

酶法合成 sn-2 位富含 DHA 的中长链结构脂

姜 萱, 杨 瑶, 徐秀丽, 晁仲昊, 张石群, 程 阳, 邹孝强

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:采用两步酶法制备 sn-2 位富含 DHA 的中长链结构脂。首先,利用固定化脂肪酶 Lipozyme 435 催化 DHA 藻油发生醇解反应,溶剂萃取以获得富含 DHA 的单甘酯,再利用脂肪酶催化单甘酯和癸酸的酯化反应合成 sn-2 位富含 DHA 的中长链结构脂,并对中长链结构脂的组成进行分析。结果表明,最优酶法酯化反应条件为真空度 0.05 MPa,单甘酯与癸酸摩尔比 1:3,固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 添加量为底物质量的 8%,反应温度 25℃,反应时间 9 h。在最优条件下,酯化产物中甘油三酯(TAG)含量为 96.55%,TAG 脂肪酸组成中,DHA 占总脂肪酸的 40.04%,占 sn-2 位脂肪酸的 72.15%。纯化的产品 TAG 中中长链结构脂占 99.14%,含 DHA 的中长链结构脂占 67.69%。

关键词:二十二碳六烯酸;中长链结构脂;单甘酯;脂肪酶;醇解;酯化

中图分类号:TS225.6;TS201.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2022)06-0071-07

Enzymatic synthesis of medium and long-chain structured lipids rich in docosahexaenoic acid at sn-2 position

JIANG Xuan, YANG Yao, XU Xiuli, CHAO Zhonghao, ZHANG Shiqun, CHENG Yang, ZOU Xiaoqiang

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Medium and long-chain structured lipids (MLSL) rich in docosahexaenoic acid (DHA) at sn-2 position were prepared by a two-step enzymatic method. In the first step, Lipozyme 435 was used to catalyze the alcoholysis of DHA oil, and monoglyceride (MAG) rich in DHA was obtained by solvent extraction. Then the lipase-catalyzed esterification of MAG and capric acid (CA) was employed to obtain MLSL rich in DHA at sn-2 position. The results showed that the optimal enzymatic esterification conditions were obtained as follows: vacuum 0.05 MPa, Lipozyme TL IM dosage 8% (based on the mass of substrates), ratio of MAG to CA 1:3, reaction time 9 h, and reaction temperature 25℃. Under the optimal conditions, the triglycerides (TAG) content in the product was 96.55%, among which the DHA accounted for 40.04% of the total fatty acids and 72.15% of the sn-2 fatty acids. In the purified product of TAG, the content of total MLSL was 99.14% and the MLSL with DHA accounted for 67.69%.

Key words: docosahexaenoic acid; medium and long-chain structured lipid; monoglyceride; lipase; alcoholysis; esterification

二十二碳六烯酸(DHA)是大脑组织中常见的 ω -3长链多不饱和脂肪酸(PUFA),有多种药理与

生理功能^[1-6]。DHA是大脑生长和维持功能所必需的脂肪酸,对婴幼儿的神经、视力、大脑发育有着重要意义,但是婴儿内源性合成DHA不能满足自身生长发育需求,故需通过饮食补充DHA^[7-8]。婴幼儿的消化系统发育不完善,其胃脂肪酶的水平虽然与成年人相似,但胰脂肪酶和胆盐的含量分别仅为成年人的5%~10%和50%,所以婴幼儿的每日脂肪摄

收稿日期:2021-04-12;修回日期:2022-01-26

基金项目:国家自然科学基金项目(31601433)

作者简介:姜 萱(1997),女,在读硕士,研究方向为油脂与植物蛋白工程(E-mail)jiangxuan1997@foxmail.com。

通信作者:邹孝强,副教授(E-mail)xiaoqiangzou@163.com。

入量虽然是成年人的 3 ~ 5 倍,但其消化能力有限,吸收率显著低于成人^[7-8]。因此,提高 DHA 在婴儿体内的生物利用度非常重要。

中长中 (MLM) 型结构脂是最典型的中长链结构脂 (MLSL),即中链脂肪酸 (MCFA) 位于 sn - 1, 3 位,而长链脂肪酸 (LCFA) 位于 sn - 2 位。人体内的胃脂肪酶和胰脂肪酶特异性作用于 sn - 1, 3 位,同时由于 MCFA 有良好的水溶性,在 sn - 1, 3 位的 MCFA 与 LCFA 相比更容易被水解,并经门静脉吸收后快速供能^[9];水解产生的 sn - 2 位的单甘酯 (MAG) 富含 LCFA,可通过肠壁快速吸收。因此,MLM 型结构脂被认为是功能性脂肪酸的理想载体^[10-11]。

有研究以商业真菌发酵的微生物油为原料,通过酶促酯交换及酸解反应,制备了富含 PUFA 的 MLSL^[12-15]。许多研究为提高反应速率选择反应温度 40 ~ 60 °C,在长时间的保温反应过程中 PUFA 较易发生氧化,丧失生物活性。同时,酶促酯交换反应的体系中不仅包含 MLM 型结构脂,还包含其他类型的 MLSL 及未反应的底物,MLM 型结构脂分离困难;而酶促酸解反应中,sn - 1, 3 位特异性脂肪酶对 PUFA 的活性较低,最终的产品中较多 MLSL 含有 2 个 LCFA 分子。因此,酯交换和酸解法难以获得高纯度的 MLM 型结构脂。本研究在 25 °C 下采用两步酶法制备富含 MLM 型结构脂的产品,减少了 DHA 在反应过程中的氧化,同时有效提高了产品中 MLM 型结构脂的含量。

本研究首先制备 sn - 2 位富含 DHA 的 MAG,随后通过脂肪酶催化其与癸酸 (CA) 的酯化反应获得 MLM 型 MLSL。对酯化反应的除水方式,脂肪酶种类及添加量,底物摩尔比及反应时间对甘油酯组成的影响进行了考察,并对最终产物的组成进行了分析,以期对富含 DHA 的中长链结构脂的工业化应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DHA 藻油 (来源于裂殖壶藻),厦门汇盛生物有限公司;固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM (来源于 *Rhizomucor miehei*)、Lipozyme 435 (来源于 *Candida antarctica*)、Lipozyme TL IM (来源于 *Thermomyces lanuginosus*)、Novozym 40086 (来源于 *Aspergillus oryzae*),诺维信 (中国) 生物技术有限公司;无水乙醇 (纯度 ≥ 99.5%),上海麦克林生化科技有限公司;癸酸 (纯度 99%),北京百灵威科技有限公司;

正己烷、异丙醇,色谱纯,百灵威科技有限公司;2, 7 - 二氯荧光素、正己烷、乙腈、乙酸、氯仿,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;4 Å 分子筛,国药集团化学试剂有限公司;薄层色谱硅胶板 (20 cm × 20 cm, 10 cm × 20 cm),乳山市太阳干燥剂有限公司;三油酸甘油酯标准品 (纯度 ≥ 99%)、二油酸甘油酯混标 (其中 1, 3 - 二油酸甘油酯含量为 85%、1, 2 - 二油酸甘油酯含量为 15%)、2 - 油酸甘油酯 (纯度 ≥ 95%)、1 - 油酸甘油酯 (纯度 ≥ 99%)、37 种脂肪酸甲酯混标, Sigma - Aldrich 上海有限公司;DHA 甲酯标准品溶液 (9.99 mg/mL), Supelco 公司。

夹层反应釜;低温恒温槽;SHZ - 3 型循环水多用真空泵;Agilent 7820A 气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;Waters 1525 高效液相色谱仪、Waters Acquity UPLC、Waters Xevo G2 - S Q - TOF 质谱仪,美国 Waters 科技有限公司;Alltech 3300 蒸发光检测器,美国 Grace 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 MAG 的制备

参照文献^[16]的方法进行 MAG 的制备。为了减少 2 - MAG 发生酰基迁移,并防止 PUFA 氧化,DHA 藻油的酶促醇解在 25 °C 下进行。将 DHA 藻油和无水乙醇按照质量比 1:3 混合,置于 25 mL 夹层反应釜中,添加 10% Lipozyme 435,在 350 r/min 磁力搅拌下反应 6 h,旋转蒸发除去体系中的乙醇,得粗产物。再采用溶剂进行萃取,具体为:取 1 mL 粗产物溶解在 9 mL 95% 乙腈中,用 9 mL 正己烷洗涤乙腈体系 3 次;取乙腈相,旋转蒸发除去溶剂后,溶于 10 mL 氯仿中,然后与 10% 乙醇溶液充分混合,分离后收集氯仿层,并用 10 mL 氯仿洗涤水相 2 次,合并氯仿层,旋转蒸发除去氯仿,得到 MAG。

1.2.2 sn - 2 位富含 DHA 的中长链结构脂的制备

将 1.2.1 制备的 MAG 与 CA 以一定的摩尔比混合,添加一定量的脂肪酶,在 25 °C、350 r/min 磁力搅拌、除水条件下进行反应,每隔一定时间取样,分析反应产物的甘油酯组成。

1.2.3 甘油酯组成分析

利用配有 LiChrospher Si 柱 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm) 的高效液相色谱 (HPLC) 和蒸发光散射检测器 (ELSD) 对中长链结构脂的甘油酯组成进行分析。HPLC 条件:柱温 30 °C;ELSD 温度 55 °C;流动相 A 为正己烷 - 异丙醇 (体积比 99:1),流动相 B 为异丙醇 - 正己烷 - 乙酸 (体积比 1:1:0.01),流速

为 1.0 mL/min;梯度洗脱程序为流动相 A 在 10 min 内由 100% 线性降至 80%,在 10 ~ 14 min 降至 70%,随后在 1 min 内升至 100% 并保持 5 min,总运行时间为 20 min。采用峰面积归一化法进行定量。

1.2.4 甘油三酯(TAG)脂肪酸组成分析

取 50 μ L 待测样品,采用薄层层析(TLC)将样品中的 TAG 分离,展开剂为正己烷-乙醚-乙酸(体积比 80:20:1)^[17]。在硅胶板上均匀喷洒 0.2% 2,7-二氯荧光素乙醇溶液,在紫外光下显色,刮下对应 TAG 的条带,加入 500 μ L 2 mol/L 的氢氧化钾-甲醇溶液,充分旋涡振荡后,用 2 mL 正己烷萃取脂肪酸甲酯 2 次,经无水硫酸钠柱干燥、氮气浓缩后,进行气相色谱分析。

气相色谱条件:SP-TM-380 毛细管柱(60 m \times 0.32 mm \times 0.2 μ m);色谱柱升温程序为先在 100 $^{\circ}$ C 下保持 4 min,然后以 15 $^{\circ}$ C/min 的速率升温到 180 $^{\circ}$ C 并保持 4 min,最后以 4 $^{\circ}$ C/min 的速率升温至 215 $^{\circ}$ C;进样口温度和火焰离子化检测器温度均为 250 $^{\circ}$ C;载气为氮气,流速为 1 mL/min;分流比 100:1。

通过与标准品的保留时间进行定性,通过峰面积归一化法进行定量。

1.2.5 sn-2 位脂肪酸组成分析

将 30 mg 样品溶解于 10 mL 乙醚中,添加 0.3 mL 烯丙基溴化镁,剧烈搅拌 1 min 后,加入 8 mL 酸缓冲液(含 0.27 mol/L HCl 和 0.4 mol/L 硼酸)停止反应。除去水相,将乙醚萃取液用硼酸洗涤 2 次,并用无水硫酸钠干燥。采用氮气将乙醚相蒸发至 150 μ L,用氯仿-丙酮(体积比 90:10)为展开剂,在硼酸浸渍的 TLC 板上分离。将 sn-2 MAG 条带刮下,并用 2 mL 乙醚萃取 2 次,用无水硫酸钠干燥、氮气浓缩后进行甲酯化反应,采用气相色谱分析脂肪酸组成^[18]。

1.2.6 酯化反应产物中 TAG 的纯化

参考 Hita 等^[19]的方法对 1.2.2 得到的酯化反应产物中 TAG 进行分离纯化。将 5.0 g 酯化反应产物溶于 125 mL 正己烷,加入 75 mL 0.8 mol/L KOH 溶液(30% 乙醇配制),充分混合,游离脂肪酸及其钾盐溶于水相,TAG 溶于有机相;两相分离后,用 10 mL 正己烷洗涤水相 2 次;合并有机相,旋转蒸发除去溶剂,得到纯化的 TAG。

1.2.7 TAG 构型分析

将 1.2.6 所得纯化的 TAG 用色谱纯正己烷配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的溶液,进配备 BEH C18 柱(2.1 mm \times 50 mm \times 1.9 μ m)和四级杆飞行

时间质谱仪的超高效液相色谱(UPLC)系统分析甘油三酯的构型。UPLC 条件:进样量 1.0 μ L;柱温 45 $^{\circ}$ C;流动相 A 为乙腈-异丙醇(体积比 1:9),流动相 B 为 40% 乙腈溶液,流动相中均加入 10 mmol/L 的乙酸铵;梯度洗脱程序为流动相 A 在 0 ~ 1 min 为 70%,在 1 ~ 30 min 由 70% 线性升至 87%,保持 1 min,在 31 ~ 32 min 由 87% 线性降至 70%,保持 4 min;流速 300 μ L/min。MS 条件:ESI 正离子模式;毛细管电压 3.5 kV,锥孔电压 30 V;离子源温度 100 $^{\circ}$ C;碰撞气体为氩气,流速 50 L/h;脱溶剂温度 400 $^{\circ}$ C;去溶剂化气体为氮气,流速 700 L/h;质量扫描范围(m/z)200 ~ 1 500。根据质谱信息对 TAG 构型进行准确定性,采用峰面积归一化法进行定量。

1.2.8 统计分析

所有样品测定均重复 3 次,数据由 Microsoft Excel 2010 和 Origin 8.5 软件计算得出,并以“平均值 \pm 标准差”表示。使用 SAS 软件对数据进行方差分析(ANOVA)。显著性水平为 $\alpha = 0.05$,在 $p < 0.05$ 时差异显著。

2 结果与讨论

2.1 MAG 的甘油酯组成

DHA 藻油经过醇解及溶剂萃取后,得到的 MAG 的甘油酯组成如图 1 所示。由图 1 可以看出,MAG 中 2-MAG 含量为 80.21%。

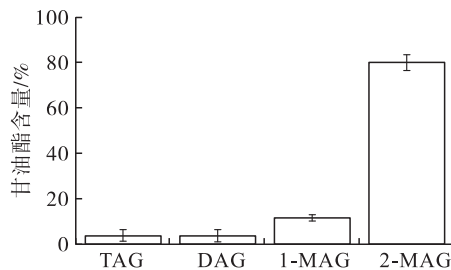


图 1 MAG 的甘油酯组成

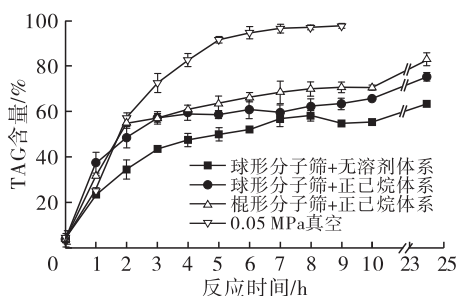
2.2 M-DHA-M 型 MSL 制备的单因素实验

2.2.1 除水方式对酯化反应的影响

在 MAG 与 CA 的酯化反应中,及时从反应体系中除去副产物水,将大大提高产品中 TAG 的产率。在 MAG 与 CA 摩尔比 1:3、Lipozyme TL IM 添加量为底物质量的 10%、反应温度 25 $^{\circ}$ C 条件下,考察不同除水方式对反应体系中 TAG 含量的影响,结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,常压下的反应体系反应 24 h 后,TAG 含量均显著高于 10 h 时的,说明在 10 h 时酯化反应尚未达到平衡。在常压下,选用棍形分子筛+正己烷体系的 TAG 含量较高,反应 24 h

时 TAG 含量达到 82.75%；而选用球形分子筛的反应中,在正己烷体系和无溶剂体系下反应 24 h 后,TAG 含量分别达到 75.04% 和 63.34%。在真空度 0.05 MPa 下的反应体系在 5 h 内 TAG 含量急剧上升,7 h 后接近平衡,反应 9 h 时 TAG 含量达到 97.48%,远高于其他 3 种除水方式的。有研究表明,正己烷作为溶剂会导致酰基迁移率上升^[20]；而真空环境下,TAG 积累速率更高,平衡条件下 TAG 含量更高,说明真空除水效率高,与文献[16]结果相符,且真空除水避免了溶剂对酰基迁移的影响。因此,选择 0.05 MPa 真空作为除水的最佳方法。



注:正己烷体系(正己烷体积为底物质量的 4 倍);球形分子筛和棍形分子筛添加量均为 200 mg;分子筛在马弗炉中 500℃下活化 4 h

图 2 不同除水条件下酯化反应体系中 TAG 含量随反应时间的变化

2.2.2 脂肪酶种类对酯化反应的影响

本研究采用固定化脂肪酶催化 MAG 与 CA 的酯化反应。Lipozyme TL IM、Lipozyme RM IM 及 Novozym 40086 为特异性催化 sn-1,3 位的固定化脂肪酶,为了提高 TAG 的生产效率,比较了 3 种脂肪酶在酯化反应中的催化能力。在 MAG 与 CA 摩尔比 1:3、脂肪酶添加量为底物质量的 10%、反应温度 25℃、真空度 0.05 MPa 条件下,考察脂肪酶种类对反应体系中 TAG 含量的影响,结果如图 3 所示。

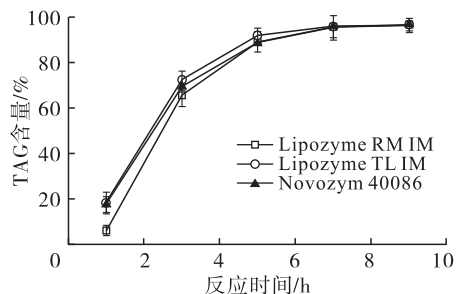


图 3 脂肪酶种类对酯化反应体系中 TAG 含量的影响

由图 3 可以看出,使用不同种类的脂肪酶不会改变反应的平衡状态,但会影响反应效率,从而影响反应平衡所需时间。Lipozyme TL IM 在反应 5 h 内

表现出最强的催化活力,反应 5 h 时反应体系中 TAG 含量达到 93.57%,而反应 7 h 时,Novozym 40086、Lipozyme TL IM 和 Lipozyme RM IM 催化的反应体系中的 TAG 含量均接近 96.50%。Lipozyme TL IM 的价格相对其他 2 种脂肪酶更低。综合考虑经济性及催化性能,选择 Lipozyme TL IM 作为酯化反应的催化剂。

2.2.3 MAG 与 CA 摩尔比对酯化反应的影响

在可逆反应中,底物摩尔比是影响反应平衡状态的重要因素,同时影响反应效率。在 Lipozyme TL IM 添加量为底物质量的 10%、反应温度 25℃、真空度 0.05 MPa 条件下,考察 MAG 与 CA 摩尔比对反应体系中 TAG 含量的影响,结果如图 4 所示。

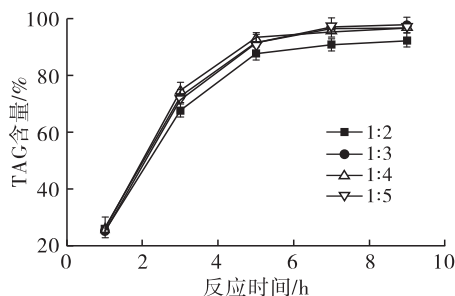


图 4 MAG 与 CA 摩尔比对酯化反应体系中 TAG 含量的影响

由图 4 可以看出,反应 9 h 时,MAG 与 CA 摩尔比为 1:2 的反应体系中 TAG 含量为 92.05%,而 MAG 与 CA 摩尔比为 1:3、1:4 及 1:5 的反应体系中 TAG 含量均高于 97%。随着 MAG 与 CA 摩尔比从 1:2 增加到 1:3,酯化反应速率和平衡状态下 TAG 含量均有显著提升;MAG 与 CA 摩尔比从 1:3 增加到 1:5,反应速率和 TAG 含量提高幅度较小,表明 CA 足量时,其含量提升对反应速率及平衡状态的影响较小。但是 CA 的增加会导致体系中脂肪酸含量显著增加,促进氧化,且过量的脂肪酸会增加脱酸的成本,因此应选择脂肪酸含量更低的 MAG 与 CA 摩尔比^[21]。综合考虑,选择 MAG 与 CA 摩尔比 1:3。

2.2.4 Lipozyme TL IM 添加量对酯化反应的影响

在 MAG 与 CA 摩尔比 1:3、反应温度 25℃、真空度 0.05 MPa 条件下,考察 Lipozyme TL IM 添加量对反应体系中 TAG 含量的影响,结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出:Lipozyme TL IM 添加量为 10% 时,反应体系中 TAG 含量在反应时间 0~5 h 时急剧上升,反应 5 h 达到 91.36%,反应 7 h 后趋于稳定,达到 96.56%;Lipozyme TL IM 添加量 4%、6% 及 8% 的反应体系中 TAG 含量随反应时间延长不断上升,在反应 9 h 时分别达到 88.95%、94.84%

及96.55%。在4%~10%的范围内,反应速率随着Lipozyme TL IM添加量的增加而提高,这是由于Lipozyme TL IM添加量较低时,体系内酶的含量不足以满足底物的接触需求;随着Lipozyme TL IM添加量的增加,酶与底物接触频率增加,酯化反应速率提高。由于反应9 h时Lipozyme TL IM添加量为8%的反应体系与添加量为10%的反应体系中TAG含量接近,因此选择Lipozyme TL IM添加量为8%。

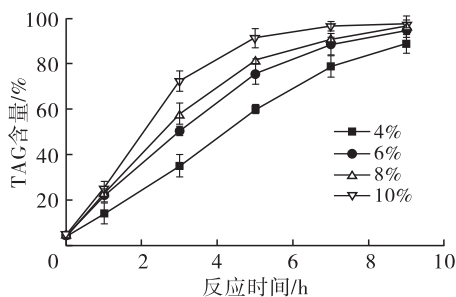


图5 Lipozyme TL IM添加量对酯化反应体系中TAG含量的影响

综上,通过单因素实验,得到酯化反应的最优条件为:反应温度25℃,MAG与CA摩尔比1:3,脂肪酶Lipozyme TL IM添加量为底物质量的8%,真空度0.05 MPa,反应时间9 h。在优化条件下得到的产物中TAG含量为96.55%。

2.3 TAG的脂肪酸组成

对最优酯化条件得到的产物按1.2.4方法分离TAG,并测定其脂肪酸组成,同时与DHA藻油的脂肪酸组成进行对比,结果如表1所示。

由表1可知:DHA、棕榈酸(PA,C16:0)及二十二碳五烯酸(DPA,C22:5)是DHA藻油中的主要脂

肪酸,含量分别为54.12%、25.72%及10.96%;而其sn-2位脂肪酸组成中,PUFA(包括DPA和DHA)总含量为87.86%,其中DHA含量为69.39%。TAG中总脂肪酸以癸酸和DHA为主,含量分别为40.27%和40.04%;与DHA藻油相比,TAG中DHA含量略有下降,棕榈酸含量显著下降,而癸酸含量显著提升。TAG中sn-2位的脂肪酸主要为DHA和DPA,含量分别为72.15%和14.73%,癸酸含量仅为3.17%,表明在优化条件下酰基迁移率低。与DHA藻油相比,TAG中sn-2位的DHA含量更高,原因可能是以下两点:一是脂肪酶对DHA的活性较低,在醇解制备MAG的过程中,倾向于水解具有较短碳链及低不饱和脂肪酸,对DHA有一定的富集效果;二是sn-2位上的部分脂肪酸,如棕榈酸及油酸,更容易发生酰基转移,从而导致sn-2位的DHA含量增加。

表1 原料及TAG的脂肪酸组成 %

脂肪酸	DHA藻油		TAG	
	总脂肪酸	sn-2位脂肪酸	总脂肪酸	sn-2位脂肪酸
C10:0	-	-	40.27 ± 2.59	3.17 ± 0.12
C16:0	25.72 ± 1.68	7.86 ± 0.51	5.63 ± 0.91	3.68 ± 0.17
C18:0	1.33 ± 0.11	0.73 ± 0.06	2.38 ± 0.67	0.91 ± 0.02
C18:1	2.84 ± 0.09	0.78 ± 0.57	1.91 ± 0.22	4.03 ± 0.11
C22:5	10.96 ± 1.12	18.47 ± 1.89	8.42 ± 0.20	14.73 ± 0.85
C22:6	54.12 ± 1.60	69.39 ± 1.77	40.04 ± 2.65	72.15 ± 1.84

2.4 产品的TAG构型

采用UPLC-Q-TOF-MS分离鉴定产品中的TAG构型,结果见表2。

表2 产品的TAG种类及含量

TAG种类	ECN	m/z	含量/%	脂肪酸组成 ^a
TAG(30:0)	30	572.493 0	0.87 ± 0.25	C10:0 - C10:0 - C10:0
TAG(34:1)	32	626.536 9	0.51 ± 0.05	C14:1 - C10:0 - C10:0, C16:0 - C14:1 - C4:0, C18:1 - C12:0 - C4:0
TAG(36:0)	36	656.587 4	4.23 ± 0.18	C16:0 - C10:0 - C10:0
TAG(38:1)	36	682.602 6	4.51 ± 0.29	C18:1 - C10:0 - C10:0
TAG(40:4)	32	704.587 8	0.88 ± 0.29	C20:4 - C10:0 - C10:0
TAG(40:6)	28	700.556 4	1.59 ± 0.09	C22:6 - C10:0 - C8:0
TAG(42:5)	32	730.604 9	20.49 ± 0.01	C22:5 - C10:0 - C10:0
TAG(42:6)	30	728.585 6	54.78 ± 0.16	C22:6 - C10:0 - C10:0
TAG(46:6)	34	784.651 2	0.56 ± 0.27	C22:6 - C14:0 - C10:0
TAG(48:5)	38	814.696 8	0.83 ± 0.16	C22:5 - C16:0 - C10:0
TAG(48:6)	36	812.685 5	3.90 ± 0.05	C22:6 - C16:0 - C10:0
TAG(50:7)	36	838.699 8	1.08 ± 0.15	C22:6 - C18:1 - C10:0
TAG(54:11)	32	886.700 1	1.23 ± 0.25	C22:5 - C22:6 - C10:0
TAG(54:12)	30	884.684 9	4.55 ± 0.29	C22:6 - C22:6 - C10:0

注:a.不区分位置异构体

由表2可知:从产品中共分析出14个TAG母离子,从中鉴定出16种甘油酯,其中MLSL含量为99.14%,含有DHA的MLSL含量为67.69%;DHA-CA-CA及DPA-CA-CA是产品中最主要的2种TAG,含量分别为54.78%及20.49%。

结合脂肪酸组成与甘油三酯的鉴定,可以认为产品中的主要成分是MLM型TAG,且富含CA-DHA-CA。

3 结论

本研究以酶催化醇解DHA藻油(来源于裂殖壶藻)获得的sn-2位富含DHA的MAG为反应原料,以CA为酰基供体,通过脂肪酶催化酯化反应制备sn-2位富含DHA的MLSL。最优酯化反应条件为:MAG与CA摩尔比1:3,反应温度25℃,脂肪酶Lipozyme TL IM添加量为底物质量的8%,真空度0.05 MPa,反应时间9 h。在最优条件下,酯化产物中TAG含量为96.55%,TAG的脂肪酸组成中,DHA占总脂肪酸的40.04%,占sn-2位脂肪酸的72.15%;纯化的产品中中长链结构脂含量为99.14%,含DHA的中长链结构脂含量为67.69%。该产品富含CA-DHA-CA,可从分子层面提升DHA的生物利用率,并应用于婴儿配方食品及功能性食品。

参考文献:

- [1] BELAYEV L, MARCHESELLI V L, KHOUTOROVA L, et al. Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection[J]. *Stroke*, 2005, 36(1): 118-123.
- [2] WILLIAMS J J, MAYURASAKORN K, VANNUCCI S J, et al. *n*-3 Fatty acid rich triglyceride emulsions are neuroprotective after cerebral hypoxic-ischemic injury in neonatal mice[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56233 [2013-04-12]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056233>.
- [3] MAYURASAKORN K, NIATSETSKAYA Z V, SOSUNOV S A, et al. DHA But not EPA emulsions preserve neurological and mitochondrial function after brain hypoxia-ischemia in neonatal mice[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160870 [2016-04-12]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160870>.
- [4] DYALL S C. Long-chain *omega*-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA[J/OL]. *Front Aging Neurosci*, 2015(7): 52 [2015-04-12]. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00052>.
- [5] KIM Y, KIM J. Intake or blood levels of *n*-3 polyunsaturated fatty acids and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2020, 29(2): 288-299.
- [6] TIAN Z R, YAO M, ZHOU L Y, et al. Effect of docosahexaenoic acid on the recovery of motor function in rats with spinal cord injury: a meta-analysis[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(3): 537-547.
- [7] ABRAHAMSE E, MINEKUS M, AKEN G A, et al. Development of the digestive system: experimental challenges and approaches of infant lipid digestion[J]. *Food Digestion*, 2012, 3(1): 63-77.
- [8] BOURLIEU C, MÉNARD O, BOUZERZOUR K, et al. Specificity of infant digestive conditions: some clues for developing relevant in vitro models[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54(11): 1427-1457.
- [9] AOYAMA T, NOSAKA N, KASAI M. Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids[J]. *J Med Invest*, 2007, 54: 385-388.
- [10] PFEFFER J, FREUND A, BEL-RHLID R, et al. Highly efficient enzymatic synthesis of 2-monoacylglycerides and structured lipids and their production on a technical scale[J]. *Lipids*, 2007, 42(10): 947-953.
- [11] CHRISTENSEN M S, HØY C E, BECKER C C, et al. Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure[J]. *Am J Clin Nutr*, 1995, 61: 56-61.
- [12] ÁLVAREZ C A, AKOH C C. Preparation of infant formula fat analog containing capric acid and enriched with DHA and ARA at the sn-2 position[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2016, 93(4): 531-542.
- [13] HE Y J, LI J B, GUO Z, et al. Synthesis of novel medium-long-medium type structured lipids from microalgae oil via two-step enzymatic reactions[J]. *Process Biochem*, 2018, 68: 108-116.
- [14] ROXANA I K F, KAZUHIKO H, IWASAKI Y, et al. Utilization of reaction medium-dependent regiospecificity of *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) for the synthesis of 1,3-dicapryloyl-2-docosahexaenoyl (or eicosapentaenoyl) glycerol[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2001, 78: 285-290.
- [15] COSTA C M, OSÓRIO N M, CANET A, et al. Production of MLM type structured lipids from grapeseed oil catalyzed by non-commercial lipases[J/OL]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2018, 120(1): 1700320 [2018-04-12]. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700320>.
- [16] IRIMESCU R, IWASAKI Y, IWASAKI Y. Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2002, 79: 879-883.

参考文献:

- [1] 宋庆明. 蚕豆肽制备及其生物活性的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2009.
- [2] 王吉福, 胡英忠. 青海蚕豆发展现状及技术对策探讨[J]. 农业科技通讯, 2017(10):20-21.
- [3] 宋晓敏, 李素芬, 刘建福, 等. 20种蚕豆样品蛋白质含量与其蛋白组分的分子质量[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(12):42-46.
- [4] 苏海玲, 张海英, 李红卫, 等. 蚕豆蛋白酶解工艺及响应面法的优化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(5):39-46.
- [5] 陈丹阳, 韩涛, 杜斌, 等. 酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽及其响应面优化[J]. 中国油脂, 2018, 43(10):46-52.
- [6] 叶婷, 康玉凡, 薛文通. 蚕豆蛋白的提取及加工利用研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2013(8):24-26,30.
- [7] 陈丹阳, 韩涛. 蚕豆蛋白酶解物分离纯化及降胆固醇活性[J]. 中国油脂, 2021, 46(1):61-64,104.
- [8] XIE J H, DU M X, SHEN M Y, et al. Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin - I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*) [J]. Food Chem, 2019, 270:243-250.
- [9] 王天明, 苏意钢, 马永钧, 等. 海地瓜多肽分离及抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(5):75-81,166.
- [10] ZHANG Y, LEWIS K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 149(1):59-64.
- [11] 张月圆. 醋豆降压肽的制备及其降压活性研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.
- [12] 谢丽平. 具有抗氧化、抗衰老活性的多肽筛选、分离纯化及结构鉴定[D]. 广州:华南理工大学, 2019.
- [13] 缪佳瑜, 林慧敏, 李颖杰, 等. 复合酶解结合膜分离技术制备秘鲁鱿鱼抗氧化肽的研究[J]. 食品科技, 2019, 44(12):131-139.
- [14] 黄文凯. 膜分离方法制备免疫活性大豆肽的研究[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2007.
- [15] 吴红洋, 姜太玲, 申光辉, 等. 花椒籽蛋白降血压肽的加工适应性研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(2):24-29.
- [16] 李雪琴, 苗笑亮, 裘爱泳. 蚕豆分离蛋白的制备及其功能性质研究[J]. 粮食与饲料工业, 2003(5):41-43.
- [17] 郑志强, 郝利民, 刘晋, 等. 小麦蛋白双酶解制备高抗氧化性小麦肽研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(8):78-88.
- [18] 刘淳, 张海英, 韩涛, 等. Alcalase 碱性蛋白酶酶解蚕豆蛋白的研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(12):29-33.
- [19] 张立娟, 姜瞻梅, 姚雪琳, 等. 双缩脲法检测大豆分离蛋白中蛋白质的研究[J]. 食品工业科技, 2008(7):241-242.
- [20] 俞晓玉, 王树成, 高娃, 等. 粮食中蛋白质含量的测定[J]. 广东化工, 2017, 44(4):114-115.
- [21] 乔杨波, 韩丽娟, 王树林, 等. 不同蛋白酶酶解对蚕豆蛋白生物活性的影响[J]. 中国油脂, 2020, 45(7):56-60.
- [22] 许鹭, 蓝木香, 杨继国, 等. 柚皮苷-卵磷脂包合物的制备及其理化性质研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(8):237-241,279.

(上接第76页)

- [17] ZOU X Q, HUANG J H, JIN Q Z, et al. Preparation of human milk fat substitutes from palm stearin with arachidonic and docosahexaenoic acid: combination of enzymatic and physical methods[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(37):9415-9423.
- [18] XU X, SKANDS A R H, HØY C E, et al. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: elucidation of acyl migration by response surface design [J]. J Am Oil Chem Soc, 1998, 75(12):1179-1186.
- [19] HITA E, ROBLES A, CAMACHO B, et al. Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases[J]. Process Biochem, 2007, 42(3):415-422.
- [20] LI W, DU W, LI Q, et al. Dependence on the properties of organic solvent: study on acyl migration kinetics of partial glycerides [J]. Bioresour Technol, 2010, 101(15):5737-5742.
- [21] MIYASHITA K, TAKAGI T. Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids [J]. J Am Oil Chem Soc, 1986, 63:1380-1384.