

酶法醇解合成 2-花生四烯酸单甘酯

王小三,李厚悦,王子欣,付艺婕,刘柯纓,黄 晔,陈 焯,赵昕辰,常 明

(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

摘要:2-花生四烯酸单甘酯(2-AG)是一种内源性大麻素,在神经、心血管和免疫等系统中具有一系列的生理活性。为实现2-AG的绿色高效制备,探究了脂肪酶催化醇解富含花生四烯酸的微生物油制备2-AG的方法。以2-单甘酯(2-MAG)含量为指标,通过单因素实验对酶法催化醇解反应条件进行了优化,并采用溶剂萃取法对产物进行纯化。结果表明:最佳反应条件为以Lipozyme 435脂肪酶为醇解脂肪酶、酶添加量4%(以油质量计)、油与无水乙醇物质的量比1:40、叔丁醇为溶剂、油溶比2:3、反应温度35℃、反应时间8 h,在最佳条件下粗产物中2-MAG含量为33.63%;经溶剂萃取纯化后2-MAG的纯度达到了94.79%,其中2-AG含量为40.70%。综上,酶法醇解富含花生四烯酸的微生物油可以获得高2-AG含量的2-MAG。

关键词:2-花生四烯酸单甘酯;脂肪酶催化;醇解;微生物油

中图分类号:TQ644;TS224.8 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)12-0097-05

Enzymatic synthesis of 2-arachidonoylglycerol by ethanolysis

WANG Xiaosan, LI Houyue, WANG Zixin, FU Yijie, LIU Keying,
HUANG Ye, CHEN Ye, ZHAO Xinchun, CHANG Ming

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) is an endogenous cannabinoid and exhibits a variety of biological activities in the central nervous, cardiovascular, and immune systems. To prepare 2-AG in a greener and efficient way, a lipase-catalyzed alcoholysis of microbial oil rich in arachidonic acid was used to synthesize 2-AG. With the 2-monoacylglycerol (2-MAG) content as an index, the reaction conditions of lipase-catalyzed alcoholysis were optimized by single factor experiment, and a solvent extraction method was employed to purify the product. The results showed that the optimal reaction conditions of lipase-catalyzed alcoholysis were as follows: Lipozyme 435 as alcoholysis enzyme, lipase dosage 4% (relative to oil mass), molar ratio of oil to anhydrous ethanol 1:40, *tert*-butanol as solvent, ratio of oil to solvent 2:3, reaction temperature 35℃ and reaction time 8 h. Under the optimal conditions, 2-MAG content in the crude product was up to 33.63%. The purity of 2-MAG after purification was up to 94.79%, and the content of 2-AG was 40.70%. In conclusion, enzymatic alcoholysis of microbial oil rich in arachidonic acid can obtain 2-MAG with high 2-AG content.

Key words: 2-arachidonoylglycerol; lipase-catalyzed reaction; alcoholysis; microbial oil

2-花生四烯酸单甘酯(2-AG)为花生四烯酸(ARA)与甘油的sn-2位羟基发生酯化后形成的活

性物质。2-AG为两亲类化合物,常温下为液体,可以与乙醇、甲醇、乙腈等极性溶剂以任意比例互溶,但在正己烷等非极性溶剂中溶解性差^[1]。

2-AG是一种内源性大麻素,人体突触后神经元受到激活后,其细胞膜上的甘油磷脂在磷脂酶的作用下产生甘油二酯(DAG),DAG在脂肪酶作用下生成内源性大麻素2-AG^[2]。研究表明,内源性大

收稿日期:2022-06-23;修回日期:2023-07-03

作者简介:王小三(1983),男,副教授,硕士生导师,研究方向为油脂改性与修饰(E-mail)wxstongxue@163.com。

通信作者:常 明,教授,硕士生导师(E-mail)chang@jiangnan.edu.cn。

麻素 2-AG 能够调节压力适应能力,并减少急、慢性应激反应导致的类焦虑和抑郁,药物增强 2-AG 信号可能是一种减少应激反应所产生的不利后果的有效方法^[3-4]。同时,内源性大麻素 2-AG 和食欲素系统(O/X)之间存在相互作用,Hanlon 等^[5]研究发现,人体的饥饿感和食欲会随着午后体内 2-AG 浓度的升高而逐渐强烈,并且人在缺少睡眠时,食物摄入过多会激活内源性大麻素 2-AG,增加由睡眠不足导致肥胖的概率。此外,2-AG 在治疗糖尿病及癌症、神经保护等方面具有多种生理活性^[6]。

作为一种 2-单甘酯(2-MAG),2-AG 具有 2-MAG 的通性,即能够作为非离子型表面活性剂,具有增加溶解度、乳化性等作用^[7]。甘油骨架 sn-2 位的脂肪酸往往不稳定,2-MAG 常发生酰基转移,变为热力学更稳定的 1-单甘酯(1-MAG)^[8]。在酰基转移的同时,2-MAG 所具有的多种生理活性也随之消失。因此,抑制酰基转移,保留 2-MAG 的结构为制备 2-AG 产品时的难点及最关键一环。目前常采用化学法、化学酶法(化学法+酶法)、酶法合成 2-AG。但是化学法合成过程中无法避免副产物的形成,且实验中需采用放射性标记等有害物质,容易造成污染^[9-10]。化学酶法成本高、产量低,并且涉及有毒的非生物性催化剂,反应条件苛刻,因此工业化制备价值较低^[11]。酶法合成工艺流程较短,不涉及有害催化剂,反应条件温和,避免了化学法、化学酶法的缺点。因此,酶法合成 2-AG 为最佳路径。本研究以富含 ARA 的微生物油为原料,通过酶法醇解反应合成 2-MAG,并通过单因素实验探究醇解的最佳反应条件,以期制备高纯度的 2-AG,为其在食品和药品中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

高山被孢霉微生物油(ARA 含量为 37.6%),嘉必优生物工程(武汉)有限公司;Lipozyme 435、Lipozyme RM IM,诺维信(中国)投资有限公司;Lipase CL IM、Lipase DF IM、Lipase AYS,天野酶制剂有限公司;1-油酸单甘酯、2-油酸单甘酯标准品,Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司。

夹层酶反应器,上海申迪玻璃仪器有限公司;DC-1006 低温恒温槽;90-4 数显恒温磁力搅拌器;R-501 旋转蒸发器;5810 高速离心机;WHY-2 数显恒温振荡器;Waters 1525 高效液相色谱仪(HPLC),美国 Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 2-MAG 的酶法醇解合成

向 20 mL 夹层酶反应器中加入 2 g 微生物油,按一定底物(油与无水乙醇)物质的量比加入无水乙醇,再加入一定量的有机溶剂、0.08 g 脂肪酶,在一定的温度下搅拌(400 r/min)反应一段时间后,停止反应,将反应产物进行抽滤以去除脂肪酶,随后在 35℃ 下旋蒸以完全去除溶剂,得到醇解粗产物。

1.2.2 2-MAG 的纯化

醇解粗产物中含有甘油三酯(TAG)、DAG、单甘酯(MAG)、脂肪酸乙酯(FAEE)和少量游离脂肪酸(FFA),可利用以上组分在 85% 乙醇溶液和正己烷中分配系数的差异,萃取去除 TAG、FAEE 等杂质。向醇解粗产物中按料溶比 1:15 分别加入正己烷、体积分数 85% 乙醇溶液,充分混合,分层后取含有 2-MAG 的下层(乙醇溶液相),重复萃取纯化 3 次。将萃取物在 80 r/min、35℃ 条件下旋蒸 40 min 除去溶剂,得到纯化的 2-MAG。纯化回收率(Y)按式(1)计算。

$$Y = m_1 c_1 / (m_2 c_2) \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_1 为纯化的 2-MAG 质量,g; m_2 为醇解粗产物质量,g; c_1 为纯化的 2-MAG 中 2-MAG 含量,%; c_2 为醇解粗产物中 2-MAG 含量,%。

1.2.3 脂质组成分析

采用 HPLC(配示差折光检测器)对样品脂质组成进行分析。HPLC 条件:Sepax HP-Silica 色谱柱(4.6 mm × 250 mm × 5 μm),柱温 30℃,样品质量浓度 10 mg/mL;进样量 20 μL;流动相为正己烷-异丙醇-甲酸(体积比 15:1:0.03),流速 1 mL/min。比对各脂质组分的保留时间与甘油酯标准品的保留时间进行定性分析,采用峰面积归一化法定量。

1.2.4 数据处理

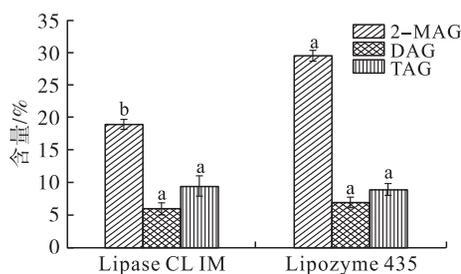
每个条件优化实验至少重复两次,结果以“平均值 ± 标准差”表示。实验所测结果利用 Origin 8.0 软件作图,采用 IBM SPSS Statistics 软件进行单因素方差(ANOVA)分析,选择 Tukey 方法检测样本数据间差异显著性($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 2-MAG 合成单因素实验

2.1.1 脂肪酶种类的影响

在底物物质的量比 1:40、叔丁醇 1 mL、反应温度 35℃、反应时间 8 h 条件下,加入不同种类的脂肪酶,按 1.2.1 方法合成 2-MAG,测定醇解粗产物的脂质组成,考察酶种类对粗产物中 2-MAG 含量的影响,结果如图 1 所示。



注:同一指标不同字母表示具有显著差异($p < 0.05$)。下同

图1 脂肪酶种类对粗产物中2-MAG含量的影响

实验过程中发现,Lipozyme RM IM、Lipase DF IM、Lipase AYS在醇解反应体系中无任何催化活性,原料油没有发生醇解反应,反应后无DAG和MAG生成,这主要是因为极性醇的反应介质中,极性溶剂会“夺取”脂肪酶催化中心的水分,使这些酶脱水而失活^[12]。不同的脂肪酶对乙醇的耐受性不同^[13],Lipozyme 435、Lipase CL IM在醇解合成2-MAG反应中表现出良好的乙醇耐受性和sn-1,3位特异性,可以催化TAG的醇解反应,生成2-MAG。由图1可知,Lipozyme 435催化产物中DAG和TAG的含量与Lipase CL IM的无显著差异($p > 0.05$),但2-MAG的含量高,说明脂肪酶Lipase CL IM可能进一步催化2-MAG醇解生成甘油和脂肪酸乙酯,故Lipozyme 435催化醇解合成2-MAG的效率优于Lipase CL IM。

在醇解反应体系中,Lipozyme 435通常具有sn-1,3位特异性。Watanabe等^[14]在针对乙醇醇解TAG的研究中发现,Lipozyme 435具有强位置选择性。Shimada等^[15]研究表明,在一定的极性范围内(溶剂极性不能过高,过高反而导致脂肪酶失活^[13]),醇解时酶活性与溶剂极性呈正相关,且对多种脂肪酸具有普适性。目前Lipozyme 435的位置选择特性已被应用于多个酶法合成1,3-二油酸甘油二酯的研究中^[16-17]。与Lipozyme 435一样,Lipase CL IM也是来源于南极假丝酵母的脂肪酶,因此在醇解体系中也认为具有sn-1,3位特异性,但在本研究中其催化的产物中2-MAG含量较低,可能是因为不同的固定化方法影响了其位置选择性^[18]。因此,Lipozyme 435为酶法醇解合成2-MAG最适脂肪酶。

2.1.2 底物物质的量比的影响

按2.1.1,保持其他条件不变,脂肪酶选用Lipozyme 435,考察底物物质的量比对粗产物中2-MAG含量的影响,结果如图2所示。

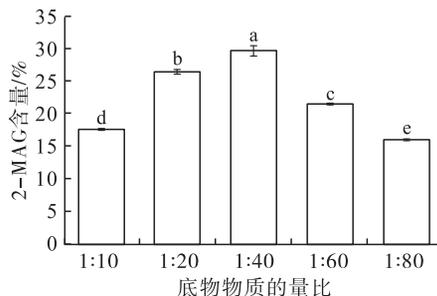


图2 底物物质的量比对粗产物中2-MAG含量的影响

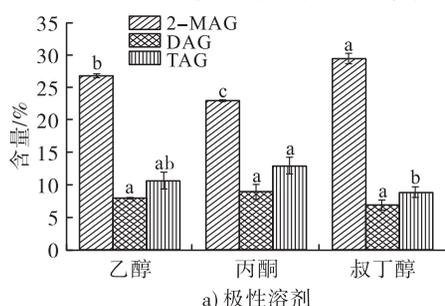
在酶法醇解反应中,底物物质的量比能够直接对反应产物组成造成影响。无水乙醇添加量不足,则反应不能进行完全,产物中TAG和DAG的含量过高;无水乙醇添加量过大,可能会影响脂肪酶的活性;因此需选择合适的底物物质的量比。由图2可知,随着底物物质的量比增加,产物中2-MAG含量呈先升后降趋势。当底物物质的量比由1:10增加到1:40时,产物中2-MAG含量达到最高,为29.53%,这是由于无水醇添加量增加,其与微生物油的反应更为充分,同时反应体系极性逐渐增强,脂肪酶的sn-1,3位特异性也随之增加,促使反应向正向进行。在底物物质的量超过1:40之后,2-MAG含量有所下降,其原因可能是过量的无水乙醇醇解sn-1,3位脂肪酸后,继续与sn-2位脂肪酸发生反应所致。综上,为保证脂肪酶较强的sn-1,3位特异性,选择底物物质的量比为1:40。

2.1.3 溶剂种类的影响

按2.1.1,保持其他条件不变,脂肪酶选用Lipozyme 435,底物物质的量比1:40,考察溶剂种类(乙醇、丙酮、正己烷、叔丁醇和二氯甲烷)对粗产物中2-MAG含量的影响,结果如图3所示。

不同溶剂具有不同极性,而溶剂极性与底物在体系中的溶解度和脂肪酶的活性有密切关系。研究发现,溶剂在一定的极性范围内,脂肪酶活性随着有机溶剂极性增强而增加^[16]。同时,脂肪酶对于脂肪酸位置的选择性也会受到溶剂极性的影响^[14]。由图3可知,在极性反应体系中,叔丁醇是最佳的反应介质,其2-MAG的含量显著高于乙醇和丙酮中的,DAG含量在3种介质中无显著性差异($p > 0.05$),叔丁醇中TAG的含量最低。在非极性反应体系中,正己烷体系中2-MAG含量高于二氯甲烷反应体系中的,而在二氯甲烷反应体系中TAG的含量显著高于正己烷体系中的。当极性反应溶剂为乙醇和叔丁醇时,产物中2-MAG的含量显著高于非极性体系下的,原因一方面或为脂肪酶的活性中心大多被一个 α -螺旋的“盖结构”所覆盖,在非极性

反应体系中,“盖结构”闭合,脂肪酶活性较低,而当脂肪酶吸附于水油界面时,“盖结构”敞开,活性中心暴露,脂肪酶活性大大提升^[19],另一方面,1(3)-MAG的热力学稳定性大于2-MAG,造成酰基转移,产生更为稳定的1-MAG,而极性溶剂中酰基转移速率低于非极性溶剂中的^[17]。Li等^[17]针对溶剂中DAG和MAG的酰基转移现象研究显示,溶剂极



性与脂肪酸酰基转移速率呈负相关,极性越大,酰基转移速率越小,2-MAG在正己烷、二氯甲烷中酰基转移速率常数(k_1)分别为0.019 5、0.013 7 h⁻¹,转移速度较快,而在正丁醇和叔丁醇中2-MAG酰基转移速率常数(k_1)分别为0.003 7 h⁻¹和0.003 3 h⁻¹,转移速度较慢。本研究在叔丁醇反应体系中2-MAG含量最高。因此,叔丁醇为反应最佳溶剂。

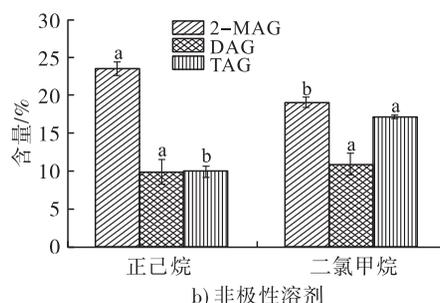


图3 溶剂种类对粗产物中2-MAG含量的影响

2.1.4 溶剂添加量的影响

按2.1.1,保持其他条件不变,脂肪酶选用Lipozyme 435,底物物质的量比1:40,溶剂为叔丁醇,考察溶剂添加量对粗产物中2-MAG含量的影响,结果如图4所示。

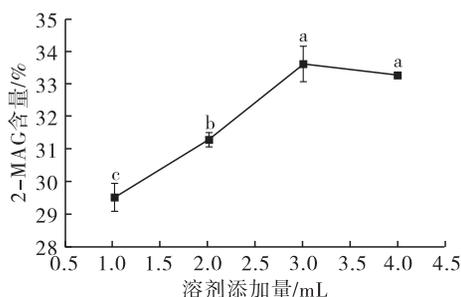


图4 溶剂添加量对粗产物中2-MAG含量的影响

溶剂添加量会影响底物的溶解,从而导致反应效率的变化。因此,需要选定合适的溶剂添加量。由图4可知,当溶剂添加量在1~3 mL之间时,2-MAG含量随溶剂添加量增加而显著增加($p < 0.05$),当溶剂添加量大于3 mL时,2-MAG含量无显著变化($p > 0.05$)。综合考虑反应速率及成本,最佳溶剂添加量为3 mL。

2.1.5 反应温度及反应时间的影响

按2.1.1,保持其他条件不变,脂肪酶选用Lipozyme 435,底物物质的量比1:40,溶剂为3 mL叔丁醇,考察反应时间和反应温度对粗产物中2-MAG含量的影响,结果如表1所示。

脂肪酶活性及稳定性受温度的影响极大^[20],同时根据动力学原理,不同温度条件下产物的酰基转移速率也会不同,因此反应温度是影响产物中2-MAG含量的重要因素。另一方面,反应到达平衡需

要一定的时间,反应时间过短,底物无法完全反应,TAG和DAG有很大部分没有转化为2-MAG,产物中2-MAG含量偏低,反应时间过长,会导致2-MAG发生酰基转移,2-MAG损失较多。

表1 反应温度和反应时间对粗产物中2-MAG含量的影响

反应时间/h	2-MAG含量/%			
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
2	6.88 ± 0.82 ^b	6.98 ± 0.65 ^b	7.93 ± 0.70 ^b	17.30 ± 1.18 ^a
4	11.97 ± 0.96 ^b	13.61 ± 0.39 ^b	14.87 ± 1.73 ^b	20.90 ± 0.85 ^a
6	15.91 ± 1.06 ^c	18.36 ± 1.22 ^{bc}	20.63 ± 1.34 ^b	24.68 ± 0.81 ^a
8	23.11 ± 2.50 ^b	30.58 ± 1.92 ^a	33.63 ± 0.36 ^a	26.45 ± 1.45 ^b

注:同行中不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)

由表1可知,在4个不同的反应温度下,产物中2-MAG的含量均随反应时间延长而增加,说明在8 h时2-MAG酰基转移速率低于其合成速率。对比不同温度下所得产物中2-MAG含量可知,在反应时间小于或等于6 h时,40 °C下产物中2-MAG含量最高,而在反应时间8 h时,35 °C下产物中2-MAG含量最高,原因可能为温度较高,初始反应速率较快,在反应温度为40 °C时2-MAG的酰基转移速率较高,即使前期反应速度较快,但是长时间最终产物中2-MAG含量较低。在35 °C下反应8 h时,粗产物中2-MAG的含量为33.63%。理论上,1 mol TAG经醇解反应后,生成1 mol 2-MAG和2 mol 脂肪酸乙酯,粗产物中2-MAG的最大含量为33.3%(物质的量分数),因此本实验所得产物中2-MAG的含量已接近理论最大值,如若再延长反应时间可能导致酰基转移使目标产物含量降低。

综上所述,酶法醇解制备2-MAG的最佳反应

条件为以 Lipozyme 435 脂肪酶为醇解用酶,脂肪酶添加量 4%,油与无水乙醇物质的量比 1:40,溶剂为叔丁醇,油溶比 2:3,反应温度 35℃,反应时间 8 h。在最佳条件下,粗产物中 2-MAG 的含量高达 33.63%。

2.2 2-MAG 的纯化

根据 1.2.2 方法将最佳条件下反应所得醇解粗产物进行纯化。结果表明,纯化产物中 2-MAG 的含量为 94.79%,其中 2-AG 的含量为 40.70%,1-MAG 的含量为 4.92%。2-MAG 的纯化回收率为 81.13%。另外,本实验发现纯化前粗产物中不存在 1-MAG,而纯化后所得产品中含有 1-MAG,推测可能由于 2-MAG 发生酰基转移,形成相对更稳定的 1-MAG。

3 结论

本实验主要研究了以富含花生四烯酸的微生物油为原料,酶法醇解制备 2-MAG。结果表明,Lipozyme 435 脂肪酶在极性溶剂中具有良好的位置选择性和乙醇耐受性,能够优先醇解 sn-1,3 位脂肪酸。在酶添加量 4%、油与无水乙醇物质的量比 1:40、叔丁醇为溶剂、油溶比 2:3、反应温度 35℃、反应时间 8 h 条件下,粗产物中 2-MAG 含量为 33.63%。经过纯化,最终产品中 2-MAG 的含量为 94.79%,其中 2-AG 的含量为 40.70%。综上所述,脂肪酶催化富含花生四烯酸的微生物油乙醇解反应可以得到高纯度的 2-MAG,其富含 2-AG,为其在食品、医药领域中的应用奠定了基础。

参考文献:

[1] 唐文佳. 酶法合成 sn-2 位富含花生四烯酸的甘油一酯和对称性甘油三酯[D]. 江苏 无锡:江南大学,2016.

[2] DINH T P, CARPENTER D, LESLIE F M, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002,99(16): 10819-10824.

[3] HILL M N, MCLAUGHLIN R J, BINGHAM B, et al. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010,107(20): 9406-9411.

[4] PATEL S, ROELKE C T, RADEMACHER D J, et al. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling[J]. Eur J Neurosci, 2005,21(4):1057-1069.

[5] HANLON E C, TASALI E, LEPROULT R, et al. Sleep restriction enhances the daily rhythm of circulating levels of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol[J]. Sleep,

2016,39(3):653-664.

[6] WU M M, ZHANG X, ASHER M J, et al. Druggable targets of the endocannabinoid system: implications for the treatment of HIV-associated neurocognitive disorder[J/OL]. Brain Res, 2019,1724:146467[2022-06-23]. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146467.

[7] 宋国胜,郭祀远,蔡妙颜,等. 新型高效食品防腐剂:甘油单月桂酸酯[J]. 食品科技,2002(1):37-39.

[8] 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.

[9] 李俊华. 月桂酸单甘酯和蔗糖酯制备的工艺优化及性能研究[D]. 郑州:河南工业大学,2011.

[10] 孔明,杨博,姚汝华. 脂肪酶催化合成单甘酯的研究进展[J]. 中国油脂,2003,38(7):11-14.

[11] 谷玉杰,马石刚,吕剑. 合成系列高纯度单脂肪酸甘油酯[J]. 日用化学工业,2006(1):12-14.

[12] WANG X, JIN Q, WANG T, et al. An improved method for the synthesis of 1-monoolein[J]. J Mol Catal B: Enzym, 2013,97(10):130-136.

[13] HERNÁNDEZ-MARTÍN E, OTERO C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM[J]. Bioresour Technol, 2008,99(2):277-286.

[14] WATANABE Y, NAGAO T, SHIMADA Y. Control of the regiospecificity of *Candida antarctica* lipase by polarity[J]. New Biotechnol, 2009,26(1/2):23-28.

[15] SHIMADA Y, OGAWA J, WATANABE Y, et al. Regiospecific analysis by ethanolysis of oil with immobilized *Candida antarctica* lipase[J]. Lipids, 2003,38(12):1281-1286.

[16] DUAN Z Q, DU W, LIU D H. The solvent influence on the positional selectivity of Novozym 435 during 1,3-diolein synthesis by esterification[J]. Bioresour Technol, 2010,101(7):2568-2571.

[17] LI W, DU W, LI Q, et al. Dependence on the properties of organic solvent: study on acyl migration kinetics of partial glycerides[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(15):5737-5742.

[18] YU H, WU J, CHING C B. Enhanced activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase immobilized on macroporous adsorptive resins for ibuprofen resolution[J]. Biotechnol Lett, 2004,26(8):629-633.

[19] 曹茜,冯凤琴. 微生物脂肪酶的研究进展及其在食品中的应用[J]. 中国食品学报,2013(10):136-143.

[20] 潘志杰,陈小娥,王卫飞,等. 脂肪酶催化鱼油醇解富集 EPA 和 DHA 的研究[J]. 农业机械,2012(2):40-43.