

Lipozyme TL IM 催化合成中长链脂肪酸甘油三酯的工艺优化

杨颖,熊巍林,汪增乾,李敏利,姜黎

(道道全粮油股份有限公司 国家油菜籽加工技术研发分中心,湖南 岳阳 414000)

摘要:为探索高含量中长链脂肪酸甘油三酯(MLCT)和低成本的酶法催化合成 MLCT 工艺,以一级菜籽油为原料,采用脂肪酶 Lipozyme TL IM 酶法催化酯交换合成 MLCT,采用单因素试验研究了底物配比(菜籽油与中链甘油三酯质量比)、反应时间、反应温度、酶添加量对酯交换反应的影响,在此基础上,通过正交试验对 MLCT 合成工艺条件进行优化。结果表明,最佳的 MLCT 合成工艺条件为底物配比 3:1、反应时间 4 h、反应温度 50℃、酶添加量 8% (基于底物的质量),在此条件下 MLCT 含量达到 87.50%。优化的 MLCT 合成工艺具有 MLCT 含量高,反应时间短、反应温度低的优势,可降低能耗及减少酶失活,从而降低了生产成本。

关键词:脂肪酶;中长链脂肪酸甘油三酯;酯交换

中图分类号:TS225.6; Q814.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2022)12-0037-05

Process optimization of synthesis of medium and long - chain fatty acid triglycerides catalyzed by Lipozyme TL IM

YANG Ying, XIONG Weilin, WANG Zengqian, LI Minli, JIANG Li

(National R&D Center for Rapeseed Processing, Daodaoquan Grain & Oil Co., Ltd., Yueyang 414000, Hunan, China)

Abstract: To explore the enzymatic catalytic synthesis process of medium long - chain fatty acid triglyceride (MLCT) with high MLCT content and low cost, lipase Lipozyme TL IM enzymatic catalytic transesterification was used to synthesize MLCT using first - grade rapeseed oil as raw material, and the effects of substrate ratio (mass ratio of rapeseed oil to medium chain triglycerides), reaction time, reaction temperature and enzyme dosage on transesterification reaction were investigated by single factor experiment. Then the synthesis process conditions were optimized by orthogonal experiment. The results showed that the optimal synthesis process conditions were obtained as follows: substrate ratio 3:1, reaction time 4 h, reaction temperature 50℃, and enzyme dosage 8% (based on the mass of substrate), and the MLCT content reached 87.50% under the optimal conditions. The optimized process has advantages of high MLCT content, short reaction time and low reaction temperature, which can reduce energy consumption and enzyme inactivation, thus reducing the production cost.

Key words: lipase; medium and long - chain fatty acid triglycerides; transesterification

中长链脂肪酸甘油三酯(MLCT)是指同一甘油骨架上含有中链和长链脂肪酸的甘油三酯^[1],通常是由酯化或酯交换合成。MLCT克服了中链脂肪酸烟点低的缺陷,且相比长链脂肪酸,具有快速供能、

降低胆固醇含量、预防和缓解肥胖症等特殊生理功能^[2],拥有很好的市场潜力。

目前,MLCT的合成方法主要是化学法和酶法^[3]。酶法由于具有专一性强、副产物少、绿色环保、安全性高等优势^[4],近年来备受推崇,如:徐文迪等^[5]以椰子油与富含 OPO 和 OPL 的油脂为原料,在脂肪酶 NS40086 的催化下生产 MLCT,产品中 MLCT 质量分数达到了 70.44%;陆继源等^[6]利用脂

收稿日期:2021-09-26;修回日期:2022-07-25

作者简介:杨颖(1994),女,硕士,研究方向为食品安全与加工(E-mail)2496801257@qq.com。

肪酶 Lipozyme 435 催化中链甘油三酯(MCT)和大豆油酯交换反应合成 MLCT, 得出最佳工艺条件为大豆油与 MCT 质量比 60:40、反应温度 89℃、反应时间 4.36 h、加酶量 5.5%, 此条件下 MLCT 质量分数达到 84.15%。但目前的酶法大多存在反应时间长、温度高的问题, 从而在工业生产中会产生较大的能源消耗, 且容易使酶失活。脂肪酶价格昂贵, 失活导致的低使用率会造成合成油品的成本大幅度升高, 高成本低利润则会使该类型产品难以推广。

基于此, 本研究以菜籽油为原料, 采用脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化合成 MLCT, 通过单因素试验和正交试验对 MLCT 合成工艺条件进行优化, 以获得高含量 MLCT 和低成本的工艺条件, 为 MLCT 的酶法工业化高效生产提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

一级菜籽油, 道道全粮油股份有限公司; 中链甘油三酯(MCT), 浙江建德千岛化工有限公司; 脂肪酶 Lipozyme TL IM, 诺维信生物技术有限公司; 异丙醇、甲醇、乙腈、三氯甲烷、氢氧化钾、氢氧化钠、冰乙酸, 均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

HH-6 型数显恒温水浴锅, 常州普天仪器制造有限公司; YMD-150 型分子蒸馏系统, 上海远怀实业有限公司; Triple TOF TM 6000+ 液相色谱-质谱联用仪, 美国 AB Sciex 公司; GC7890B 型气相色谱仪, 美国 Agilent 科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 MLCT 的催化合成

参考文献[7-8]的方法进行 MLCT 的催化合成。具体为: 一级菜籽油和 MCT 按一定比例混合, 加入适量的 Lipozyme TL IM, 于密闭容器中在一一定的温度下搅拌反应一段时间后, 停止搅拌和加热, 过滤去除酶制剂, 再进分子蒸馏系统。在主蒸发器温度 220℃(实际壁温 180~200℃)、内置冷凝器温度 -10℃、转速 300 r/min、加料真空 4 Pa、加料速度 3~6 g/min、压强 5~6 Pa 条件下分离提纯, 得到 MLCT。

1.2.2 MLCT 甘油三酯组成及含量的测定

参考文献[9]进行 MLCT 甘油三酯的组成及含量的测定。

前处理: 称量 10 mg 样品到 12 mL 的玻璃试管中, 加入 2 mL 的异丙醇-三氯甲烷(体积比 1:1)溶解, 涡旋混匀后, 取上述溶液 20 μL 到 880 μL 异丙醇中, 加入 100 μL 的全脂质内标(equiSPLASH_

330731_1EA_REV, 10 μg/mL), 涡旋混匀后, 过 0.22 μm 的有机滤膜, 上机。

液相色谱条件: Shimadzu UPLC LC-30A 色谱系统; Phenomenex Kinetex C18 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm); 进样量 3 μL; 流速 0.4 mL/min; 柱温 60℃; 样品室温度 4℃; A 相为水-甲醇-乙腈(体积比 1:1:1, 含 5 mmol/L NH₄Ac), B 相为异丙醇-乙腈(体积比 5:1, 含 5 mmol/L NH₄Ac); 洗脱梯度为 0.5 min 20% B, 1.5 min 40% B, 3 min 60% B, 13 min 98% B, 13.1 min 20% B, 17 min 20% B。

质谱条件: AB Sciex Triple TOF® 6600, ESI 离子源, 正离子模式, 质量扫描范围(*m/z*) 100~1 200; 离子喷雾电压 5 500 V; 离子源温度 600℃。

1.2.3 MLCT 质量指标的测定

色泽的测定参考 GB/T 5009.37-2003; 透明度的测定参考 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; 烟点的测定参考 GB/T 20795-2006。

1.2.4 数据处理

每个试验重复 3 次, 采用 Origin 9.0 统计分析软件进行基础数据整理、分析与作图, 利用 Design Expert 软件进行方差分析。甘油三酯数据采用 AB Sciex 公司的专业脂质分析软件 MasterView、PeakView、MultiQuant 和 MarkView 进行分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 底物配比(菜籽油与 MCT 质量比)对 MLCT 含量的影响

将一级菜籽油与 MCT 分别按 5:1、4:1、3:1、2:1、1:1 的质量比混合, 加入 10% (基于底物的质量) 的 Lipozyme TL IM, 于 60℃ 反应 4 h 后, 过滤去除酶制剂, 再经过分子蒸馏分离提纯后检测 MLCT 含量, 结果如图 1 所示。

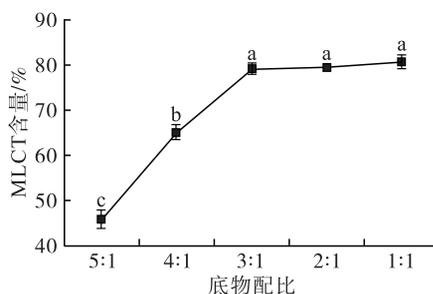


图 1 底物比对 MLCT 含量的影响

在酶催化合成 MLCT 的反应过程中,底物配比对最终合成 MLCT 的含量有较大影响。若 MCT 过量则产物分离纯化难度大,生产成本低,若 MCT 量过低则 MLCT 含量低,因此选择合适的底物配比尤为重要^[10]。由图 1 可知:当底物配比为 5:1 时,MLCT 含量仅为 45.76%;随着 MCT 比例的增大,MLCT 含量不断升高,底物配比为 3:1 时,MLCT 含量增至 79.16%;继续增大 MCT 比例,MLCT 含量增加不显著。有研究表明,当反应底物 MCT(三癸酸甘油三酯)的浓度增大到一定值时,会抑制结构脂的合成^[11]。因此,选择底物配比 3:1 最为合适。

2.1.2 反应时间对 MLCT 含量的影响

将一级菜籽油与 MCT 按 3:1 的质量比混合,加入 10% 的 Lipozyme TL IM,于 60℃ 分别反应 1、2、3、4、5 h 后,过滤去除酶制剂,再经分子蒸馏分离提纯后检测 MLCT 含量,结果如图 2 所示。

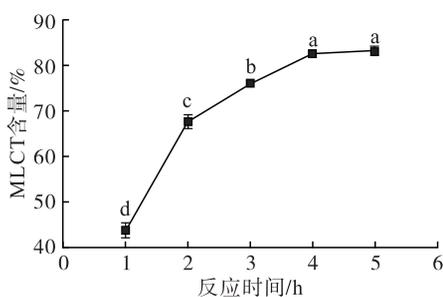


图 2 反应时间对 MLCT 含量的影响

反应时间是影响 MLCT 含量的重要因素之一,当反应没达到平衡之前,随着反应时间的延长,MLCT 含量增加。由图 2 可知,随着反应时间的延长,MLCT 含量增加,反应 4 h 时 MLCT 含量为 82.85%,4 h 后 MLCT 含量增加不显著,反应达到平衡。考虑反应时间越长,能耗越大,酶的活性越低,选择 4 h 的反应时间最为合适。杨凯舟等^[12]通过响应面优化脂肪酶催化合成 MLCT,得到最佳反应时间为 12.97 h;胡蒋宁等^[13]以苦瓜籽油为原料,癸酸为酰基供体,在特异性脂肪酶 Lipozyme RM IM 的催化作用下合成功能性油脂,得到最佳反应时间为 14.8 h。本试验通过单因素试验得到的最佳反应时间为 4 h,大大缩短了反应时间,合成效率更高且能源消耗更少。

2.1.3 反应温度对 MLCT 含量的影响

将一级菜籽油与 MCT 按 3:1 的质量比混合,加入 10% 的 Lipozyme TL IM,分别于 40、50、60、70、80℃ 反应 4 h 后,过滤去除酶制剂,再经分子蒸馏分离提纯后检测 MLCT 含量,结果如图 3 所示。

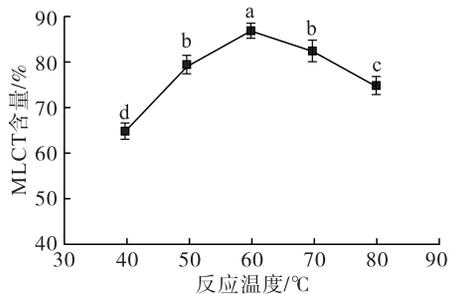


图 3 反应温度对 MLCT 含量的影响

反应温度对酶活有较大影响,脂肪酶都有最适反应温度,高于或低于该温度,酶活都会下降,甚至失活^[14]。由图 3 可知:当反应温度在 40~60℃ 时,随着反应温度的升高,MLCT 含量增大;当反应温度高于 60℃ 之后,MLCT 含量下降。在一定温度范围内,提高反应温度可以增加酶的活性,加快反应进程,有利于 MLCT 的合成。反应温度过高会引起酶的空间结构发生改变,导致酶的活性降低甚至失活。因此,60℃ 为 Lipozyme TL IM 较为合适的反应温度。

2.1.4 酶添加量对 MLCT 含量的影响

将一级菜籽油与 MCT 按 3:1 的质量比混合,分别加入 4%、6%、8%、10%、12% 的 Lipozyme TL IM,于 60℃ 反应 4 h 后,过滤去除酶制剂,再经分子蒸馏分离提纯后检测 MLCT 含量,结果如图 4 所示。

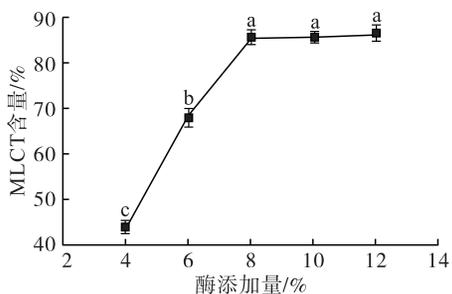


图 4 酶添加量对 MLCT 含量的影响

酶添加量会直接影响合成反应到达平衡的时间,合适的酶添加量可以实现在最短时间内合成最多 MLCT。由图 4 可知,随着酶添加量的增加,MLCT 含量不断增加,当酶添加量到达 8% 之后,MLCT 含量不再显著变化。在底物足量的条件下,反应速率与酶添加量之间的关系满足酶反应动力学方程,即增加酶添加量,反应速率将会加快^[15]。而过量的酶会加大反应的传质阻力^[16],影响反应的进行,不利于工业化生产。综合考虑,选择酶添加量为 8% 较为合理。

2.2 正交试验

在单因素试验的基础上,以 MLCT 含量为评判

依据,底物配比(A)、反应时间(B)、反应温度(C)、酶添加量(D)为因素设计四因素三水平正交试验。正交试验设计及结果见表1,方差分析见表2。

表1 正交试验设计及结果

试验号	底物配比	反应时间/h	反应温度/℃	酶添加量/%	MLCT含量/%
1	3:1	3	50	8	84.23
2	3:1	4	60	10	86.42
3	3:1	5	70	12	84.40
4	2:1	3	60	12	77.32
5	2:1	4	70	8	81.43
6	2:1	5	50	10	81.80
7	1:1	3	70	10	70.34
8	1:1	4	50	12	72.45
9	1:1	5	60	8	73.61
k_1	85.017	77.297	79.493	79.757	
k_2	80.183	80.100	79.117	79.520	
k_3	72.133	79.937	78.723	78.057	
R	12.884	2.803	0.770	1.700	

表2 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F	F临界值	显著性
A	254.144	2	285.876	99	**
B	14.855	2	16.710	19	
C	0.889	2	1.000	19	
D	5.087	2	5.722	19	
误差	0.889				

注:**表示极显著

由表1和表2可知,各因素对MLCT含量影响的主次顺序为A>B>D>C,且底物配比对MLCT合成具有极显著影响。酶催化合成MLCT的最佳工艺条件为A₁B₂C₁D₁,即底物配比3:1、反应时间4h、反应温度50℃、酶添加量8%,在此条件下进行3次平行验证试验,得到MLCT平均含量为87.50%。

2.3 MLCT质量指标

对最佳工艺条件下合成的MLCT质量指标进行测定,结果如表3所示。

由表3可知,通过酶催化合成的MLCT澄清、透明,呈淡黄色,不溶性杂质含量为0.02%,水分及挥发物含量为0.02%,过氧化值为0.36 mmol/kg,酸值(KOH)为0.16 mg/g,烟点达到224.2℃,中链脂肪酸含量为15.08%,中链甘油三酯、中长链甘油三

酯和长链甘油三酯含量分别为1.53%、87.42%、11.05%,各项指标均满足2012年第16号新资源食品公告要求。

表3 合成的MLCT质量指标

项目	质量指标	2012年第16号新资源食品公告*
色泽	淡黄色	淡黄色
透明度	澄清、透明	澄清、透明
不溶性杂质/%	0.02	-
水分及挥发物/%	0.02	-
过氧化值/(mmol/kg)	0.36	-
酸值(KOH)/(mg/g)	0.16	-
烟点/℃	224.2	-
中链脂肪酸/%	15.08	≥11
中链甘油三酯/%	1.53	<3
中长链甘油三酯/%	87.42	≥18
长链甘油三酯/%	11.05	≤77

注:*为中长链脂肪酸食用油的要求

3 结论

通过Lipozyme TL IM酶法催化菜籽油与中链甘油三酯进行酯交换反应,合成MLCT。通过单因素和正交试验对酯交换工艺条件进行优化。结果表明,底物配比是影响酯交换的关键因素,其次是反应时间、酶添加量,最后是反应温度,最佳MLCT合成工艺条件为底物配比(菜籽油与中链甘油三酯质量比)3:1、反应时间4h、反应温度50℃、酶添加量8%,在此条件下MLCT含量达到87.50%。合成的MLCT酸值、过氧化值较低,甘油三酯和中链脂肪酸含量均符合2012年第16号新资源食品公告要求。

参考文献:

- [1] KO S N, KIM H, LEE K T, et al. Optimization of enzymatic synthesis of structured lipid with perilla oil and medium chain fatty acid[J]. Food Sci Biotechnol, 2003, 12:253-256.
- [2] 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.
- [3] 王苑力,李桐,郭咪咪,等. 中长链脂肪酸结构脂质及其制备工艺研究进展[J]. 中国粮油学报,2021,36(1):195-202.
- [4] 何玥,赵金利,张参,等. 酶催化酯交换制备零反式脂肪酸食品专用油脂基料的性质研究[J]. 中国油脂,2016,41(9):36-40.
- [5] 徐文迪,缪智诚,王小三,等. 酶法合成中长碳链甘油三酯[J]. 中国油脂,2019,44(8):51-56.
- [6] 陆继源,王小三,金青哲,等. 响应面优化酶法酯交换催化合成中长链结构甘油三酯[J]. 中国油脂,2017,42(5):15-19.

(下转第63页)

参考文献:

- [1] 曲悦, 王晓杰, 刘晓栏, 等. *D*-氨基半乳糖修饰对玉米醇溶蛋白结构性质及生物活性的影响[J]. 中国油脂, 2019, 44(7): 75-80.
- [2] 王香丽, 刘杰, 吕宁, 等. 玉米醇溶蛋白在食品中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2018(1): 33-36.
- [3] HAO L, LIN G Q, CHEN C Y, et al. Phosphorylated zein as biodegradable and aqueous nanocarriers for pesticides with sustained-release and anti-UV properties[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(36): 9989-9999.
- [4] PATEL A R, VELIKOV K P. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures[J]. Curr Opin Colloid In, 2014, 19(5): 450-458.
- [5] KASAAI M R. Zein and zein-based nano-materials for food and nutrition applications: a review[J]. Trends Food Sci Tech, 2018, 79: 184-197.
- [6] ZHANG Y, CUI L L, CHE X X, et al. Zein-based films and their usage for controlled delivery: origin, classes and current landscape[J]. J Control Release, 2015, 206: 206-219.
- [7] DICKEY L C, PARRIS N, CRAIG J C, et al. Ethanolic extraction of zein from maize[J]. Ind Crop Prod, 2001, 13(1): 67-76.
- [8] 张明珠, 张丽芬, 陈复生, 等. 玉米醇溶蛋白提取技术及在食品中应用研究[J]. 食品科技, 2021, 46(2): 205-209.
- [9] 张明珠, 张丽芬, 陈复生, 等. 玉米醇溶蛋白的超声辅助酶法提取工艺及不同提取方法对其结构和功能特性的影响[J]. 中国油脂, 2021, 46(4): 26-32.
- [10] 陈秋冰, 熊双丽, 李安林, 等. 超声波辅助浓香菜籽油水化脱胶工艺优化[J]. 中国油脂, 2021, 46(2): 5-10.
- [11] 吴子恺. 新型超高油玉米种质的选育[J]. 作物学报, 2004, 30(8): 751-756.
- [12] 盛玉萍, 黄其椿, 吴子恺, 等. 微胚乳玉米8个主要形状的研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(9): 2850-2858.
- [13] 戴罗杰, 郭春雨, 李飞宇, 等. 微胚乳超高油玉米的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 37(19): 8925-8927.
- [14] 赵文扬. 玉米蛋白粉中玉米黄色素和醇溶蛋白的提取技术研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2015.
- [15] 时小红. 河南省普通玉米品种品质变化规律分析[J]. 河南农业科学, 2010, 39(9): 37-41.
- [16] 畅鹏, 杜鑫, 杨东晴, 等. 蛋白质热聚集行为机理及其对蛋白质功能特性影响的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 318-325.
- [17] NIKOLAIDIS A, ANDREADIS M, MOSCHAKIS T. Effect of heat, pH, ultrasonication and ethanol on the denaturation of whey protein isolate using a newly developed approach in the analysis of difference-UV spectra[J]. Food Chem, 2017, 232: 425-433.
- [18] 孙长华, 张华, 刘峰, 等. 玉米醇溶蛋白水解氨基酸组成分析及其功能性测定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011, 54(24): 103-104.
- [19] FENG Y, LEE Y. Surface modification of zein colloidal particles with sodium caseinate to stabilize oil-in-water pickering emulsion[J]. Food Hydrocolloid, 2016, 56: 292-302.
- [20] CHEN H Q, ZHONG Q X. A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil[J]. Food Hydrocolloid, 2015, 43: 593-602.
- (上接第40页)
- [7] 周盛敏. 中长链脂肪酸结构脂的酶法合成、安全性评价及减肥功能研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2017.
- [8] 刘琛, 王卫飞, 廖森泰. 酶催化桑蚕蛹油酯交换制备中长链脂肪酸甘油酯[J]. 中国油脂, 2021, 46(4): 120-123.
- [9] 陆继源. 酶法酯交换合成中长碳链结构甘油酯[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2017.
- [10] XU X, FOMUSO L B, AKOH C C. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 3-10.
- [11] AKOH C C, YEEL N. Enzymatic synthesis of position-specific low-calorie structured lipids[J]. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74(11): 1409-1413.
- [12] 杨凯舟, 毕艳兰, 马素敏, 等. 响应面优化脂肪酶催化合成中长碳链甘油酯[J]. 中国油脂, 2012, 37(2): 51-55.
- [13] 胡蒋宁, 张超, 邓泽元, 等. Lipozyme RM IM 脂肪酶催化苦瓜子油和癸酸合成功能性油脂[J]. 食品科学, 2011, 32(24): 92-97.
- [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.
- [16] HOSSEN M, HERNANDEZ E. Enzyme-catalyzed synthesis of structured phospholipids with conjugated linoleic acid[J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2005, 107: 730-736.