

酶促酸解合成结构脂反应中酰基迁移的研究进展

吴羽琦, 王笑寒, 王小三, 金青哲, 王兴国

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:酶促酸解合成结构脂具有显著的优越性,其中酰基迁移副反应是结构脂合成中亟需研究和控制的关键。对酶催化酸解反应中酰基迁移的理论和实践研究进行综述,归纳总结温度、时间、酶、载体、水分活度、溶剂、底物比、甘油酯结构等因素对酰基迁移的影响。目前,对酰基迁移的研究主要在酶促反应水平上,机理尚不深入,且优化酶促酸解条件提高接入率、产率与减少酰基迁移是不可兼得的矛盾关系。今后需要进行酰基迁移在复杂体系下的影响机制和评测方法的深入研究,以期更高效地开发特殊用途的结构脂产品。

关键词:结构脂;脂肪酶;酶促酸解;酰基迁移;影响机制

中图分类号:TS225.1;TS221 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)02-0020-08

Advance in acyl migration in the reaction of enzymatic acidolysis to synthesize structured lipids

WU Yuqi, WANG Xiaohan, WANG Xiaosan, JIN Qingzhe, WANG Xingguo

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

Abstract:The synthesis of structured lipids by enzymatic acidolysis has significant superiority, but the side reaction of acyl migration, the key to the production of structured lipids, should be imminently highlighted and controlled. The theoretical and practical researches on acyl migration in enzyme-catalyzed acidolysis reaction were reviewed, and the factors affecting acyl migration, including solvent, water activity, temperature, time, enzyme, carrier, substrate ratio and glyceride structure were summarized. At present, the research on acyl migration was mainly at the level of enzymatic reaction, and the research on the mechanism was not deep. In addition, the increases of the accessing rate and yield by optimizing the conditions of enzymatic acidolysis and the decrease of acyl migration were incompatible. Further research should be focused on the influence mechanism of acyl migration and the evaluation methods in complex systems so as to develop unique functional structured lipids products effectively.

Key words:structured lipids; lipase; enzymatic acidolysis; acyl migration; influence mechanism

酶催化合成具备特殊生理功能和营养价值的结构脂(Structured lipids, SLs),相较于传统的化学合成法,具有加工损失少、副产物少、无风味损失和连

续可控等优点^[1]。许多结构脂已通过酶促催化进行工业化生产,而利用脂肪酶催化酯交换生产的结构磷脂(Structure of phospholipids, PLs)、偏甘酯(Partial glyceride, PAG)以及含中链脂肪酸的低热量甘油酯等产品,因其原料和反应条件等的限制,尚未很好地商业化^[2]。酶催化合成结构脂的方法有水解法、酯交换法、酯化法,其中酯交换法又分为酸解法、酯-酯交换法和醇解法。酶促酸解反应是以甘油三酯(TAG)和游离脂肪酸(Free fatty acid, FFA)为原料,利用脂肪酶催化 FFA 与 TAG 酰基交换。相比于

收稿日期:2020-05-18;修回日期:2020-10-24

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31972035);
新农科研究与改革实践项目

作者简介:吴羽琦(1998),女,在读本科,专业为食品科学与工程(E-mail)wyq0727vip@163.com。

通信作者:王小三,副教授,博士(E-mail)wxstongxue@163.com。

醇解法过程烦琐、成本高,酯-酯交换法产物不宜分离,酶促酸解法具有显著优越性,在生产具有独特营养和生理功能的 SLs 中占有举足轻重的地位。

酰基迁移作为酶促酸解反应中无法避免的副反应,使原本保留在 sn-2 位的特定酰基迁移到其他位置,降低了目标产物的得率,从而限制了酶促酸解合成 SLs 的应用和发展。现有的报道主要集中在研究多因素条件下,酰基迁移对酶促反应的影响,而实际是脂肪酶位置选择性和酰基迁移共同作用的结果^[3]。目前,很多的评论和书籍提供了酶法生产 SLs 的详尽概述^[3-4],但鲜有对酶法合成 SLs 中酰基迁移问题系统归纳的报道。由于非特异性脂肪酶将脂肪酸随机地接入甘油骨架上,这与酰基迁移导致的结果类似,因此本文探究了在特异性脂肪酶存在的情况下对酰基迁移的影响,旨在对脂肪酶催化酸解反应过程中酰基迁移情况的研究进行归纳和分析,阐述不同因素条件对酰基迁移的影响规律,以期今后深入探究相关机理和酶促酸解合成 SLs 的应用提供理论指导,并扩大其应用范围。

1 酰基迁移的机制

酰基迁移是自发产生的,且在酯交换反应过程中是不可避免的。专一性脂肪酶在催化酯交换制备 SLs 的过程中,会存在甘油骨架中 sn-2 位脂肪酸迁移至 sn-1,3 位或非 sn-2 位脂肪酸反向迁入的现象(如图 1 所示),其涉及 TAG 的水解和再酯化^[5]。水解产生的二酰基甘油酯(DAG)和单酰基甘油酯(MAG),尤其是 DAG 的存在,是脂肪酶催化酸解反应中不可避免的中间体,也是酰基迁移和 SLs 合成

的前体物质^[6]。在酸解反应中需严格控制 DAG 含量,尽可能减少酰基迁移;而对于部分醇解反应,则希望更大程度地酰基迁移来提高目标产物 1,2-DAG 的产率。

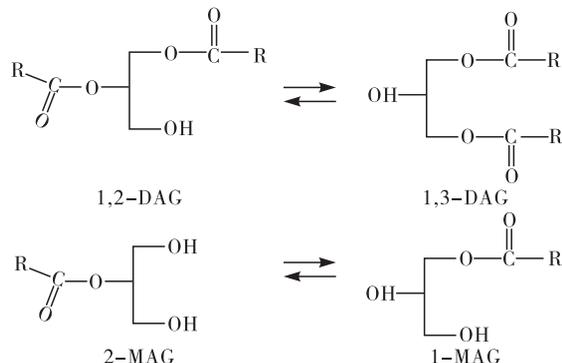


图 1 酶催化酯交换过程中的酰基迁移

目前,对于酰基迁移的机制报道可以分为两种观点:一是无酶非催化条件下的酰基迁移,二是酶催化途径下独立存在的酰基迁移。目前,多数是基于在有溶剂体系中酰基迁移的报道,而对非有机溶剂条件下的机制分析则欠缺研究。无酶非催化条件下,推测的分子内酰基迁移机理通过 sn-2 亲核取代发生, TAG 水解后,游离羟基氧的电子亲核攻击酯羰基碳,形成五元环(缩酮)中间体,最终开环形成产物,如图 2 所示。Li 等^[7]发现在去除酶的反应体系中,1,2-DAG 和 2-MAG 的含量仍然随着反应时间延长而显著变化,推测酰基迁移可能是分子内的反应。Laszlo 等^[8]利用动力学分析验证了酰基迁移为分子内反应,即酰基迁移由熵驱动,在反应过程中既不放热也不吸热。

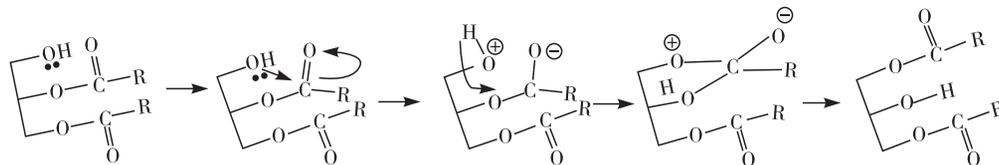


图 2 无酶非催化下推测的酰基迁移机制

也有研究发现,脂肪酶催化作用下的酰基迁移独立于分子内酰基迁移,有独特的反应途径。Martinelle 等^[9]在有机溶剂存在下,以辛酸乙酯作为酰基供体,2-辛醇作为酰基受体的酰基迁移的动力学研究中,验证了酶催化条件下的酰基迁移反应遵循乒乓机制,即脂肪酶先进攻 TAG 酯键形成酯酶复合物(Michaelis-Menten 复合物),之后醇基部分解离,再与 H₂O 结合形成四面体过渡态中间体后,生成 TAG 并释放酶。Joseph 等^[10]研究表明,脂肪酶活性位点三联体(Asp203-His257-Ser144)在酰基迁移反应中起着至关重要的作用,对于脂肪酶催化

途径下的酰基迁移,质子化是主要理论基础,归纳为四个步骤,其中一个水分子参与的五元环的打开,使 1,2-DAG 变成 1,3-DAG,是整个反应的限速步骤。Mao 等^[11]采用量子化学模拟手段,对无酶非催化途径和脂肪酶催化途径酰基迁移机制分别进行推理分析,针对脂肪酶催化条件下的酰基迁移,提出并探讨了无水分子参与条件下,可能的酰基迁移机理,如图 3 所示。脂肪酶催化条件下,底物 1,2-DAG 的 sn-2 质子被 Ser144 夺取,并转移到 His257 上,之后 sn-1 羟基氧亲核攻击 sn-2 羰基碳,并经过双质子转移完成酰基迁移。同时还研究了水分子对

分步途径酰基迁移的影响,尽管该途径所需化学能垒高,在室温条件下很难发生,但部分酶催化反应中

的高温环境对该途径的影响或有增加。

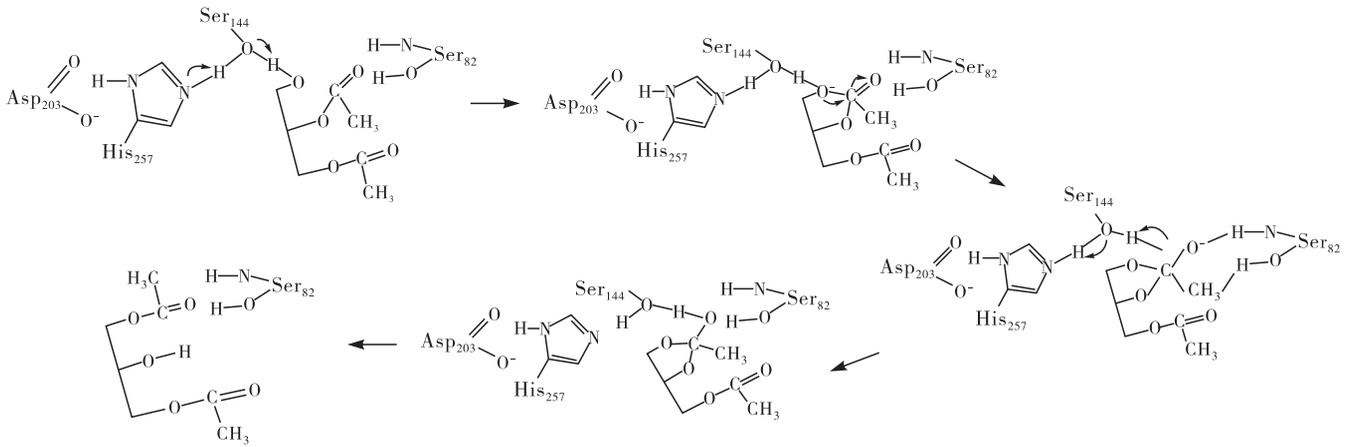
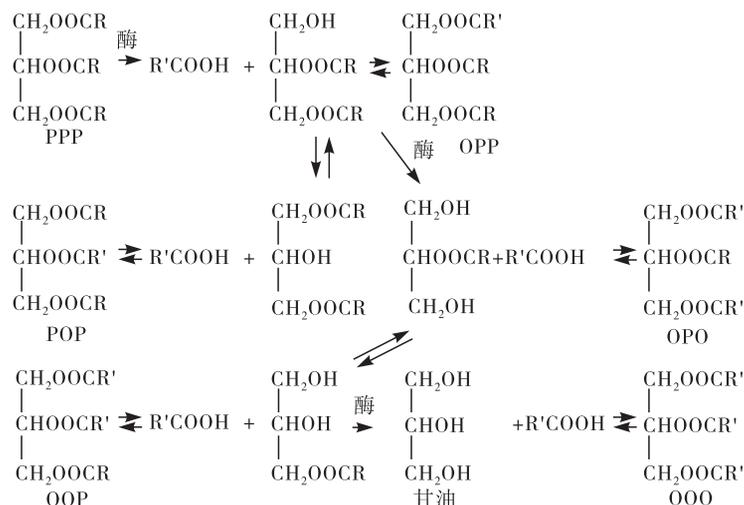


图3 脂肪酶催化下推测的酰基迁移机制

酶法酸解是可逆反应,酯键分解释放出脂肪酸形成 DAG/MAG,之后 FFA 与 DAG/MAG 反应生成 SLs, DAG、MAG 形成期间均会发生酰基迁移。通过控制底物比和反应条件,产物移除等促进平衡移动,提高脂肪酸接入率和产率。但提高接入率往往和减少酰基迁移是两者不可兼得的矛盾关系。然而,副产物 MAG 和 DAG 作为优良的乳化剂,降低了反应界面活化能,提高了酶的反应速度^[6]。DAG 的产生受众多因素的影响,且与酰基供体的接入和酰基迁移程度均呈正相关^[12]。因此,充分的反应和较低的迁移率是研究酶法酸解合成 SLs 的关键目标。

酰基迁移影响酶促酸解反应。以三棕榈酸甘油酯和油酸的酶促酸解反应为例,其酰基迁移途径如图4所示。对于 FFA 参与的酸解反应,酰基迁移情

况可通过该脂肪酸在 sn - 2 位相对含量来反映;对于复杂体系,则需对反应前后 sn - 2 位脂肪酸的组成进行整体的比较和分析。在酰基迁移的研究中,水解产物的存在会干扰脂肪酸组成的准确分析,位置异构体的含量变化可细致反映酰基迁移情况,这需引起研究者的注意。表1列出了典型的酶促酯交换实验中酰基迁移的研究分析。酶催化条件下,需要重视酯交换反应与并存的酰基迁移副反应分开的动力学研究。但目前酶催化酸解的研究主要集中在催化剂的合成和应用方面,动力学建模方面的研究较少。Basheer^[13]、Paez^[14]等均对酶促酸解反应动力学进行了报道,但也只是通过宏观反应速率的分析确定反应级数。



注:P. 棕榈酸;O. 油酸。

图4 三棕榈酸甘油酯和油酸的酶促酸解途径

表1 酶促酯交换中酰基迁移的研究分析

底物与酶类型	分析方法	目标	不足	参考文献
三棕榈酸甘油酯、共轭亚油酸 (CLA)、辛酸 (CA), Lipozyme RM IM	GC-FID 分析 sn-2 位 CLA、CA 相对含量	程序调节反应温度减少酰基迁移	不同脂肪酸结构结果不一	[15]
油酸甘油酯、棕榈酸 (PA), Lipozyme RM IM/Lipozyme TL IM/Lipozyme OF	TLC-FID 分析目标 TAG 相对含量, HPLC-MS/MS 分析手性 TAG 相对含量	探究酶类型和反应条件对酰基迁移和产率的影响		[16]
油酸、亚油酸、分提棕榈硬脂酸, NS 40086	GC-FID 分析 sn-2 位 PA 相对含量, UPLC-Q-TOF-MS、HPLC-ELSD 分析产物组成	优化反应条件减少酰基迁移, 提高产率和 sn-2 位 PA 相对含量	产物含 OPO 和 OOP 等同分异构体	[17]
5 种植物油、CA, Lipozyme RM IM	GC-FID 分析 sn-2 位 CA 相对含量, HPLC-MS/MS 分析含 CA 的手性 TAG	比较酰基迁移水平与手性 TAG 异构体相对含量相关性	含 CA 的 TAG 中位置异构体难定量	[18]
单细胞油脂、CA, Novozym 435/NS 40086/Lipozyme RM IM/Lipozyme TL IM	GC-FID 分析 FA 竞争参数 α , UPLC-Q-TOF-MS 分析产物组成	优化条件减少酰基迁移, 合成位置特异性中链脂肪酸 SLs		[19]
PA 藻油、 <i>n</i> -3 PUFAs 藻油, Novozym 435/Lipozyme 435/Lipozyme TL IM/Lipozyme RM IM	GC-FID 分析 sn-2 位特异 FA 反应前后变化量总和、FA 竞争参数 α	优化条件减少酰基迁移, 合成人乳替代脂	忽视水解产物和位置异构体的影响	[20]
鳕鱼油、藻油、乙醇, 脂肪酶 CAL-A/Novozym 435/Lipozyme TL IM	¹³ C NMR 分析 1-MAG、2-MAG 相对含量	建立 MAG 动力学模型, 探究脂肪酶选择性和酰基迁移	涉及两步水解, 不能真实反映对某一阶段单纯酰基迁移造成的影响	[21]
单甘酯、甲醇, Lipozyme TL IM	HPLC 分析 1-MAG、2-MAG 相对含量和反应速率常数	探究不同溶剂下酶的选择性和酰基迁移		[22]
棕榈油、甲醇, Lipozyme RM IM	HPLC 分析 1,3-DAG 和 1(3)-MAG 相对含量	研究酰基转移的影响因素	忽视产物 TAG 酰基迁移	[23]
全氢化高芥酸菜籽油、中链甘油三酯、棕榈油, Lipozyme TL IM	比较与纯化学法反应 FA 变化差异	优化条件控制酰基迁移	忽视化学法反应体系中的酰基迁移	[24]
高度氢化大豆油、普通大豆油, Lipozyme TL IM/Lipozyme RM IM	HPLC 分析 SUS 相对含量、1,2/1,3-DAG 含量比值	探究多因素及交互作用对酰基迁移的影响	忽视 TAG 位置异构体	[25]

注: GC-FID. 气相色谱-火焰离子化检测器; TLC-FID. 薄层色谱-火焰离子化检测器; UPLC-Q-TOF-MS. 高效液相色谱-飞行时间质谱; HPLC-ELSD. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器; FA. 脂肪酸; OPO. 1,3-二油基-2-棕榈酰甘油酯; sn-OOP. 1,2-二油基-3-棕榈酰甘油酯; HPLC-MS/MS. 高效液相色谱-串联质谱; *n*-3 PUFAs. *n*-3 多不饱和脂肪酸; ¹³C NMR. 碳 13 核磁共振; MAG. 单酰基甘油酯; DAG. 二酰基甘油酯。

2 酰基迁移影响因素

2.1 温度和时间

高温对酰基迁移的增加起着非常重要的作用, 同时温度也会影响酶的反应活性。控制温度减少酰基迁移的同时, 也需要关注脂肪酸接入率及合成效率。对于一些饱和度高的 TAG (更高熔点), 较低的温度使得体系的黏度较大, 阻碍了底物的传热传质, 酰基迁移少的同时反应效率也低; 此外, 酶作为有最适温度的生物制剂, 较高的温度会一定程度上改变酶的构象, 使得酶的特异性发生改变, 并加剧酰基迁移^[26]。王子田等^[27]发现, 随着温度的升高, 在单油酸 MAG 酯化反应体系中的 1,3-DAG 与 DAG 比值不增反减, 主要是由于 sn-1 位羟基与酶形成过渡

态中间物的能势远低于 sn-2 位羟基, 因此根据 Arrhenius 方程, 随着温度的升高, sn-2 位羟基反应速率比 sn-1 位增大得多, 导致 sn-1,3 位选择性降低。但也有可能是期间发生了酰基迁移导致的。时间作为除温度外另一个热力学参数, 影响着酰基迁移的平衡。根据 Arrhenius 方程的一般规律, 温度越高, 达到平衡所需的时间越短^[28], 随时间延长, 酰基迁移加剧。故控制反应温度和时间, 是控制酰基迁移的有效手段。

Xu 等^[29]利用五因素响应面设计, 探究了菜籽油与癸酸在无溶剂介质中酶促酯交换反应的酰基迁移规律, 结果表明, 温度对酰基迁移的影响最显著。范晓波等^[30]使用脂肪酶 Lipozyme RM IM 催化极度

氢化大豆油和油酸酯交换反应时发现,sn-2位的油酸含量在整个反应进程中从2.13%逐渐上升至23.25%,表明时间是影响酰基迁移的主要因素。Yang等^[15]报道了在无溶剂体系中,温度程序化设置在减少酰基迁移方面更为突出,且对酰基掺入无明显影响。因此,在不显著降低反应产率的前提下,通过程序化设置改变酸解温度来减少酰基迁移是可行的,这对今后的研究具有指导意义。

2.2 酶和载体

据报道,酶量对酰基迁移的影响仅次于温度^[29]。高比例的酶量,带入更多的水分进入反应体系,DAG含量因增强的水解作用而增加,从而增加了酰基迁移的可能性^[29]。范晓波等^[30]在油酸和极度氢化大豆油的酶促酸解反应研究中表明:增加酶量到一定程度(底物质量比10%),体系中酶的活性位点与底物充分接触,反应进程加快,sn-1位油酸接入率达最大;然而继续加大酶量,酶自身水分增多,导致反应向水解方向偏移,最终产率反而下降;在10%酶量下,酰基迁移情况也是最严重的,故满足高sn-1,3位脂肪酸接入率,同时低酰基迁移率的最适酶量需要深入考量。同样,He等^[20]在利用酶法酸解微藻油制备新型人乳替代脂时发现,高脂肪酶载量,在提高脂肪酸接入率的同时,也会降低原sn-2位棕榈酸含量。这与过量的酶影响中间产物酰基迁移程度增大的结论是一致的。

同时,各种载体,包括硅胶、硅藻土、离子交换树脂及吸附树脂对酰基迁移影响各不相同^[6]。树脂是潜在的酰基迁移催化剂,在吸附树脂及弱酸性离子交换树脂存在下,酰基迁移速率较快。这主要是由于弱酸性离子交换树脂促进酰基受体羟基质子化,增加亲核性,从而加快了酰基迁移的发生;而对于中性吸附树脂,可能由于亲核的羟基基团与亲电中心羰基基团空间位置上的接近,促进了酰基迁移^[30]。Pacheco等^[25]在研究高度氢化大豆油和油酸酯交换中发现,Lipozyme TL IM(硅胶固定)的酰基迁移率明显高于Lipozyme RM IM(离子交换树脂固定),这可以从它们固定化载体来解释,进一步验证了硅胶对异构化反应的催化作用。此外,在间歇式酶反应器中,搅拌分解脂肪酶颗粒可能会加强载体的作用,故寻找更温和的反应器很有必要^[31]。不同品种来源的脂肪酶,在有机溶剂体系下,对酰基迁移的作用大小也不同,而在无溶剂体系下,这一差异被淡化^[32]。

2.3 水分活度

在酶催化反应的过程中探究水对酰基迁移的影

响,不同的研究所得的结论不尽相同,且在有(无)溶剂的反应体系中,含水量对酰基迁移的影响也有差异^[9]。李人望^[22]通过动力学模拟,阐述了酰基迁移机理,发现酰基迁移过程属于sn-2亲核取代反应,体系的极性因水分活度增加而增强,不利于反应过渡态电荷的分散,进而影响了sn-2亲核取代反应,导致反应活化能提高,因此不利于酰基迁移的发生。这主要是由于过多的水分子结合在酶的活性中心附近形成水簇,使酶呈现过柔性,底物与酶结合受阻,导致酶的位置选择性下降^[33]。而Li等^[34]报道了水分活度增加可以加速酰基迁移。Kroeger等^[35]研究表明,水分子通过氢键活化亲核试剂(基团)和亲电试剂(基团),有助于将质子从甘油骨架的sn-1位转移到sn-2位,从而促进酰基迁移。刘文强等^[36]以脂肪酶Lipozyme TL IM催化共轭亚油酸(CLA)和松籽油制备sn-2位富含CLA和松籽油酸(PLA)的SLs,考察体系水分活度对CLA接入量和酰基迁移的影响。结果表明,CLA的接入量和酰基迁移均随水分活度的增加而增加。Xu等^[29]认为在无溶剂介质中,水不会引起酰基迁移,不同水分活度下酰基迁移的差异可能是不同的介质含水量下的DAG水平不同造成的。

也有研究得出水分活度应控制在合适范围内,水分活度过低或过高,均会加剧酰基迁移的发生。肖乾煌等^[37]利用三棕榈酸甘油酯和油茶籽油脂脂肪酸制备1,3-二油基-2-棕榈酰甘油酯(OPO),发现在不同溶剂中,水分活度均在0.53时表现出较低的酰基迁移率。此外,一些用于控制水分活度的固定化剂和水合盐添加剂会影响酰基迁移^[38]。范晓波等^[30]以不同饱和盐溶液(不同水分活度)探究对酰基迁移的影响,结果发现较低和较高的水分活度对酰基迁移都有负面影响。通过分子筛或丙酮等对实验材料进行反应前脱水,可一定程度减少反应体系中的水分对实验的干扰。综上所述,若要抑制酰基迁移需要控制水分活度。少量水解产生的DAG在酶促酸解过程的初始阶段很重要,DAG可以促进新TAG的产生,但是不加控制的水解会降低SLs产率。

2.4 溶剂

通常情况下,酰基迁移的速率常数随着溶剂极性的增大而减小^[39]。在非极性的烷烃类及卤代烷类溶剂中,酰基迁移速率较快;而在更多的极性溶剂中,如氯甲酸和丙酮,以及在非极性溶剂中加入少量的水,都会降低酰基的迁移速率^[40]。段章群^[41]利用脂肪酶Lipozyme RM IM比较不同溶剂体系中

sn-1,3位专一性高低,发现丙酮中专一性最好,而正己烷体系中最弱,3种溶剂的极性大小与酰基迁移率呈负相关。较小的酰基迁移结果同时反映了sn-1,3特异脂肪酶的专一性,因此从分子动力学角度研究溶剂对酶位置选择性的影响,有助于选择最佳的溶剂实现所需的应用。但也有研究称,不同类型溶剂条件下的反应,酰基迁移程度并不总是与溶剂的极性呈负相关^[22]。这是由于溶剂体系极其复杂,还包括了酶的构象变化以及酶、底物、溶剂间的相互作用。李人望^[22]研究发现,与水对酰基迁移反应速率常数的影响机理相似,低极性溶剂有利于过渡态中间体电荷的分散,从而降低了反应的活化能。同时,溶剂的疏水性导致sn-1位羟基形成过渡态的能势增大,而sn-2位过渡态的能势减小,使得脂肪酶的sn-1,3位置选择性减弱^[42]。由于溶剂对脂肪酶必需水化层剥夺能力的不同,影响了酶的活性和选择性,进而出现sn-2位脂肪酸的位置变化,与因酰基迁移而导致的现象相同。出于绿色环保安全角度,在酶促合成SLs的过程中,仍然推荐采用无溶剂体系,但是应较好地控制反应体系的水分含量以减少酰基迁移的影响。

2.5 底物比

有研究表明,底物摩尔比对酰基迁移无显著影响,而也有实验验证了底物摩尔比会影响酰基迁移^[17,25,43-44]。Wang等^[17]研究发现,酰基供体(亚油酸、油酸)与棕榈硬脂酸解的底物摩尔比值在6~12范围内,随着酰基供体含量的增加,产物OPO和1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯(OPL)总收率显著增加,而需要保留的sn-2位多不饱和脂肪酸也因酰基迁移而减少。Wang等^[43]发现,棕榈油与棕榈油脂肪酸不论在一步还是分步酸解下,目标产物OPO的相对含量均随着底物摩尔比的增大而呈先增大后减少的趋势。考虑到脂肪酸浓度的增加,使整个反应体系黏度增大,影响酶与底物间的接触和酰基迁移作用。因此,酰基供体中脂肪酸的合理比例对产率有积极的影响。也有研究发现,在酶促酯交换过程中,有、无溶剂存在下的Lipozyme RM IM催化反应,底物摩尔比对酰基迁移表现出不同的影响水平^[25]。不一致的结论,可能是反应体系的不同以及底物类型和结构差异等因素导致的。

2.6 甘油酯的结构

由于酰基结构的不同,碳链的长短、不饱和双键的数量和位置等的差异对空间位阻产生不同程度的影响,进而影响酰基的迁移情况。链长越短的脂肪酸

具有更高的酰基迁移速率已在很多研究中报道^[44],因而中链脂肪酸的酰基迁移在SLs合成中受到广泛关注。相比之下,很多功能性长链脂肪酸则表现较稳定的状态。DAG与MAG酰基迁移速率常数决定两者表观速率活化能,较高的反应活化能和较少的酰基受体导致DAG的酰基迁移速率远小于MAG^[6]。

Xu等^[29]在脂肪酶催化酯交换反应中,通过比较产物sn-2位脂肪酸含量随反应时间的变化规律,得出亚麻酸向sn-2位迁移的速率最大,亚油酸次之,油酸最小。同样,在菜籽油与癸二酸合成反应中,比较sn-2位的脂肪酸含量变化规律,得出油酸含量呈上升趋势,而亚油酸含量和亚麻酸含量均呈下降趋势,同样验证了不饱和度越高的脂肪酸,迁移速率越快。也有研究发现,不同脂肪酶会导致油酸、亚油酸、亚麻酸酰基迁移大小变化的差异^[6]。

2.7 其他

酸度对酰基迁移也有一定影响。理论上,强酸是导致部分酰基迁移的原因,在酸性环境中,羰基氧的负电荷对质子的吸引力会增强碳原子的亲电性,促进sn-2亲核取代反应及酰基迁移的发生。这可以解释酸解反应中,高FFA底物比导致酰基迁移增加的现象,然而脂肪酸是弱酸,影响可能会很小^[29]。振荡速率的影响也有报道^[45]。对于无溶剂反应体系,反应体系黏度较大,振荡速率的加快有利于整个反应的传质,使得酯交换程度和酰基迁移程度增大,而进一步加快振荡速率对酯交换影响甚微,但酰基迁移率继续增加。国内外在有机溶剂和无溶剂酶促酸解反应的研究中,都取得了较好进展,但鲜有在超临界二氧化碳(SC-CO₂)状态下酶法催化合成的相关报道^[46]。SC-CO₂作为一种特殊溶剂,也对酰基迁移产生影响,其在酶促酸解合成SLs的应用有待进一步研究。除此之外,还有一些可能的影响因素,如微波。微波增加了极性分子的熵值,加快反应速率的同时,底物分子结合在活性中心的概率也随碰撞的加剧而增加,sn-2位羟基的空间与活性中心结合机会增大,造成sn-1,3位选择性减弱。在微波对脂肪酶sn-1,3位选择性影响的研究中,各种脂肪酶对TAG和FFA的选择性与在传统的加热条件下相一致^[47]。而这些研究中,没有排除酰基迁移在位置脂肪酸变化分析中的影响,故微波可能也是酰基迁移一个潜在影响因素。此外,反应器类型也影响酰基迁移的程度和副产物的形成。半工业规模填充床反应器和搅拌釜反应器相比,填充床反应器可显著减少酰基迁移^[18]。

3 结 语

酰基迁移除了在脂肪酶催化的酯交换反应过程中,受水分活度、时间、温度、酶量、反应器类型、反应体系等因素影响,在常规蒸馏纯化特定 SLs 的过程中也观察到酰基迁移。阐明酶催化合成到纯化 SLs 产物全过程的酰基迁移情况,对于优化反应条件、控制酰基迁移是很有必要的。

现阶段,对酰基迁移的研究主要在酶促反应水平上,机理尚不深入,类型多是醇解反应中的分析。酶存在的反应体系中,酰基迁移在分子水平上的反应进程和酶催化反应进程可能涉及独立的机理;且不同条件下得到的结论并不一致,甚至矛盾;此外,优化酶促酸解条件的过程中,提高接入率、产率往往和减少酰基迁移是不可兼得的矛盾关系。因此,深入酰基迁移机理从而控制酰基迁移程度,对脂肪酶催化制备 SLs 的工业化生产具有重要意义。除了对酰基迁移情况的探究,还需进一步深入研究酯交换、水解和随机化速率的影响因素及其机理,以期更高效地开发特殊用途的 SLs 产品。

参考文献:

- [1] SHIN J A, AKOH C C, LEE K T. Production and physicochemical properties of functional - butter fat through enzymatic interesterification in a continuous reactor[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 888 - 900.
- [2] JALA R C R, KUMAR C G. Designer and functional food lipids in dietary regimes: current trends and future prospects [M]//HOLBAN A M, GRUMEZESCU A M. Handbook of food bioengineering: alternative and replacement foods. Amsterdam: Elsevier, 2018: 283 - 316.
- [3] CHENOG L, GUO Z, FEDOSOV S N, et al. Enzymes as biocatalysts for lipid - based bio - products processing [M]//DUNFORD N T. Food and industrial bioproducts and bioprocessing. Hoboken: Wiley, 2012: 333 - 358.
- [4] SANDOVAL G. Methods in molecular biology: lipases and phospholipases [M]. New York: Humana Press, 2012: 403 - 433.
- [5] MATORI M, ASAHARA T, OTO Y. Positional specificity of microbial lipases[J]. J Ferment Bioeng, 1991, 72(5): 397 - 398.
- [6] XU X B, MU H, SKANDS A R H, et al. Parameters affecting diacylglycerol formation during the production of specific - structured lipids by lipase - catalyzed interesterification[J]. J Am Oil Chem Soc, 1999, 76: 175 - 181.
- [7] LI W, LI R W, LI Q A, et al. Acyl migration and kinetics study of 1(3) - positional specific lipase of *Rhizopus oryzae* - catalyzed methanolysis of triglyceride for biodiesel production[J]. Process Biochem, 2010, 45(12): 1888 - 1893.
- [8] LASZLO J A, COMPTON D L, VERMILLION K E. Acyl migration kinetics of vegetable oil 1, 2 - diacylglycerols [J]. J Am Oil Chem Soc, 2008, 85(4): 307 - 312.
- [9] MARTINELLE M, HULT K. Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida antarctica* lipase B[J]. BBA - Protein Struct M, 1995, 1251(2): 191 - 197.
- [10] JOSEPH B, RAMTEKE P W, THOMAS G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments [J]. Biotechnol Adv, 2008, 26(5): 457 - 470.
- [11] MAO J Y, HU Z Y, HU J N, et al. A density functional theory (DFT) study of the acyl migration occurring during lipase - catalyzed transesterifications[J]. Int J Mol Sci, 2019; 20(14): 3438[2020 - 05 - 18]. <https://doi.org/10.3390/ijms20143438>.
- [12] SUBROTO E, WISAMPUTRI M F, SUPRIYANTO, et al. Enzymatic and chemical synthesis of high mono - and diacylglycerol from palm stearin and olein blend at different type of reactor stirrers[J]. J Saudi Soc Agric Sci, 2020, 19(1): 31 - 36.
- [13] BASHEER S, MOGI K, NAKAJIMA M. Interesterification kinetics of triglycerides and fatty acids with modified lipase inn - hexane[J]. J Am Oil Chem Soc, 1995, 72: 511 - 518.
- [14] PAEZ B, ROBLES A, CAMACHO F, et al. Kinetics of lipase - catalysed interesterification of triolein and caprylic acid to produce structured lipids [J]. J Chem Technol Biot, 2003, 78: 461 - 470.
- [15] YANG T, FRUEKILDE M, XU X. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming [J]. Food Chem, 2005, 92(1): 101 - 107.
- [16] YAMAMOTO Y, YOSHIDA H, NAGAI T, et al. Preparation of chiral triacylglycerols, sn - POO and sn - OOP, via lipase - mediated acidolysis reaction [J]. J Oleo Sci, 2018, 67(2): 207 - 214.
- [17] WANG X, JIANG C, XU W, et al. Enzymatic synthesis of structured triacylglycerols rich in 1, 3 - dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol and 1 - oleoyl - 2 - palmitoyl - 3 - linoleoylglycerol in a solvent - free system [J]. LWT - Food Sci Technol, 2020, 118: 108798.
- [18] MU H L, KURVINEN J P, KALLIO H, et al. Quantitation of acyl migration during lipase - catalyzed acidolysis and of the regioisomers of structured triacylglycerols formed [J]. J Am Oil Chem Soc, 2001, 78(9): 959 - 964.
- [19] ZOU X, YE L, HE X, et al. Preparation of DHA rich medium and long chain triacylglycerols by lipase - catalyzed acidolysis of microbial oil from *Schizochytrium*

- sp. with medium - chain fatty acids[J]. *Biotechnol Appl Bioc*, 2020, 107: 121 - 130.
- [20] HE Y, QIU C, GUO Z, et al. Production of new human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis of microalgae oils from *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* [J]. *Bioresour Technol*, 2017, 238: 129 - 138.
- [21] 何勇锦. 藻油制备功能性油脂及其酶催化特性的研究[D]. 福州:福建师范大学, 2016.
- [22] 李人望. 溶剂和水活度对脂肪酶1,3-位置选择性和酰基迁移的影响研究[D]. 北京:清华大学, 2010.
- [23] 鲁珊, 黄健花, 王兴国. Lipozyme RM IM 催化棕榈油与甲醇醇解过程中酰基迁移的研究[J]. *中国油脂*, 2013, 38(1): 48 - 51.
- [24] 苏国忠. 中长链甘油三酯的制备及在人造奶油中的应用[D]. 辽宁 大连:大连理工大学, 2012.
- [25] PACHECO C, CRAPISTE G H, CARRIN M E. Study of acyl migration during enzymatic interesterification of liquid and fully hydrogenated soybean oil[J]. *J Mol Catal B - Enzym*, 2015, 122: 117 - 124.
- [26] DODSON G G, LAWSON D M. Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation [J]. *Faraday Discuss*, 1992, 93: 95 - 105.
- [27] 王子田, 苏剑晓, 杜伟, 等. Lipozyme TL IM 催化油酸酯化反应制备1,3-甘油二酯[J]. *高等学校化学学报*, 2015 (8): 1535 - 1541.
- [28] KODALI D R, TERCYAK K, FAHEY D A, et al. Acyl migration in 1,2 - dipalmitoyl - sn - glycerol[J]. *Chem Phys Lipids*, 1990, 52(3/4): 163 - 170.
- [29] XU X B, SKANDS A, HØY C, et al. Production of specific - structured lipids by enzymatic interesterification; elucidation of acyl migration by response surface design [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, 75: 1179 - 1186.
- [30] 范晓波, 孟宗, 陈琰, 等. 油酸与极度氢化大豆油酶促酸解过程中油酸位置分布规律研究[J]. *粮食与食品工业*, 2016, 23(2): 13 - 18.
- [31] FORESTI M, FERREIRA M. Lipase - catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium; analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2010, 46(6): 419 - 429.
- [32] KIM I, KIM H, LEE K, et al. Lipase - catalyzed acidolysis of perilla oil with caprylic acid to produce structured lipids [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2020, 79(4): 363 - 367.
- [33] LIU W R, LANGER R, KLIBANOV A M. Moisture - induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37(2): 177 - 184.
- [34] LI W, DU W, LI Q, et al. Study on acyl migration kinetics of partial glycerides; dependence on temperature and water activity[J]. *J Mol Catal B - Enzym*, 2010, 63(1/2): 17 - 22.
- [35] KROEGER A A, KARTON A. A computational investigation of the uncatalysed and water - catalysed acyl rearrangements in ingenol esters [J]. *J Austr Chem*, 2017, 71(4): 212 - 221.
- [36] 刘文强, 陈人萍, 刘旭峰, 等. 水分活度在共轭亚油酸结构脂制备中对酰基迁移的影响[J]. *食品科技*, 2016, 41(12): 1 - 7.
- [37] 肖乾煌, 徐雨茜, 熊华, 等. 溶剂和水分活度对 OPO 结构脂合成中酰基迁移的影响[J]. *中国油脂*, 2020, 45(3): 62 - 67.
- [38] SJURSENS B J, KVVITTINGEN L, ANTHONSEN T. Regioselective lipase - catalyzed transesterification of tributyrin: influence of salt hydrates on acyl migration [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1995, 72: 533 - 537.
- [39] RAY R C, ROSELL C M. *Microbial enzyme technology in food applications* [M]. New York: CRC Press, 2002: 357 - 386.
- [40] FUREBY A M. *Aspects on lipase - catalyzed preparation of partial acylglycerols* [D]. Sweden: Lund University, 1995.
- [41] 段章群. 生物酶法制备1,3-甘油二酯的研究[D]. 北京: 清华大学, 2010.
- [42] 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*, 2009, 101(7): 2568 - 2571.
- [43] WANG Z Y, LIU L H, LIU L B, et al. 1,3 - Dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol - rich triacylglycerol characterization by three processing methods[J]. *Int J Food Prop*, 2019, 22(1): 1156 - 1171.
- [44] BOSWINKEL G, DERKSEN J T P, TVAN' T RIET K, et al. Kinetics of acyl migration in monoacylglycerols and dependence on acyl chain - length [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1996, 73: 707 - 711.
- [45] 宋海东, 魏安池, 赵凯艳, 等. 影响酶催化制备类可司脂过程中酰基位移动和酯交换因素研究[J]. *粮食与油脂*, 2014 (2): 1 - 4.
- [46] MORE S B, WAGHMARE J S, GOGATE P R, et al. Improved synthesis of medium chain triacylglycerol catalyzed by lipase based on use of supercritical carbon dioxide pretreatment[J]. *Chem Eng J*, 2018, 334(15): 1977 - 1987.
- [47] YADAV G, LATHI P S. Synergism between microwave and enzyme catalysis in intensification of reactions and selectivities; transesterification of methyl acetoacetate with alcohols[J]. *J Mol Catal A - Chem*, 2004, 223: 51 - 56.