

非水相生物催化制备甘油磷酸胆碱

毛慧芳, 张洪斌*, 赵艳艳, 胡雪芹
(合肥工业大学医学工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要: 通过非水相中对生物催化剂脂肪酶水解大豆卵磷脂生成甘油磷酸胆碱的研究, 确定最佳的工艺条件。结果表明: 最佳条件为反应时间6h、反应温度40℃、pH5.0、加酶量12.5mg/mL、水含量4%, 为了增加酶的利用率和减少有机溶剂的使用, 反应1.5h后补加底物, 补加质量为初始质量的50%, 补加的底物质量浓度为0.437g/mL。在此工艺条件下, 经高效液相色谱检测分析, 3次平行实验测得反应液经水萃取后甘油磷酸胆碱产率为97%。该工艺为甘油磷酸胆碱的制备提供了一种可行的方法。

关键词: 脂肪酶; 卵磷脂; 甘油磷酸胆碱; 非水相

Biocatalytic Production of Glycerophosphatide Choline in Non-aqueous Phase

MAO Hui-fang, ZHANG Hong-bin*, ZHAO Yan-yan, HU Xue-qin
(School of Medical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstracts: This study was undertaken to optimize reaction conditions for the biocatalytic deacylation of phosphatidylcholine (PC) by lipase to glycerol-3-phosphocholine (GPC) in non-aqueous phase. The optimal reaction conditions were found to be reaction at 40 °C and pH 5.0 for 6 h with an enzyme dose of 12.5 mg/mL in the presence of 4% water. Moreover, in order to increase the utilization rate of lipase and reduce solvent consumption, additional PC at a concentration of 0.437 g/mL was added in a proportion of 50% relative to the initial amount after 1.5 h during the reaction process. Under these process conditions, the average yield of GPC after aqueous extraction of reaction products was 97% ($n = 3$) as determined by HPLC. Thus, a feasible method to prepare GPC has been established.

Key words: lipase; phosphatidylcholine; glycerophosphatide choline; non-aqueous phase

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)22-0067-05

大豆卵磷脂是大豆油生产的副产品, 也是一种天然表面活性剂, 化学名称为磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)。甘油磷酸胆碱(glycerophosphatide choline, GPC)是PC分子上两条脂肪酸链完全被水解的产物, 是体内卵磷脂代谢的产物之一^[1]。在体内, GPC可穿过血脑屏障, 这种生理功能为乙酰胆碱的生物合成提供必要的物质胆碱。乙酰胆碱是机体内重要的神经递质, 可帮助脑部完成学习、记忆等活动, 甚至修复老年痴呆早期患者已部分受损的认知能力^[2]。所以作为保健品, GPC可以减缓记忆力衰退的进程, 预防或推迟老年痴呆的发生^[3]。虽然中国卵磷脂资源丰富, 但目前国内尚无生产GPC的厂家, 因此对于农副产品大豆卵磷脂的开发利用具有重大意义。纯净的GPC呈白色粉末状或无色透明粘稠状, 极性较强, 溶于水、甲醇等极性溶剂。

脂肪酶(E.C.3.1.1.3)是一类具有多种催化能力的生物催化剂, 可催化一些水不溶性酯类的水解反应^[4-5], 除此

之外还表现出其他酶的活性, 如磷脂酶、溶血磷脂酶活性等。脂肪酶催化水解磷脂是一种界面反应, 反应界面的大小直接影响反应速度和水解程度^[6]。有机溶剂的存在有助于改善反应体系的黏度和分散性, 提高反应的立体选择性, 减少水相中的副反应^[7]。但脂肪酶催化反应的底物磷脂与水及酶互不溶解, 使反应很难发生。而在含微量水的反胶束中, 则可解决油水两相反应的困难^[8]。

目前化学法制备GPC已进行过较多的研究^[9], 且得率较高, 但化学法制备方法存在一些缺点, 如反应条件难控制, 所需试剂价格昂贵, 环境污染较大等。而生物催化反应所用物质毒性较小, 具有高度专一性, 不会改变卵磷脂的天然构型, 反应条件较温和, 适合药物的工业化生产。本实验以生物催化剂脂肪酶为工具酶, 探讨非水相中制备原料药GPC的工艺条件, 旨在提供一种在温和条件下制备高产率GPC的方法, 为其产业化应用提供参考。

收稿日期: 2011-09-23

基金项目: 安徽省长三角科技联合攻关项目(10140702001)

作者简介: 毛慧芳(1985—), 女, 硕士, 研究方向为生物制药。E-mail: huifang.mao@163.com

*通信作者: 张洪斌(1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物化工与酶工程。E-mail: zhb5678@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 试剂与amp;仪器

PC60 北京美亚斯磷脂技术有限公司; 脂肪酶 济宁和美生物工程有限公司; 溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)标准品、GPC标准品 美国Sigma公司; 庚烷、己醇、冰醋酸、醋酸钠、乙腈 天津市博迪化工有限公司; 乙腈为色谱纯, 其他均为分析纯; 二蒸水 本实验室自制。

SL202N 电子天平 上海民桥精密科学仪器有限公司; 85-2恒温磁力加热搅拌器 金坛市晶玻实验仪器厂; JJ-1 电动搅拌器 江苏金坛金城国胜实验仪器厂; RE-52 真空旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 10TA-干燥箱 上海市实验仪器总厂; 高效液相色谱仪(配有蒸发光检测器和浙江大学N2000色谱工作站) 美国Alltech公司; HH-2 恒温水浴锅 江苏金坛晶玻实验仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 卵磷脂水解制备GPC的催化反应

取250mL三口烧瓶, 称量适量卵磷脂, 依次加入庚烷、己醇, 超声溶解, 其中PC、庚烷、己醇三者比例为2:6.3:0.9(m/V/V)。然后缓慢加入适量0.02mol/L的醋酸/醋酸钠缓冲液和酶液, 200r/min搅拌条件下恒温水浴反应。在反应1.5h后, 缓慢补加质量浓度比初始反应稍高的底物溶液, 该底物用体积比为7:1的庚烷和己醇溶解, 加入适量缓冲液水相, 缓冲液体积按整个反应体系的最佳含水量计算。整个反应体系体积为60mL。

1.2.2 GPC制备工艺的优化

反应结束后, 由薄层层析法(thin layer chromatography, TLC)检测到反应液中不存在中间产物溶血磷脂酰胆碱(LPC, PC的甘油骨架上脱去一条脂肪酸链), 此时可由脂肪酸的量来确定GPC的量。

利用脂肪酶水解卵磷脂制备GPC的过程中主要考察以下几个参数: 反应时间(0.25、0.5、1、2、4、6、6.5h)、反应温度(30、40、50、55、60℃)、反应pH值(3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)、酶质量浓度(8、9.5、11、12.5、14mg/mL)、含水量(占反应体系的体积分数: 2%、3%、4%、5%、6%)、补加的底物质量浓度(0.278、0.347、0.437、0.547、0.625g/mL)、补加底物的质量分数(占初始底物质量: 30%、50%、80%、100%、120%), 根据反应中每克PC生成的GPC量或GPC产率, 最终确定最佳的工艺条件。

1.2.3 产物的初步纯化——加水萃取

反应结束后, 向反应液中加入等体积的萃取剂——蒸馏水, 静置或离心。液体被分成上下两层, 有机试剂庚烷和己醇在上层, 水在下层。目的产物GPC是强极性

物质, 水溶性强, 被萃取在下层, 即水层。萃取后, 将液体经旋转蒸发仪浓缩后烘干, 即得GPC粗产品。

1.2.4 产物产率的计算

$$\text{GPC产率}/\% = \frac{\text{GPC粗品质量} \times \text{粗品中GPC纯度}}{\text{GPC理论产量}} \times 100$$

1.3 指标的测定

1.3.1 酸碱滴定

由于脂肪酸和GPC同是反应产物, 可以通过用酸碱滴定法测反应体系中脂肪酸的变化情况来间接反映目标产物GPC的生成情况, 其中两者的换算关系为脂肪酸与GPC的物质的量比为2:1。

参照AOCS标准做酸碱滴定。

1.3.2 TLC检测

固定相为硅胶高效G板, 展开剂为氯仿: 甲醇: 水=65:25:4(V/V), 显色剂为碘液。

1.3.3 HPLC-ELSD检测

色谱条件: 固定相为C₁₈柱(250mm×4.6mm, 5μm); 流动相: 50%乙腈; 检测器为蒸发光散射检测器(ELSD); 流速: 0.6mL/min; 检测器漂移管温度: 110℃; 柱温: 35℃。

1.4 数据处理

反应产物用GPC标准品外标法定量, 制备GPC标准品的质量浓度分别为0.159、0.212、0.319、0.637、1.275mg/mL, 以质量浓度的对数为横坐标, 峰面积的对数为纵坐标, 制定标准曲线。

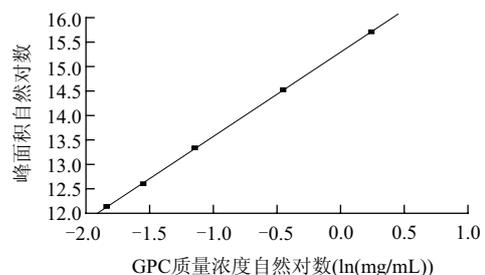


图1 GPC的标准工作曲线

Fig.1 GPC standard curve

用最小二乘法作线性回归, 制得的质量浓度对数与峰面积对数的标准工作曲线为 $Y=1.7235X+12.52$ ($R^2=0.99996$), 由图1可知, GPC标准品质量浓度自然对数在-2~0.45范围内, 与峰面积呈良好的线性关系。

2 结果与分析

2.1 催化工艺的确定

2.1.1 反应时间的确定

在反应温度40℃、pH5.0、加酶量12.5mg/mL、含水

量4%，补加的底物质量浓度为0.437g/mL，补加底物质量为初始质量的50%的条件下，实验检测并记录了该反应6.5h内的动态变化。由图2可见，前15min内反应速度较快，随后速率有所降低，但在1~2h时间内由于补加了底物，GPC量再次增加较快。整体来看，反应6h时间之内，体系中GPC的量呈现逐渐增加并趋于平衡的趋势，6h后继续延长反应时间，GPC不再增加，主要原因是反应开始时底物过量，反应速率较快，随着底物的减少，酶与底物结合位点减少，导致产物增加较慢，最后不再增加；并且随着时间的延长，受有机溶剂影响，活力有所降低，影响酶解反应进行，所以最佳反应时间是6h。

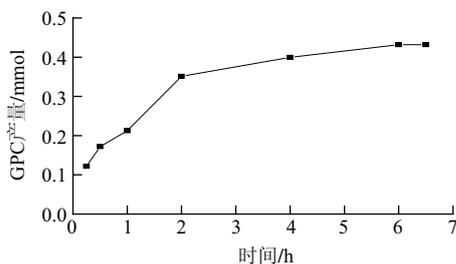


图2 反应时间对GPC产量的影响
Fig.2 Effect of reaction time on GPC yield

2.1.2 温度对产物产量的影响

在反应时间6h，其他条件同2.1.1节的条件下，在30~60℃范围内分别测定GPC量，结果见图3。温度在酶催化反应中起着重要的作用，直接影响反应速率、催化活性及稳定性。温度增加有助于底物在溶剂中的溶解，降低体系的黏度，促进反应的进行，同时增加了分子运动的动能，利于底物分子与酶分子的碰撞接触；但过高的温度会导致酶的变性失活，温度过低会影响反应体系的传递速度^[10]，从而导致反应速率降低。同时，在PC水解生成GPC过程中，涉及到中间产物LPC的酰基转移反应，而酰基转移受反应体系中温度的影响^[11]，温度通过对酶活和酰基转移综合作用来影响GPC的产量变化。由图3可知，温度为40℃时，整个反应体系产生的GPC量最大，所以40℃为该反应的最适温度。

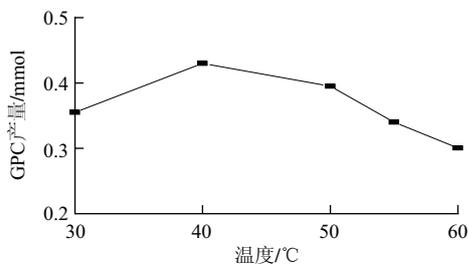


图3 温度对GPC产量的影响
Fig.3 Effect of temperature on GPC yield

2.1.3 pH值对产物产量的影响

在反应时间6h、温度40℃、加酶量12.5mg/mL、含水

量4%，补加的底物质量浓度为0.437g/mL，补加底物质量为初始质量50%的条件下，在pH3.0~6.0范围内，pH对产物产量的影响见图4。酶要表现活性，其活性部分的有关基团都必须保持一定的解离状态，其中任何一种基团的解离状态发生变化就将使酶从活性状态转入无活性状态^[12]，pH值能影响酶分子的存在形式及结构的稳定性，尤其是能引起活性部位基团解离的变化，从而影响酶分子的活性。由图4可知，随着pH值的增加，GPC量有先增加后减少的趋势，在pH5.0时达到最大值，所以最适pH值为5.0。

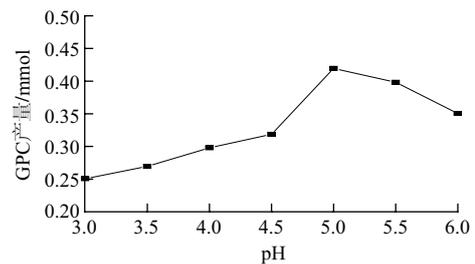


图4 pH值对GPC产量的影响
Fig.4 Effect of pH on GPC yield

2.1.4 加酶量对产物产量的影响

在反应时间6h、温度40℃、pH5.0、含水量4%，补加的底物质量浓度0.437g/mL，补加底物质量为初始质量50%的条件下，在酶质量浓度为8~14mg/mL范围内，酶质量浓度对产物产量影响见图5。由图5可知，酶质量浓度小于12.5mg/mL时，GPC有逐渐增加的趋势，之后GPC的变化不明显。这是因为脂肪酶是界面酶，底物与酶在泡囊界面发生反应，反应的速度由界面面积的大小决定。一定范围内当底物质量浓度一定的情况下，酶量增加，反应速率加快，当酶质量浓度高到一定程度，酶分子将饱和反应界面，更多的酶分子将无法达到该界面，从而出现GPC量不再增加^[13]。所以最佳酶质量浓度为12.5mg/mL。

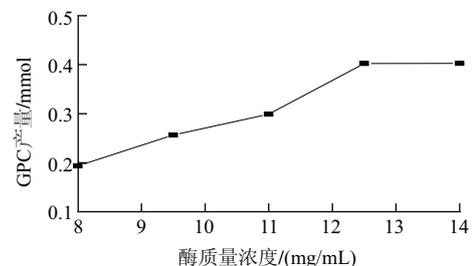


图5 加酶量对GPC产量的影响
Fig.5 Effect of phospholipase A1 loading on GPC yield

2.1.5 水含量对产物产量的影响

在反应时间6h、温度40℃、pH5.0、酶质量浓度为12.5mg/mL，补加底物质量浓度为0.437g/mL，补加底物

质量为初始质量50%的条件下,在水含量为2%~6%范围内,水含量对产物产量的影响见图6。适量的水是维持酶活性的必需元素^[14],Svensson等^[15]研究发现,适量的水可增加磷脂的水解反应。但是,体系内过量的水不仅可能导致副产物的产生,而且使体系发生乳化现象,不利于反应的进行。由图6可知,随着水含量的增加,GPC量有逐渐先增多后减少的趋势,当水含量为4%时,GPC量达到最大值,所以,最适水含量为4%。

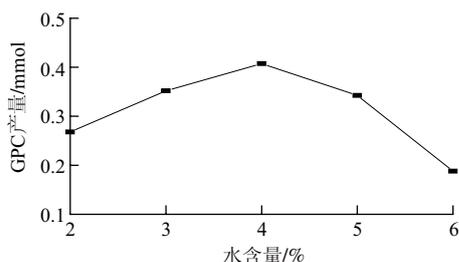


图6 水含量对GPC产量的影响

Fig.6 Effect of water content on GPC yield

2.1.6 反应过程中补加底物PC的质量及质量浓度的确定

在反应过程中补加比初始反应体系的质量浓度高的底物,以增加酶的利用率和减少有机溶剂的使用。补加的底物需用新鲜的庚烷和己醇以7:1的体积比溶解。反应初期,过高的底物质量浓度导致反应液的黏度和传质阻力增大,反应一段时间后,底物质量浓度逐渐变低,实行补加工工艺,可有效提高酶促反应效率。

为节约有机溶剂的使用,且反应一段时间后原体系中底物质量浓度有所减少,所以补加的质量浓度应比初始质量浓度(0.278g/mL)稍大。在反应时间6h、温度40℃、pH5.0、酶质量浓度12.5mg/mL、水含量4%,补加底物质量为初始反应质量50%的条件下,考察补加的底物质量浓度分别为0.278、0.347、0.437、0.547、0.625g/mL时, GPC产率随质量浓度的变化情况,如图7所示。

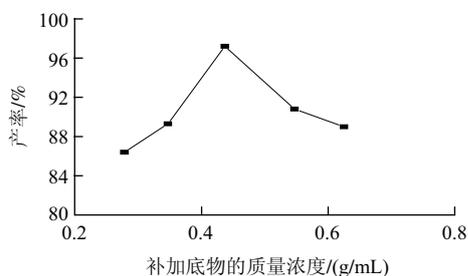


图7 补加底物质量浓度对GPC产率的影响

Fig.7 Effect of additional substrate concentration on GPC yield

由图7可知, GPC产率随质量浓度的增加呈现先增加后减小的趋势,当质量浓度为0.437g/mL时, GPC产率达到最大。主要原因是底物PC也是天然的表面活性剂,而脂肪酶是界面酶,在油水界面参与催化反应, PC的存在

可减小界面的张力, PC质量浓度过小不能提供酶在界面反应的稳定的微环境,而PC质量浓度过大不利于酶分子的自由扩散,阻碍反应的进行,所以确定补加的质量浓度为0.437g/mL。

当补加的底物质量浓度不变时(0.437g/mL), GPC产率随补加的底物质量分数变化见图8。其中对于补加不同质量的底物,底物量的增加,反应时间相应有所延长,反应终点根据酸碱滴定法来判定。对于补加底物的质量分数分别为30%、50%、80%、100%、120%时对应的反应时间分别为5、6、7.5、10、12h。由图8可看出,在温度40℃、pH5.0、酶质量浓度为12.5mg/mL、水含量4%的条件下, GPC的产率在底物质量分数不大于50%时几乎保持不变,且达到最大值,之后逐渐减小。主要原因是在一定范围内,酶未完全被底物饱和,补加的底物反应比较完全,但随底物量的逐渐增加,增加到一定程度,底物过量,且随着时间延长酶的活性也有所降低,最后有部分底物不能转化为产物导致产率降低。综合考虑 GPC产率和酶的最大利用,当补加底物量为初始质量的50%时,为最佳补加量。

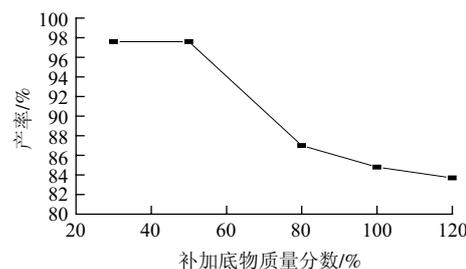


图8 补加底物质量分数(占初始底物质量)对GPC产率的影响

Fig.8 Effect of additional substrate amount on GPC yield

2.2 产物GPC的产率计算

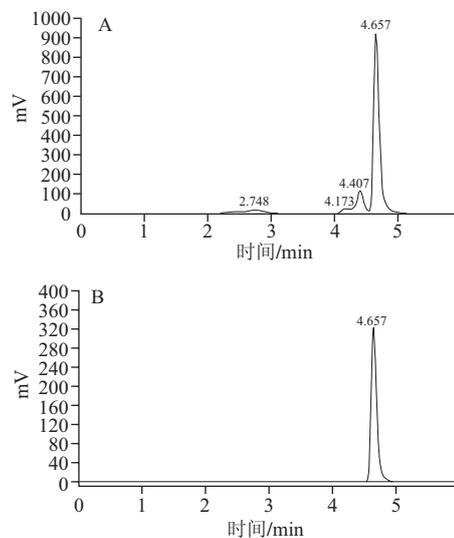


图9 GPC样品(A)和标准品(B)的高效液相色谱图

Fig.9 HPLC chromatograms of GPC sample (A) and standard GPC (B)

在已优化的工艺条件下做酶法制备GPC的催化反应,反应液经1.2.3所述方法萃取后取样做HPLC-ELSD检测,在1.3.3节节的检测方法下,GPC出峰时间为4.657min,图9A、B分别为产品及标样的HPLC图,由图可知,制备出的目的产物中的GPC纯度相对较高。可进一步通过外标定量法测出其中GPC纯度。

由1.4节的标准曲线可计算出GPC粗品的纯度为54%,按1.2.4节的产率计算方法,得GPC的产率为97%。此产率高于Blasi等^[16]在酶法制备GPC的工艺中反应48h的GPC产率(94%)。

在催化反应过程中若不补加底物,通过实验并计算得GPC的产率为89.18%,小于补加的产率97%,主要原因是当底物消耗一部分后再补加,可以使反应的化学平衡向正反应方向(GPC生成方向)移动,从而提高了产率。所以在酶法制备GPC的过程中实行补加底物工艺,既提高了酶的利用率,减少了有机溶剂的使用,又提高了GPC的产率。

3 结论

实验在PC、庚烷、己醇的组成比($m/V/V$)为2:6.3:0.9的前提下,通过单因素试验,确定脂肪酶催化水解卵磷脂的最佳工艺条件为反应时间6h、温度40℃、pH5.0、加酶量12.5mg/mL、水含量4%;同时,基于工业化生产考虑,为了酶的充分利用和节省有机试剂的使用,在反应1.5h后,补加较高质量浓度的底物,当初始底物质量浓度为0.278g/mL时补加底物质量为初始质量的50%,补加的质量浓度为0.437g/mL。

大豆卵磷脂是天然产物,原料易得,且功能多,应用广,国内外对于卵磷脂的酶法改性研究较多,但生成的主要产物是LPC,酶法制备高产率GPC的文献报道很少。本实验在反应6h后,反应液经蒸馏水萃取后得到GPC粗品,通过HPLC测定其中GPC含量,计算得产率为97%,在目前报道的非水相生物催化制备GPC的研究中效率较高。另外,实验中所用的两种有机试剂庚烷、己醇可通过旋蒸回收,重复利用。该工艺反应条件温和,

产物产率较高,可为生物催化制备GPC的工业化生产提供实验基础。

参考文献:

- [1] 常平安,秦文珍. 酵母卵磷脂的脱酰基分解代谢[J]. 生命的化学, 2009, 29(4): 547-551.
- [2] 钱峰. 微乳体系中磷脂酰胆碱的酶解研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- [3] PAMETTI L, ABATE G, BARTPRELLI L, et al. Multicentre study of 1- α -glyceryl-phosphorylcholine vs ST200 among patients with probable senile dementia of Alzheimer's type[J]. *Drugs Aging*, 1993, 3(2): 159-164.
- [4] DAVIS B G, BOYER V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2001, 18: 618-640.
- [5] PANDEY A, BENJAMIN S, SOCCOL C R, et al. The realm of microbial lipases in biotechnology[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 29(2): 191-131.
- [6] 林保平, 郑镇勇. 蔬菜加工中的变色和对策[J]. *福建农业*, 2005(10): 25.
- [7] 王李礼, 陈依军. 非水相体系酶催化反应研究进展[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1789-1794.
- [8] 金字. 反胶束中酶催化反应研究进展[J]. *化学工程师*, 2008(6): 34-35.
- [9] 孙清瑞, 鹿保鑫, 刘志明, 等. 化学催化法制备甘油磷酸胆碱的研究[J]. *粮油加工*, 2009(11): 56-57.
- [10] 陈石根, 周润琦. 酶学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001.
- [11] POISSON L, DEVOS M, GODET S, et al. Acyl migration during deacylation of phospholipids rich in docosahexaenoic acid (DHA): an enzymatic approach for evidence and study[J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(5): 743-749.
- [12] 高修功. 非水相酶学的原理与应用[J]. *国外医学: 生物医学工程分册*, 1994, 17(5): 268-273.
- [13] 黄丹, 马美湖, 蔡朝霞, 等. 磷脂酶A1改性制备高乳化性蛋黄粉的工艺条件优化[J]. *食品科学*, 2010, 31(6): 20-25.
- [14] HOSOKAWA M, TAKAHASHI K, MIYAZAKI N, et al. Application of water mimics on preparation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid containing glycerolipids[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1995, 72(4): 421-425.
- [15] SVENSSON I, ADLERCREUTZ P, MATTIASSON B. Lipase-catalyzed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1992, 69(10): 986-991.
- [16] BLASI F, COSSIGNANI L, SIMONETTI M S, et al. Enzymatic deacylation of 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholines to *sn*-glycerol-3-phosphocholine[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(7): 1405-1408.