两步酶法合成MLM型结构脂质中醇解反应研究

操丽丽[1,2]，姜绍通[1,2,*]，寿佳菲[1,2]，符克皇[1]
(1.合肥工业大学生物与食品工程学院，安徽 合肥 230009；
2.安徽省农产品精深加工重点实验室，安徽 合肥 230009)

摘 要：为获得纯度较高的2-单甘酯来制备MLM型结构脂质，以菜籽油和无水乙醇为底物，用来自*Thermomyces lanuginosa*固定化脂肪酶TL IM作为催化酶来制备2-单甘酯。在单因素试验的基础上，采用正交试验设计，获得醇解反应的最佳工艺条件：菜籽油/无水乙醇(底物)物质的量比1:5，Lipozyme TL IM酶加入量为7%(以底物质量计)、反应温度35℃、反应时间18h，总单甘酯含量为38.82%。经三级分子蒸馏纯化后，总单甘酯的纯度可以达到90.76%。

关键词：MLM结构脂质；菜籽油；无水乙醇；醇解；单甘酯

Optimization of Alcoholysis Reaction for Two-Step Enzymatic Synthesis of MLM-Type Structural Lipid

CAO Li-li[1,2]，JIANG Shao-tong[1,2,*]，SHOU Jia-fei[1,2]，FU Ke-huang[1]
(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China；
2. Anhui Key Laboratory of Intensive Processing of Agricultural Products, Hefei 230009, China)

Abstract：In order to obtain monoglyceride (MAG) with high purity for the synthesis of MLM-type structure lipid, immobilized lipase TL IM from *Thermomyces lanuginose* was used to catalyze the synthesis of MAG by alcoholysis of rapeseed oil and anhydrous ethanol. The optimal alcoholysis conditions were determined by one-factor-at-a-time and orthogonal array design as follows: rapeseed oil/anhydrous ethanol molar ratio of 1:5, lipase dosage of 7% (*m*/*m*, on the basis of the weight of substrates), reaction temperature of 35 ℃ and reaction time of 18 h, resulting in an MAG content of 38.82% in the final products. The purity of the MAG obtained could be increased to 90.76% by a three-stage molecular distillation process.

Key words：MLM structure lipid；rapeseed oil；anhydrous ethanol；alcoholysis；monoglycerides
中图分类号： TS225.6 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2012)20-0065-04

结构脂质是指将短碳链脂肪酸、中碳链脂肪酸中的一种或两种，同长碳链脂肪酸一起与甘油结合所形成的新型脂质[1-2]。MLM型结构脂质就是其中的一种，它是在甘油结构的2位分布着必需脂肪酸(主要是长碳链脂肪酸L)，1,3位被中碳链脂肪酸(C_6～C_{12}，M)占据的一种特殊的结构脂质。MLM型结构脂质在体内代谢快、蓄积少，具有降血脂、减肥等功能[3]。

MLM型结构脂质最简单最直接的方法是通过1,3特异性固定化脂肪酶催化甘油三酯与目的脂肪酸进行酸解反应制得，但是此反应存在的最大问题是发生了酰基转移，使得MLM型结构脂质的产率降低[4-6]。为尽量减少酰基转移的发生，其中一种有效的方法就是用两步法合成，第1步为1,3特异性固定化脂肪酶催化甘油三酯醇解反应制备单甘酯(2-MAGs)；第2步为单甘酯与特定脂肪酸酯化反应制取MLM型结构脂质，同样也在1,3特异性固定化脂肪酶催化下进行[7]。两步法合成具有得率高、特异性强等特点。

目前，工业上合成单甘酯主要采用化学法，包括油脂水解法、甘油解法和直接酯化法[8-9]。但是化学法存在能耗大，产物易降解，且不具有特异性。近年来，以脂肪酶为催化剂在较温和条件下合成单甘酯成为研究人员探索的新途径之一。María等[6]研究在不同的反应器中特异性脂肪酶催化鱼油醇解制取2-单甘酯，在非连续的搅拌器中2-单甘酯产率可以达到63%～65%。

本实验利用1,3特异性脂肪酶催化菜籽油醇解制备2-单甘酯，采用单因素和正交试验设计，探索2-单甘酯制备的最适条件，并采用分子蒸馏仪对醇解反应产物进行纯化获得高纯度2-MAGs，以期为MLM型结构脂质两步酶法合成提供理论参考。

收稿日期：2011-07-27
基金项目：“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD02B04)
作者简介：操丽丽(1979—)，女，讲师，博士研究生，主要从事油脂加工与分析研究。E-mail：lilycao504@hotmail.com
*通信作者：姜绍通(1954—)，男，教授，主要从事农产品加工与贮藏研究。E-mail：jiangshaotong@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菜籽油 安徽太平工贸有限公司；Lipozyme TL IM酶(来自*Thermomyces lanuginosa*)和Lipozyme RM IM酶(来自*Rhizomucor miehei*) 诺维信生物制药有限公司；无水乙醇(分析纯) 国药集团化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

SHY-2A型恒温气浴摇床 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂；R201型旋转蒸发器 上海申胜生物技术有限公司；2英寸刮膜式分子蒸馏仪 美国Pope公司；QP2010气相质谱仪 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 醇解脂肪酶的选择

称取2.0g菜籽油，以底物(菜籽油/无水乙醇)物质的量比1:5加入无水乙醇，以底物质量的8%分别加入脂肪酶Lipozyme TL IM和Lipozyme RM IM，置于摇床，40℃、200r/min反应24h，考察两种酶对醇解反应产单甘酯的影响。每组实验重复3次，结果取平均值。

1.3.2 单因素试验

在1.3.1节实验基础上，分别考察底物物质的量比(1:3、1:4、1:5、1:6、1:7)、加酶量(按底物质量计)(4%、6%、8%、10%、12%)、反应时间(4、8、12、16、20、24h)、反应温度(25、30、35、40、45℃)对醇解反应产单甘酯影响。

1.3.3 正交试验优化醇解反应条件

根据单因素试验结果，选取影响较为显著的因素及其较适宜的水平区间，采用$L_9(3^4)$正交表进行正交试验方案设计，每组试验重复3次，以总单甘酯含量为指标，确定醇解反应的最佳反应参数组合。

1.3.4 回收后固定化脂肪酶Lipozyme TL IM催化活性的考察

将醇解反应后的固定化酶过滤回收，用石油醚(沸程30～60℃)洗涤，室温条件下吹干后进行循环使用，考察其催化活性。

1.3.5 分子蒸馏提纯单甘酯

醇解产物通过旋转蒸发器除去乙醇和水后，进行三级分子蒸馏。一级分子蒸馏条件为蒸馏温度120℃、压力0.4～0.6Pa、刮板转速200r/min、进料速度3mL/min，收集重相油样用于二级分子蒸馏；二级分子蒸馏条件同一级，收集重相油样用于三级分子蒸馏；三级分子蒸馏条件为蒸馏温度190℃、压力0.4～0.6Pa、刮板转速200r/min、进料速度3mL/min，收集轻相用于总单甘酯纯度检测及后续实验。

1.3.6 总单甘酯含量的测定

参考文献[10]中化学分析方法进行测定。

2 结果与分析

2.1 醇解脂肪酶的选择

Lipozyme TL IM和Lipozyme RM IM都是经微生物发酵而制得，具有1,3特异性的固定化脂肪酶。由图1可以看出，Lipozyme TL IM催化醇解反应制取单甘酯的活性要远高于Lipozyme RM IM。原因可能是大量无水乙醇存在下，Lipozyme RM IM的活性受到了很大程度的影响，致使其催化效率降低[11]。因此，在醇解反应中，选择Lipozyme TL IM作为催化用酶来制取单甘酯。

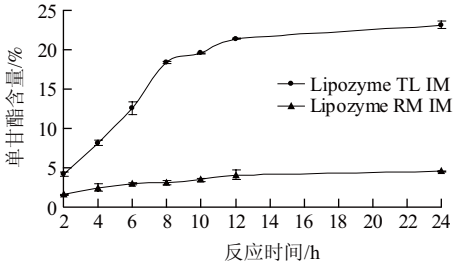

图1 酶种类对单甘酯含量的影响

Fig.1 Effect of lipase type on MAG synthesis

2.2 单因素试验

2.2.1 最佳底物物质的量比的选择

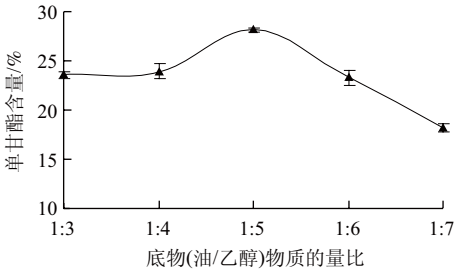

图2 底物物质的量比对单甘酯含量的影响

Fig.2 Effect of substrate/enzyme ratio on MAG synthesis

由图2可以看出，当菜籽油与无水乙醇的物质的量比为1:5时，单甘酯的含量最高。分析原因可能是，随着底物质量的增多，提供给固定化脂肪酶更多的催化反应机会，而继续增加底物质量，单甘酯的含量反而降低，可能是由于过多的底物导致了酶被底物包裹，因而影响了催化效率[11]。故选择菜籽油与无水乙醇的物质的量比为1:5。

2.2.2 最佳加酶量的选择

图3表明，随着酶量的增加，单甘酯的含量增加，但加酶量从8%增加到12%，单甘酯的含量增加不明显。加酶量的大小和反应速度直接相关，如果底物的量能够保持足够大，当酶量增加时，反应速度会随之增大。酶与无机催化剂同样，在不改变反应平衡的情况下，能与底物形成活性中间体，降低反应的活化能，而缩短反应时间[12]。在保证一定反应速度的同时，尽可能减少酶的添

加量，不仅可减少副产物的含量，还可降低生产成本，故加酶量选为8%。

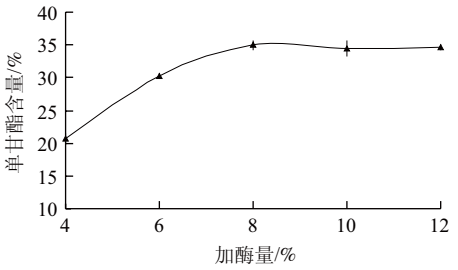

图 3 加酶量对单甘酯含量的影响

Fig.3 Effect of enzyme dosage on MAG synthesis

2.2.3 最佳反应时间的选择

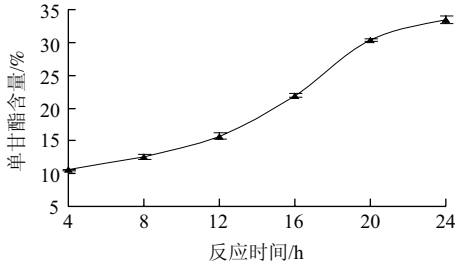

图 4 反应时间对单甘酯含量的影响

Fig.4 Effect of reaction time on MAG synthesis

从图4可以看出，在反应前一段时间内，单甘酯的增加比较缓和，而在12h后单甘酯的含量增加很快，原因可能是在反应初期，底物菜籽油和无水乙醇与酶未充分混合，导致产物单甘酯含量较低，随着反应时间的延长，菜籽油和无水乙醇与酶已接近充分混合状态，此时醇解反应速率较快，因而单甘酯含量迅速增加。但是继续增加反应时间，则会大量生成多种副产物，这样对单甘酯的分离造成很大影响[4,13]。综上，选择反应时间为20h。

2.2.4 最佳反应温度的选择

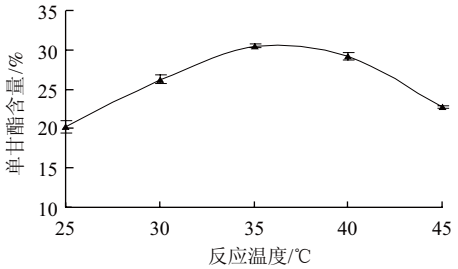

图 5 反应温度对单甘酯含量的影响

Fig.5 Effect of reaction temperature on MAG synthesis

由图5可以看出，当温度低于35℃左右时，单甘酯的含量增加显著。这可能是由于单甘酯的熔点比所对应的甘三酯的熔点高10～15℃左右，而1,3-甘二酯则高10℃左右[14]。随着反应的进行，单甘酯大量形成，当反应温度较低时，单甘酯即从体系中凝固析出，从而导致反应向有利于生成单甘酯的方向进行，提高了单甘酯的浓度。当温度再降低时，单甘酯呈固态，反应难以实现[15]。故选反应温度为35℃。

2.3 正交试验优化试验条件

根据单因素试验结果，采用$L_9(3^4)$正交试验对醇解反应的参数进行优化，因素水平见表1。

表 1 醇解反应试验因素水平表

Table 1 Factors and levels used in orthogonal array design

水平	因素			
	*A*底物物质的量比(油:乙醇)	*B*加酶量/%	*C*反应时间/h	*D*反应温度/℃
1	1:5	9	20	32.5
2	1:6	8	18	37.5
3	1:7	7	22	35.0

表 2 醇解反应正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal array design arrangement and corresponding results

试验号	*A*	*B*	*C*	*D*	单甘酯含量/%
1	1	1	1	1	33.78±0.41
2	1	2	2	2	29.33±0.57
3	1	3	3	3	40.07±0.95
4	2	1	2	3	30.43±0.29
5	2	2	3	1	28.62±0.76
6	2	3	1	2	22.90±0.41
7	3	1	3	2	25.25±0.36
8	3	2	1	3	27.92±0.66
9	3	3	2	1	29.41±0.33
k_1	34.39	29.82	28.20	30.60	
k_2	27.32	28.63	29.72	25.83	
k_3	27.53	30.80	31.31	32.81	
R	7.08	2.17	3.11	6.98	

表 3 醇解反应方差分析表

Table 3 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*值	显著性
A	291.91	2	145.96	138.16	**
B	21.26	2	10.63	10.06	**
C	43.59	2	21.8	20.63	**
D	229.09	2	114.55	108.42	**
e	19.02	18	1.06		
总和	604.87	26			

注：$F_{0.01(2,18)}$=6.01；**. 表示差异极显著，$P < 0.01$。

以单甘酯含量为考察指标，正交试验结果和方差分析结果分别见表2、3。由表2可以看出，第3号试验($A_1B_3C_3D_3$)单甘酯含量最高。从方差分析(表3)的结果表明，因素*A*、*B*、*C*、*D*对结果都有非常显著的影响，主次

顺序为$A>D>C>B$。其计算分析较好的条件为$A_1B_3C_3D_3$，与直接分析相同；但由于C_2和C_3相差不大，考虑经济效率，选择C_2为较佳水平，因此选择计算分析较好条件为$A_1B_3C_2D_3$。将两种不同组合方案进行验证实验，在$A_1B_3C_2D_3$方案下单甘酯含量(39.54±0.86)%与$A_1B_3C_3D_3$方案下单甘酯含量(39.70±0.79)%相近，因此，最佳的方案确定为底物物质的量比1:5、加酶量7%、反应时间18h、温度35℃。

2.4 Lipozyme TL IM回收及其操作稳定性

固定化酶除了稳定性高、反应物易分离外，还可反复使用，使生产连续化，简化产品的后处理工艺。它能够重复使用的次数对于实际生产来说具有重要意义，使用次数越多，生产成本就越低。但是，固之化酶使用次数和反应的条件是密切相关的。根据正交试验确定的最优工艺条件，考察酶的操作稳定性，结果见图6。

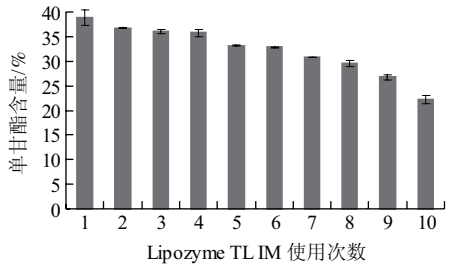

图 6 Lipozyme TL IM的操作稳定性

Fig.6 Effect of number of repeated uses of Lipozyme TL IM on MAG synthesis

由图6可知，Lipozyme TL IM使用10次后，酶的活性逐渐降低。分析原因可能有以下几个方面：第一，是在反应过程中固定化载体被破坏，从而影响酶的稳定性，也是导致酶颜色变浅的原因之一；第二，酶在有机溶剂洗涤过程中，破坏了它内部的结合水导致活力下降；第三，由于酶的重复利用吸附了不少极性物质也会影响酶的活力[16]；第四，此酶长期与无水乙醇接触，也可能导致酶活降低[7]。从整个反应过程来看，Lipozyme TL IM较为稳定，使用10次后酶活仍能保持60%以上，用作催化菜籽油醇解制取单甘酯是合适的。

2.5 分子蒸馏纯化单甘酯

将最优反应条件反应得到的醇解产物进行三级分子蒸馏纯化，测得单甘酯的纯度如表4所示。

表4 多级分子蒸馏对单甘酯纯度的影响

Table 4 Effect of multistage molecular distillation on MAG purity

分子蒸馏产物	一级重相	二级重相	三级轻相
单甘酯的纯度/%	33.28±0.64	74.57±0.70	90.76±0.51

由表4可知，经一级、二级分子蒸馏，得到的重相中单甘酯的纯度为74.57%，由于反应物中还残留一些未反应的菜籽油，因此还需进行三级分子蒸馏，得到轻相中单甘酯的纯度为90.76%。

3 结 论

3.1 脂肪酶筛选结果表明，脂肪酶Lipozyme TL IM催化菜籽油与无水乙醇醇解反应活性高、操作稳定性好、重复利用率高。

3.2 正交试验获得醇解反应的最佳工艺条件为脂肪酶Lipozyme TL IM加入量7%、菜籽油/无水乙醇底物物质的量比1:5、反应温度35℃、反应18h，单甘酯含量为38.82%。

3.3 经三级分子蒸馏纯化后，单甘酯的纯度可以达到90.76%。

参考文献：

[1] FORESTI M L, FERREIRA M L. Lipase-catalyed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(6): 419-429.

[2] 王瑛瑶. 新型功能性油脂: 结构脂质的研究现状[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(4): 162-165.

[3] CARRÍN M E, CRAPISTE G H. Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 84(2): 243-249.

[4] HITA E, ROBLES A, CAMACHO B, et al. Production of structured triacylglycerols(STAG) rich in docosahexaenoic acid(DHA) in positon 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(3): 415-422.

[5] del MAR MUNIO M, ESTEBAN L, ROBLES A, et al. Synthesis of 2-monoacyiglycerols rich polyunsaturated fatty acids by ethanolysis of fish oil catalyzed by 1,3 specific lipases[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(10): 1033-1039.

[6] ESTEBAN L, del MAR MUNIO M, ROBLES A, et al. Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 44(2/3): 271-279.

[7] IRIMESCU R, FURIHATA K, HATA K, et al. Two-step enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols[J]. Am Oil Chem Soc, 2001, 78(7): 743-748.

[8] 刘燕, 刘钟栋, 孙晓霞, 等. 单甘酯的研究进展[J]. 粮油加工, 2009(3): 56-59.

[9] 胡隼, 万鹏, 王芳, 等. 脂肪酶催化大豆色拉油甘油解合成单甘酯[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(3): 80-84.

[10] 吕德水, 石明孝. 单脂肪酸甘油酯总单酯含量的测定[J]. 日用化学工业, 1996(3): 39-40.

[11] del MAR MUNIO M, ROBLES A, ESTEBAN L, et al. Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(7): 723-730.

[12] 刘新喜, 彭立凤. 固定化脂肪酶催化合成单甘酯[J]. 中国油脂, 2001, 26(1): 40-43.

[13] DENG Li, XU Xuebing, HARALDSSON G G, et al. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: a critical evaluation of lipases and alcohols[J]. J Am Oil Chem Soc, 2005, 82(5): 341-347.

[14] MILLQVIST A, ADLERCREUTZ P, MATTIASSON B. Lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides for the preparation .of 2-monoglycerides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1994, 16(12): 1042-1047.

[15] 胡永涛, 刘钟栋, 杨菁, 等. 单甘酯、甘二酯高纯品的生产、理化性质及特殊用途[J]. 中国食品添加剂, 2009(1): 57-64.

[16] 丁双. 脂肪酶催化改良大豆油制备质构脂质的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.