

瓜蒌籽甘油二酯油的酶法甘油解制备研究

周子旋, 苏菁菁, 韩艳萍, 丁晓凡, 江 濛, 王 莉, 薛秀恒

(安徽农业大学 食品与营养学院, 合肥 230036)

摘要: 为了优化瓜蒌籽甘油二酯(DAG)油制备工艺,提高DAG工业化产量,以脂肪酶为催化剂,采用酶法甘油解法制备瓜蒌籽DAG油,通过单因素试验探究了反应时间、脂肪酶添加量、醇油质量比对DAG含量的影响,通过响应面法优化反应条件,并对酶法甘油解反应前后瓜蒌籽油的脂质组成、脂肪酸组成和基本理化指标进行分析。结果表明:瓜蒌籽DAG油最佳制备条件为反应时间12.5 h、醇油质量比1:10、脂肪酶添加量6.5% (以醇油总质量计),该条件下所得瓜蒌籽DAG油的DAG含量为60.60%,其中1,3-DAG含量为45.97%,1,2-DAG含量为14.63%;与酶法甘油解反应前比较,瓜蒌籽DAG油的主要脂肪酸组成并没有改变,但酸值上升,碘值和皂化值下降。综上,采用酶法甘油解法可生产出DAG含量较高的瓜蒌籽DAG油。

关键词: 瓜蒌籽油;甘油二酯;酶法甘油解法

中图分类号:TS222+.1;TS224.8 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)01-0038-05

Preparation of diacylglycerol from *Trichosanthes kirilowii* seed oil by enzymatic glycerolysis

ZHOU Zixuan, SU Jingjing, HAN Yanping, DING Xiaofan,
JIANG Meng, WANG Li, XUE Xiuheng

(College of Food and Nutrition, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to optimize the preparation process of *Trichosanthes kirilowii* seed diglycerides (DAG) oil and improve the industrial yield of DAG, enzymatic glycerolysis method was used to prepare *Trichosanthes kirilowii* seed DAG oil with lipase as catalyst. The effects of reaction time, enzyme addition amount and glycerol to oil mass ratio on the content of DAG were investigated through single factor test. The reaction conditions were optimized by response surface methodology. The lipid composition, fatty acid composition and basic physicochemical indexes of *Trichosanthes kirilowii* oil before and after enzymatic glycerolysis were analyzed. The results showed that the optimal preparation conditions were reaction time 12.5 h, glycerol to oil mass ratio 1:10 and enzyme addition amount 6.5% (base on the total mass of glycerol and oil). The DAG content of *Trichosanthes kirilowii* seed DAG oil was 60.60% under these conditions, in which 1,3-DAG content was 45.97% and 1,2-DAG content was 14.63%. Compared with *Trichosanthes kirilowii* seed oil, the main fatty acid composition of *Trichosanthes kirilowii* seed DAG oil did not change, but the acid value increased, while the iodine value and saponification value decreased. In conclusion, *Trichosanthes kirilowii* seed DAG oil with high DAG content can be produced by enzymatic glycerolysis method.

Key words: *Trichosanthes kirilowii* seed oil; diglycerides; enzymatic glycerolysis

收稿日期:2023-07-31;修回日期:2024-07-26

基金项目:安徽省农业农村厅产业竞争力提升科技行动项目(AHCYJSTX-07-202003);安徽农业大学神农新秀项目(rc352102);安徽农业大学大学生创新项目(X202210364098)

作者简介:周子旋(1999),女,硕士研究生,研究方向为生物与医药(E-mail)1175708748@qq.com。

通信作者:薛秀恒,教授(E-mail)xuexiuheng@126.com。

瓜蒌籽是葫芦科植物栝楼的干燥成熟种子,具有清热解毒、利水消肿等功效。瓜蒌籽含油量丰富,约为50%^[1]。瓜蒌籽油具有浓郁的瓜蒌籽清香,保留了瓜蒌籽绝大多数营养物质,其脂肪酸主要有19

种,其中不饱和脂肪酸含量占总脂肪酸含量的65%以上^[1],主要以亚油酸、油酸为主,而瓜蒌籽油特有的共轭亚麻酸——瓜蒌酸,具有抗癌、减少内脏脂肪和体脂的作用^[2]。

甘油二酯(DAG)是众所周知的安全食品成分,是天然油脂中的微量成分,有1,2-DAG、1,3-DAG 2种异构体,其中1,2-DAG的消化代谢通路与甘油三酯(TAG)相似,而1,3-DAG的消化代谢通路与TAG不同,膳食DAG具有降低肝脏脂肪、抑制体质量增长等作用^[3-4]。以瓜蒌籽油为原料制备瓜蒌籽DAG油,不仅可使瓜蒌籽油具备DAG的功能特性还能保留瓜蒌籽油原有的脂肪酸组成,从而生产出一款功能性油脂,既可供肥胖及“三高”人士食用^[5],又能丰富瓜蒌产品种类,拓宽瓜蒌市场。但目前,我国关于DAG的研究还缺乏突破性进展,其工业化生产仍面临着成本高的问题^[6]。

目前,DAG的制备方法主要有化学法和生物酶法。其中:化学法过程烦琐、能耗大、污染严重,且所得产品品质差^[7];生物酶法具有反应条件温和、转化率高和产品纯度高的优点,近年来引起了广泛关注^[8]。生物酶法一般通过固定化的方法使酶更加稳定,以便重复利用,降低成本。常用的生物酶法主要是水解法、酯化法和甘油解法,其中,甘油解法是指在催化剂作用下,甘油与脂肪酸酯通过酯交换生成DAG,由于操作简单、成本较低,近年来被作为生产DAG的常用方法之一。张秀秀等^[9]以葵花籽油为原料,采用酶法甘油解法制备富含亚油酸的DAG,最佳条件下DAG含量可达到49.21%。

本文通过酶法甘油解法制备瓜蒌籽DAG油,通过单因素试验和响应面法优化反应条件,并对反应前后瓜蒌籽油脂质组成、脂肪酸组成以及基本理化指标进行分析,以期为提高DAG工业化产量,满足人们对功能性DAG的需求提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

瓜蒌籽油,吉安海瑞天然植物有限公司;Novozym 435 脂肪酶,上海源叶生物科技有限公司;甘油,山东中玺生物科技有限公司;乙酸、正己烷,色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

JA2103 电子天平、HJ-4B 数显恒温磁力搅拌器,金坛区西城新瑞仪器厂;Waters 1525 系列高效液相色谱仪、Waters 2414 示差检测器,美国 Waters 公司;7890B 气相色谱仪,美国 Agilent 公司;IKAT25 高速分散器,德国 IKA 科技有限公司;HH-S 恒温水浴锅,江苏国胜实验仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 瓜蒌籽 DAG 油的制备

参照蒋羽鸽等^[10]的方法并稍作修改。取5g瓜蒌籽油于50 mL 容器中,于85℃下灭菌、灭酶10 min后,加入一定量的甘油,用高速均质机充分混合均匀,再加入一定量的Novozym 435 脂肪酶,置于53℃恒温振荡摇床内反应一定时间后,5 000 r/min 离心5 min,取上层油样,在85℃下加热10 min使残留的脂肪酶失活,得到瓜蒌籽DAG油。

1.2.2 TAG、甘油一酯(MAG)、DAG 含量的测定

取适量油样和液相色谱流动相充分混匀,过0.25 μm 有机系滤膜,置于液相瓶中待检测。色谱条件:Waters 1525 系列高效液相色谱仪;菲罗门硅胶色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙酸-正己烷-异丙醇(体积比1:2 000:100),流速1 mL/min;等度洗脱;柱温箱温度35℃;Waters 2414 示差检测器,检测器温度30℃;进样量10 μL。

根据标准品保留时间进行定性,采用峰面积归一化法进行定量。

1.2.3 脂肪酸组成及含量测定

参照GB 5009.168—2016对样品的脂肪酸组成及含量进行测定。色谱条件:DB-5 毛细管色谱柱(50 m × 0.25 mm × 0.25 μm);载气为高纯度氦气;分流比1:80;进样量1.0 μL;进样口温度250℃,检测器温度280℃;升温程序为初始温度100℃,保持13 min,以10℃/min升至180℃,保持6 min,以1℃/min升至200℃,保持20 min,以4℃/min升至230℃,保持10.5 min。

1.2.4 理化指标的测定

分别参照GB 5009.229—2016、GB/T 5534—2008、GB/T 5532—2022测定样品酸值、皂化值及碘值。

1.2.5 数据处理与分析

采用Excel和SPSS软件进行数据处理分析,采用Origin绘图。

2 结果与分析

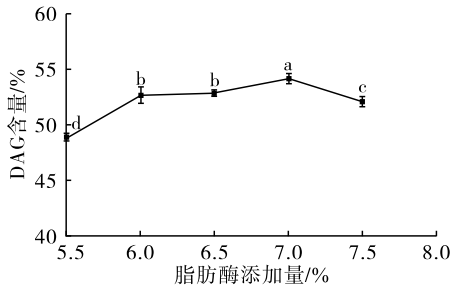
2.1 瓜蒌籽 DAG 油制备的单因素试验

2.1.1 脂肪酶添加量对 DAG 含量的影响

在醇油(甘油与瓜蒌籽油)质量比1:10、反应时间12 h的条件下,研究脂肪酶添加量(以醇油总质量计)对DAG含量的影响,结果如图1所示。

由图1可知,随着脂肪酶添加量的增加,DAG含量总体呈现上升趋势。其中,脂肪酶添加量为7%时,DAG含量最高。这主要是因为随脂肪酶添加量的增加,酶与底物充分接触,反应速率加快,进

而导致 DAG 含量增加^[11],故初步确定最佳脂肪酶添加量为 7%。



注:不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同

Note: Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

The same below

图1 脂肪酶添加量对 DAG 含量的影响

Fig. 1 Effect of lipase dosage on DAG content

2.1.2 醇油质量比对 DAG 含量的影响

在脂肪酶添加量 7%、反应时间 12 h 条件下,研究醇油质量比对 DAG 含量的影响,结果如图 2 所示。

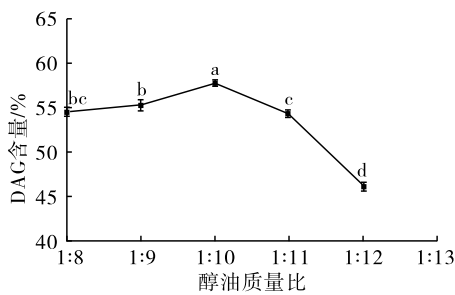


图2 醇油质量比对 DAG 含量的影响

Fig. 2 Effect of glycerol to oil mass ratio on DAG content

由图 2 可知,当醇油质量比在 1:8 ~ 1:12 之间时,DAG 含量呈现先增加后减少的趋势,醇油质量比为 1:10 时,DAG 含量最高。因此,初步确定最佳醇油质量比为 1:10。

2.1.3 反应时间对 DAG 含量的影响

在脂肪酶添加量 7%、醇油质量比 1:10 条件下,研究反应时间对 DAG 含量的影响,结果如图 3 所示。

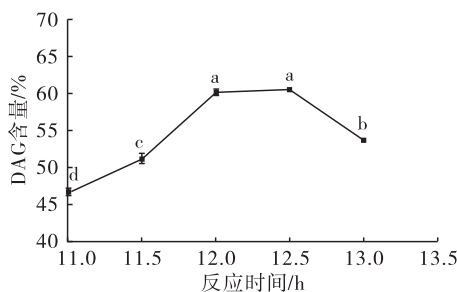


图3 反应时间对 DAG 含量的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on DAG content

由图 3 可知,随着反应时间的延长,DAG 含量先增加后降低。反应时间过长,DAG 的生成速率低于分解速率,且脂肪酶的结构也可能发生改变,导致酶活性降低^[12],最终导致 DAG 含量降低。因此,初步确定最佳反应时间为 12.5 h。

2.2 瓜蒌籽 DAG 油制备的响应面优化试验

在单因素试验基础上,以反应时间(A)、脂肪酶添加量(B)、醇油质量比(C)为自变量^[13],以 DAG 含量(Y)为响应值设计响应面试验。响应面试验因素与水平如表 1 所示,响应面试验设计及结果如表 2 所示。

表1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface test

水平	A 反应时间/h	B 脂肪酶添加量/%	C 醇油质量比
-1	11.5	6.0	1:9
0	12.0	6.5	1:10
1	12.5	7.0	1:11

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results

试验号	A	B	C	DAG 含量/%
1	-1	-1	0	50.60
2	1	-1	0	53.60
3	-1	1	0	53.67
4	1	1	0	52.40
5	-1	0	-1	51.93
6	1	0	-1	55.47
7	-1	0	1	54.00
8	1	0	1	52.73
9	0	-1	-1	53.53
10	0	1	-1	53.67
11	0	-1	1	51.87
12	0	1	1	54.00
13	0	0	0	58.70
14	0	0	0	58.60
15	0	0	0	58.20
16	0	0	0	60.80
17	0	0	0	59.30

利用 Design Expert 软件对表 2 试验结果进行多元回归拟合分析,得到 DAG 含量的二次多元回归方程: $Y = 59.120 + 0.500A + 0.517B - 0.250C - 1.067AB - 1.202AC + 0.497BC - 3.144A^2 - 3.409B^2 - 2.444C^2$ 。

对回归模型进行方差分析,结果见表 3。

由表 3 可知,回归模型 p 值小于 0.01,极显著,失拟项 p 值大于 0.05,不显著,说明回归方程在整个回归区域的拟合情况良好,模型成立,可以用于瓜蒌籽 DAG 油制备工艺的优化。各因素对 DAG 含量的影响大小依次为脂肪酶添加量(B) > 反应时间(A) > 醇油质量比(C)。交互项 AB、AC 对 DAG 含

量的影响显著($p < 0.05$),二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对 DAG 含量的影响极显著($p < 0.01$),一次项 A 、 B 、 C 及交互项 BC 对 DAG 含量无显著影响($p > 0.05$)。由此可以说明,各试验因素与响应值之间不是简单的线性关系。

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	F	p
模型	144.92	9	26.47	0.000 1 **
A	2.00	1	3.29	0.112 7
B	2.14	1	3.52	0.102 7
C	0.50	1	0.82	0.394 8
AB	4.56	1	7.49	0.029 0 *
AC	5.78	1	9.51	0.017 7 *
BC	0.99	1	1.63	0.242 8
A^2	41.61	1	68.40	<0.000 1 **
B^2	48.92	1	80.41	<0.000 1 **
C^2	25.14	1	41.33	0.000 4 **
残差	4.26	7		
失拟项	0.11	3	0.04	0.989 7
纯误差	4.15	4		
总和	149.18	16		

注: * 表示差异显著($p < 0.05$); ** 表示差异极显著($p < 0.01$)

Note: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

通过响应面优化得到瓜蒌籽 DAG 油制备的最佳工艺条件为反应时间 12.041 h、脂肪酶添加量 6.529%、醇油质量比 1:9.934,在此条件下瓜蒌籽 DAG 油中 DAG 含量理论预测值为 59.163%。考虑到实际情况,将瓜蒌籽 DAG 油的最佳制备工艺条件调整为反应时间 12.5 h、脂肪酶添加量 6.5%、醇油质量比 1:10,在此条件下经过 3 次验证试验,测得瓜蒌籽 DAG 油中 DAG 含量为 60.60%,与理论预测值相差不大,表明该模型的预测效果良好。

2.3 瓜蒌籽油酶法甘油解反应前后的脂质组成对比

瓜蒌籽油和最佳条件下制备的瓜蒌籽 DAG 油的脂质组成如表 4 所示。

表 4 瓜蒌籽油及其 DAG 油的脂质组成

Table 4 Lipid composition of *Trichosanthes*

脂质	瓜蒌籽油	瓜蒌籽 DAG 油
TAG	97.87	37.45
MAG	2.13	1.95
1,3-DAG	-	45.97
1,2-DAG	-	14.63

注: - 表示未检出。下同

Note: -. Not detected. The same below

由表 4 可知:瓜蒌籽油的脂质组成主要为 TAG;瓜蒌籽 DAG 油中 DAG 含量可达到 60.6%,其中 1,3-DAG 含量为 45.97%,1,2-DAG 含量为 14.63%。

2.4 瓜蒌籽油酶法甘油解反应前后的脂肪酸组成对比

瓜蒌籽油和最佳条件下制备的瓜蒌籽 DAG 油的脂肪酸组成及相对含量如表 5 所示。

表 5 瓜蒌籽油及其 DAG 油脂肪酸组成及相对含量

Table 5 Composition and relative contents of fatty acids of *Trichosanthes kirilowii* seed

脂肪酸	瓜蒌籽油	瓜蒌籽 DAG 油
棕榈酸 C16:0	8.03	8.83
亚油酸 C18:2	43.45	45.07
油酸 C18:1	40.52	39.00
硬脂酸 C18:0	6.19	5.87
山嵛酸 C22:0	0.14	0.09
瓜蒌酸 9c,11t,13c-C18:3	1.67	0.97
花生酸 C20:0	-	0.17

由表 5 可知:瓜蒌籽油亚油酸含量最高,其次为油酸,二者分别占总脂肪酸含量的 43.45% 和 40.52%,瓜蒌籽油中也检测出特有的瓜蒌酸,瓜蒌酸能够改善血液黏稠度,预防心脑血管疾病^[14-15],但本文原料瓜蒌籽油中检出的瓜蒌酸含量远低于许晓兰等^[2]报道的 22.57%~37.47%,具体原因有待进一步分析。经酶法甘油解反应后,瓜蒌籽 DAG 油中亚油酸相对含量较瓜蒌籽油升高,而油酸相对含量降低,另外,检出反应前未检测出的花生酸,可能是反应促使花生酸的产生。综上,酶法甘油解反应前后瓜蒌籽油的主要脂肪酸组成无变化,瓜蒌籽油特殊的脂肪酸构成赋予其更高的营养与研究价值,因此瓜蒌籽油在研发功能性保健食品及药品方面的市场潜力巨大。

2.5 瓜蒌籽油酶法甘油解反应前后的理化指标对比

瓜蒌籽油和最佳条件下制备的瓜蒌籽 DAG 油的理化指标如表 6 所示。

由表 6 可知,瓜蒌籽 DAG 油的酸值显著高于瓜蒌籽油,这是由于酶法甘油解反应产生了游离脂肪酸,导致酸值上升。瓜蒌籽 DAG 油的皂化值较瓜蒌籽油显著下降。瓜蒌籽 DAG 油的碘值较瓜蒌籽油显著下降,这是因为反应后不饱和脂肪酸含量下降(表 5)所致^[16]。

表 6 瓜蒌籽油及其 DAG 油的理化指标

Table 6 Physicochemical indexes of *Trichosanthes kirilowii* seed oil and its DAG oil

项目	瓜蒌籽油	瓜蒌籽 DAG 油
酸值(KOH)/(mg/g)	0.440 ± 0.031b	0.529 ± 0.026a
皂化值(KOH)/(mg/g)	193.280 ± 4.100a	181.430 ± 3.590b
碘值(I)/(g/100 g)	128.580 ± 0.480a	115.210 ± 0.320b

注:同行不同字母表示差异显著($p < 0.05$)

Note: Different letters in the same line indicate significant difference ($p < 0.05$)

3 结论

通过单因素试验和响应面试验优化得到瓜蒌籽 DAG 油最佳制备条件为反应时间 12.5 h、脂肪酶添加量 6.5%、醇油质量比 1:10,在此条件下瓜蒌籽 DAG 油中 DAG 含量为 60.60%,其中 1,3-DAG 含量达到 45.97%。与酶法甘油解前相比,瓜蒌籽 DAG 油的主要脂肪酸组成无明显变化,酸值显著上升,皂化值和碘值显著下降。综上,采用酶法甘油解法合成瓜蒌籽 DAG 油,可为瓜蒌籽在功能性食品上的开发与应用提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 李文娟,朱亮亮,李从虎,等.瓜蒌籽油成分、提取方法及功能特性的研究进展[J].中国油脂,2018,43(5):70-74.
- [2] 许晓兰,毕艳兰,王金梦,等.不同产地瓜蒌籽油组分分析[J].中国油脂,2018,43(12):122-125,133.
- [3] 金青哲,杜美军,杨云翀,等.甘油二酯油的代谢特性及营养价值[J].粮食与油脂,2023,36(5):40-43.
- [4] XIE M, DONG X, YU Y, et al. A novel method for detection of lipid oxidation in edible oil[J/OL]. LWT - Food Sci Technol, 2020, 123: 109068[2023-07-31]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109068>.
- [5] DIAO X, GUAN H, KONG B, et al. *In vitro* digestion of emulsified lard - based diacylglycerols[J]. J Sci Food Agric, 2021, 101(8): 3386-3393.
- [6] LEE W J, QIU C, LI J, et al. Sustainable oil - based ingredients with health benefits for food colloids and products[J]. Curr Opin Food Sci, 2022, 43: 82-90.
- [7] SATRIANA S, ARPI N, LUBIS Y M, et al. Diacylglycerol - enriched oil production using chemical glycerolysis[J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2016, 118(12): 1880-1890.
- [8] TING R R, AGAPAY R, ANGKAWIJAYA A E, et al. Diglyceride production via noncatalyzed esterification of glycerol and oleic acid[J/OL]. Asia - Pacific J Chem Eng, 2019, 14(6): 2383[2023-07-31]. <https://doi.org/10.1002/apj.2383>.
- [9] 张秀秀,李少华,薛秀恒,等.葵花籽油甘油二酯的制备及其在发酵乳应用中的特性研究[J].中国油脂,2020,45(7):87-92.
- [10] 蒋羽鸽,王志耕,梅林,等.无溶剂体系甘油解法制备乳脂 1,3-甘油二酯[J].食品与发酵工业,2016,42(7):176-180.
- [11] ZHOU D, ZHAO M, WANG J, et al. A novel and efficient method for punicic acid - enriched diacylglycerol preparation: Enzymatic ethanolysis of pomegranate seed oil catalyzed by Lipozyme 435[J/OL]. LWT - Food Sci Technol, 2022, 159: 113246[2023-07-31]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113246>.
- [12] 王致禹,陈晓倩,孟庆凤,等.有机溶剂和混合油脂对脂肪酶活性恢复的影响[J].中国食品学报,2021,21(2):55-62.
- [13] 刘晓娟,张姗姗,吴琼.富含甘油二酯的大豆油制备工艺优化[J].粮食与油脂,2017,30(11):54-58.
- [14] 周亮,刘元法,金青哲,等.瓜蒌籽油理化性质及瓜蒌酸结构分析[J].食品科学,2007,28(11):116-118.
- [15] PARK S M, JEON S K, KIM O H, et al. Anti - tumor effects of the ethanolic extract of *Trichosanthes kirilowii* seeds in colorectal cancer[J/OL]. Chin Med, 2019, 14: 43[2023-07-31]. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0263-8>.
- [16] JAHAN D T. Comparative study of acid value and rancidity in commonly used oils and fats[J]. Int J Res Appl Sci Eng Technol, 2020, 8(8): 1429-1432.