

# 酶法合成 $\alpha$ -亚麻酸型多烯磷脂酰胆碱的研究

杜俊民<sup>1</sup>, 吴东<sup>1</sup>, 冯翠萍<sup>2</sup>, 侯相林

(1. 中国科学院 山西煤炭化学研究所, 山西 太原 030001;

2. 山西农业大学, 山西 太谷, 030801)

**摘要:** 为合成含有  $\alpha$ -亚麻酸( $\alpha$ -LNA)的多烯磷脂酰胆碱, 我们用高纯度蛋黄磷脂和含亚麻酸油脂在定向脂肪酶的催化下进行了酯交换反应研究, 考察了亚麻酸分子形式、反应体系、含水量、底物浓度比及原料亚麻酸纯度对结合率的影响, 结果表明, 以正己烷作反应介质, 加入较高纯度的亚麻酸乙酯(含量 72.7%), 底物浓度比 1: 3 (g/g), 加水量 1.0%, 脂肪酶 20%, 在 45 °C 恒温水浴下, 搅拌反应 12 h. 卵磷脂的亚麻酸结合率可达 20% 以上.

**关键词:** 多烯磷脂酰胆碱; 酯交换; 酶催化

**中图分类号:** O643.32 **文献标识码:** A

磷脂酰胆碱又称卵磷脂(简称 PC)是由脂肪酸、磷酸、甘油和胆碱等构成, 是维持人体正常功能的基础物质, 其在临床上用于动脉粥样硬化、脂肪肝、神经衰弱及营养不良的治疗, Barmeholz<sup>[1]</sup>研究表明, 卵磷脂在延缓衰老, 治疗心血管系统病具有积极的意义. 而含有  $\omega$ -3 系多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3PUFA 型)的卵磷脂, 由于其在细胞内可分解成多烯脂肪酸和卵磷脂, 可显示出双重增效的作用结果, 近年来受到人们的关注<sup>[2]</sup>. 因此合成含有  $\omega$ -3PUFA 的多烯卵磷脂具有广阔的应用前景.

酶法合成  $\omega$ -3PUFA 型卵磷脂已有报道, 但这些研究主要多以合成 EPA/DHA 型多烯卵磷脂为主<sup>[2-6]</sup>, 较少有以  $\alpha$ -亚麻酸( $\alpha$ -LNA)为主合成多烯卵磷脂.  $\alpha$ -亚麻酸是二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)的母体物质, 在  $\omega$ -3PUFA 中占有重要地位. 由于相对稳定, 来源容易, 不含胆固醇和过量服用会引起中毒的 VA 和 VD, 因此选用含  $\alpha$ -亚麻酸的植物油脂比鱼油更适合合成多烯卵磷脂. 本文介绍了脂肪酶作用下, 使用含  $\alpha$ -亚麻酸的植物油脂与蛋黄卵磷脂通过酯交换反应合成  $\alpha$ -亚麻酸( $\alpha$ -LNA)型多烯磷脂酰胆碱的初步研究结果.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器和试剂

恒温水浴锅; 搅拌器; 真空干燥箱; 岛津 GC-

14B 气相色谱仪.

蛋黄卵磷脂自制(磷脂酰胆碱含量大于 90%); 亚麻油由超临界萃取装置萃取得到; 亚麻乙酯油自制; 氧化铝为天津化工厂产品; 甲醇, 正己烷, 丙酮, 醋酸, 无水碳酸钠皆为分析纯, 由北京化学所生产; 1.3 位定向脂肪酶为诺维信公司产品, 活力为 250IU/g.

### 1.2 实验方法

**1.2.1 酯交换反应** 在 250 mL 三颈烧瓶中, 加入蛋黄卵磷脂和适当比例的含亚麻酸的植物油脂, 脂肪酶适量, 45 °C 恒温水浴, 在一定的反应体系中搅拌反应.

**1.2.2 卵磷脂的提取** 将酯交换反应后的反应液过滤将脂肪酶回收后, 适当处理后得含卵磷脂的油脂混合物; 取其适量加入到 2 mL 离心管中, 加入活性氧化铝充分搅拌吸附卵磷脂, 静置 10 min; 再加入丙酮洗涤去游离脂肪酸和油脂, 气相色谱检测洗涤干净后, 尽量倾出丙酮, 然后再加入 0.5 mL 甲醇将卵磷脂从吸附载体上解吸溶解到甲醇液中.

**1.2.3 脂肪酸甲酯化** 取一定量的含有待测物(固体约 30 mg, 液体约 0.25 mL)加入 2 mL 离心管中, 加入 0.25 mL 2% 甲醇钠溶液甲酯化 5 min, 然后加入 10% 的乙酸 0.25 mL 和乙醚 0.5 mL, 摇匀, 静置, 取乙醚层为待检测的脂肪酸甲酯.

**1.2.4 气相色谱条件** 岛津 GC-14B 气相色谱仪

色谱柱为含有 25% DEGS 的 1.2 m  $\times$  4 mm 玻璃填充柱(岛津公司), 白色 102 担体, 色谱条件为: 柱温 190  $^{\circ}\text{C}$ , 汽化 250  $^{\circ}\text{C}$ , 检测 250  $^{\circ}\text{C}$ , 空气流量 500 mL/min, 氢气 50 mL/min, 氮气 30 mL/min, 进样 1  $\mu\text{L}$ .

1.2.5 高纯亚麻酸乙酯的制备 取 200 mL 亚麻酸乙酯油脂, 按 1: 3: 8 比例, 分别加入尿素、甲醇, 加热混匀后冷却到 10  $^{\circ}\text{C}$  左右, 过滤, 加水分层洗掉尿素, 旋转蒸发回收甲醇, 得到高亚麻酸含量的乙酯油脂.

1.2.6 亚麻酸卵磷脂的定向结合率 定向结合率定义为亚麻酸在卵磷脂总脂肪酸中的含量, 也即卵

磷脂中亚麻酸色谱峰面积占总脂肪酸的色谱峰面积的百分比(%). 本实验暂时不考虑温度时间等因素, 仅对亚麻酸酯分子形式, 反应介质, 水含量, 底物配比, 原料中亚麻酸含量给以考察, 研究酶法定向酯交换反应的影响因素.

## 2 结果与讨论

### 2.1 原料中脂肪酸分析

取一定量的蛋黄卵磷脂、亚麻油及其乙酯, 按 1.2.3 中方法分析, 得到的脂肪酸构成和含量如表 1 所示.

由表 1 可知, 蛋黄卵磷脂中不含亚麻酸, 而亚

表 1 蛋黄卵磷脂、亚麻油、亚麻酸乙酯及高纯亚麻酸乙酯脂肪酸构成

Table 1 The constitutes of fatty acids of yolk PC, linseed oil, ethyl linolenate and high purity ethyl linolenate(%)

Reaction material	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3	C20: 4
Yolk PC	30.3	0.0	16.4	34.1	14.7	0.0	4.5
Linseed oil	8.7	0.2	2.6	24.1	12.8	51.5	0.0
Ethyl linolenate	8.0	0.1	3.5	23.5	13.6	51.3	0.0
High purity ethyl linolenate	0.0	0.0	0.0	8.9	17.3	72.7	0.0

The purity of ethyl linolenate: 95.3%; The purity of high purity ethyl linolenate: 97.0%.

Abbreviations: C16: 0, palmitic acid; C16: 1, palmitoleic acid; C18: 0, stearic acid; C18: 1, oleic acid; C18: 2, linoleic acid; C18: 3, linolenic acid; C20: 4, arachidonic acid.

These abbreviations are also suitable for other tables below.

麻油、亚麻酸乙酯及高纯亚麻酸乙酯含有大量的亚麻酸, 分别为 51.5%, 51.3% 和 72.7%. 蛋黄卵磷脂中饱和脂肪酸的含量很高, 达 46.7%. 而亚麻油及其乙酯饱和酸含量很低, 分别为 11.5%, 11.

6%, 高纯亚麻酸乙酯中不含饱和酸.

### 2.2 亚麻酸酯分子形式对卵磷脂结合率的影响

表 2 中用亚麻酸乙酯合成的卵磷脂的亚麻酸含量比用亚麻油(甘油三酯)高(5.0% > 2.5%), 这

表 2 亚麻酸分子形式对亚麻酸结合率的影响

Table 2 Effect of the molecular form of linolenic acid on incorporation of linolenic acid(%)

Molecular form	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3	C20: 4
Linseed oil	32.1	0.0	15.2	31.9	14.4	2.5	3.9
Ethyl linolenate	23.0	0.1	10.1	42.4	18.2	5.0	1.5

Reaction conditions: solvent-free system, yolk PC, 5 g; lipase, 1 g; linseed oil and ethyl linolenate, 15 g; respectively; water addition 0.21 g; reaction temperature, 55 $^{\circ}\text{C}$ ; reaction time, 2 h

表明亚麻酸乙酯形式比以甘油三酯分子形式的亚麻油更容易与蛋黄卵磷脂上脂肪酸发生酯交换反应. 在本体系中, 卵磷脂可被一定量的亚麻酸乙酯完全溶解, 但同样量的亚麻油则较难溶解卵磷脂, 而且反应体系较粘稠. 一般来讲, 脂肪酸乙酯的熔点最低, 而同酸甘三酯的熔点很高, 为使反应物在反应温度下能充分地混匀, 应选用熔点尽可能低的酰基供体. 从分子大小来讲, 甘油三酯形式的油脂分子

要比乙酯分子大, 酶活性中心的浓度要比乙酯低. 因此选用乙酯作为酰基供体.

### 2.3 体系中水含量对亚麻酸结合率的影响

在无溶剂体系中, 选取 0%, 0.5%, 1.0%, 2.0%, 5.0%, 10% 六个因素水平的水含量(以底物和酶的总量计), 考察水含量对合成亚麻酸型卵磷脂的影响, 结果见表 3.

Ingemar Svensson 等<sup>[5]</sup>研究了控制水分活度对

合成卵磷脂的影响,表明在酯交换反应中,酶分子 需要保持一定的水分,以释放其活性部位.表3表

表3 体系中水含量对亚麻酸结合率的影响

Table 3 Effect of the content of water on incorporation of linolenic acid(%)

Content of water (%)	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3	C20: 4
0.0	32.5	0.0	15.2	35.9	11.4	2.1	2.9
0.5	31.1	0.0	14.2	32.9	16.1	3.2	2.5
1.0	23.0	0.1	10.1	42.3	18.1	5.0	1.5
2.0	21.4	0.2	8.1	44.6	21.3	3.9	0.5
5.0	17.4	0.2	9.5	48.7	19.2	4.6	0.4
10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Reaction conditions: solvent-free system, yolk PC 5 g; lipase, 1 g; ethyl linolenate, 15 g;  
reaction temperature: 55 °C; reaction time: 2 h

明,随着体系含水量的增加,活化后的酶分子对亚麻酸的结合率逐步增加,在1%时达到最高.随后结合率下降,这可能是过多的水分导致酶维持不住其应有的三维结构,还有一个主要原因是反应平衡开始向水解方向进行.在体系中水含量达到10%时,卵磷脂上已经检测不到脂肪酸,证明卵磷脂已

被彻底水解.因此为保持反应具有较高的结合率和低的水解率,反应体系选择1.0%的含水量为宜.

#### 2.4 底物浓度比对亚麻酸结合率的影响

为考察底物浓度比对卵磷脂亚麻酸结合率的影响,本实验设计了1: 1、1: 2、1: 3、1: 4四种底物浓度比(g: g)进行实验,结果见上表4.表4表

表4 底物比对亚麻酸结合率的影响

Table 4 Effect of the substrate ratio of PC to ethyl linolenate on incorporation of linolenic acid(%)

Substrate ratio(g: g)	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3	C20: 4
1: 1	23.9	0.0	17.8	31.8	14.5	3.2	8.6
1: 2	24.0	0.3	15.0	36.1	12.9	1.8	9.9
1: 3	21.7	0.2	8.2	46.1	15.1	4.8	3.9
1: 4	23.0	0.1	10.1	42.4	18.2	5.0	1.5

Reaction conditions: solvent-free system; yolk PC5 g; lipase, 1 g; water addition 0.21 g;  
reaction temperature: 55 °C; reaction time: 4 h

明,用亚麻油乙酯与蛋黄卵磷脂进行酯交换反应,存在一个较合适的底物浓度比.由于酶活性中心处亚麻酸的浓度得到增加,所以随着底物浓度比的增加,亚麻酸结合率在增加.但在1: 3以后,结合率增加缓慢,而且过高的底物比还会增加后续分离的

困难,故综合考虑,在1: 3底物浓度比下,亚麻酸的结合率较高,因此选择1: 3底物浓度比作为反应的原料反应比例.

#### 2.5 反应介质体系对亚麻酸结合率的影响

表5是将无溶剂体系配比的卵磷脂与亚麻油乙

表5 反应介质对亚麻酸结合率的影响

Table 5 Effect of the reaction system on incorporation of linolenic acid(%)

Reaction system	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3	C20: 4
Solvent-free system	23.0	0.1	10.1	42.4	18.2	5.0	1.5
Hexane system	23.3	0.3	11.5	42.6	7.6	14.4	0.0

Reaction conditions: hexane system; yolk PC, 5 g; lipase, 1 g; ethyl linolenate, 15 g;  
water addition 0.2 g; reaction temperature: 45 °C; reaction time: 4 h

酯混合物溶解于100 mL的正己烷中,然后按1.2.1 反应,结果表明正己烷体系合成的卵磷脂具有高的

亚麻酸含量, 有机溶剂正己烷的存在有利于增加底物的溶解度, 减少底物的粘度以及保持合适的水活度, 因此表现出了较高的酯交换效率, 进一步比较发现, 正己烷体系中亚麻酸结合率的升高是由于亚油酸结合率的下降所致. 此体系可以抑制副反应水解反应和利于回收固体酶, 因此, 选择正己烷作为酯交换反应的介质体系.

## 2.6 原料亚麻酸纯度对亚麻酸结合率的影响

亚麻酸含量为 51.3% 亚麻酸乙酯在经过尿包

表 6 原料亚麻酸纯度对亚麻酸结合率的影响

Table 6 Effect of the purity of linolenic acid on incorporation of linolenic acid (%)

The purity of linolenic acid (%)	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3	C20: 4
51.3	23.0	0.1	10.1	42.4	18.2	5.0	1.5
72.7	20.5	0.0	8.0	40.5	12.2	11.3	7.5

Reaction conditions: hexane system; yolk PC, 5 g; lipase, 1 g; ethyl linolenate of 51.3% and 72.7%, 15 g, respectively; water addition 0.2 g; reaction temperature: 45 °C; reaction time: 2 h

化亚麻酸乙酯的必要性. 反应的脂肪酶是 1, 3 位置酶, 其仅对 1 位的脂肪酸起到交换作用, 而卵磷脂上 1 位的脂肪酸主要是饱和酸棕榈酸和硬脂酸, 在开始酯交换反应后, 1 位饱和酸不断掉下来变成乙酯, 而体系中亚麻酸不断结合上去变成磷脂, 直到达到平衡. 根据碰撞理论和反应平衡理论, 在高含量亚麻酸反应体系下, 由于非目的酸含量低, 而亚麻酸含量高, 亚麻酸的反应速度快, 因此可获得较高的结合率. 本实验选用能容易达到较高纯度的尿

表 7 反应前后卵磷脂脂肪酸构成

Table 7 The constitutes of fatty acids of phosphatidylcholine before and after reaction (%)

PC	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3	C20: 4
PC before reaction	30.3	0.0	16.4	34.1	14.7	0.0	4.5
the synthesized PC ( $\alpha$ -LNA)	20.9	0.0	5.0	44.5	6.2	23.3	0.0

Reaction conditions: hexane system; yolk PC, 5 g; lipase, 1 g; ethyl linolenate of 72.7%, 15 g; water addition 0.2 g; reaction temperature: 45 °C; reaction time: 12 h

结果表明, 反应后亚麻酸的结合率达到了 23.3%. 用此法制备的多烯磷脂酰胆碱中多烯酸总含量为 39.5%, 高于已报道的多烯酸结合率<sup>[2~4]</sup>, 合成出了具有高含量(大于 20%)亚麻酸的  $\alpha$ -LNA 型多烯磷脂酰胆碱.

## 3 结 论

3.1 亚麻酸酯分子形式, 反应介质, 体系含水量, 底物浓度比及原料亚麻酸纯度等因素对卵磷脂中亚麻酸定向结合率有一定的影响. 酶法定向酯交

法制备后获得了高纯度亚麻酸乙酯(含量 72.7%), 并且不含有饱和酸棕榈酸和硬脂酸. 在反应前进行人工定向分离纯化亚麻酸乙酯可以减少反应中非目的脂肪酸如饱和酸等对目的脂肪酸结合的影响, 提高亚麻酸的定向结合率. 为考察高含量亚麻酸乙酯对定向合成亚麻酸卵磷脂的影响, 本实验采用含量为 51.3% 和 72.7% 的亚麻酸反应. 结果见表 6.

结果表明, 高含量亚麻酸乙酯可以把亚麻酸结合率从 5.0% 提高到 11.3%, 说明了反应前分离纯

包法纯化亚麻酸乙酯, 其亚麻酸纯度含量为 70% 以上, 可以为合成亚麻酸  $\alpha$ -LNA 型多烯磷脂酰胆碱提供廉价原料.

## 2.7 酶法定向酯交换反应

选取反应条件的适宜值(以含量 72.7% 的亚麻酸乙酯为亚麻酸供体, 以正己烷为反应的溶剂体系, 底物浓度比 1: 3, 加水量 1.0%), 按 1.2.1 进行酶法定向酯交换反应 12 h, 比较反应前后卵磷脂上的脂肪酸构成(见表 7).

换合成亚麻酸型卵磷脂的适宜反应条件为: 以正己烷作反应介质, 加入高含量的亚麻酸乙酯(含量 > 70%), 底物浓度比 1: 3(g/g), 加水量 1.0%.

3.2 原料卵磷脂不含  $\alpha$ -亚麻酸( $\alpha$ -LNA), 在通过酶催化酯交换后得到的卵磷脂中亚麻酸含量可达到 20% 以上.

## 参考文献:

- [1] Barmholz Y. *Bichime Biophys Acta.* [J], 1980, **604**: 129 ~ 129

- [2] Wang Yong-hua (王永华). *Journal of South China University of Technology* (Natural Science Edition) (华南理工大学学报)(自然科学版)[J], 2000, **28**(12): 71 ~ 75
- [3] Zhang Ling-hua (张苓花). *Journal of Dalian Institute of Light Industry* (大连轻工业学院学报)[J], 2000, **19**(1): 45 ~ 47
- [4] Qin De-yuan (秦德元), Zhang Peng (张鹏). *China oils and fats* (中国油脂)[J], 2004, **29**(9): 45 ~ 47
- [5] Ingemar Svensson, Patrick Adlercreutz, Bo Mattinasson. *J. Oil Chem. Soc.* [J], 1992, **69**(10): 986 ~ 991
- [6] Pan Li (潘丽), Gu Ke-ren (谷克仁), Yang Zhuang (杨壮). *Cereals and oils processing* (粮油加工)[J], 2006, (12): 57 ~ 68

## Enzymatical Synthesis ( $\alpha$ -LNA) of Phosphatidylcholine Containing Polyunsaturated Fatty Acids

DU Jun-min<sup>1</sup>, WU Dong<sup>1</sup>, FENG Cui-ping<sup>2</sup>, HOU Xiang-lin

(1. *Institute of Coal Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Taiyuan, 030001, China;*

2. *Shanxi Agricultural University, Taigu, 030801, China*)

**Abstract:** To synthesize polyunsaturated phosphatidylcholine containing  $\alpha$ -linolenic acid, we processed transesterification using high pure yolk PC and oils containing  $\alpha$ -linolenic acid through lipase catalysis, revealing the effects of the molecular of linolenic acid, the reaction system, the content of water, the ratio of substrate and material linolenic acid and purity of  $\alpha$ -linolenic acid on incorporation of linolenic acid. The result shows that at 45 °C, the yolk PC and high pure linolenic acid oil ester (the ratio of substrate is 1: 3 g/g) reacted 12 hours in hexane containing 1.0% of water, and its incorporation of linolenic acid could reach 20% above.

**Key words:** Polyunsaturated phosphatidylcholine; Transesterification; Enzyme catalysis