

# 酶催化分子蒸馏单甘酯的重相产物制备中、长链甘油二酯及其性质研究

杨 佳<sup>1,2</sup>, 张 震<sup>3</sup>, 仇超颖<sup>1,2</sup>, 谢小冬<sup>1,2</sup>, 汪 勇<sup>1,2</sup>

(1. 暨南大学 食品科学与工程系, 广东高校油脂生物炼制工程技术研究中心, 广州 510632;

2. 暨南大学-萨斯喀切温大学“油料生物炼制与营养”联合实验室, 广州 510632;

3. 华南理工大学 食品科学与工程学院, 广州 510640)

**摘要:**以分子蒸馏单甘酯的重相产物和辛酸为原料, 固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 为催化剂催化酯交换反应制备中、长链甘油酯(M/LCG)。通过单因素实验探究了底物(重相产物与辛酸)摩尔比、反应温度、反应时间、加酶量对产品中含有辛酸的甘油酯成分含量及辛酸插入率的影响, 从而选择合适的工艺条件为: 反应温度 65 °C, 底物摩尔比 6:4, 反应时间 6 h, 加酶量 15%。在选定条件下, 产品 M/LCG 中甘油二酯(DAG)含量为 50.73%, 辛酸插入率为 15.35%。对选定条件下的 M/LCG 样品经柱层析分离纯化, 以硅胶为吸附剂, 正己烷-乙醚-甲酸(体积比 45:25:1)的溶液为洗脱剂, 可得到 DAG 含量为 88.24% 的中、长链甘油二酯(M/LCD), 且主要为 sn-1,3 DAG。通过 DSC、XRD 对纯化的 M/LCD 进行性质研究, 测得其熔点为 60.34 °C, 存在明显同质多晶现象, 主要为  $\beta$  与  $\beta'$  晶型共存。M/LCD 的热力学性质以及晶型特性将为其在乳液方面的潜在应用提供一定的理论依据。

**关键词:**重相产物; 中、长链甘油二酯; 分离纯化; 热力学性质; 晶型特性

中图分类号: TQ641; TS224 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)09-0100-07

## Enzymatic production and characterization of medium – and long – chain diglycerides from residue phase products of molecular distilled monoacylglycerols

YANG Jia<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhen<sup>3</sup>, QIU Chaoying<sup>1,2</sup>, XIE Xiaodong<sup>1,2</sup>, WANG Yong<sup>1,2</sup>

(1. Guangdong University Engineering Technology Research Center for Oils and Fats Biorefinery,

Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Guangdong Saskatchewan Oilseed Joint Laboratory, Guangzhou 510632, China; 3. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The medium – and long – chain glycerides (M/LCG) were prepared by enzymatic transesterification of octanoic acid and molecular distillation residue of monoglyceride with Lipozyme TL IM as catalyst. The effects of molar ratio of substrate (molecular distillation residue and octanoic acid), reaction temperature, reaction time and dosage of enzyme on the content of octanoic acid – containing glycerides and the entrapment efficiency of octanoic acid were investigated by single factor experiment. And the

收稿日期: 2018-04-17; 修回日期: 2018-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671781, 31701525);

广东省科技计划项目(2017B090907018, 2014A010107014);

广州市民生科技攻关项目(201803020032)

作者简介: 杨 佳(1994), 女, 在读硕士, 研究方向为油脂生物炼制 (E-mail) yangjia@stu2016.jnu.edu.cn。

通信作者: 汪 勇, 研究员, 博士 (E-mail) twyong@jnu.edu.cn。

optimal process conditions were obtained as follows: reaction temperature 65 °C, molar ratio of molecular distillation residue to octanoic acid 6:4, reaction time 6 h and dosage of enzyme 15%. Under the optimal conditions, the content of diglycerides in M/LCG was 50.73%, and the entrapment efficiency of octanoic acid was 15.35%. The M/LCG obtained by optimal conditions was purified by column chromatography with

silica gel as adsorbent, *n* - hexane - ether - formic acid ( volume ratio 45 : 25 : 1 ) as eluent, and medium - and long - chain diglycerides ( M/LCD ) with DAG content 88.24% was obtained, and main were sn - 1,3 DAG. The characteristics of the purified M/LCD was measured by DSC and XRD, and the results showed the melting point of M/LCD was 60.34 °C, and there was obvious polymorphisms, mainly coexistence of  $\beta$  and  $\beta'$  type crystal form. The thermodynamic properties and crystal form of M/LCD would provide a certain theoretical basis for its potential application in emulsion.

**Key words:** molecular distillation residue (MDR); medium - and long - chain diglycerides (M/LCD); separation and purification; thermodynamic property; crystal characteristics

天然油脂中的甘油二酯(DAG)含量小于10%,是天然油脂中的一种微量成分<sup>[1]</sup>。DAG有两种同分异构体,分别为1,2-DAG和1,3-DAG,1,3-DAG因结构对称,在物理化学性质上更具热力学稳定性。DAG传统的制备方法是通过化学法在高温下进行甘油解,具有随机的特点,随着工业上酶应用的发展,因其反应条件温和被广泛用于制备DAG。DAG含有一个羟基,极性比甘油三酯(TAG)大<sup>[2]</sup>,这种分子结构,决定了DAG是一种良好的乳化剂,可应用于食品、化工和医药等诸多领域<sup>[3]</sup>。

中链脂肪酸(MCFA)具有较多的生理功能,主要有降低脂肪积累、供能迅速,提高葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性等<sup>[4]</sup>;中、长链甘油二酯(M/LCD,指中链甘油二酯,中长链甘油二酯和长链甘油二酯这3种DAG的总和。同样,下文的M/LCT为中链甘油三酯,中长链甘油三酯和长链甘油三酯这3种TAG的总和)含有MCFA易于消化,具有快速供能的优点,同时其所含的长链脂肪酸(LCFA)还可补充人体必需脂肪酸<sup>[5]</sup>,因此M/LCD具有巨大的应用前景。

分子蒸馏单甘酯(MAG)是一类重要的食品乳化剂,在得到产品MAG的同时,也会得到部分重相产物(MDR),主要成分是饱和DAG和TAG,附加值低。本研究以工业生产单甘酯分子蒸馏后所得的重相产物(MDR)和中链脂肪酸辛酸为原料,Lipozyme TL IM酶为催化剂,通过酯交换反应制备中、长链甘油酯(M/LCG)。以含辛酸的甘油酯组分含量及辛酸插入率为指标,通过单因素实验探究了底物(MDR与辛酸)摩尔比、反应温度、反应时间和加酶量的影响,确定适宜工艺条件。通过柱层析法对选定条件下的M/LCG进行分离纯化,得到了较高纯度的M/LCD,利用差式扫描量热仪(DSC)、X-衍射仪(XRD)分析手段研究M/LCD产品的热力学性质和晶型特性,为产品在乳液方面的潜在应用提供相应的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

重相产物(MDR):广州嘉德乐生化科技有限公司;辛酸:天津市科密欧化学试剂有限公司,纯度大于99.5%;固定化酶Lipozyme TL IM:诺维信(中国)生物技术有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

GC-7820A气相色谱仪(美国Agilent公司);2010 Plus气相色谱仪(日本岛津科技有限公司);DSC1型差示扫描量热仪(梅特勒-托利多公司);MSALXD-2型全自动X-射线衍射仪(北京市普析通用仪器有限公司);AVANCE III核磁共振波谱测定仪:布鲁克拜厄斯宾有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 M/LCG的制备

称取重相产物于圆底烧瓶中,在旋转蒸发仪中于一定温度和100 r/min转速下使其熔融,再加入相应质量的辛酸和固定化酶催化剂Lipozyme TL IM,反应一定时间后,滤去Lipozyme TL IM酶,样品置于4 °C冰箱备用。

对选定条件下制备得到的样品,采用化学法除去游离脂肪酸(FFA)得到M/LCG。具体脱酸方法为:将3 mL样品溶于15 mL正己烷和15 mL丙酮混合溶液中,加入3滴酚酞,用0.8 mol/L的KOH水溶液滴定除酸,用力摇晃,直至溶液颜色变红且0.5 min之内不褪色,溶液转移至分液漏斗,静置分层,分出下层的水相,有机相层再用蒸馏水洗涤3次,把过量的碱液洗去,至无色,倒出上层有机相,用无水硫酸钠干燥,最后将有机相通过旋蒸去除正己烷和丙酮,得到除去FFA的样品M/LCG。

#### 1.2.2 气相色谱法分析脂肪酸组成

使用三氟化硼-甲醇快速甲酯化法对样品进行

处理,利用 Zhang 等<sup>[6]</sup>的方法通过 2010 Plus 气相色谱仪测定脂肪酸组成。

### 1.2.3 气相色谱法分析甘油酯组成

参照 Wang 等<sup>[7]</sup>所用气相色谱分析法对粗产品进行成分分析,以含有辛酸的甘油酯成分含量及辛酸插入率作为单因素的分析指标,通过 GC-7820A 气相色谱仪检测高熔点和高沸点的甘油酯成分。

### 1.2.4 M/LCG 的薄层层析(TLC)定性分析

将薄层层析板于 110℃ 烘箱中活化 1 h,1.0 mg M/LCG 用 1 mL 正己烷和 1 mL 丙酮混合溶液溶解,再用 0.3 mm 的毛细管取样后在薄板的近底端点样 3  $\mu$ L,尝试在不同的展开液中展开,然后放置在碘缸中碘蒸气显色 3 min。确定最佳的展开液,并将其用作洗脱剂分离纯化 M/LCG,得到 M/LCD。

### 1.2.5 M/LCG 的柱层析分离纯化

取 M/LCG 产物 2.0 g 溶于 5 mL 最佳的展开液中,上硅胶层析柱(2.8 cm  $\times$  60 cm,硅胶 200~300 目),以 30 mL/min 的流速用最佳的展开液进行洗脱,按 15 mL/管收集洗出液,以 MAG、DAG、TAG 和 FFA 为目标物,经 TLC 定性检测,富集 DAG 成分,得到 M/LCD。

### 1.2.6 M/LCD 的核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)分析

根据 Laszlo 等<sup>[8]</sup>的分析方法。将 20.0 mg 柱层析分离纯化的 M/LCD 溶于 0.5 mL CDCl<sub>3</sub>(0.05% TMS),用于<sup>1</sup>H-NMR 分析。测试条件:温度 25℃,

谱宽 10 330.6 Hz,扫描次数 80,采集时间 3.171 9 s,脉冲宽度 12.76°。

### 1.2.7 样品的热力学特性分析

采用 DSC 对样品进行熔化和结晶特性分析。准确称取样品 M/LCG 和 M/LCD(8.0~12.0 mg)置于铝坩埚内,用空坩埚作为参比<sup>[9]</sup>,每个样品重复测试 2 次。

控温程序:初始温度 25℃,保持 1 min,以 40℃/min 升温至 80℃并保持 5 min,以 8℃/min 的速率冷却到 -50℃并保持 5 min,再以 8℃/min 的速率加热到 80℃。高纯 N<sub>2</sub> 流速为 50 mL/min。通过动态的升降温过程,得到样品的熔融和结晶曲线。

### 1.2.8 样品的晶型分析

采用 XRD 测定样品的晶型<sup>[10]</sup>。检测条件:工作电压 36 kV,电流 20 mA,Cu 靶,扫描步长 0.02°,扫描速度 2(°)/min,扫描范围 2 $\theta$  为 5°~30°。

### 1.2.9 辛酸插入率的计算

寿佳菲<sup>[11]</sup>提出一种辛酸插入率的计算方法:以样品峰的保留时间与辛酸甲酯标准品的保留时间定性,按峰面积归一化法计算辛酸插入率,公式如下:

$$\text{辛酸插入率} = \frac{\text{结构脂质中辛酸甲酯所对应的峰面积}}{\text{结构脂质中所有脂肪酸甲酯所对应的峰面积}} \times 100\%$$

根据该公式,衍生另外一种通过甘油酯成分和含量计算辛酸插入率的方法,具体计算方式见表 1。

表 1 辛酸插入率的计算方法

|        | MAG      |          |          | DAG      |          |          |          |          |          | TAG                                                                       |          |          |          |          |          |          |          | % |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---|
| 组分     | C8       | C16      | C18      | C8, C8   | C8, C16  | C8, C18  | C16, C16 | C16, C18 | C18, C18 | C8, C16                                                                   | C8, C16  | C8, C18  | C16, C16 | C16, C18 | C16, C18 | C16, C18 | C18, C18 |   |
| 含量     | <i>a</i> | <i>b</i> | <i>c</i> | <i>d</i> | <i>e</i> | <i>f</i> | <i>g</i> | <i>h</i> | <i>i</i> | <i>j</i>                                                                  | <i>k</i> | <i>l</i> | <i>m</i> | <i>n</i> | <i>o</i> | <i>p</i> |          |   |
| C8 含量  |          |          |          |          |          |          |          |          |          | $A = a + 2d + e + f + j + k + l$                                          |          |          |          |          |          |          |          |   |
| 总脂肪酸含量 |          |          |          |          |          |          |          |          |          | $B = a + b + c + 2(d + e + f + g + h + i) + 3(j + k + l + m + n + o + p)$ |          |          |          |          |          |          |          |   |
| 辛酸插入率  |          |          |          |          |          |          |          |          |          | $\omega = A/B$                                                            |          |          |          |          |          |          |          |   |

### 1.2.10 数据分析

利用 OriginPro 8 软件对实验数据进行分析,结果数据为平均值( $n=2$ )。

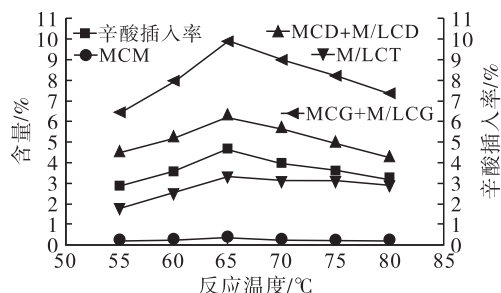
## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验

#### 2.1.1 反应温度对酯交换反应的影响

在加酶量 5%、底物(MDR 与辛酸,下同)摩尔比 1:1、反应时间 2.5 h 条件下,研究反应温度对酯交换反应的影响,结果如图 1 所示。由图 1 可知,随着反应温度的升高,产物中的 MCM、MCD + M/LCD

和 M/LCT 的含量以及辛酸插入率均呈现先增加后降低的趋势,因而总的 MCG + M/LCG 也显示出相同的趋势,均在反应温度 65℃ 时出现最大值,其中辛酸插入率达到 4.47%,MCD + M/LCD 含量由 4.46%(55℃)升至 6.22%,因为升高温度可降低反应物的黏度,增加两相反应物的相互溶解性和扩散作用<sup>[12-13]</sup>,当反应温度超过 65℃ 时,脂肪酶在高温条件下会因变性失活而被钝化<sup>[7]</sup>,使得酯交换效果降低。综合考虑,选择 65℃ 为合适的反应温度。



注: MCM 为中链单甘油酯; MCD 为中链甘油二酯; M/LCD 为中、长链甘油二酯; M/LCT 为中、长链甘油三酯; MCG 为中链甘油酯; M/LCG 为中、长链甘油酯; 下同。

图1 反应温度对反应中各组分含量及辛酸插入率的影响

### 2.1.2 底物摩尔比对酯交换反应的影响

在反应时间 2.5 h、反应温度 65 °C、加酶量 5% 条件下, 研究底物摩尔比对酯交换反应的影响, 结果如图 2 所示。

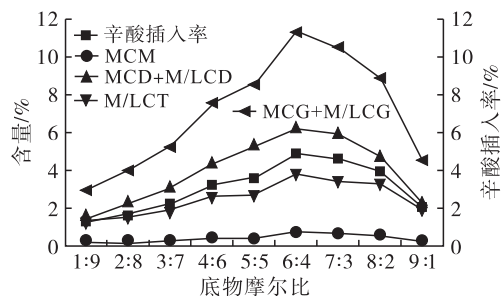


图2 底物摩尔比对反应中各组分含量及辛酸插入率的影响

由图 2 可知, 随着 MDR 所占比例的增加, 产物中的 MCM、MCD + M/LCD 和 M/LCT 的含量以及辛酸插入率均呈现先增加后降低的趋势。当底物摩尔比由 1:9 增加至 6:4, 辛酸插入率由 1.24% 升至 4.82%, MCD + M/LCD 由 1.43% 升至 6.09%, 但随着 MDR 所占比例的继续增加, 这些指标开始下降, 当底物摩尔比为 9:1 时, 辛酸插入率降为 2.02%, MCD + M/LCD 降为 2.24%, 因为底物摩尔比的增加, 在一定范围内可促使反应向正方向进行, 加快产物的生成, 但是过量的脂肪酸同时会导致酶的钝化<sup>[14]</sup>。综上所述, 采用底物摩尔比 6:4 较为合适。

### 2.1.3 加酶量对酯交换反应的影响

在底物摩尔比 6:4、反应温度 65 °C、反应时间 2.5 h 条件下, 研究加酶量对酯交换反应的影响, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 加酶量从 3% 提高到 15% 时, 图中所测定的指标均呈上升趋势, 其中辛酸插入率由 2.66% 升至 12.64%, 继续增大加酶量到 17%, 辛酸插入率开始降低, 其他测试指标依然有所升高, 但加酶量超过 17% 以后, 这些指标也开始明显下降。一般说来, 在一定范围内加酶量的增加会缩短反应时间, 加速反应进程, 但是当超出这一范

围, 加酶量的增加会导致聚合物的生成, 进而导致酶和底物的接触面积减小, 使得酶活性位点无法与底物接触<sup>[15]</sup>。辛酸插入率在加酶量为 15% 时达到最大值, 其他相关指标(除 MCM)在加酶量为 17% 达到最大值。综合考虑经济因素, 选择加酶量 15% 为合适的反应条件。

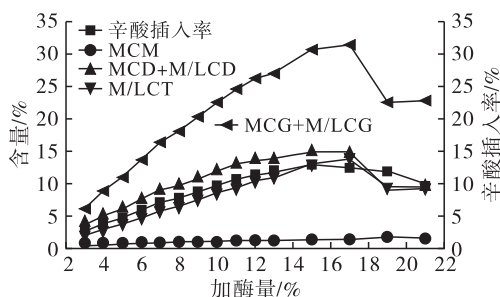


图3 加酶量对反应中各组分含量及辛酸插入率的影响

### 2.1.4 反应时间对酯交换反应的影响

在底物摩尔比 6:4、反应温度 65 °C、加酶量 15% 条件下, 研究反应时间对酯交换反应的影响, 结果如图 4 所示。

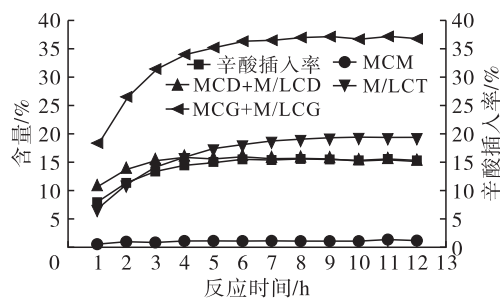


图4 反应时间对反应中各组分含量及辛酸插入率的影响

在一定的时间范围内, 所有中链的甘油酯组分含量均呈现随反应时间的延长而增加的趋势。Liu 等<sup>[16]</sup>研究了反应时间对酯化反应的影响, 指出当脂肪酶和反应底物在界面达到饱和状态时, 反应时间对 DAG 的生成影响较为显著, 随着反应时间的延长, DAG 最终会达到一个平衡值。由图 4 可知, MCD + M/LCD 在反应时间 4 h 达到饱和状态, 含量为 15.74%, 但由于 M/LCT 含量 4 h 后仍在增加, 一直到 6 h 才趋于平衡, 使得辛酸插入率和 MCG + M/LCG 的含量也在 6 h 达到平衡状态, 此时辛酸插入率达到 15.35%, MCG + M/LCG 含量为 36.33%。综合考虑能耗等因素, 选定 6 h 为合适反应时间。

### 2.2 原料及样品的脂肪酸和甘油酯组成(见表 2)

由表 2 可知, MDR 富含长链脂肪酸, 由硬脂酸和棕榈酸组成, 其中棕榈酸含量为 63.35%, 硬脂酸含量 36.65%, 甘油酯组成分析显示其主要含 DAG 和 TAG, 含量分别为 52.40% 和 36.25%, MAG 含量 10.75%, FFA 含量为 0.60%; 除酸前后的样品(酯

交换后样品和 M/LCG) 的脂肪酸组成和含量相近, 但甘油酯组成分析显示除酸后 FFA 含量由酯交换后样品的 27.22% 降为 M/LCG 的 2.79%, 表明该化学法去除 FFA 效果较好, 最终 M/LCG 含有 53.62% 的棕榈酸、32.76% 的硬脂酸以及 13.62% 的辛酸, 且 DAG 含量为 50.73%。

表 2 原料及样品的脂肪酸和甘油酯组成 %

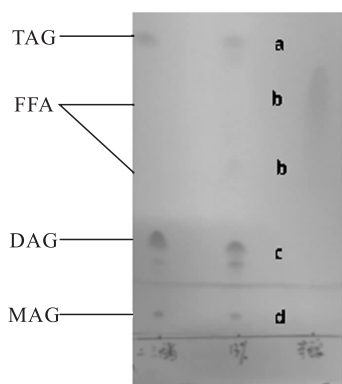
| 项目  | MDR          | 酯交换后样品       | M/LCG        |
|-----|--------------|--------------|--------------|
| 脂肪酸 |              |              |              |
| 辛酸  | -            | 15.80 ± 0.33 | 13.62 ± 0.33 |
| 棕榈酸 | 63.35 ± 0.12 | 53.18 ± 0.98 | 53.62 ± 0.28 |
| 硬脂酸 | 36.65 ± 0.12 | 31.02 ± 0.34 | 32.76 ± 0.34 |
| 甘油酯 |              |              |              |
| FFA | 0.60 ± 0.09  | 27.22 ± 0.05 | 2.79 ± 0.05  |
| MAG | 10.75 ± 0.33 | 5.73 ± 0.48  | 4.19 ± 0.48  |
| DAG | 52.40 ± 0.12 | 34.12 ± 0.09 | 50.73 ± 0.09 |
| TAG | 36.25 ± 0.32 | 32.96 ± 0.93 | 42.29 ± 0.93 |

注: 酯交换后样品指单因素实验后所选条件下制备未除酸的样品; M/LCG 指除酸后的样品; “-”表示未检出。

## 2.3 M/LCD 的分离纯化

### 2.3.1 M/LCG 的 TLC 定性分析

TLC 的分离效果主要由被分离物质的极性、吸附剂的活性和展开剂的极性所决定, 而混合物中 MAG、DAG、TAG、FFA 的极性和硅胶的吸附极性都是恒定的, 因此主要通过选择合适的展开剂来提高分离效果。通过尝试不同的展开剂, 包括正己烷-乙酸乙酯(体积比 4:1)、正己烷-乙醚-甲酸(体积比 75:25:1)以及正己烷-乙醚-甲酸(体积比 45:25:1), 得到分离效果最好的展开剂为正己烷-乙醚-甲酸(体积比 45:25:1), 在该展开剂条件下, TLC 定性分析结果见图 5, 其中 a 为 TAG, b 为 FFA, c 为 DAG, d 为 MAG。因而后续的柱层析分离纯化选用正己烷-乙醚-甲酸(体积比 45:25:1)为洗脱剂。



注: 左为原料重相产物, 中为单因素实验中 13% 加酶量的样品, 右为原料辛酸。

图 5 M/LCG 的 TLC 分离结果

由图 5 可知, 该展开剂对 M/LCG 的分离效果较好, 由于样品含有中链的甘油酯, 且中链的甘油酯相比长链的极性更大, 故从图中可以看到 a 和 c 处的点有分离现象, 考虑是不同脂肪酸链长导致的 DAG 和 TAG 中不同成分极性的差别所致。根据极性分析, 图 5 中 a、b、c、d 依次为 M/LCT、FFA、M/LCD 和 M/LCM, TLC 图中点的大小显示物质的含量多少, 因此可以判断样品中主要为 TAG 和 DAG, 少量的 MAG 和 FFA。

### 2.3.2 M/LCG 的硅胶柱层析分离效果

以正己烷-乙醚-甲酸(体积比 45:25:1)的洗脱剂对 M/LCG 进行分离纯化, 通过 TLC 检测后, 分离出 a、b 和 c 3 种组分, 将分段收集到的组分 a、b、c 分别进行气相色谱分析, 所得结果如表 3 所示。

表 3 脂肪酸和甘油酯组成 %

| 项目  | a            | b            | c            |
|-----|--------------|--------------|--------------|
| 脂肪酸 |              |              |              |
| 辛酸  | 14.34 ± 0.22 | 12.14 ± 0.32 | 12.09 ± 0.24 |
| 棕榈酸 | 46.19 ± 0.12 | 59.93 ± 0.25 | 54.12 ± 0.12 |
| 硬脂酸 | 39.48 ± 0.17 | 27.93 ± 0.15 | 33.79 ± 0.15 |
| 甘油酯 |              |              |              |
| FFA | 0.26 ± 0.13  | 94.14 ± 0.23 | 4.60 ± 0.09  |
| MAG | 0.32 ± 0.18  | 1.32 ± 0.15  | 2.37 ± 0.13  |
| DAG | 17.66 ± 0.15 | 0.94 ± 0.19  | 88.24 ± 0.17 |
| TAG | 81.77 ± 0.21 | 3.60 ± 0.11  | 4.79 ± 0.25  |

注: a、b、c 指柱层析后对应 TLC 图位置的甘油酯组分。

由表 3 可知, 以正己烷-乙醚-甲酸(体积比 45:25:1)的洗脱剂分离纯化该 M/LCG 效果较好, 可得纯度为 88.24% 的 M/LCD, 辛酸含量由分离纯化前的 13.62% 降为分离纯化后的 12.09%, 硬脂酸和棕榈酸含量相对有所升高, 分别由 32.76% 升至 33.79%, 53.62% 升至 54.12%。同时也分离得到 81.77% 的 TAG 和 94.14% 的 FFA。

### 2.3.3 M/LCD 的 $^1\text{H}$ -NMR 分析

对柱层析分离纯化后得到的 M/LCD 经  $^1\text{H}$ -NMR 分析, 得到的谱图如图 6 所示。

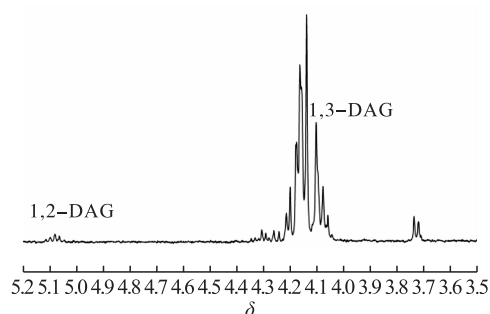


图 6 M/LCD 的  $^1\text{H}$ -NMR 谱图

Laszlo 等<sup>[8]</sup>的研究中根据甘油分子上羟基位置的差异对手性碳上所连的氢原子化学位移不同的性质,对 1,2-DAG 和 1,3-DAG 的含量比进行了分析,1,3-DAG 中的手性碳原子连接了一个氢原子和一个羟基,使得手性碳的电负性减弱,因而该氢原子出峰位置在高场区域,化学位移在 4.1 左右,而 1,2-DAG 中的羟基在其他碳原子上,连接质子的碳原子电负性较强,因而出峰位置在低场区域,化学位移在 5.1 左右。对比化学位移 4.1 和 5.1 处的积分大小,其中 5.1 处的积分为 0.08,4.1 处的积分为 1.10,说明 1,3-DAG 与 1,2-DAG 积分比为 13.75:1,可以确定样品 M/LCD 中主要为 sn-1,3 DAG。

## 2.4 物化特性分析

### 2.4.1 熔化结晶特性

柱层析分离前后样品 M/LCG 和 M/LCD 的熔化结晶情况如图 7、表 4 所示。

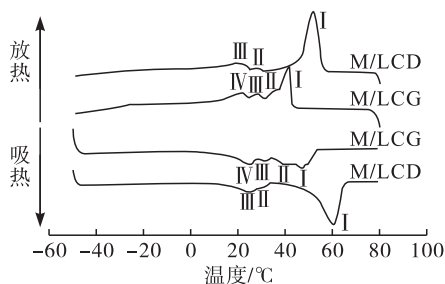


图 7 M/LCG 与 M/LCD 的熔化(下)和结晶(上)曲线

表 4 产品 M/LCG 和 M/LCD 初始结晶温度、熔点和相应的焓值

| 样品         | 初始结晶温度/°C | 结晶焓/(J/g) | 熔点/°C | 熔融焓/(J/g) |
|------------|-----------|-----------|-------|-----------|
| 峰 I(M/LCG) | 42.94     | 40.90     | 47.08 | -37.08    |
| 峰 I(M/LCD) | 55.28     | 112.09    | 60.34 | -109.41   |

由图 7 可知,M/LCD 的结晶熔融曲线均含有 3 个峰,而 M/LCG 含有 4 个峰,这可能是由于产物本身成分复杂,没有固定的熔点和凝固点,而熔点和凝固点相近的组分,易叠加在一起从而形成相对较宽的峰<sup>[17]</sup>。M/LCD 相比 M/LCG 少一个峰是因为其组成不如 M/LCG 复杂,最明显的 I 峰也变得更尖锐,说明结晶过程中成核和晶体生长快,峰 I 的峰宽也相对较短,说明 I 峰附近熔点相近的物质变少,同时峰面积大小可以体现成分的含量,M/LCD 的 I 峰占主导,表明在 I 峰熔融结晶区间的物质含量最高,在另外两峰位置熔融结晶的物质只占少量,进一步显示了 M/LCD 较高的纯度。由表 4 可知,M/LCG 的初始结晶温度为 42.94 °C,在 52.77 °C 完全熔化,熔点为 47.08 °C,柱层析后的 M/LCD 初始结晶温度为 55.28 °C,在 63.75 °C 完全熔化,熔点为 60.34 °C,

相比具有更高的熔点和结晶温度,这是因为和相同脂肪酸组成的 TAG 相比,极性更大的 DAG 熔点要高 10 °C 以上<sup>[18]</sup>,M/LCD 相比 M/LCG,DAG 含量更高,因而熔点相对更高。

### 2.4.2 晶型分析

对 M/LCD、M/LCG 样品的晶型进行 XRD 测定,结果见图 8。

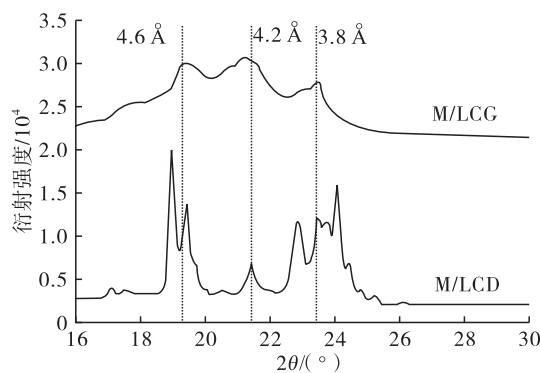


图 8 M/LCD、M/LCG 样品的 XRD 谱图

由图 8 可知,产品纯化之前的 M/LCG,主要在 4.2、3.8 Å 和 4.6 Å 出现较强的衍射峰,一般来说 3.8 Å 和 4.2 Å 左右出现的衍射峰,代表  $\beta'$  晶型;4.6 Å 附近的强衍射峰则表示存在  $\beta$  晶型,因此可以判定,M/LCG 存在同质多晶现象,主要是  $\beta$  与  $\beta'$  晶型共存。纯化后的 M/LCD,与纯化前样品最大的不同是晶型衍射峰的强度,这与产品的固体特性及熔点存在很大关系,固体特性越强,熔点越高,通过 X 射线衍射得到的峰强度越高。DSC 结果也印证了这一说法,即 M/LCD 熔点较 M/LCG 更高,DSC 结果显示 M/LCG 的熔点为 47.08 °C,柱层析后的 M/LCD 的熔点为 60.34 °C,这也是因为纯化后 M/LCD 中 DAG 含量得到显著升高,M/LCG 中 DAG 含量为 50.73%,纯化后的 M/LCD 中 DAG 含量为 88.24%,而同脂肪酸组成的甘油酯,DAG 的熔点要比 TAG 高很多。同样 M/LCD 也主要在 3.8 Å 和 4.6 Å 存在高强度的衍射峰,说明 M/LCD 与 M/LCG 一样,也存在明显同质多晶现象,为  $\beta$  与  $\beta'$  共存。

## 3 结论

以工业分子蒸馏制备单甘酯的重相产物和辛酸为原料,Lipozyme TL IM 酶为催化剂,通过酯交换反应制备中、长链甘油酯(M/LCG)。通过单因素实验得到的合适的工艺条件为反应温度 65 °C、底物摩尔比 6:4、反应时间 6 h、加酶量 15%,该条件下的辛酸插入率为 15.35%,M/LCG 中 DAG 含量为 50.73%,对所选工艺条件下的 M/LCG 样品经柱层析分离纯化,以硅胶为吸附剂,正己烷-乙醚-甲酸(体积比 45:25:1)为洗脱剂,可得到 DAG 含量为 88.24% 的

M/LCD,其中辛酸含量为 12.09%,且主要为 sn-1,3 DAG,熔点为 60.34 °C,相较于分离纯化前其固体特性更强,熔点更高,与 DAG 含量明显升高有关,M/LCD 存在明显同质多晶现象,主要为  $\beta$  与  $\beta'$  晶型共存。DAG 作为一种有效的乳化剂,在稳定乳液和促进结晶方面具有一定的作用,M/LCD 高熔点以及稳定的  $\beta$  与  $\beta'$  共存的晶型特征有助于其替代或者部分替代饱和油脂应用于脂肪晶体乳状液体系中,在产品同等流变学特性基础上可减少体系中饱和脂肪酸的用量,因而本研究为 M/LCD 在乳液方面的潜在应用提供了一定的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] YANAI H, TOMONO Y, ITO K, et al. Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome [J]. *Nutr J*, 2007, 6: 43 - 57.
- [2] LO S K, TAN C P, LONG K, et al. Diacylglycerol oil - properties, processes and products: a review [J]. *Food Bioprocess Technol*, 2008, 1(3): 223 - 233.
- [3] 陈福明, 孙登文. 双甘酯的生产及应用[J]. *中国油脂*, 1997, 22(5): 49 - 51.
- [4] SCHÖNFELD P, WOJTCZAK L. Short - and medium - chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective[J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(6): 943 - 954.
- [5] LEE Y Y, TANG T K, LAI O M. Health benefits, enzymatic production, and application of medium - and long - chain triacylglycerol (M/LCT) in food industries: a review [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(8): 137 - 144.
- [6] ZHANG Z, WANG Y, MA X, et al. Characterisation and oxidation stability of monoacylglycerols from partially hydrogenated corn oil[J]. *Food Chem*, 2015, 173:70 - 79.
- [7] WANG L, WANG Y, HU C, et al. Preparation of diacylglycerol - enriched oil from free fatty acids using lecithase ultra - catalyzed esterification [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2011, 88(10): 1557 - 1565.
- [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] 陈琼, 杨雪, 赵金利, 等. 酶法制备甘油二酯与甘油三酯的结晶特性研究[J]. *中国油脂*, 2015, 40(11): 48 - 53.
- [10] 杨雪. 基于 DAG 塑性脂肪的结晶特性与相容性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015.
- [11] 寿佳菲. 中长链脂肪酸甘油三酯的酶法制备与分离纯化研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012.
- [12] YANG T K, FRUEKILDE M B, XU X B. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming[J]. *Food Chem*, 2005, 92(1): 101 - 107.
- [13] TAO Q, LI A, SHI L, et al. Improved thermal stability of lipase in W/O microemulsion by temperature - sensitive polymers[J]. *Colloids Surf B*, 2013, 111: 587 - 593.
- [14] HU D J, CHEN J M, XIA Y M. A comparative study on production of middle chain diacylglycerol through enzymatic esterification and glycerolysis[J]. *J Ind Eng Chem*, 2013, 19(5): 1457 - 1463.
- [15] WATAN T, SHIMIZU M, NAKANISHI K, et al. Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1, 3 - regiospecific lipase lipozyme RM IM[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2003, 80(12): 1201 - 1207.
- [16] LIU N, WANG Y, ZHAO Q, et al. Fast synthesis of 1, 3 - DAG by Lecitase<sup>®</sup> Ultra - catalyzed esterification in solvent - free system[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2011, 113(8): 973 - 979.
- [17] JANSEN M, BIRCH J. Composition and stability of olive oil following partial crystallization [J]. *Food Res Int*, 2009, 42(7): 826 - 831.
- [18] WANG Y, ZHAO M M, OU S Y, et al. Separation of diacylglycerols from enzymatically hydrolyzed soybean oil by molecular distillation[J]. *Sep Purif Technol*, 2010, 75: 114 - 120.

告

读

者

为更好地服务于广大读者,《中国油脂》杂志社常年办理《中国油脂》逾期补订和过刊订阅业务;常年办理油脂专业书籍邮购业务,书目、代号、价格请查阅近期《中国油脂》杂志社专业书籍征订广告。

订阅、邮购地址:西安市劳动路 118 号,《中国油脂》杂志社读者服务部

邮编:710082 电话:029 - 88653162 联系人:潘亚萍