

# $\alpha$ -亚麻酸单甘酯的合成工艺研究

刘艳丰, 黄惠华

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 在溶剂体系中, 以亚麻籽油和甘油为反应底物, Lipozyme435 为催化剂, 制备富含  $\alpha$ -亚麻酸的单甘酯, 采用单因素实验与响应面分析法考察了制备过程中底物摩尔比、反应时间、油醇比、加酶量和反应温度对单甘酯得率的影响。结果表明, 反应的最佳条件为底物摩尔比(亚麻籽油:甘油)=1:3, 油醇比为 39.66%, 加酶量 6.01wt%, 反应温度为 56.11 °C, 反应时间为 10.48 h。在此反应条件下反应所得产物中单甘酯含量约达 71.1%, 经检验单甘酯中  $\alpha$ -亚麻酸的含量达 51.36%。

**关键词:** 亚麻籽油;  $\alpha$ -亚麻酸; 单甘酯; 甘油解; 酶催化

**文章编号:** 1673-9078(2012)1-86-90

## Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol rich in $\alpha$ -Linolenic acid from Linseed oil by response surface methodology

LIU Yan-feng, HUANG Huihua

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol production between Linseed oil and glycerol in a solvent system by Lipozyme 435 was studied by response surface methodology. The result showed the optimal parameters were as follows: substrate molar ratio of Linseed oil to glycerol 1:3, the t-butyl alcohol ratio 39.66% (oil to t-butyl alcohol, *m/V*), enzyme dosage 6.01wt%, reaction temperature 56.11°C and reaction time 10.48h. Under the optimal conditions, monoacylglycerol content could reach 71.1% in the reaction product, and the content of  $\alpha$ -linolenic acid reached 51.36% in the monoacylglycerol.

**Key words:** Linseed oil;  $\alpha$ -Linolenic acid; monoacylglycerol; glycerolysis; lipase catalyze

单脂肪酸甘油酯 (Monoglyceride, 简称 MG) 又称单甘酯, 按照结构可分为  $\alpha$ -单甘酯和  $\beta$ -单甘酯, 按照脂肪酸组成又可分为饱和脂肪酸单甘酯和不饱和脂肪酸单甘酯, 它在天然油脂中存在但含量很低<sup>[1]</sup>, 因此单甘酯产品几乎都为工业制备。单甘酯分子中既存在疏水基团又存在亲水基团, 具有优良的乳化性能, 是一种多元醇型非离子表面活性剂, 能在水中形成稳定的水合分散体, 其 HLB 值通常为 2~3, 但通过改变组成单甘酯的脂肪酸碳链的长度和饱和度, 可以调整其 HLB 值<sup>[2]</sup>, 单甘酯具有乳化、稳定、品质改良等多种性能, 已被广泛应用于食品、化妆品、医药、精细化工、洗涤剂、塑料等工业中。单甘酯的合成研究始于 19 世纪中叶, 但发展缓慢, 直到 20 世纪初才开始工业化生产, 当时生产的单甘酯纯度并不高<sup>[3]</sup>, 一直以来, 单甘酯的研究生产对象主要为饱和脂肪酸单甘酯, 单十八烷酸丙三醇酯几乎成了单甘酯的代名词, 不饱和脂肪酸单甘酯的研究近来才得到发展, 且发现有时具有较饱和脂肪酸单甘酯更好的品质, 如油酸单甘酯与饱和酸单甘酯相比能更有效地降低溶液的表面

张力, 乳化能力更好<sup>[4]</sup>, 亚麻酸脂肪酸单甘酯在食品工业中应用时可以为人体补充人们普遍缺乏的亚麻酸, 还可以用为抗癌药物原料<sup>[5]</sup>。单甘酯的制备有化学法和生物酶法两种, 其中化学法又包括直接酯化法、甘油解法和油脂水解法, 目前单甘酯的大规模生产主要通过化学方法, 反应过程需要高温环境, 导致能耗很大且容易使不饱和脂肪酸降解, 而酶法制备单甘酯的酶催化剂具有一定的催化专一性且反应条件温和, 在制备不饱和脂肪酸单甘酯领域具有独特的优势, 开始探索将酶法应用于单甘酯的工业生产中<sup>[6]</sup>。

本研究拟采用固定化酶 Lipozyme 435 在溶剂体系中催化亚麻籽油甘油解制备富含  $\alpha$ -亚麻酸的单甘酯, 通过单因素与响应面法结合考察底物摩尔比(亚麻籽油:甘油)、反应时间、油醇比、反应温度和加酶量五个因素对单甘酯得率的影响优化反应条件, 得到含有大量  $\alpha$ -亚麻酸单甘酯的混合产物, 为  $\alpha$ -亚麻酸单甘酯的理论研究与工业应用提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料

收稿日期: 2011-08-13

有机亚麻籽油( $\alpha$ -亚麻酸 $\geq 56\%$ 、不饱和脂肪酸 $\geq 80\%$ ): 河北欣奇典生物科技有限公司; Lipozyme 435: 诺维信(中国)生物技术有限公司; 正己烷、异丙醇均为色谱纯: 天津市科密欧化学试剂有限公司; 叔丁醇、甘油、石油醚、乙醚均为分析纯: 国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 实验仪器

JA1003 电子分析天平; XW-80A 漩涡混合器; THZ-C 气浴恒温振荡器; TDL-5-A 台式离心机; UltiMate3000 型液相色谱仪; WD-94031 紫外分析仪, Agilent7890A 气相色谱仪。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 酶促亚麻籽油甘油解制备单甘酯

按照摩尔比例精确称取一定量的亚麻籽油与甘油至具塞三角瓶中, 加入一定量的固定化脂肪酶 lipozyme 435 与一定体积的叔丁醇, 采用漩涡混合器混合后放入温度恒定、转速为 200 r/min 的气浴恒温振荡器中反应一段时间, 然后将反应混合物经 3000 r/min 离心 2 min, 收集上层清液, 减压蒸馏除去叔丁醇溶剂后离心, 取上层油液进行检测。

### 1.3.2 HPLC-RID 法测定甘油酯组成<sup>[7]</sup>

液相色谱条件为检测器: RI-101 Shodex 示差折光检测器; 色谱柱: Luna Silica(2) 硅胶色谱柱 250 $\times$ 4.60 mm; 流动相: 正己烷/异丙醇为 16:1 (V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱箱温度: 35  $^{\circ}$ C; 检测器温度: 35  $^{\circ}$ C; 进样量: 10  $\mu$ L。样品中甘油二酯、甘油三酯、单甘酯的色谱峰与亚麻籽油、甘油二酯与单甘酯对照品的保留时间范围及薄层色谱分析鉴定结果来判断。某种甘油酯的含量表示为该种甘油酯的峰面积占总的甘油酯峰面积的百分比。

### 1.3.3 反应产物中单甘酯含量<sup>[7]</sup>

计算采用面积归一化法。

$$\text{单甘酯含量}(\%) = \frac{\text{单甘酯百分量}(\%)}{\text{甘油酯总百分量}(\%)} \times 100$$

其中, 甘油酯总百分量(%)为除脂肪酸外的甘油三酯、甘油二酯和单甘酯百分量的总和, 单甘酯百分量(%)为合成产物中单甘酯的百分含量。

### 1.3.4 脂肪酸组成分析

取少量产物油 50  $\mu$ L 加入 50  $\mu$ L 异丙醇溶解, 点样于硅胶板进行薄层色谱分析, 展开剂为石油醚:乙酸:乙酸(80:20:2, V/V/V)。用 0.2% 2,7-二氯荧光黄的甲醇溶液喷涂后置于紫外灯下观察, 最后刮下单甘酯带的硅胶, 放入 50 mL 圆底烧瓶中, 加入一定量的 2% 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -甲醇溶液, 密封置于 70~80  $^{\circ}$ C 水浴回流反应一定时间, 冷却后加入 2 mL 正己烷, 振摇促进甲

酯化样品溶解, 然后倒入一定量的饱和 NaCl 溶液升至瓶口, 吸取正己烷层离心, 取上层清液过无水硫酸钠柱得到脂肪酸甲酯, 进行气相色谱分析<sup>[8]</sup>。气相色谱条件参考覃小丽等<sup>[9-10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果分析

#### 2.1.1 底物摩尔比对单甘酯含量的影响

根据 1.3.1 中所示方法, 分别按照底物摩尔比(亚麻籽油/甘油)为 1:1、1:3、1:5、1:7 和 1:9, 油醇比为 40%, 反应温度为 50  $^{\circ}$ C, 加酶量为底物的 5 wt%, 反应时间为 3 h 的条件进行反应, 实验结果如图 1 所示。

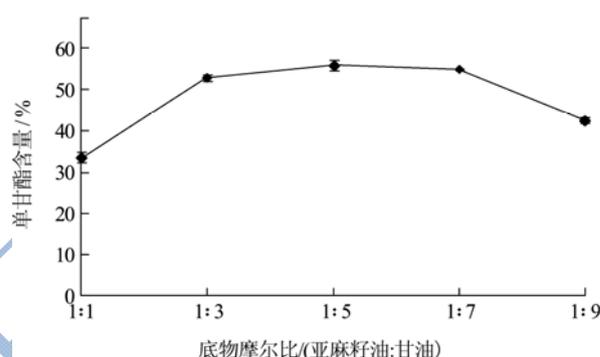


图 1 反应底物摩尔比对单甘酯含量的影响

Fig.1 Effect of substrate molar ratio on monoglyceride content

由图 1 可知, 给定条件下反应产物中单甘酯的含量随着底物摩尔比(亚麻籽油/甘油)的升高先升高, 在 1:3 后变化缓慢, 当比例超过 1:7 后, 单甘酯含量又开始降低, 综合考虑到底物摩尔比与甘油添加量对反应最终产物后续处理的影响, 底物摩尔比最适宜比例约为 1:3。

#### 2.1.2 反应时间对单甘酯含量的影响

根据 1.3.1 中所示方法, 按照底物摩尔比(亚麻籽油/甘油)为 1:3, 油醇比为 40%, 反应温度为 50  $^{\circ}$ C, 加酶量为底物的 5 wt%, 反应时间分别为 3 h、5 h、7 h、9 h、11 h 的条件进行反应, 实验结果如图 2 所示。

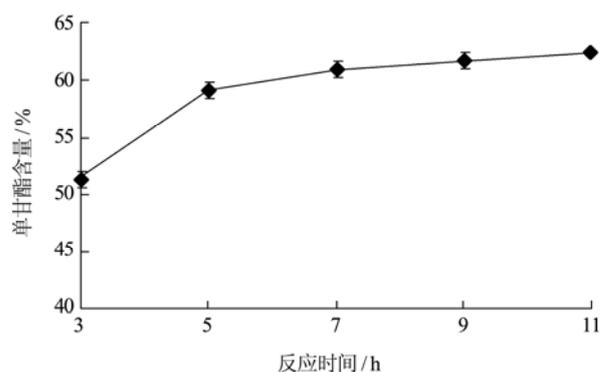


图 2 反应时间对单甘酯含量的影响

Fig.2 Effect of reaction time on monoglyceride content

由图 2 可知, 给定条件下反应产物中单甘酯的含量随着反应时间的延长而逐渐增加, 当超过 5 h 时, 单甘的含量增幅逐渐减小, 因此, 反应时间控制在 5~11 h 较为适宜。

### 2.1.3 油醇比对单甘酯含量的影响

根据 1.3.1 中所示方法, 按照底物摩尔比(亚麻籽油/甘油)为 1:3, 反应时间为 5 h, 反应温度为 50 ℃, 加酶量为底物的 5 wt%, 油醇比分别为 20%、40%、60%、80%、100%的条件进行反应, 结果如图 3 所示。

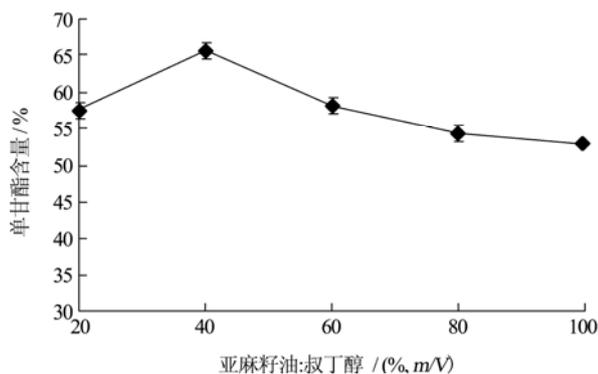


图 3 油醇比对单甘酯含量的影响

Fig.3 Effect of oil and t-butyl alcohol ratio on monoglyceride content

由图 3 可知, 给定条件下反应产物中单甘酯的含量首先随着油醇比的增加而逐渐增加, 当增加到一定程度后, 单甘的含量逐渐减小, 可能的原因为溶剂增多, 整体体积增加, 亚麻油与甘油浓度均降低, 减小了反应机率, 综合考虑单甘酯含量与反应结束后利于溶剂去除, 应将油醇比控制在 40%左右。

### 2.1.4 反应温度对单甘酯含量的影响

根据 1.3.1 中所示方法, 按照底物摩尔比(亚麻籽油/甘油)为 1:3, 油醇比为 40%, 加酶量为底物的 5 wt%, 反应时间 5 h, 反应温度分别为 40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃的条件进行反应, 实验结果如图 4 所示。

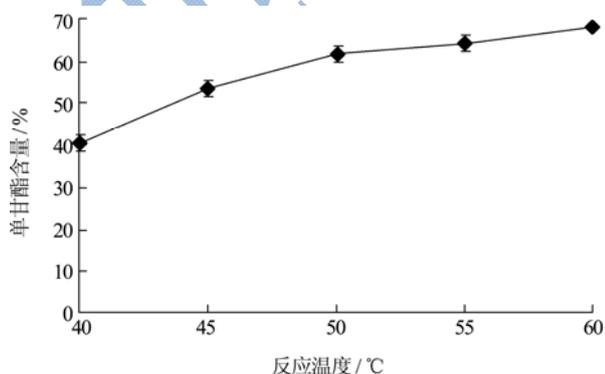


图 4 反应温度对单甘酯含量的影响

Fig.4 Effect of reaction temperature on monoglyceride content

由图 4 可知, 给定条件下反应产物中单甘酯的含量随着温度的增加而增大, 当超过 50 ℃时, 单甘酯含量随着温度升高而增加的速度放缓, 因此适宜的反应温度控制范围为 50 ℃~60 ℃。

### 2.1.5 加酶量对单甘酯含量的影响

根据 1.3.1 中所示方法, 按照底物摩尔比(亚麻籽油/甘油)为 1:3, 油醇比为 40%, 反应时间为 5 h, 反应温度为 55 ℃, 加酶量分别为底物的 3 wt%、5 wt%、7 wt%、9 wt%和 11 wt%的条件进行反应, 实验结果如图 5 所示。

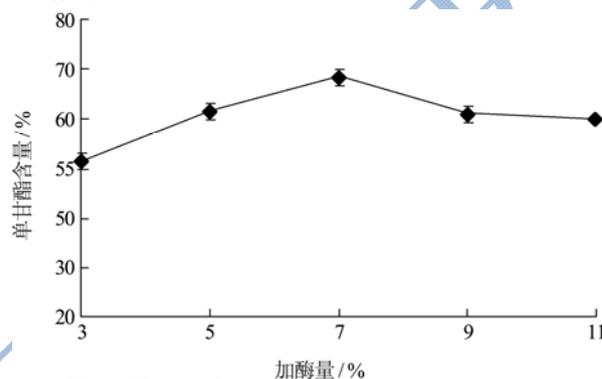


图 5 加酶量对单甘酯含量的影响

Fig.5 Effect of enzyme load on monoglyceride content

由图 5 可知, 给定条件下反应产物中单甘酯的含量随着加酶量的变化先增大后减小, 然后趋于平衡, 综合考虑产物单甘酯含量与酶成本问题, 将加酶量控制在 3 wt%~9 wt%范围内。

## 2.2 响应面设计

在单因素考察底物比、油醇比、反应时间、加酶量和反应温度基础上, 选择对反应产物中单甘酯含量影响较大的反应时间、反应温度、油醇比和加酶量四个因素运用 Design Expert 7.1 进行响应面设计, 以单甘酯含量为依据优化反应条件。根据各因素单因素试验的结果和 Lipozyme 435 的反应推荐温度(40~60 ℃), 设计试验因素编码及水平见表 1。

表 1 响应面设计因素与水平表

Table 1 variables and levels in Box-Behnken experiment design

因素	水平		
	-1	0	1
A(反应时间/h)	5	8	11
B(反应温度/℃)	50	55	60
C(油醇比/%)	20	40	60
D(加酶量/wt%)	3	6	9

## 2.3 响应面试验优化亚麻酸单甘酯制备条件

### 2.3.1 响应面实验结果

实验结果见表 2。

表 2 亚麻酸单甘酯制备响应曲面试验结果

Table 2 Box-Behnken experiment design and corresponding experimental values of monoglyceride content

试验号	A	B	C	D	单甘酯含量/%
1	-1	0	0	-1	59.96
2	1	0	1	0	64.34
3	1	0	0	1	65.27
4	0	-1	-1	0	53.00
5	-1	0	0	1	64.72
6	0	0	0	0	71.95
7	0	0	1	-1	59.08
8	0	0	0	0	72.12
9	0	-1	0	1	61.78
10	-1	0	1	0	63.14
11	0	0	0	0	69.76
12	-1	1	0	0	63.55
13	-1	-1	0	0	64.33
14	0	1	0	1	64.81
15	-1	0	-1	0	52.85
16	0	0	-1	-1	50.52
17	0	0	1	1	60.57
18	0	0	0	0	69.35
19	0	1	1	0	65.80
20	1	-1	0	0	67.57
21	0	0	0	0	72.53
22	1	0	-1	0	67.07
23	0	0	-1	1	54.01
24	0	-1	0	-1	58.65
25	1	0	0	-1	66.70
26	1	1	0	0	66.25
27	0	1	-1	0	63.41
28	0	-1	1	0	60.19
29	0	1	0	-1	60.97

2.3.2 模型评价

采用 Design-Expert 7 对表 2 的实验结果进行分析得到回归方程、响应面图 (图 5~图 8) 和方差分析表 (见表 3)。由图可以看出各因素对响应值的影响变化趋势, 且回归模型存在最大值, 说明各个因素都有一个最适合的值。单甘酯含量回归模型  $p(\text{Prob}>F) < 0.0001$ , 说明模型极显著, 失拟项为 0.1217, 即  $P > 0.05$ , 影响不显著, 说明模型拟合程度良好, 该模型成功有效, 实验误差小。一次项 A,B,C 以及二次项 AC,  $B^2, C^2$  和  $D^2$  的 P 值小于 0.05, 十分显著。优化后的回归方程为:

$$\text{单甘酯含量}(\%) = 71.14 + 2.39A + 1.60B + 2.69C +$$

$$1.28D - 0.13AB - 3.25AC - 1.55AD - 1.20BC + 0.18BD - 0.50CD - 1.46A^2 - 3.39B^2 - 7.93C^2 - 6.30D^2$$

决定系数  $R^2$  为 90.99%, 校正决定系数是 0.8197, 说明该模型能解释 81.97% 响应值变化, 18.03% 的变异不能用此模型解释, 说明回归方程的拟合度较好, 能真实反映数据结果。

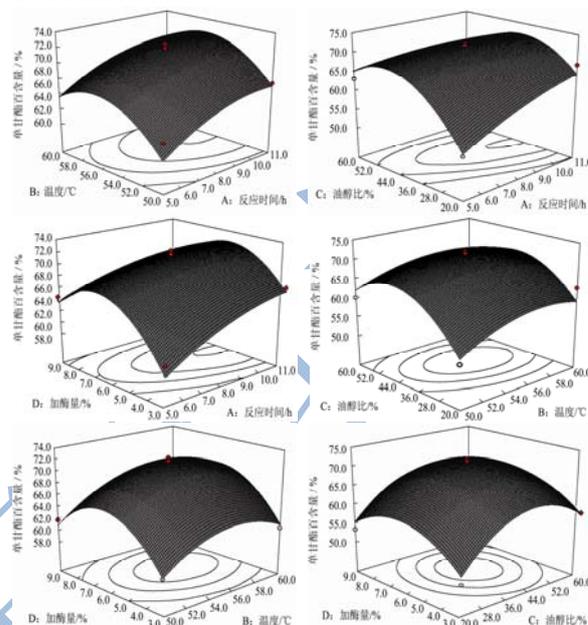


图 6 反应温度、反应时间、油醇比与加酶量四因素相互间的交互影响

Fig.6 Response surface and contour plots for the interactive effect of reaction temperature, reaction time, oil-t-butyl alcohol ratio and enzyme load on monoglyceride content

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance table for monoglyceride contents

项目	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	14	842.44	60.17	10.09	<0.0001
残基	14	83.45	5.96		
失拟项	10	74.80	7.48	3.46	0.1217

2.3.3 最优解决方案

利用回归方程确定最佳单甘酯制备条件, 最佳条件为: 反应温度 56.11 °C, 油醇比为 39.66%, 时间 10.48 h, 加酶量为底物的 6.01 wt%。采用上述优化工艺参数进行亚麻籽油甘油酯制备富含  $\alpha$ -亚麻酸的单甘酯。在此条件下进行重复试验, 单甘酯的平均含量达到 71.1%, 与预测值 72.3% 相比, 其相对误差为 0.28%, 这说明实验模式合理。

2.4 亚麻籽油与甘油二酯脂肪酸组成分析

假定总脂肪酸含量为 100 时, 亚麻籽油及其产物单甘酯的主要脂肪酸组成如表 4 所示。

由表 4 可以看出, 亚麻籽油以及产物单甘酯中主要含有 C16:0、C18:0、C18:1、C18:2、C18:3n-6 和 C18:3

六种脂肪酸,其总量占到总脂肪酸的98%以上,制备获得的单甘酯不饱和脂肪酸含量为89.38%,其中亚麻酸含量高达51.36%。

表4 亚麻籽油及产物的脂肪酸组成 %

Table 4 Fatty acid compositions of Linseed oil and s

monoglyceride		
脂肪酸类型\样品	亚麻籽油	单甘酯
C16:0	4.59±0.54	5.71±0.12
C18:0	2.36±0.74	3.86±0.01
C18:1	16.48±1.48	21.20±0.07
C18:2	15.78±0.43	16.35±0.03
C18:3n-6	0.68±0.07	0.47±0.01
C18:3n-3	60.01±1.53	51.36±0.27
占总脂肪酸的含量	99.90±0.08	98.95±0.06

### 3 结论

采用响应曲面优化方法得到了在叔丁醇溶剂体系下, Lipozyme435 酶法催化亚麻籽油甘油解制备甘油二酯的最佳工艺, 在各因素方差分析中表明在考察的范围内, 反应时间, 油醇比, 反应温度三个因素对单甘酯生成量有显著影响, 其中反应时间与油醇比的交互作用对单甘酯的得率影响达到显著水平, 在底物摩尔比为1:3, 反应温度56.11℃, 时间10.48 h, 加酶量为底物的6.01 wt%的最优工艺下反应产物中的单

甘酯得率达71.1%,  $\alpha$ -亚麻酸的含量达51.36%。

### 参考文献

- [1] 王弘,侯建中,陈世忠,等.松果菊挥发油的化学成分研究[J].中国中医药信息杂志,2002,9(5):42-43
- [2] 刘燕,刘钟栋,孙晓霞,等.单甘酯的研究进展[J].粮油加工,2009,2:56-58
- [3] 谷玉杰,吕剑.合成单脂肪酸甘油酯的进展[J].应用化工,2001,30(6):6-13
- [4] 倪永全,杜志云,黄旭东.不饱和酸单甘酯的研制[J].无锡轻工大学学报,1995,14(2):143-148
- [5] 高波,滕利荣,孟庆繁,等.固定化脂肪酶催化合成 $\alpha$ -亚麻酸单甘油酯的方法.中国:200710055632 [P].2007,10:24
- [6] 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,2008,23(7):11-14
- [7] 朱启思.有机溶剂体系中酶法合成单油酸甘油酯的工艺研究[D].广州:华南理工大学,2010
- [8] 张超,胡蒋宁,范亚苇,等.响应面法优化酶催化紫苏籽油合成富含 $\alpha$ -亚麻酸甘油二酯的工艺条件[J].中国农业科学,2011,44(5):1006-1014
- [9] 纪丽丽,宋文东,刘建秀.红树林植物露兜中挥发油和脂肪酸的测定[J].现代食品科技,2008,24(6):588-592
- [10] 覃小丽,杨博,王永华.人初乳脂肪酸组成及sn-2位脂肪酸分布的研究[J].食品工业科技,2010,31(5):81-88