

脂肪酶催化合成维生素 A 酯

刘 涛, 尹春华, 谭天伟

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要:研究了有机溶剂中脂肪酶催化合成维生素 A 酯。对催化合成维生素 A 棕榈酸酯反应的脂肪酶和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 不含水分的正己烷中,0.200 g 维生素 A 醋酸酯和 0.468 g 棕榈酸在酶量为 10% (指固定化酶与维生素 A 醋酸酯的质量比)的固定化脂肪酶催化下,在 30℃、190 r/min 下反应 6 h,转化率可以达到 75%,固定化酶可连续使用 6 次以上。

关键词:维生素 A;维生素 A 棕榈酸酯;脂肪酶;合成

中图分类号:TQ225.24

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2005)02-0037-04

Lipase catalyzed synthesis of vitamin A esters

LIU Tao, YIN Chun-hua, TAN Tian-wei

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

Abstract: The synthesis of vitamin A esters in organic solvent with a lipase was studied. Novozym 435 was used for the synthesis of vitamin A plamitate. 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 interesterification from 0.200 g vitamin A acetate and 0.468 g palmitic acid, at 30℃, in 10 mL hexane, containing 0% of water (V/V), with 10% of lipase (mass ratio, immobilized lipase to vitamin A plamitate). In these conditions, 75% of vitamin A acetate was converted into vitamin A plamitate. The immobilized lipase was reused about 6 batches.

Key words: vitamin A; vitamin A plamitate; lipase; interesterification

维生素 A 及其衍生物已经广泛应用于化妆品和药物中^[1-5],维生素 A 和维生素 A 醋酸酯是维生素 A 系列中最常用的,但是这两种物质在结构上极不稳定,在光、空气、氧化剂和高温的条件下极易被氧化^[6]。现在已经有大量的研究集中于发展合性质稳定的维生素 A 衍生物,尤其是维生素 A 棕榈酸酯,在一些发达国家已经出现用化学合成制得维生素 A 棕榈酸酯,但是化学法合成不仅存在化学催化剂带来的有毒物质,而且高温、高压条件下很容易发生副反应,产生有毒副作用的产物,同时还有能耗高、对设备和仪器要求高、对环境污染严重等问题^[7-8],酶法合成可以避免这些问题。可用棕榈酸与维生素 A 醋酸酯在脂肪酶(lipase. EC3.1.1.3)的催化下合成,但国内外鲜有报道,笔者研究了有机溶剂中脂肪酶催化合成维生素 A 酯的方法。

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(180 万单位),瑞士罗氏公司;假丝酵母酶 sp 99-125、根霉和硅藻土固定化假丝酵母 sp 99-125,自制;Novozym 435、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。

振荡培养箱 SHZ-3,哈尔滨东连电子技术开发有限公司,反应时转速为 190 r/min;高效液相色谱仪,岛津 10A。

1.2 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 0.200 g 维生素 A 醋酸酯,0.468 g 棕榈酸,0.020 g Novozym 435 酶,10 mL 正己烷,30℃下振荡反应 6 h。酯化率以反应体系内转酯化生成维生素 A 棕榈酸酯的量计。

1.3 维生素 A 棕榈酸酯的色谱分析

将反应液取样约 0.100 g,用 25 mL 的甲醇溶解,吸取 20 μ L 样品进样。色谱柱为 Alltech C₁₈ (250 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 327nm,流速 1 mL/min,计算方法为外标法。

收稿日期:2004-10-15

基金项目:国家“十五”攻关项目(No. 2001BA708B03-08);国家“863”项目(No. 2002AA514030);国家“973”项目(No. 2003CB716002)资助

作者简介:刘涛(1979-),男,硕士生;谭天伟(1963-),男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为生物化学工程及酶工程,通讯联系人,010-64416691, tantw@mail.buct.edu.cn。

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,维生素 A 醋酸酯与棕榈酸的摩尔比为 3:1,温度为 25℃,10 mL 正己烷中,反应 24 h,结果见表 1。由表 1 可看出,Novozym 435 作为催化剂酯化率达到最高,为 75.8%,硅藻土固定化假丝酵母的酯化率为 51.6%,游离假丝酵母作为催化剂的酯化率为 46.0%,但根霉和猪胰脂肪酶却表现出很低的活性,催化合成的维生素 A 棕榈酸酯低至检测不出,故选择 Novozym 435 作为体系反应的催化剂。

表 1 酶的种类对酯化反应的影响

酶	转化率/%
Novozym 435	75.8
Lipozyme RM IM	32.3
LA 201056	46.8
Lipozyme TL IM	28.2
Procine Pancreas	0
来自 <i>Candida</i> sp.99-125 的酶	46.0
来自 <i>Rhizopus arrhizus</i> 的酶	0
固定化酶来自 <i>Candida</i> sp.99-125	51.6

2.2 有机溶剂的影响

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。Laane^[9]用有机溶剂的极性参数 $\lg P$ 来描述有机溶剂对酶反应的影响($\lg P$ 是该有机溶剂在正辛醇/水体系中分配系数的对数)。笔者试验了 5 种常用的有机溶剂,其相对极性和酯化率见表 2。

表 2 溶剂对反应的影响

溶剂	$\lg P$	转化率/%
正己烷	3.5	75.4
石油醚	≈ 3.5	72.8
环己烷	3.0	68.2
苯	2.0	54.7
特戊醇	1.15	9.6
四氢呋喃	0.49	0
乙醇	-0.24	0

由表 2 可见,在其他条件相同的前提下,酯化率与溶剂的疏水性大小次序基本上是一致的,正己烷是较理想的反应介质。

2.3 底物摩尔比的影响

脂肪酶催化酯交换反应是可逆反应,如欲彻底反应,必须使反应物过量,或在反应中移走某产物。笔者对几种不同底物摩尔比进行了比较,以确定最佳摩尔比。在实验中固定维生素 A 醋酸酯的浓度为 6 mmol/L,而棕榈酸的浓度从 6~60 mmol/L 间变化,结果见图 1。从图 1 中可以看出随着维生素 A

(上接第 36 页)

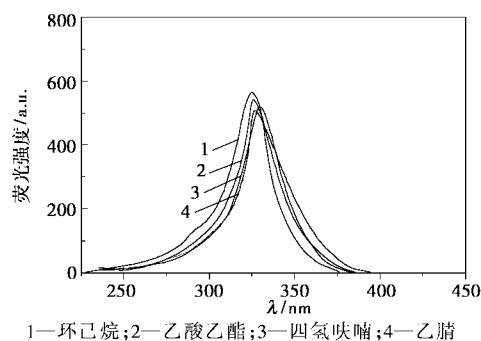


图 7 BPA 在不同溶剂中的荧光发射光谱图

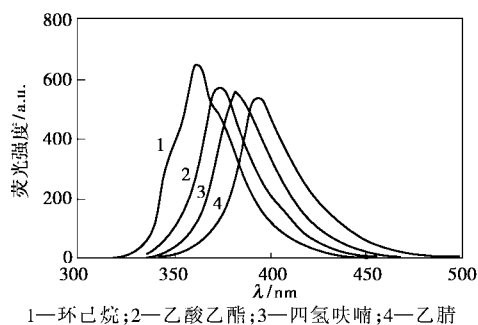


图 8 BPAA 在不同溶剂中的荧光发射光谱图

比较例外的是四氢呋喃中的荧光发射峰出现了与其极性相比出乎寻常的红移,峰值为 394 nm,比乙腈(380 nm)还高,这是因为化合物中的氨基与四氢呋喃形成了氢键。

比较图 6 和图 8 可以看到,同未双键化的化合物 BPA 相比,BPAA 吸收谱图和荧光谱图的峰值和波形基本保持不变,不同的是同样浓度时荧光强度有所降低,但仍具有较高的荧光强度,说明含双键的荧光单体的荧光量子发射产量有所降低,表现出一定的荧光结构自猝灭效应。

参考文献

- [1] Erk C. [J]. Ind Eng Chem Res, 2000, 39(10): 3582 - 3588.
- [2] 李建宇. [J]. 现代化工, 2001, 21(4): 13 - 16.
- [3] 蔡超, 吴大成, 郭睿威. [J]. 工业水处理, 2003, 23(11): 5 - 8.
- [4] 高振衡, 周一民, 王明真, 等. [J]. 高等学校化学学报, 1980, 1(1): 61 - 65.
- [5] 彭兆快, 杨国强. [J]. 高等学校化学学报, 1996, 17(9): 1424 - 1427. ■

醋酸酯与棕榈酸的摩尔比增加,酯化率也在增加,并且当维生素A醋酸酯与棕榈酸的摩尔比达到1:3时,酯化率达到最高。酸的物质的量继续增加,酯化率几乎不再增加。

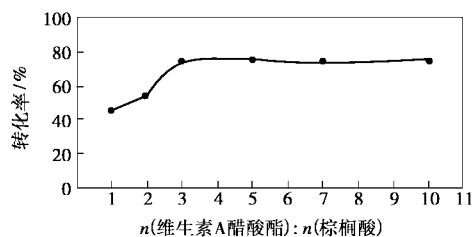


图1 底物摩尔比对酯化反应的影响

2.4 反应温度的影响

温度对 Novozym 435 酶催化维生素A醋酸酯与棕榈酸的转酯化反应的影响如图2所示,可见最适反应温度为25℃。这是由于在低温条件下 Novozym 435 酶的活性比较低,而当温度高于25℃时,温度对维生素A醋酸酯的稳定性有影响,在高温条件下维生素A和维生素A醋酸酯容易分解。

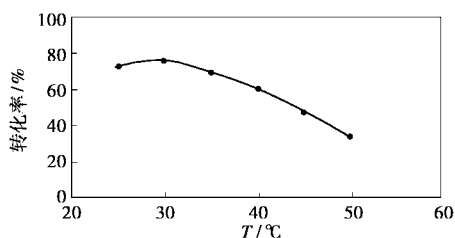


图2 温度对酯化反应的影响

2.5 体系最初含水量的影响

对于有机相中的酶促反应,水是维持酶活力所必需的^[10],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^[11]。图3为 Novozym 435 酶在正己烷中催化维生素A醋酸酯与棕榈酸反应时,初始含水量对转酯化反应的影响。

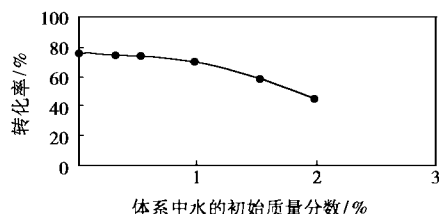


图3 体系最初含水量对反应的影响

由图3可知,在无水的反应体系中,酯化率最高;随着水的加入,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,而正己烷的极性小不足以夺去它的必需水,因此水含量的增加,提高了水的浓度,增加了水解副反应

(从谱图可以看出维生素A的含量明显增加),对酶催化反应不利;另一方面随着水含量的增加,Novozym 435 酶会聚集在一起不能分散,因此影响了整个反应的传质。

2.6 酶量对反应的影响

在反应体系中,维生素A醋酸酯和棕榈酸的摩尔比设定为1:3,固定化酶的用量从2.5%~50.0%,30℃下反应6h,反应结果见图4,故在反应体系中选择10%为酶最适用量。

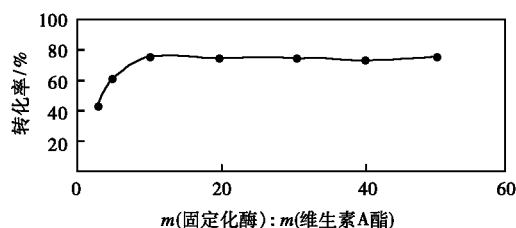
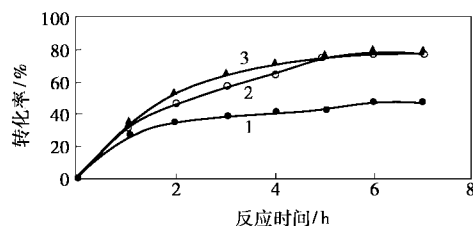


图4 酶量对酯化反应的影响

2.7 酯化反应的进程

考察3种不同摩尔比的酯化反应进程,如图5所示。



维生素A醋酸酯和棕榈酸的摩尔比:1—1:1;2—1:3;3—1:5

图5 酯化反应的进程

反应系统由0.200g维生素A醋酸酯、0.020g固定化酶和10mL正己烷组成,维生素A醋酸酯和棕榈酸的摩尔比分别为1:1、1:3和1:5。体系随着摩尔比的增加,转化率在逐渐增加,反应6h后,酯化率的增长趋于平缓。

2.8 固定化酶的使用寿命

考察 Novozym 435 酶的重复使用寿命(见图6),按基础反应体系连续反应6批后,反应转化率仍维持在65%以上,当反应到第7批时,转化率就快速下降。这可能是由于醋酸的生成对酶的失活影响较大的缘故。

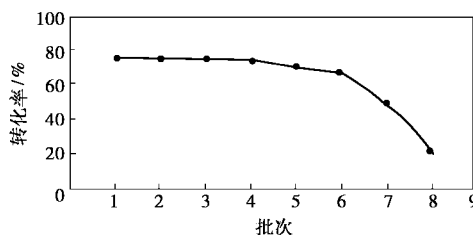


图6 固定化酶的批次反应

2.9 其他维生素 A 酯的合成

笔者通过优化条件还考察了其他维生素 A 酯的合成,如中长链脂肪酸、不饱和脂肪酸,结果见表 3(溶剂为正己烷,反应 6 h),可看出维生素 A 醋酸酯与各脂肪酸在优化条件下以较高的转化率可合成各种维生素 A 酯。

表 3 不同脂肪酸底物时维生素 A 酯的合成

脂肪酸底物	转化率/%	脂肪酸底物	转化率/%
月桂酸	68.2	油酸	78.6
豆蔻酸	72.6	亚油酸	76.1
棕榈酸	75.8	亚麻酸	69.5
硬脂酸	80.0		

3 结语

研究了用固定化脂肪酶催化合成维生素 A 酯如维生素 A 棕榈酸酯、维生素 A 油酸酯等。对催化合成维生素 A 棕榈酸酯反应的酶种和介质进行筛选,发现最佳酶种为 Novozym 435 酶,最佳介质为正己烷。确定了最适反应条件:在 10 mL 无水正己烷中,0.200 g 维生素 A 醋酸酯和 0.468 g 棕榈酸在酶量为 10%(固定化酶与维生素 A 醋酸酯的质量比)的固定化脂肪酶催化下,温度为 30℃,转速为

190 r/min,反应 6 h,转化率可以达到 75%,固定化酶可连续使用 6 批以上。

参考文献

- [1] Keller K L, Fenske N A. [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 39: 611 - 625.
- [2] Kligman M D. [J]. *Postgrad Med*, 1997, 102: 115 - 118.
- [3] Di Mascio P, Murphy M E, Sies H. [J]. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53: 194 - 200.
- [4] Rackett S C, Rothe M J, Grant-Kels J M. [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1993, 29(3): 447 - 461.
- [5] Bertram J S. Cancer prevention by retinoids and carotenoids; proposed role of gap junctional communication[A]. *Vitamins and minerals in the prevention and treatment of cancer*[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991. 31 - 50.
- [6] Hong W K, Itri M I. The retinoids, biology, chemistry and medicine [M]. 2nd ed. New York: Raven press, 1994. 597 - 630.
- [7] Advanced Polymer Systems, Inc. Retinyl esters of α -hydroxy acids for topical improvement of skin function and appearance [P]. WO 97/20812, 1997 - 06 - 12.
- [8] Elizabeth Arden Co, Division of Conopco, Inc. Cosmetic composition with a retinol fatty acid ester [P]. US 5885595, 1999 - 03 - 23.
- [9] Lanne C, Boeren S, Vos K, et al. [J]. *Biotechnology Bioengineering*, 1987, 30: 81 - 87.
- [10] Halling P J, Valivety R H. [J]. *Prog biotechnol*, 1992, 8: 13 - 21.
- [11] Affleck R, Xu Z F, Suzawa V, et al. [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89(3): 1100 - 1104. ■

第二届全国化学工程与生物化工年会

(第一轮)会议通知

第二届全国化学工程与生物化工年会将于 2005 年 10 月 27—31 日在北京召开,会议由北京化工大学和中国科学院过程工程研究所共同承办。会议主题为化工/生物化工科学技术与可持续发展。年会的主要目的是交流在化工科学与技术各个分支领域的最新研究成果,讨论它们的现代论题和方法;特别强调与推动面向经济、社会可持续发展,与相关学科交叉的化工科学与技术研究。本次会议将有多位两院院士和国际著名学者出席并作大会报告,会议期间还拟举行重大、前沿领域的专题研讨会,部分跨国公司、国内大公司人力资源部门负责人与参会人员积极参加会议。

征文范围

(1)化学/生化科学与工程:化工热力学与物性数据;化工流体力学与传热;传质与分离工程;催化与生物催化;化学反应与生化反应工程;基因工程与组织工程;细胞培养与发酵工程;酶工程与酶制剂;生物分离工程与工艺;过程系统工程;过程模型化、模拟与控制。鼓励在上述领域内微、介观层次的研究,鼓励计算化学工程方法的发展与应用。

(2)面向可持续发展的化工科学技术与高等教育:绿色与可持续发展化学工艺与工程;生物制品;资源化学工程/资源生物工程;能源化学工程/能源生物工程;环境化

学工程/环境生物工程;材料化学工程/材料生物工程;化工安全工程;可持续发展战略的工业实践;可持续发展与化工高等教育。

会议有关时间表

- 2005 年 1 月 20 日,第一轮通知;
- 2005 年 4 月 30 日,摘要截止日期;
- 2005 年 5 月 30 日,第二轮通知(接受摘要);
- 2005 年 8 月 30 日,论文截稿日期;
- 2005 年 9 月 25 日,会议第三轮通知,并进行预注册;
- 2005 年 10 月 27 日,参会人员报到及注册。

会议日程及会务费

2005 年 10 月 27 日报到,28—30 日开会,31 日北京市区学术参观考察。会议将安排大会特邀报告、专题报告、分会报告及墙报。

版面费 100 元(论文集,论文光盘);学生代表注册费 450 元;其他代表注册费 650 元,住宿自理。

投稿联系方式

- 地址:北京市北三环东路 15 号
- 名称:北京化工大学学报编辑部 邮编:100029
- 联系人:曾宪玉、朱晓群
- 电话:010 - 64434926 传真:010 - 64419619
- e-mail:ncbe@mail.buct.edu.cn
- 会议网址: <http://www.ncbe.buct.edu.cn>

第二届全国化学工程与生物化工年会组委会