

酵母展示脂肪酶催化合成葡萄酒香料己酸丁酯

苏国栋¹ 张燕¹ 张少平²

(1.聊城大学生命科学学院,山东 聊城 252004;2.肇庆学院生命科学学院,广东 肇庆 526061)

摘要:以毕赤酵母展示的南极假丝酵母脂肪酶 B 为催化剂,己酸和丁醇为反应底物,合成葡萄酒用香料己酸丁酯。结果表明,酵母展示脂肪酶是合成己酸丁酯的良好催化剂,其最适催化工艺条件为:酸醇物质的量比为 1:1.2,催化剂展示脂肪酶用量为 2%,反应时间为 4 h,酯化率可达 97.2%。

关键词:酵母展示脂肪酶;葡萄酒香料;己酸丁酯

中图分类号:TS262.6;TS261.4;TS264.3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)10-0049-03

Catalytic Synthesis of Butyl Hexanoate by Using Lipase B Displayed on the Surface of *Candida Antarctica*

SU Guodong¹, ZHANG Yan¹ and ZHANG Shaoping²

(1.College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252004; 2.College of Life Science, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China)

Abstract: Lipase B displayed on the surface of *Candida antarctica* was used as catalyst with hexanoic acid and butyl alcohol as reaction substrate to synthesize butyl hexanoate. The experimental results suggested that yeast surface-displayed lipase was a good catalyst and the optimum technical conditions were summed up as follows: molar ratio of hexanoic acid to butyl alcohol was 1:1.2, the use level of catalyst was 2%, the reaction time was 4 h, and esterification rate reached up to about 97.2%.

Key words: yeast surface-displayed lipase; grape wine perfume; butyl hexanoate

己酸丁酯天然存在于酒类、干酪、番茄等柔软水果及橙汁、啤酒等中,具有葡萄酒似香气,其中伴有青香、蜡香,味觉上有甜菠萝蜜味、略带发酵过的水果风味。己酸丁酯作为食品用香料,主要用于葡萄酒中所含香精的配制^[1-2]。随着人们生活水平的不断提高,己酸丁酯作为葡萄酒的调香香料,不仅能提高产品的质量档次,赋予酒体自然感,而且更能适应消费者的口味,进而增强产品的市场竞争力。相关己酸丁酯的合成研究甚少,目前工业上常采用化学催化合成法^[3]如浓硫酸催化酯化反应,导致大量废液排放,严重污染环境,并且所得产品质量不理想,后处理繁琐。

近年来,通过生物酶法催化合成带芳香气味的短链酯已成为研究热点^[4-5]。酶法所产芳香气味的酯类在美国联邦法规中被认为是天然产物^[6],生物酶法合成己酸丁酯具有反应条件温和,固定化酶尤其是利用微生物细胞展示的酶具备不溶于有机溶剂、可重复多次使用、热稳定性高、副产物少、对环境友好等^[7]优点。已成功用于多种

短链脂肪酸酯的催化合成并取得了一定的成果^[8]。目前,利用细胞展示酶来催化合成己酸丁酯在国内外还未见相关研究报道。本实验根据脂肪酶在非水相中可催化合成短链芳香酯的特性,首次尝试以正己烷为溶剂,己酸和丁醇为底物,结合本实验室已构建酵母展示脂肪酶为催化剂,催化合成己酸丁酯,并初步对其催化合成的条件进行优化。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

展示 CALB 的毕赤酵母全细胞催化剂为本实验室自制,采用吸光光度法测定其酶活力为 210.7 U/(g-dry cell);己酸、正丁醇均为分析纯,购于国药集团;化学试剂正己烷(色谱纯)、对硝基苯酚丁酸酯(p-NPB)购于 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯,反应前先用分子筛除水。HZQ-Q 型恒温水浴振荡器,哈尔滨东联电子技术开发有限公司。

基金项目:聊城大学博士科研启动基金(31805)。

收稿日期:2012-06-06

作者简介:苏国栋,男,博士,讲师,研究方向:酶工程。

通讯作者:张少平。

优先数字出版时间:2012-08-02;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120802.1536.005.html>。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母展示脂肪酶催化剂的制备

将发酵液以 4 °C、6000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集细胞, 用 pH8.0、50 mmol/L 的磷酸缓冲液清洗 3 次并重悬, 真空冷冻干燥约 24 h。产品为微黄色、颗粒均匀的酵母菌体干粉。

1.2.2 CALB 酶活力的测定

采用吸光光度法测定脂肪酶活力^[9]。用 pH7.5、50 mmol/L 磷酸缓冲液配制浓度为 2 mmol/L 的 p NPB 作为酶反应的底物, 其中添加 0.5% 的 TritonX-100。在 0.5 mL 浓度为 2 mmol/L 的底物溶液中加入 0.5 mL 适当浓度的酶粉重悬液, 37 °C 下反应一定时间, 在 405 nm 处测定反应液的吸光值。每个样品均测定 3 个平行样, 以不添加酶粉作空白对照。酶活力定义: 1 min 内水解底物生成 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.2.3 酯化反应

在 50 mL 具塞三角瓶中加入一定量的正己烷, 分别加入己酸、正丁醇和一定量的酵母冻干粉, 在 45 °C、200 r/min 摇床中反应。当反应时间为 1 h 时, 分别加入 0.6 g 3A 分子筛, 并定时(1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h)取样测定底物酸的转化率。再以不同有机溶剂作为反应体系中的溶剂, 分别反应一定时间并测其酯化率。

1.2.4 底物转化率和反应效率的计算

反应一定时间后, 取出 150 μL 反应液置于 1.5 mL 离心管中, 4 °C、5000 r/min 离心 5 min, 取上清液 100 μL。酸值的测定按照 GB1668—81 方法进行, 酯化率计算: 酯化率 = (1 - 反应后的酸值) / 反应前的酸值 × 100 %。

2 结果与分析

2.1 催化剂用量对酯化率的影响

固定己酸的用量为 0.1 mol, 丁醇为 0.12 mol, 再加入 10 mL 正己烷作为反应溶剂, 改变展示脂肪酶的用量, 反应温度 45 °C, 反应 4 h, 其酯化率见图 1。

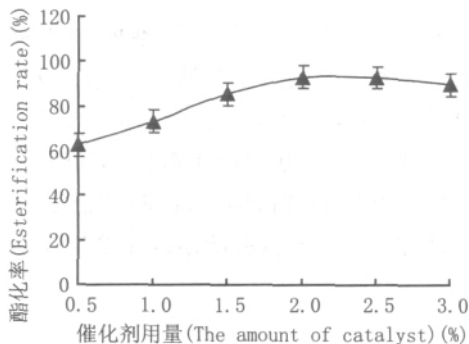


图 1 展示脂肪酶的用量对酯化率的影响

图 1 表明, 酵母展示脂肪酶对己酸和丁醇的酯化反

应有良好的催化活性。随着催化剂用量的增加, 酯化率不断提高, 2% 用量时, 酯化率为 93.2%。继续增加催化剂用量, 酯化率变化不大, 故最适催化剂用量为 2%。

2.2 反应底物对比对酯化率的影响

固定己酸的用量为 0.1 mol, 丁醇过量, 催化剂量为 2%, 正己烷 10 mL, 反应 4 h, 反应温度 45 °C, 考察不同反应物对比对酯化率的影响, 结果见表 1。

表 1 反应底物的对比对酯化率的影响

项目	n(己酸) : n(丁醇)				
	1 : 1	1 : 1.1	1 : 1.2	1 : 1.3	1 : 1.4
酯化率 (%)	89.6	93.6	97.2	93.3	90
溶液颜色	棕红色	红色	微黄色	红色	棕色

表 1 表明, 丁醇用量对反应的酯化率有较大的影响。增加丁醇用量时, 酯化率随之提高。当反应物配比为 1 : 1.2 时, 酯化率可达 97.2% ; 继续增加丁醇用量, 酯化率有所降低, 故最适酸醇物质的量比为 1 : 1.2。

2.3 反应时间对酯化率的影响

固定己酸的用量为 0.1 mol, 丁醇为 0.12 mol, 酵母展示脂肪酶用量为 2%, 有机溶剂为正己烷, 反应温度 45 °C, 测定不同反应时间的酯化率, 结果见图 2。

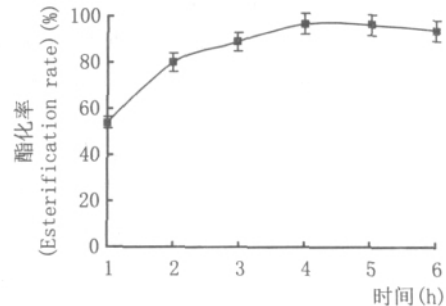


图 2 反应时间对酯化率的影响

由图 2 可知, 随着反应时间的延长, 酯化率逐渐提高。当反应时间达到 4 h, 再增加反应时间对酯化率无太大影响, 因此最佳反应时间为 4 h。

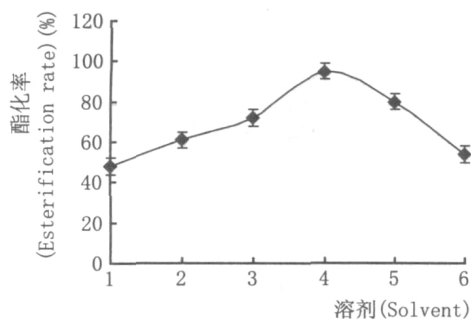
2.4 有机溶剂对酯化率的影响

固定己酸的用量为 0.1 mol, 丁醇为 0.12 mol, 酵母展示脂肪酶用量为 2%, 反应温度 45 °C, 反应时间为 4 h; 分别以正丙烷、正丁烷、正戊烷、正己烷、正庚烷及环己烷为溶剂, 测定酯化率, 结果见图 3。

由图 3 可知, 不同的有机溶剂随着碳链加长, 其酯化率逐渐提高, 以正己烷的效果最佳, 再增加碳链长度或者改变其形态后会降低其酯化率。因此, 最佳反应有机溶剂为正己烷。

3 结论

酵母展示脂肪酶催化合成己酸丁酯, 其催化活性良



1.正丙烷;2.正丁烷;3.正戊烷;4.正己烷;5.正庚烷;6.环己烷

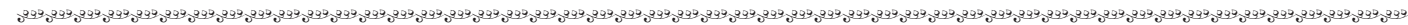
图3 不同有机溶剂对酯化率的影响

好、反应时间短、酯化率高、后处理简单、对环境无污染,因而具有较高的工业应用价值。适宜的工艺条件为:酸醇的量比为 1:1.2, 催化剂用量 2%, 有机溶剂为正己烷 10 mL, 反应时间 4 h, 在此条件下酯化率最高可达 97.2%。

参考文献:

[1] 孙宝国,刘玉平.食用香料手册[M].北京:中国石化出版社,2004:281-282.
 [2] 张福捐,张建立,盛淑玲.葡萄酒香料己酸丁酯的催化合成[J].酿酒科技,2007(6):24-25.

[3] 张富捐,张翔宇,盛淑玲.钨硅杂多酸催化合成丁酸异丁酯的研究[J].食品科技,2004(2):61-62.
 [4] 潘志友,韩双艳,林影,郑穗平.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[J].生物工程学报,2008,24(4):673-678.
 [5] Su GD, Huang DF, Han SY et al. Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis, [J]. Appl Microbiol and Biotechnol, 2010, 86(5): 1493-1501.
 [6] 牛梅菊,赵文献.己酸正丁酯合成的改进[J].聊城师院学报:自然科学版,1999,12(1):45-47.
 [7] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display[J].Appl Microbiol and Biotechnol, 2004, 64: 28-40.
 [8] 金子,林影,黄登峰,苏国栋,韩双艳.展示南极假丝酵母脂肪酶 B 的毕赤酵母全细胞催化合成短链芳香酯[J].生物工程学报,2009,25(12):1927-1932.
 [9] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D. Extracellular lipase of *Pseudomonas sp.* strain ATCC 21808: purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data[J].Bacteriol, 1991,173(15):4836-4841.



(上接第 48 页)

参考文献:

[1] 赖登燊.入窖七因素的变化规律及相互关系的研究(一):入窖温度[J].酿酒科技,2010(11):30-32.
 [2] 蒲岚,李璐,谢善慈,等.浓香型白酒窖池中糟醅微生物的变化趋势研究[J].酿酒科技,2011(1):17-19.
 [3] 张超,蒲岚,李璐,等.浓香型白酒控温发酵下糟醅典型微生物的变化趋势[J].食品与发酵工业,2011(7):22-25.
 [4] 蒲岚,李璐,邱树毅,等.浓香型白酒发酵温度调控对主要香味成分生成的影响研究[J].食品与发酵工业,2011(9):126-129.
 [5] 周庆伍.白酒固态发酵温度变化与产、质量关系的研究[J].酿酒,2008(11):62-64.
 [6] 张良,蒙兆强,李灵彦,等.温度与白酒酿造函数关系之浅析[J].酿酒科技,2008(3):48-50.
 [7] 陈泽军,陈云宗,周瑞平,等.多粮浓酱兼香型白酒生产方法:ZL200910059543.X[P].2012-03-21.
 [8] 赖登燊,梁诚.入窖七因素的变化规律及相互关系的研究(二):入窖温度[J].酿酒科技,2011(1):33-36.
 [9] 罗惠波,黄治国,李浩.浓香型大曲微生物群落代谢多样性研究[J].西南大学学报:自然科学版,2009(7):180-184.
 [10] 唐现洪.高温堆积发酵工艺在浓香型双沟大曲酒生产中的应用[J].酿酒科技,2006(8):59-62.

贵州习酒成为本届中国-东盟博览会唯一指定白酒

本刊讯:中国自古有以酒会友、酒宴宾客的传统,中国-东盟博览会作为中国与东盟合作平台,承载着加强中国与东盟礼仪文化交流的使命。据悉,2012年9月12日,中国-东盟博览会秘书处举行新闻发布会,宣布贵州茅台酒厂(集团)习酒有限责任公司荣膺中国-东盟博览会战略合作伙伴,贵州习酒成为本届博览会唯一指定白酒。中国-东盟博览会秘书处副秘书长王雷表示,2012是中国-东盟友好合作年,博览会指定的白酒,将作为推进中国和东盟互通的重要文化使者,助力第九届中国-东盟博览会。(小小)