

酶 - 化学法羟基十八碳二烯脂肪酸玉米油的制备与测定

叶延鹏, 马天凤, 周昊, 蔡燕*, 朱西挺*

南通大学, 化学化工学院, 江苏 南通

收稿日期: 2022年1月22日; 录用日期: 2022年2月11日; 发布日期: 2022年2月18日

摘要

开发了一种绿色、温和的合成十八碳二烯脂肪酸玉米油的酶 - 化学方法。以大豆脂氧酶好氧催化氧化玉米油所得的氢过氧化玉米油为原料, 以乙醇/乙酸乙酯稀释氢过氧化玉米油酯, 与溶有亚硫酸钠水相混合, 还原得到十八碳二烯脂肪酸甘油酯。考察了溶剂浓度、还原剂用量、温度、时间对氢过氧化玉米油还原产率的影响。最佳工艺条件为: 15°C, 以90% (V/V体系)的乙醇为溶剂, $n(\text{Na}_2\text{SO}_3):n(-\text{OOH}) = 1.2:1$ 、反应1.5 h, 氢过氧化大豆油的转化率达91%。

关键词

脂氧合酶, 羟基十八碳二烯脂肪酸甘油酯, 还原, 两相, 油脂

Preparation and Determination of Hydroxyoctadecadiene Fatty Acid Glycerides by Enzymatic Chemical Method

Yanpeng Ye, Tianfeng Ma, Hao Zhou, Yan Cai*, Xiting Zhu*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

Received: Jan. 22nd, 2022; accepted: Feb. 11th, 2022; published: Feb. 18th, 2022

Abstract

A green and mild enzymatic chemical method for the synthesis of octadecadiene fatty acid corn oil was developed. The hydroperoxide obtained by aerobic catalytic oxidation of corn oil by soybean

*通讯作者。

文章引用: 叶延鹏, 马天凤, 周昊, 蔡燕, 朱西挺. 酶 - 化学法羟基十八碳二烯脂肪酸玉米油的制备与测定[J]. 分析化学进展, 2022, 12(1): 19-25. DOI: 10.12677/aac.2022.121003

lipoxygenase was used as raw material. Corn oil hydroperoxide was diluted with ethanol/ethyl acetate and mixed with water dissolved in sodium sulfite to obtain octadecadiene fatty acid glyceride. Then sodium sulfite was dissolved in aqueous phase, the corn oil hydroperoxide was diluted with ethyl acetate/ethanol, and the octadecadiene fatty acid glyceride was obtained by reduction reaction. The effects of solvent concentration, reductant dosage, temperature and time on the reduction yield of hydroperoxide corn oil were investigated. The optimum process conditions were as follows: 15°C, 90% (V/V system) ethanol as solvent, $n(\text{Na}_2\text{SO}_3):n(-\text{OOH}) = 1.2:1$, reaction for 1.5 h, and the conversion of soybean oil hydroperoxide reached 91%.

Keywords

Lipoxygenase, Hydroxyoctadecadiene Fatty Acid Glyceride, Reduction, Two-Phase, Oil

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

大豆脂肪氧合酶属氧化还原性酶，分布广，廉价易得。它能催化氧化含 cis, cis-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸及其酯得到氢过氧化衍生物，在风味物质、药物、洗涤剂、涂料、增塑剂等的合成中可作为重要的中间体[1] [2]。LOX 采用可再生的油脂资源为底物，其酶催化作用将植物油脂转化为具高附加值的产品，可以减小对石油产品的依赖，在能源短缺的今天有重要的工业意义，是值得不懈努力研究的目标。

目前对 LOX 下游产品的开发主要分两个方向。一方面是开发设计出具有多烯结构的非天然底物，并基于该底物对 LOX 酶进行分子改造，合成具有特殊用途的物质[3] [4]。另一方面从已经开发成熟的优势底物亚油酸的产物氢过氧化亚油酸出发，经去氢得到具共轭三键的桐油类脂肪酸，或经 Diels-Alder 反应生成二聚酸等[5] [6] [7]。作者前期开发了一条利用脱脂豆粕高效率合成氢过氧化油脂的工艺[8]，考虑到天然的羟基酸油脂只有蓖麻油，远满足不了市场需求，若将氢过氧化油脂进一步还原制得具有蓖麻油结构的羟基油脂，将非常有前景。

本章用亚硫酸钠还原氢过氧化玉米油制备羟基玉米油，考察了溶剂种类、浓度、还原剂用量、反应温度、时间等因素对还原反应的影响，得到一条酶-化学法绿色制备羟基十八碳二烯脂肪酸玉米油的工艺(见图 1)。

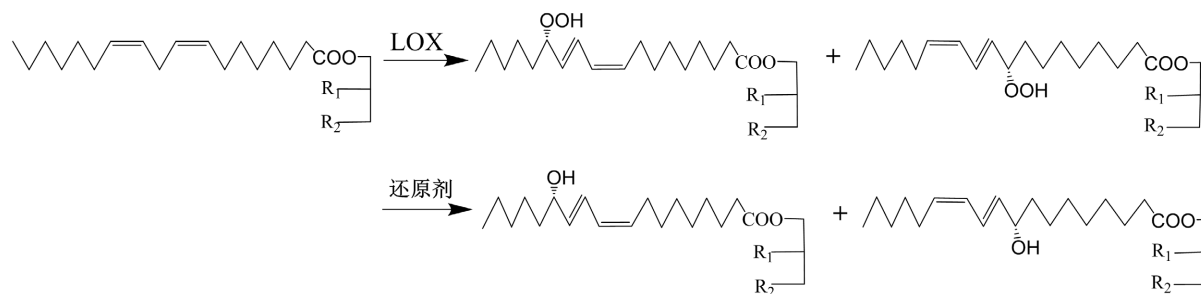


Figure 1. Preparation of hydroxy octadecadiene fatty acid glycerides by enzymatic-chemical method

图 1. 酶-化学法制备羟基十八碳二烯脂肪酸甘油酯

2. 实验部分

2.1. 实验试剂与材料

大豆(东北吉林),玉米油(购于本地大润发超市);二甲酚橙(AR,上海试剂三厂);过氧化氢异丙苯(80%,Sigma);硼酸,硼砂,硫酸铵,氯化钠,氢氧化钠,氢氧化钾,亚硫酸钠,三氟化硼,酚酞,2,6-叔丁基-4-甲基酚(BHT),邻苯二甲酸氢钾(基准试剂),浓硫酸(98%),盐酸,乙醚,无水乙醇,甲醇,乙酸乙酯,正己烷,石油醚(60°C~90°C),*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),均为AR级(国药集团化学试剂有限公司)。

Shimadzu GC-2010 气相色谱检测器;多功能食品粉碎机(SQ2130D,上海帅佳电子);紫外可见分光光度计(TU-1901,北京普析通用);离心机(LD4-2,北京医用离心机厂)。

2.2. 油脂组分分析

在 55°C 水浴中,将 1 滴油脂溶解于 2 mL NaOH 甲醇溶液(0.5 mol/L),皂化 30 min。静置冷却后,加入硫酸酸化,萃取出脂肪酸层洗至中性。将脂肪酸层与 2 mL 三氟化硼-甲醇溶液煮沸 5 min,冷却后加入 1 mL 石油醚(60°C~90°C)和饱和氯化钠溶液震荡片刻,静置分层,用注射器抽出醚层作 GC 分析(SrAdv 色谱工作站,PEG 20 M 极性毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.5 μm))。

2.3. 油脂酸价、皂化值分析

分别参照 GB/T5530-2005 测定玉米油的酸值[9],GB/T5534-1995 测定皂化值[10]。

2.4. LOX 酶催化制备氢过氧化油脂

参照文献[7]方法制备。

2.5. 薄层色谱分离氢过氧化油脂粗产物

展开剂 A 组成为甲苯:乙酸乙酯:乙醚:乙酸(75:13:10:1.2),展开剂 B 组成为正己烷:乙醚:甲酸(64:16:2)。取活化好的硅胶 G 板,用笔记下起始和终止的位置,用定容毛细管取试样点于薄板上,待溶剂挥发后,放入盛有展开剂 A 的玻璃密闭展开槽中,待溶剂行至 4 cm 处,取出薄层板晾干,再放入另一有展开剂 B 的玻璃槽中。展开剂行至终止处取出。待薄层展开剂挥发后,用碘显色,可见展开的氢过氧化油脂产物和反应物玉米油两点。用乙醚溶解收集的氢过氧化油脂的点,多次萃取分离后得到产物。

2.6. 亚硫酸钠还原氢过氧化油脂

称取 0.5 g 氢过氧化玉米油置于 50 mL 反应瓶中,加入适量有机溶剂溶解,边搅拌边滴加一定量亚硫酸钠水溶液。密闭、恒温、搅拌状态下反应。反应结束加入乙醚萃取(每次 7 mL,萃取 3 次),合并萃取液。水洗、饱和食盐水洗萃取液,除去乙醚,得到还原产物。

2.7. 氢过氧化玉米油的含量分析

用二甲酚橙法测定产物中氢过氧化物的含量[11]。样品吸光度测量值与过氧化氢异丙苯标准曲线对照求得氢过氧化物的摩尔量,并计算出氢过氧化物的得率。所有单因素分析的实验点相对误差在 2% 以内。

氢过氧化玉米油产率的计算公式(1)如下:

$$\text{Yield}(\%) = \frac{nM_{\text{玉米油}}}{3W_{\text{玉米油}} \times 49.6} \times 100\% \quad (1)$$

式中 $M_{\text{玉米油}}$ 为 878。 W 代表氢过氧化物粗产品的质量。式(1)中的 3 代表每摩尔玉米油分子中含 3 摩尔脂肪酸。

3. 结果与讨论

3.1. 玉米油组分和性质分析

采用气相色谱分析玉米油中各脂肪酸含量。由表 1 可知，玉米油中亚油酸的含量为 47.7%，还含有少许亚麻酸为 1.9%，则多不饱和油脂含量计 49.6%。玉米油的酸价、皂化值列于见表 2。根据各组分比例和皂化值、酸价计算得玉米油的平均分子量为 878。

Table 1. Components of corn oil

表 1. 玉米油组分表

%	油酸	亚油酸	亚麻酸	油酸	硬脂酸	棕榈酸
玉米油		47.7%	1.9%	30.0%	1.9%	18.5%

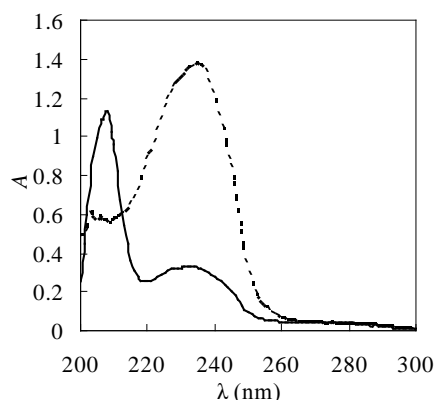
Table 2. The acid value and saponification value of the corn oil

表 2. 玉米油的酸价、皂化值

理化性质	酸价 mgKOH/g	皂化值 mgKOH/g
玉米油	0.191 ± 0.002	193.5 ± 0.7

3.2. 薄层色谱分离氢过氧化油脂粗产物

经二甲酚橙法分析氢过氧化油脂粗产物中氢过氧化玉米油含量为 29.8%。经薄层色谱两次展开后，得到初步纯化的氢过氧化玉米油，其含量为 82%。用紫外图谱分析玉米油和氢过氧化玉米油，如图 2 所示。玉米油中的非共轭双键在 202 nm 处有最大吸收，酶促反应生成的氢过氧化玉米油在 230 nm 左右有吸收峰，初步判断为新生成的共轭双键所形成的峰。



—玉米油 - - -氢过氧化玉米油。

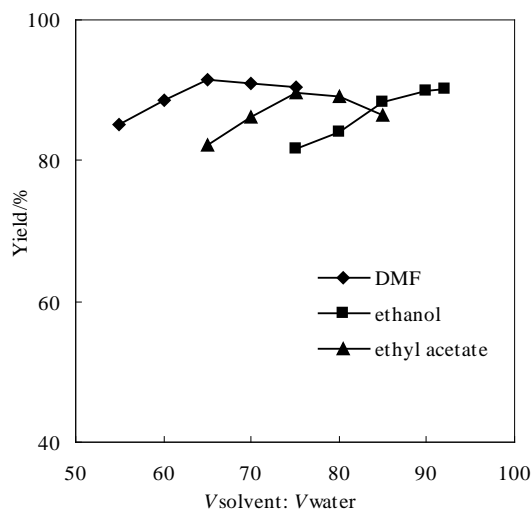
Figure 2. UV spectra of corn oil and its hydroperoxide

图 2. 玉米油及其过氧化物的紫外图谱

3.3. 溶剂效应

施金金等前期采用乙醇为溶剂还原氢过氧化亚油酸，成功高产率制备了羟基亚油酸。本文中的玉米油较亚油酸在乙醇中的溶解性差很多，因此要考虑溶剂效应，选择更为合适的溶剂。选择具有代表性的 DMF、乙醇和乙酸乙酯进行比较考察。结果如图 3 所示，DMF 体积达 65% 时，还原产率达 91.5%。乙醇

为溶剂时,其体积占 90%时,羟基十八碳二烯脂肪酸玉米油的产率达 89%。乙酸乙酯为溶剂时,体系为两相,当乙酸乙酯体积占 75%时,还原产率达 89.7%。三者中 DMF 具有最好的溶解性,但存在成本高、毒性大的缺点,所以进一步比较乙醇和乙酸乙酯两种溶剂的表现。

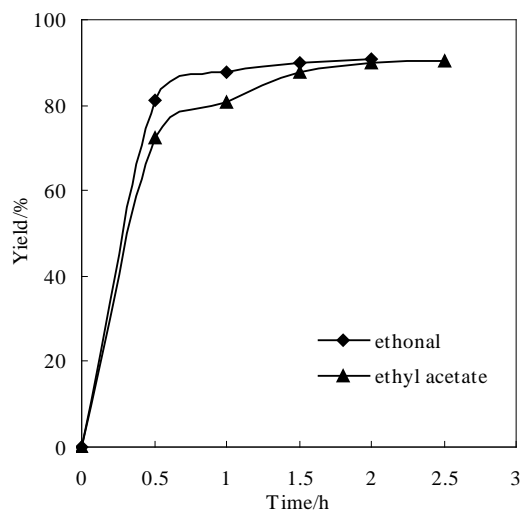


$n(-OOH):n(Na_2SO_3) = 1:1, 2\text{ h}, 10^\circ\text{C}$.

Figure 3. Effects of solvent type on the reducing reaction
图 3. 溶剂对还原反应的影响

3.4. 时间对还原反应的影响

考察在乙醇和乙酸乙酯两种溶剂体系中,羟基十八碳二烯脂肪酸玉米油还原反应的时间进程(如图 4 所示)。反应初期(30 min 以内),转化率随时间几乎成直线上升,乙醇体系的还原反应速度略高于乙酸乙酯体系的还原反应速度。推测是因为乙酸乙酯的两相体系传质速率没有乙醇体系快。乙醇/水体系在 1.5 h 时还原反应达到平衡,乙酸乙酯/水两相体系反应 2 h 后实现平衡,两者最终转化率接近,均达到 90%。

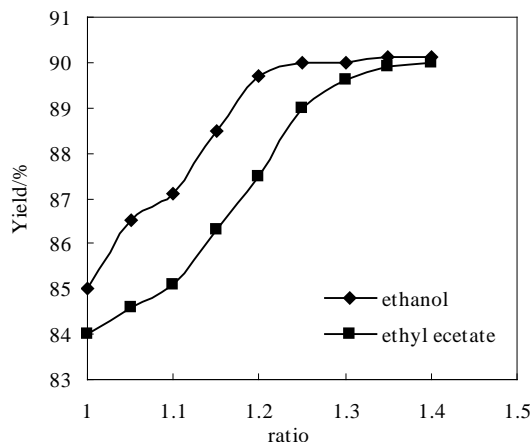


$n(-OOH):n(Na_2SO_3) = 1:1, 10^\circ\text{C}$

Figure 4. Effects of time on the reducing reaction
图 4. 时间对还原反应的影响

3.5. 亚硫酸钠用量对反应的影响

由图 5 可知, 还原剂亚硫酸钠用量对体系有着较大影响。当亚硫酸钠: 氢过氧化玉米油脂($n:n$) = 1.2 时, 乙醇/水体系的还原率达最高 90%。对乙酸乙酯/水体系, 还原剂用量为 1.35 时还原产率达最高。

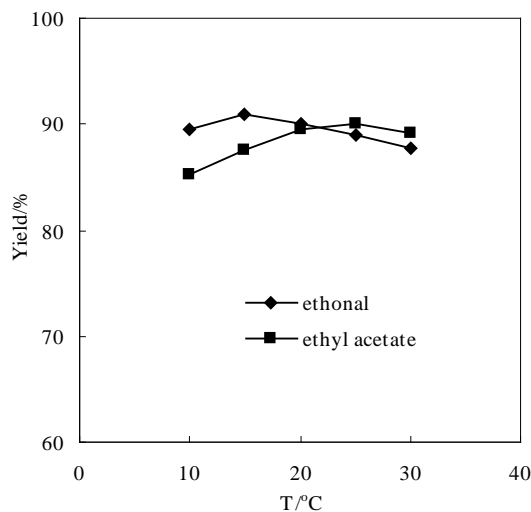


1.5 h, 10°C, 90% (v/v) 乙醇; 2 h, 10°C, 75% (v/v) 乙酸乙酯

Figure 5. Effects of the dosage of Na_2SO_3 on the reducing reaction
图 5. 亚硫酸钠用量对还原反应的影响

3.6. 温度对还原反应的影响

考察 10°C~30°C 下温度对还原体系的影响, 如图 6 所示。对于乙醇/水体系, 温度为 15°C 时体系还原产率达最高 91%。但在乙酸乙酯/水体系中, 温度为 25°C 时还原产率才达到最大值为 90%。温度可以影响体系的传质, 温度越高, 传质效果越好。对乙酸乙酯/水双相体系, 对传质的要求更高, 所以最优温度也相对较高。虽然乙酸乙酯/水体系使用的溶剂量较少, 但还原剂用量、温度时间成本却都提高了, 而且乙酸乙酯没有乙醇绿色环保, 综合考虑采用乙醇体系更为合适。



1.5 h, $n(-\text{OOH}):n(\text{Na}_2\text{SO}_3) = 1:1.2$, 90% (v/v) 乙醇; 2 h, $n(-\text{OOH}):n(\text{Na}_2\text{SO}_3) = 1:1.35$, 75% (v/v) 乙酸乙酯

Figure 6. Effects of the temperature on the reducing reaction
图 6. 温度对反应的影响

4. 结论

以大豆脂氧酶好氧催化氧化玉米油所得的氢过氧化玉米油为原料, 然后将亚硫酸钠溶于水相, 以乙酸乙酯/乙醇稀释氢过氧化玉米油酯, 进行还原反应得到十八碳二烯脂肪酸甘油酯。考察了溶剂、时间、温度及还原剂亚硫酸钠用量对还原产率的影响。对于乙醇/水体系, 乙醇为溶剂, 其体积占 90% 时, 反应 1.5 h, $n(\text{Na}_2\text{SO}_3):n(-\text{OOH}) = 1.2:1$ 时, 羟基十八碳二烯脂肪酸玉米油的产率达 91%。对乙酸乙酯/水双相体系, 当乙酸乙酯体积占 75% 时, 反应 2 h, $n(\text{Na}_2\text{SO}_3):n(-\text{OOH}) = 1.35:1$, 25 °C 下, 羟基十八碳二烯脂肪酸玉米油的产率达 90%。

参考文献

- [1] Malik, A.S., Boyko, O., Atkar, N. and Young, W.F. (2001) A Comparative Study of MR Imaging Profile of Titanium Pedicle Screws. *Acta Radiologica*, **42**, 291-293. <https://doi.org/10.1080/028418501127346846>
- [2] Marczy, J.S., Nemeth, A.S., Samu, Z., *et al.* (2002) Production of Hexanal from Hydrolyzed Sunflower Oil by Lipoxigenase and Hydroperoxide Lyase Enzymes. *Biotechnology Letters*, **24**, 1673-1675. <https://doi.org/10.1023/A:1020657618363>
- [3] Noordermeer, M.A., Goot, W., Kooij, A.J., *et al.* (2002) Development of a Biocatalytic Process for the Production of C6-Alde Hydes from Vegetable Oils by Soybean Lipoxigenase and Recombinant Hydroperoxide Lyase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4270-4274. <https://doi.org/10.1021/jf0202685>
- [4] Kim, T., Lee, J., Kim, S., *et al.* (2021) Biocatalytic Synthesis of Dihydroxy Fatty Acids as Lipid Mediators from Polyunsaturated Fatty Acids by Double Dioxygenation of the Microbial 12S-Lipoxigenase. *Biotechnology and Bioengineering*, **118**, 3094-3104. <https://doi.org/10.1002/bit.27820>
- [5] Freedman, J., Tran, A., Tourdot, B.E., *et al.* (2020) Biosynthesis of the Maresin Intermediate, 13S,14S-Epoxy-DHA, by 15-Lipoxigenase and 12-Lipoxigenase and Its Regulation through Negative Allosteric Modulators. *Biochemistry*, **59**, 1832-1844. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00233>
- [6] Clapp, C.H., Pachuski, J., Bassett, N.F., *et al.* (2018) N-Linoleoylamino Acids as Chiral Probes of Substrate Binding by Soybean Lipoxigenase-1. *Bioorganic Chemistry*, **78**, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.03.010>
- [7] Lee, J., An, J., Kim, T., *et al.* (2020) Discovery and Engineering of a Microbial Double-Oxygenating Lipoxigenase for Synthesis of Dihydroxy Fatty Acids as Specialized Proresolving Mediators. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **8**, 16172-16183. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c04793>
- [8] Cai, Y., Liu, Y.J., Xu, H., *et al.* (2011) Soymeal-Catalyzed Facile and Economic Bioproduction of Soybean Oil Hydroperoxide. *Biocatalysis and Biotransformation*, **29**, 31-36. <https://doi.org/10.3109/10242422.2010.550001>
- [9] 中华人民共和国国家标准. GB/T5530-2005 动植物油脂酸值和酸度测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [10] 中华人民共和国国家标准. GB/T5534-1995 动植物油脂皂化值的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
- [11] Gay, C., Collins, J. and Gebicki, J.M. (1999) Hydroperoxide Assay with the Ferri-Xylenol Orange Complex. *Analytical Biochemistry*, **273**, 149-155. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4208>