

## 结构脂质

# 无溶剂体系酶促酸解合成富含1,3-二硬脂酸-2-油酸甘油三酯的工艺研究

陈洋,董鹏,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:**优化了无溶剂体系中固定化1,3-特异性脂肪酶催化高油酸葵花籽油与硬脂酸合成富含1,3-二硬脂酸-2-油酸甘油三酯(SOS)的合成工艺。以SOS体系含量为考察指标,考察了酶的种类、底物摩尔比、反应温度、反应时间的影响。确定无溶剂体系下SOS合成的最佳工艺条件为:特异性脂肪酶为NS40086,酶添加量12%(以底物总质量计),底物(高油酸葵花籽油与硬脂酸)摩尔比1:12,反应时间4 h,反应温度70℃。在最佳工艺条件下反应产物中SOS含量为66.1%,SSO含量为7.1%,SOO含量为13.5%。

**关键词:**1,3-二硬脂酸-2-油酸甘油三酯;酸解;NS40086脂肪酶

**中图分类号:**TS225.6;TQ641 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2018)07-0057-04

## Synthesis of 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol by enzymatic acidolysis in solvent-free system

CHEN Yang, DONG Peng, 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:** Products rich in 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol (SOS) was synthesized by enzymatic acidolysis of high-oleic sunflower seed oil and stearic acid catalyzed by immobilized 1,3-regiospecific lipase in solvent-free system, and the synthesis process was optimized. The effects of lipase type, molar ratio of high-oleic sunflower seed oil to stearic acid, reaction time and reaction temperature on the content of SOS were investigated. The results showed that the optimal conditions of synthesis of SOS in solvent-free system were obtained as follows: with immobilized lipase NS40086 as catalyst and its dosage 12% (based on total mass of substrates), molar ratio of high-oleic sunflower seed oil to stearic acid 1:12, reaction time 4 h and reaction temperature 70℃. Under these conditions, the content of SOS, SSO and SOO in the product were 66.1%, 7.1% and 13.5%, respectively.

**Key words:** 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol; acidolysis; NS40086 lipase

由于可可脂(CB)独特的物理化学性质,其作为糖果行业中巧克力制品的理想用油,同时也存在着

高温不耐受性、极易起霜等问题<sup>[1-2]</sup>。巧克力起霜导致产品品质下降,是困扰糖果行业的一个世界性难题。通过酶促酸解获得富含1,3-二硬脂酸-2-油酸甘油三酯(SOS,S为硬脂酸,O为油酸)的可可脂改良剂可以很好地解决巧克力制品起霜、不耐热等问题<sup>[3-4]</sup>。

SOS是由十八碳的硬脂酸和十八碳的油酸所组成的一种长碳链熔点较高的甘油三酯。由于用于合成SOS的酶法酯交换或酶法酸解反应产物含量通常较低,所以目前关于SOS酶法合成的报道非常有

收稿日期:2017-09-10;修回日期:2018-03-21

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20150137);江苏省政策引导类计划(产学研合作)-前瞻性联合研究项目(BY2016022-33)

作者简介:陈洋(1993),男,在读硕士,研究方向为脂质科学与技术(E-mail)1373652588@qq.com。

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

限。王灵燕<sup>[5]</sup>使用高油酸葵花籽油与硬脂酸在无溶剂体系下反应,产物中 SOS 含量为 39.58%。Meng 等<sup>[6]</sup>使用高油酸葵花籽油与山嵛酸甲酯在无溶剂体系下反应,产物中 1,3-二山嵛酸-2-油酸甘油三酯(BOB, B 为山嵛酸, O 为油酸)含量为 32.8%。

本文以高油酸葵花籽油和硬脂酸为原料,首次采用较高的底物摩尔比结合新型的固定化 1,3-特异性脂肪酶 NS40086,提供了一种绿色高效的酶促酸解反应制备 SOS 的路径,以高效液相色谱定性,制备色谱结合气相色谱定量为检测手段,对影响酶法酸解反应的主要因素进行了初步研究,为酶法制备 SOS 的工业化推广奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

高油酸植物油:上海益海嘉里粮油有限公司提供(油酸含量 84.91%,主要甘三酯为 OOO 和 SOO);SOS 标准品(纯度 99%)、1,2-二硬脂酸-3-油酸甘油三酯(SSO)标准品、硬脂酸甲酯、油酸甲酯:Sigma 公司;硬脂酸:国药集团化学试剂有限公司;固定化脂肪酶 Lipozyme435、Lipozyme RM IM、NS40086:丹麦 Novozymes 公司;猪胰腺脂肪酶:Sigma 公司;正己烷、异丙醇、乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

夹层酶反应器,HH-601 超级恒温水浴锅,Re-501 型旋转蒸发器,Agilent 7820A 气相色谱仪,Waters 1525 高效液相色谱仪,Grace 中压制备色谱。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酸解反应

将一定量的高油酸葵花籽油和硬脂酸加入夹层酶反应釜中,添加一定量的固定化脂肪酶,在固定转速的恒温磁力搅拌器上,一定温度下反应一定时间后加入热正己烷溶解,趁热过滤除去脂肪酶,旋转蒸发除去正己烷,得到反应产物。

#### 1.2.2 HPLC-ELSD 测定甘油三酯含量

采用 HPLC-ELSD 测定反应产物中甘油三酯的含量。色谱条件:Sunfire C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm);流速 1 mL/min;柱温 30℃;进样量 10 μL;流动相 A 相为正己烷-异丙醇(体积比 1:1),B 相为乙腈;洗脱条件为流动相 A 相与流动相 B 相体积比 35:65。

所有反应均一式两份,以 SOS 标准品为外标定性,采用面积归一化法定量。在此色谱条件下,反应产物的 HPLC-ELSD 图见图 1。

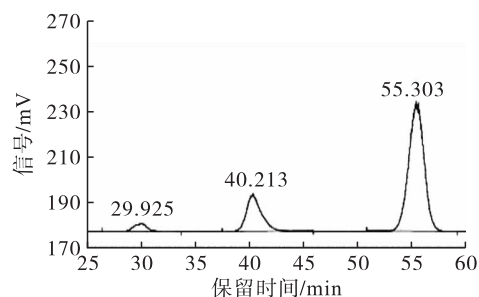


图 1 反应产物的 HPLC-ELSD 图

#### 1.2.3 反应产物 sn-2 位脂肪酸测定

由于无法利用 1.2.2 高效液相色谱有效分离 SOS 和 SSO,本实验中考察指标为 SOS 体系的含量,为了确定最终反应产物中 SOS 的具体含量,首先通过制备型 HPLC 制备含有 SOS 和 SSO 的组分。随后将收集的组分通过气相色谱检测 sn-2 位脂肪酸组成,定量分析 SOS 和位置异构体 SSO。反应产物 sn-2 位脂肪酸的测定参考 GB/T 24894-2010。除了使用 Sunfire C18 色谱柱(150 mm × 19 mm)和 8.0 mL/min 的流速之外,制备 SOS 和 SSO 组分的方法与 1.2.2 高效液相色谱的方法相同。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脂肪酶种类对反应的影响

脂肪酶对不同脂肪酸或其酰基部分有不同的分辨能力,不同来源的脂肪酶具有不同的催化特性,如稳定性、催化活性、底物专一性和位置专一性等,对产物中甘油三酯的组成起着决定性作用。因此,本实验选择了 3 种固定化脂肪酶作比较,其基本信息见表 1。

表 1 脂肪酶基本信息

脂肪酶	微生物来源	载体	位置选择性
Lipozyme435	<i>Candida antarctica</i>	大孔性丙烯酸树脂	底物性质决定 <sup>[7]</sup>
Lipozyme RM IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	大孔阴离子交换树脂	sn-1,3 <sup>[8]</sup>
NS40086	<i>Aspergillus oryzae</i>	大孔性丙烯酸树脂	sn-1,3 <sup>[9]</sup>

选取 3 种固定化脂肪酶 Lipozyme435、Lipozyme RM IM、NS40086 进行实验,反应条件为:无溶剂体

系下,底物(高油酸葵花籽油与硬脂酸)摩尔比 1:4,加入占底物总质量 12% 的一种脂肪酶,反应温度

70 °C, 反应时间 6 h, 酶的种类对酶促酸解反应的影响结果如图 2 所示。

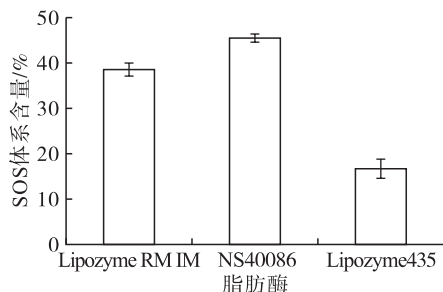


图 2 酶的种类对酶促酸解反应的影响

定向酸解反应过程,一方面要求脂肪酶拥有较强的催化酯化活力,尽可能减少水解带来的副产物;另一方面要有较好的 sn-1,3 位特异性,以获得更高的产率<sup>[10]</sup>。由于 Lipozyme435 的位置特异性取决于反应物的种类,在某些反应中,Lipozyme435 表现为 sn-1,3 位特异性,而在其他反应中,这种脂肪酶的作用却表现为一种无定位专一性的脂肪酶。由图 2 可知,Lipozyme435 在酸解反应中表现出较低的催化活性,说明在该反应体系下,Lipozyme435 并没有表现出 sn-1,3 位特异性。通常,用于合成对称型甘油三酯最常见的 sn-1,3 特异性脂肪酶是 Lipozyme RM IM<sup>[11]</sup>。然而,Lipozyme RM IM 具有低热稳定性,在高于 60 °C 的温度下进行反应,对 Lipozyme RM IM 的催化活性具有不利影响<sup>[12]</sup>,同时考虑到若将该反应温度降至 60 °C 以下会造成硬脂酸的固化,从而不利于反应的进行。相反,NS40086 在 70 °C 下表现出良好的热稳定性,且其催化酸解的产物中 SOS 体系含量最高。因此,选取 NS40086 作为反应用脂肪酶。

## 2.2 底物摩尔比对反应的影响

反应条件为:无溶剂体系下,将高油酸葵花籽油与硬脂酸以不同摩尔比混合,加入占底物总质量 12% 的脂肪酶 NS40086,反应温度 70 °C,反应时间 6 h,底物摩尔比对酶促酸解反应的影响结果如图 3 所示。

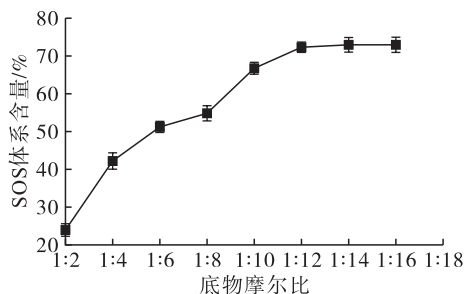


图 3 底物摩尔比对酶促酸解反应的影响

由图 3 可知,随着底物摩尔比的增加,SOS 体系

含量呈现先急剧增加后趋于平缓的趋势。较低的底物摩尔比会导致反应的不完全,反应初期高油酸葵花籽油与硬脂酸会较多地生成 1-硬脂酸-2,3-二油酸甘油三酯(SOO),随着底物摩尔比的增加,硬脂酸的大量引入,将初期生成的 SOO 进一步转化为 SOS,提高了 SOS 的含量。由于在后续操作中 SOS 与 SOO 较难分离,粗产物中 SOO 的含量将决定最终产品中 SOS 的纯度。

在此前合成抗起霜剂 BOB 的研究中,通常使用较低的底物摩尔比。然而,使用低摩尔比导致反应不完全,并且在粗产物中形成大量的 BOO。例如,Padley<sup>[13]</sup>利用低底物摩尔比的山萘酸和菜籽油酶法酸解,产物中含有 44.7% 的 BOO。Meng 等<sup>[6]</sup>以低底物摩尔比的山萘酸甲酯和高油酸葵花籽油酶法合成 BOB,目标产物 BOB 含量为 32.8%,而粗产物中存在含量高达 34.4% 的 BOO。在本研究中,较高的底物摩尔比对于高油酸葵花籽油和 SOO 转化为 SOS 是有利的,这与先前使用高底物比用于合成结构脂质的研究一致<sup>[14]</sup>。所以本实验采取的高底物摩尔比不仅可以提高 SOS 体系的含量,还可以提高 SOS 的纯度。尽管底物摩尔比为 1:10 时 SOS 体系的含量与摩尔比为 1:12 的 SOS 体系含量没有显著差异,但底物摩尔比为 1:12 导致甘油酯中 SOO 含量较低。因此,最适底物摩尔比为 1:12。

## 2.3 反应温度对反应的影响

反应条件为:无溶剂体系下,高油酸葵花籽油与硬脂酸摩尔比 1:12,加入占底物总质量 12% 的脂肪酶 NS40086,在不同温度下催化反应 6 h,反应温度对酶促酸解反应的影响结果如图 4 所示。

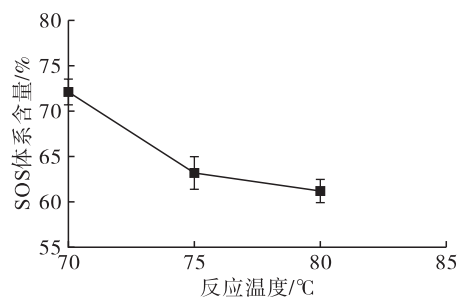


图 4 反应温度对酶促酸解反应的影响

反应温度影响反应速率、底物相互作用和脂肪酶活性。反应温度与反应速率、底物相互作用呈正相关,但反应温度对脂肪酶的活性具有双重作用。低的反应温度不利于增加脂肪酶的催化活性,但过高的反应温度会使脂肪酶中的蛋白质变性,导致其失活<sup>[15]</sup>。由于硬脂酸的熔点约为 70 °C,并且在低于 70 °C 的反应温度下固化,所以选择 70 °C 的初始

温度来研究反应温度对反应的影响。由图 4 可知, 70 ~ 80 °C 范围内的反应温度对 SOS 体系含量有着显著影响, 随着反应温度的升高, SOS 体系含量显著降低, 其原因是过高的温度使脂肪酶的活性明显降低。因此, 选择 70 °C 作为最佳反应温度。

#### 2.4 反应时间对反应的影响

反应条件为: 无溶剂体系下, 高油酸葵花籽油与硬脂酸摩尔比 1:12, 加入占底物总质量 12% 的脂肪酶 NS40086, 在 70 °C 下催化反应不同的时间, 反应时间对酶促酸解反应的影响结果如图 5 所示。

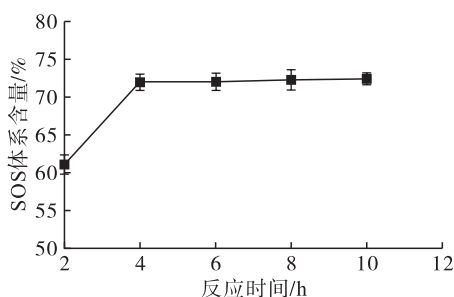


图 5 反应时间对酶促酸解反应的影响

由图 5 可知, 当反应时间在 2 ~ 4 h 的范围内变化时, SOS 体系含量显著增加。随着反应时间从 4 h 增加到 8 h, SOS 体系含量的变化不明显。因此, 选择 4 h 作为最佳反应时间。

无溶剂体系下, 在高油酸葵花籽油与硬脂酸的摩尔比 1:12, 加入占底物总质量 12% 的脂肪酶 NS40086、反应温度 70 °C、反应时间 4 h 条件下, SOS 体系含量为 73.2%。

#### 2.5 SOS 体系的组成确定

采用 1.2.3 对 SOS 体系的组成进行测定。结果表明: SOS 体系中 sn-2 位置上有 90.3% 的油酸和 9.7% 的硬脂酸, 表明 SOS 体系中含有 90.3% 的 sn-SOS 和 9.7% sn-SSO, 即在该最优反应条件下, 反应产物中 SOS 含量为 66.1%, SSO 含量为 7.1%, SOO 含量为 13.5%。

### 3 结论

SOS 作为可可脂改良剂的高成本限制了其在巧克力行业的应用。相比于以往反应产率通常较低的酶法酯交换和酶法酸解, 在本项研究中, 开发了一种以新型脂肪酶 NS40086 和高底物摩尔比为主的高效酸解反应来生产 SOS, 目标产物的产率显著提高。通过单因素实验, 获得酶法酸解合成 SOS 的最优反应条件: 无溶剂体系下, 将高油酸葵花籽油与硬脂酸以摩尔比 1:12 混合, 加入占底物总质量 12% 的脂肪酶 NS40086, 在 70 °C 下催化反应 4 h。在最优反应条件下, 反应产物中 SOS 含量为 66.1%, SSO 含

量为 7.1%, SOO 含量为 13.5%。

#### 参考文献:

- [1] MAHESHWARI B, YELLAREDDY S. Application of kokum (*Garcinia indica*) fat as cocoa butter improver in chocolate[J]. *J Sci Food Agric*, 2005, 85(1): 135-140.
- [2] SONWAI S, ROUSSEAU D. Structure evolution and bloom formation in tempered cocoa butter during long-term storage[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2006, 108(9): 735-745.
- [3] WALTER P, COMILLON P. Influence of thermal conditions and presence of additives on fat bloom in chocolate[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2001, 78(9): 927-932.
- [4] JIN J, ZHENG L, PEMBE W M, et al. Production of sn-1, 3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol-rich fats from mango kernel fat by selective fractionation using 2-methylpentane based isohexane[J]. *Food Chem*, 2017, 234: 46-54.
- [5] 王灵燕. 可可脂改良剂的生物合成[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2011.
- [6] MENG Z, GENGW X, LI J W, et al. Enzymatically catalyzed synthesis of anti-blooming agent 1, 3-dibehenoyl-2-oleoyl glycerol in a solvent-free system: optimization by response surface methodology[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(45): 10798-10806.
- [7] DOSSANTOS P, REZENDE C A, MARTINEZ J. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide[J]. *J Supercrit Fluid*, 2016, 107: 170-178.
- [8] WANG X, CHEN Y, MA Y, et al. Lipozyme 435-catalyzed synthesis of eicosapentaenoyl ethanolamide in a solvent-free system[J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2015, 122: 233-239.
- [9] WANG X, WANG X, WANG T. An effective method for reducing free fatty acid content of high-acid rice bran oil by enzymatic amidation[J]. *J Ind Eng Chem*, 2017, 48: 119-124.
- [10] 沈琪. 酶促酸解制备类可可脂的研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2012.
- [11] 唐文佳. 酶法合成 sn-2 位富含花生四烯酸的甘油一酯和对称性甘油三酯[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2016.
- [12] HAAR D, STABLER A, WICHMANN R, et al. Enzymatic esterification of free fatty acids in vegetable oils utilizing different immobilized lipases[J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(1): 169-174.
- [13] PADLEY F B. Enzymatic transesterification starting from high erucicruciferae oils: US5508048 [P]. 1996-04-16.
- [14] SAHIN N, AKOH C C, KARAALI A. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(14): 5779-5783.
- [15] QIN X L, YANG B, HUANG H H, et al. Lipase-catalyzed incorporation of different fatty acids into tripalmitin-enriched triacylglycerols: effect of reaction parameters[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(9): 2377-2384.