

## 生物法合成维生素 C 棕榈酸酯

# Biological Synthesis of *L*-ascorbyl Palmitate

徐凤杰, 谭天伟\*

XU Feng-Jie and TAN Tian-Wei\*

北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029

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

**摘 要** 研究了不同的脂肪酶在有机溶剂体系中催化合成 *L*-维生素 C 棕榈酸酯的反应。针对维生素 C 在有机溶剂中溶解度较低这一问题,对催化合成维生素 C 棕榈酸酯反应的脂肪酶和反应介质进行比较,同时对影响合成维生素 C 棕榈酸酯反应的因素(温度、底物浓度、底物摩尔比、反应时间和酶量等)进行探讨,优化了反应条件。在 10mL 的丙酮中,1.094g 棕榈酸与 0.107g 维生素 C 在酶量为 20%(W/W),固定化酶/维生素 C 的固定化脂肪酶催化下,初始含 0.4nm 分子筛 20%,温度为 60℃,转速为 200r/min,反应 48h 转化率可以达到 80%,产物维生素 C 棕榈酸酯的浓度可达 20g/L。

**关键词** *L*-维生素 C 棕榈酸酯,脂肪酶,Novo 435,丙酮,合成

中图分类号 Q564 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)06-0988-05

**Abstract** Biological synthesis of *L*-Ascorbyl Palmitate in organic system were studied in this text. The contradiction between conversion of vitamin C and concentration of *L*-Ascorbyl Palmitate were resolved. High conversion of vitamin C and concentration of *L*-Ascorbyl Palmitate were obtained by Novo435. A series of solvents(log P from -0.24 to 3.5) were investigated for the reaction and acetone was found to be the most suitable from the standpoint of the enzyme activity and solubility of *L*-ascorbic. And the equilibrium of the reaction was affected by the addition of the molecular sieves and temperature. Reaction carried out at 60℃ and with 20% 0.4nm molecular sieves is good for the enzyme to keep its activity and for making the equilibrium go to the product. With 1.094g palmitic acid, 0.107g vitamin C and 0.020g Novo435, rotate rate of 200r/min, the conversion of ascorbic reached 80% and the concentration of *L*-ascorbyl palmitate is 20g/L after 48h. Furthermore, reaction batch of Novo435 and substrates recycle were observed, the result indicated that Novo435 may used 4~5 times continuously with high conversion. And 6-O-unsaturated acyl *L*-ascorbates were synthesized through Novo435 condensation of ascorbic acid and various unsaturated fatty acids with high conversion in this text.

**Key words** *L*-ascorbyl palmitate, lipase, Novo 435, acetone, interesterification

维生素 C 棕榈酸酯(*L*-AP),简称维 C 棕榈酸酯,化学名称为棕榈酰-0-6-*L*-抗坏血酸酯,它是一种安全无毒高效的脂溶性抗氧化剂,不仅保持了 *L*-抗坏血酸抗氧化的特性而且在

动物油、植物油中具有相当的溶解度,被广泛应用于食品、化妆品及医药卫生等领域<sup>[1]</sup>。同时还具有乳化性,性质稳定<sup>[2]</sup>。

目前,维生素 C 棕榈酸酯的合成方法主要有化学合成法

Received: May 9, 2005; Accepted: August 2, 2005.

This work was supported by the grants from 973 program of China(No. 2003CB716002), the Natural Science Foundation of China(No. 20325622, 20576013), National Fifteen Tackle Key Problem of China(No. 2004BA71B08-02, 2004BA411B05)

\* Corresponding author. Tel: 86-10-64416691; E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

国家重点基础研究发展规划 973 项目(No. 2003CB716002 和 200CB002),国家自然科学基金项目(No. 20325622, 20576013),国家十五攻关项目(No. 2004BA71B08-02, 2004BA411B05)

和酶催化合成法。化学合成法虽然比较成熟,转化率最高可以达到 86%,但是化学法合成催化剂用量大,价格昂贵,对设备的抗腐蚀性要求高,必须控制在较低的温度下进行,不适合工业化生产。而酶催化法具有选择性高,副反应少,反应条件温和,产品下游分离操作相对简单,对设备要求不高等优点。如果酶法能达到同样的转化率并实用于工业化生产,将会带来很大的利润。因此对于酶法生产维生素 C 棕榈酸酯,已有些人做了初步尝试<sup>[3-5]</sup>,一般采用叔丁醇或叔戊醇作溶剂,产物浓度最高可达到 12g/L,但是转化率不高,为 60%。Youchun<sup>[6]</sup>等人虽然把产物维生素 C 棕榈酸酯的转化率提高到 91%,但是此时浓度只有 0.49g/L,无实际应用价值。因此选择合适的溶剂,同时提高反应的转化率和产物浓度是一个有待解决的问题。

1 材料和方法

1.1 试剂

维生素 C 棕榈酸酯(≥99.5%) 瑞士罗氏公司 ;棕榈酸 :北京化学试剂公司 ;维生素 C 棕榈酸酯(≥99%) :百灵威试剂公司 ;0.4nm 分子筛 :北京化学试剂公司 ;假丝酵母酶 sp. 99-125、根霉和自制酶布固定化假丝酵母 sp. 99-125 :本实验室自制 ;Novo435、Lipozyme RM IM、LA 201056 和 Lipozyme TL IM :丹麦 Novo 公司 ;猪胰脂肪酶 :美国 Sigma 公司 ;其余试剂购于北京化学试剂公司。

1.2 仪器

振荡培养箱 SHZ-3 :为哈尔滨东连电子技术开发有限公司产品,反应所用转速为 200r/min ;高效液相色谱岛津 10A :日本岛津公司 ;KQ3200B 型超声波清洗器 :昆山市超声仪器有限公司。

1.3 维生素 C 棕榈酸酯的合成

基础反应体系在 25mL 具塞锥形瓶中进行,加入 0.107g 维生素 C,0.625g 棕榈酸,0.020g Novo 435 酶,10mL 丙酮,50℃下振荡反应 48h。

1.4 转化率的测定

以反应体系内酯化生成维生素 C 棕榈酸酯的量,计算转化率。转化率 = 生成的产物维生素 C 棕榈酸酯的摩尔数 / 加入的底物维生素 C 的摩尔数 × 100%(本文所提到的转化率都是以底物维生素 C 为基准来计算)。

1.5 维生素 C 棕榈酸酯的色谱分析(图 1 图 2)

将反应液取样约 0.100g,用 25mL 的甲醇溶解,吸取 20μL

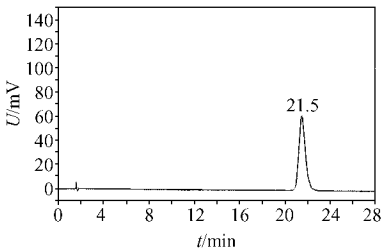


图 1 维生素 C 棕榈酸酯谱图

Fig. 1 Chromatogram of L-ascorbyl palmitate

样品进样。色谱条件 :检测器 :UVIS-201 紫外检测器 ;色谱柱 :C18 柱(250mm × 4.6mm, 4.5μm) ;Alltech 426 型泵及 HS 色谱数据工作站 ;检测波长为 250nm ;流动相 :甲醇 :醋酸溶液(pH = 2.65) = 85 : 15 ;流速 :1mL/min ;计算方法 :外标法。

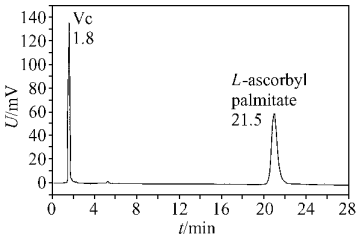


图 2 维生素 C 棕榈酸酯与维生素 C 的混合样标准谱图

Fig. 2 Chromatogram of mixture of L-ascorbyl palmitate and Vitamin C

The save time of Vitamin C is 1.8min, the save time of L-ascorbyl palmitate is 21.5min.

2 结果与讨论

2.1 酶的选择

选择了几种来源不同和固定化方法不同的脂肪酶作为催化剂,底物棕榈酸与维生素 C 的摩尔比为 4 : 1,在 25mL 的容量瓶里加入 10mL 的丙酮,在 50℃下,转速 200r/min,反应 48h,取样分析,结果见表 1。

表 1 不同酶对酯化率的影响

Table 1 Influences of different enzymes on interesterification

Lipase	Conversion/%
free lipase from Rhizoups arrhizus	0.00
Procine Pancreas	0.00
Lipozyme TL IM	0.35
free lipase from Candida sp.99-125	1.27
Lipozyme RM IM lux	2.93
LA201056	3.12
immobilized lipase from Candida sp.99-125	50.00
Novozym 435	62.91

The reaction was carried out at 50℃, with 0.107g Vitamin C, 0.625g palmitate and different enzymes in 10mL acetone.

从表 1 可以看出,在相对酶活一样的情况下(25000u/g),Novo435 催化酯化反应转化率最高达 62.91%,自制的固定化酶的转化率为 50.00%,游离假丝酵母作为催化剂的转化率为 1.27%,而根霉和猪胰脂肪酶表现的活性更低,催化合成的维生素 C 棕榈酸酯低至检测不出,这可能是由于酶的固定化方法不同造成的。而酶粉,在相对酶活一样的情况下,由于粉末状的酶粉在有机相中易于成团,不利于传质的进行,因此酶粉比固定化的酶的催化效果差的更多。因此我们选择 Novo 435 作为体系反应的催化剂。

2.2 溶剂的选择

有机溶剂作为酶反应的介质会直接影响酶的催化活性和稳定性。Laane<sup>[7]</sup>用有机溶剂的极性参数 log P 来描述有机溶剂对酶反应的影响(log P 是该有机溶剂在正辛醇/水体系中的分配系数的对数)。他将溶剂分为 3 类 :第一类有机溶

剂的  $\log P < 2$  ;第二类有机溶剂的  $\log P$  在  $2 \sim 4$  之间 ;第三类有机溶剂的  $\log P > 4$  。研究发现 : $\log P < 2$  的有机溶剂不适合作为反应介质 ,因有机溶剂将强烈破坏酶的必需水化层而使酶失活 ; $\log P$  在  $2 \sim 4$  之间的有机溶剂对酶的必需水有微弱破坏 ,对酶活性有影响但很难预测 ; $\log P > 4$  的有机溶剂一般不破坏酶的必需水化层。本文试验了 5 种常用的有机溶剂 ,其相对极性和转化率见表 2。

表 2 有机溶剂对转化率的影响  
Table 2 Influences of solvents on conversion

Solvent	Log P	Conversion/%	Concentration of <i>L</i> -APC (g/L)
Hexane	3.53	2.54	0.35
Nonane	2.51	2.24	0.33
Pretroleum ether	2.62	0.00	0.31
Benzene	2.0	2.12	0.00
Butyl butyrate	1.32	46.55	6.43
Tert-amyl alcohol	1.15	55.61	7.69
Tetrahydrofuran	0.49	0.00	0.00
Acetone	-0.24	62.85	8.56

The reaction was carried out at 50℃ ,with 0.107g Vitamin C ,0.625g palmitate and 0.020g Novo 435 in different solvents.

由表 2 可见 ,在其它条件均相同的前提下 ,当溶剂的  $\log P$  在  $2 \sim 4$  之间时 ,酯化反应的转化率很小 ,且转化率与溶剂的疏水性的大小次序基本上是一致的。这一结果进一步证实 ,溶剂的疏水性影响酶的活力 ,溶剂的疏水性较强 ,固定化酶在其中催化酯化反应的转化率也较高。而当溶剂的  $\log P < 2$  时 ,取得的产物浓度较高 ,这一点与 Laane 所提出的规律(  $\log P < 2$  的有机溶剂不适合作为反应介质 )有所区别。丙酮的极性成负数 ,但是该体系的转化率却是最高的。由于该反应体系溶剂的极性降低 ,维生素 C 和棕榈酸的溶解度增大 ,而目前维生素 C 和棕榈酸的溶解度是影响转化率的一个重要因素 ,能够提高底物浓度 ,所以反应进行的比较完全 ,转化率较高 ,因此我们选取丙酮作溶剂。

2.3 底物摩尔比的影响

脂肪酶催化酯化反应是维生素 C 和棕榈酸反应生成酯和水的可逆反应 ,要使反应彻底 ,就必须使反应物过量 ,或在反应中除去某产物。为了提高维生素 C 棕榈酸酯的转化率 ,本文对几种不同底物摩尔比进行了比较 ,从而确定最佳摩尔比。在实验中 ,我们固定维生素 C 的物质的量为 0.6mmol/L ,棕榈酸与维生素 C 的物质的量之比从 1:1 到 12:1 变化。结果见图 3。从图中可以看出随着棕榈酸与维生素 C 的摩尔比增加 ,转化率也在增加 ,并且 ,当棕榈酸与维生素 C 的摩尔比达到 7:1 时 ,转化率达到了最高。酸的摩尔数继续增加 ,转化率几乎达到了平衡。

2.4 反应温度的优化

温度对 Novo 435 酶催化维生素 C 与棕榈酸的酯化反应的影响如图 4 所示。由图 4 可见 ,反应的最适温度为 60℃ ,当温度低于 25℃ 时 ,随着温度的升高 ,转化率增加 ,这是由于在低温条件下 Novo435 酶的活性比较低 ;而当温度高于 60℃ 时 ,随着温度的升高 ,转化率快速下降 ,这主要是因为温度对维生素 C 的稳定性影响比较大 ,且酶失活<sup>[8]</sup>造成的。

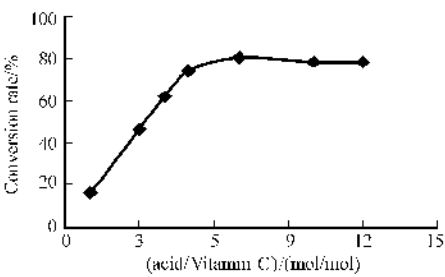


图 3 底物摩尔比对酯化的影响

Fig. 3 Effects of acetate/acid molar ratio on conversion  
The reaction was carried out at 50℃ ,with 0.02g Novo435 and 0.107g Vitamin C in 10mL acetone with different acetate/acid molar ratio.

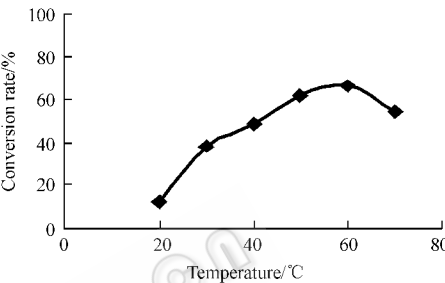


图 4 温度对酯化的影响

Fig. 4 Effects of temperature on conversion of Vitamin C  
The reaction was carried out with 0.107g Vitamin C, 0.625g palmitate acid and 0.02g Novo 435 in 10mL acetone at different temperature.

2.5 维生素 C 浓度的影响

维生素 C 极性较强 ,易溶于水 ,难溶于有机溶剂 ,只有溶解在反应体系中的维生素 C 才能参加反应 ,因此维生素 C 的浓度也是影响转化率的一个重要因素。维生素 C 的浓度对转化率的影响如图 5。随着维生素 C 在丙酮中的浓度增加 ,转化率增加 ,但是维生素 C 在 10mL 的丙酮中的溶解度有限 ,当达到饱和时 ,溶剂中存在的过量的没有溶解的维生素 C 会阻碍传质 ,酯化率降低。由图 5 可以看出 10mL 的反应体系维生素 C 的最佳浓度为 0.107g/L( 0.6mmol )。

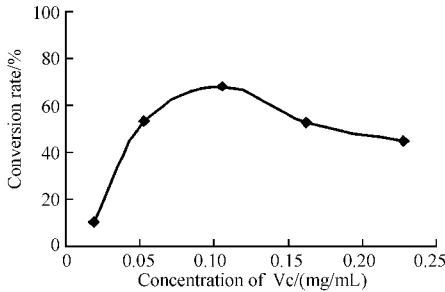


图 5 维生素 C 的浓度对转化率的影响

Fig. 5 Effects of concentration of Vitamin C on conversion  
The reaction was carried out at 50℃ ,with 0.02g Novo435 in 10mL acetone.

2.6 酶量对反应的影响

在反应体系中 ,棕榈酸和维生素 C 的摩尔比设定为 7:1 ,固定化酶的用量从 5% 到 65% ,50℃ 下反应 48h ,反应结果见图 6。当固定化酶的用量较低时 ,转化率随着酶用量的增

大而增大 ,而当酶用量超过 20% 时 ,转化率基本维持不变。故在反应体系中选择 20%( W/W ,固定化酶/维生素 C )为最适酶用量。

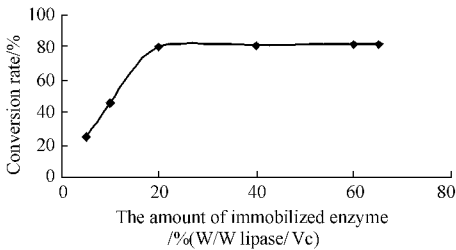


图 6 酶量对酯化反应的影响

Fig. 6 Effects of the immobilized lipase on conversion

The reaction was carried out at 50℃ ,with different amount of Novo 435 in 10mL acetone.

2.7 酯化反应的进程

我们考察了 3 种不同摩尔比的酯化反应进程 ,如图 7 所示。反应系统由 0.107g 维生素 C、0.020g 固定化酶和 10mL 丙酮组成 ,维生素 C 和棕榈酸的摩尔比分别为 1:1、1:4 和 1:7。由图 7 可看出 ,体系随着摩尔比的增加 ,转化率在逐渐增加 ,反应 48h 后 ,转化率的增长趋于平缓。

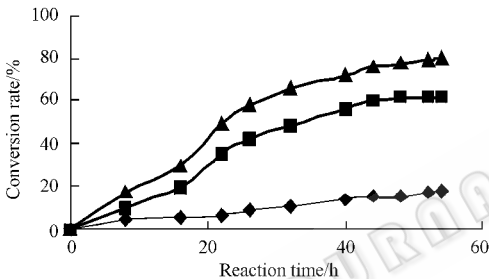


图 7 酯化反应的进程

Fig. 7 Time course of interesterification

The reaction was carried out at 50℃ ,with 0.020g Novo 435 in 10mL acetone.

2.8 分子筛含量的影响

对有机相中的酶促反应而言 ,水的存在是维持酶活力所必需的<sup>[9]</sup>。酶反应在环绕着酶分子的水层内进行 ,底物分子必须先主体有机相进入微水相 ,才能与酶作用 ,激发酶的活性。但过量的水又会引起酶中心内部“水簇”的生成 ,从而改变酶的活性结构使酶活性降低<sup>[10]</sup>。图 8 为 Novo435 酶在丙酮中催化维生素 C 与棕榈酸反应时 ,分子筛(0.4nm 分子筛 ,购与北京化学试剂公司 )作为吸水剂对转酯化反应的影响。由图 8 可知 ,在一定范围内随着水含量的减少 ,酯化率升高 ,分子筛的量继续增加 ,随着水含量的继续减少 ,酯化率逐渐降低 ,这是由于脂肪酶在有机溶剂中显示催化活性时不需要太多的水 ,脂肪酶分子只需要结合几分子的水就会表现出很高的催化活力 ,但是不能没有水 ,当酶在几乎干燥的体系中 ,基本不表现催化活性 ,并且过量的分子筛会阻碍传质的进行。因此分子筛有一个最佳用量 ,图 8 的结论也证明了这一点。

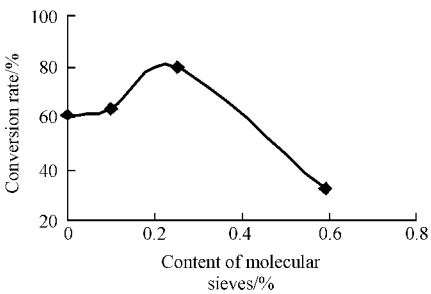


图 8 分子筛对酯化反应的影响

Fig. 8 Influences of the molecular sieves on the interesterification

The reaction was carried out at 50℃ ,with 0.020g Novo435 in 10mL acetone with molecular sieves.

2.9 酶的寿命

由于商品酶价格昂贵 ,因此我们考察该酶能不能连续多次使用 ,从而降低成本。在最佳反应条件下 ,我们作了批次实验得到以下结果(图 9)。

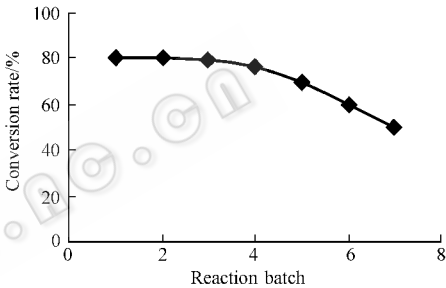


图 9 反应批次的影响

Fig. 9 Influences of the reaction batch

The reaction was carried out at 50℃ ,with 0.020g Novo435 ,0.107g vitamin C ,0.625g palmitate acid in 10mL acetone with molecular sieves.

从实验结果可以看出 ,固定化酶经过 4 次连续使用后 ,转化率仍可以达到 75% ,第 6 次使用后转化率降到 60%。因此我们可以把商品酶连续 4~5 次使用 ,都可以得到比较高的转化率 ,从而在一定程度上降低了成本。

2.10 维生素 C 棕榈酸酯的分离纯化

由于最优条件下底物棕榈酸过量较多 ,我们采用以下方法分离提取产物 ,同时回收底物棕榈酸。

将反应得到的混合物过滤 ,滤去分子筛和酶 ,过滤后的溶液减压蒸发回收溶剂 ,得到干燥混合物(棕榈酸 ,维生素 C 维生素 C 棕榈酸酯)水洗过滤除去少量没有反应的维生素 C ,然后将余下混合物(棕榈酸 ,维生素 C 棕榈酸酯)放入 4℃ 正己烷 ,产物维生素 C 棕榈酸酯结晶析出。棕榈酸正己烷溶液减压蒸发 ,析出的棕榈酸和蒸发出的正己烷都可以回收利用。

2.11 其他维生素 A 酯的合成

本文通过优化的条件还考察了其他维生素 C 酯的合成 ,如中长链脂肪酸 ,不饱和脂肪酸。结果见表 3 ,从表中可看出 ,维生素 C 与脂肪酸在优化条件下可以合成相应的维生素 C 酯 ,且转化率还较高。

表 3 不同脂肪酸底物时维生素 C 酯的合成  
Table 3 The synthesis of Vitamin C esters

Fatty acid	Solvent	Conversion after 48h/%	Production
Dodecylic acid	Acetone	68.2	L-ascorbyl dodecylate
Myristic acid	Acetone	72.6	L-ascorbyl myristicate
Palmitate acid	Acetone	75.8	L-ascorbyl palmitate
Stearic acid	Acetone	80.0	L-ascorbyl stearic
Oleic acid	Acetone	78.6	L-ascorbyl oleate
Linolic acid	Acetone	76.1	L-ascorbyl linoleate
Linolenic acid	Acetone	69.5	L-ascorbyl linolenate

3 结论

我们研究了一种用固定化脂肪酶催化合成维生素 C 棕榈酸酯的方法。对催化合成维生素 C 棕榈酸酯反应的酶种和介质进行筛选 ,发现最佳酶种为 Novo 435 酶 ,最佳介质为丙酮 ,同时对影响合成维生素 C 棕榈酸酯反应的酯化率的因素( 温度、水分含量、酶量和底物摩尔比 )进行了探讨 ,确定了最适反应条件 :在 10mL 的丙酮中加入 20% 的 0.4nm 分子筛 , 0.107g 维生素 C 和 1.094g 棕榈酸在酶量为 20%( W/W ,固定化酶/维生素 C )的固定化脂肪酶催化下 ,温度为 60℃ ,转速为 200r/min ,反应 48h ,转化率可以达到 80% ,产物浓度为 20g/L。虽然棕榈酸过量 ,但是低温条件下可以析出 ,且丙酮易于挥发 ,易于产品的分离纯化 ;由于丙酮的极性比叔丁醇 ,叔戊醇的极性小 ,对维生素 C 和棕榈酸的溶解度相对较好 ,产率较高 ,且丙酮价格相对较便宜 ,因此本文研究结果有应用价值。

REFERENCES( 参考文献 )

[ 1 ] Humeau C ,Girardin M ,Coulon D *et al* . Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *Biotechnol Lett* ,1998 ,**17** :1091 – 1094  
[ 2 ] Spiclin P ,Gasperlin M ,Kmetec V . Stability of ascorbyl palmitate in topical micoroemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* , 2002 ,**22** 271 – 279

[ 3 ] Song QX ,Wei DZ. Study of vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. *J Molec Cat B :Enzymatic* ,2002 ,**18** 261 – 266  
[ 4 ] Rejasse B ,Maugard T ,Legoy MD. Enzymatic procedures for the synthesis of watersolubleretinal derivatives in organic media. *Enzyme Micro Technol* ,2003 ,**32** 312 – 320  
[ 5 ] Tang LH( 汤鲁宏 ) ,Zhang H( 张浩 ) . Studies on lipase synthesis of L-ascorbyl palmitate in nonaqueous phase. *Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ) ,2000 ,**16** ( 3 ) 363 – 367  
[ 6 ] Yan YC , Uwe T Bornscheuter. Lipase-catalyzed synthesis of vitaminC. *Biotechnol Lett* ,1999 ,**21** :1051 – 1054  
[ 7 ] Lanne C , Boeren S , Vos K *et al* . Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology Bioengineering* , 1987 ,**30** : 81 – 87  
[ 8 ] Luo GM( 罗贵民 ) . Enzyme Engineering. 3nd ed. Beijing : Chemical Industry Press 2002 pp.17 – 18  
[ 9 ] Halling PJ , Valivety RH. Physical-chemical nature low water systems for biocatalysis : Especially phase behavior : water activity and pH. *Prog biotechnol* ,1992 ,**8** :13 – 21  
[ 10 ] Affleck R , Xu ZF , Suzawa V *et al* . Enzymic catalysis and dynamics in low water environments. *Proc Natl Acad Sci* ,1992 ,**89** ( 3 ) :1100 – 1104

诚 征 广 告

《生物工程学报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的综合性的学术刊物。主要报道我国生物技术领域科学和技术的新进展和新成果 ,刊登的内容包括 :基因工程、细胞工程、酶工程、生化工程、生物反应器等各个方面 ,涉及工业、农业和医学等诸多领域。刊载的文章有 60% 以上是获“ 863 ”、“ 973 ”、国家自然科学基金资助或属“ 八五 ”、“ 九五 ”攻关及省部级重大项目的研究论文 ,为国内从事生物技术的科研人员必读的刊物。

过去的几年 ,本刊以严谨的态度、诚实的信誉 ,赢得了厂商和读者的信赖 ,与许多公司建立了良好的长期合作关系。

《生物工程学报》设有广告专版 ,真诚欢迎国内外厂商来此发布产品、技术和服务信息 ,刊登仪器、设备、试剂等方面的广告。我刊除彩色四封外 ,还有精美彩色、黑白插页供选择。

需要刊登广告的客户 ,可电话告知您的 Fax ,我们会立即将报价单传真给您 ,洽商确定版位后 ,即由科学出版社广告部( 我刊广告代理 )与您签定正式的刊登合同。

编辑部电话/传真 010-62554303 E-mail :cjb@sun.im.ac.cn