

酶法制备甘油二酯的研究进展

李悦¹, 钟南京², 李洪广¹

(1. 中山市人民医院 营养科, 广东 中山 528428; 2. 广东药科大学 食品科学学院, 广东 中山 528458)

摘要:甘油二酯(DAG)可抑制体内脂肪堆积、降低血清甘油三酯水平从而具有减肥效果。与化学法相比,酶法制备DAG具有反应条件温和、选择性强、环境友好等优点。综述了国内外酶法制备DAG的研究现状,对酶促酯化合成、酶促甘油解以及酶促水解法制备DAG进行了详细介绍,着重阐述了如何提高DAG的选择性,总结了脂肪酶在DAG制备中的关键问题,以为DAG的工业化生产提供参考。

关键词:脂肪酶;甘油二酯;酯化;甘油解;水解

中图分类号:TS225.6;TQ641 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)06-0077-08

Review on progress of enzymatic production of diacylglycerol

LI Yue¹, ZHONG Nanjing², LI Hongguang¹

(1. Nutrition Department, Zhongshan Municipal People's Hospital, Zhongshan 528428, Guangdong, China; 2. Food College, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, Guangdong, China)

Abstract: Diacylglycerol(DAG) can reduce weight due to its ability of inhibiting fat accumulating and reducing the level of triacylglycerol(TAG). Compared with chemical catalysis, enzymatic catalysis of DAG production exhibits mild reaction conditions, higher selectivity and environmental friendly. The status of enzymatic production of DAG in worldwide was reviewed. Preparation of DAG by enzymatic esterification synthesis, enzymatic glycerolysis and enzymatic hydrolysis was introduced in details. Besides, how to improve the specificity of DAG was emphasized and the key problems of lipase in the preparation of DAG were summarized, so as to provide reference for the industrial production of DAG.

Key words: lipase; diacylglycerol; esterification; glycerolysis; hydrolysis

甘油二酯(DAG)具有重要的生理功效,尤其是1,3-DAG,其被证实可抑制人体脂肪堆积,且具有安全、营养、人体相容性高等诸多优点^[1],被广泛应用于食品、医疗、化妆品等行业。以普通油脂为原料制取具有营养保健功能的DAG是近年来油脂研究开发的热点^[2]。

DAG的制备方法主要为化学法和酶法^[3]。传统化学法常采用碱(氢氧化钾/氢氧化钠等)作为催化剂,在高温下反应,其能耗高,反应产物中DAG含

量相对较低,且不适于富含多不饱和脂肪酸的DAG的制备,此外高温操作容易产生缩水甘油酯,从而引发食品安全问题。相比而言,酶法具有反应条件温和、选择性强、环境友好、能耗低、副产物少等优点。因此,酶法制备DAG日益受到关注。

不同的脂肪酶具有不同的选择性、稳定性及底物活性^[4],产生的催化效果不同。本文就国内外酶法制备DAG的研究现状进行了综述,着重阐明了如何提高酶促合成DAG的选择性,总结了脂肪酶在DAG生成中的关键问题,以为DAG的工业化生产提供参考。

1 DAG及其功能特性

DAG是甘油中的两个羟基与脂肪酸酯化的产物。DAG有两种异构体,即1,2-DAG和1,3-DAG,两者以(3~4):(7~6)的比例在自然界形成平衡^[3]。由于分子的空间效应,1,3-DAG比1,2-

收稿日期:2021-05-07;修回日期:2022-02-08

基金项目:国家自然科学基金项目(31772000)

作者简介:李悦(1988),女,初级技师,硕士,研究方向为油脂改性(E-mail)123694786@qq.com。

通信作者:钟南京,副教授,硕士生导师,博士(E-mail)adong473@163.com。

DAG 具有更稳定的热力学性质,食用油中的 1,2-DAG 在高温处理过程中通过酰基转移转化为 1,3-DAG,直至两者平衡^[1]。一般天然油脂中甘油三酯 (TAG) 含量不低于 90% (棉籽油除外,其 TAG 含量为 87.0%),DAG 含量最高接近 10%。不同来源的油脂其 DAG 含量不同,如棉籽油中 DAG 含量为 9.5%,而橄榄油中 DAG 含量为 5.5%^[1,5]。

尽管 DAG 与 TAG 有相同的能量值和消化率^[4],但 1,3-DAG 可以抑制体内脂肪堆积,降低血清甘油三酯水平,降低餐后血脂和血红蛋白 A1c,增加餐后脂类氧化,从而达到降低体质量的作用^[6-8]。因此,DAG 有利于减少与肥胖相关疾病(如动脉粥样硬化、糖尿病、高血压等)的发生。此外,与 TAG 相比,DAG 含有一个亲水性的羟基,其双亲分子结构使其具有乳化性质,在食品、化妆品和制药工业中,DAG 与单甘酯(MAG)可以协同作为乳化剂和表面活性剂^[6]。例如:DAG 可制备 O/W 乳液,用于蛋黄酱和沙拉酱;或作为 W/O 乳液的乳化剂用于人造奶油、涂抹酱、奶油馅料、配方食品、油炸食品及冰淇淋等^[9]。DAG 还可以作为脂肪晶体调节剂用作有机产品合成前体,如磷脂、糖脂、脂蛋白;作为药物前体,例如 1,3-DAG 缀合的苯丁酸氮芥用于治疗淋巴瘤,1,2-DAG 缀合的(S)-(3,4-二羟基苯基)丙氨酸(L-Dopa)可以用于治疗帕金森病^[10];还可用于含脂肪食物中 TAG 晶体结构的改性及作为疏水性油脂将材料分离^[11]。

2 酶法制备 DAG

根据反应路线,制备 DAG 有酯化合成、甘油解、部分水解等反应途径。

2.1 酶促酯化合成 DAG

游离脂肪酸(FFA)与甘油在脂肪酶催化下可以

生成 DAG,同时还生成部分 MAG 和 TAG。适当的含水量是保持酶活性所必需的,但该反应是可逆的,过量的水会影响反应向酯化反应方向进行,及时去除生成的水可以使反应平衡向酯化反应方向进行,从而提高 DAG 含量,因此酯化反应合成 DAG 的关键之一是及时去除反应生成的水。前人已采用真空、氮吹以及加入分子筛、硅胶等方法除水。Xu 等^[12]在酶促酯化过程中采用真空泵及时去除反应混合物中的水,结果发现 DAG 含量由 2.86% 提升至 89.87%。有研究表明,酯化合成 DAG 的反应中真空除水的真空度应当保持在一定范围内,不应该低于 0.4 kPa^[13]。另外,使用适度过量的甘油(底物脂肪酸与甘油摩尔比 1:1)脱除填充床中固定化酶颗粒所吸附的水分简便易行,可以提高脂肪酶在反应过程中的稳定性^[14],再结合真空除水使反应向生成甘油酯的方向进行。但是该反应生成的 MAG 更多,DAG 含量较低,且甘油的增加,将会造成脂肪酶催化中心被覆盖,不利于脂肪酶催化反应。真空驱动-氮气鼓泡操作模式(vacuum-driven N₂ bubbling protocol)用于酶促酯化合成 DAG 已取得显著的效果。该模式将氮气引入反应器底部,通过氮气鼓泡以增加脂肪酸、甘油以及脂肪酶的接触,从而促进酯化反应进行;同时生成的水分被及时除去,使反应平衡向甘油酯合成的方向进行。该操作模式下 1,3-DAG 产率高达 92%~96%,同时酶在该操作模式下的稳定性非常好,Novozym 435 重复利用 10 次后,酶活损失很小^[15-16]。分子筛也是常用的固体吸收方法,使用上流式酶填充床反应器进行酶促酯化反应,用分子筛脱水,辛酸转化率可以达到 90.2%,DAG 含量达到 77.3%^[17]。表 1 为近年来酶促酯化合成 DAG 的研究现状。

表 1 酶促酯化合成 DAG

| 脂肪酶 | 底物 | 溶剂 | 反应条件 | DAG 含量/% | DAG 产率/% | 参考文献 |
|----------------|-----------------|----|---|-------------------|----------------------|------|
| Lipozyme RM IM | 油脂部分水解得到的脂肪酸,甘油 | 无 | 60 °C, 3 h, 脂肪酸与甘油摩尔比 1:1, 加酶量 10 g, 真空, 90 °C 下除水分, 连续填充床酶反应器 500 r/min, 进料流速 1.5 mL/min | 60.9 | | [14] |
| Novozym 435 | 共轭亚油酸, 甘油 | 无 | 45 ~ 55 °C, 3 h, 共轭亚油酸与甘油摩尔比值 2 ~ 2.4, 真空氮气鼓泡压力 < 1 kPa, 加酶量 40 ~ 70 g/L | | 92 ~ 96 (1,3-DAG) | [15] |
| Novozym 435 | 共轭亚油酸, 甘油 | 无 | 51 °C, 4 h, 共轭亚油酸与甘油摩尔比值 2.53, 甘油含量 0.460 3 g, 真空氮气压力 0.67 kPa, 加酶量为共轭亚油酸质量的 5.9% | | 96.65 (1,3-DAG) | [16] |
| Lipozyme RM IM | 月桂酸, 甘油 | 无 | 50 °C, 3 h, 甘油与脂肪酸摩尔比 1:2, 加酶量为反应物质量的 5%, 真空驱动-空气鼓泡操作 | 80.3 (1,3-DAG) | | [18] |

续表 1

| 脂肪酶 | 底物 | 溶剂 | 反应条件 | DAG 含量/% | DAG 产率/% | 参考文献 |
|--------------------------|----------------------------------|-----------|--|-------------------|----------|------|
| Novozym 435 | 辛酸,甘油 | 无 | 65℃,7 h,甘油与辛酸摩尔比 1:2,加酶量 5%,反应空速 34 h ⁻¹ ,水顶玻璃圆筒反应器,4 Å 分子筛添加量 20.8% | 77.3 | 43.2 | [17] |
| Novozym 435 | 油酸,甘油 | 叔丁醇 | 60℃,7 h,叔丁醇 6 g,脂肪酶 1 g,10.0 g 油酸,1.3 g 甘油,4 Å 分子筛 6.4 g | 40 (1,3-DAG) | | [19] |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | 纯化棕榈酸蒸馏物,甘油 | 叔丁基甲基醚 | 45℃,24 h,纯化棕榈酸蒸馏物与甘油摩尔比值 1.23,分子筛添加量 31.1%,初始酶添加量 2.32%,硅胶吸附甘油 | 44.9 (1,3-DAG) | | [20] |
| 磷脂酶 Lecitase Ultra | 油酸,甘油 | 无 | 40℃,1.5 h,油酸与甘油摩尔比 1:5,初始水分含量 4% (占底物质量),加酶量 1.5% (占底物质量) | 54.8 (1,3-DAG) | | [20] |
| Novozym 435 | 棕榈酸,甘油 | 超临界二氧化碳 | 65℃,6 h,棕榈酸与甘油摩尔比 1:2,超临界二氧化碳压力 12 MPa,加酶量为反应物质量的 1% | | 56.2 | [21] |
| Novozym 435 | 棕榈酸,甘油 | 二氧化碳膨胀丙酮 | 50℃,5 h,棕榈酸与甘油摩尔比 1:3,加酶量 25% (占溶解脂肪酸的质量),压力 8.5 MPa | 77.9 | | [22] |
| Novozym 435 | 油酸,甘油 | 氯化胆碱-低共熔体 | 50℃,1 h,油酸与甘油摩尔比 2:1,氯化胆碱与甘油比例 1:2,初始含水量 2%,加酶量 4% | 42.9 (1,3-DAG) | | [23] |
| Lipozym 435 | 脂肪酸(60% 棕榈油脱臭馏出物和 40% 油酸的混合物),甘油 | 无 | 60℃,0.5 h,甘油与脂肪酸摩尔比 7.5:1,加酶量 5.0%,初始含水量 2.5%,通入 N ₂ 气体流量 10.6 mL/min | 57.9 | | [24] |
| Lipase G50 | 脂肪酸,甘油 | 无 | 30℃,24 h,甘油与脂肪酸摩尔比 5:1,加水量为底物总质量的 5%,加酶量 350 U/g | 44.7 | | [25] |
| Lipozyme RM IM | 油酸,甘油 | 无 | 63℃,1.9 h,油酸与甘油摩尔比 2.1:1,加酶量 6.9% (占底物总质量) | 61.2 (1,3-DAG) | | [26] |
| Novozym 435 | 油酸,甘油,甘油基阿魏酸 | 无 | 65℃,12 h,酶负载量 7.5%,油酸与(甘油基阿魏酸+甘油)质量比 7.5:1 | | 82.6 | [27] |
| 脂肪酶 SMG1 | 共轭亚油酸,甘油 | 无 | 25℃,24 h,加水量 3%,加酶量 240 U/g,共轭亚油酸与甘油摩尔比 1:3 | 53.4 | | [28] |

从表 1 可以看出,脂肪酶使用较多的是 Novozym 435。Lipozyme RM IM 对酯化合成甘油酯也具有较好的催化效果,并且 Lipozyme RM IM 的 1,3-位选择性强,而 Lipozyme TL IM 催化酯化反应的效果则较差^[18]。真空驱动-氮气鼓泡(以及随后改进的空气鼓泡)操作模式取得的效果显著,不仅所得的 DAG 含量高,酶操作稳定性也非常好。另外,反应设备对酯化效果也有影响,如 Hu 等^[17]研究发现,填充床反应器酯化反应生成的 DAG 较间歇式反应器多(DAG 含量分别为 77.3% 和 45.5%),但是脂肪酸转化率则比间歇式反应器低(分别为 82.3% 和 94.4%)。研究表明,超临界二氧化碳介质具有良好的传质性能,可使底物与酶更好地接触,降低底物对酶的抑制作用;动力学研究表明,酶促酯化合成

反应遵循双底物乒乓机制,且超临界二氧化碳中甘油及脂肪酸的米氏常数与抑制常数均小于有机溶剂体系中的^[21]。在极低的酶质量浓度下(超临界二氧化碳介质中酶质量浓度仅为 0.34 g/L,相比较有机溶剂体系中酶质量浓度为 1.73 g/L),超临界二氧化碳介质中棕榈酸的转化率、DAG 产率(81.0%, 56.2%)均高于有机溶剂体系(68.8%, 41.4%)^[21]。通过使用气体膨胀液体的方法可以改变体系物理化学性质如黏度、介电常数、氢键,从而促进酯化反应^[29]。研究表明,在酶促酯化油酸与甘油合成 DAG 体系中,使用低共熔体(DES)作为溶剂,将氯化胆碱(CHCl)加入后可以显著提高酶对 DAG 的选择性。使用 Novozym 435 催化油酸与甘油酯化反应,以 CHCl-DES 作为溶剂可在反应 1 h 内

获得含量为 42.9% 的 1,3-DAG, 其原因是氯化胆碱影响脂肪酶的区域选择性和化学反应平衡, 可以抑制酰基转移, 提高对 1,3-DAG 的选择性^[23]。

2.2 酶促甘油解反应制备 DAG

酶促甘油解反应是指在游离或固定化酶的催化

下 TAG 与甘油的反应。甘油解反应过程简单、原料来源容易, 是制备甘油酯 (MAG 和 DAG) 的主要反应路径^[20]。表 2 为近年来酶促甘油解反应制备 DAG 的研究现状。

表 2 酶促甘油解反应制备 DAG

| 脂肪酶 | 底物 | 溶剂 | 反应条件 | DAG 含量/% | DAG 产率/% | 参考文献 |
|-------------------------------------|------------|---|---|----------|----------|------|
| Lipozyme IM IU | 大豆油, 甘油 | 无 | 45 °C, 12 h, 甘油与大豆油摩尔比 10:1, 加酶量 5% (占底物质量), 初始水分含量 5% (占底物质量) | 53.7 | | [20] |
| <i>Pseudomonas</i> | 氢化牛油, 甘油 | 无 | 60 °C 下 2 h, 然后 55 °C 下 4 h, 再 48 °C 下 72 h; 氢化牛油与甘油摩尔比 2:1, 加酶量 50 000 U/g (占氢化牛油质量), 含水量 0.5% ~ 4% | | 90 | [30] |
| Lipozyme RM IM | 棕榈油, 甘油 | [TOMA] · [Tf ₂ N]/Amoeng 120 | 60 °C, 48 h, 1 mmol 甘油三油酸酯, 0.5 mmol 甘油, 1 g 离子液体, 加酶量 10% | 43 ~ 45 | | [31] |
| Novozym 435 | 甘油三油酸酯, 甘油 | [TOMA] · [Tf ₂ N]/Amoeng 102 | 45 °C, 24 h, 1.77 g 油, 甘油与油摩尔比 1.75:2, 1 g 离子液体, 加酶量 10% (占油质量), [TOMA] · [Tf ₂ N] 与 Amoeng 102 比例 1:3 | | 73 | [32] |
| Novozym 435 | 甘油三油酸酯, 甘油 | [TOMA] · [Tf ₂ N]/Amoeng 102 | 55 ~ 60 °C, 24 h, 甘油与油摩尔比 (1.8 ~ 2):2, [TOMA] · [Tf ₂ N] 含量小于 10%, 加酶量 15% (基于油质量) | | 70 | [32] |
| Lipozym 435 | 菜籽油, 甘油 | 无 | 65 °C, 23 h, 菜籽油与甘油摩尔比 1:2, 加酶量 5% (基于油质量) | | 62 | [33] |
| 自制固定化酶 (离子液体修饰 SBA-15 固定化 CALB) | 玉米油, 甘油 | 叔丁醇 | 50 °C, 12 h, 玉米油 4.4 g, 甘油 0.23 g, 叔丁醇 17 mL, 加酶量 5% (占底物质量) | 67.2 | | [34] |
| 自制固定化酶 (SBA-15 固定化 CALB) | 玉米油, 甘油 | 叔丁醇 | 50 °C, 12 h, 玉米油 4.4 g, 甘油 0.23 g, 叔丁醇 17 mL, 加酶量 5% | 53.6 | | [35] |
| 自制固定化酶 (经过有机功能基团改性的 SBA-15 负载 CALB) | 大豆油, 甘油 | 无 | 60 °C, 12 h, 大豆油 3.52 g, 甘油 0.184 g, 加酶量 0.2 g | 61.9 | | [36] |
| 自制固定化酶 (经过有机功能基团改性的 SBA-15 负载 RML) | 大豆油, 甘油 | 无 | 60 °C, 12 h, 大豆油 3.52 g, 甘油 0.184 g, 加酶量 0.2 g | 59.03 | | [37] |
| Lipozyme TL IM | 葵花籽油, 甘油 | 无 | 50 °C, 5 h, 葵花籽油与甘油摩尔比 2:1, 加酶量 10% (占底物质量) | 59.8 | | [38] |
| Lipozyme TL IM | 鱼油, 甘油 | Tween 65 | 40 °C, 6 h, 鱼油与甘油摩尔比 1:0.5, Tween 65 添加量 5%, 加酶量 25% (占底物质量) | 20.76 | | [39] |
| Novozym 435 | 大豆油, 甘油 | 叔丁醇 | 反应温度 50 °C, 24 h, 大豆油与甘油质量比 6.23:1, 叔丁醇中底物质量浓度 400 mg/mL, 加酶量 1% (占大豆油质量) | 48.5 | | [40] |
| Lipozyme TL IM | 棕榈油, 甘油 | 无 | 55 °C, 8 h, 1 000 g 棕榈油, 170 g 甘油, 60 g 硅胶吸附甘油, 加酶量 5%, 3 Å 分子筛添加量 20 g | 34 | | [41] |

提高酶促甘油解反应对 DAG 的选择性是研究热点,目前温度控制法和溶剂化作用法已取得较大的进展。温度控制法是通过控制反应体系的温度,使目标产物 DAG 选择性凝固析出,从而使平衡向目标产物 DAG 生成的方向移动,如 Yamane 等^[30]以氢化牛油为原料,通过控制酶催化甘油解反应的温度(48~60℃),经过长时间(>3 d)反应,产物中 DAG 产率高达 90%。但是由于反应时间长、脂肪酶与 DAG 不能有效分离,尤其是制备不饱和脂肪酸为主的 DAG,其凝固点很低,反应几乎不可进行,因此温度控制法不能用于工业化生产。

溶剂化作用法是通过加入适当的溶剂于反应体系中,使反应体系中各物质的化学势、活度系数、活度等性质发生变化,从而引起平衡组成的改变^[42]。Kahveci 等^[32]在这方面进行了深入研究,其中采用 [TOMA]·[Tf₂N]/Amoeng 102 离子液体时,DAG 产率达 73%。用于 DAG 生产的离子液体具有以下结构特征:①其阳离子应该具有疏水性,[TOMA]·[Tf₂N] 的结构中阳离子含有 3 个辛基,增加了 [TOMA]·[Tf₂N] 的疏水性,从而可在高浓度下溶解 TAG,提高甘油解反应中 TAG 的转化率;②其阴离子的极性不能太强,以便抑制 MAG 的生成,使反应产物停留在 DAG 阶段,从而提高反应对 DAG 的选择性,得到高含量的 DAG。鉴于离子液体具有相对较高的黏度,对反应有很大的限制,因此可向离子液体中添加有机溶剂以降低体系黏度,从而加快反应速度。Kahveci 等^[32]在二元离子液体系统的基础上加入正己烷,可进一步提高 TAG 转化率和 DAG 产率,与不加正己烷的二元离子液体系统相比,TAG 的转化率提高了 32.1%,DAG 产率提高了 15.1%,主要原因是黏度降低导致传质增强。但由于有机溶剂会引起环境污染同时增加工艺成本,所以这种二元系统并没有进一步应用。

此外,固定化酶的载体性质也可以影响酶促甘油解反应效率和选择性。当固定化脂肪酶载体为亲水性载体时,载体周围容易形成亲水性甘油层,从而限制脂肪酶接触疏水性的油相,导致反应难以进行^[33],例如:将 *Candida antarctica* 脂肪酶 B(CALB)

固定在丙烯酸树脂(为疏水性载体)上可以催化鱼油的甘油解反应,获得 42% 的 DAG;然而,将 CALB 固定在大孔阴离子交换树脂(为亲水性载体)上,并没有发生甘油解反应,当甘油逐渐加入时反应才能进行,但获得的 DAG 产率仅为 19%,即使将甘油吸附在硅胶上,DAG 含量仍然低于 CALB 固定在大孔丙烯酸树脂上催化的甘油解反应。就酶促甘油解对 DAG 的选择性而言,载体的疏水性适中更有利于提高 DAG 的选择性,而并不是疏水性越强 DAG 的选择性越高^[34]。近年来介孔材料作为固定脂肪酶载体催化甘油解反应受到关注。其中 SBA-15 在近年来被广泛使用,它是一种有序的六边形介孔分子筛,其孔道表面有丰富的硅羟基,适用于表面改性后特定的催化反应^[43]。Cai 等^[35]采用 SBA-15 作为载体固定 CALB,催化玉米油甘油解反应,获得的 DAG 含量达到 53.6%。为进一步提高 DAG 的选择性,课题组在载体修饰上展开了系列研究,包括(咪唑基)离子液体和有机功能基团修饰载体 SBA-15。其中采用离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐修饰 SBA-15 后负载 CALB(CH₃-IL-BF₄-SBA-15-CALB),其催化甘油解所得 DAG 含量和 DAG 与 MAG 比值分别达 67.2% 和 13.4,DAG 选择性得以较大提高^[34];但是在 SBA-15 直接负载 CALB 或咪唑基离子液体修饰 SBA-15 后再负载 CALB,其催化甘油解反应均需在溶剂(采用了叔丁醇溶剂)辅助下才可以进行;而采用有机功能基团修饰 SBA-15 后再负载 CALB 或 RML,其催化甘油解反应均可在无溶剂体系下进行并可得到相对较高的 DAG 含量。其中异氰酸丙基修饰 SBA-15 后再负载 CALB 催化甘油解反应,DAG 含量为 61.9%^[36],而异氰酸丙基修饰 SBA-15 后再负载 RML 催化甘油解反应,DAG 含量为 59.03%^[37]。

2.3 酶促水解反应制备 DAG

酶促水解反应是指在酶作用下,将 TAG 部分水解释放出 FFA,生成产物 DAG 和 MAG,彻底水解将得到甘油和 FFA。酶促水解反应制备 DAG 的研究现状见表 3。

表 3 酶促水解反应制备 DAG

| 脂肪酶 | 底物 | 溶剂 | 反应条件 | DAG 含量/% | DAG 产率/% | 参考文献 |
|----------------|-------|----|--------------------------------------|----------|----------|------|
| Lipozyme RM IM | 棕榈油,水 | 无 | 60℃,6 h,加酶量 10% (占油质量),含水量 50% (油质量) | 40.8 | | [44] |
| 磷脂酶 A1 | 棕榈油,水 | 无 | 45℃,8 h,含水量 44%,酶载量 34 U/g,反应时间 8 h | 35.51 | | [45] |

续表 3

| 脂肪酶 | 底物 | 溶剂 | 反应条件 | DAG 含量/% | DAG 产率/% | 参考文献 |
|----------------|----------|-----|--|----------|----------|------|
| PS Amano SD | 棕榈油,水 | 正己烷 | 60℃,5 min,含水量 5% (占油质量),加酶量 10% (占油质量),微波辐射流速 0.1 mL/min | | 30 | [46] |
| Lipozyme RM IM | 棕榈油,水 | 无 | 55℃,72 h,加酶量 2.87%,水占油质量的 2.10%,搅拌速度 400 r/min | | 35.9 | [47] |
| 脂肪酶 T1 | 棕榈硬脂酸酯,水 | 无 | 60℃,7 h,含水量 30% (占油质量),酶浓度 7.5 U/g(占油质量) | 28.1 | | [48] |
| 脂肪酶 rProROL | 大豆油,水 | 无 | 40℃,6 h,含水量 20% (占油质量),pH 6.5,加酶量 30 U/g(占油质量) | | 33.11 | [49] |
| Lipozyme TL IM | 大豆油,水 | 无 | 55℃,1.5 h,含水量 20% (占油质量),加酶量 1% (占油质量),超声波照射 | | 30 | [50] |
| Lipozyme RM IM | 棕榈油,水 | 无 | 65℃,12 h,含水量 50% (占油质量),加酶量 10% (占油质量) | | 32 | [51] |

酶促水解法制备 DAG 过程中,通过控制反应条件(如水分含量),可以获得较高含量的 DAG。水解法制备 DAG 过程简单,无需增加其他底物,易于生成,但是需要控制好反应条件,且产物中含有的 FFA 需要进一步分离。酶促油脂水解属于脂类-水界面反应,界面大小直接决定着反应速度。油在水中分散越细,界面越大,反应速度越快,而搅拌速度、油水比例以及乳化剂用量均影响界面大小,此外高速搅拌条件下可以克服反应的传质限制,有利于提高反应速度^[52]。反胶束是表面活性剂分子在非极性有机溶剂中自发形成的具有热力学稳定性的纳米级聚集体,其内部有一个极性核,便于水在极性核中的溶解。研究表明,使用反胶束系统不仅可以提供大量界面区域,还可提供足够的水分子保护酶避免其在非极性环境中失活^[53]。此外,不同的脂肪酶催化水解反应的效果也不一样。Mardani 等^[44]研究对比了 Lipozyme TL IM、脂肪酶 A、脂肪酶 AY、Lipozyme RM IM、Lecitase Ultra 催化棕榈油水解反应,结果表明,Lipozyme RM IM 催化所得 DAG 含量最高(40.8%),而 Lecitase Ultra 水解最为彻底,可获得高含量的 FFA(94.5%)。添加表面活性剂可增加油相和水相表面的接触,从而有利于酶促反应的进行,但将其从反应产物中分离会增加经济负担^[45]。此外,微波辐射可以提高传质速度,反应体系在适度流速下,持续给予微波加热,可促进反应底物与酶的接触,同时还可以避免反应过程中由于酶的聚集形成高浓度聚合物而导致的酶失活^[46]。利用超声波空化可以提高非均相反应速度,超声波可以减少酶促反应中的传质限制,主要通过改变酶的性质,增加

底物与酶的反应面积从而提高酶促反应效率^[54-55]。采用固定化酶催化水解反应中,固定化酶载体的性质会影响催化水解的效率,惰性疏水性凝胶载体包裹的脂肪酶,其催化水解大豆油的活性较高^[56],而亲水性载体如阴离子树脂会吸附过量的水分,导致底物 TAG 不能到达脂肪酶分子,影响脂肪酶活性位点作用于油-水界面^[57],所以水油比例也是决定油部分水解的重要因素,并非油水比例越低水解程度越高^[58]。

3 结束语

富含 DAG 的油脂具有显著的生理功效,可以减少人体对 TAG 的吸收。已经有大量研究采用不同方法制备富含 DAG 的油脂,以提高其经济性。本研究回顾了酶促反应制备 DAG 的方法,酶法制备 DAG 具有反应条件温和、选择性较强、对环境友好、能量需求较少、副产物少的优点。但鉴于目前酶法制备 DAG 工业化生产成本较高,酶的稳定性不足,DAG 的含量不高等因素,需要进一步优化酶法制备 DAG 的工业化条件。

参考文献:

- [1] MATSUO N. Nutritional characteristics and health benefits of diacylglycerol in foods [J]. Food Sci Technol Res, 2004, 10(2):103-110.
- [2] SATHIYANARAYANAN S, ARPI N, LUBIS Y M, et al. Diacylglycerol-enriched oil production using chemical glycerolysis [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2016, 118(12):1880-1890.
- [3] ZHONG N J, LI L, XU X B, et al. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis [J]. Food Chem, 2010, 122(1):228-232.
- [4] PHUAH E T, TANG T T, LEE Y Y, et al. Review on the

- current state of diacylglycerol production using enzymatic approach[J]. *Food Bioprocess Tech*, 2015, 8(6):1169 – 1186.
- [5] TAKASE H. Metabolism of diacylglycerol in humans[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2007, 16(S1):398 – 403.
- [6] FLICKINGER B D, MATSUO N. Nutritional characteristics of DAG oil[J]. *Lipids*, 2003, 38(2):129 – 132.
- [7] RUDKOWSKA I, ROYNETTE C E, DEMONTY I, et al. Diacylglycerol: efficacy and mechanism of action of an anti-obesity agent[J]. *Obes Res*, 2005, 13(11):1865 – 1876.
- [8] TADA N. Physiological actions of diacylglycerol outcome [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004, 7(2):145 – 149.
- [9] TAGUCHI H, NAGAO T, WATANABE H, et al. Energy value and digestibility of dietary oil containing mainly 1,3 – diacylglycerol are similar to those of triacylglycerol [J]. *Lipids*, 2001, 36(4):379 – 382.
- [10] GARZONABURBEH A, POUPAERT J H, CLAESEN M, et al. 1,3 – Dipalmitoylglycerol ester of chlorambucil as a lymphotropic, orally administrable antineoplastic agent [J]. *J Med Chem*, 1983, 26(8):1200 – 1203.
- [11] SATRIANA, ARPI N, LUBIS Y M, et al. Diacylglycerol – enriched oil production using chemical glycerolysis [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2016, 118(12):1880 – 1890.
- [12] XU Y Y, WEI C Q, ZHAO X Q, et al. A comparative study on microstructure, texture, rheology, and crystallization kinetics of palm – based diacylglycerol oils and corresponding palm – based oils[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2016, 118(8):1179 – 1192.
- [13] WATANABE T, SUGIURA M, SATO M, et al. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor[J]. *Process Biochem*, 2005, 40(2):637 – 643.
- [14] 杨继国, 杨博, 王永华, 等. 全酶法制备甘油二酯的研究(II):脂肪酸酶法酯化反应的工艺优化[J]. *中国油脂*, 2009, 34(3):15 – 19.
- [15] GUO Z, SUN Y. Solvent – free production of 1,3 – diglyceride of CLA: strategy consideration and protocol design[J]. *Food Chem*, 2007, 99(3):1076 – 1084.
- [16] GUO Z, SUN Y. Solvent – free enzymatic synthesis of 1,3 – diconjugated linoleoyl glycerol optimized by response surface methodology[J]. *Biotechnol Prog*, 2010, 20(2):619 – 622.
- [17] 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.
- [18] ZHONG N J, GUI Z Y, XU L, et al. Solvent – free enzymatic synthesis of 1,3 – diacylglycerols by direct esterification of glycerol with saturated fatty acids[J/OL]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12(1):65 [2012 – 05 – 07]. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-65>.
- [19] DUAN Z Q, DU W, LIU D H. Novozym 435 – catalyzed 1,3 – diacylglycerol preparation via esterification in *t* – butanol system[J]. *Process Biochem*, 2010, 45(12):1923 – 1927.
- [20] 刘宁. 无溶剂体系固定化磷脂酶 Lecitase Ultra 催化合成甘油二酯研究[D]. 广州:华南理工大学, 2013.
- [21] 瞿佳政. S_{CCO}₂介质中棕榈酸甘油二酯酶促合成反应的研究[D]. 天津:天津大学, 2009.
- [22] TAI H P, BRUNNER G. Mono – and di – acylglycerol synthesis in CO₂ – expanded acetone[J]. *J Super Fluid*, 2011, 59:87 – 91.
- [23] ZENG C X, QI S J, XIN R P, et al. Enzymatic selective synthesis of 1,3 – DAG based on deep eutectic solvent acting as substrate and solvent [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2015, 38(11):2053 – 2061.
- [24] LIU M M, FU J N, TENG Y L, et al. Fast production of diacylglycerol in a solvent free system via lipase catalyzed esterification using a bubble column reactor[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2016, 93(5):637 – 648.
- [25] 徐扬, 王卫飞, 陈华勇, 等. 偏甘油酯脂肪酶 Lipase G50 催化酯化法制备甘油二酯[J]. *中国油脂*, 2012, 37(2):46 – 50.
- [26] 鲁珊. 高纯 1,3 – 二油酸甘油酯的制备[D]. 江苏无锡:江南大学, 2013.
- [27] SUN S D, SHAN L, LIU Y F, et al. Solvent – free enzymatic synthesis of feruloylated diacylglycerols and kinetic study[J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2009, 57(1):104 – 108.
- [28] 徐达. 高纯度共轭亚油酸的制备及其甘油二酯的酶法合成研究[D]. 广州:华南理工大学, 2012.
- [29] WYATT V T, BUSH D, LU J, et al. Determination of solvatochromic solvent parameters for the characterization of gas – expanded liquids[J]. *J Super Crit Fluid*, 2005, 36(1):16 – 22.
- [30] YAMANE T, KANG S T, KAWAHARA K, et al. High – yield diacylglycerol formation by solid – phase enzymatic glycerolysis of hydrogenated beef tallow [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1994, 71:339 – 342.
- [31] GUO Z, KAHVECI D, ÖZÇELİK B, et al. Improving enzymatic production of diglycerides by engineering binary ionic liquid medium system[J]. *New Biotechnol*, 2009, 26:37 – 43.
- [32] KAHVECI D, GUO Z, ÖZÇELİK B, et al. Optimization of enzymatic synthesis of diacylglycerols in binary medium systems containing ionic liquids[J]. *Food Chem*, 2010, 119:880 – 885.
- [33] KRISTENSEN J B, XU X B, MU H L. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2005, 82(5):329 – 334.
- [34] ZHONG N J, LI Y, CAI C S, et al. Enhancing the

- catalytic performance of *Candida antarctica* lipase B by immobilization onto the ionic liquids modified SBA-15[J/OL]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2018, 120:1700357[2021-05-07]. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700357>.
- [35] CAI C S, GAO Y Q, LIU Y, et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto SBA-15 and their application in glycerolysis for diacylglycerols synthesis[J]. *Food Chem*, 2016, 212:205-212.
- [36] LI Y, ZHONG N J, CHEONG L Z, et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto organically-modified SBA-15 for efficient production of soybean-based mono and diacylglycerols[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120:886-895.
- [37] ZHONG N J, CHEN W L, LIU L Y, et al. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production[J]. *Food Chem*, 2019, 271:739-746.
- [38] DHARA R, SINGHAL R S. Process optimization of enzyme catalyzed production of dietary diacylglycerol (DAG) using TL IM as biocatalyst[J]. *Ultrasonics*, 2014, 18(2):169-176.
- [39] MONTE BLANCO S F, SANTOS J S, FELTES M M, et al. Optimization of diacylglycerol production by glycerolysis of fish oil catalyzed by Lipzyme TL IM with Tween 65[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2015, 38(12):2379-2388.
- [40] WANG W F, LI T, NING Z X, et al. Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 49(2):192-196.
- [41] YEOH C M, PHUAH E T, TANG T K, et al. Molecular distillation and characterization of diacylglycerol-enriched palm olein[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2015, 116(12):1654-1663.
- [42] ZHONG N J, CHEONG L Z, XU X B. Strategies to obtain high content of monoacylglycerols[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2014, 116:97-107.
- [43] WANG X, CHAN J C C, TSENG Y H, et al. Synthesis, characterization and catalytic activity of ordered SBA-15 materials containing high loading of diamine functional groups[J]. *Micropor Mesopor Mat*, 2006, 95(1/2/3):57-65.
- [44] MARDANI M, FARMANI J, KENARI R E. Efficacy of some commercial lipases in hydrolysis of palm olein for production of free fatty acids and diacylglycerol oil[J]. *J Oil Palm Res*, 2015, 27(3):250-260.
- [45] WANG Y, ZHAO M M, OU S Y, et al. Preparation of diacylglycerol-enriched palm olein by phospholipase A1-catalyzed partial hydrolysis[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2010, 111(7):652-662.
- [46] MATOS L M C, LEAL I C R, SOUZA R O M A D. Diacylglycerol synthesis by lipase-catalyzed partial hydrolysis of palm oil under microwave irradiation and continuous flow conditions[J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2011, 72(1):36-39.
- [47] VOLL F A P, CABRAL V F, DARIVA C. Kinetic modeling of solvent-free lipase-catalyzed partial hydrolysis of palm oil[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168(5):1121-1142.
- [48] XU Y, GUO S H, WANG W F, et al. Enzymatic hydrolysis of palm stearin to produce diacylglycerol with a highly thermostable lipase[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2013, 115(5):564-570.
- [49] LI D M, QIN X L, WANG J R, et al. Hydrolysis of soybean oil to produce diacylglycerol by a lipase from *Rhizopus oryzae*[J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2015, 115:43-50.
- [50] BABICZ I, LEITE S G, DE SOUZA R O, et al. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation[J]. *Ultrason Sonochem*, 2010, 17(1):4-6.
- [51] CHEONG L Z, TAN C P, LONG K, et al. Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: optimization using response surface methodology[J]. *Food Chem*, 2007, 105(4):1614-1622.
- [52] 雷炳福, 孙登文. 脂肪酶催化油脂水解反应的应用研究[J]. *中国油脂*, 1996, 21(4):10-12.
- [53] TSAI S, CHIANG C. Kinetics, mechanism, and time course analysis of lipase-catalyzed hydrolysis of high concentration olive oil in AOT-isooctane reversed micelles[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 38(2):206-211.
- [54] YACHMENEV V G, BLANCHARD E J, LAMBERT A H. Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greige cotton[J]. *Ultrasonics*, 2004, 42(1):87-91.
- [55] LI C, YOSHIMOTO M, OGATA H, et al. Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks[J]. *Ultrason Sonochem*, 2005, 12(5):373-384.
- [56] NOUREDDINI H, GAO X, JOSHI S, et al. Immobilization of *Pseudomonas cepacia*, lipase by sol-gel entrapment and its application in the hydrolysis of soybean oil[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2002, 79(1):33-40.
- [57] KAHVECI D, GUO Z, ÖZÇELİK B, et al. Lipase-catalyzed glycerolysis in ionic liquids directed towards diglyceride synthesis[J]. *Process Biochem*, 2009, 44:1358-1365.
- [58] CHU B S, QUEK S Y, BAHARIN B S. Optimisation of enzymatic hydrolysis for concentration of vitamin E in palm fatty acid distillate[J]. *Food Chem*, 2003, 80(3):295-302.