

文章编号 :1009-038X(2000)02-0157-03

催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的反应媒体和脂肪酶^①

汤鲁宏, 张浩

(无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要 :对水、庚烷和叔戊醇等几种反应媒体和 NOVO435(*Candida antarctica*), MML(*Mucor miehei*), LIPOLASE, PPL(*Porcine pancreas*)等数种脂肪酶对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应的影响进行了系统的研究. 结果表明,反应媒体及脂肪酶品种对反应影响极大. 所研究的几种反应媒体中,叔戊醇是唯一适用于该反应的反应媒体. 在所研究的几种脂肪酶中,NOVO 435 表现出了良好的催化活性;MML 也有一定活性,但不如 NOVO 435,其相对活力只有 NOVO 435 的 20%,其余酶种则无催化活性.

关键词 :L-抗坏血酸棕榈酸酯;反应媒体;脂肪酶

中图分类号 :O643.32 文献标识码 :A

Selection of Suitable Reaction Media and Lipase : Synthesize of L-ascorbyl Palmitate Catalyzed by Lipase

TANG Lu-hong, ZHANG Hao

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract :The influences of reaction media including water, heptane and 2-methyl-2-butanol as well as the kinds of lipase such as NOVO435, MML, LIPOLASE, PPL on the synthesize of L-ascorbyl palmitate catalyzed by lipase has been investigated in detail. It is indicated that the kind of reaction media as well as lipase can influence such reaction significantly. As the conclusion, 2-methyl-2-butanol is the only suitable reaction media among the media investigated in this paper. NOVO 435 is the best one fitting for the reaction among the lipases investigated in this paper.

Key words :L-ascorbyl palmitate; reaction media; lipase

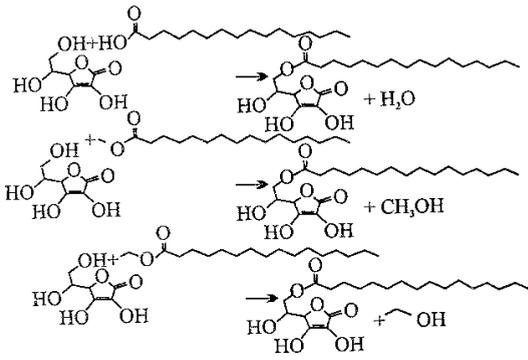
L-抗坏血酸棕榈酸酯现已被广泛地用作酯溶性抗氧化剂及营养强化剂添加在油脂或食品中^[1,2],这是由它独特的功能决定的. 首先, L-抗坏血酸棕榈酸酯与 L-抗坏血酸相比,抗氧化性有了显著的提高^[3];其次,由于棕榈酸基的植入,使得它既

有亲水的抗坏血酸基,又有亲油的棕榈酸基,从而成为一种优良的表面活性剂^[4,5];此外,它还具有极强的抗癌和抗肿瘤功效. Kageyama K 等^[6]发现它能强烈地抑制 Ehrlich ascites 癌细胞的 DNA 合成,并分解癌细胞的细胞膜磷脂,是极好的抗癌物质.

① 收稿日期 :1999-06-10;修订日期 :1999-11-29.

作者简介 :汤鲁宏(1960年1月生),男,江苏南京人,工学博士,副教授.
万方数据

可以预测, L-抗坏血酸棕榈酸酯必将作为一种新兴的重要的多功能添加剂活跃在食品、化妆品和医疗保健品等各个领域。目前市售的 L-抗坏血酸棕榈酸酯全部由化学合成制得,有关合成工艺相当成熟。它利用棕榈酸酰氯^[7]、棕榈酸或棕榈酸酯^[8]与抗坏血酸在浓硫酸等催化剂的作用下合成。化学合成的致命缺陷是显而易见的,不仅存在化学催化剂带来的有毒物质,而且高温、高压条件下很容易有副反应,产生有毒副作用的产物和非自然的异构体。同时还有能耗高、对设备和仪器要求高、对环境污染极为严重等问题。而酶法合成可以避免这些缺陷,它用棕榈酸或棕榈酸酯与抗坏血酸在脂肪酶(lipase, EC3.1.1.3)的催化下合成。近年来,国外已对酶法合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯作了有益的探索^[9],反应方程式分别如下:



酶法合成与化学合成相比有无可比拟的优点:第一,反应条件温和,勿需高温、高压;第二,催化反应特异性强,不易产生副产物;第三,生物催化的产品质量高,可以避免化学催化中产生的对人类和人类生存环境有害的物质;第四,产物易于分离提纯^[10]。

作者对水相、庚烷相、叔戊醇相和无溶剂体系这4种不同的反应媒体中的数种脂肪酶的活力进行了系统的研究。从理论上说,脂肪酶都可以催化此反应,但由于专一性不同,并非所有的脂肪酶都适合催化此反应。而且,有的脂肪酶适合在有机相或无溶剂体系中催化醇解或酸解反应,而有的脂肪酶在酯化反应中活性很高。因此,选择合适的脂肪酶及反应媒体是研究的关键。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 恒温振荡水浴槽,754 分光光度计。

1.1.2 试剂 NOVO435(*Candida antarctica*) Novo Nordisk 公司产品;MML(*Mucor miehei*) Novo Nordisk 公司产品;LIPOLASE Novo Nordisk 公

司产品;PPL(*Porcine pancreas*) Sigma 公司产品;其余化学试剂均为国产化学纯级试剂,上海试剂采购供应站提供,试剂使用前均用 3A 的分子筛除去水分。

1.2 实验方法

在 100 mL 具塞三角瓶中,分别加入 0.34 mol/L 棕榈酸或棕榈酸酯与含 0.4 g 抗坏血酸的 20 mL 水、叔戊醇、庚烷或无溶剂组成的反应体系,再加入 0.4 g 脂肪酶,40 °C 下于 200 r/min 旋转振荡,72 h 后取样检测。产物质量浓度测定采用硅钼兰分光光度测定法^[11]。

2 结果与讨论

实验结果见表 1。

表 1 脂肪酶催化反应结果

Tab.1 Results of the reactions catalyzed by lipase

底物	反应媒体	产物质量浓度/(g/L)			
		NOVO435	MML	LIPOLASE	PPL
棕榈酸	水	0	0	0	0
棕榈酸	庚烷	0	0	0	0
棕榈酸	叔戊醇	11.8	2.0	0	0
棕榈酸甲酯	水	0	0	0	0
棕榈酸甲酯	庚烷	0	0	0	0
棕榈酸甲酯	叔戊醇	12.5	2.6	0	0
棕榈酸甲酯	无溶剂	0	0	0	0
棕榈酸乙酯	水	0	0	0	0
棕榈酸乙酯	庚烷	0	0	0	0
棕榈酸乙酯	叔戊醇	10.4	1.6	0	0
棕榈酸乙酯	无溶剂	0	0	0	0

由表 1 可看出,LIPOLASE 和 PPL 在 4 种反应媒体下均不能催化此反应,说明 LIPOLASE 和 PPL 不存在催化此反应的功能;NOVO435 催化此反应的活性最好,在叔戊醇相中,以棕榈酸甲酯为底物,催化合成所得到的 L-抗坏血酸棕榈酸酯的最高质量浓度可达 12.5 g/L, MML 次之,但酶活比 NOVO435 弱得多,72 h 后的最高产物质量浓度只有 2.6 g/L。这是因为 MML 催化此反应的速度相当的慢,反应 72 h 远未达到平衡。NOVO435 和 MML 在水相中不能催化此反应,这是因为在水相中不利于反应向生成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的方向进行。当底物为棕榈酸时,反应为合成反应,水作为反应介质大量存在,根据热力学平衡原则,会强烈推动反应

向反方向进行.同时由于 $K_{eq1} = [L\text{-抗坏血酸棕榈酸酯}][\text{水}] / [L\text{-抗坏血酸}][\text{棕榈酸}]$,而棕榈酸质量浓度极低,因此抗坏血酸棕榈酸酯的质量浓度接近 0.当底物为棕榈酸酯时,反应为酯交换反应,相当于两步反应,即首先是棕榈酸酯的水解反应,然后是棕榈酸与 L-抗坏血酸的合成反应.同样由于水为反应介质,适合水解反应,使合成反应极为困难.而且 $K_{eq2} = [L\text{-抗坏血酸棕榈酸酯}][\text{甲醇}] / [L\text{-抗坏血酸}][\text{棕榈酸甲酯}]$, $K_{eq3} = [L\text{-抗坏血酸棕榈酸酯}][\text{乙醇}] / [L\text{-抗坏血酸}][\text{棕榈酸乙酯}]$,同样由于棕榈酸酯质量浓度极低,得到的 L-抗坏血酸棕榈酸酯的质量浓度亦低至接近 0.

从表 1 亦可知 NOVO435、MML 在庚烷相、无溶剂体系中不能催化此反应,确切地说,NOVO435、MML 在这两种媒体中催化合成的 L-抗坏血酸棕榈酸酯低至检测不出.当底物为棕榈酸时,由于 $K_{eq1} = [L\text{-抗坏血酸棕榈酸酯}][\text{水}] / [L\text{-抗坏血酸}][\text{棕榈酸}]$,反应介质为庚烷,而庚烷是一非极性极强的有机溶剂,L-抗坏血酸的溶解度极低,故平衡时,L-抗坏血酸棕榈酸酯的质量浓度极低.当底物为棕榈酸酯时, $K_{eq2} = [L\text{-抗坏血酸棕榈酸酯}][\text{甲醇}] / [L\text{-抗坏血酸}][\text{棕榈酸酯}]$, $K_{eq3} = [L\text{-抗坏血酸棕榈酸酯}][\text{乙醇}] / [L\text{-抗坏血酸}][\text{棕榈酸乙酯}]$,同样由于棕榈酸酯质量浓度极低,得到的 L-抗坏血酸棕榈酸酯的质量浓度亦低至接近 0.

酯][乙醇][L-抗坏血酸][棕榈酸乙酯],反应介质为庚烷或无溶剂体系,同样 L-抗坏血酸的溶解度极低,故平衡时,L-抗坏血酸棕榈酸酯的质量浓度亦极低.

可见,此反应与一般的有机相催化反应亦有所区别,它对溶剂要求苛刻,需选择亲水性较强的溶剂,即极性较大,对抗坏血酸有较大的溶解性,以确保得到的产物质量浓度较高,同时此溶剂极性又不能过强,否则容易造成酶的失活.这是一个极为棘手的问题,需仔细地筛选溶剂.

3 结 语

作者对催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的反应媒体和脂肪酶进行了初步的研究,找出了适用的反应媒体——叔戊醇相及最适合催化此反应的脂肪酶——NOVO435.研究中所采用的各种脂肪酶在催化本反应的活性方面表现出了极大的差异,其机理仍有待深入探讨.叔戊醇是否是适用于本反应的唯一反应媒体,也仍是一个有待进一步深入调查的问题.

致谢:衷心感谢 NOVO 公司北京办事处余萍小姐和谭小姐提供酶样品.

参考文献

- [1] NIPPO ROCHE K K. Antioxidant activity of ascorbic acid and ascorbyl palmitate[J]. *New Food Ind*, 1991, 33(6): 6~13
- [2] 凌关庭,王亦芸,唐述潮.食品添加手册(上、下册)[M].北京:化学工业出版社,1989.
- [3] LIU X Y, GUO F L, WU L M. Remarkable enhancement of antioxidant activity of vitamin C in an artificial bilayer by making it lipophilic[J]. *Chem Phys Lipids*, 1996, 83(1): 39~43
- [4] SCHWEIKERT LONI, JONOS C T. Use of fatty acid of ascorbic acid as emulsifier for preparation of stable, fluid preparations of fat-soluble substances[P]. 德国专利:DE 4200728, 1993-07-15.
- [5] MAGUIRE JOHN, LIN JUE CHEN, YAMAMOTO NORIHIRO, et al. Edible water in oil emulsion[P]. 英国专利:GB 2280449, 1995-02-01.
- [6] KAGEYAMA K, ONOYAMA Y, KIMURA M, et al. Enhanced inhibition of DNA and release of membrane phosphor-lipids in tumor cells treated with a combination of acylated ascorbate and hyperthermia[J]. *Int J Hyperthermia*, 1991, 7(1): 85~91
- [7] 陆豫,甘利军,陈葆仁. L-抗坏血酸棕榈酸的合成[J]. *精细化工*, 1996, 13(3): 17~18
- [8] KAYMOND C COUSINS. Synthesis of 6-fatty acid ester L-ascorbic acid[J]. *JAACS*, 1977, 54(8): 308~312
- [9] HUMEAU, GIRARDIN, COULON. Synthesis of 6-O-palmitoyl L-ascorbic acid catalyzed by candida antica lipase[J]. *Bio-technology Letters*, 1995, 17(10): 1091~1094
- [10] 徐岩.溶剂相中微生物脂肪酶催化合成脂肪酸酯的研究[D].无锡:无锡轻工大学,1997.
- [11] 汤鲁宏,张浩.硅钼兰分光光度法测定微量 L-抗坏血酸棕榈酸酯[J]. *食品科学*, 1999(11): 54~57

(责任编辑:李春丽)