

酶法合成 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸 甘油三酯结构脂的研究

高亮¹, 余旭伟², 邹凤³, 程昕祎¹, 杨壮壮¹, 王小三¹, 金青哲¹, 王兴国¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心, 江苏无锡 214122;

2. 江南大学数字媒体学院, 江苏无锡 214122; 3. 无锡市食品安全检验检测中心, 江苏无锡 214122)

摘要:在 Lipozyme RM IM 脂肪酶的催化作用下, 将分提后的棕榈硬脂与油酸和亚油酸反应, 通过酶法酸解合成富含 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯(OPL)的结构脂, 通过单因素实验对酶法合成反应条件进行了优化。结果表明, 合成 OPL 结构脂的最优反应条件为: 棕榈硬脂、油酸、亚油酸摩尔比 1:7:7, 酶添加量 8%, 反应温度 60℃, 反应时间 6 h。在最优条件下, 进行 50 倍放大实验, 合成产物中 OPL 和 sn-2 位棕榈酸的含量分别为 48.37% 和 84.70%。

关键词: 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯; 结构脂; 酶法酸解; Lipozyme RM IM

中图分类号: TS252.4; Q814.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)08-0066-05

Enzymatic synthesis of structured lipids rich in

1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleylglycerol

GAO Liang¹, YU Xuwei², ZOU Feng³, CHENG Xinyi¹, YANG Zhuangzhuang¹,
WANG Xiaosan¹, JIN Qingzhe¹, WANG Xingguo¹

(1. Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. School of Digital Media, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 3. Wuxi Institute for Food Control, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Fractionated palm stearin was reacted with oleic acid and linoleic acid under the catalysis of Lipozyme RM IM to synthesize structured lipids rich in 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleylglycerol (OPL). The synthesis conditions were optimized by single factor experiment. The results showed that the optimal conditions were obtained as follows: molar ratio of palm stearin to oleic acid to linoleic acid 1:7:7; enzyme dosage 8%, reaction temperature 60℃, reaction time 6 h. The reaction was amplified 50 times under the optimal conditions, and the contents of OPL and sn-2 palmitic acid were 48.37% and 84.70%, respectively.

Key words: 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleylglycerol; structured lipids; enzymatic acidolysis; Lipozyme RM IM

母乳被认为是婴儿最理想的食品, 含有 3% ~

5% 的脂肪, 这部分脂肪也常称为人乳脂, 主要由甘油三酯(98%)、磷脂(0.8%)和胆固醇(0.5%)等成分构成, 能为婴幼儿提供约 50% 的能量、必需脂肪酸和生理活性物质供其生长^[1]。人乳脂的组成和结构比较特殊, 从人乳脂脂肪酸组成来看, 主要包括油酸、棕榈酸和亚油酸, 分别占人乳脂的 25% ~ 35%、20% ~ 30%、10% ~ 20%^[2]。对于人乳

收稿日期: 2019-12-06; 修回日期: 2020-03-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31701559, 31972035)

作者简介: 高亮(1993), 男, 在读硕士, 研究方向为脂质科学与技术(E-mail) gaoliangjiangnan@163.com。

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

脂脂肪酸的空间结构,其中70%以上的棕榈酸在sn-2位上,而不饱和脂肪酸,如油酸和亚油酸位于sn-1,3位^[3]。因此,甘油三酯在人乳脂中的存在形式主要是USU型,如1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(OPO)和1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯(OPL)^[4]。这种独特的结构可促进婴儿对脂肪和钙吸收,并对脂代谢有着显著的影响。研究表明,甘油三酯在人体中,在胰脂酶的特异性催化作用下,被水解为游离的不饱和脂肪酸和2-饱和脂肪酸单甘酯,被小肠吸收。当水解下来的1,3位脂肪酸主要为棕榈酸等饱和脂肪酸时,由于其熔点较高,会在肠道内形成不溶性的钙皂等,不利于婴幼儿生长发育^[5]。孙聪^[6]调查分析了中国无锡地区309例人乳样品发现,人乳脂中OPL的含量(17.85%~33.02%)高于OPO的含量(6.81%~24.86%),这与欧洲的一些报道相反^[7-8],但与中国其他地区报道类似^[9-10],这可能与中国乳母多食用较高亚油酸植物油如大豆油等饮食有关。因此,OPL是中国人乳中含量最高的甘油三酯。

目前国内外大多关注富含OPO结构脂的报道,多采用棕榈硬脂和猪油等与油酸或者富含油酸的植物油脂在特异性酶的催化作用下合成OPO^[11-12]。而孙聪^[6]调查分析了13种添加OPO的婴儿配方奶粉,发现虽然OPO的含量与人乳脂接近,但棕榈酸在sn-2位的含量却仍低于人乳脂。因此,在中国市场的婴儿配方奶粉中,除了要添加OPO结构脂,还需添加sn-2位富含棕榈酸的甘油三酯如OPL。

目前,有关于富含OPL结构脂的研究报道很少,婴儿配方奶粉中也没有关注到OPL的添加。在动物油脂中,牛乳和羊乳中含有少量的OPL(0.35%),而猪油虽然含有一定量的OPL,但受到宗教信仰的限制未得到广泛应用。在植物油中,棕榈酸主要位于sn-1,3位,因此OPL主要以sn-POL或sn-PLO等同分异构体形式存在。因此,通过酶法合成中国人乳脂中含量最高的OPL结构脂对于生产和调配与人乳脂高度相似的人乳替代脂具有重要意义。

本研究的目的是通过酶法合成富含OPL的结构脂,为此,本文以分提后的棕榈硬脂为原料,在Lipozyme RM IM的催化作用下,与油酸和亚油酸发生酸解反应合成富含OPL的结构脂。探究了底物摩尔比、酶添加量、反应温度、反应时间对酸解反应的影响,在最优条件下对该反应进行50倍放大实验,并通过高效液相色谱和气相色谱对产物进行检测分析,得到高含量的OPL结构脂。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

棕榈硬脂(58℃),益海嘉里有限公司;油酸(85%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;猪胰脂酶、脂肪酸甲酯标品,Sigma-Aldrich(中国上海)公司;乙腈(>99%)、异丙醇(>99%)、正己烷(>95%),百灵威科技有限公司;薄层色谱硅胶板(20 cm×20 cm,乳山市太阳干燥剂有限公司);Lipozyme RM IM 脂肪酶,诺维信生物技术有限公司。

亚油酸(60%~74%)、乙醚、正己烷,冰醋酸、无水硫酸钠、氢氧化钾、乙醇、氯化钙、脱氧胆酸钠、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、2,7-二氯荧光素、丙酮等,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

反应釜、反应器;HH-601 超级恒温水浴;漩涡振荡器;磁力搅拌器,IKA集团;电子天平;三用紫外分析仪;低温恒温槽;Agilent 1260 高效液相色谱、Agilent 7820A 气相色谱,美国安捷伦科技有限公司;蒸发光散射检测器,美国 Grace 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 棕榈硬脂的分提

将25 g 棕榈硬脂置于盛有125 mL 丙酮的反应器中,调节温度至60℃,将反应器中反应物溶解,然后以10℃/h的降温速度程序降温至38℃,并保持3 h,快速真空抽滤除去丙酮,经旋转蒸发得到高含量的三棕榈酸甘油酯(PPP)。

1.2.2 酶法合成OPL结构脂

将PPP与酰基供体(油酸和亚油酸)混合于25 mL 反应釜中,当反应底物溶解并稳定时,加入一定量Lipozyme RM IM 脂肪酶,在一定温度下反应,每隔2 h 取样。反应结束后,在4 000 r/min 的转速下离心3 min,回收Lipozyme RM IM 脂肪酶,并去除游离脂肪酸,得到富含OPL的结构脂。

对于游离脂肪酸的去除,工业上常采用碱炼脱酸的方法,我们做了一些改进^[13]:向回收脂肪酶后的反应产物中按10 mL/g 加入正己烷将产物溶解,再用0.5 mol/L 的KOH-乙醇溶液(30%)中和产物中的游离脂肪酸,碱的用量为理论游离脂肪酸摩尔数的1.5倍,将混合物摇匀并静置5 min,体系分为两相,吸取含有甘油三酯的正己烷相,经旋转蒸发除去正己烷,得到纯化的结构脂。

1.2.3 甘油三酯组成分析

采用配有蒸发光散射检测器的高效液相色谱检测分析分提后的棕榈硬脂和OPL结构脂中甘油三酯

的组成。分析条件: C18 非极性色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 蒸发光散射检测器温度 55 °C, 空气流速 1.8 mL/min, 增益值 1, 流动相洗脱程序见表 1, 流速 0.8 mL/min, 进样质量浓度 20 mg/mL, 进样量 10 μL。

表 1 分析甘油三酯的洗脱程序

时间/min	乙腈/%	异丙醇/%
0	60	40
40	60	40
45	55	45
85	55	45
90	60	40

1.2.4 总脂肪酸组成分析

样品甲酯化: 甘油三酯 (20 mg) 溶于 1.2 mL 的溶剂 (95% 正己烷) 中, 加入 0.5 mL KOH - 甲醇溶液 (2 mol/L) 充分反应, 吸取上层, 并用无水硫酸钠吸收水分, 膜过滤后, 用气相色谱仪进行检测分析。

分析条件: 采用配有氢火焰离子化检测器的气相色谱; Trace TR - FAME 毛细管柱 (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 检测器温度 250 °C; 氮气流速 1.0 mL/min; 分流比 20:1; 程序升温为初始温度 60 °C 保持 3 min, 然后以 5 °C/min 的速率升温至 180 °C, 并保持 15 min, 最后以 2 °C/min 的速率升温至 220 °C,

保持 10 min。

1.2.5 脂肪酸区域特异性分析

甘油三酯 (50 mg) 溶于 1.2 mL 的溶剂 (95% 正己烷) 中, 依次加入 7 mL Tris - HCl 缓冲液 (pH 7.6)、1.75 mL 胆酸盐溶液 (0.05%)、0.7 mL 氯化钙溶液 (2.2%), 充分振荡, 加入 50 mg 猪胰脂酶, 在 37.5 °C 下反应 5 min, 冷却后加入 2 mL 无水乙醚, 离心后吸取有机层, 浓缩后在薄层色谱上点样, 展开剂为正己烷 - 无水乙醚 - 冰醋酸 (体积比 50:50:1), 用 2,7 - 二氯荧光素显色, 刮下单甘酯 (2 - MAG), 用无水乙醚萃取后, 氮吹干无水乙醚, 将样品按 1.2.4 方法进行甲酯化和气相色谱分析。

1.2.6 数据分析

所有数据重复两次取平均值, 并以“平均值 ± 标准差”表示, 采用 Origin 2018 制图。

2 结果与讨论

2.1 分提棕榈硬脂的脂肪酸及甘油三酯组成

棕榈硬脂的分提采用溶剂结晶法, 即根据不同的甘油三酯在丙酮中溶解度的不同, 利用低温结晶法将其达到分离的目的。棕榈硬脂分提前后总脂肪酸和 sn - 2 位脂肪酸组成及含量见表 2, 甘油三酯组成见表 3。

表 2 棕榈硬脂分提前后总脂肪酸和 sn - 2 位脂肪酸组成及含量

脂肪酸	棕榈硬脂		分提后的棕榈硬脂		%
	总脂肪酸	sn - 2 位脂肪酸	总脂肪酸	sn - 2 位脂肪酸	
C14:0	1.09 ± 0.12	0.76 ± 0.14	0.71 ± 0.15	0.41 ± 0.15	
C16:0	79.95 ± 0.84	69.25 ± 1.03	92.03 ± 0.90	90.67 ± 1.30	
C18:0	5.01 ± 0.08	4.15 ± 0.23	4.26 ± 0.34	4.02 ± 0.74	
C18:1	11.53 ± 0.53	22.19 ± 0.64	2.55 ± 0.20	4.70 ± 0.60	
C18:2	2.42 ± 0.12	3.65 ± 0.34	0.45 ± 0.08	0.20 ± 0.06	

表 3 棕榈硬脂分提前后甘油三酯组成

甘油三酯	棕榈硬脂	分提后的棕榈硬脂	%
OOP	0.88 ± 0.11	0	
POP	10.44 ± 0.75	0.79 ± 0.22	
PPP	83.70 ± 1.43	93.44 ± 1.95	
POS	0.72 ± 0.13	0	
PPS	6.26 ± 0.15	5.77 ± 0.59	

由表 2 可见, 棕榈硬脂通过溶剂分提后, 脂肪酸含量明显发生了变化, 其中棕榈酸含量从 79.95% 提高到 92.03%, sn - 2 位棕榈酸含量从 69.25% 提高到 90.67%, 油酸和亚油酸等不饱和脂肪酸含量均大幅度降低。由表 3 可见, 棕榈硬脂分提后, OOP、POP、POS 等熔点较低的甘油三酯含量大幅降低, 然而熔点高的甘油三酯, 尤其是 PPP 从 83.70%

增加到 93.44%。分提后的棕榈硬脂含有高含量的 PPP 和 sn - 2 位棕榈酸, 是合成 OPL 结构脂的良好底物。

2.2 酶法合成 OPL 单因素实验

2.2.1 底物摩尔比对反应的影响

由于 OPL 甘油骨架上含有 3 个不同的脂肪酸, 在考虑底物摩尔比对反应的影响时, 主要分为 PPP 与总脂肪酸 (油酸和亚油酸) 的摩尔比以及油酸与亚油酸的摩尔比。首先, 探究了 PPP 与总脂肪酸摩尔比为 1:8、1:10、1:12、1:14、1:16 时对反应的影响, 其他反应条件为反应温度 60 °C、Lipozyme RM IM 脂肪酶添加量 10%、油酸与亚油酸摩尔比 1:1.2, 结果见图 1。

由图 1 可见, 随着反应时间的延长, OPL 的含量

逐渐升高,至6 h时反应趋于平衡。同时,随着脂肪酸供体(油酸和亚油酸)比例的提高,OPL的含量也逐渐提高,当PPP与总脂肪酸摩尔比为1:14时,OPL含量明显高于其他4组。这是因为在脂肪酸比例较低时,随着脂肪酸供体比例的增加,OPL含量也随之提高,但该反应是可逆反应,反应趋近平衡后再增加反应物中的脂肪酸供体,会导致OPL含量下降。因此,选择PPP与总脂肪酸摩尔比为1:14进行后续反应条件研究。

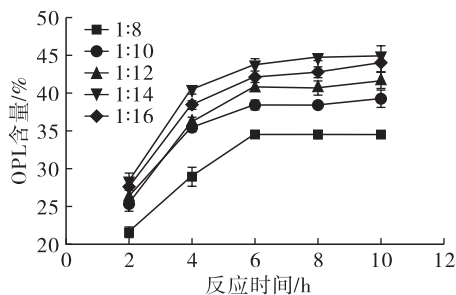


图1 PPP与总脂肪酸摩尔比对反应的影响

在确定了PPP与总脂肪酸的摩尔比为1:14后,在其他条件不变的情况下,继续探究油酸与亚油酸摩尔比为1:0.8、1:1、1:1.2、1:1.4、1:1.6时对反应的影响,结果见图2。

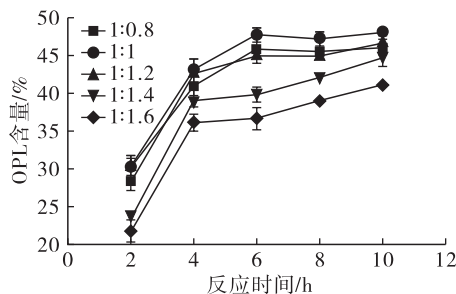


图2 油酸与亚油酸摩尔比对反应的影响

由图2可见,随着反应时间的延长,OPL的含量先迅速增加再缓慢增加,在反应时间为6 h、油酸与亚油酸摩尔比为1:1时,OPL的含量最高(47.74%)。这是因为随着亚油酸比例的不断增加,LPL等甘油三酯副产物影响OPL的含量,而油酸比例的不断增加,OPO等甘油三酯也是导致OPL含量降低的因素,因此选择油酸与亚油酸摩尔比为1:1作为反应底物。

综上所述,确定PPP、油酸、亚油酸最佳摩尔比为1:7:7。

2.2.2 脂肪酶添加量对反应的影响

在PPP、油酸、亚油酸摩尔比1:7:7,反应温度60℃下,探究了脂肪酶添加量为6%、8%、10%、12%、14%时对反应的影响,结果见图3。

由图3可见,反应时间为6 h时,Lipozyme RM

IM脂肪酶添加量为8%~12%,OPL的含量相差不多,均高于脂肪酶添加量为6%和14%时的,且在脂肪酶添加量为6%时,整个反应过程中OPL含量均低于其他组。为了提高产物中OPL的含量,同时考虑脂肪酶价格昂贵的问题,选择Lipozyme RM IM脂肪酶添加量为8%。

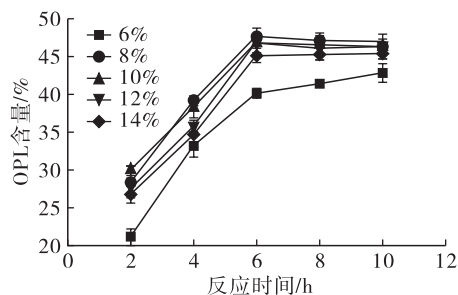


图3 脂肪酶添加量对反应的影响

2.2.3 反应温度对反应的影响

在PPP、油酸、亚油酸摩尔比1:7:7,脂肪酶添加量8%条件下,探究反应温度为50、55、60、65、70℃时对反应的影响,结果见图4。

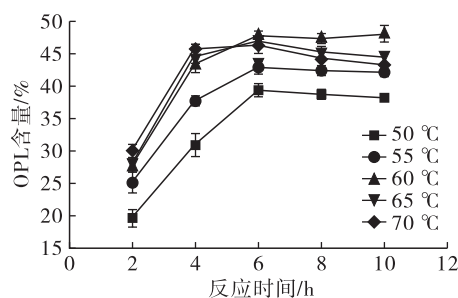


图4 反应温度对反应的影响

由图4可见,在反应时间超过6 h后,反应温度为60℃时,OPL的含量均高于其他温度,这也说明Lipozyme RM IM脂肪酶的最适反应温度约为60℃。因此,选择60℃作为合成OPL的反应温度。

通过探究不同反应条件对酶法合成OPL的影响,最终确定最适反应条件:PPP、油酸、亚油酸的摩尔比1:7:7,Lipozyme RM IM脂肪酶添加量8%,反应温度60℃,反应时间6 h。

2.3 小试放大实验

在酶法合成OPL最适反应条件下,进行50倍放大的小试实验,分析产物的总脂肪酸组成、sn-2位脂肪酸组成和甘油三酯组成,结果分别见表4、表5。

由表4可知,酸解产物与小试实验产物脂肪酸组成无明显差异,小试实验产物中主要是棕榈酸、油酸和亚油酸,含量分别为38.59%、32.45%和25.68%,同时sn-2位棕榈酸的含量为84.70%,明显高于人乳脂中棕榈酸的含量,因此添加OPL结构

脂,可有效提高婴幼儿配方奶粉中 sn-2 位棕榈酸的含量。

表 4 酸解产物和小试实验产物的总脂肪酸和 sn-2 脂肪酸组成

脂肪酸	总脂肪酸		sn-2 脂肪酸	
	酸解产物	小试实验产物	酸解产物	小试实验产物
C16:0	39.56 ± 0.75	38.59 ± 0.21	84.34 ± 1.01	84.70 ± 0.54
C18:0	3.33 ± 0.25	3.29 ± 0.12	3.62 ± 0.54	3.41 ± 0.13
C18:1	31.87 ± 0.47	32.45 ± 0.33	8.34 ± 0.34	8.28 ± 0.14
C18:2	25.15 ± 0.14	25.68 ± 0.40	3.70 ± 0.47	3.61 ± 0.35

表 5 酸解产物和小试实验产物的甘油三酯组成及含量

甘油三酯	酸解产物	小试实验产物
OLL	0.78 ± 0.21	0.66 ± 0.31
LPL	11.79 ± 1.22	12.12 ± 1.01
OOL	1.23 ± 0.33	1.13 ± 0.21
OPL	48.93 ± 0.77	48.37 ± 0.56
PPL	12.88 ± 0.56	13.50 ± 0.70
OPO	12.70 ± 0.98	12.30 ± 1.03
PPO	9.80 ± 0.25	10.49 ± 0.35
PPP	1.12 ± 0.31	0.72 ± 0.13
POS	0.77 ± 0.13	0.71 ± 0.10

由表 5 可知,酸解产物和小试实验产物在甘油三酯组成方面也无显著性差异,小试实验产物中,OPL 的含量为 48.37%,明显高于人乳脂中 OPL 的含量,产物中 OPO、PPO、PPL 等甘油三酯也是人乳脂中主要的甘油三酯,这对于调配模拟人乳脂甘油三酯组成的人乳替代脂具有重要意义。

3 结论

以分提后的棕榈硬脂与油酸、亚油酸为反应底物,在 Lipozyme RM IM 脂肪酶的催化作用下,发生酸解反应合成 OPL 结构脂。通过单因素实验确定合成 OPL 最优条件为:PPP、油酸、亚油酸摩尔比 1:7:7,Lipozyme RM IM 脂肪酶添加量 8%,反应温度 60℃,反应时间 6 h。在最优条件下,所得的 OPL 结构脂中棕榈酸、油酸和亚油酸的含量分别为 38.59%、32.45%、25.68%,sn-2 位棕榈酸的含量为 84.70%,同时 OPL 含量为 48.37%,这为制备与人乳脂高度相似的人乳替代脂奠定了基础。

参考文献:

[1] VICTORA C G, BAHL R, BARROS A J D, et al. Breast-feeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect[J]. *Lancet*, 2016, 387: 475-490.
 [2] SUN C, WEI W, ZOU X, et al. Evaluation of triacylglycerol composition in commercial infant formulas on the Chinese market: a comparative study based on fat source and stage[J]. *Food Chem*, 2018, 252: 154-162.

[3] SUN C, WEI W, SU H, et al. Evaluation of sn-2 fatty acid composition in commercial infant formulas on the Chinese market: a comparative study based on fat source and stage[J]. *Food Chem*, 2018, 242: 29-36.
 [4] WEI W, JIN Q Z, WANG X G. Human milk fat substitutes: past achievements and current trends[J]. *Prog Lipid Res*, 2019, 74: 69-74.
 [5] WANG X, ZOU S, MIU Z, et al. Enzymatic preparation of structured triacylglycerols with arachidonic and palmitic acids at the sn-2 position for infant formula use[J]. *Food Chem*, 2019, 283: 331-337.
 [6] 孙聪. 人乳替代脂的组成、相似性评价及制备研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2018.
 [7] TEN-DOMENECH I, BELTRAN-ITURAT E, MANUEL HERRERO-MARTINEZ J, et al. Triacylglycerol analysis in human milk and other mammalian species: small-scale sample preparation, characterization, and statistical classification using HPLC-ELSD profiles[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 5761-5770.
 [8] MORERA S, CASTELLOTE A I, JAUREGUI O, et al. Triacylglycerol markers of mature human milk[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2003, 57: 1621-1626.
 [9] TU A, MA Q, BAI H, et al. A comparative study of triacylglycerol composition in Chinese human milk within different lactation stages and imported infant formula by SFC coupled with Q-TOF-MS[J]. *Food Chem*, 2017, 221: 555-567.
 [10] YUAN T, QI C, DAI X, et al. Triacylglycerol composition of breast milk during different lactation stages[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 2272-2278.
 [11] WEI W, FENG Y, ZHANG X, et al. Synthesis of structured lipid 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol in both solvent and solvent-free system[J]. *LWT - Food Sci Technol*, 2015, 60: 1187-1194.
 [12] 黄磊. 酸解巴沙鲶鱼油制备富含 OPO 的人乳替代脂[J]. *中国油脂*, 2017, 42(5): 116-122.
 [13] JIMENEZ M J, ESTEBAN L, ROBLES A, et al. Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position by lipase-catalyzed acidolysis[J]. *Biochem Eng J*, 2010, 51: 172-179.