

分子蒸馏纯化富含中长碳链甘油三酯的人乳替代脂

缪智诚,王雅寓,徐文迪,杨壮壮,王小三,金青哲,王兴国

(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)

摘要:酶法合成富含中长碳链甘油三酯的人乳替代脂,选用分子蒸馏技术对酯交换产物进行纯化。在进料温度 65 °C、冷凝器温度 30 °C、压力 1 Pa、刮板转速 120 r/min、进料速度 2.5 mL/min 条件下,探究了分子蒸馏温度对重相组成的影响,确定最佳分子蒸馏温度为 210 °C。经过分子蒸馏后,大部分的甘油二酯及游离脂肪酸被去除,产品中甘油三酯含量可达 97.22%,甘油三酯中 MLCT 含量增加到 74.82%。

关键词:中长碳链甘油三酯;人乳替代脂;分子蒸馏;蒸馏温度

中图分类号:TS201.2;TQ028 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)02-0032-07

Molecular distillation purification of human milk fat substitutes rich in medium and long chain triacylglycerols

MIAO Zhicheng, WANG Yayu, XU Wendi, YANG Zhuangzhuang, WANG Xiaosan, JIN Qingzhe, WANG Xingguo

(Synergetic Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Human milk fat substitutes rich in medium and long chain triglycerides (MLCT) were synthesized by enzymatic method, and the transesterification products were purified by molecular distillation technology. The effects of molecular distillation temperature on the composition of heavy phase was investigated under the conditions of feeding temperature 65 °C, condenser temperature 30 °C, pressure 1 Pa, scraper speed 120 r/min and feeding speed 2.5 mL/min. The optimal molecular distillation temperature was determined to be 210 °C. After molecular distillation, most of the diglycerides and free fatty acids were removed, and the content of triglycerides in the product could reach 97.22%, and the content of MLCT in triglycerides increased to 74.82%.

Key words: medium and long chain triglyceride; human milk fat substitutes; molecular distillation; molecular distillation temperature

中长碳链甘油三酯 (MLCT) 是指甘油骨架上同时含有中链脂肪酸 (MCFA) 和长链脂肪酸 (LCFA) 的结构脂。MLCT 同时含有 MCFA 和 LCFA, 一方面有利于婴儿消化吸收, 另一方面可以实现脂肪酸的同步运输, 使 MCFA 以一个更可控的水解速率释放

到血液中, 避免了酮体过量中毒, 与传统的长碳链甘油三酯 (LCT)、中碳链甘油三酯 (MCT) 相比, MLCT 在营养代谢方面存在诸多优势, 有益于婴儿的生长发育^[1-2]。研究发现 MCFA 及其单甘油酯特殊的抗菌活性对婴儿早期肠道菌群的建立有一定的影响, 能够促进乳杆菌及双歧杆菌的生长, 抑制变形菌的生长^[3]。婴儿配方奶粉中通常以添加椰子油的形式补充 MCFA, 其甘油三酯结构与母乳中 MLCT 的结构存在较大的差异。目前, 国内外虽已有大量合成 MLCT 的相关研究^[4-5], 但是以母乳甘油三酯为模板合成 MLCT 人乳替代脂的报道尚少。因此, 合

收稿日期: 2019-04-11; 修回日期: 2019-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助 (31701559)

作者简介: 缪智诚 (1997), 男, 在读本科, 研究方向为脂质科学与技术 (E-mail) 18861812331@163.com。

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

成与母乳甘油三酯结构相似的 MLCT 人乳替代脂有助于婴儿配方奶粉在化学组成上更加接近母乳。

MLCT 酶法酯交换合成的反应过程主要是水解反应和酯化反应^[6],因此粗产物中都会含有杂质,如游离脂肪酸、甘油二酯等,除去产物中的这些杂质可以提高 MLCT 结构脂的纯度,得到高质量、高附加值的产品。分子蒸馏是一种应用较广泛的物理分离纯化结构脂的方法,具有分离程度高、物料停留时间短、操作温度远低于物料在常压下的沸点、绿色环保等优点,适合分离纯化高沸点、热敏性的物质^[7]。分子蒸馏的原理是根据不同分子的平均自由程不同进行分离,酯交换制备 MLCT 的过程中产生的游离脂肪酸、甘油二酯等副产物与甘油三酯的相对分子质量差异较大,因此可以考虑采用分子蒸馏去除。

本文采用两步酶法合成 MLCT,先用棕榈硬脂与油酸、亚油酸进行酶法酸解合成富含 OPO(O 为油酸,P 为棕榈酸)和 OPL(L 为亚油酸)的结构脂,再将富含 OPO 和 OPL 的结构脂与椰子油酶法酯交换制备富含 MLCT 的结构脂。探讨了分子蒸馏法对分离纯化 MLCT 的影响,从而得到高附加值的 MLCT。

1 材料与方法

1.1 实验材料

棕榈硬脂(熔点 58℃),益海嘉里有限公司;精炼椰子油,东海粮油工业(张家港)有限公司;油酸(85%),阿拉丁有限公司;固定化脂肪酶 NS40086,诺维信生物技术有限公司;猪胰脂肪酶, Sigma - Aldrich(中国)公司;薄层层析硅胶板(10 cm × 20 cm),乳山市太阳干燥剂有限公司。亚油酸(65%)、无水乙醇、无水乙醚、冰醋酸、正己烷、丙酮、甲醇、脱氧胆酸钠、氯化钙、Tris、盐酸、氢氧化钾、无水硫酸钠、酚酞、2,7-二氯荧光素、高真空硅脂,国药集团化学试剂有限公司;乙腈、异丙醇、正己烷,色谱纯,百灵威科技公司。

HH-601 型恒温水浴锅,金坛市精达仪器有限公司;RT 10 磁力搅拌器,艾卡(广州)仪器设备有限公司;Agilent 7820A 气相色谱仪、Agilent 1260 高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;Alltech 3300 蒸发光散射检测器,美国 Grace 公司;Waters 1525 高效液相色谱仪、2414 型示差检测器、Waters Acquity UPLC、Waters Xevo G2-S Q-TOF 质谱仪(分辨率 32500(FWHM)),沃特世科技有限公司;KDL2 短程分子蒸馏设备,德国 UIC 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 高熔点棕榈硬脂的分提

参考徐文迪等^[8]的方法进行棕榈硬脂的分提。

1.2.2 酶法合成富含 OPO 和 OPL 的结构脂

参考徐文迪等^[8]的方法,将分提后的棕榈硬脂与油酸及亚油酸进行酶法酸解反应合成富含 OPO 和 OPL 的结构脂。

1.2.3 酶法合成富含 MLCT 的人乳替代脂

将富含 OPO 和 OPL 的结构脂与椰子油按照底物摩尔比($n(\text{OPO} + \text{OPL}) : n(\text{椰子油})$)0.8:1 混合,待反应底物完全熔化后加入底物总质量 8% 的固定化脂肪酶 NS40086 催化反应,间歇式酶反应在分批式夹套加热搅拌反应釜中进行,反应温度 65℃,磁力搅拌转速 350 r/min,反应时间 6 h。反应结束后,离心除去脂肪酶,得到含 MLCT 的酯交换产物。

1.2.4 分子蒸馏纯化

采用分子蒸馏除去酯交换产物中的部分杂质,包括游离脂肪酸、甘油二酯及部分 MCT。分子蒸馏条件:蒸馏温度 180~230℃;压力 1 Pa;进料速度 2.5 mL/min;刮板转速 120 r/min;冷凝器温度 30℃。

1.2.5 检测方法

1.2.5.1 总脂肪酸组成分析

脂肪酸甲酯的制备参考 GB 5009.168—2016。

气相色谱条件:Agilent 7820A 气相色谱仪;Trace TR-FAME 色谱柱(60 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Thermo Fisher Scientific);氢火焰离子化检测器;检测器和进样口温度 250℃;升温程序为初始柱温 100℃,保留 1 min,随后以 5℃/min 的速率升温到 220℃,保留 15 min。通过对比混合脂肪酸甲酯标准品的保留时间对脂肪酸进行定性。

1.2.5.2 sn-2 位脂肪酸组成分析

样品 sn-2 位单甘酯的制备按照 GB/T 24894—2010 进行,再根据 GB 5009.168—2016 甲酯化方法处理后,将待测样过膜进行气相色谱检测,检测条件同 1.2.5.1。

1.2.5.3 甘油酯组成分析

RP-HPLC-ELSD 分析样品的甘油三酯组成。样品溶于色谱纯正己烷中,质量浓度为 20 mg/mL,进样量 10 μL。色谱条件:蒸发光散射检测器;Li-chrospher C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm);柱温 30℃;梯度洗脱程序为 0~40 min 60% 乙腈 + 40% 异丙醇,45~85 min 55% 乙腈 + 45% 异丙醇,90 min 60% 乙腈 + 40% 异丙醇;洗脱流速 0.8 mL/min;雾化室温度 55℃;气体流速 1.8 L/min;增益 1。采用峰面积归一化法定量。

NP-HPLC 分析甘油酯、游离脂肪酸含量。参考 Wang 等^[9]方法并稍作修改。样品溶解于流动相中,质量浓度为 20 mg/mL,进样量 20 μL。色谱条件:示

差检测器; Sepax HP - Silica 硅胶柱(4.6 mm × 250 mm × 5 μm); 柱温 35 °C; 流动相为正己烷 - 异丙醇 - 甲酸(体积比 15:1:0.03), 洗脱流速 1 mL/min。

UPLC - Q - TOF - MS 鉴定甘油三酯的构型。采用配备 BEH C18 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.9 μm) 和四级杆飞行时间质谱仪的超高效液相色谱系统鉴定甘油三酯的构型。色谱及质谱条件参考 Zhang 等^[10]的方法。

2 结果与讨论

2.1 分提后的棕榈硬脂及富含 OPO 和 OPL 结构脂的甘油三酯组成(见表 1)

表 1 分提后的棕榈硬脂及富含 OPO 和 OPL 结构脂的甘油三酯组成 %

甘油三酯	分提后的棕榈硬脂	富含 OPO 和 OPL 的结构脂
LPL	ND	1.48 ± 0.33
OOL	ND	0.47 ± 0.15
OPL	ND	30.06 ± 1.21
PPL	ND	6.05 ± 0.50
OOO	ND	0.45 ± 0.17
OPO	ND	39.20 ± 1.94
PPO	0.56 ± 0.08	20.79 ± 1.23
PPP	93.54 ± 0.37	0.96 ± 0.12
POS	5.90 ± 0.17	0.54 ± 0.14

注: P. C16:0; S. C18:0; O. C18:1; L. C18:2; ND. 未检出。

由表 1 可知, 分提后的棕榈硬脂中 PPP 占比高达 93.54%, 结构脂中 OPO 的含量最高, 达到了 39.20%, 其次是 OPL, 含量为 30.06%。

2.2 富含 MLCT 的酯交换产物的脂肪酸组成及甘油三酯组成

富含 MLCT 的酯交换产物总脂肪酸和 sn - 2 位脂肪酸组成见表 2。

表 2 富含 MLCT 的酯交换产物的总脂肪酸和 sn - 2 位脂肪酸组成 %

脂肪酸	总脂肪酸	sn - 2 位脂肪酸
C8:0	4.09 ± 0.14	ND
C10:0	2.76 ± 0.12	0.95 ± 0.14
C12:0	25.51 ± 0.31	31.14 ± 0.23
C14:0	10.44 ± 0.16	7.22 ± 0.15
C16:0	23.65 ± 0.28	39.56 ± 0.34
C18:0	2.70 ± 0.11	2.79 ± 0.14
C18:1	22.53 ± 0.24	13.61 ± 0.14
C18:2	8.32 ± 0.16	4.74 ± 0.11

由表 2 可知: 富含 OPO 和 OPL 的结构脂和椰子油经过酯交换得到的富含 MLCT 的酯交换产物同时含有中链脂肪酸和长链脂肪酸; sn - 2 位脂肪酸中含量最高的是棕榈酸, 其次是月桂酸, 这是由于两种

原料油的 sn - 2 位分别含有高含量的棕榈酸和月桂酸, 在 sn - 1, 3 位特异性脂肪酶的催化作用下进行酯交换反应后, 得到的产物中 sn - 2 位仍保留高含量的棕榈酸和月桂酸。

酶法酯交换产物经过 UPLC - Q - TOF - MS 分析其甘油三酯组成, 结果如表 3 所示。由表 3 可知, 酯交换产物中有 44 种甘油三酯, 其中含有大量的 MLCT。OPLa 是含量最高的 MLCT, 其在人乳脂中也是含量最高的 MLCT。酯交换产物中其他的 MLCT, 如 LPLa、OLaL、OLaO、OPCa、OMLa、OLaLa、LLaLa 都是人乳脂中含量较高的 MLCT^[11]。酯交换产物中还含有一些 MLCT 是人乳脂中存在但含量较低的, 如 LLaCa、OLaCa、PMLa、LaLaM、PLaLa、OOCa、PPLa; 酯交换产物中还有少量的 MLCT 是在人乳脂中未检测到的, 主要是一些含有辛酸的 MLCT, 包括 OCaCy、LLaCy、OLaCy、OLCy、OOCy。辛酸的相对分子质量较小, 可采用分子蒸馏去除部分含有辛酸的 MLCT。除 MLCT 之外, 酯交换产物中还含有一部分未完全反应的 MCT, 可采用分子蒸馏去除部分。

表 3 UPLC - Q - TOF - MS/MS 鉴定酯交换产物的甘油三酯组成

甘油三酯	[M + NH ₄] ⁺ (m/z)	[DAG] ⁺ (m/z)	相对含量/%
LaCyCy	544.42	383.21 327.23 383.21	0.46 ± 0.08
LaCaCy	572.45	355.27 383.31 411.33	0.97 ± 0.13
LCaCy	652.43	355.27 463.37 491.41	0.32 ± 0.06
LaLaCy	600.47	383.28 411.32 439.35	2.47 ± 0.24
LaLaCa	628.51	411.33 411.33 439.35	3.31 ± 0.35
OCaCy	654.54	355.26 465.39 493.39	0.86 ± 0.12
LLaCy	680.54	383.31 463.36 519.41	1.06 ± 0.18
LCaCa	680.54	383.29 491.45 491.45	0.18 ± 0.03
LLaCa	708.58	411.34 491.4 519.42	1.18 ± 0.17
LaLaLa	656.52	439.36 439.36 439.36	5.11 ± 0.34
LLaLa	736.59	439.36 495.41 495.41	3.30 ± 0.21
OLaCy	682.54	383.31 465.38 521.43	3.20 ± 0.19
OLCy	762.62	463.36 465.39 601.5	0.50 ± 0.04
OLaCa	710.58	411.33 493.41 521.43	3.03 ± 0.22
LaLaM	684.56	467.37 467.37 439.36	5.20 ± 0.38
LLaL	816.68	519.42 519.42 599.47	0.49 ± 0.13
OOCy	764.63	465.38 465.38 603.51	2.83 ± 0.24
OLaLa	738.61	439.35 521.43 521.43	6.44 ± 0.41
PLaLa	712.59	439.35 495.41 495.41	5.61 ± 0.36
OLaL	820.69	519.41 521.43 601.48	2.69 ± 0.18
LPLa	792.65	495.42 519.41 575.47	3.59 ± 0.25
OOCa	792.65	493.44 603.54 603.54	0.34 ± 0.07
OPCa	766.63	467.38 493.40 577.51	1.32 ± 0.14
OMLa	766.63	467.38 521.44 549.46	3.34 ± 0.18

续表 3

甘油三酯	$[M + NH_4]^+$ (m/z)	$[DAG]^+$ (m/z)			相对含量/%
PMLa	740.63	467.38	495.41	523.44	4.49 ± 0.27
LPL	872.73	575.49	575.49	599.49	0.31 ± 0.05
OML	846.71	547.45	549.47	601.49	0.76 ± 0.10
OLaO	820.69	521.43	521.43	603.51	4.88 ± 0.38
OPLa	794.65	495.42	521.43	577.49	6.60 ± 0.49
OMM	794.65	495.42	549.49	549.49	0.59 ± 0.05
PPLa	768.65	495.42	495.40	551.47	4.44 ± 0.24
OOL	900.76	601.49	601.49	603.50	0.66 ± 0.07
OPL	874.73	575.47	577.48	601.49	2.03 ± 0.21
OMO	848.73	549.47	549.47	603.51	1.16 ± 0.32
PPL	848.73	575.47	575.47	551.49	0.22 ± 0.06
OPM	822.69	523.44	549.47	603.51	3.67 ± 0.34
PPM	796.69	523.44	523.44	551.46	2.29 ± 0.28
OOO	902.77	603.53	603.53	603.53	0.73 ± 0.27
OPO	876.74	577.48	577.48	603.51	3.13 ± 0.41
PPO	850.73	551.48	577.48	577.48	3.50 ± 0.39
PPP	824.73	551.47	551.47	551.47	1.32 ± 0.33
POS	878.77	577.51	579.51	605.53	0.79 ± 0.18
PPS	852.76	551.48	579.51	579.51	0.32 ± 0.08
OOS	904.85	605.53	605.53	603.53	0.31 ± 0.06

注: Cy. C8:0; Ca. C10:0; La. C12:0; M. C14:0; P. C16:0; S. C18:0; O. C18:1; L. C18:2。

2.3 分子蒸馏纯化富含 MLCT 的人乳替代脂

2.3.1 分子蒸馏温度对重相甘油酯组成的影响

采用 NP-HPLC 分析重相的游离脂肪酸(FFA)、甘油二酯及甘油三酯含量,结果如表 4 所示。

表 4 重相甘油酯组成 %

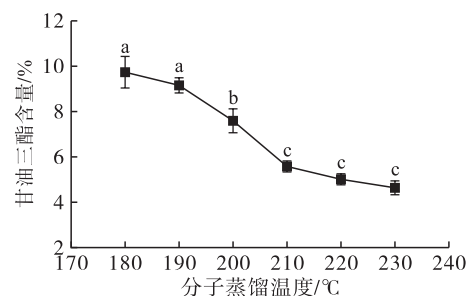
分子蒸馏	甘油三酯	甘油二酯	FFA
分子蒸馏前	86.07 ± 0.82	9.67 ± 0.27	4.26 ± 0.16
分子蒸馏后			
180 °C	95.09 ± 0.74	3.90 ± 0.25	1.01 ± 0.13
190 °C	95.90 ± 0.92	3.28 ± 0.18	0.82 ± 0.11
200 °C	96.94 ± 0.88	2.76 ± 0.13	0.30 ± 0.07
210 °C	97.22 ± 0.75	2.62 ± 0.14	0.15 ± 0.09
220 °C	98.29 ± 0.71	1.61 ± 0.11	0.10 ± 0.06
230 °C	98.58 ± 0.82	1.30 ± 0.15	0.12 ± 0.08

由表 4 可以看出,经过分子蒸馏,重相中甘油三酯含量从 86.07% 提高到 95% 以上,且甘油三酯含量随着分子蒸馏温度升高而增加。这是由于分子蒸馏温度升高,分子的平均自由程增加^[12],甘油二酯和游离脂肪酸等小分子物质更容易到达冷凝面,从而被分离到轻相中。

2.3.2 分子蒸馏温度对重相甘油三酯组成的影响

采用 RP-HPLC-ELSD 测定重相的甘油三酯

组成,结果如图 1~图 3 所示。



注:字母不同表示差异显著($p < 0.05$),下同。

图 1 分子蒸馏温度对重相甘油三酯(ECN < 38)含量的影响

由图 1 可知,重相中相对分子质量小的甘油三酯(ECN < 38)的含量随着分子蒸馏温度的升高而降低,这些甘油三酯主要是 MCT。说明分子蒸馏温度越高,越来越多的 MCT 分子从重相逃逸到轻相中,当分子蒸馏温度达到 210 °C 时,这部分甘油三酯的含量已降低为 5.67%,当继续升高分子蒸馏温度时,变化幅度减小,没有出现显著性的差异。

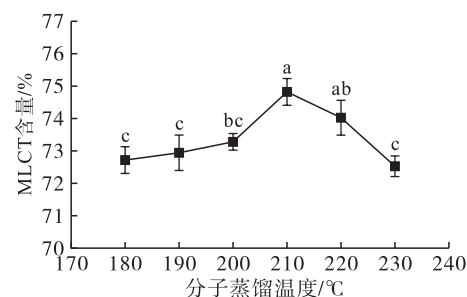


图 2 分子蒸馏温度对重相 MLCT(ECN = 38 ~ 44)含量的影响

重相中 MCT 含量随着分子蒸馏温度的升高而降低,理论上 MLCT 含量会相应增加,但是由图 2 可知,重相中 MLCT(ECN = 38 ~ 44)含量却随着分子蒸馏温度的升高先增加后降低,在分子蒸馏温度达到 210 °C 时,MLCT 含量达到最大值。这是因为随着分子蒸馏温度的升高,越来越多的 MCT 被蒸发到轻相中,MCT 含量的减少使得重相 MLCT 的含量增加,当分子蒸馏温度从 200 °C 升高到 210 °C 时,MLCT 的含量明显增加,表明结构脂中大部分的 MCT 都可在 210 °C 时被分离到轻相中。然而在升温过程中,一些相对分子质量较小的 MLCT 也会逐渐地被分离到轻相中。当分子蒸馏温度较低时,MCT 分子的逃逸占主导地位,MLCT 分子不及 MCT 分子减少的量多,使得 MLCT 的含量整体仍呈现增加的趋势;当分子蒸馏温度继续升高,大部分的 MCT 分子已被蒸发到轻相中,越来越多的 MLCT 分子被蒸发到轻相中,导致重相中 MLCT 含量降低。

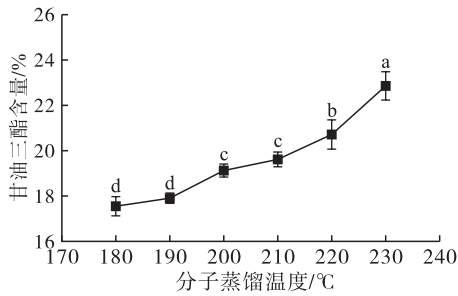


图3 分子蒸馏温度对重相甘油三酯(ECN >44)含量的影响

由图3可知,随着分子蒸馏温度的升高,重相中相对分子质量较大的甘油三酯(ECN > 44)含量一直呈增加的趋势,这些甘油三酯大部分是LCT。这

是由于分子蒸馏温度升高有利于小分子的MCT和MLCT逃逸到冷凝面,导致大部分的MCT及部分相对分子质量较小的MLCT分子被回收到轻相中,LCT由于其自身的相对分子质量大,分子的平均自由程较小,在蒸发过程中无法到达冷凝面,而返回到重相中,从而使得LCT的含量随着分子蒸馏温度的升高而持续增加。

2.3.3 分子蒸馏温度对重相脂肪酸组成的影响

从前面的分析可知分子蒸馏温度会影响重相甘油三酯组成,可以推断重相脂肪酸组成也会受到相应的影响。不同分子蒸馏温度下重相脂肪酸组成如表5所示。

表5 不同分子蒸馏温度下重相脂肪酸组成

脂肪酸	脂肪酸含量/%					
	180 °C	190 °C	200 °C	210 °C	220 °C	230 °C
C8:0	2.67 ± 0.21	2.42 ± 0.24	2.12 ± 0.15	1.78 ± 0.16	1.55 ± 0.11	1.50 ± 0.11
C10:0	2.58 ± 0.18	2.46 ± 0.20	2.21 ± 0.16	2.01 ± 0.13	1.73 ± 0.20	1.52 ± 0.17
C12:0	22.01 ± 0.22	21.46 ± 0.24	20.95 ± 0.26	20.23 ± 0.37	18.91 ± 0.32	18.18 ± 0.28
C14:0	9.62 ± 0.28	9.35 ± 0.14	9.09 ± 0.31	9.06 ± 0.33	8.82 ± 0.36	8.41 ± 0.16
C16:0	26.83 ± 0.23	27.04 ± 0.34	27.38 ± 0.41	27.94 ± 0.20	28.51 ± 0.17	29.14 ± 0.13
C18:0	2.71 ± 0.21	2.92 ± 0.16	3.02 ± 0.13	3.11 ± 0.25	3.12 ± 0.17	3.25 ± 0.13
C18:1	24.04 ± 0.27	24.48 ± 0.28	25.14 ± 0.21	25.48 ± 0.28	26.49 ± 0.28	26.94 ± 0.21
C18:2	9.57 ± 0.18	9.88 ± 0.16	10.11 ± 0.18	10.41 ± 0.25	10.88 ± 0.14	11.07 ± 0.41

由表5可知,当分子蒸馏温度在180~230 °C范围内变化时,中链脂肪酸含量随分子蒸馏温度的升高而降低,长链脂肪酸(除C14:0)含量变化则相反。这是由于中链脂肪酸主要来源于MCT和MLCT,随着分子蒸馏温度的升高,甘油三酯中大部分的MCT和一部分MLCT被蒸发到轻相中,导致重相中的中链脂肪酸含量减少。C14:0的含量均随着分子蒸馏温度的升高而降低的原因是由于C14:0的相对分子质量比其他长链脂肪酸的相对分子质量小,一些含有C14:0的甘油三酯在分子蒸馏过程中会被部分分离到轻相,如LaLaM,从而导致C14:0的含量降低。

综上所述,最终选择210 °C作为纯化MLCT的最优分子蒸馏温度,在此温度下产物中的甘油三酯含量可达到97.22%,产物中MLCT的含量最高,MCT的含量相对较低。

2.3.4 分子蒸馏纯化产物的脂肪酸组成

最优条件下分子蒸馏纯化产物的脂肪酸组成如表6所示。由表6可知,分子蒸馏纯化产物的总脂肪酸和sn-2位脂肪酸中含量最高的3种脂肪酸为棕榈酸、油酸和月桂酸。与表2对比发现,分子蒸馏

后碳原子数16及以上的脂肪酸含量提高,碳原子数16以下的脂肪酸含量降低。这是由于部分MLCT经过分子蒸馏之后被除去,导致结构脂中的中链脂肪酸含量降低。C8:0和C10:0在母乳的总脂肪酸组成中含量很少^[13-15],通过分子蒸馏除去了产物中部分的C8:0和C10:0,两者的总含量从6.85%降低到3.79%。

表6 分子蒸馏后产物的脂肪酸组成 %

脂肪酸	总脂肪酸	sn-2位脂肪酸
C8:0	1.78 ± 0.16	ND
C10:0	2.01 ± 0.13	0.77 ± 0.12
C12:0	20.23 ± 0.37	25.09 ± 0.34
C14:0	9.06 ± 0.33	7.10 ± 0.26
C16:0	27.94 ± 0.20	41.46 ± 0.38
C18:0	3.11 ± 0.25	3.27 ± 0.15
C18:1	25.48 ± 0.28	16.21 ± 0.17
C18:2	10.41 ± 0.25	6.11 ± 0.13

2.3.5 分子蒸馏纯化产物的甘油三酯组成

采用RP-HPLC-ELSD对分子蒸馏纯化产物的甘油三酯组成进行分析,结果见表7。由表7可知,酯交换产物经过分子蒸馏纯化之后,甘油三酯中

的相对分子质量较小的甘油三酯含量大大降低,从14.53%下降为5.56%,而MLCT含量从67.37%增加到74.82%。

表7 RP-HPLC-ELSD测定的分子蒸馏前后

产物的甘油三酯组成及含量		%
ECN	分子蒸馏前	分子蒸馏后
32	2.53 ± 0.28	0.30 ± 0.05
34	3.54 ± 0.42	0.98 ± 0.10
36	8.46 ± 0.57	4.28 ± 0.25
<38	14.53 ± 1.27	5.56 ± 0.24
38	9.22 ± 0.33	8.38 ± 0.53
40	21.09 ± 0.85	21.84 ± 0.17
42	15.60 ± 0.61	18.91 ± 0.46
44	21.47 ± 0.92	25.69 ± 0.74
38~44	67.37 ± 1.48	74.82 ± 0.41
46	10.73 ± 0.38	11.70 ± 0.20
48	7.36 ± 0.59	7.92 ± 0.11
>44	18.10 ± 0.21	19.62 ± 0.32

注:ECN = 38~44为MLCT。

由于产物中甘油三酯的种类较多,根据RP-HPLC-ELSD的测定结果只能根据ECN值初步判定MLCT总含量的增减情况,但是具体到每一种甘油三酯的变化,还应该采用UPLC-Q-TOF-MS得到更加细致准确的结果。图4(A)和(B)分别为分子蒸馏前和分子蒸馏后的产物经UPLC测定的总离子流图。

从图4可以看出,经过分子蒸馏之后,8 min之前甘油三酯的相对含量明显降低,主要是一些相对分子量较小的中碳链甘油三酯。具体的甘油三酯组成如表8所示。对比表3可知,分子蒸馏之后,在人乳脂中含量较高的几种MLCT^[11](OPLa、LPLa、OLaL、OLaO、OMLa、LLaLa)的含量得到了不同程度的提高,其中OLaL、OMLa、LPLa、OLaO的含量变化较大。分子蒸馏之后OPLa仍是含量最高的MLCT,这与其在人乳脂MLCT中含量最高保持一致。人乳脂中含有辛酸的MLCT的含量较少,分子蒸馏之后,含有辛酸的MLCT(LCaCy、OCaCy、LLaCy、OLaCy、OLCy、OOCy)的总含量有所降低,与其他含有辛酸的MLCT的含量呈减少的变化趋势不同,OOCy和OLCy的含量有所提高,这是由于这两种MLCT分子中含有两个长链脂肪酸,比只含有一个长链脂肪酸的MLCT的相对分子质量更大,不易分离。原产物中含量较高的3种中碳链甘油三酯LaLaCy、LaLaCa及LaLaLa的含量分别从2.47%、3.31%及5.11%降低到0.23%、0.63%和2.43%。由于LCT的相对分子质量较大,需要更高的蒸馏温度才能将其从重相分离,因此在纯化过程中并不能除去LCT,但是产物中含量较高的LCT都是人乳中常见的甘油三酯,如OPO、OPL、OPM等,也属于人乳替代脂的一部分。

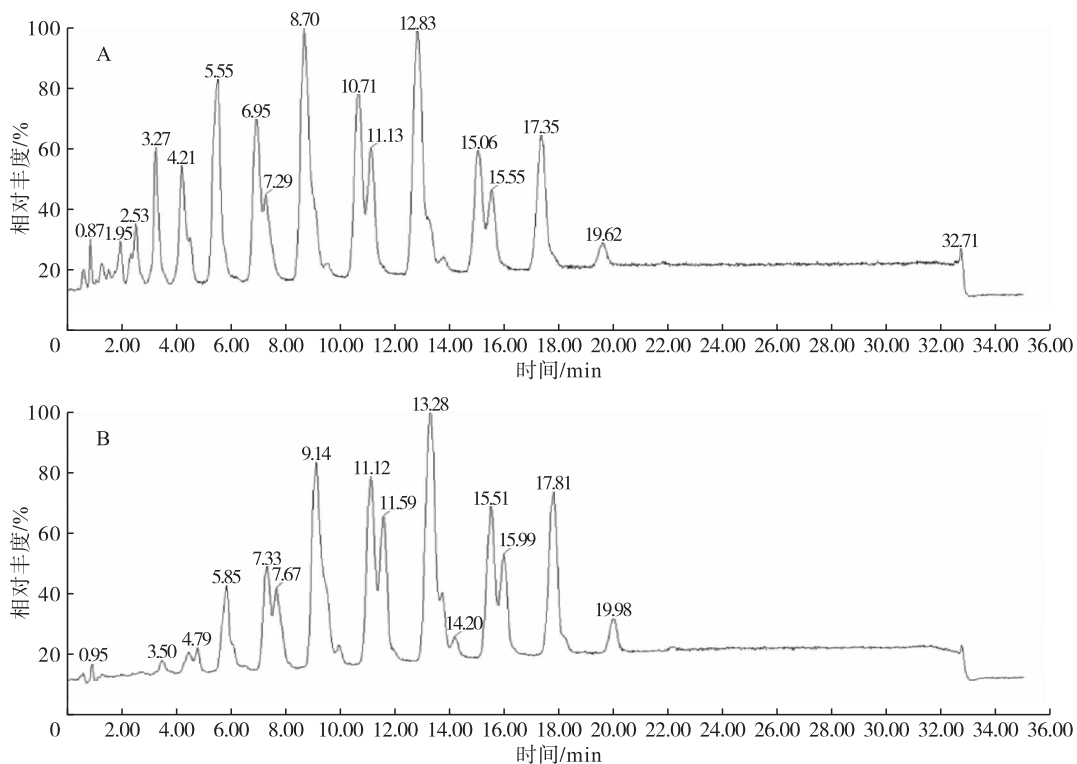


图4 分子蒸馏前(A)和分子蒸馏后(B)的产物的总离子流图

表 8 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定的分子蒸馏后产物的甘油三酯组成

甘油三酯	$[M + NH_4]^+$ (m/z)	$[DAG]^+$ (m/z)			相对含量/%
LaCyCy	544.42	383.21	327.23	383.21	0.01 ± 0.01
LaCaCy	572.45	355.27	383.31	411.33	0.04 ± 0.02
LCaCy	652.43	355.27	463.37	491.41	0.10 ± 0.04
LaLaCy	600.47	383.28	411.32	439.35	0.23 ± 0.08
LaLaCa	628.51	411.33	411.33	439.35	0.63 ± 0.12
OCaCy	654.54	355.26	465.39	493.39	0.26 ± 0.06
LLaCy	680.54	383.31	463.36	519.41	0.66 ± 0.13
LCaCa	680.54	383.29	491.45	491.45	0.12 ± 0.03
LLaCa	708.58	411.34	491.4	519.42	1.08 ± 0.18
LaLaLa	656.52	439.36	439.36	439.36	2.43 ± 0.24
LLaLa	736.59	439.36	495.41	495.41	3.80 ± 0.36
OLaCy	682.54	383.31	465.38	521.43	1.72 ± 0.15
OLCy	762.62	463.36	465.39	601.5	0.68 ± 0.12
OLaCa	710.58	411.33	493.41	521.43	2.22 ± 0.19
LaLaM	684.56	467.37	467.37	439.36	3.18 ± 0.22
LLaL	816.68	519.42	519.42	599.47	0.70 ± 0.10
OOCy	764.63	465.38	465.38	603.51	3.55 ± 0.18
OLaLa	738.61	439.35	521.43	521.43	6.36 ± 0.34
PLaLa	712.59	439.35	495.41	495.41	4.93 ± 0.21
OLaL	820.69	519.41	521.43	601.48	3.76 ± 0.33
LPLa	792.65	495.42	519.41	575.47	4.56 ± 0.42
OOCa	792.65	493.44	603.54	603.54	0.50 ± 0.03
OPCa	766.63	467.38	493.40	577.51	1.00 ± 0.12
OMLa	766.63	467.38	521.44	549.46	4.39 ± 0.26
PMLa	740.63	467.38	495.41	523.44	4.89 ± 0.32
LPL	872.73	575.49	575.49	599.49	0.60 ± 0.13
OML	846.71	547.45	549.47	601.49	1.08 ± 0.28
OLaO	820.69	521.43	521.43	603.51	5.99 ± 0.36
OPLa	794.65	495.42	521.43	577.49	6.69 ± 0.21
OMM	794.65	495.42	549.49	549.49	0.60 ± 0.06
PPLa	768.65	495.42	495.40	551.47	4.80 ± 0.32
OOL	900.76	601.49	601.49	603.50	0.90 ± 0.03
OPL	874.73	575.47	577.48	601.49	2.99 ± 0.24
OMO	848.73	549.47	549.47	603.51	2.87 ± 0.13
PPL	848.73	575.47	575.47	551.49	0.54 ± 0.09
OPM	822.69	523.44	549.47	603.51	4.63 ± 0.18
PPM	796.69	523.44	523.44	551.46	3.19 ± 0.11
OOO	902.77	603.53	603.53	603.53	0.92 ± 0.05
OPO	876.74	577.48	577.48	603.51	3.98 ± 0.15
PPO	850.73	551.48	577.48	577.48	4.46 ± 0.18
PPP	824.73	551.47	551.47	551.47	1.99 ± 0.11
POS	878.77	577.51	579.51	605.53	1.00 ± 0.07
PPS	852.76	551.48	579.51	579.51	0.64 ± 0.05
OOS	904.85	605.53	605.53	603.53	0.35 ± 0.07

3 结 论

本研究以酶法合成的富含 MLCT 的酯交换产物为原料,探究分子蒸馏温度对重相组成的影响,得到分子蒸馏的最优条件:进料温度 65 °C,压力 1 Pa,蒸馏温度 210 °C,冷凝器温度 30 °C,刮板转速 120

r/min,进料速度 2.5 mL/min。经过分子蒸馏之后,产品中甘油三酯含量可达 97.22%, MLCT 含量得到提高。分子蒸馏纯化之后,人乳脂中含量较高的几种 MLCT 的含量得到了不同程度的提高,表明分子蒸馏取得了可观的成效,提高了产物中 MLCT 的纯度,得到了富含 MCLT 的人乳替代脂。

参考文献:

- [1] MU H, PORSGAARD T. The metabolism of structured triacylglycerols[J]. Prog Lipid Res, 2005, 44(6): 430-448.
- [2] 周飞, 王建宇, 白雪斐. 中长碳链甘油三酯的研究进展[J]. 中国油脂, 2018, 43(7): 67-81.
- [3] NEJRUP R G, BAHL M I, VIGSNIS L K, et al. Lipid hydrolysis products affect the composition of infant gut microbial communities in vitro[J]. Br J Nutr, 2015, 114(1): 63-74.
- [4] 陆继源. 酶法酯交换合成中长碳链结构甘油三酯[D]. 江苏无锡:江南大学, 2017.
- [5] HALLDORSSON A, MAGNUSSON C D, HARALDSSON G G. Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols[J]. Tetrahedron Lett, 2001, 42(43): 7675-7677.
- [6] 杨凯舟. 医用中长碳链甘油三酯的研制[D]. 郑州:河南工业大学, 2012.
- [7] 段振亚, 刘茂睿, 李韶璞, 等. 刮膜式分子蒸馏技术理论研究进展[J]. 化学工程, 2017, 45(9): 14-17.
- [8] 徐文迪, 邹硕, 缪智诚, 等. 酶法合成富含 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯及 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯的油脂组合物[EB/OL]. 北京:中国科技论文在线 [2019-01-17]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201901-105>.
- [9] WANG W F, LI T, QIN X L, et al. Production of lipase SMG1 and its application in synthesizing diacylglycerol[J]. J Mol Catal B:Enzym, 2012, 77:87-91.
- [10] ZHANG T, LOU F, TAO G J, et al. Composition and structure of single cell oil produced by *Schizochytrium limacinum* SR31 [J]. J Am Oil Chem Soc, 2016, 93: 1-10.
- [11] ZOU X Q, HUANG J H, JIN Q Z, et al. Model for human milk fat substitute evaluation based on triacylglycerol composition profile[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(1): 167-175.
- [12] 孙月娥, 李超, 王卫东. 分子蒸馏技术及其应用[J]. 粮油加工, 2010(2): 91-95.
- [13] 洪颖. 食用油脂甘油三酯组成特征及 HPLC 测定方法研究[D]. 江苏无锡:江南大学, 2015.
- [14] ZOU X Q, HUANG J H, JIN Q Z, et al. Lipid composition analysis of milk fats from different mammalian species: potential for use as human milk fat substitutes[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(29): 7070-7080.
- [15] 侯俊青. 固定化脂肪酶催化樟树籽仁油和大豆油制备中长碳链结构脂质[D]. 南昌:南昌大学, 2014.