

固定化脂肪酶催化制备甘油三酯型鱼油

王升帆, 王庭, 郝锋剑, 宋丹华, 章鹏飞, 俞钰莉, 马娟, 许新德

(浙江医药股份有限公司 新昌制药厂, 浙江 新昌 312500)

摘要:以固定化脂肪酶作为催化剂,以甘油和鱼油乙酯为原料进行酯交换反应制备甘油三酯型鱼油。通过单因素试验考察了酶种类、真空度、反应温度、加酶量对酯交换反应的影响,并采用正交试验对酯交换反应条件进行了优化。结果表明:固定化脂肪酶催化制备甘油三酯型鱼油的最佳反应条件为 Novozym 435 脂肪酶作为催化剂、真空度 500 Pa、反应温度 50 ℃、加酶量 2%、反应时间 15 h,在该条件下产物中甘油三酯含量达到 78%,经过分子蒸馏后甘油三酯含量达到 82.08%;脂肪酶重复使用 15 次,酯交换反应后产物中甘油三酯含量仍能达到 74%。

关键词:脂肪酶;鱼油;甘油三酯;酯交换

中图分类号:TS225.2;Q55

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)08-0097-05

Preparation of triglyceride fish oil catalyzed by immobilized lipase

WANG Shengfan, WANG Ting, XI Fengjian, SONG Danhua,

ZHANG Pengfei, YU Yuli, MA Juan, XU Xinde

(Xinchang Pharmaceutical Factory, Zhejiang Medicine Co., Ltd., Xinchang 312500, Zhejiang, China)

Abstract: With immobilized lipase as catalyst, the triglyceride fish oil was prepared from fish oil ethyl esters and glycerol by transesterification. The effects of enzyme species, vacuum degree, reaction temperature, enzyme dosage on transesterification were investigated by single factor experiment, and the transesterification conditions were optimized by orthogonal experiment. The results showed that the optimal conditions of preparing triglyceride fish oil catalyzed by immobilized lipase were obtained as follows: Novozym 435 lipase as catalyst, vacuum degree 500 Pa, reaction temperature 50 ℃, enzyme dosage 2%, reaction time 15 h. Under these conditions, the triglyceride content reached 78%, and it could reach 82.08% after molecular distillation. The triglyceride content could reach 74% when the immobilized lipase was used for fifteen times.

Key words: lipase; fish oil; glycerides; transesterification

鱼油富含 Ω -3 脂肪酸,主要为二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),它们具有降血脂、增强免疫、改善和增强记忆、抗炎和改善视力等功效^[1-3]。目前市场上主要存在甘油三酯型鱼油和乙酯型鱼油,其中:乙酯型鱼油在人体中消化和吸收都比较困难,而且可能存在一些安全隐患^[4-5];甘

油三酯型鱼油是以天然形式存在的,人体容易吸收,几乎没有安全隐患,因此其认可度比较高。但是天然鱼油中的 EPA 和 DHA 含量比较低,通常只有 30% 左右^[6],无法满足消费者的需求。因此,开发高 EPA 和 DHA 含量的甘油三酯型鱼油可以有效综合利用海洋生物鱼油资源,提高鱼油保健医疗功效和产品的经济附加值。

甘油三酯型鱼油的传统制备方法是化学合成法,该法存在反应温度高,设备腐蚀严重,产品颜色深、品质差等缺点。而酶催化法制备甘油三酯型鱼油反应条件相对温和,可以在较低温度下进行,能够避免高温引起的多不饱和脂肪酸聚合、氧化、共轭化

收稿日期:2020-11-16;修回日期:2021-05-27

基金项目:浙江省重点研发计划(2019C01082)

作者简介:王升帆(1988),男,工程师,硕士,研究方向为酶工程及油脂加工(E-mail) wangshengfan@zmc-china.com。

通信作者:许新德,教授级高级工程师(E-mail) xuxinde@zmc-china.com。

和反式化等相关问题^[7-8]。近年来,越来越多的国内外学者对酶催化法制备高 EPA 和 DHA 含量甘油三酯型鱼油进行了研究。Medina 等^[9]用 Novozym 435 脂肪酶催化多不饱和脂肪酸和甘油合成甘油三酯,最佳条件下产品中 EPA 含量为 25.7%, DHA 含量为 44.7%。王卫飞等^[7]在叔丁醇溶剂体系中,以 Novozym 435 脂肪酶为催化剂,在甘油和多不饱和脂肪酸酯摩尔比 1:3、反应温度 50℃、加酶量 2%、反应时间 12 h 条件下进行反应,多不饱和脂肪酸酯转化率达到 51.5%;然后去除溶剂,在真空条件下继续反应 24 h 后,多不饱和脂肪酸酯的转化率可达到 87.8%,产物中甘油三酯占 67.1%,甘油二酯占 18.2%,甘油一酯占 2.1%。郭正霞等^[10]以国产固定化假丝酵母脂肪酶作为催化剂,催化乙酯型鱼油和甘油酯型鱼油进行酯交换制备高多不饱和脂肪酸含量的甘油酯型鱼油,在最优条件下得到的甘油酯产品中 EPA 和 DHA 含量分别为 33.4% 和 13.1%。宋诗军等^[11]首先通过脂肪酶催化鱼油选择性醇解,得到混合甘油酯,再将混合甘油酯作为底物,添加乙酯型鱼油,再以 Novozym 435 脂肪酶为催化剂,在酶添加量 2%、反应温度 60℃、真空度 100 Pa 条件下磁力搅拌反应 6 h,得到的产物经过分子蒸馏处理后,以甘油三酯为主的产品中 EPA 和 DHA 的含量分别为 40.4% 和 28.6%。郑建永等^[12]利用自制米曲霉脂肪酶为催化剂,以甘油酯型鱼油和乙酯型鱼油为底物,在最优的条件下反应 18 h,产物甘油酯型鱼油中 EPA 和 DHA 的总含量可达到 39.72%,催化剂米曲霉 WZ007 菌丝体在重复使用 6 次后,甘油酯型鱼油产品中的 EPA 和 DHA 总含量仍保持在 34.51%。由于现有工艺路线得到的甘油三酯型鱼油中 EPA、DHA 含量不高,另外甘油三酯比例达不到理想效果,因此需要寻求更好的酶法合成路线。

本文以固定化脂肪酶为催化剂,以高 EPA 和 DHA 含量的乙酯型鱼油和甘油为原料制备甘油三酯型鱼油。考察了酶种类、真空度、加酶量、反应温度对酯交换反应的影响,以期酶法合成高 DHA、EPA 含量甘油三酯型鱼油的工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

鱼油乙酯(EPA 含量 48.6%, DHA 含量 32.5%),新昌制药厂。Novozym 435、Lipozyme RM IM、Lipozyme TL IM(均为固定化酶)脂肪酶,诺维信

(中国)生物技术有限公司;二十碳五烯酸乙酯对照品、二十二碳六烯酸乙酯对照品、二十二碳六烯酸甘油三酯对照品、二十二碳六烯酸甘油二酯对照品、二十二碳六烯酸单甘酯对照品,NU-CHEK 公司;甘油,国药集团化学试剂有限公司;正己烷、异丙醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

旋转蒸发仪;SHB-11 水环真空泵;旋片真空泵;7890 气相色谱仪、1260 液相色谱仪(配 1260 示差检测器)、ZORBAX RX-SIL 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),美国 Agilent 公司;MD-S80 降膜分子蒸馏装置,广州汉维冷气机电有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 甘油三酯型鱼油的酶法合成

将甘油和鱼油乙酯按照摩尔比 1:3 置于 250 mL 三口瓶中,添加一定量的脂肪酶后置于恒温水浴锅中,在抽真空条件下,机械搅拌反应一定时间。反应完成后,过滤去除脂肪酶,得到酯交换产物。

1.2.2 产物组成分析

取 100 mg 样品溶解于 10 mL 流动相中,采用高效液相色谱法测定产物组成。色谱条件:进样量 20 μL,示差检测器,ZORBAX RX-SIL 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为正己烷-异丙醇(体积比 15:1),流速 0.8 mL/min,柱温 35℃。样品中各组分出峰先后顺序为甘油三酯、脂肪酸乙酯、1,3-甘油二酯、1,2-甘油二酯、单甘酯。采用面积归一化法定量。

1.2.3 分子蒸馏分离酯交换产物

采用降膜分子蒸馏装置在温度 150℃、真空度 2 Pa 条件下将乙酯和甘油酯分离。

1.2.4 脂肪酸组成分析

参考 GB/T 17376—2008《动植物油脂 脂肪酸甲酯制备》中的三氟化硼甲醇处理方法对样品进行甲酯化,再采用气相色谱分析脂肪酸组成。

气相色谱条件^[13]:HP-INNOWAX 色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);载气为高纯度氦气(纯度 99.999%),流速 1.8 mL/min;柱初始温度 170℃,保持 2 min,然后以 3℃/min 升温至 240℃,保持 2.5 min;FID 检测器温度 270℃;进样口温度 250℃;分流比 100:1;进样量 1 μL。采用面积归一化法定量。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 不同脂肪酶对甘油三酯合成的影响

脂肪酶的来源不同,甘油酯的催化合成能力也不同。在反应温度 50℃、加酶量 2%、真空度 500 Pa、反应时间 24 h 条件下,考察 Novozym 435、

Lipozyme RM IM、Lipozyme TL IM 3种脂肪酶对甘油三酯合成的影响,结果如图1所示。

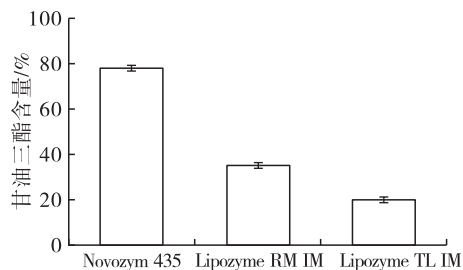


图1 不同脂肪酶对甘油三酯合成的影响

由图1可知,不同脂肪酶催化酯交换反应的结果差异明显,其中 Novozym 435 脂肪酶作为催化剂时酯交换产物中甘油三酯的含量最高,为78%,而 Lipozyme RM IM 和 Lipozyme TL IM 脂肪酶作为催化剂时甘油三酯含量分别为35%和20%,这可能与 Lipozyme RM IM 和 Lipozyme TL IM 为1,3特异性脂肪酶,酰基转移能力不强有关。因此,选用 Novozym 435 脂肪酶作为后续研究的催化剂。

2.1.2 真空度对甘油三酯合成的影响

鱼油乙酯和甘油在酯交换反应过程中会生成乙醇,不断移除乙醇可以使平衡向有利于甘油三酯生成的方向移动,从而提高甘油三酯的含量。采用脂肪酶 Novozym 435,在反应温度50℃、加酶量2%、反应时间24 h条件下,考察真空度对甘油三酯合成的影响,结果如图2所示。

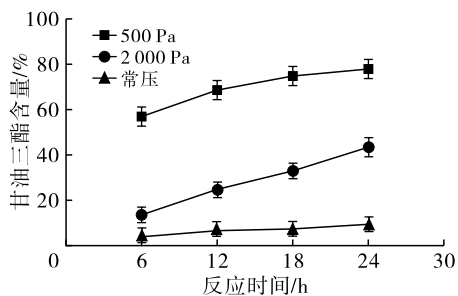


图2 真空度对甘油三酯合成的影响

由图2可知,在常压下反应24 h甘油三酯含量仅为10%左右,在2000 Pa真空度下反应24 h甘油三酯含量达到44%,而在500 Pa真空度下反应12 h甘油三酯含量达到69%,反应24 h达到78%。因此,真空环境可以有效提高酯交换反应的程度,且选择500 Pa真空度较为合适。

2.1.3 加酶量对甘油三酯合成的影响

在酶催化反应中加酶量对反应平衡的速度有很大影响。加酶量过小会延长反应达到平衡的时间,降低酶催化反应的效率,加酶量过大会增加酶的成本,因此选择合适的加酶量不仅能使反应快速达到

平衡,还可以在在一定程度上节约成本。在反应温度50℃、加酶量2%、真空度500 Pa、反应时间24 h条件下,考察加酶量对甘油三酯合成的影响,结果如图3所示。

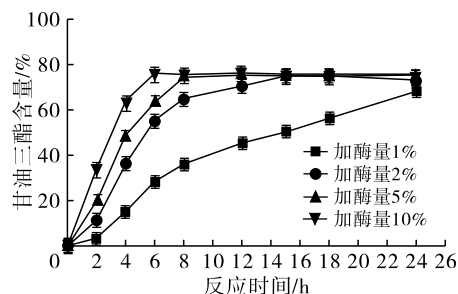


图3 加酶量对甘油三酯合成的影响

由图3可知,随着加酶量的增加,酯交换反应速率明显加快,加酶量为10%时反应6 h就达到平衡,加酶量为5%时反应8 h达到平衡,加酶量为2%时反应15 h达到平衡,而加酶量为1%时反应24 h仍未达到平衡。基于反应速率及成本考虑,选用2%加酶量较为合适。

2.1.4 反应温度对甘油三酯合成的影响

在加酶量2%、真空度500 Pa、反应时间15 h条件下,考察反应温度对甘油三酯合成的影响,结果如图4所示。

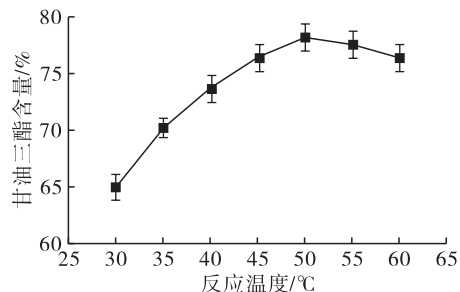


图4 反应温度对甘油三酯合成的影响

由图4可知,反应温度低于50℃时甘油三酯含量随反应温度升高而升高,当反应温度高于50℃时,甘油三酯含量随反应温度升高略有下降。这可能是因为反应温度升高一方面可以加快传质效果,另一方面高温使生成的乙醇更容易被去除,从而使反应向生成甘油三酯的方向进行。但是过高的温度可能导致酶部分失活,另外鱼油不饱和双键多,属于热敏物质,在较高温度条件下容易氧化降解,从而影响产品品质。综合考虑甘油三酯含量、能耗以及酶稳定性,选择50℃作为最佳反应温度。

2.2 正交试验

根据单因素试验结果,以 Novozym 435 脂肪酶为催化剂,设计四因素三水平正交试验,对脂肪酶催化制备甘油三酯型鱼油的工艺条件进行优化。正交

试验因素水平如表 1 所示,正交试验设计及结果如表 2 所示。

表 1 正交试验因素水平

水平	A 反应温度/℃	B 真空度	C 反应时间/h	D 加酶量/%
1	45	常压	14	1
2	50	2 000 Pa	15	2
3	55	500 Pa	16	3

表 2 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	甘油三酯含量/%
1	1	1	1	1	4.82
2	1	2	2	2	36.24
3	1	3	3	3	68.20
4	2	1	2	3	9.80
5	2	2	3	1	29.42
6	2	3	1	2	70.38
7	3	1	3	2	8.68
8	3	2	1	3	30.45
9	3	3	2	1	61.26
k_1	36.42	7.77	35.22	31.83	
k_2	36.53	32.04	35.78	38.43	
k_3	33.46	66.61	35.43	36.15	
R	3.07	58.84	0.56	6.60	

由表 2 可知,各因素对甘油三酯含量的影响大小依次为真空度 > 加酶量 > 反应温度 > 反应时间,最优因素水平组合为 $A_2B_3C_2D_2$,即真空度 500 Pa、加酶量 2%、反应温度 50℃、反应时间 15 h,在该条件下进行验证试验,得到甘油三酯含量为 78%、单甘酯含量小于 1% 的产品。

2.3 酶重复使用情况

在反应温度 50℃、加酶量 2%、真空度 500 Pa、反应时间 15 h 条件下,进行甘油三酯型鱼油的合成反应,反应结束后将脂肪酶过滤,然后加入新的物料进行下一批反应,考察脂肪酶的重复使用情况,结果如图 5 所示。

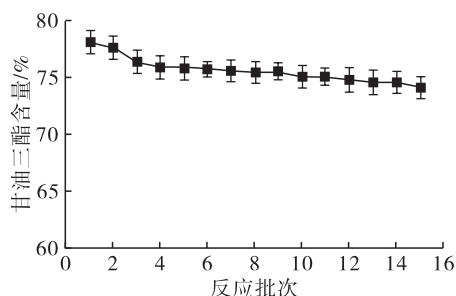


图 5 脂肪酶的重复使用情况

由图 5 可知,固定化脂肪酶 Novozym 435 的相

对酶活随着使用次数增加有所降低,但是重复使用 15 次,酯交换反应后产物中甘油三酯的含量为 74%,说明此酶在上述条件下进行酯交换反应的重复使用性好,可以作为生产用酶。

2.4 酯交换产物的分离

由于酯交换反应后得到的混合物中仍有少量的乙酯没有反应,为了获得较纯的甘油酯产品,采用分子蒸馏对乙酯和甘油酯进行分离。分子蒸馏前后产物的组成如表 3 所示。

表 3 分子蒸馏前后产物的组成 %

产物	乙酯	甘油三酯	甘油二酯	单甘酯
分子蒸馏前	6.60	78.00	15.25	0.15
分子蒸馏后	0.03	82.08	17.77	0.12

由表 3 可知,分子蒸馏后大部分乙酯被去除,残留的乙酯仅占 0.03%,单甘酯含量也下降到 0.12%,甘油三酯含量由 78.00% 增加到 82.08%,剩余部分为甘油二酯。分子蒸馏后的产物满足 USP 40 中 *Omega-3 Acid Triglycerides* 规定的甘油三酯型鱼油中甘油三酯含量大于 50% 的要求。将分子蒸馏后的产品进行脂肪酸组成分析,结果 EPA 含量为 48.4%,DHA 含量为 32.2%,基本与原料乙酯中 EPA 和 DHA 含量一致。

3 结论

本研究在无溶剂条件下利用固定化脂肪酶催化鱼油乙酯和甘油酯交换合成甘油三酯型鱼油。研究了酶种类、真空度、加酶量、反应温度对酯交换反应的影响,通过单因素试验和正交试验,得到最佳反应条件为利用 Novozym 435 脂肪酶作为催化剂、真空度 500 Pa、加酶量 2%、反应温度 50℃、反应时间 15 h,在此条件下酯交换产物中甘油三酯含量达 78%。酯交换产物通过分子蒸馏提纯,得到甘油三酯含量为 82.08% 的甘油三酯型鱼油产品。对固定化酶的重复使用情况进行了考察,结果表明固定化脂肪酶 Novozym 435 在重复使用 15 次后仍能够达到工艺目标,研究为甘油三酯型鱼油的产业化提供了有价值的参数。

参考文献:

- [1] 陈振华,吴克刚,黄杨彬. *Omega-3* 系多不饱和脂肪酸的生理作用[J]. 食品研究与开发, 2001, 22(5): 3-5.
- [2] ALONSO A, MARTINEZ M A. Fish *omega-3* fatty acids and risk coronary heart disease[J]. Med Clin, 2003, 121(1): 28-35.
- [3] 王国财,刘菊妍,苏薇薇,等. 鱼油中 EPA 和 DHA 的酶法富集工艺研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(5): 104-107.

(下转第 109 页)

- concerning mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: updates from last decade [J]. *Food Chem*, 2017, 215: 425 - 437.
- [8] HOU S L, MA J J, CHENG Y Q, et al. One - step rapid detection of fumonisin B₁, deoxynivalenol and zearalenone in grains [J/OL]. *Food Control*, 2020, 117: 107107 [2021 - 02 - 25]. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107107>.
- [9] 李喜田. 食用植物油加工质量的影响因素及控制[J]. *中国油脂*, 2020, 45(7): 110 - 113.
- [10] 张静. 浅析土壤污染现状与防治措施[J]. *农业与技术*, 2020 (11): 130 - 132.
- [11] 张驰, 谢文磊. 浅谈食用油脂的安全问题[J]. *食品安全导刊*, 2015(21): 29.
- [12] 姚晶, 樊婷, 苏春燕, 等. 食用植物油组分分析快速检测技术研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2020, 28(2): 97 - 102.
- [13] AL - RUZOUQ R, GIBRIL M B A, SHANABLEH A, et al. Sensors, features, and machine learning for oil spill detection and monitoring: a review [J/OL]. *Remote Sensing*, 2020, 12 (20): 3338 [2021 - 02 - 25]. <https://doi.org/10.3390/rs12203338>.
- [14] ZHAO Y, WANG H, ZHANG P, et al. Rapid multiplex detection of 10 foodborne pathogens with an up - converting phosphor technology - based 10 - channel lateral flow assay [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21342 [2021 - 02 - 25]. <https://doi.org/10.1038/srep21342>.
- [15] KONG D Z, LIU L Q, SONG S S, et al. A gold nanoparticle - based semi - quantitative and quantitative ultrasensitive paper sensor for the detection of twenty mycotoxins[J]. *Nanoscale*, 2016, 8: 5245 - 5253.
- [16] PENG J, LIU L Q, XU L G, et al. Gold nanoparticle - based paper sensor for ultrasensitive and multiple detection of 32 (fluoro) quinolones by one monoclonal antibody[J]. *Nano Res*, 2017, 10(1): 108 - 120.
- [17] 李向梅, 刘志威, 陈晓敏, 等. 食品安全免疫层析检测技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11 (15): 4939 - 4955.
- [18] RODA A, MICHELINI E, ZANGHERI M, et al. Smartphone - based biosensors: a critical review and perspectives[J]. *Trac - trend Anal Chem*, 2016, 79: 317 - 325.
- [19] 王忠兴, 郭玲玲, 匡华. 食品安全免疫层析检测技术研发及应用进展[J]. *生物产业技术*, 2019(4): 73 - 79.
-
- (上接第 100 页)
- [4] LAWSON L D, HUGHES B G. Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 152 (1): 328 - 335.
- [5] IKEDA I, SASAKI E, YASUNAMI H, et al. Digestion and lymphatic transport of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids given in the form of triacylglycerol, free acid and ethyl ester in rats [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1259:297 - 304.
- [6] 田龙, 林文, 王志祥, 等. 深海鱼油中 EPA 和 DHA 的富集方法研究进展[J]. *药物生物技术*, 2008, 15 (6): 489 - 492.
- [7] 王卫飞, 马永钧, 范海星, 等. 酶法合成富含 DHA、EPA 甘油三酯的研究[J]. *中国油脂*, 2011, 36(2): 5 - 8.
- [8] 潘志杰, 陈小娥, 王卫飞, 等. 脂肪酶催化鱼油醇解富集 EPA 和 DHA 的研究[J]. *农业机械*, 2012(3): 40 - 43.
- [9] MEDINA A R, CERDAN L E, GIMENEZ A G, et al. Lipase - catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils [J]. *J Biotechnol*, 1999, 70: 379 - 391.
- [10] 郭正霞, 孙兆敏, 张芹, 等. 酶法催化乙酯甘油酯酯交换制备富含 EPA 和 DHA 的甘油酯[J]. *食品工业科技*, 2012(20): 176 - 180.
- [11] 宋诗军, 夏松养, 林晓坪, 等. 酶法制备高含量 EPA、DHA 甘油酯[J]. *农业机械*, 2013(11): 47 - 51.
- [12] 郑建永, 张石自, 王升帆, 等. 米曲霉脂肪酶催化鱼油酯交换制备高含量 EPA/DHA 甘油酯的研究[J]. *中国油脂*, 2017, 42(7): 111 - 114.
- [13] 洪毅敏, 马金萍, 张艳纹, 等. 气相色谱法测定乙酯型鱼油微胶囊产品中 EPA 乙酯和 DHA 乙酯含量[J]. *中国油脂*, 2015, 40(12): 88 - 91.