

非水相脂肪酶催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的研究 I

汤鲁宏 张 浩

(无锡轻工大学食品学院 无锡 214036)

摘 要 对催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的脂肪酶(NOVO435、MML、LIPOLASE、PPL)和反应介质进行比较,得出最佳酶种为 NOVO435,最佳介质为叔戊醇,同时对影响合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的初速度的因素(转速、温度、水分含量、酶浓度和底物浓度)进行了探讨,确定了最适反应条件:转速为 200r/min,温度为 55℃,水分含量为 0,酶浓度为 12.5%。

关键词 L-抗坏血酸棕榈酸酯,脂肪酸,反应介质,初速度

中图分类号 Q814.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0363-05

L-抗坏血酸棕榈酸酯(L-ascorbic acid palmitate,简称 L-AP)是一种新型的多功能食品添加剂,现已广泛地用作脂溶性抗氧化剂及营养强化剂添加在油脂或食品中^[1]。由于化学合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的方法有太多的缺陷,国外对在非水相中利用脂肪酶(Lipase EC3.1.1.3)合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯进行了一定的探讨^[2]。本文对水相、无溶剂体系和若干有机溶剂相等不同反应介质中的几种脂肪酶的活力进行系统的研究,选择合适的介质与酶种,并研究了各种因素对酶法合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的初速度的影响,确定最适酶促反应条件。

1 材料与方 法

1.1 实验试剂

1.1.1 脂肪酶: NOVO435 7000PLU/g (Novo Nordisk 公司);MML 25BIU/g (Novo Nordisk 公司);LIPOLASE 10KLU/g (Novo Nordisk 公司);PPL 143u/mg protein (Sigma 公司)。

1.1.2 化学试剂:均为国产化学纯试剂,上海试剂采购供应站。

1.2 实验仪器

HZS-H 水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);CS-930 荧光扫描仪(日本岛津公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 脂肪酶及反应介质的初筛:在 100mL 具塞三角瓶中,分别加入 0.4g 抗坏血酸及 0.6mol/L 棕

榈酸或棕榈酸酯的 20mL 水、叔戊醇或无溶剂组成的反应体系,再加入 0.4g 脂肪酶,40℃(棕榈酸无溶剂体系时为 65℃)下 200r/min 旋转振荡,72h 后取样检测。

1.3.2 有机溶剂的筛选:在 100mL 具塞三角瓶中,分别加入 0.4g 抗坏血酸及 0.6mol/L 棕榈酸或棕榈酸酯的 20mL 有机溶剂组成的反应体系,再加入 0.4g 脂肪酶,40℃下 200r/min 旋转振荡,72h 后取样检测。

1.3.3 产物浓度测定^[3]:L-抗坏血酸在有机溶剂中溶解度较小,即使反应结束后也有部分 L-抗坏血酸以固态形式存在于体系中,因此,以 L-抗坏血酸的转化率来衡量反应转化程度并不准确,本文采用 L-抗坏血酸棕榈酸酯的浓度(即产物浓度)作为衡量转化程度的标准。吸取反应体系 5mL,置于 250mL 碘量瓶中,加 50mL 无水乙醇,摇匀,再加水 30mL,摇匀后立即用 0.1mol/L 的碘标准溶液滴定至黄色 30s 内不褪色为终点,记下碘标准溶液消耗的体积(mL),同时作空白。

结果计算: $c_2 = 0.2073 \times (V_1 - V_2) \times c_1 / V_3$
式中: V_1 ——滴定样品所消耗的碘标准滴定液的体积(mL)
 V_2 ——滴定空白所消耗的碘标准滴定液的体积(mL)
 c_1 ——碘标准滴定液的浓度(mol/L)
 V_3 ——吸取的反应液的体积(mL)

c_2 ——L-抗坏血酸棕榈酸酯的浓度(g/L)

0.2073——与 1.00mL 碘标准滴定液 [$c(1/2I_2) = 1.000\text{mol/L}$] 相当于以克表示的 L-抗坏血酸棕榈酸酯的质量

注 无溶剂体系时,首先配成 50mL 的乙醇溶液,再进行以上操作。

1.3.4 催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的体系组成: 100mL 具塞三角瓶中,加入 0.4g 抗坏血酸和 0.34mol/L 棕榈酸或棕榈酸酯的 20mL 叔戊醇溶液,加酶量为 0.2g,反应温度为 55℃,摇床转速为 200r/min,水分含量为 0,反应 10min 后取样检测。

1.3.5 催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的初速度的测定^[4]: 吸取 10 μL 反应液进行薄层层析,然后用荧光扫描仪测出斑点面积,重复 4 次,取其平均值,根据标准方程,算得初速度。

$$v = \frac{2000 \times 10^{1.32\sqrt{A}}}{414 \times t \times m}$$

式中: v ——反应的初速度($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ 酶)

A ——斑点的面积(cm^2);

m ——酶的质量/g;

t ——反应时间/min;

2000——总体对萃取液的倍数;

414——L-抗坏血酸棕榈酸酯的摩尔质量(g/mol)。

2 结果与讨论

2.1 反应介质及酶种的筛选

2.1.1 脂肪酶及反应介质的初筛: 由于实验用几种脂肪酶的作用温度范围均在 30~60℃ 之内,将反应介质(水相、叔戊醇相和无溶剂体系)与脂肪酶、底物排列组合在 40℃ 下振荡反应 72h,结果见表 1。

表 1 脂肪酶催化反应结果

Table 1 The results of enzymatic reaction

Substrate	Reaction media	Product concentration/(g/L)			
		NOVO 435	MML	LIPOLASE	PPL
Palmitic acid	Water	0	0	0	0
Palmitic acid	Amyl alcohol	11.60	2.62	0	0
Palmitic acid	Solvent-free	0	0	0	0
Methyl palmitate	Water	0	0	0	0
Methyl palmitate	Amyl alcohol	9.40	2.09	0	0
Methyl palmitate	Solvent-free	0	0	0	0
Ethyl palmitate	Water	0	0	0	0
Ethyl palmitate	Amyl alcohol	9.96	1.66	0	0
Ethyl palmitate	Solvent-free	0	0	0	0

由表 1 可看出,LIPOLASE、PPL 在 3 种反应介质下均不能催化此反应,说明 LIPOLASE、PPL 不存在催化此反应的功能。NOVO 435 催化此反应的活性最好,在叔戊醇相中、以棕榈酸为底物催化合成所得到的 L-抗坏血酸棕榈酸酯的高最浓度可达 11.60g/L。MML 次之,但催化此反应的活力比 NOVO 435 弱的多,72h 后的最高产物浓度只有 2.62g/L。这可能因为反应 72h 尚未达到平衡的缘故。

而 NOVO435、MML 在水相中不能催化此反应,这可能因为在水相不利于反应向生成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的方向进行。

从表 1 还可看出 NOVO435、MML 在无溶剂体系中难以催化此反应,确切地说,NOVO435、MML 在无溶剂体系中催化合成的 L-抗坏血酸棕榈酸酯

低至检测不出。当无溶剂体系时,L-抗坏血酸的溶解度极小,根据平衡常数的公式,即使达到平衡,L-抗坏血酸棕榈酸酯的浓度极低。

由上可知采用 NOVO 345 作催化剂、反应介质为叔戊醇时所得产物浓度最高。另外,此反应与一般的有机相催化反应有所区别,无溶剂体系时的产物浓度为 0,说明对有机溶剂有一定的要求,还需详细筛选有机溶剂。

2.1.2 有机溶剂的筛选: 有机溶剂作为酶反应的介质直接影响酶的催化活性及稳定性。Laane^[5]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 2~4 之间;第三类有机溶剂的 $\log P > 4$ 。研究结果发现;

$\log P < 2$ 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 2~4 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。

但此反应与一般有机相合成反应有所不同, 底物由 L-抗坏血酸和棕榈酸或棕榈酸酯组成, L-抗坏血酸是极性很强的物质, 而棕榈酸或棕榈酸酯是非极性很强的物质, 根据平衡常数公式, 要获得高浓度的 L-抗坏血酸棕榈酸酯就要求反应结束时的 L-抗坏血酸和棕榈酸或棕榈酸酯的浓度都比较高。从前面几种反应介质的比较结果可以看出: 水和无溶剂体系均不合作此反应的介质。因此, 需选择有一定的亲水性的溶剂, 即有一定的极性, 对抗坏血酸有一定的溶解性, 以确保根据平衡常数的计算公式从理论上计算所得的产物浓度较高, 同时极性又不宜太强, 否则, 易造成酶的失活。我们重点对极性与非极性都较为折中的有机溶剂作介质进行比较, 结果见表 2。

表 2 有机溶剂对反应的影响

Table 2 The effect of solvent on reaction

Solvent	$\log P$	Product concentration/(g/L)		
		Palmitic acid	Methyl palmitate	Ethyl palmitate
1,4-dioxane	-1.10	0.84	0.61	0.66
Ethanol	-2.242	0	0	0
Methyl ethyl ketone	0.29	2.92	1.79	1.43
Tetrahydrofuran	0.49	3.67	1.83	2.00
Amyl alcohol	1.15	11.60	9.40	9.96
Butyl butyrate	1.32	2.22	1.02	0.98
Iso-propyl ether	1.90	0	0	0
Trichloromethane	2.00	0	0	0
Benzene	2.0	0	0	0
Hexane	3.50	0	0	0
Heptane	4.00	0	0	0

由表 2 可以看出, 当反应在极性较强的有机溶剂如 1,4-二氧六环中进行时, 由于它们可以夺取酶分子的必需水, 造成了酶的失活, 虽然 L-抗坏血酸在它的溶解度很大, 反应结束时的产物浓度很低。反应介质为乙醇时, 可能棕榈酸或棕榈酸酯与乙醇发生了反应, 造成了反应结束时的产物浓度为 0。当反应在非极性较强的苯、己烷、庚烷中进行时, 可能由于溶解度的原因, 虽然它们很适合酶的催化反

应, 产物浓度仍为 0。溶剂的极性处于两者之间时, 即 $\log P$ 在 0~2 之间时, 取得的产物浓度较高, 这点与 Laane 所提出的规律($\log P < 2$ 的有机溶剂易使酶失活而不适合作为反应介质)有所区别。在这几种有机溶剂之中, 以叔戊醇作介质所得的产物浓度最高。

2.2 影响合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的初速度的因素

2.2.1 温度和摇床转速对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响:

在其它条件相同的情况下, 在 0~300r/min 范围之间测定 3 种底物在不同转速条件下对反应初速度的影响, 实验结果见图 1 和图 2。由图 1 可知, 摇床转速增大至 200r/min 以上后, 反应初速度基本保持恒定。这说明固定化酶反应体系中的外扩散限制在转速增大过程中对反应的影响逐渐减小^[6]。由图 2 可知, 温度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应的初速度影响很大。3 种底物合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的最适温度都为 55℃。

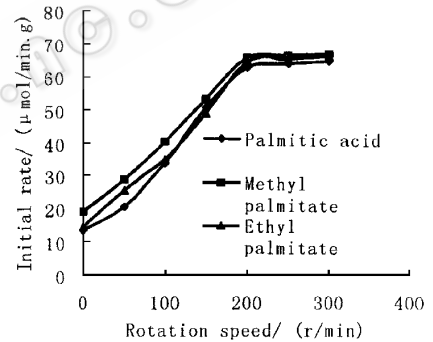


图 1 转速对反应初速度的影响

Fig. 1 Effect of rotation speed on the initial rate of reactions

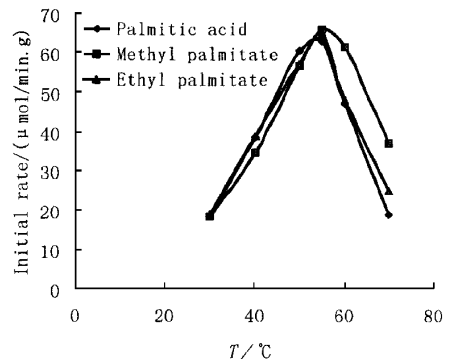


图 2 温度对反应初速度的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the initial rate of reactions

2.2.2 水分含量对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响:

在催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的反应体系中, 将水分含量从 0 变至 3%, 实验结果表明, 在水分含量为 0 时, 固定化酶本身所固有的水分

即可保证酶活达到最高,因为一定量的水对于酶的活性是必不可少的,水分子可以屏蔽酶分子内部极强的集团间的静电作用,使酶分子有足够的“柔性”,能够处于催化作用所必需的构象状态^[7]。随着水分含量的增加,水在酶分子周围形成“水簇”^[8],酶活逐渐降低,同时水含量的增加也导致水解反应的加速,使得反应初速度降低。

2.2.3 酶浓度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响:在其它条件相同的情况下,分别检测 3 种反应在 3 种底物浓度下不同的酶浓度(相对于底物的量的百分比浓度)作用下的初速度,结果见图 3、4、5。从这些图可知,随着酶浓度的增大,反应初速度逐渐加快,但并不呈线性增加,估计受到内扩散限制^[6],当酶浓度大于 12.5% 后,反应初速度不再变化,这可能由于底物已被酶全部饱和。

2.2.4 底物浓度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应

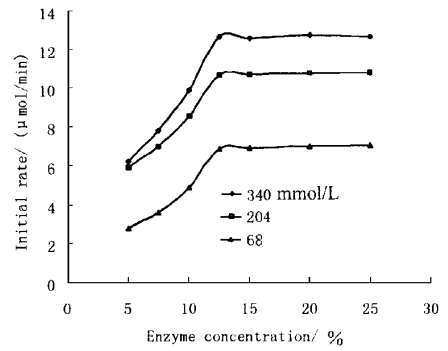


图 5 棕榈酸乙酯在不同浓度下酶浓度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成的影响

Fig. 5 Effect of enzyme concentration on the initial rate of reactions of ethyl palmitate

初速度的影响:由于 L-抗坏血酸微溶于叔戊醇,且反应结束后仍有部分固态 L-抗坏血酸,它在反应中的浓度可视为定值,因此我们所讨论的底物浓度就专指棕榈酸或棕榈酸酯的浓度。改变 3 种底物的浓度,测出相应的初速度,结果见图 6。L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应的初速度随着底物浓度的增大而加快,底物浓度高于 340mmol/L 后,初速度达到一恒定值。

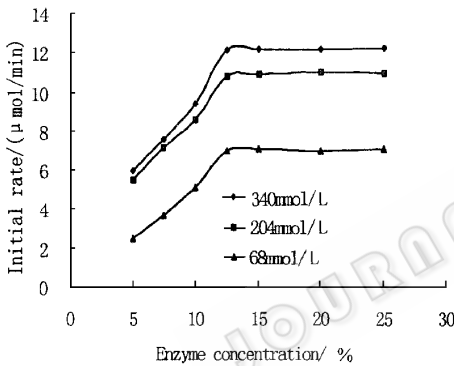


图 3 棕榈酸在不同浓度下酶浓度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成的影响

Fig. 3 Effect of enzyme concentration on the initial rate of reactions of palmitic acid

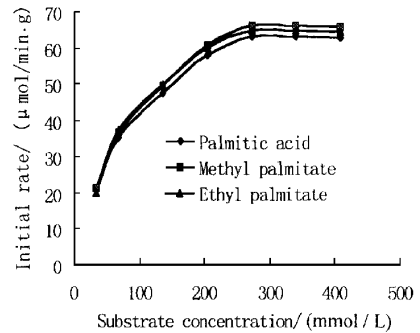


图 6 底物浓度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应初速度的影响

Fig. 6 Effect of substrate concentration on the initial rate of reactions

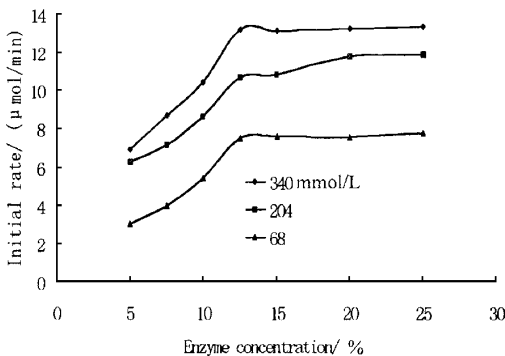


图 4 棕榈酸甲酯在不同浓度下酶浓度对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成的影响

Fig. 4 Effect of enzyme concentration on the initial rate of reactions of methyl palmitate

3 结 论

本文对催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的酶种和介质进行筛选,发现在叔戊醇中用 NO-VO435 催化此反应所得的产物浓度最高,同时对影响合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯反应的初速度的因素(转速、温度、水分含量、酶浓度和底物浓度)进行了探讨,确定了最适反应条件:转速为 200r/min,温度为 55℃,水分含量为 0%,酶浓度为 12.5%。

参 考 文 献

- [1] Zaks A ,Klibanov A M. *Science* ,1984 **224** :1249~1251
- [2] Humeau. *Biotechnology Letters* ,1995 **17**(10):1091~1094
- [3] 中华人民共和国标准(食品添加剂卷)北京:中国标准出版社,1996,891~892
- [4] 汤鲁宏,张浩,孙云飞. *食品工业科技*,1999 **5**:57~58
- [5] Laane C ,Boeren S ,Veeger C. *Biotech Bioeng* ,1987 **81**~87
- [6] 郭勇. *酶工程*,北京:中国轻工业出版社,1994,210~224
- [7] Zaks A ,Klibanov A M. *J Biol Chem* ,1988 **263**:3194~3201
- [8] Affleck R ,Xn I F. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1992 **89**:1100~1104

Studies on Lipase-catalyzed Synthesis of L-ascorbyl Palmitate in Non-aqueous Phase

TANG Lu-Hong ZHANG Hao

(Wuxi University of Light Industry ,Wuxi 214036)

Abstract The investigation on the reaction media and lipases(NOVO435, MML, LIPOLASE, PPL) for enzymatic synthesis of L-ascorbyl palmitate as well as the factors effecting initial rate of synthesis reaction(rotation speed ,temperature , water content ,enzyme concentration and substrate concentration) is presented. Among these investigated solvents and lipases ,amyl alcohol and NOVO435 is the optimum pair. The reaction conditions have been optimized 200r/min ,55°C ,water content = 0 ,the amount of enzyme = 12.5% of the substrate 's quantity.

Key words L-Ascorbyl palmitate lipase reaction media initial rate