

酶催化桑蚕蛹油酯交换制备中长链脂肪酸甘油酯

刘琛^{1,2}, 王卫飞², 廖森泰²

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070; 2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广州 510610)

摘要:以桑蚕蛹油为底物, 通过酶法催化其与三辛酸甘油酯进行酯交换反应, 制备富含 α -亚麻酸的中长链脂肪酸甘油三酯(MLCTs)。通过单因素实验考察了酶种类、底物质量比、反应温度、加酶量以及反应时间对酯交换反应的影响, 对酯交换条件进行了优化。结果表明, 最佳反应条件为: 采用Lipozyme TL IM脂肪酶, 三辛酸甘油三酯与桑蚕蛹油质量比1:4, 加酶量为底物质量的8%, 反应温度45℃, 反应时间10 h。在最佳反应条件下, 酯交换反应的转化率为98.42%, 酯交换产物中中长链脂肪酸甘油三酯含量为98.73%, 辛酸含量为20.00%, α -亚麻酸含量为30.09%。

关键词: 中长链脂肪酸甘油三酯; 桑蚕蛹油; 脂肪酶; 酯交换

中图分类号: TS225.6; TS201.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)04-0108-05

Preparation of medium and long - chain fatty acid triglycerides from silkworm pupa oil by enzymatic interesterification reaction

LIU Chen^{1,2}, WANG Weifei², LIAO Sentai²

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Sericulture & Agricultural - food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Using silkworm pupa oil and caprylic triglyceride as substrates, medium and long - chain fatty acid triglycerides (MLCTs) rich in α - linolenic acid were prepared by enzymatic interesterification reaction. The effects of enzyme type, substrate mass ratio, reaction temperature, enzyme dosage and reaction time were studied by single factor experiment to optimize the reaction conditions. The results showed that the optimal reaction conditions were obtained as follows: using Lipozyme TL IM lipase, mass ratio of caprylic triglyceride to silkworm pupa oil 1:4, enzyme dosage 8% of the substrate mass, reaction temperature 45℃ and reaction time 10 h. Under these conditions, the conversion rate of the interesterification reaction was 98.42%, and the contents of MLCTs, octanoic acid and α - linolenic acid in the interesterification products were 98.73%, 20.00% and 30.09%, respectively.

Key words: medium and long - chain fatty acid triglycerides; silkworm pupa oil; lipase; interesterification

甘油三酯(Triglyceride, TAG)又称三酰甘油、中性脂肪,是人体主要的供能物质,在人体新陈代谢中有重要作用。但随着人民生活水平的提高,目前我

国人均油脂摄入量已达到我国营养学会推荐标准的2倍以上^[1],肥胖及其导致的代谢综合征极大地影响我国人民的健康水平。大量油脂替代品的出现也旨在解决该问题,但普通的油脂替代品无法补充脂溶性营养素,因而低热量油脂的开发备受关注^[2-3]。

中长链脂肪酸甘油三酯(MLCTs)具有快速供能、降低血清胆固醇含量、预防和缓解肥胖症等特殊生理功能^[4-5],是目前最为重要的低热量油脂之一。而富含 α -亚麻酸的中长链脂肪酸甘油三酯又因其特殊的生理功能受到广泛关注。 α -亚麻酸是人体

收稿日期:2020-11-16;修回日期:2021-01-24

基金项目:广东省科技计划项目(2015B020234006,2017A070702007);广东省现代农业产业技术体系创新团队(2016LM2151)

作者简介:刘琛(1998),女,在读硕士,研究方向为油脂加工(E-mail)2416563771@qq.com。

通信作者:廖森泰,研究员,硕士生导师(E-mail)liaost@163.com。

必需脂肪酸之一,具有增长智力、保护视力、延缓衰老等多种功能,同时也是人体内合成二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸的前体物质。蚕蛹是蚕丝制备过程中的副产物,其中提取的蚕蛹油富含 α -亚麻酸,且成本较低^[6-7]。

中长链脂肪酸甘油三酯主要是通过酶法或化学法制备而成,与化学法相比,酶法具有反应条件温和、选择性高、副产物少等优点^[8-9]。Zhao等^[10]采用脂肪酶Lipozyme TL IM催化高度氢化的大豆油、樟树籽仁油和紫苏籽油酯交换制备富含 α -亚麻酸和 中链脂肪酸的中长链脂肪酸甘油三酯。Bai等^[11]以三辛酸甘油酯和 三亚麻酸甘油酯为原料,优化了Lipozyme RM IM催化酯交换合成 α -亚麻酸的中长链脂肪酸甘油三酯工艺,获得较高的生物转化率(73.2%)。而与三亚麻酸甘油酯相比,蚕蛹油的成本明显更低,且能达到相似的转化率。目前,尚未见采用蚕蛹油为原料制备中长链脂肪酸甘油三酯的研究报道。

本研究以桑蚕蛹油和三辛酸甘油三酯为原料,采用脂肪酶催化酯交换制备中长链脂肪酸甘油三酯。通过单因素实验考察了各因素对酯交换反应转化率的影响,以优化其工艺参数,获取高效、经济制备中长链脂肪酸甘油三酯的工艺条件,为制备富含 α -亚麻酸的中长链脂肪酸食用油脂和桑蚕蛹油资源的高值化利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

桑蚕蛹油,陕西帕尼尔生物科技有限公司;三辛酸甘油酯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Novozym 435(来源于*Candida antarctica*)、Lipozyme RM IM(来源于*Rhizomucor miehei*)、Lipozyme TL IM(来源于*Thermomyces lanuginosus*),Novozymes(Bagsvaerd, Denmark)公司;正己烷为色谱纯;其他有机试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

SQP型电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;SHA-8水浴恒温振荡器,金坛区水北科普实验仪器厂;GC7890B型气相色谱仪、6890N/5975B型气相色谱-质谱联用仪,美国Agilent科技有限公司;Triple TOF TM 5600+液相色谱-质谱联用仪,美国AB-SCIEX公司。

1.2 实验方法

1.2.1 桑蚕蛹油的酯交换反应

桑蚕蛹油的酯交换反应参考文献[10,12]的方

法,稍作改动。准确称取1g三辛酸甘油酯,置于50 mL具塞锥形瓶中,按一定底物质量比(三辛酸甘油酯与桑蚕蛹油质量比)加入桑蚕蛹油,混合均匀后,加入一定量的固定化脂肪酶,置于一定温度和120 r/min转速的水浴恒温振荡器中反应,2 h后每隔一段时间取样,过滤除去反应液中的脂肪酶,将获得的上层油样-20℃保存待用。

1.2.2 酯交换反应转化率的测定

按下式计算酯交换反应转化率(γ)。

$$\gamma = (M_0 - M_1) / M_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: M_0 为反应底物中三辛酸甘油三酯的含量, μg ; M_1 为反应一段时间后混合物中三辛酸甘油三酯的含量, μg 。

样品中三辛酸甘油酯含量的测定参考操丽丽^[13]的方法。具体为:

样品准备:取样品10 μL ,溶于990 μL 正己烷中,混匀后用0.22 μm 滤膜过滤,待气相色谱-质谱联用仪检测。

气相色谱条件:DB-5 ms色谱柱(30 m \times 0.25 mm,0.25 μm);进样量1 μL ;进样口温度250℃;检测器温度280℃;载气为氦气,压力0.15 MPa,流速1.1 mL/min;柱前压138 kPa;不分流模式;升温程序为250℃维持5 min,以2℃/min的速度升温至290℃,维持15 min。

质谱条件:电子电离源,电子能量70 eV,离子源温度250℃,扫描范围(m/z)40~1 000,电子倍增器电压1.25 kV。

1.2.3 中长链脂肪酸甘油酯质量指标的测定

色泽的测定参考GB/T 5009.37—2003;透明度、气味和滋味的测定参考GB/T 5525—2008;不溶性杂质含量的测定参考GB/T 15688—2008;水分及挥发物含量的测定参考GB 5009.236—2016;过氧化值的测定参考GB 5009.227—2016;酸值的测定参考GB 5009.229—2016;脂肪酸组成的测定参考GB 5009.168—2016;甘油三酯组成的测定参考石威^[14]的方法。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 酶种类对酯交换反应的影响

不同的酶对酯交换反应具有不同的催化效率。在底物质量比(三辛酸甘油三酯与桑蚕蛹油质量比)1:3、反应温度50℃、加酶量(以底物质量计)8%、反应时间12 h条件下,考察Lipozyme TL IM、Lipozyme RM IM和Novozym 435 3种固定化脂肪酶对酯交换反应的影响,结果见图1。

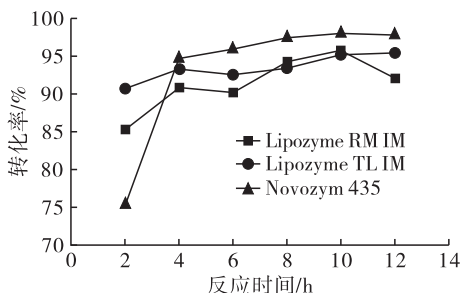


图1 酶种类对酯交换反应转化率的影响

由图1可以看出:在反应2 h时,3种脂肪酶催化酯交换反应中Lipozyme TL IM的转化率最大;随着反应的继续进行,转化率增加,其中以Novozym 435催化酯交换反应的转化率增加最多;而反应4 h以后,转化率变化不大,反应体系已基本平衡,此时3种酶催化酯交换反应的转化率相差较小。综合考虑,选取Lipozyme TL IM作为催化用酶。

2.1.2 底物质量比对酯交换反应的影响

采用Lipozyme TL IM,在反应温度50℃、加酶量8%、反应时间12 h条件下,考察底物质量比分别为1:2、1:3、1:4、1:5时对酯交换反应的影响,结果见图2。

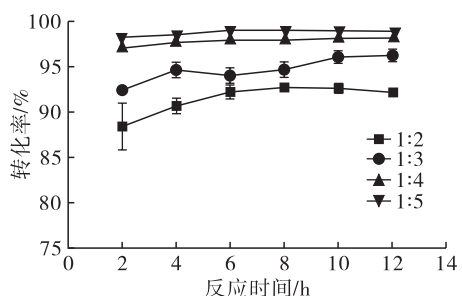


图2 底物质量比对酯交换反应转化率的影响

由图2可知,在酶催化酯交换反应过程中,随着桑蚕蛹油在底物混合物中比例的不断增加,转化率也相应提升,这说明大量的桑蚕蛹油可以加快酯交换反应速率,增大酯交换反应程度。当底物质量比为1:4时,反应12 h酯交换反应的转化率为98.18%;而当底物质量比为1:5时,酯交换反应的转化率为99.02%,相差不大。Akoh等^[15]利用三硬脂酸甘油酯和三癸酸甘油酯酯交换制备低热量结构脂质,发现随着底物摩尔比的增大(在三硬脂酸甘油酯含量不变的情况下,三癸酸甘油酯的含量增加)导致结构脂质的含量下降,由此可以推测当三辛酸甘油酯在高底物摩尔比时也可能具有一定的抑制作用。因此,综合考虑,选取底物质量比为1:4。

2.1.3 反应温度对酯交换反应的影响

较高的反应温度可以降低油脂的黏度,加速底物分子的热运动,提高向脂肪酶表面移动的底物分

子的传质系数。但是脂肪酶有其最适宜的反应温度范围,当温度低于或高于此范围,酶活性会下降甚至失去活性^[16]。

采用Lipozyme TL IM,在底物质量比1:4、加酶量8%、反应时间12 h条件下,考察反应温度分别为40、45、50、55、60℃时对酯交换反应的影响,结果见图3。

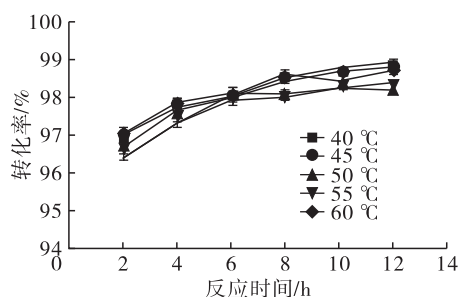


图3 反应温度对酯交换反应转化率的影响

从图3可以看出,总体上升高反应温度对酯交换反应转化率影响不大。在反应初期(2~6 h)时,随着反应温度的升高,在相同的反应时间内,转化率呈现先上升后下降的趋势;在反应时间超过6 h后,随着反应温度的升高,在相同的反应时间内,反应转化率有所降低。在适宜的温度范围内,提高反应温度,可以降低油脂的黏度、增加酶的活性,有利于反应的进行。但是反应温度过高会对酶的空间结构和空间构象产生一定的影响^[16],导致酶的活性降低,同时升高反应温度也会使能耗增加。因此,考虑酶活性、底物状态以及成本,45℃是Lipozyme TL IM较合适的反应温度。

2.1.4 加酶量对酯交换反应的影响

脂肪酶作为催化剂,在不改变反应平衡状态的前提下,会与底物形成活性中间体,降低反应的活化能,缩短反应时间。在底物足量的条件下,反应速率与加酶量之间的关系满足酶反应动力学方程,即增加加酶量,反应速率将会加快^[17]。采用Lipozyme TL IM,在底物质量比1:4、反应温度45℃、反应时间12 h条件下,考察加酶量分别为4%、6%、8%、10%、12%时对酯交换反应的影响,结果见图4。

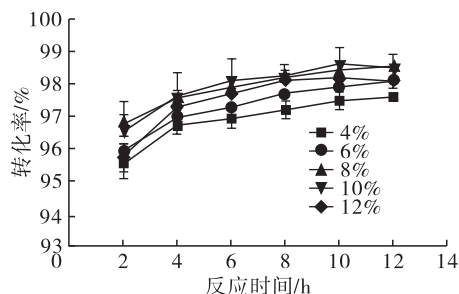


图4 加酶量对酯交换反应转化率的影响

从图4可以看出:在相同的反应时间下,加酶量在4%~10%时,随着加酶量的增加,酯交换反应的转化率有所提高,即加酶量增多会缩短反应到达平衡的时间;而加酶量在10%~12%时,随加酶量增加,转化率则有所降低,Lipozyme TL IM催化的酯交换反应转化率最大可达98.62%。当加酶量从4%上升到8%时,转化率有较大的上升,而加酶量从8%上升到12%时,转化率变化较小。原因可能是当加酶量低于8%时,底物还没被酶饱和,底物与酶分子结合的位点随着加酶量的增大而增多,酯交换反应的进程加快;当加酶量超过8%时,底物基本被酶饱和,此时并非所有的脂肪酶都同时参加反应。在尽可能降低生产成本的同时保证一定的反应速度,因此选取加酶量为8%较为合适。

2.1.5 反应时间对酯交换反应的影响

反应时间的长短主要与反应能否达到平衡有直接关系,在反应到达平衡前,反应时间越长,进行酯交换反应的底物越多。选择一个适宜的反应时间,在保证酯交换反应转化率的同时,又能降低能耗,对酯交换反应至关重要。采用Lipozyme TL IM,在底物质量比1:4、加酶量8%、反应温度45℃条件下,考察反应时间对酯交换反应的影响,结果见图5。

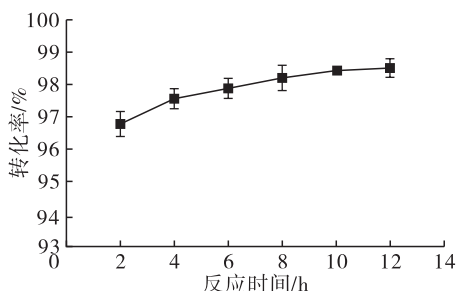


图5 反应时间对酯交换反应转化率的影响

从图5可以看出,在反应10h时,反应体系已基本平衡,酯交换反应转化率达98.42%,再延长反应时间,转化率变化很小。因此,综合考虑实验耗材、时间成本等因素,在Lipozyme TL IM催化的酯交换反应中选择反应时间为10h。

2.2 中长链脂肪酸甘油酯质量指标

在单因素实验优化的条件下,利用固定化脂肪酶催化桑蚕蛹油进行酯交换反应制备的中长链脂肪酸甘油酯的质量指标见表1。由表1可知,所得产品为澄清、透明的淡黄色,具有蚕蛹油固有的气味和滋味,且无异味。其中,不溶性杂质占0.03%,水分及挥发物占0.04%。该反应产物的过氧化值为0.25 mmol/kg,酸值(KOH)为0.17 mg/g。酯交换

反应产物中, α -亚麻酸的含量为30.09%,中长链甘油三酯的含量为98.73%,中链脂肪酸(辛酸)含量为20.00%,中链甘油三酯(三辛酸甘油三酯)的含量为0.32%,长链甘油三酯的含量为0.95%。

表1 中长链脂肪酸甘油酯的质量指标

项目	质量指标
色泽	淡黄色
气味、滋味	具有蚕蛹油固有的气味和滋味,无异味
透明度	澄清、透明
不溶性杂质/%	0.03
水分及挥发物/%	0.04
酸值(KOH)/(mg/g)	0.17
过氧化值/(mmol/kg)	0.25
中长链甘油三酯/%	98.73
α -亚麻酸/%	30.09
中链脂肪酸(辛酸)/%	20.00
中链甘油三酯(三辛酸甘油三酯)/%	0.32
长链甘油三酯/%	0.95

3 结论

本研究利用固定化脂肪酶催化桑蚕蛹油进行酯交换反应制备中长链脂肪酸甘油三酯。通过单因素实验对其工艺进行优化,得出最优条件为:采用Lipozyme TL IM,三辛酸甘油三酯与桑蚕蛹油质量比1:4,加酶量为底物质量的8%,反应温度45℃,反应时间为10h。在此优化条件下,Lipozyme TL IM催化的酯交换反应转化率达98.42%,酯交换产物中长链甘油三酯含量为98.73%,辛酸含量为20.00%, α -亚麻酸含量为30.09%。

参考文献:

- [1] 王瑞元. 2019年我国粮油生产及进出口情况[J]. 中国油脂, 2020, 45(7):1-4.
- [2] HUI Y H. 贝雷: 油脂化学与工艺学:第一卷[M]. 徐生庚, 裘爱泳, 译. 5版. 北京:中国轻工业出版社, 2001.
- [3] 王瑛瑶, 栾霞. 脂质代谢、营养学特点及结构脂质的应用[J]. 粮油食品科技, 2008, 16(5):33-35.
- [4] JALA R C R, HU P, YANG T K, et al. Lipases as biocatalysts for the synthesis of structured lipids [M]. Lipases and phospholipases. New York: Humana Press, 2012: 403-433.
- [5] 孙尚德, 王兴国, 单良, 等. 结构脂酶法合成的研究进展[J]. 中国油脂, 2007, 32(4):43-46.
- [6] 许晋. 蚕蛹油脂性质及其 α -亚麻酸纯化的研究[D]. 重庆:西南大学, 2011.

(下转第147页)

2.3 中和碱炼+脱色+脱蜡+脱臭工艺

2.3.1 工艺介绍

来自罐区的原油经加酸、加碱,中和碱炼后成为中和油;中和油加热后,加入一定比例白土,经吸附脱色、过滤后成为脱色油;115℃的脱色油经换热、冷却进入脱蜡工序,经结晶、过滤后成为脱蜡油;脱蜡油经换热,加热至250℃,在脱臭塔内进行汽提蒸馏后成为脱臭油(一级脱蜡玉米油/葵花籽油)。

2.3.2 工艺优点

此工艺优点为成熟度高,产品质量稳定,是国内各油厂常见的一种工艺。

2.3.3 工艺缺点

蒸汽消耗高,特别是系统单边进油或单边排空时,无法换热,蒸汽消耗较其他工艺高,天然气消耗也较其他工艺略高(见表1);同时,脱色后为脱蜡工序,脱蜡结晶时间为24h,若调整脱色白土用量,至少30h后才能看到成品油色泽化验结果,由于色泽调整时间长,为了保证油品的稳定性,同时要保证油品100%合格,只能多加白土,易导致白土消耗大,平均每吨油至少多添加2kg白土。

2.4 中和碱炼+脱蜡+脱色+脱臭工艺

2.4.1 工艺介绍

来自罐区的原油经加酸、加碱,中和碱炼后成为中和油;85℃的中和油经换热(至60℃)、冷却(25℃以下)进入脱蜡工序,经结晶、过滤后成为脱蜡油;脱蜡油经加热后,加入一定比例白土,经吸附脱色、过滤后成为脱色油;脱色油加热至250℃,在脱臭塔内进行汽提蒸馏后成为脱臭油(一级脱蜡玉米油/葵花籽油)。

2.4.2 工艺优点

此工艺中脱蜡工序放在中和碱炼后、脱色工序之前,与中和碱炼+脱蜡+罐区储存+脱色+脱臭工艺不同的是此工艺为连续生产,不存在固定成本高的问题;同时电耗、蒸汽消耗适中(见表1),白土消耗可控,产品质量稳定。

2.4.3 工艺缺点

经过多次的生产实践,此工艺未发现缺点。

3 结束语

生产统计数据表明,采用四种不同的冬化脱蜡生产工艺,产品质量均合格。采用中和碱炼+脱色+脱臭+脱蜡工艺,电耗、蒸汽消耗最低,但产品质量存在一定的风险;采用中和碱炼+脱蜡+罐区储存+脱色+脱臭工艺,方便生产操作,对产品销量不确定的工厂适用,电耗、蒸汽消耗较高,特别是固定成本分摊较大;采用中和碱炼+脱色+脱蜡+脱臭工艺,蒸汽消耗最高,天然气消耗略高,同时生产调节(白土增减)见效慢,导致白土消耗增加;采用中和碱炼+脱蜡+脱色+脱臭工艺,蒸汽消耗稍高,但产品质量稳定,避免了其他三种工艺的缺点。生产实践表明,中和碱炼+脱蜡+脱色+脱臭工艺最佳,建议各油脂工厂推广使用。

参考文献:

- [1] 刘玉兰. 油脂制取与工艺学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [2] 陶瑜. 油脂加工工艺与设备[M]. 北京: 中国财政经济出版社, 1999.
- [3] 何东平. 油脂制取与加工技术[M]. 武汉: 湖北科技出版社, 1998.
- [4] structured lipids using tricaprylin and trilinolenin as substrate models [J]. J Am Oil Chem Soc, 2013, 90 (3): 377-389.
- [5] 候俊青. 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.
- [6] 操丽丽. 低热量结构脂质的酶法制备及特性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2015.
- [7] 张丽丽, 章玉萍, 陈明, 等. 蚕蛹油脂提取方法及其功效研究进展[J]. 北方蚕业, 2017, 38(2): 1-8.
- [8] 刘宁, 汪勇, 赵强忠, 等. 结构脂的构效关系及酶法制备的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 382-384, 389.
- [9] IWASAKI Y, YAMANE T. Enzymatic synthesis of structured lipids[J]. J Mol Catal B Enzym, 2000, 10(1): 129-140.
- [10] ZHAO M L, TANG L, ZHU X M, et al. Enzymatic production of zero-trans plastic fat rich in α -linolenic acid and medium-chain fatty acids from highly hydrogenated soybean oil, *Cinnamomum camphora* seed oil, and perilla oil by Lipozyme TL IM[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61: 1189-1195.
- [11] BAI S, AZIZ S, KHODADADI M, et al. Lipase-catalyzed synthesis of medium-long-medium type
- [12] 石威. 蚕蛹油的溶剂提取与酶法脱酸技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [13] AKOH C C, YEE L N. Enzymatic synthesis of position-specific low-calorie structured lipids [J]. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74 (11): 1409-1413.
- [14] 丁双, 杨江科, 闫云君. 酶法改良大豆油制备质构脂质的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 173-176.
- [15] 戚以政, 汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 1999: 58-64.

(上接第111页)