

文章编号:1009-038X(2004)02-0031-05

无溶剂体系合成 1,3-甘油二酯用脂肪酶的 筛选及其酯化性质

孟祥河, 邹冬芽, 段作营, 毛忠贵

(江南大学 生物工程学院, 教育部生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 对不同来源的脂肪酶进行了系统的筛选, 并根据位置专一性的差别将脂肪酶分为 1,3-特异的、1,3-选择性和非选择性的 3 类. 采用 Lipozyme RMTM 在无溶剂系统中催化甘油、脂肪酸合成 1,3-sn-甘油二酯. 研究表明脂肪酸、底物醇种类、温度、水分活度对 Lipozyme RMTM 的活力有明显的影响.

关键词: 1,3-甘油二酯; 减肥; 脂肪酶; 酯化活力; 位置专一性

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Screening of Lipase for Synthesis of 1,3-sn-Diacylglycerols and Its Esterification Characteristics in Solvent-Free System

MENG Xiang-he, ZOU Dong-ya, DUAN Zuo-ying, MAO Zhong-gui

(School of Biotechnology, Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Lipases from different commercial sources were screened in terms of their regioselectivities (RE) and activity of esterification. Obvious differences were found in the RE value so that it can be selected as a measure to classify these biocatalysts as those of specific, selective, and nonspecific. On the base of systematic screening experiments, Lipozyme RMTM indicating high regioselectivities and high esterification activity was used as the catalyst for efficient synthesis of 1,3-sn-Diglyceride with glycerol and fatty acid as the raw materials in solvent-free system. The results suggested that the species of fatty acids and alcohols, reaction temperature, and water activity effected esterification activity of Lipozyme RMTM significantly.

Key words: 1,3-diglyceride; antiobesity; lipase; esterification activity; regioselectivity

1,3-甘油二酯(Diglyceride, DAG)是由两分子脂肪酸分别结合到丙三醇的 2 个端羟基上形成的二酯. 它是油脂的天然成分, 属 GRAS(公认安全)物质, 而且口感、色泽、风味与普通甘油三酯(TAG)

无异, 因而是理想的油脂替代品^[1]. 另外 1,3-DAG 最大特点是食用后不引起肥胖, 同时能抑制实验小鼠血清脂质的升高, 减少肥胖大鼠内脏中性脂肪的蓄积, 可以用于预防和治疗高脂血症以及与高脂血

收稿日期: 2003-07-12; 修回日期: 2003-12-02.

作者简介: 孟祥河(1974-), 男, 山东齐河人, 发酵工程博士研究生.

万方数据

症密切相关的心脑血管疾病,如动脉硬化、冠心病、中风、脑血栓等^[2]。众所周知,过多的内脏脂肪对人体健康极为不利,而甘油二酯能够降低内脏脂肪,消除不良隐患。2位羟基与具有保健功效的多不饱和脂肪酸或低能量的短链脂肪酸(SCFA)、中链脂肪酸(MCFA)酯化成期望的结构脂质,既可提高脂肪酸在体内的吸收效率,又可增加其稳定性。此外,1,3-甘油二酯还应用在含脂质食品、药品中间体甘油三酯结晶结构的修饰、作为医药中间体合成的原料等。如添加到人造奶油中调整熔点可改变塑性^[3];作为医药中间体的起始原料,可用于合成磷脂、糖脂、脂蛋白、酶的激活剂、抑制剂,作为药物载体;可与抗炎的尼氟灭酸的羧基酯化^[4];与醇、酚共价结合形成 β 阻滞剂——氯甲苯心安^[5];也可制备2-氯延胡索酰-1,3-甘油二酯消毒剂^[6]。具有吸收效果好,人体相容性高,副反应小等优点。对于这类应用,要求1,3-DAG必须是纯的、特殊结构位置的异构体。

然而工业上的二酰基甘油产品主要是采用化学法制得的,但化学法缺乏专一性,所得产品是1,2-DAG,1,3-DAG的平衡混合物(摩尔比 γ 约为3:2),而且反应温度高,使用的化学催化剂污染环境。近年来,微生物脂肪酶在油脂化工业中的应用有了进展。酶由于具有精巧的选择性、温和的反应条件及环境友好等优点日益受到人们的青睐。作者研究对合成用酶进行了系统的筛选,并对Lipozyme RMTM的酯化特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Lipozyme RMTM, Lipozyme TLTM, Novo435; Novo Nordisks 产品; Lipase AP15, Lipase PS, Lipase AK, Lipase A6, Lipase-F, Lipase AY30, Lipase G80, Lipase M-10; Amano Chemical Inco. 生产; 1-亚油酸甘油酯、2-亚油酸甘油酯、1,3-二亚油酸甘油酯、1,2-二亚油酸甘油酯、三亚油酸甘油酯标准品; Sigma Chemical Co. 产品; 甘油: AR级上海化学试剂公司产品; 油酸: CP级, 上海化学试剂公司产品; 亚油酸: 常州奥奇海洋生物工程有限公司产品; 分子筛 3A: 上海化学试剂公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酶酯化活力的测定 酯化活力的定义: 1个酯化活力单位(EU)表示在无溶剂体系中, 一定温度条件下, 每分钟消耗 1 μmol 亚油酸所需的酶量(μg)。酯化活力的测定条件: 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,

亚油酸、甘油摩尔比 γ 为2:1, 一定的酶添加量(固定化酶的质量分数为5%, 游离酶的质量分数为0.3%); 400 r/min 磁力搅拌, 进行酯化反应, 真空除去生成的水, 定时取样用吡啶醋酸铜法测定剩余的脂肪酸^[7]。

1.2.2 脂肪酶位置专一性(RE值)的测定 反应条件如下: 底物为 10 mmol 油酸和 50 mmol 甘油, 酶添加量为 0.1 g, 300 r/min 搅拌, 真空度为 0.01 MPa, 反应温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 。反应过程中定时取样分析产物中甘油酯组成, RE值按下式计算:

$$\text{RE} = (1,3\text{-MAG})\% - (2\text{-MAG})\%$$
 甘油酯组成(1-MAG, 2-MAG)按 AOCS cd 116—91 测定^[8]。

1.2.3 水分活度对 Lipozyme RMTM活性的影响 酯化反应前, 把酶置于密闭容器中与饱和盐溶液进行气相平衡 72 h, 使酶与饱和盐溶液水分活度相同。常温下, 本实验采用的饱和盐水在常温下水分活度如下: LiBr 为 0.06, LiCl 为 0.11, MgCl_2 为 0.33, NaBr 为 0.54, KCl 为 0.84。

1.2.4 酯化方法 反应混合物中脂肪酸和甘油摩尔比为 2 混合物, 盛于 100 mL 夹层烧杯中, 循环水浴保温, 200 r/min 磁力搅拌器搅拌, 添加质量分数为 3% 的固定化酶开始反应, 定时取样分析混合物的组成。

1.2.5 甘油酯组成的测定 用 HPLC/RI 法。酯化产品用己烷萃取, 加少量水离心收集上相, 通 N_2 条件下除去溶剂, 然后再溶于丙酮中, 用于 HPLC 分析。HPLC 流动相: 丙酮: 丙腈 = 1:1 (V/V); 体积流量 0.8 mL/min; 压力 0.12 MPa。^[9]

2 结果与讨论

2.1 不同商业来源的脂肪酶的酯化活力

酯化反应所需酶制剂的筛选指标主要是酶活力, 酶的专一性(位置专一性、底物专一性)。脂肪酶活性有水解活性及酯化活性之分, 不同的反应条件下, 表现的活性是不同的。如水作溶剂时主要催化脂类水解为相应的酸和醇, 而在非水相(有机相、超临界流体、无溶剂体系、微水体系及低共熔点体系)中, 水解反应明显不发生, 然而却能催化醇、酸的酯化反应, 这在水相中是热力学不利的反应^[10]。酯化反应虽然是水解反应的逆过程, 然而二者并不等同, 水解活力高的酶酯化活力并不一定高, 因而在筛选酯化反应所用酶制剂时, 以水解活力作为指标是不科学的。实验采用与实际酯化反应相同的条件下测定了不同商业来源的脂肪酶在无溶剂体系中的酯化活力, 实验结果见表 1。

表 1 不同商业来源的脂肪酶酯化活力

Tab. 1 Esterification activities of Lipases from different commercial suppliers

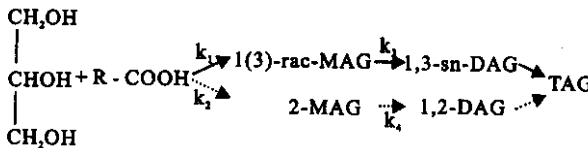
种类	酶 商 品 名	微生物来源	酶活 (EU/g)
固 定 化	Novo 435	<i>Candida antarctica</i>	705.47
	Lipozyme RM ^{IM}	<i>Rhizomucor miehei</i>	945.12
	Lipozyme TL ^{IM}	<i>Thermomyces lanuginous</i>	165.8
游 离 酶	Lipase AK	<i>Pseudomonas Species</i>	805.85
	Lipase LAP	<i>Pseudomonas Species</i>	772.64
	LipaseLMZ	—	450.61
	Lipase AP15	<i>Aspergillus niger</i>	445.05
	Lipase LZ	—	161.19
	Lipase G50	<i>Geotrichum Candidum</i>	454.23
	Lipase AY30	<i>C. rugosa</i>	301.76

数据表明, Lipozyme RM^{IM} 活力最高, 然后依次为 Lipase AK, Lipase LAP, Novo 435. 其中 Novo 435 的活力比文献报道的偏低, 一般认为 Novo 435

不仅可以作用于伯羟基, 而且可催化仲羟基和部分叔羟基, 因而具有较高的活力^[11]. 偏低的原因可能是其最适温度高(70~80 ℃), 而实验温度低不适合 Novo 435 的催化反应.

2.2 不同来源脂肪酶的位置专一性

脂肪酶根据位置专一性通常被分为 1,3 专一性及非专一性两类^[12]. 然而研究表明脂肪酶在位置专一性方面范围较宽, 可以从严格的专一性到完全非专一性. 因此一刀切的分类方法并不可取. 作者据实验所得 RE 值(见表 2), 将脂肪酶作如下分类: 1,3-Specific (RE > 90); 1,3-Selective (90 > RE > 70); Nonspecific (RE ≤ 70). 通过调整甘油、脂肪酸的摩尔比控制反应主要生成 MAG, 而不生成(或尽量少生成)甘油二酯、三酯. 示意图如下:



由于反应温度相对较低, 而且是在无溶剂系统中进行, 基本消除了高温及质子酸介质或双水相介质所不可避免的酰基转移反应, 因此可较精确地测定 RE 值.

表 2 酶促亚油酸酯化反应结果及不同来源脂肪酶的 RE 值

Tab. 2 Esterification of linolenic acid in the presence of various lipase and RE values of different lipases

序号	脂肪酸	转化率/% (12 h)	MAG/DAG	1,3-MAG/2-MAG	RE 值 (USFA)	特性
1	Novo 435	62.8.8	82/18	90/10	80	1,3-selective
2	Lipozyme R M ^{IM}	68.4	91/9	98/2	96	1,3-specific
3	Lipozyme TL ^{IM}	32.6	90/10	96/4	92	1,3-specific
4	Lipase AK	56.1	93/7	97/3	94	1,3-specific
5	Lipase LAP	52.9	84/16	82/18	64	Nonspecific
6	LipaseLMZ	46.7	88/12	89/11	78	1,3-selective
7	Lipase AP15	47.3	91/9	90/10	80	1,3-selective
8	Lipase LZ	24.8	65/35	84/16	68	Nonspecific
9	Lipase G50	31.6	98/2	90/10	80	1,3-selective
10	Lipase AY30	28.6	91/9	83/17	66	Nonspecific

本实验大大方便了酶促合成 1,3-DG 反应中适宜生物催化剂的选择, 同时增加了实验的可靠性. 从表 2 中可以看出, Lipozyme RM^{IM}, Novo 435, Lipase AK 具有较高的 RE 值和转化率. 结合表 1 数据, 实验将这 3 种酶作为酯化反应的首选. 但考虑到目前酶促合成甘油酯的成本较高, 应尽量使用固

定化酶以增加酶的稳定性, 实现催化剂的重复利用. Lipase AK 虽然专一性强, 活力也很高, 但由于是游离形式, 酶活容易损失失活, 而 Novo 435 活力虽高, 但价格昂贵, 适合生产附加值高的产品. 另外据报道 Novo 435 的位置专一性不确定, 有时表现 1,3 位专一性, 有时无专一性. 因此综合考虑性价比,

实验选择 Lipozyme RM^{IM} 作为进一步优化的对象.

2.3 Lipozyme RM^{IM} 脂肪酸的特异性

脂肪酶对不同脂肪酸酯化反应具有特异性. 其衡量标准为底物特异性常数 α (Specificity constant)^[13]. α 可以根据待测脂肪酸与参比脂肪酸(通常为油酸)在竞争与酶结合的条件下的反应速度及初始浓度求得, 即 $\alpha = (v_{Ac1} / v_{Ac2}) / ([Ac1] / [Ac2])$, 其中, v_{Ac1} , v_{Ac2} , $[Ac1]$, $[Ac2]$ 分别为待测脂肪酸、参比脂肪酸的反应速度及起始摩尔浓度. 此方法对于富集特定脂肪酸为目的的实验是科学的. 本实验主要是在脂肪酸中选择 Lipozyme RM^{IM} 适合的底物, 因此以单一脂肪酸作底物时的酶促酯化速度可在一定程度上反映出酶对其特异性.

图 1 为 Lipozyme RM^{IM} 催化不同脂肪酸酯化反应的相对初速度, 结果以相对亚油酸的酯化速度表示. 反应温度为 60℃, 其它条件见 1. 2. 3. 实验条件下, Lipozyme RM^{IM} 对亚油酸、油酸、月桂酸的催化活性明显高于短链的丁酸、辛酸. 据认为短链脂肪酸在 50℃ 以上可能会使固定化载体松散, 固定化酶出现部分脱落, 因此活力降低^[14]. 另外短链脂肪酸浓度高时会对脂肪酶产生有抑制作用^[15].

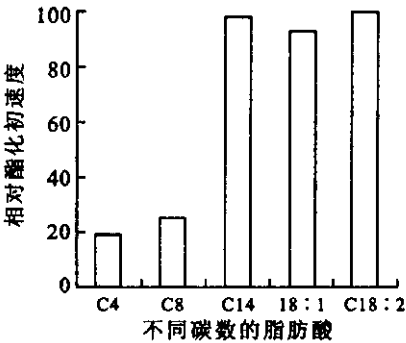


图 1 不同脂肪酸的相对酯化初速度(亚油酸作参比)
Fig. 1 Relative esterification initial velocity of fatty acid with different length chain (Linoleic acid as the base)

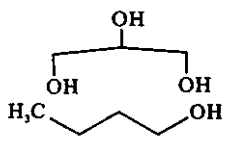
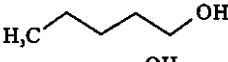
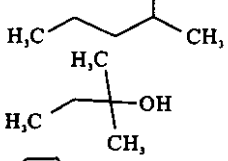
2.4 Lipozyme RM^{IM} 对不同羟基供体的选择性

Lipozyme RM^{IM} 对底物醇的选择性见表 3. 反应条件如下: 酰基供体为亚油酸, 醇酸摩尔比为 2, 反应温度为 60℃, 200 r/min 搅拌, 0.01 MPa 真空除去反应生成的水. 以甘油为底物时酶活计为 100, 其它醇作底物时酶活以甘油的相对值表示. 结果发现对伯醇(Primary hydroxyl)的活性明显高于仲醇(Secondary hydroxyl), 而对于叔醇及环己醇活性没检出. 这可能与酶的活性空间构象有关.

2.5 温度对 Lipozyme RM^{IM} 催化不同脂肪酸酯化反应的影响

改变反应温度, 酶对脂肪酸的特异性有可能会发生改变. 关于温度对不同脂肪酸作底物时酶促酯化反应初速度的影响见图 2. Lipozyme RM^{IM} 以油酸、亚油酸、月桂酸为底物时最适温度为 70℃, 此时的最大起始反应速度在 600 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 以上, 而对丁酸、辛酸, 其最适温度却接近 40℃. 由于底物不同, 适宜的温度也不同.

表 3 Lipozyme RM^{IM} 对醇底物的选择性
Tab. 3 Specific activity for alcohol substrate

醇种类	相对酯化酶活
	
	
	
	

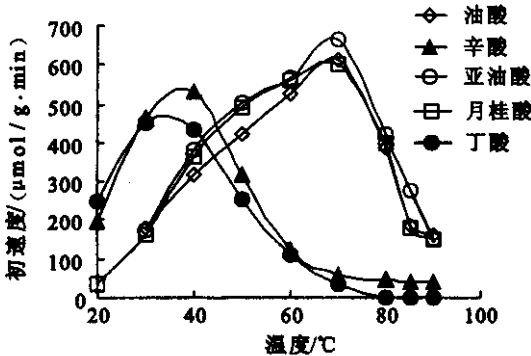


图 2 温度对反应初速度的影响
Fig. 2 Effects of temperature on initial velocity

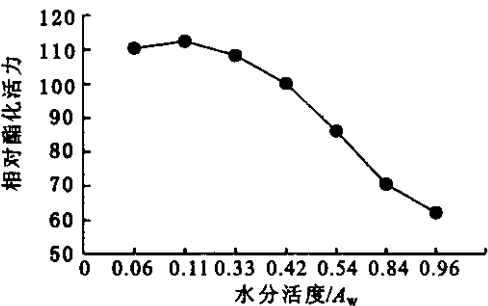


图 3 水分活度对酶活力的影响
Fig. 3 Effect of water activity on esterification activity

2.6 水分活度对 Lipozyme RMTM活力的影响

水分是酶维持活性构象所必须的,但水分超过一定量,会使酶颗粒集结成团影响传质。据认为水分还会与甘油竞争结合反应中的酰基酶中间体使其水解。因此研究水分活度对 Lipozyme RMTM的影响是必要的。本实验定义自然条件下($A_w=0.42$,水分质量分数为 8.6%)酶的活力为 100。从图 3 可以看出, $A_w<0.42$ 时酶活力很高,当 A_w 达到 0.54 时活力明显下降,而 0.96 时酶活只有正常值的 60%。

实验中没发现明显的酶结团现象,关于水分如何影响酶活还有待于研究。

3 结 论

通过对商业化来源的脂肪酶酶活及位置专一性的比较,选择 Lipozyme RMTM作为合成 1,3-DAG 酶制剂,一般酯化特性如下:亚油酸为较适宜的脂肪酸,最适温度为 70℃,最适水分活度为 0.42。

参考文献:

- [1] 孟祥河,毛忠贵,周锴. 甘油二酯的应用现状[J]. 中国食品添加剂,2002,53(4):58—61.
- [2] Naito S, Watanabe H, Shimasaki H, *et al.* Effect of Dietary Diacylglycerols on Lipids Metabolism in Human:1. The Suppressive Effect of Dietary Diacylglycerols on the Increase of the Serum Triglycerides[M]. MONTREAL: 16th International Congress of Nutrition; 1997,41.
- [3] Doucet JIM. Shortening system, products there with and methods for making and using the same[P]. 美国专利: US59098655, 1999-06.
- [4] Scriba G K E. Phenytoin-lipid conjugates as potential prodrug [J]. *Arch pharm*, 1993,326: 477—481.
- [5] kihel EI L. Letourneux, synthesis and evalution of anti-inflammatony[J]. *Drug Res*, 1996, 46: 1046—1044.
- [6] Berger M. Regioisomerically pure MAG DAG as synthetical building blooks [J]. *Fat science & technology*, 1993,95: 169—175.
- [7] Jwon D Y, Rhee J S. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acid for lipase assay[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1986,63:89—92.
- [8] Determination of Mono and Diglycerides by Capillary Gas Chromatography[M]. Official Methods and Recommended Practices of the Amercian Oil Chemists' Society, AOCS Press, 1997, cd 11b—91.
- [9] Yoshitsugu Kosugi, Prodyut Kumar Roy, Qinglong Chang, *et al.* Esterification of polyunsaturated fatty acids by various forms of immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* [J]. *Lipid*, 2000,35(4):461—466.
- [10] Lexander M Kibanov. Improving enzymes by using them in organic solvent[J]. *Nature*, 2001,409(11):241—246.
- [11] Kosaku Dainon. Characteristics of Immobilized Lipases in Oil and Fats Industry[J]. *J Olei Sci*, 2001, 1(8): 31—36.
- [12] 张树政,徐家立. 酶制剂工业[M]. 北京:科学出版社,1984,7:655—670.
- [13] Rangheard M-S, Langrand G Brartti J. Multi-competitive enzymatic reaction in organic media [J]. *Biochim Biophys Actam*, 1989,1004: 20—28.
- [14] Kim S M, Rhee J S. Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1991,68(7):499—503.
- [15] 徐岩. 溶剂相中微生物脂肪酶催化脂肪酸合成的研究[D]. 无锡:无锡轻工大学, 1999.

(责任编辑:杨 萌)