

新型固定化脂肪酶 ANL-MARE 催化制备 L-抗坏血酸棕榈酸酯及其工艺优化

蓝秋桔¹, 康梦¹, 黄海城¹, 李一峰², 周锦兰², 刘果³, 曹庸^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642) (2. 广东惠籽生物科技有限公司, 广东广州 510642) (3. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510225)

摘要: L-抗坏血酸棕榈酸酯 (L-AP) 是获批用于婴幼儿食品的脂溶性抗氧化剂。针对目前 L-AP 化学合成法污染大、酶法合成效率有限的问题, 该试验探究了新型固定化脂肪酶 ANL-MARE 催化酯化合成 L-AP 的方法。试验以 L-抗坏血酸 (L-AA) 和棕榈酸 (PA) 为底物, 叔丁醇为反应溶剂, 建立了 ANL-MARE 催化制备 L-AP 的高效工艺。经单因素和正交试验优化, 获得了 L-AP 的最佳合成工艺: L-AA 与 PA 的摩尔比 1:7, 固定化脂肪酶 ANL-MARE 质量浓度 50 g L^{-1} , $3 \text{ \AA}$ 分子筛质量浓度 250 g L^{-1} , 反应温度 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 反应时间 7 h。此条件下 L-AP 的转化率可达 90.47%, 相对纯度达 70.64%。此外, 固定化酶 ANL-MARE 在最优工艺下连续催化 10 批次后, 转化率仍保持在 70% 以上, 展现出明显优于商业酶 Novozym 435 的操作稳定性和重复使用性。用柱层析法进行 L-AP 的分离纯化, 得到 L-AP 的纯度为 92.24%。综上, 固定化酶 ANL-MARE 具有高效催化制备 L-AP 的优势, 该研究为 L-AP 的规模化酶法生产及产业化应用提供了新的理论依据和工艺基础。

关键词: L-抗坏血酸棕榈酸酯; 酶法合成; 固定化脂肪酶; ANL-MARE; 工艺优化

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0795

Synthesis of L-Ascorbyl Palmitate Via Catalyzed by Novel Immobilized Lipase ANL-MARE and Optimization of Its Process

LAN Qiuju¹, KANG Meng¹, HUANG Haicheng¹, LI Yifeng², ZHOU Jinlan², LIU Guo³, CAO Yong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China) (2. Guangdong Huizi Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510642, China) (3. College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: L-Ascorbyl palmitate (L-AP) is recognized as a lipid-soluble antioxidant and has been approved for use in infant food. In response to the problems of high pollution in the chemical synthesis method of L-AP and the limited efficiency of enzymatic synthesis, a new method of catalyzing the esterification synthesis of L-AP using immobilized lipase ANL-MARE was explored. L-ascorbic acid (L-AA) and palmitic acid (PA) were used as substrates, and tert-butanol was used as the reaction solvent. A highly efficient process for the preparation of L-AP using ANL-MARE catalysis was established. Through single-factor and orthogonal experiments, the optimal synthesis process of L-AP was determined, under which a molar ratio of L-AA to PA of 1:7, an immobilized lipase ANL-MARE mass concentration of 50 g L^{-1} , a $3 \text{ \AA}$ molecular sieve mass concentration of 250 g L^{-1} , a reaction temperature of $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and a reaction time of 7 h were employed. Under these conditions, a conversion rate of L-AP of 90.47% was achieved, and a relative purity of 70.64% was obtained. Moreover, after continuous catalysis for 10 batches under the optimal process, a conversion rate of the immobilized enzyme ANL-MARE was maintained above 70%, and significantly better operational stability and reusability were demonstrated compared to the commercial enzyme Novozym 435. L-AP was separated and purified by column chromatography, and a purity of 92.24% was achieved. In summary, the advantage of efficient catalytic synthesis of L-AP is exhibited by the immobilized enzyme ANL-MARE. A new theoretical basis and process foundation for the large-scale enzymatic production and industrial application of L-AP are provided by this research.

收稿日期: 2026-05-23; 修回日期: 2026-07-13; 接受日期: 2026-07-13

基金项目: 广东省功能食品活性物重点实验室 (2018B030322010)

作者简介: 蓝秋桔 (2002-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: qiuju_lan02@163.com

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学、天然产物化学, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

Key words: L-ascorbyl palmitate; enzymatic synthesis; immobilized lipase; ANL-MARE; process optimization

抗坏血酸棕榈酸酯 (L-ascorbyl palmitate, L-AP) 又称为维生素 C 棕榈酸酯, 是 L-抗坏血酸 (L-ascorbic acid, L-AA) 的脂溶性衍生物, 已被世界卫生组织和欧洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 批准为唯一可用于婴幼儿配方食品中的抗氧化剂^[1]。L-AP 由 L-AA 的 6 位 C 上-OH 与棕榈酸 (Palmitic acid, PA) 经酯化反应制得, 其两亲性分子结构既保留了抗坏血酸优异的抗氧化能力, 又因 PA 长链烷基的引入增强了脂溶性和表面活性^[2,3]。作为一种高效的脂溶性抗氧化剂、乳化剂及营养强化剂, L-AP 已广泛应用于食用油、婴幼儿配方奶粉、化妆品及医药等领域^[4,5]。此外, L-AP 在体内代谢生成 L-AA 和 PA, 可为细胞膜等脂质结构提供抗氧化保护, 表现出清除自由基、抗衰老及抗肿瘤等健康功效^[6,7]。因此, 高纯度 L-AP 的绿色高效制备具有重要的研究价值和应用前景。

根据催化剂的不同, L-AP 的合成工艺主要分为化学合成法和生物酶法两种。化学法以浓硫酸为催化剂进行直接酯化或以酰氯进行酯化, 工艺虽较为成熟, 但普遍存在浓硫酸用量大、设备腐蚀强、副产物多、产物分离纯化困难等问题, 且高浓度酸对食品安全构成潜在隐患^[8]。与之相比, 酶催化法以反应条件温和、专一性强、绿色安全等优势日益受到研究者关注^[9,10]。Lerin 等^[11]以 Novozym 435 为催化剂在叔丁醇体系中催化酯化合成 L-AP, 得率可达 67%。姜新慧等^[12]以固定化洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶 (*Burkholderia cepacia* lipase) 催化, 在叔丁醇中反应 48 h, L-AP 转化率达 89.5%, 且酶可循环使用 10 次。Zhang 等^[13]将南极念珠菌脂肪酶 B (*Candida antarctic* lipase B, CALB) 固定在疏水修饰的有序介孔二氧化硅上, 催化合成不同抗坏血酸脂肪酸酯, 转化率为 71.8%~76.8%。Li 等^[6]将黑曲霉脂肪酶固定于树脂, 在二氧环己烷中反应 24 h, L-AP 转化率为 83.6%。吕欣等^[14]以羧甲基纤维素固定化假单胞菌脂肪酶 (*Pseudomonas cepacia* lipase, PCL) 催化反应 24 h, 转化率达 85.3%。然而, 现有酶催化法反应时间普遍在 24 h 以上, 且存在催化剂成本高、产率难以突破 90%等问题, 制约了其规模化应用^[15-18]。

本研究团队前期成功研发出具有高催化效率和稳定性的新型固定化脂肪酶 ANL-MARE, 已在油脂改性等领域展现出替代进口商业酶的潜力^[19-21]。本研究首次将 ANL-MARE 应用于水溶性维生素的酯化改性, 以 L-AA 和 PA 为底物, 在叔丁醇体系中系统考察底物摩尔比、分子筛质量浓度、酶质量浓度、温度及时间对 L-AP 合成的影响, 通过正交试验优化获得最佳工艺条件, 同时探究固定化酶的操作稳定性, 确定 L-AP 的分离纯化方法, 以期 L-AP 的绿色、高效、规模化酶法生产提供科学依据和工艺参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

分析纯 L-AA、PA, 色谱纯冰乙酸, 购自上海麦克林生化科技有限公司; 分析纯 3Å 分子筛、叔丁醇, 购自天津福晨化学试剂有限公司; 固定化脂肪酶 ANL-MARE (源于黑曲霉脂肪酶 *Aspergillus niger* lipase, 固定在大孔丙烯酸树脂上), 由广东省功能食品活性物重点实验室提供; 分析纯正己烷、乙酸乙酯、甲酸, 购自天津富宇试剂公司; 薄层硅胶板 (G 板, 5×10 cm)、柱层析硅胶 (200~300 目), 购自广州卯林试剂公司; 色谱纯乙腈, 购自美国 BCR 试剂公司; 色谱纯 L-AA、PA、L-AP, 购自上海源叶生物技术有限公司; 商业固定化脂肪酶 Novozym 435, 购自丹麦诺维信公司。

1.2 主要仪器与设备

AB204-S 型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; FWS-30 型多功能水浴摇床, 101-1AB 型卧式干燥箱, DZ-1BCII 型真空干燥器, 河北 Faithful 仪器有限公司; UC-10 型数码超声波清洗机, 广州佰博公司; SHZ-D (III) 型循环水式真空泵, 河南予华仪器有限公司; STD-RUP20 型超纯水机, 成都浩康科技有限公司; LC-20AD XR 型高效液相色谱仪 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)、配 SPD-M40 型光电二极管阵列检测器 (Photo-Diode Array, PDA), 日本岛津公司; Acclaim 120 Å C₁₈ 液相色谱柱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; RE-52A 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 L-AP 酶促酯化合成的单因素实验

参考张甜甜^[4]和 Manish 等^[5]酶法合成 L-AP 的方法, 优化影响反应的几个关键因素, 采用以下步骤进行。首先称取 3Å 分子筛 25 g, 置于 105 °C 烘箱中活化 8 h, 将一部分 3Å 分子筛加入到 60 mL 叔丁醇中脱水平衡 24 h, 剩余 3Å 分子筛置于真空干燥器中待用。随后将一定量活化过的 3Å 分子筛 (质量浓度 50、100、150、200、250、300 g L⁻¹) 与按一定摩尔比添加的 L-AA (固定为 5 mmol) 与 PA (1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8) 加入 50 mL 脱水处理的叔丁醇中, 于 150 mL 具塞锥形瓶中在 55 °C 下混合溶解, 再向体系中加入一定质量浓度的固定化酶 ANL-MARE (10、20、30、40、50、60 g L⁻¹), 在一定的水浴温度下 (40、45、50、55、60、65 °C), 以 150 r min⁻¹ 的转速反应一定时间 (3、4、5、6、7、8 h), 整个反应避光进行。反应结束后, 真空抽滤除去酶和分子筛, 获得酶促酯化的产物混合液, 通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 转移至棕色进样瓶中, 用 HPLC 按一定的色谱条件进行检测。通过单因素试验, 以 L-AP 的转化率与相对纯度为指标, 评价固定化酶 ANL-MARE 催化合成 L-AP 的效果, 并确定合适的因素与水平。所有实验均做三次平行, 具体反应参数如下:

(1) 考察底物摩尔比对合成 L-AP 的影响: 3Å 分子筛质量浓度为 200 g L⁻¹, 固定化酶 ANL-MARE 质量浓度为 40 g L⁻¹, 反应温度为 55 °C, 反应时间为 6 h, 底物摩尔比为 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8。

(2) 考察 3Å 分子筛质量浓度对合成 L-AP 的影响: 底物摩尔比为 1:5, 固定化酶 ANL-MARE 质量浓度为 40 g L⁻¹, 反应温度为 55 °C, 反应时间为 6 h, 3Å 分子筛质量浓度为 50、100、150、200、250、300 g L⁻¹。

(3) 考察固定化酶 ANL-MARE 质量浓度对合成 L-AP 的影响: 底物摩尔比为 1:5, 3Å 分子筛质量浓度为 200 g L⁻¹, 反应温度为 55 °C, 反应时间为 6 h, 固定化酶 ANL-MARE 质量浓度为 10、20、30、40、50、60 g L⁻¹。

(4) 考察反应温度对合成 L-AP 的影响: 底物摩尔比为 1:5, 3Å 分子筛质量浓度为 200 g L⁻¹, 固定化酶 ANL-MARE 质量浓度为 40 g L⁻¹, 反应时间为 6 h, 反应温度为 40、45、50、55、60、65 °C。

(5) 考察反应时间对合成 L-AP 的影响: 底物摩尔比为 1:5, 3Å 分子筛质量浓度为 200 g L⁻¹, 固定化酶 ANL-MARE 质量浓度为 40 g L⁻¹, 反应温度为 55 °C, 反应时间为 3、4、5、6、7、8 h。

1.3.2 L-AP 酶促酯化合成的正交实验优化

根据单因素实验的结果, 进行正交优化分析, 固定反应温度为 45 °C、反应时间为 7 h, 选择对 L-AP 的转化率和相对纯度有显著影响的 3 个因素: L-AA 与 PA 的底物摩尔比 (A)、3Å 分子筛质量浓度 (B)、固定化酶质量浓度 (C), 进行三因素三水平的正交实验, 对 L-AP 酶法合成的工艺参数进行优化。各个因素的水平见表 1。

表 1 酶促酯化合成 L-AP 正交实验因素与水平

Table 1 The factors and levels of the orthogonal experiment for Enzymatic esterification synthesis of L-AP

因素	水平		
	1	2	3
A 底物摩尔比	1:6	1:7	1:8
B 3Å 分子筛质量浓度/(g L ⁻¹)	200	250	300
C 固定化酶质量浓度/(g L ⁻¹)	40	50	60

1.3.3 L-AP 的高效液相色谱分析

1.3.3.1 L-AP 的产物分析

精确吸取 60 μL 产物混合液, 用 90% (φ) 色谱级乙腈溶液稀释至 1.5 mL, 充分混匀后通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 使用 HPLC 进行检测。

色谱条件参考 Li 等^[6]和陆志芸等^[8]的方法并稍作调整。色谱柱为 Acclaim 120Å C₁₈ 液相色谱柱 (5 μm, 4.6×250 mm); 柱温为 30 °C; 流动相的 A 相为 0.1%冰乙酸水 (φ), B 相为乙腈, 以乙腈:0.1%冰乙酸水=90:10 (V/V)、流速为 1 mL·min⁻¹, 等度洗脱 30 min。检测波长为 244 nm, 进样量为 10 μL。L-AP 的定性分析利用标准品和样品的色谱峰保留时间的对比, 定量分析采用外标法对 L-AP 的含量进行测定, 计算转化率, 采用峰面积归一化法计算 L-AP 的相对纯度, 计算公式如式 (1)、(2) 所示。

$$C = \frac{N_{L-AP}}{N_{L-AA}} \times 100\% \quad (1)$$

$$R = \frac{A_{L-AP}}{\sum (A_{L-AA} + A_{L-AP} + A_{PA})} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C ——酯化生成 L-AP 的转化率, %;

N_{L-AP} ——生成的 L-AP 物质的量, mmol;

N_{L-AA} ——加入的 L-AA 物质的量, mmol;

R ——生成的 L-AP 相对纯度, %;

A_{L-AA} ——HPLC 测得的 L-AA 峰面积;

A_{L-AP} ——HPLC 测得的 L-AP 峰面积;

A_{PA} ——HPLC 测得的 PA 峰面积。

1.3.3.2 L-AP 定量标准方程的建立

参考张甜甜^[4]和 Li 等^[6]的方法, 并作适当修改。精准称取 L-AP 标准品 0.1 g 溶于色谱级乙腈中, 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 充分混匀, 得 L-AP 标准储备液。取一定量 L-AP 标准储备液, 用流动相进行稀释, 分别配制成质量浓度为 50、100、150、200、250 mg L⁻¹ 的系列标准溶液, 混匀后通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 滤液按 1.3.3.1 的色谱条件进行测定。每个浓度点重复 3 次, 以 L-AP 质量浓度 (mg L⁻¹) 为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制 L-AP 的标准曲线, 并拟合回归方程。

1.3.4 固定化酶 ANL-MARE 与商业酶的比活力对比

参考 GB/T 23527.2-2025《酶制剂质量要求 第 2 部分: 脂肪酶制剂》中的附录 A (滴定法): 取 2 个 50 mL 锥形瓶, 分别加入 4 mL 聚乙烯醇-橄榄油乳化液和 5 mL 0.025 mol L⁻¹ 的磷酸缓冲液 (pH 值 7.5), 空白组加入 95% 乙醇溶液 (φ) 15 mL, 于 40 °C 水浴中预热 5 min。向两个瓶中各加酶样 1 g 左右后立即混匀, 准确反应 15 min 后, 于样品瓶中立即加入 95% 乙醇溶液 (φ) 15 mL 以终止反应。取出锥形瓶, 各加两滴 10 g L⁻¹ 酚酞指示液, 用 0.05 mol L⁻¹ 氢氧化钠标准溶液滴定至微红色并保持 30 s 不褪色为滴定终点, 记录氢氧化钠标准溶液的消耗体积。两种固定化酶的酶活力按下式 (3) 计算:

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 50 \times n}{0.05 \times 15} \quad (3)$$

式中:

X ——样品的酶活力, U·g⁻¹;

V_1 ——滴定样品溶液消耗的氢氧化钠标准溶液体积, mL;

V_0 ——滴定空白组消耗的氢氧化钠标准溶液体积, mL;

c ——氢氧化钠标准溶液浓度, mol L⁻¹;

n ——样品的稀释倍数;

50——0.05 mol L⁻¹ 氢氧化钠标准溶液 1 mL 相当于脂肪酸 50 μmol;

0.05——氢氧化钠标准溶液的换算系数;

15——反应时间 15 min。

1.3.5 固定化酶 ANL-MARE 与商业酶的重复使用性比较

每次反应结束后, 抽滤分离固定化酶, 筛除 3 Å 分子筛, 以适量叔丁醇洗涤固定化酶表面残留产物, 每次用 10 mL 的叔丁醇进行洗涤, 洗涤 3 次, 真空干燥后投入下一批反应。连续操作 10 个批次, 以 L-AP 转化率为评价指标, 比较实验室自制的固定化酶 ANL-MARE 与商业酶 Novozym 435 的重复使用性。

1.3.6 L-AP 的分离纯化

参考 Xu 等^[22]和 Jun 等^[3]的方法并稍加修改: 反应结束后, 抽滤除去固定化酶和分子筛, 以适量叔丁醇洗涤酶表面残留产物, 将产物混合液转至烧瓶中, 在 50 °C、150 r min⁻¹ 下旋蒸除去叔丁醇。所得固体用乙酸乙酯充分溶解后转入分液漏斗中, 用超纯水洗涤数次至中性, 在此期间用前期摸好的薄层色谱 (Thin-layer chromatograms, TLC) 条件 (二氯甲烷: 甲醇: 甲酸=20:2:1, V/V/V, 如图 1a 所示) 检验 L-AA 是否已完全除去。合并有机相, 加入足量无水硫酸钠后混匀、过滤, 上清液经旋蒸除去乙酸乙酯, 得到 L-AP 和 PA 的混合物。以纯度为指标, 比较正

己烷萃取和柱层析两种方法的分离纯化效果。称取适量产物溶于适量 90% (ϕ) 色谱纯乙腈溶液中, HPLC 色谱条件同 1.3.3.1, 采用外标法计算产物纯度, 计算公式如下式 (4) 所示。

$$P = \frac{m_0}{m_1} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

P ——产物 L-AP 的纯度, %;

m_0 ——外标法测得的 L-AP 质量, g;

m_1 ——反应得到的 L-AA 质量, g。

1.3.6.1 正己烷萃取分离纯化 L-AP

参考夏木西卡玛尔等^[23]的方法: 因 L-AP 与 PA 的极性差异较大, 根据相似相溶原理, 二者在小极性的正己烷中溶解度差异大, 室温下前者几乎不溶于正己烷, 而后者易溶于正己烷, 故产物混合物用温热 (50~60 °C) 的正己烷洗涤数次, 所得固体经真空干燥后, 即得目标产物 L-AP。

1.3.6.2 硅胶柱层析法分离纯化 L-AP

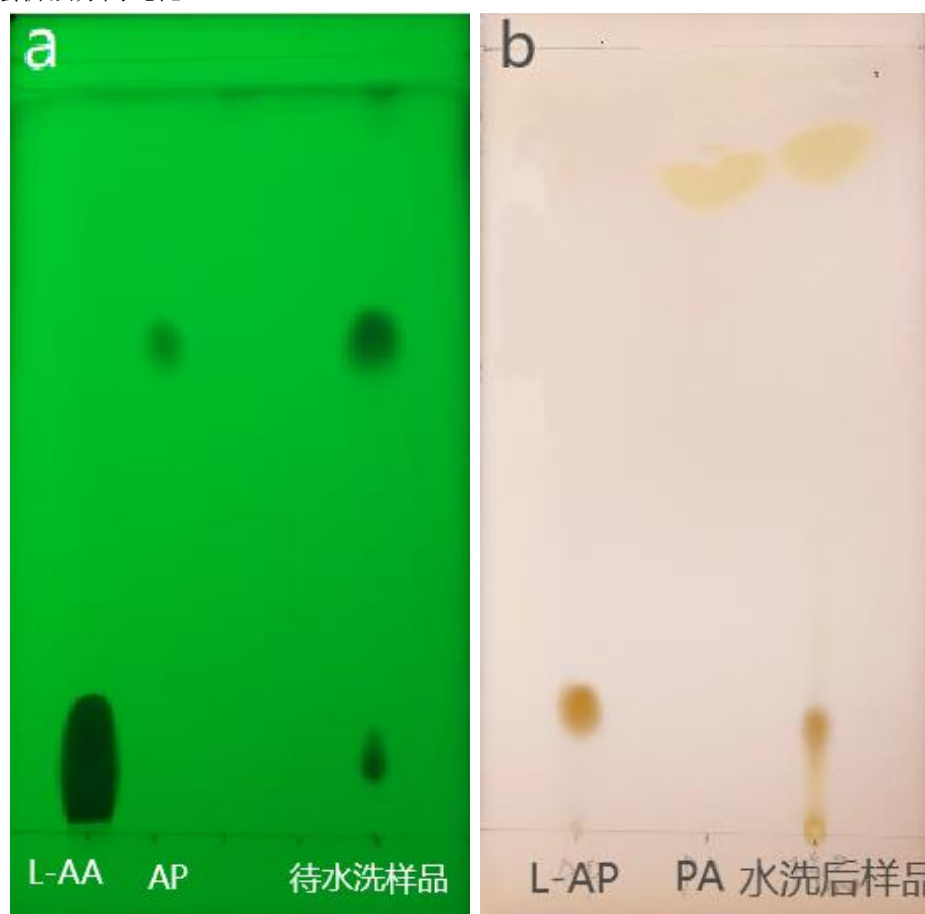


图 1 L-AA、L-AP、PA 和待分离样品的薄层色谱图

Fig.1 TLC chromatograms of L-AA, L-AP, PA, and the unseparated sample

注: (a) L-AA、L-AP、PA 和待水洗样品的薄层色谱图; (b) L-AA、L-AP、PA 和未柱层析分离的样品的薄层色谱图。

不同化合物的结构和性质存在差异, 故其在硅胶上的吸附与解吸性能不同。一般情况下极性较大的物质易被硅胶吸附, 而极性较弱的物质不易被硅胶吸附^[24,25]。在进行硅胶柱层析分离之前, 通常先采用薄层层析法探索柱层析分离的条件。通过薄层层析摸索出可将各组分很好分离的展开剂组成及比例, 即既能使目标物与杂质分得开 (比移值之差 $\Delta R_f > 0.2$)、又可使目标物比移值 $R_f = 0.2 \sim 0.3$ 的展开剂体系及比例^[25], 并将其应用于柱层析分离中。

参考曹刘霞^[25]、李卓等^[26]的方法并稍加修改: 用毛细管将少量 L-AA、L-AP、PA 和待分离样品点在硅胶板 (G 板, 5×10 cm) 上, 碘蒸后显色, 得到 L-AP 的 $R_f = 0.25$ 左右且与待分离杂质 PA 的 $\Delta R_f > 0.2$ 的展开剂体系及比例 (正己烷: 乙酸乙酯: 甲酸 = 50:50:1, V/V/V), 如图 1b 所示。称取适量 200~300 目硅胶, 在 110 °C 烘箱中活化 2~3 h

后,取出后于干燥器中冷却至室温备用。采用湿法装柱和湿法上样,待产物在玻璃层析柱中吸附平衡后,打开下端活塞,淋洗一个柱体积后,用 20 mL 试管收集流出液(同 TLC 展开体系及比例),随时将收集液点板,用 TLC 进行定性分析,将硅胶板放入碘蒸气缸里显色约 5 min,判断是否有 L-AP 流出。根据薄层层析分析的结果,将含有 L-AP 较纯的部分合并,旋蒸除去洗脱液,真空干燥得目标产物 L-AP。

1.3.7 数据分析

所有试验均重复 3 次,结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。用 Excel 2021 进行数据整理,SPSS 26.0 进行方差分析,组间差异比较采用 Duncan 多重检验,用 Origin 2024b 绘制图表。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 酶法合成 L-AP 的单因素优化

2.1.1 底物摩尔比对合成 L-AP 的影响

L-AA 和 PA 的底物摩尔比对 L-AP 的转化率和相对纯度的影响如图 2 所示。当底物摩尔比从 1:3 增加到 1:8 时,转化率和相对纯度均呈现先升高后降低的趋势,当底物摩尔比为 1:7 时,转化率和相对纯度同时达到最大值,分别为 51.12% 和 26.20%。继续增大底物摩尔比,转化率和相对纯度均显著降低($P<0.05$)。这说明在亲脂性底物和亲水性底物之间进行酯化反应时,过量使用亲脂性底物有利于促进正向反应,并限制逆向的水解反应。较低的底物摩尔比使反应体系的流动性更强,酶和底物充分接触,故转化率和相对纯度随底物摩尔比的增加而逐渐增大;当底物摩尔比过高时,体系中过剩的 PA 会阻碍传质,限制了反应正向进行^[9,27]。综上,选择最佳底物摩尔比为 1:7。

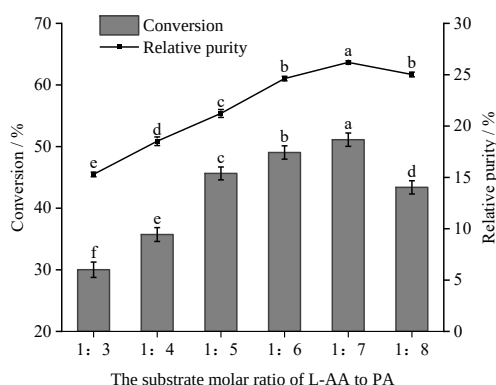


图2 底物摩尔比对酶促酯化合成 L-AP 的影响

Fig.2 The effect of substrate molar ratio on the synthesis of L-AP by enzymatic esterification

注: 不同字母表示具有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.1.2 3Å 分子筛质量浓度对合成 L-AP 的影响

3Å 分子筛的质量浓度对 L-AP 转化率和相对纯度的影响如图 3a 所示。随着合成反应的进行,水的生成量逐渐增加至一定量后会反过来促进逆向反应,从而降低 L-AP 的转化率和相对纯度^[15]。因此,本研究中加入 3Å 分子筛以去除产物中的水,从而抑制 L-AP 水解。在 3Å 分子筛质量浓度 50~300 g L⁻¹ 范围内, L-AP 转化率和相对纯度均呈先上升后降低的趋势。当 3Å 分子筛质量浓度为 250 g L⁻¹ 时, L-AP 转化率和相对纯度达到最大值,分别为 57.19% 和 25.52%。继续增加 3Å 分子筛质量浓度时, L-AP 的转化率和相对纯度显著降低($P<0.05$)。这是因为体系中分子筛含量过高会使酶的结合水丢失,酶体系内保持良好催化活性的微环境受到破坏。分子筛过多会使酶与分子筛碰撞几率增加而使固定化酶脱落^[9,12]。综上,选择最佳的 3Å 分子筛质量浓度为 250 g L⁻¹。

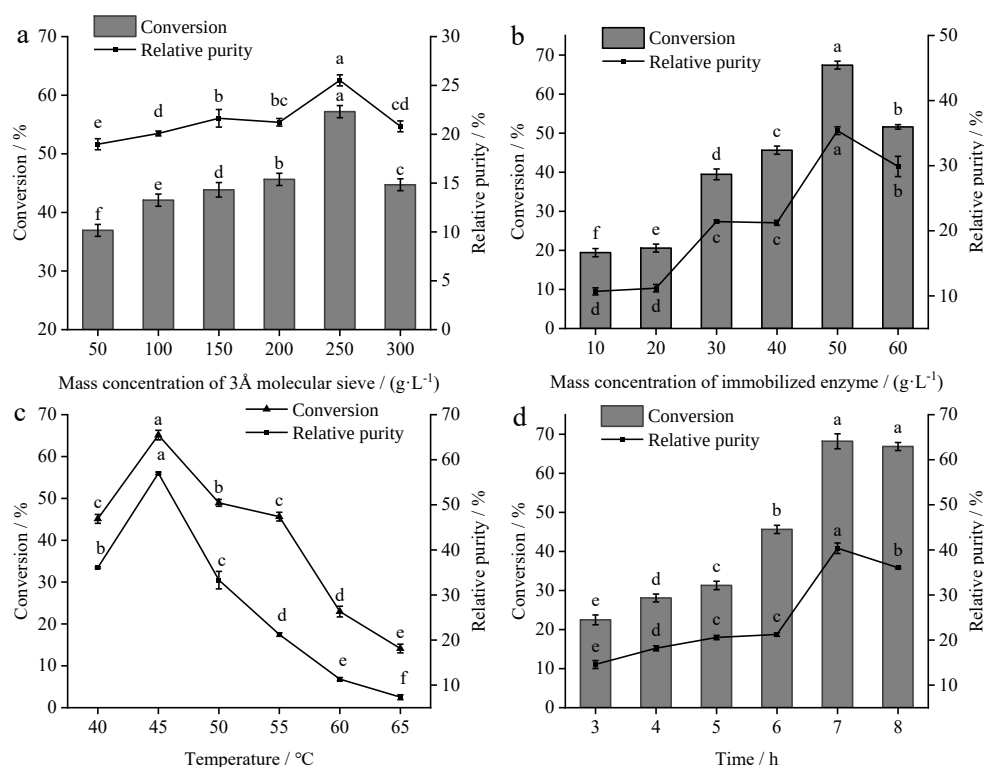


图3 不同反应因素对酶促酯化合成 L-AP 的影响

Fig.3 Effects of different reaction factors on the synthesis of L-AP by enzymatic esterification

注: (a) 3Å 分子筛质量浓度; (b) 固定化酶质量浓度; (c) 反应温度; (d) 反应时间。不同字母表示不同条件下具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.1.3 固定化酶质量浓度对合成 L-AP 的影响

固定化酶 ANL-MARE 的质量浓度对 L-AP 转化率和相对纯度的影响如图 3b 所示。在酶促反应中, 酶量对反应速率有着重要影响。在固定化酶质量浓度从 10 g L^{-1} 增加到 60 g L^{-1} 时, L-AP 转化率和相对纯度均呈先上升后降低的趋势。当固定化酶质量浓度为 50 g L^{-1} 时, 转化率和相对纯度同时达到最大值, 分别为 67.40% 和 35.37%, 继续增大固定化酶质量浓度, L-AP 转化率和相对纯度均显著降低 ($P < 0.05$)。这与其他人^[5,6,16,17,28]的研究结果较为接近。随着固定化酶质量浓度增加, 酶促合成反应趋于饱和, 过高质量浓度的固定化酶会导致反应混合液的粘度增加, 限制反应体系的质量传递, 进而阻碍酶促合成, 故 L-AP 转化率和相对纯度降低。综上, 选择最佳的固定化酶 ANL-MARE 质量浓度为 50 g L^{-1} 。

2.1.4 反应温度对合成 L-AP 的影响

反应温度对 L-AP 转化率和相对纯度的影响如图 3c 所示。温度是影响酶活性的重要因素之一, 较低温度下, 底物和酶分子的动能不足, 底物在酶颗粒内的扩散速率较低, 酶-底物复合物形成慢, 导致 L-AP 产量偏低。在 $40 \sim 45^\circ\text{C}$ 范围内, L-AP 转化率和相对纯度随着温度升高而上升, 在 45°C 时 L-AP 转化率和相对纯度分别达到峰值 65.12% 和 57.00%, 这是因为一定的温度范围内, 酶活性随温度升高而上升。温度继续升高, 转化率和相对纯度均显著降低 ($P < 0.05$), 这是因为高温降低酶的活性, 加之 L-AA 在有溶剂的反应体系中, 热稳定性较差, 故 L-AP 的合成效果被抑制^[29]。这优于 Manish 等^[5]最佳反应温度为 50°C 的报道。综上, 选择最佳反应温度为 45°C 。

2.1.5 反应时间对合成 L-AP 的影响

反应时间对 L-AP 转化率和相对纯度的影响如图 2d 所示。在 $3 \sim 7 \text{ h}$ 内, L-AP 转化率和相对纯度均随着时间延长逐渐升高, 并在 7 h 达到最大值, 分别为 66.84% 和 40.37%。继续延长时间, L-AP 转化率降低, 相对纯度无显著变化 ($P > 0.05$)。这说明在 7 h 时反应已达平衡, 继续延长时间对合成效果影响不大。另外, 继续延长反应时间可能会引发产物抑制效应或逆反应, 使得形成的产物水解^[5,30], 故 L-AP 的转化率一般不会增加。这显著优于 Li 等^[6]最佳反应时间为 24 h 的报道, 且能耗更小, 可显著降低产业化成本。综上, 选择最佳的反应时间为 7 h 。

2.2 酶法合成 L-AP 正交实验结果及分析

2.2.1 正交实验的设计及方差分析

根据单因素实验的结果，固定反应温度为 45 ℃，反应时间为 7 h，选择底物摩尔比（A）、3Å 分子筛质量浓度（B）、固定化酶质量浓度（C）三个因素，以 L-AP 的转化率和相对纯度为评价指标，采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计对 L-AP 酶法合成工艺条件进行优化。正交实验的设计及结果见表 2，方差分析见表 3。

对表 2 的正交实验结果进行分析，根据 k 值和 R 值，各因素对转化率和相对纯度的影响程度均为：底物摩尔比（A）>固定化酶质量浓度（C）>3Å 分子筛质量浓度（B），转化率的最佳工艺组合为 $A_2B_2C_2$ ，相对纯度的最佳工艺组合为 $A_3B_2C_2$ 。对酶法合成的工艺组合进行综合评价，由表 2 和表 3 可知，A 同时为影响转化率和相对纯度的最主要因素， B_2C_2 均是转化率和相对纯度的最优工艺。 A_2 与 A_3 分别为正交试验优化出的转化率和相对纯度的最优条件，在验证试验中对 A_2 与 A_3 进行对比，以确定最终酶促合成条件。

表 2 酶法合成 L-AP 正交实验设计与结果

Table 2 Orthogonal experimental design and results for enzymatic synthesis of L-AP							
实验号	A	B	C	D（空白列）	转化率/%	相对纯度/%	
1	1	1	1	1	64.13±0.04	42.84±0.16	
2	1	2	2	2	89.47±0.01	59.76±0.31	
3	1	3	3	3	79.24±0.05	50.38±0.26	
4	2	1	2	3	86.81±0.04	63.54±0.35	
5	2	2	3	1	89.63±0.04	67.12±0.44	
6	2	3	1	2	61.03±0.05	52.48±0.35	
7	3	1	3	2	57.88±3.61	63.48±2.61	
8	3	2	1	3	63.09±0.57	64.90±1.26	
9	3	3	2	1	68.68±0.45	69.97±0.33	
转化率	k_1	77.62	69.61	62.75	74.15		
	k_2	79.15	80.73	81.65	69.46	因素主次	A>C>B
	k_3	63.22	69.65	75.58	76.38	最优水平	$A_2B_2C_2$
	R	15.94	11.12	12.83	6.92		
相对纯度	k_1	50.99	56.62	53.41	59.98		
	k_2	61.05	63.93	64.42	58.57	因素主次	A>C>B
	k_3	66.12	57.61	60.33	59.61	最优水平	$A_3B_2C_2$
	R	15.13	7.31	11.02	1.40		

表 3 酶法合成 L-AP 正交实验结果方差分析

Table 3 Analysis of variance of the orthogonal experiment results for enzymatic synthesis of L-AP						
方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性	
转化率	A	463.55	2	231.78	55.73	*
	B	246.56	2	123.28	29.64	*
	C	558.78	2	279.39	67.18	*
	D（误差）	74.86	18	4.16		
相对纯度	A	355.62	2	177.81	1 011.36	**
	B	94.35	2	47.18	268.33	**
	C	186.11	2	93.05	529.28	**
	D（误差）	3.16	18	0.18		

注：*表示差异显著（ $P<0.05$ ）；**表示差异极显著（ $P<0.01$ ）。

2.2.2 验证实验

基于正交实验的结果，现比较转化率最佳工艺 A₂B₂C₂、相对纯度最佳工艺 A₃B₂C₂ 两组的酶促合成效果，验证实验的结果见表 4。

由表 4 可知，两组验证实验中，转化率最佳工艺 A₂B₂C₂ 的转化率为 90.47%、相对纯度为 70.64%。仅改变 A 因素，相对纯度最佳工艺 A₃B₂C₂ 的转化率为 89.98%，高于 A₃B₂C₂ 组；相对纯度为 74.67%，高于 A₃B₂C₂ 组。结合工业生产时底物 PA 用量的增加带来的更高成本，经综合考虑，本实验选择 A₂B₂C₂ 为最佳合成工艺，即底物摩尔比 1:7、3Å 分子筛质量浓度 250 g L⁻¹、固定化酶 ANL-MARE 质量浓度 50 g L⁻¹。

表 4 酶法合成 L-AP 最佳工艺验证实验

Table 4 Optimization and verification experiment of the best process for enzymatic synthesis of L-AP					
工艺方案	A 底物摩尔比	B 3Å 分子筛质量浓度/(g L ⁻¹)	C 固定化酶质量浓度/(g L ⁻¹)	转化率/%	相对纯度/%
A ₂ B ₂ C ₂	1:7	250	5	90.47±0.18	70.64±0.74
A ₃ B ₂ C ₂	1:8	250	5	89.98±2.83	74.67±0.97

2.3 固定化酶 ANL-MARE 与商业酶的重复使用性比较

对固定化酶 ANL-MARE 的酶活性分析如表 5 所示，ANL-MARE 的比活力达 81.54 U·mg⁻¹，与 Novozym 435 酶无显著性差异，且高于先前研究报道的 ANL 在微孔 ZIF-8 材料上制备的固定化酶的酶活力^[31]。这说明固定化酶 ANL-MARE 酶活力良好，可用于后续的重复使用性实验。

表 5 固定化酶 ANL-MARE 与商业酶的酶活对比

Table 5 Comparison of enzyme activity between immobilized ANL-MARE and commercial enzymes

酶	比活力/(U mg ⁻¹)
ANL-MARE	81.54±2.58
Novozym 435	86.09±1.82

固定化酶的操作稳定性是评价其工业应用潜力的重要指标。在最优工艺条件下，将 ANL-MARE 与目前广泛用于酯合成反应的商业固定化酶 Novozym 435 进行重复使用性对比。结果如图 4 所示。

固定化酶 ANL-MARE 连续催化 10 批次后 L-AP 转化率仍保持在 70%以上，而 Novozym 435 经 7 次循环后转化率已明显下降。ANL-MARE 在第 7 批次后的转化率显著高于 Novozym 435 ($P<0.05$)，表现出更优的操作稳定性。这可能归因于 ANL-MARE 所用的大孔丙烯酸树脂载体与脂肪酶之间具有较强的非共价结合力，有效减少了酶蛋白在反复使用过程中的脱落与失活。值得注意的是，姜新慧等^[12]以固定化洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶催化合成 L-AP，10 批次中仅前 5 次转化率高于 70%。本研究所用的 ANL-MARE 在相同循环次数下 L-AP 转化率衰减更缓，进一步表明该固定化酶在 L-AP 的连续化生产中具有明显优势。

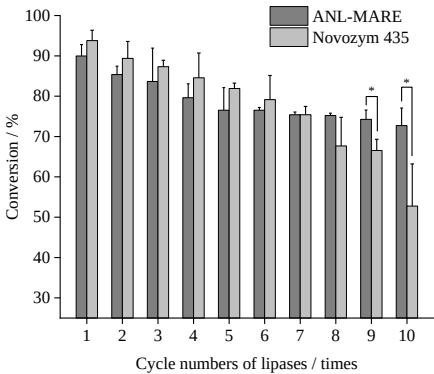


图 4 固定化酶 ANL-MARE 与商业酶的重复使用性比较

Fig.4 Comparison of the reusability of the immobilized enzyme ANL-MARE and commercial enzymes

注：*表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.4 分离纯化 L-AP 的工艺优化

取适量样品，按 1.3.3 的色谱条件进行测定。粗品，纯化后产品，L-AA、L-AP、PA 标准品的 HPLC 图见图 5。

结果显示，在波长 244 nm 下 L-AP 的保留时间为 10.3 min。各成分的色谱峰与标准品色谱峰的保留时间一致，且分离度良好。

在最优的合成工艺条件下，通过 HPLC 检测，以转化率和纯度为评价指标，将正己烷萃取法与柱层析法进行 L-AP 的分离纯化效果对比。结果如图 6 所示。

正己烷萃取法所得的 L-AP 转化率为 89.52%，纯度为 86.32%；而通过柱层析法分离纯化得到的 L-AP 转化率为 89.98%，纯度为 92.24%。两种方法的转化率和纯度并无显著差异 ($P>0.05$)，但后者的转化率和纯度均略高于前者，考虑后续工艺放大的成本和产量需求，选定正己烷萃取法为后续的分离纯化工艺。值得注意的是，先前徐文婷等^[32]利用固定在脱脂棉上的 ANL 酶催化合成 L-AP，催化反应 24 h 后仅得转化率 62.20% 的 L-AP。王渝红^[33]用冰水与乙酸乙酯的混合液作为粗产品析出剂，得到纯度为 74.70% 的 L-AP。本研究利用自制的 ANL-MARE 反应 7 h 后合成转化率和纯度均更高的 L-AP，进一步表明该固定化酶在 L-AP 的工业生产中具有明显优势。

就酶法合成 L-AP 工艺的转化率、反应时间等，将本实验与前人的研究结果进行比较，结果如表 6 所示。可以看出，本研究的合成工艺条件：反应时间 7 h、转化率 90% 左右目前处于前列水平。

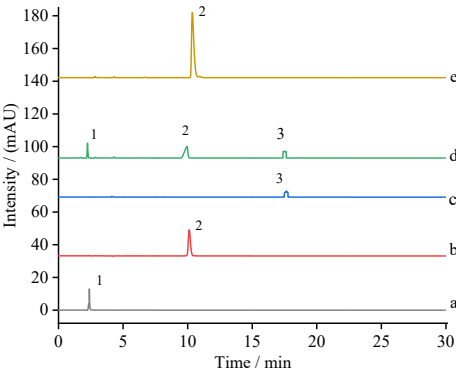


图 5 各样品的 HPLC 图谱

Fig.5 HPLC chromatograms of each sample

注：（a）L-AA 标准品；（b）纯化后产品 L-AP 标准品；（c）PA 标准品；（d）产物混合液；（e）纯化后产品。（1）L-AA；（2）L-AP；（3）PA。

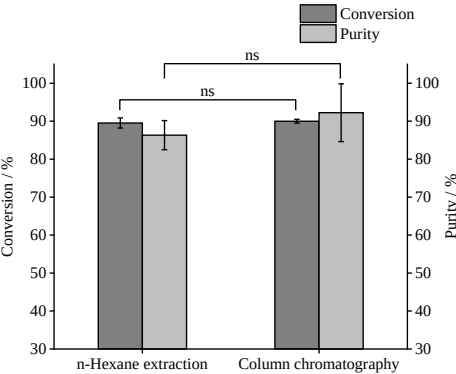


图 6 不同分离纯化方法的比较

Fig.6 Comparison of Different Separation and Purification Methods

注：ns 表示差异不显著 ($P>0.05$)。

表 6 酶法合成 L-AP 的研究进展

Table 6 Recent advances in enzymatic synthesis of L-AP

底物（底物摩尔比）	溶剂	脂肪酶种类	温度/℃	时间/h	转化率(%) / 产物浓度	优势	不足	参考文献
					(g/L)			
L-AA、PA(1:4)	二氧六环	Aspergillus niger lipase	50	24	83.58%	转化率较高	耗时长	[6]
L-AA、PA(1:8)	2-甲基 2-丁醇	Novozyme 435	55	15	93.5%	转化率高	棕榈酸添加量较高	[9]
L-AA、PA(1:8)	2-甲基 2-丁醇	Novozyme 435	55	144	84%	转化率较高	耗时长、棕榈酸添加量较高	[15]

现代食品科技		Modern Food Science and Technology				2027, Vol.43, No.7		
L-AA, PA(1:5)	叔丁醇	Candida antarctica lipase B	60	6	90%	转化率高、耗时短	温度偏高	[5]
L-AA, PA(1:3)	丙酮	Aspergillus niger lipase	37	24	90.4%	温度较低、转化率高	耗时长	[32]
L-AA, PA(1:3)	丙酮	Pseudomonas cepacian lipase	50	24	85.3%	棕榈酸用量少	耗时长	[14]
L-AA, PA(1:9)	叔丁醇	Novozym 435	70	17	67%	前 6 h 反应速率快, 转化率达到 56%	耗时长、温度高、棕榈酸添加量较高	[11]
L-AA、棕榈酸甲酯 (1:3.8)	叔丁醇	Novozym 435	54.6	17.2	79.5%	棕榈酸甲酯用量少、产物无需分离纯化	耗时长	[34]
L-AA、棕榈油	叔戊醇	Novozym 435	55	24	65%	使用棕榈油, 成本较低	耗时长、转化率较低	[35]
L-AA, PA(1:3)	叔戊醇	Novozym 435	50	72	16.6 g/L	加入相转移剂四丁基溴化铵, 使 L-AP 浓度提高	耗时长	[36]
L-AA, PA(1:2)	叔丁醇	洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶 (Burkholderia cepacia lipase)	55	48	89.5%	转化率较高	耗时长	[12]
L-AA、棕榈酸甲酯	叔丁醇	Novozym 435	55	36	52%	产物无需分离纯化	耗时长、转化率低	[23]

3 结论

本文以新型固定化脂肪酶 ANL-MARE 为催化剂, 在叔丁醇体系中催化 L-抗坏血酸与棕榈酸酯化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯, 经单因素和正交试验优化获得最优工艺: L-AA 与 PA 摩尔比 1:7, 固定化酶质量浓度 50 g L⁻¹, 3Å 分子筛质量浓度 250 g L⁻¹, 反应温度 45 ℃, 反应时间 7 h, 此条件下 L-AP 转化率为 90.47%。在最优工艺条件下连续催化 10 批次, ANL-MARE 仍可保持 70%以上的 L-AP 转化率, 操作稳定性优于商业固定化酶 Novozym 435。选用效果更佳的柱层析法进行分离纯化, 所得 L-AP 的纯度可达 91.54%。综上, 固定化酶 ANL-MARE 具有催化制备 L-AP 的良好活性和重复使用性, 本研究为 L-AP 的酶法高效合成提供了新工艺, 并为其在婴幼儿配方食品添加剂领域的产业化应用奠定了理论基础, 下一步将着眼于提高 L-AP 工艺放大后的产量和效率等, 使 L-AP 的产业化生产具备实际应用价值。

参考文献

[1] MAGED Y, GABRIELE A, LAURENCE C, et al. Opinion on the re-evaluation of ascorbyl palmitate (E 304i) as a food additive in foods for infants below 16 weeks of age and the follow-up of its re-evaluation as a food additive for uses in foods for all population groups [J]. EFSA Journal, 2020, 18(6): 6153.

[2] OLIWIA M, ALEKSANDRA M, CAROLINA L S, et al. Enhancing formulation stability: a comparative study of ascorbic acid and ascorbyl palmitate as antioxidants in nanoemulsions of natural products [J]. ACS Applied Nano Materials, 2025, 8(23): 12306-12313.

[3] JUN Y P, JAEHO M, YOONSEOK C, et al. Erythorbyl fatty acid ester as a multi-functional food emulsifier: Enzymatic synthesis, chemical identification, and functional characterization of erythorbyl myristate [J]. Food Chemistry, 2021, 353: 129459.

[4] 张甜甜.L-抗坏血酸酯的酶法合成及其理化性质研究——基于有序介孔硅脂肪酶微阵列[D].合肥:安徽农业大学,2023.

[5] MANISH G Y, MONALI R. K, RAJESHKUMAR N. V, et al. Production of 6-O-L-ascorbyl palmitate by immobilized *Candida antarctica* lipase B [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 184(4): 1168-1186.

[6] LI Q, QIAN J Q, HUANG A, et al. Biocatalytic synthesis of L-ascorbyl palmitate using oleic acid imprinted *Aspergillus niger* lipase immobilized on resin [J]. Food Chemistry, 2025, 463(1): 141075.

[7] 郭红雨,张逸,刘忠慧,等.抗坏血酸棕榈酸酯的制备及应用进展[J].食品工业科技,2025,46(2):1-11.

[8] 陆志芸,张辉,赵敏,等.高效液相色谱法测定食品中抗坏血酸棕榈酸酯[J].理化检验(化学分册),2010,46(8):869-871.

[9] JESSICA H, LUIGI T, CLAUDIA B, et al. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in a rotating bed reactor [J]. Molecules, 2023, 28(2): 644.

- [10] 张秋莹,孙晶晶,王伟,等.酶法制备 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸的分离纯化工艺及抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2025,41(5):68-78.
- [11] LINDOMAR A. L, ALINE R, ROGÉRIO D, et al. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in organic solvents: Process optimization and kinetic evaluation [J]. Food Bioprocess Technol, 2012, 5(3): 1068-1076.
- [12] 姜新慧,晏日安,曾永青.非水相中脂肪酶催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯[J].食品科技,2010,35(5):258-261.
- [13] ZHANG T T, ZHANG Y, DENG C Y, et al. Green and efficient synthesis of highly liposoluble and antioxidant L-ascorbyl esters by immobilized lipases [J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 379(2): 134772.
- [14] 吕欣,于婉琪,关欣,等.CMC 调节脂肪酶催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯[J].中国食品添加剂,2017,2:70-74.
- [15] CAROLINA T, CLAUDIA B, CARMINNA O, et al. Synthesis with immobilized lipases and downstream processing of ascorbyl palmitate [J]. Molecules, 2019, 24(18): 3227.
- [16] NISHANT P, MANGAT S, PRATIBHA D, et al. Synthesis of food-grade 6-O-ascorbyl fatty esters and their semi-synthesis from low-value oils as resources [J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2023, 13: 15393-15400.
- [17] 龚欣.抗坏血酸棕榈酸酯的合成及应用研究[D].广州:华南理工大学,2014.
- [18] YAN H L, CUI L, WANG X, et al. Encapsulation of ascorbyl palmitate in maize granular starch through an irradiation-hydrothermal method [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2023, 208: 110939.
- [19] 刘放,苗建银,黄早成,等.固定化脂肪酶催化酱油糟油脂合成甘油二酯的研究[J].现代食品科技,2017,33(11):110-118.
- [20] FENG K L, HUANG Z C, PENG B, et al. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase onto a novel macroporous acrylic resin: Stable and recyclable biocatalysis for deacidification of high-acid soy sauce residue oil [J]. Bioresource Technology, 2020, 298: 122553.
- [21] 康梦,何家强,冯孔龙,等.固定化脂肪酶 ANL-MARE 催化酸解合成 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯[J].现代食品科技,2024,40(2):109-119.
- [22] XU L J, YANG T, WANG J, et al. Immobilized lipase based on hollow mesoporous silicon spheres for efficient enzymatic synthesis of resveratrol ester derivatives [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(32): 9067-9075.
- [23] 夏木西卡玛尔,吾满江,艾力.脂肪酶催化合成棕榈酸维生素 C 酯的研究[J].应用化工,2007,36(4):373-375.
- [24] 蔡梦根,陶冠军,秦昉,等.L-抗坏血酸月桂酸酯的酶法合成、分离及其性质[J].食品工业科技,2008,29(10):211-215.
- [25] 曹刘霞.非水相酶催化合成 L-抗坏血酸油酸酯、结构表征及性质研究[D].郑州:河南工业大学,2011.
- [26] 李卓,晏日安,曾永青.超声波强化酶法合成 L-抗坏血酸癸酸酯及其抗氧化性研究[J].食品工业科技,2013,34(2):204-209.
- [27] ZHANG Y K, ZHENG M L, ZHANG Y, et al. Antioxidative ability and mechanism of L-ascorbyl palmitate synthesized by lipases as biocatalyst: Experimental and molecular simulation investigations [J]. Food Bioscience, 2024, 59: 104160.
- [28] 吴平.生物印迹假丝酵母脂肪酶催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的研究[D].杭州:浙江工业大学,2013.
- [29] ZHANG X J, QI F Y, QI J M, et al. Efficient enzymatic synthesis of L-ascorbyl palmitate using *Candida antarctica* lipase B-embedded metal-organic framework [J]. Biotechnology Progress, 2022, 38(1): 3218.
- [30] FAVARIN F R, FORRATI É M, BASSOTO V A, et al. Ascorbic acid and ascorbyl palmitate-loaded liposomes: Development, characterization, stability evaluation, in vitro security profile, antimicrobial and antioxidant activities [J]. Food Chemistry, 2024, 460(2): 140569.
- [31] HU Y L, ZHOU H, DAI L M, et al. Lipase immobilization on macroporous ZIF-8 for enhanced enzymatic biodiesel production [J]. ACS Omega, 2021, 6(3): 2143-2148.
- [32] 徐文婷,毕武丹,丛方地,等.固定化脂肪酶 ANL 非水催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯[J].生物加工过程,2018,16(4):36-39.
- [33] 王渝红.新型抗氧化剂 L-抗坏血酸棕榈酸酯的合成工艺研究[D].成都:四川大学,2007.
- [34] 王军凯.酶法合成 L-抗坏血酸脂脂肪酸酯及其抗氧化性研究[D].武汉:华中科技大学,2011.
- [35] 张洪勇,钱俊青.叔戊醇体系中酶法合成 L-抗坏血酸脂脂肪酸酯的研究[J].高校化学工程学报,2011,25(6):1010-1015.
- [36] 李红,陶静,李颖.L-抗坏血酸棕榈酸酯的酶法合成[J].食品工业科技,2011,32(8):350-352.