W, et al. Enzymatic production of xylose esters using degummed soybean oil fatty acids following a hydroesterification strategy[J]. Process Biochem, 2024, 142: 104 – 112.
- [6] KUMAR A, DHAR K, KANWAR S S, et al. Lipase catalysis in organic solvents: Advantages and applications[J/OL]. Biol Proced Online, 2016, 18: 2 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0033-2>.
- [7] XIE M, QING C, YI J, et al. Enzymatic synthesis of stachyose – derived fatty acid mono – esters, the evaluation of their surface and interfacial properties and the capacity of certain derived emulsions to deliver resveratrol [J/OL]. Food Chem, 2025, 472: 142948 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.142948>.
- [8] SHIN D W, MAI N L, BAE S W, et al. Enhanced lipase – catalyzed synthesis of sugar fatty acid esters using supersaturated sugar solution in ionic liquids[J]. Enzyme Microb Technol, 2019, 126: 18 – 23.
- [9] EL – BAZ H A, ELAZZAZY A M, SALEH T S, et al. Enzymatic synthesis of glucose fatty acid esters using SCOs as acyl group – donors and their biological activities [J/OL]. Appl Sci, 2021, 11(6): 2700 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.3390/app11062700>.
- [10] HOLLENBACH R, OCHSENREITHER K, SYLDATK C. Enzymatic synthesis of glucose monodecanoate in a hydrophobic deep eutectic solvent[J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): E4342 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.3390/ijms21124342>.
- [11] PARK N, WALSH M K. Microbial inhibitory properties of maltodextrin fatty acid esters against food – related microorganisms[J/OL]. LWT – Food Sci Technol, 2021, 147: 111664 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111664>.
- [12] ZHAO L, ZHANG H, HAO T, et al. *In vitro* antibacterial activities and mechanism of sugar fatty acid esters against five food – related bacteria[J]. Food Chem, 2015, 187: 370 – 377.
- [13] WAGH A, SHEN S, SHEN F A, et al. Effect of lactose monolaurate on pathogenic and nonpathogenic bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(9): 3465 – 3468.
- [14] TENG Y, STEWART S G, HAI Y W, et al. Sucrose fatty acid esters: Synthesis, emulsifying capacities, biological activities and structure – property profiles[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(19): 3297 – 3317.
- [15] CABEZAS J T, CARRILLO – MONTES J P, WAGLAY A, et al. Combining the mechanical ball milling of the carbohydrate and the use of low solvent reaction media for the synthesis of fructose fatty acid esters by immobilized lipases[J]. N Biotechnol, 2022, 70: 93 – 101.
- [16] CHEN J Q, HAI Y W, QING C, et al. The synthesis of certain fatty acid ester derivatives of trehalose and an investigation of their emulsifying properties and bioactivities[J/OL]. LWT – Food Sci Technol, 2023, 187: 115369 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115369>.
- [17] LI X, HAI Y W, MA D, et al. Fatty acid ester surfactants derived from raffinose: Synthesis, characterization and structure – property profiles[J]. J Colloid Interface Sci, 2019, 556: 616 – 627.
- [18] LIJINA P, GNANESH KUMAR B S. Differentiating planteose and raffinose using negative ion mode mass spectrometry[J/OL]. Int J Mass Spectrom, 2023, 487: 117027 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2023.117027>.
- [19] CARVALHO L, MORALES J C, PÉREZ – VICTORIA J M, et al. Hemolytic activity and solubilizing capacity of raffinose and melezitose fatty acid monoesters prepared by enzymatic synthesis[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2015, 92: 139 – 145.
- [20] PÉREZ – VICTORIA I, PÉREZ – VICTORIA F J, ROLDÁN – VARGAS S, et al. Non – reducing trisaccharide fatty acid monoesters: Novel detergents in membrane biochemistry [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1808(3): 717 – 726.
- [21] YAN G, WANG S, LI Y, et al. Effect of emulsifier HLB on aerated emulsions: Stability, interfacial behavior, and aeration properties [J/OL]. J Food Eng, 2023, 351: 111505 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111505>.
- [22] BUZATU A R, SOLER M A, FORTUNA S, et al. Reactive natural deep eutectic solvents increase selectivity and efficiency of lipase catalyzed esterification of carbohydrate polyols[J/OL]. Catal Today, 2024, 426: 114373 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2023.114373>.
- [23] ZHU S, WANG S, CHEN S, et al. Lipase – catalyzed highly regioselective synthesis of acylated chlorogenic acid [J/OL]. Food Biosci, 2020, 37: 100706 [2024 – 06 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100706>.

