

# Lipozyme TLIM 催化大豆磷脂乙醇解制备溶血磷脂

许晓欣, 杨国龙, 孟鹏程, 杨瑞楠, 刘 伟

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

**摘要:**为改善大豆磷脂的功能特性,扩大其应用范围,采用 Lipozyme TLIM 催化大豆磷脂乙醇解制备溶血磷脂,通过单因素实验考察了反应时间和底物质量浓度对乙醇解反应的影响,并通过响应面实验优化其工艺条件。结果表明:在大豆磷脂乙醇解反应过程中,随着反应时间的延长,磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰乙醇胺(PE)的含量不断降低,磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)、鞘磷脂(SM)、N-酰基磷脂酰乙醇胺(APE)、心磷脂(CL)、磷脂酰甘油(PG)含量变化较小,主要生成2-溶血磷脂酰胆碱(2-LPC);Lipozyme TLIM 催化大豆磷脂乙醇解的最佳工艺条件为底物质量浓度 1.0 g/mL、反应温度 20 °C、加酶量 15% (以大豆磷脂质量计)、加水量 2% (以大豆磷脂质量计)、反应时间 24 h,在此条件下溶血磷脂含量为 67.80%,且溶血磷脂主要以 2-LPC 为主,含量为 48.45%,还含有少量的溶血磷脂酸(LPA)、溶血磷脂酰丝氨酸(LPS)、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)等,在乙醇解产物<sup>13</sup>C-NMR 图谱中,脂肪酸乙酯有强而尖锐的信号,脂肪酸的信号极弱,证明 Lipozyme TLIM 催化大豆磷脂乙醇解过程中主要发生了乙醇解反应。综上,利用脂肪酶乙醇解大豆磷脂制备溶血磷脂为大豆磷脂的改性拓宽了新思路。

**关键词:**大豆磷脂;溶血磷脂;脂肪酶;乙醇解

中图分类号:TS229;TQ645.96 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)01-0055-06

## Preparation of lysophospholipids through ethanolysis of soybean phospholipids catalyzed by Lipozyme TLIM

XU Xiaoxin, YANG Guolong, MENG Pengcheng, YANG Ruinan, LIU Wei  
(College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** In order to improve the functional properties of soybean phospholipids and expand their applications, lysophospholipids was prepared by Lipozyme TLIM catalyzed ethanolysis of soybean phospholipids, the effects of reaction time and substrate mass concentration on ethanolysis reaction were examined by single factor test, and the optimal process conditions were obtained using response surface methodology. The results showed that the contents of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) decreased with the extension of the reaction time, and the contents of phosphatidic acid (PA), phosphatidylinositol (PI), sphingomyelin (SM), N-acylphosphatidylethanolamine (APE), cardiolipin (CL) and phosphatidylglycerol (PG) changed slightly, and 2-lysophosphatidylethanolamine (2-LPC) was the primary product. The optimal conditions for Lipozyme TLIM catalyzed ethanolysis of soybean phospholipids were as follows: substrate mass concentration 1.0 g/mL, reaction temperature 20 °C, enzyme loading amount 15% (based on the mass of soybean phospholipids), water content 2% (based on the mass of soybean phospholipids), and reaction

time 24 h. Under these conditions, the content of lysophospholipids was 67.80%, and the lysophospholipids mainly consisted of 2-LPC with content of 48.45%, with small amounts of lysophosphatidic acid (LPA), lysophosphatidylserine (LPS), lysophosphatidylethanolamine (LPE) and so on. In the <sup>13</sup>C-NMR spectrum of

收稿日期:2023-11-13;修回日期:2024-08-06

基金项目:河南省科技研发计划联合基金(应用攻关类)(222103810064)

作者简介:许晓欣(1998),女,硕士研究生,研究方向为脂质高值化作用(E-mail)xuxiaoxin202103@126.com。

通信作者:杨国龙,教授(E-mail)ygl88888@haut.edu.cn。

the ethanolysis product, the signal of fatty acid ethyl ester was strong and sharp, while that of fatty acid was very weak, which proved that ethanolysis was the major reaction in the Lipozyme TLIM catalyzed soybean phospholipids enzymolysis. In conclusion, the preparation of lysophospholipids by Lipozyme TLIM catalyzed ethanolysis of soybean phospholipids can provide a new way for phospholipids modification.

**Key words:** soybean phospholipids; lysophospholipids; lipase; ethanolysis

磷脂是由脂肪酸、甘油和磷酸等组成的,其甘油骨架上 sn - 1 位和 sn - 2 位上的羟基与脂肪酸结合,sn - 3 位上的羟基与亲水性的磷酸及其他基团结合,这种结构使其具有两亲性质<sup>[1-3]</sup>,从而表现出优良的表面活性剂性能,如很好的乳化性、分散性、湿润性、渗透性等,并广泛应用于食品、药品、保健品、饲料、工业助剂等行业<sup>[4]</sup>。大豆磷脂是由大豆油脱胶后的水化油脚加工后得到的产品,大豆磷脂产品组成的非均匀性和各磷脂成分具有不同功能特性,导致其亲水亲油平衡(HLB)值较低,限制了大豆磷脂的应用范围<sup>[5-6]</sup>。将大豆磷脂转化为溶血磷脂,可提高其润湿能力、乳化稳定性、HLB 值等,扩大其应用范围<sup>[7]</sup>。

大豆磷脂转化为溶血磷脂的方法有水解法和乙醇解法。水解法是利用磷脂酶 A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>、脂肪酶水解磷脂分子中的酰基,得到溶血磷脂<sup>[8]</sup>。王大海等<sup>[9]</sup>利用磷脂酶 A<sub>1</sub>水解大豆浓缩磷脂,得到的产物酸值(KOH)高达 129.6 mg/g。孙清瑞等<sup>[10]</sup>利用 Novozym 435 脂肪酶在正己烷体系下水解大豆磷脂,在底物浓度 25%、加水量 20%、反应温度 51℃、加酶量 6.6% 条件下,大豆磷脂的相对水解率为 81.4%。汪勇等<sup>[11]</sup>利用磷脂酶 A<sub>2</sub>在水相体系下水解大豆浓缩磷脂得到 HLB 值大于 8、乳化性能更好的溶血磷脂。乙醇解法主要是利用脂肪酶催化乙醇与磷脂发生反应,生成溶血磷脂和脂肪酸乙酯,该方法更有利于产物的提纯。前期研究表明,脂肪酶催化大豆卵磷脂乙醇解的转化率可达 95% 以上<sup>[12]</sup>。脂肪酶 Lipozyme TLIM 价格低廉,常用于催化油脂改性,但关于其催化大豆磷脂乙醇解制备溶血磷脂的报道较少。本研究以大豆磷脂为原料,以脂肪酶 Lipozyme TLIM 催化大豆磷脂乙醇解制备溶血磷脂,并对反应条件进行优化,以期脂肪酶催化磷脂乙醇解制备溶血磷脂产品提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大豆磷脂,沈阳天峰生物制药有限公司;Lipozyme TLIM,诺维信(中国)有限公司;乙二胺四乙酸二钠(分析纯),天津市风船化学试剂科技有限

公司;甲醇、乙醇、正己烷、石油醚、三氟化硼、乙醚(分析纯),天津科密欧试剂有限公司;氢氧化铯、磷酸三苯酯(TPP)、氘代氯仿(CDCl<sub>3</sub>, 色谱纯),上海麦克林生化科技股份有限公司。

90 - 1 型磁力搅拌器;AVANCE III HD 500 MHz 核磁共振分析仪,德国 Bruker 公司;TGL - 16M 高速冷冻离心机;Agilent 6890N 气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 大豆磷脂指标测定

##### 1.2.1.1 基本理化指标

水分及挥发物含量参照 GB 5009.3—2016 测定;丙酮不溶物含量参照 AOCS Ja4 - 46 测定;乙醚不溶物含量参照 SN/T 0802.1—1999 测定;酸值参照 AOCS Ja6 - 55 测定;过氧化值参照 AOCS Ja8 - 87 测定。

##### 1.2.1.2 脂肪酸组成

参考 GB 5009.168—2016 对大豆磷脂进行甲酯化处理,采用气相色谱法测定其脂肪酸组成。

色谱条件:BPX - 70 毛细管柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm);升温程序为初始温度 170℃,以 2℃/min 升温至 210℃;进样口温度 210℃;进样量 1 μL;分流进样,分流比 20:1;检测器温度 300℃;氮气流速 1.0 mL/min;氢气流速 40 mL/min;空气流速 400 mL/min。

##### 1.2.1.3 磷脂组成

采用<sup>31</sup>P - 核磁共振法(<sup>31</sup>P - NMR)分析磷脂组成<sup>[13-14]</sup>。准确称量大豆磷脂或乙醇解大豆磷脂,依次加入 0.5 mL 甲醇、0.5 mL 0.2 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA) - 氢氧化铯溶液(pH 8.5)和 0.5 mL 含有 TPP 的 CDCl<sub>3</sub> 溶液,涡旋振荡后离心,吸取 500 μL 下层溶液至核磁管中进行<sup>31</sup>P - NMR 分析,按面积归一化法计算各组分含量<sup>[15-16]</sup>。

#### 1.2.2 大豆磷脂的乙醇解反应

准确称量大豆磷脂于圆底烧瓶中,加入一定量的无水乙醇(均用分子筛脱水)充分溶解,配制成一定质量浓度的大豆磷脂乙醇溶液,再加入一定量的水和脂肪酶后置于油浴中,在一定温度下进行乙醇解反应。反应过程中定时取样,样品经氮吹脱溶、离

心脱酶处理后按 1.2.1.3 方法分析其磷脂组成。

### 1.2.3 乙醇解产物的 NMR 分析

准确称取 80 ~ 100 mg 乙醇解产物溶解在  $\text{CDCl}_3$  中, 涡旋 2 min 后静置 3 min, 随后转移至 5 mm 核磁管中进行  $^{13}\text{C}$ -NMR 分析。

### 1.2.4 数据处理

采用 Origin 9、MestReNova 14 和 Design Expert 8.0.6 进行数据分析处理, 结果以“平均值  $\pm$  标准偏差”表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大豆磷脂的理化性质

大豆磷脂的基本理化指标及脂肪酸组成见表 1。

表 1 大豆磷脂的基本理化指标及脂肪酸组成

Table 1 Basic physicochemical indicators and fatty acid composition of soybean phospholipids

项目	指标
水分及挥发物/%	0.94 $\pm$ 0.04
酸值(KOH)/(mg/g)	8.23 $\pm$ 0.06
过氧化值/(g/100 g)	0.05 $\pm$ 0.01
丙酮不溶物/%	96.31 $\pm$ 0.62
乙醚不溶物/%	0.11 $\pm$ 0.02
脂肪酸/%	
棕榈酸	16.56 $\pm$ 0.10
硬脂酸	3.62 $\pm$ 0.07
油酸	8.76 $\pm$ 0.04
亚油酸	64.03 $\pm$ 0.12
亚麻酸	7.04 $\pm$ 0.04

由表 1 可知, 原料大豆磷脂的丙酮不溶物含量为 96.31%, 乙醚不溶物含量为 0.11%, 酸值(KOH)为 8.23 mg/g, 过氧化值为 0.05 g/100 g。大豆磷脂脂肪酸组成为亚油酸、棕榈酸、油酸、亚麻酸、硬脂酸, 其主要以不饱和脂肪酸为主, 这与此前报道的结果<sup>[17]</sup>一致。

大豆磷脂的磷脂组成及含量见表 2。

表 2 大豆磷脂的磷脂组成及含量

Table 2 Phospholipids composition and content of soybean phospholipids

组分	含量/%
磷脂酰胆碱(PC)	68.76 $\pm$ 0.29
2-溶血磷脂酰胆碱(2-LPC)	1.33 $\pm$ 0.06
磷脂酰肌醇(PI)	9.21 $\pm$ 0.24
磷脂酰丝氨酸(PS)	11.00 $\pm$ 0.13
鞘磷脂(SM)	0.79 $\pm$ 0.11
磷脂酰乙醇胺(PE)	5.79 $\pm$ 0.16
N-酰基磷脂酰乙醇胺(APE)	0.69 $\pm$ 0.02
心磷脂(CL)	0.95 $\pm$ 0.02
磷脂酰甘油(PG)	0.54 $\pm$ 0.03
磷脂酸(PA)	0.95 $\pm$ 0.05

由表 2 可知, 大豆磷脂主要组分为 PC、PS、PI 和 PE, 含量分别为 68.76%、11.00%、9.21% 和 5.79%, 还含有少量的 2-LPC(1.33%) 及其他磷脂(含量均低于 1%), 与此前报道的磷脂主要组成结果<sup>[18]</sup>相似。

### 2.2 大豆磷脂乙醇解反应的单因素实验

#### 2.2.1 反应时间对乙醇解反应的影响

在底物质量浓度 1.0 g/mL、反应温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、加水量 5% (以大豆磷脂质量计)、加酶量 15% (以大豆磷脂质量计) 条件下, 反应时间对 Lipozyme TLIM 催化乙醇解大豆磷脂的影响如图 1 所示。

由图 1a 可知: 随着反应的进行, PC 的含量快速下降。在反应时间 0 ~ 4 h 内 PC 含量下降很快, 随后含量下降速率减慢, 反应 24 h 时 PC 含量下降至 39.52%; PS 和 PE 的含量缓慢降低, 反应 24 h 时 PS、PE 的含量分别降低至 6.73% 和 0.93%; PI、PA、SM、APE、CL、PG 含量变化程度较小。这说明大豆磷脂中的不同磷脂组分在乙醇解过程中表现出反应差异性。

由图 1b 可知, 反应过程中有较多的 LPC、溶血磷脂酸(LPA)、溶血磷脂酰丝氨酸(LPS)、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE) 等溶血磷脂(LPL) 生成。随着反应的进行, 它们的含量逐渐增加, 其中 LPC 的含量最高, 在反应 24 h 后其含量从 1.33% 增长至 30.18%。乙醇解反应生成的 LPC 主要以 2-LPC 为主, 也有极少量的 1-LPC 产生(图 1c)。这是由于脂肪酶 Lipozyme TLIM 作用于磷脂甘油骨架上的酰基, 形成 2-LPC。在反应前期脂肪酶与磷脂上酶的结合位点接触, 传质过程顺利进行。在反应 16 ~ 24 h 后, 由于磷脂上酶的结合位点已经饱和, 乙醇解反应程度有限, LPC 的生成速率减缓。在反应 12 h 时有 1-LPC 生成, 这可能是酰基在甘油骨架的 sn-2 位上热力学性质不稳定, sn-2 位上的酰基转移到 sn-1 位上<sup>[19]</sup>。与 PC(PC 含量 > 97%) 的乙醇解反应<sup>[12]</sup> 相比, 大豆磷脂乙醇解的反应程度较低, 这可能是大豆磷脂的组分复杂, 一些不能被醇解的组分(PA、SM、APE、CL、PG) 会抑制醇解反应的发生。反应过程中 LPL 还会继续发生醇解反应失去酰基, 生成无酰基磷脂(GPL)(图 1d), GPL 含量的增多说明醇解反应的副反应逐渐加强<sup>[20]</sup>。

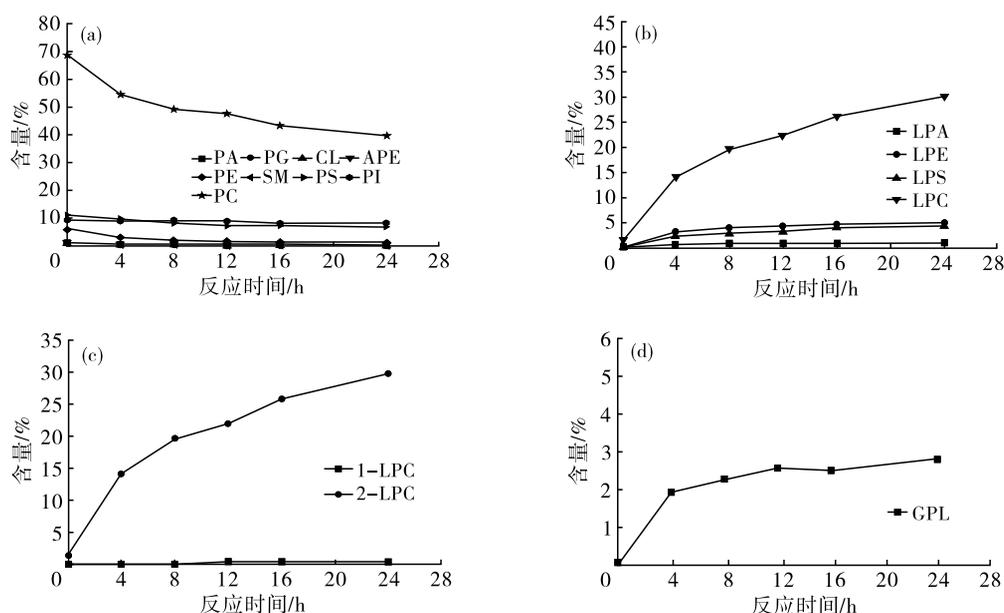


图1 大豆磷脂乙醇解过程中各组分含量随时间的变化

Fig. 1 Changes in the content of components with time during the ethanolysis of soybean phospholipids

### 2.2.2 底物质量浓度对乙醇解反应的影响

在反应温度 30 ℃、加水量 5%、加酶量 15% 条件下,底物质量浓度对溶血磷脂含量的影响如图 2 所示。

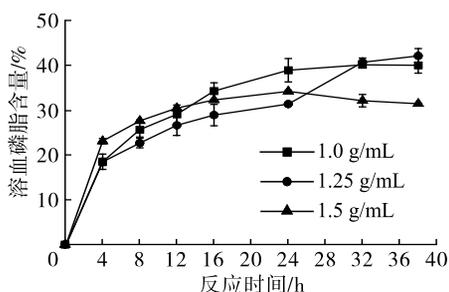


图2 底物质量浓度对溶血磷脂含量的影响

Fig. 2 Effect of substrate mass concentration on the content of lysophospholipids

由图 2 可知,当底物质量浓度为 1.0 ~ 1.5 g/mL 时,溶血磷脂在反应 4 h 内生成速率较快,之后随着反应时间的延长溶血磷脂含量持续增长。当底物质量浓度为 1.5 g/mL 时,在反应时间 0 ~ 4 h 内,溶血磷脂含量从 1.33% 增加至 24.74%,反应 38 h 后,溶血磷脂含量达到 33.06%。当底物质量浓度为 1.25、1.0 g/mL 时,反应 38 h 后溶血磷脂含量分别达到 43.73%、41.65%。底物质量浓度为 1.5 g/mL 时,反应前期溶血磷脂增长速率较快,高于底物质量浓度 1.0 g/mL 和 1.25 g/mL 的。在反应后期底物质量浓度为 1.5 g/mL 的醇解反应生成溶血磷脂的速率低于底物质量浓度为 1.0 g/mL 与 1.25 g/mL 的。这可能是因为较高的底物质量浓度会影响传质

过程。底物质量浓度为 1.0 g/mL 与 1.25 g/mL 时,反应 38 h 后溶血磷脂含量相差不大。综合考虑,选择 1.0 g/mL 作为最佳底物质量浓度。

### 2.3 大豆磷脂乙醇解反应的响应面优化实验

#### 2.3.1 响应面设计与结果

参照工厂工艺生产中工艺条件设置范围并结合本文单因素实验结果,在底物质量浓度 1.0 g/mL 的条件下,以反应温度 ( $X_1$ )、加酶量 ( $X_2$ )、加水量 ( $X_3$ )、反应时间 ( $X_4$ ) 为因素,以溶血磷脂含量 ( $Y$ ) 为响应值,采用响应面法中四因素五水平中心组合法对反应条件进行优化。响应面实验因素与水平见表 3,响应面实验设计与结果见表 4。

表3 响应面实验因素与水平

Table 3 Response surface experiment factors and levels

水平	反应温度/℃	加酶量/%	加水量/%	反应时间/h
-2	20	3	2	2
-1	30	6	4	4
0	40	9	6	8
1	50	12	8	16
2	60	15	10	24

表4 响应面实验设计与结果

Table 4 Response surface experiment design and results

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y$ /%
1	0	0	-2	0	10.18
2	0	0	0	0	8.57
3	-1	1	1	1	25.20

续表 4

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y/\%$
4	1	1	-1	-1	3.91
5	0	0	0	0	6.08
6	-1	1	-1	-1	16.21
7	0	0	0	0	6.95
8	-2	0	0	0	16.96
9	2	0	0	0	1.42
10	0	0	0	2	15.20
11	1	-1	1	-1	2.94
12	1	1	-1	1	4.09
13	0	0	0	-2	6.49
14	0	0	0	0	8.54
15	-1	1	1	-1	16.12
16	1	-1	1	1	3.29
17	1	1	1	-1	4.22
18	0	-2	0	0	5.55
19	-1	1	-1	1	29.32
20	0	0	0	0	6.45
21	0	2	0	0	16.83
22	1	-1	-1	1	3.97
23	-1	-1	-1	-1	9.41
24	-1	-1	1	1	11.35
25	-1	-1	1	-1	8.51
26	1	-1	-1	-1	2.99
27	0	0	2	0	12.43
28	1	1	1	1	3.94
29	-1	-1	-1	1	17.66
30	0	0	0	0	8.01

### 2.3.2 模型的建立与方差分析

采用 Design Expert 8.0.6 对结果进行分析,得到溶血磷脂含量的二次拟合回归方程: $Y = 8.12 - 5.89X_1 + 2.79X_2 - 0.40X_3 + 2.11X_4 - 2.31X_1X_2 + 0.68X_1X_3 - 2.21X_1X_4 + 0.24X_2X_3 + 0.57X_2X_4 - 0.78X_3X_4 + 0.32X_1^2 + 0.82X_2^2 + 0.85X_3^2 + 0.32X_4^2$ 。模型的方差分析结果见表 5。

由表 5 可知,回归模型极显著( $p < 0.0001$ ),失拟项( $p = 0.0785$ )不显著,模型的决定系数( $R^2$ )为 0.9627,校正决定系数( $R_{adj}^2$ )为 0.9280,说明模型在整个回归区域拟合良好。一次项  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_4$ ,以及交互项  $X_1X_2$ 、 $X_1X_4$  的影响极显著,二次项  $X_2^2$ 、 $X_3^2$  的影响显著。综上所述,该模型对溶血磷脂含量进行分析和预测是可靠的。

表 5 模型的方差分析

Table 5 Analysis of variance for the model

来源	平方和	自由度	均方	$F$	$p$	显著性
模型	1 293.32	14	92.38	27.68	<0.0001	**
$X_1$	818.65	1	818.65	245.28	<0.0001	**
$X_2$	183.56	1	183.56	55.00	<0.0001	**
$X_3$	3.74	1	3.74	1.12	0.3066	
$X_4$	84.08	1	84.08	25.19	0.0002	**
$X_1X_2$	85.33	1	85.33	25.57	0.0001	**
$X_1X_3$	7.36	1	7.36	2.20	0.1583	
$X_1X_4$	81.38	1	81.38	24.38	0.0002	**
$X_2X_3$	0.95	1	0.95	0.28	0.6023	
$X_2X_4$	5.35	1	5.35	1.60	0.2248	
$X_3X_4$	9.97	1	9.97	2.99	0.1044	
$X_1^2$	2.80	1	2.80	0.84	0.3740	
$X_2^2$	18.46	1	18.46	5.53	0.0328	*
$X_3^2$	19.78	1	19.78	5.93	0.0279	*
$X_4^2$	2.19	1	2.19	0.66	0.4307	
残差	50.06	15	3.34			
失拟项	44.18	10	4.42	3.76	0.0785	
绝对误差	5.88	5	1.18			
总离差	1 343.39	29				

注: \*\* 表示影响极显著( $p < 0.01$ ); \* 表示影响显著( $p < 0.05$ )

Note: \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$

### 2.3.3 最佳条件确定及验证

以溶血磷脂含量为优化条件的目标,通过响应面分析得到脂肪酶 Lipozyme TLIM 催化大豆磷脂乙醇解最佳工艺条件为反应温度 20.09℃、加酶量 15%、加水量 2%、反应时间 23.99 h,在此条件下溶血磷脂含量理论值为 68.30%。结合实际操作将工艺条件调整为反应温度 20℃、加酶量 15%、加水量 2%、反应时间 24 h,在此条件下进行验证实验,得到溶血磷脂含量为 67.80%,理论值与实际结果相差不大。在最佳条件下,乙醇解产物中溶血磷脂主要为 2-LPC(含量为 48.45%)、LPS、LPE 和 LPA,还有少量的 PC、PS、PE、PA、PI、SM、APE、CL、PG。

### 2.4 乙醇解反应产物的 NMR 分析

优化条件下乙醇解产物的<sup>13</sup>C-NMR谱图如图 3 所示。

脂肪酶催化乙醇解反应伴随着脂肪酸乙酯的产生,水解反应伴随着脂肪酸产生。不同的游离脂肪酸及其酯类有不同的化学位移,脂肪酸甘油酯的甘油骨架碳原子的化学位移在 61~76<sup>[21]</sup>。脂肪酸乙酯中乙氧基(RCO-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)的化学位移为 60~61<sup>[22]</sup>。游离脂肪酸羧基中的羰基碳(R-COOH)的化学位移在 178~181,脂肪酸烷基酯中羰基碳(R-COOR')的化学位移在 172~175,脂肪酸甘油酯羰基

碳(—COOR)的化学位移在 172 ~ 173.5<sup>[23-24]</sup>。由图 3 可以看出,化学位移在 60.68 和 60.23 处为脂肪酸酯的特征化学位移,而未出现游离脂肪酸的特征化学位移。因此,可以判断脂肪酶醇解大豆磷脂的反应以乙醇解反应为主。

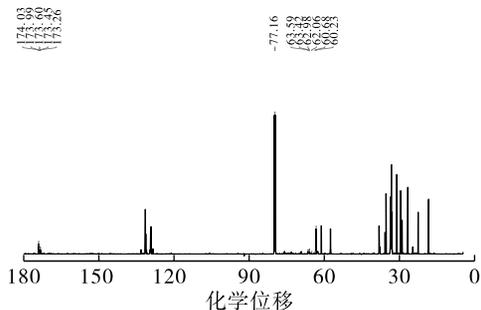


图 3 乙醇解产物<sup>13</sup>C-NMR 谱图

Fig. 3 <sup>13</sup>C-NMR spectrum of ethanolysis product

### 3 结论

本研究采用 Lipozyme TLIM 催化大豆磷脂乙醇解制备溶血磷脂,利用 <sup>31</sup>P-NMR 分析醇解过程中各磷脂成分含量变化,并通过响应面实验对反应条件进行优化。结果表明:在大豆磷脂乙醇解反应过程中,随着反应时间的延长,PC、PS 和 PE 的含量不断降低,而 PA、PI、SM、APE、CL 和 PG 的含量变化较小,LPC 含量不断增加。大豆磷脂乙醇解最佳工艺条件为底物质量浓度 1.0 g/mL、加酶量 15%、加水量 2%、反应温度 20℃、反应时间 24 h,该条件下溶血磷脂含量为 67.80%。<sup>13</sup>C-NMR 分析结果显示乙醇解产物中无游离脂肪酸,这表明醇解反应过程中没有发生水解反应或水解反应程度很低。

#### 参考文献:

[1] 安红,宋伟明,张宏波. 磷脂化学及应用技术[M]. 北京:中国计量出版社,2006.

[2] 冉世前,朱云芬,徐淑玲,等. 磷脂结构、膳食来源及营养学研究进展[J]. 中国油脂,2022,47(1):68-74,88.

[3] D'ARRIGO P, SERVI S. Synthesis of lysophospholipids[J]. Molecules, 2010, 15(3):1354-1377.

[4] 齐文娟,岳红卫,王伟. 大豆磷脂的理化特性及其开发与应用[J]. 中国油脂,2005,30(8):35-37.

[5] 李红,孙东弦,刘延奇. 大豆磷脂改性研究进展[J]. 中国油脂,2012,37(9):70-75.

[6] 孙旭璐,陈慧,郑伟. 改性大豆磷脂的 HLB 值检测方法优化研究[J]. 粮食与油脂,2015,28(4):47-48.

[7] 范勋涛. 磷脂酶 A<sub>1</sub> 水解大豆磷脂及其产物溶血磷脂的应用研究[D]. 黑龙江大庆:黑龙江八一农垦大学,2009.

[8] 王利,焦发道. 大豆磷脂的改性方法及其应用[J]. 黑龙

江八一农垦大学学报,2002,14(3):80-84.

[9] 王大海,于才渊,杨天奎. 磷脂酶 A<sub>1</sub> 催化水解大豆浓缩磷脂的研究[J]. 食品工业科技,2008,29(2):233-235.

[10] 孙清瑞,谷克仁,仁卫东. 脂肪酶催化大豆磷脂制备溶血磷脂的研究[J]. 中国油脂,2005,30(8):31-34.

[11] 汪勇,王兴国,欧仕益,等. 磷脂酶 A<sub>2</sub> 水解大豆浓缩磷脂的研究(II) 贫水相的水解及产品性能的测定[J]. 中国粮油学报,2003,18(5):49-52.

[12] YANG G, YANG R, HU J. Lysophosphatidyl choline synthesis by lipase-catalyzed ethanolysis[J]. J Oleo Sci, 2015, 64(4):443-447.

[13] 俞乐,丛芳,王兴国,等. 不同来源大豆毛油磷脂组成的核磁检测及磷脂酸含量比较[J]. 中国油脂,2017,42(1):130-133.

[14] YAO L, JUNG S. <sup>31</sup>P NMR phospholipid profiling of soybean emulsion recovered from aqueous extraction[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(8):4866-4872.

[15] MALZ F, JANCKE H. Validation of quantitative NMR[J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 38(5):813-823.

[16] CABEZAS D M, MADOERY R, DIEHL B W K, et al. Application of enzymatic hydrolysis on sunflower lecithin using a pancreatic PLA<sub>2</sub>[J]. J Am Oil Chem Soc, 2011, 88(3):443-446.

[17] 金华丽,谷克仁. 脂肪酶催化大豆磷脂改性的研究[J]. 中国粮油学报,2009,24(7):33-36.

[18] MACKENZIE A, VYSSOTSKI M, NEKRASOV E. Quantitative analysis of dairy phospholipids by <sup>31</sup>P NMR[J]. J Am Oil Chem Soc, 2009, 86(8):757-763.

[19] 杨洁. 人乳脂肪球的磷脂组成、结构及低温储存性能研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2018.

[20] VIRTO C, ADLERCREUTZ P. Lysophosphatidylcholine synthesis with *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435)[J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 26(8):630-635.

[21] SCANO P, ANEDDA R, MELIS M P, et al. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR characterization of the molecular components of the lipid fraction of pecorino sardo cheese[J]. J Am Oil Chem Soc, 2011, 88(9):1305-1316.

[22] 周子南,孝延文,高新风,等. 聚甲基丙烯酸酯链结构核磁共振(NMR)研究[J]. 高分子学报,1992,32(3):321-327.

[23] SCANO P, ROSA A, LOCCI E, et al. NMR study of the lipid profile of mullet raw roe and bottarga[J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2009, 111(5):505-512.

[24] SARPAL A S, TEIXEIRA C M, SILVA P R, et al. Determination of lipid content of oleaginous microalgal biomass by NMR spectroscopic and GC-MS techniques[J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(13):3799-3816.