

固定化脂肪酶合成维生素 A 棕榈酸酯

李宏亮, 胡晶, 谭天伟

北京化工大学生命科学与技术学院北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029

摘要: 研究了有机溶剂中脂肪酶催化维生素 A 棕榈酸酯的合成工艺。采用维生素 A 醋酸酯和棕榈酸乙酯作为反应底物, 对催化合成维生素 A 棕榈酸酯反应介质进行了比较, 同时对影响合成维生素 A 棕榈酸酯反应的因素(温度、初始水含量、底物摩尔比、反应时间和酶量等)进行了探讨, 优化了反应条件: 在 10 mL 的石油醚中, 体系初始含水量 0.2%(体积比 V/V), 0.100 g 维生素 A 醋酸酯和 0.433 g 棕榈酸乙酯在酶量为 1.1 g 的固定化酶催化下, 在 30°C、190 r/min 下反应 12 h, 转化率可以达到 83%, 固定化酶可连续使用 5 次以上。

关键词: 维生素 A, 维生素 A 棕榈酸酯, 脂肪酶合成, 转酯化

Immobilized Lipase Catalyzed Synthesis of Vitamin A Plamitate

Hongliang Li, Jing Hu, and Tianwei Tan

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

Abstract: The synthesis of vitamin A plamitate in organic solvent with vitamin A acetate and ethyl palmitate with immobilized lipase from *Candida* sp. was studied. The influences of solvent, the molar ratio of substrates, the reaction temperature and time, and the water concentration were optimized and the best result was obtained by transesterification from 0.100 g vitamin A acetate and 0.433 g ethyl palmitic, at 30°C, in 10 mL petroleum ether, containing 0.2% of water (V/V), with 1.1 g lipase. In these conditions, the yield of vitamin A plamitate reached 83% in 12 h. The immobilized lipase was reused about 5 batches.

Keywords: vitamin A, vitamin A plamitate, lipase synthesis, transesterification

维生素 A 是人体必需的营养素之一, 是儿童生长发育过程中必不可少的微量营养素, 它参与机体多种生理过程^[1]。由于其能抗炎、抗氧化、调节免疫、抗皮肤衰老、抗癌等功效已经被广泛应用于化妆品和药物中^[2-5]。但是, 维生素 A 是非常不稳定的, 很容易在空气、光、高温下被氧化。而且维

生素 A 对皮肤有刺激性。为了降低它的不稳定性和刺激性, 可以将维生素 A 转化成维生素 A 酯。各种的化学方法已经用于维生素 A 酯的合成, 但是化学方法经常产生一些有毒物质和副产物, 而且需要高温、高压, 对设备、能耗要求高^[6-8]。酶法避免了这些问题, 具有温和的反应条件、高催化效率和固有

Received: August 20, 2007; **Accepted:** November 14, 2007

Supported by: the National High Tech Research and Development (863 Program) (No. 2006AA020203), Key Project of National Programs for Fundamental Research and Development (973 Program) of China (No. 2007CB714304), the National Natural Science Foundation of China (No. 20576013), National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (No. 20325622).

Corresponding author: Tianwei Tan. Tel: +86-10-64416691; E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2006AA020203)、国家高技术研究与发展计划(973)项目(No. 2007CB714304)、国家自然科学基金(No. 20576013)和国家杰出青年基金(No. 20325622)资助。

的专一性^[9,10]。在众多维生素 A 酯中,维生素 A 棕榈酸酯一种比较稳定、常见的酯类。

Ajima 等人报道了采用聚乙二醇修饰后的脂肪酶作为催化剂,在苯溶剂中,维生素 A 醋酸酯和棕榈酸摩尔比为 1:10 的条件下合成维生素 A 棕榈酸酯,转化率可达到 80%~85%。但该方法催化剂制备复杂、成本高,且用的溶剂有毒。本实验室刘涛报道了用维生素 A 醋酸酯和棕榈酸为底物,用自制的固定化脂肪酶合成维生素 A 棕榈酸酯,转化率达到 75%^[11]。Thierry Maugard 等人报道了合成维生素 A 乳酸酯时,采用 L-乳酸做酰基供体时转化率低于 5%,而采用 L-乳酸甲酯做酰基供体转化率达到 90%^[12]。由此可见,酯类酰基供体有时比酸类酰基供体有更高的转化率。

采用棕榈酸作为酰基供体时,在产品的分离阶段,过量的棕榈酸必须采用加碱、过滤的方法除去,过滤过程会很大的影响产品收率。采用棕榈酸乙酯作为酰基供体时,棕榈酸乙酯比棕榈酸更易溶于有机溶剂,有利于传质。另外,在产品的分离阶段,过量的棕榈酸乙酯可以和未反应的维生素 A 醋酸酯一起采用萃取的方法除去,这样可以简化分离步骤,使产品收率提高。因此,我们对棕榈酸乙酯作为酰基供体进行了研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

维生素 A 醋酸酯(280 万单位),浙江新和成有限公司;棕榈酸,北京化学试剂公司;维生素 A 棕榈酸酯(170 万单位),瑞士罗氏公司;棕榈酸乙酯,北京都利化工公司;固定化假丝酵母酶 *sp*99-125,固定化酶的比活力为 8000 u/g,自制;其余试剂购于北京化学试剂公司。振荡培养箱 SHZ-3,哈尔滨东连电子技术开发有限公司;高效液相色谱仪,岛津 10A;冷冻真空干燥机,德国 Christ 公司。

1.2 固定化脂肪酶的制备

见文献[13]。

1.3 维生素 A 棕榈酸酯的合成

基础反应体系在 25 mL 具塞锥形瓶中进行,加入 0.100 g 维生素 A 醋酸酯,0.260 g 棕榈酸乙酯,1.00 g 固定化酶(自制),10 mL 石油醚,30°C 下振荡反应 12 h,反应时转速为 190 r/min。

1.4 维生素 A 棕榈酸酯的色谱分析

将反应液取样约 0.0330 g,用 10 mL 的甲醇溶解,吸取 20 μ L 样品进样。色谱柱为 Alltech C18 (150 mm \times 4.6 mm, 4.5 μ m),流动相为 100%甲醇,检测器为岛津 10A 紫外检测器,检测波长 327 nm,流速 1 mL/min,计算方法为外标法。

1.5 转化率的测定

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

2 结果与讨论

2.1 转酯化反应进程

本文考察了转酯化反应进程。结果如图 1 所示。随着反应时间的增加,转化率持续的增加,反应到 12 h 时,转化率基本不再增加,反应达到平衡。

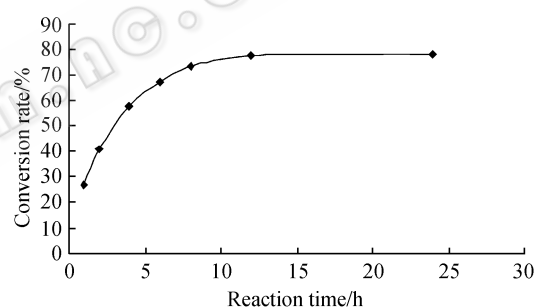


图 1 转酯化反应进程

Fig. 1 Time course of transesterification

the reaction was carried out at 30°C with 0.100 g Vitamin A acetate, 0.260 g ethyl palmitate and 1.000 g immobilized lipase in 10 mL Petroleum ether

2.2 固定化酶用量对转化率的影响

在反应体系中,维生素 A 醋酸酯和棕榈酸乙酯的摩尔比 1:3,加入酶量从 0.3 g 到 2.1 g,30°C 下反应 12 h,结果见图 2。当固定化酶量较低时转化率随酶量增加而增大,当酶量超过 1.1 g 时,转化率基本不变。所以从经济角度考虑,选择 1.1 g 的酶比较合适。

2.3 反应温度对转化率的影响

温度对转化率的影响如图 3 所示。当酶量为 0.700 g 时,转化率随着温度的增加而增大,在 50°C 时转化率达到 75%;当酶量为 1.00 g 时温度对转化率影响不大。可能原因是在酶量少的时候,高温加快反应速度,使转化率较高;在酶量充足时,温度

不能影响转化率, 主要是酶在起作用。但是在高温下酶易失活, 影响酶的使用寿命, 故选择 30°C 为最适温度。

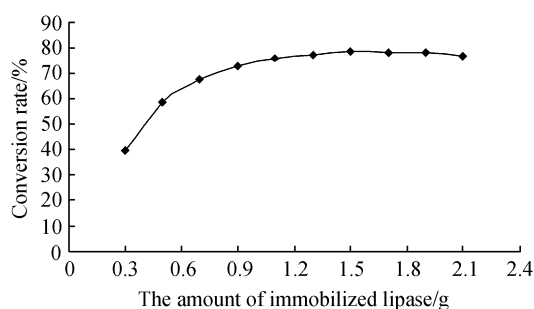


图 2 固定化酶的量对转化率的影响

Fig. 2 Effects of the immobilized lipase on conversion

The reaction was carried out at 30°C with 0.100 g vitamin A acetate, 0.260 g ethyl palmitate in 10 mL petroleum ether with different amount of immobilized lipase for 12 h

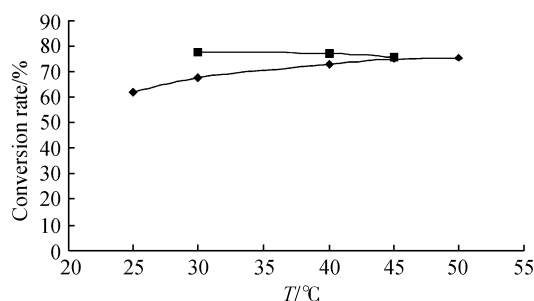


图 3 反应温度对转化率的影响

Fig. 3 Effects of temperature on conversion

The reaction was carried out with 0.100 g vitamin A acetate and 0.260 g ethyl palmitate in 10 mL petroleum ether with different temperature for 12 h

■ amount of immobilized lipase 0.700g; ◆ amount of immobilized lipase 1.000 g

2.4 体系初始水含量对转化率的影响

水含量对有机相酶催化转酯化反应的影响体现在两方面: 一方面, 微量水与酶的水合作用是维持酶催化活性和构型稳定的重要因素; 另一方面, 过量的水会破坏反应的化学平衡, 影响反应速率和产率。反应体系中的水过多会在酶分子周围形成“水簇”, 影响传质, 并导致酶的催化活性降低^[14, 15]。反应前固定化酶经过冷冻干燥, 有机溶剂用无机盐吸水处理, 然后向反应体系中加入一定量的水。反应结果如图 4 所示: 开始时, 转化率随着加水量的增加而增加, 当加水量达到 0.2% (体积分数) 时转化率最大, 超过 0.2% 转化率开始下降。故 0.2% (体积分数) 为最适加水量。固定化酶本身含有一定量的水, 经计算固定化酶含水量为 0.0338 g 水/g 固定化酶, 0.700 g 固定化酶含水量为 0.0236 g, 即 0.0236 mL

水, 接近最适加水量, 所以其他条件的考察都采用未干燥的酶。

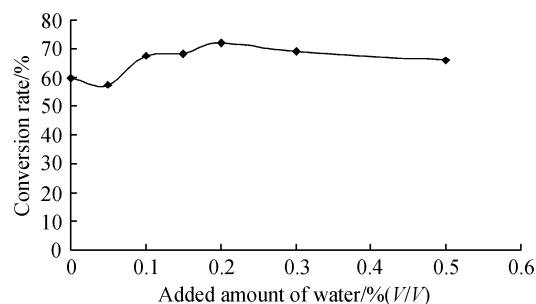


图 4 体系初始水含量对转化率的影响

Fig. 4 Effects of water content on conversion rate

The reaction was carried out at 30°C with 0.100 g Vitamin A acetate, 0.260 g ethyl palmitate and 0.700 g lyophilized immobilized lipase in 10 mL Petroleum ether with different amount of water for 12 h

2.5 底物摩尔比对转化率的影响

脂肪酶催化酯交换反应是可逆反应, 从化学平衡的角度来讲, 提高一种底物的转化率可以使另一种过量, 或在反应中移走某产物。本文对几种不同底物摩尔比进行了比较, 以确定最佳摩尔比。在 10 mL 石油醚中加入维生素 A 醋酸酯的量为 0.3 mmol, 棕榈酸乙酯的量从 0.3~3.6 mmol 变化, 实验结果见图 5。从图中可以看出, 开始时随着底物摩尔比的增加, 转化率也在增加, 当底物摩尔比为 1:7 (维生素 A 醋酸酯/棕榈酸乙酯) 时, 转化率最高达到 85%, 继续增加摩尔比, 转化率略有下降, 可能是过量的棕榈酸乙酯影响传质。当底物摩尔比达到 1:5 时, 转化率达到 83%, 继续增加摩尔比转化率增加缓慢, 而且加入过多的棕榈酸乙酯给后续的分离带来困难, 也造成原料的浪费, 所以综合考虑, 应该采用底物摩尔比为 1:5 比较合适。

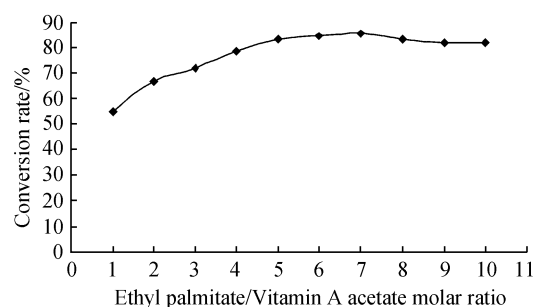


图 5 底物摩尔比对转化率的影响

Fig. 5 Effects of ethyl palmitate/ Vitamin A acetate molar ratio on conversion

The reaction was carried out at 30°C with 1.000 g immobilized lipase in 10 mL Petroleum ether with different ethyl palmitate/ Vitamin A acetate molar ratio for 12 h

2.6 有机溶剂对转化率的影响

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。本研究选取了几种常用的有机溶剂,其相对极性和转化率见表1。从表1可以看出,lg $P > 3.2$ 的有机溶剂转化率都比较高,而lg $P \leq 2.5$ 的有机溶剂转化率很小,这与 Laane^[16]的研究结果基本一致,石油醚做溶剂的转化率最高达到 82.5%。

表1 有机溶剂对转化率的影响

Table 1 Influences of solvents on conversion

Solvent	lgP	Conversion rate/%
Isooctane	4.7	73.3
Nonane	4.5	65
Petroleum ether	4.5	82.5
n-Heptane	4.0	67.6
n-Hexane	3.5	78.6
Cyclohexane	3.2	61
Toluene	2.5	4.9
Chloroform	2.0	0
Tertiary amyl alcohol	1.15	9

The reaction was carried out at 30°C with 0.100 g vitamin A acetate, 0.433 g ethyl palmitate and 1.100 g immobilized lipase in different solvents for 12 h

2.7 反应批次

通过分析不同温度下固定化酶的使用寿命,结果(图6)发现,30°C 下酶的使用寿命高于 40°C 和 45°C,在连续使用5批以后转化率仍然有67%,从第7批开始转化率下降到50%以下,可能是固定化酶在连续使用后酶的构象发生变化,使酶活降低的缘故。

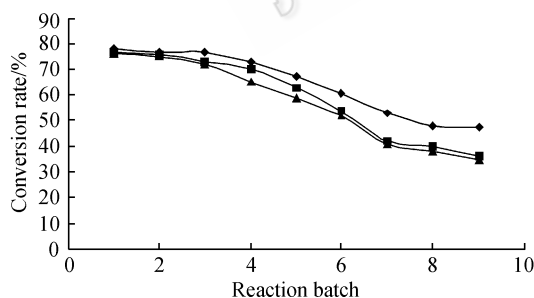


图6 反应批次的影响

Fig. 6 Influences of the reaction batch

The reaction was carried out with 0.100 g vitamin A acetate, 0.260 g ethyl palmitate and 1.000 g immobilized lipase in 10 mL Petroleum ether for 12 h

◆ temperature of reaction 30°C; ■ temperature of reaction 40°C;
▲ temperature of reaction 45°C

3 结论

本文研究了固定化脂肪酶催化合成维生素 A 棕

榈酸酯,采用棕榈酸乙酯做酰基供体与维生素 A 醋酸酯进行转酯化反应生成维生素 A 棕榈酸酯,与采用棕榈酸作酰基供体比较,前者转化率稍高于后者。在分离纯化阶段,采用棕榈酸乙酯可以去掉加碱过滤的步骤,而直接采用有机溶剂萃取分离产品和过量的棕榈酸乙酯;在工业放大上,降低了分离的难度,减少分离步骤,使工业化成为可能。

REFERENCES

- [1] Donald SM, Martin FR. Sight and life manual on vitamin A disorders, 2nd ed. Basel: Task Force Sight and Life. Munich: Zuckschwerdt Publishers, 2001.
- [2] Keller KL, Fenske NA. Uses of vitamins A, C and E and related compounds in dermatology. *J Am Acad Dermatol*, 1998, **39**: 611–625.
- [3] Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr*, 1991, **53**: 194–200.
- [4] Rackett SC, Rothe MJ, Grant-Kels JM. Diet and dermatology, the role of dietary manipulation in the prevention and treatment of cutaneous disorders. *J Am Acad Dermatol*, 1993, **29** (3): 447–461.
- [5] Duffy JA, Teal J, Garrison M, Serban G. US Patent, 5605933, 1997.
- [6] Thierry M, Marie DL. Enzymatic synthesis of derivatives of vitamin A in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, **8**: 275–280.
- [7] Advanced Polymer Systems, Inc. Retinyl esters of α -hydroxy acids for topical improvement of skin function and appearance. WO patent, 97/20812, 1997-06-12.
- [8] Elizabeth AC. US patent, 5885595, 1999-03-23.
- [9] Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol Adv*, 2001, **19**: 627–662.
- [10] Zaks A, Klivanov AM. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 3192–3196.
- [11] Liu T, Yin CH, Tian TW. Lipase catalyzed Synthesis of Vitamin A ester. *Modern Chemical Industry*, 2005, **25**(2): 37–40.
刘涛, 尹春华, 谭天伟. 脂肪酶催化合成维生素 A 酯. 现代化工, 2005, **25**(2): 37–40.
- [12] Thierry M, Joana T, Marie DL. Study of vitamin E synthesis by lipase-catalyzed transesterification in organic media. *Biotechnol Prog*, 2000, **16**: 358–362.
- [13] Yin CH, Liu T, Tan TW. Synthesis of vitamin A E by immobilized *Candida* sp. lipase in organic media. *Chinese J Chem Eng*, 2006, **14**(1): 81–86.
- [14] 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.
- [15] Affleck R, Xu ZF, Suzawa V, Focht K, Clark DS, Dordick JS. Enzymic catalysis and dynamics in low water environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(3): 1100–1104.
- [16] Lanne C, Boeren S, Vos K, Veeger C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology Bioengineering*, 1987, **30**: 81–87.