

辛酸结构大豆磷脂酶法改性工艺优化

张安琪, 吕和霖, 黄 晔, 刘睿杰, 王小三, 常 明

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:为了改善天然磷脂的理化性质以及拓宽其应用范围,以辛酸和大豆磷脂为底物,采用酶法对大豆磷脂进行改性。筛选了改性大豆磷脂的脂肪酶,考察了反应温度、反应时间、脂肪酶用量、底物质量比对辛酸结构大豆磷脂改性工艺的影响,在此基础上,采用正交试验优化大豆磷脂的酶法改性工艺条件,并考察了脂肪酶的重复利用性。结果表明:Novozym 435 脂肪酶的催化效果优于 Lipozyme RM IM 和 Lipozyme TL IM;大豆磷脂酶法改性的最优条件为反应温度 55 °C、Novozym 435 用量 25%、底物质量比(辛酸与大豆磷脂质量比)7:1、反应时间 36 h,在此条件下辛酸结合率可达 $(78.79 \pm 0.81)\%$;Novozym 435 经过 4 次重复利用后,辛酸结合率仍能达到 $(63.67 \pm 1.50)\%$ 。综上,Novozym 435 可作为催化磷脂改性的优选脂肪酶。

关键词:大豆磷脂;脂肪酶;脂肪酸;酶法改性;结构磷脂

中图分类号:TQ645.9+6;Q814.9 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)08-0127-05

Process optimization of enzymatic modification of octanoic acid – structured soybean phospholipids

ZHANG Anqi, LYU Helin, HUANG Ye, LIU Ruijie,
WANG Xiaosan, CHANG Ming

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

Abstract: In order to improve the physicochemical properties of natural phospholipids as well as to expand their applications, soybean phospholipids were modified by an enzymatic method using octanoic acid and soybean phospholipids as substrates. Lipases for modifying soybean phospholipids were screened, and the effects of reaction temperature, reaction time, lipase dosage and substrate mass ratio on the modification process of octanoic acid – structured soybean phospholipids were investigated. On this basis, orthogonal tests were used to optimize the process conditions of the enzyme – catalyzed modification of soybean phospholipids, and the reusability of the lipases was determined. The results showed that the catalytic effect of Novozym 435 was stronger than that of Lipozyme RM IM and Lipozyme TL IM. The optimal conditions for the enzyme – catalyzed modification of soybean phospholipids were reaction temperature 55 °C, Novozym 435 dosage 25%, mass ratio of octanoic acid to soybean phospholipids 7:1, and reaction time 36 h. The octanoic acid binding rate was $(78.79 \pm 0.81)\%$ under the optimal conditions, and the octanoic acid binding rate still reached $(63.67 \pm 1.50)\%$ after four times of reuse of Novozym 435. In conclusion, Novozym 435 can be used as a preferred lipase to catalyze the modification of phospholipids.

Key words: soybean phospholipids; lipase; fatty acid; enzymatic modification; structured phospholipids

收稿日期:2023-03-13;修回日期:2024-04-18

作者简介:张安琪(2002),女,在读本科,研究方向为脂质营养(E-mail)aseven4724@163.com。

通信作者:常明,教授,博士生导师(E-mail)chang@jiangnan.edu.cn。

以甘油为骨架的磷脂在自然界中分布很广,它既有亲水性的磷酸基团头部,又有疏水性的脂肪酸尾部,表现出两亲特性。作为重要的乳化剂、稳定剂和抗氧化剂,磷脂在食品、药品和化妆品等领域应用广泛^[1]。磷脂的理化性质和生理活性与其结构密

切相关。对磷脂的结构进行改性,可以显著拓宽磷脂的应用范围,改善产品的加工属性。

磷脂改性的方法主要有化学法和酶法。相比化学法,酶法改性因具有反应条件温和、特异性强、产物易分离、酶催化效率高以及较少使用有机溶剂等优点而广受青睐。目前,用于催化磷脂改性的酶主要包括磷脂酶和脂肪酶两类。磷脂酶在磷脂改性的过程中,更容易催化磷脂结合脂肪酸的水解,而酯化效率相对较低。脂肪酶产品种类多,同时具有较好的磷脂催化活性^[2],但目前关于脂肪酶对磷脂改性的研究较少。前期试验发现,辛酸改性的磷脂具有更好的乳化性能,在营养学方面,辛酸改性磷脂可能会加速脂膜的代谢活动。因此,本研究以辛酸和大豆磷脂为底物,考察了3种脂肪酶(Lipozyme RM IM、Novozym 435和Lipozyme TL IM)对磷脂的催化改性效果,并对磷脂酶法改性条件进行优化,以期拓宽磷脂产品的应用范围提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

大豆磷脂 PC-80(磷脂酰胆碱 83.73%、棕榈酸 13.20%、硬脂酸 4.14%、油酸 8.33%、亚油酸 65.74%、亚麻酸 8.59%),河北美业斯维生物技术有限公司;诺维信固定化脂肪酶 Novozym 435、Lipozyme RM IM、Lipozyme TL IM,北京高瑞森科技有限公司;辛酸、正己烷、丙酮、甲醇、三氟化硼(BF_3)-乙醚、氢氧化钾、无水硫酸钠均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

GC-7820A型气相色谱仪,安捷伦科技有限公司;AR2140型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;SE812型氮吹仪,上海安谱实验科技股份有限公司;Centrifuge 5810型离心机,德国Eppendorf公司;RE-52AA型旋转蒸发器,美国Grace公司;THZ-420型恒温空气摇床,上海精宏实验设备有限公司;MSC-100型恒温混匀仪,杭州奥盛仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 脂肪酶催化磷脂改性工艺

称取一定量辛酸和大豆磷脂于25 mL锥形瓶中,按料液比1:2加入正己烷,待大豆磷脂完全溶解后加入一定量脂肪酶,将锥形瓶完全密封,放入恒温空气摇床中于一定温度下反应一定时间,反应结束后,3 000 r/min离心5 min,回收脂肪酶。上清液于50℃下减压旋转蒸发除去正己烷,再加入3倍体积

冷丙酮,用玻璃棒充分搅拌使游离脂肪酸溶于丙酮中,5 000 r/min离心15 min,沉淀反复用丙酮洗涤,直至洗液挥发后无油迹为止,再使用氮气吹干即为改性大豆磷脂,于-20℃冰箱中保存备用。

1.2.2 辛酸结合率的测定

测定改性大豆磷脂脂肪酸组成,以辛酸含量表征磷脂酶法改性的辛酸结合率。

1.2.2.1 甲酯化

取50 mg样品,加入2 mL 0.5 mol/L的NaOH-甲醇溶液,在65℃、1 000 r/min下于恒温混匀仪中皂化30 min,待样品冷却至室温后,加入2 mL 25%的 BF_3 -甲醇溶液,在70℃、1 000 r/min条件下于恒温振荡器中反应5 min,冷却至室温后加入1.5 mL正己烷,在3 000 r/min条件下振荡3~4 min,静置分层,取上清液,加入无水硫酸钠进行脱水处理,在10 000 r/min条件下离心5 min后取上清液过0.22 μm 有机膜,待气相色谱分析。

1.2.2.2 气相色谱条件

Trace TR-FAME毛细管柱(60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm);氢火焰离子化检测器,检测器温度250℃;氮气流速1.0 mL/min;分流比20:1;升温程序为初始温度60℃保持3 min,然后以5℃/min的速率升温至180℃,保持15 min,最后以2℃/min的速率升温至220℃,保持10 min。基于脂肪酸混标的保留时间进行定性,采用峰面积归一化法进行定量^[3]。

1.2.3 脂肪酶的重复利用性

将1.2.1反应结束后离心下层用正己烷反复洗涤,至洗后的正己烷挥发后无油迹,待正己烷完全挥发后,将脂肪酶用于下一次催化改性反应。

1.2.4 数据处理

所有试验重复两次,数据采用SPSS Statistics 26和Microsoft Excel进行分析,采用Origin 6.0进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶的筛选

在底物质量比(辛酸与大豆磷脂质量比)2:1、脂肪酶用量30%(以底物质量计)、反应温度50℃、反应时间60 h的条件下,对3种脂肪酶进行筛选,结果见图1。

由图1可知,Novozym 435催化酯交换后辛酸结合率达到51.38%,高于Lipozyme TL IM(48.71%)和Lipozyme RM IM(42.27%)。因此,选择Novozym 435进行后续试验。

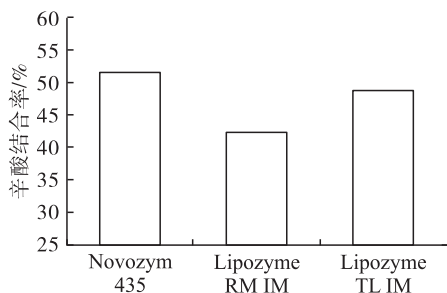
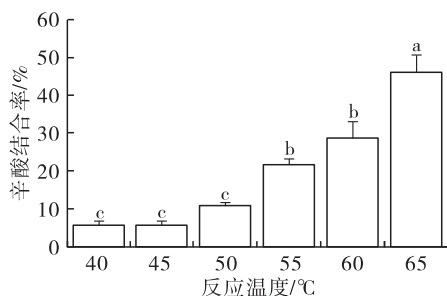


图1 脂肪酶对辛酸结合率的影响

2.2 脂肪酶催化磷脂改性的单因素试验

2.2.1 反应温度对辛酸结合率的影响

在底物质量比 2:1、脂肪酶用量 30%、反应时间 36 h 的条件下,考察反应温度对辛酸结合率的影响,结果见图 2。



注:不同字母表示差异显著。下同

图2 反应温度对辛酸结合率的影响

由图 2 可知,辛酸结合率随着反应温度的升高而升高,当反应温度升高到 65 °C 时辛酸结合率达到 46.15%。正己烷的沸点为 69 °C,考虑到实际应用,过高的反应温度会导致正己烷大量挥发,影响反应速度,因此选择反应温度为 55 °C。

2.2.2 反应时间对辛酸结合率的影响

在底物质量比 2:1、脂肪酶用量 30%、反应温度 55 °C 的条件下,考察反应时间对辛酸结合率的影响,结果见图 3。

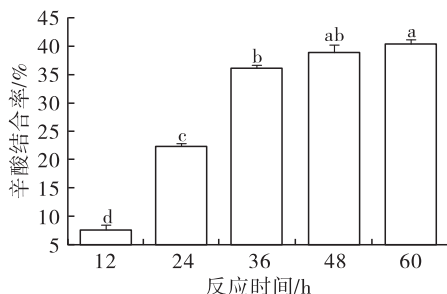


图3 反应时间对辛酸结合率的影响

由图 3 可知,辛酸结合率随着反应时间的延长而增加,反应 12 h 时,辛酸结合率为 7.65%,反应 36 h 时,辛酸结合率达到 36.05%。反应 36 h 以后,反应逐渐趋于平缓。总的来说,辛酸结合率与反应时间在一定区间内呈正相关。在实际生产过程中,

过长的反应时间一方面会导致副产物溶血磷脂含量的增加,另一方面也会降低生产效率^[4]。因此,选择反应时间为 36 h。

2.2.3 脂肪酶用量对辛酸结合率的影响

在底物质量比 2:1、反应温度 55 °C、反应时间 36 h 的条件下,考察脂肪酶用量对辛酸结合率的影响,结果见图 4。

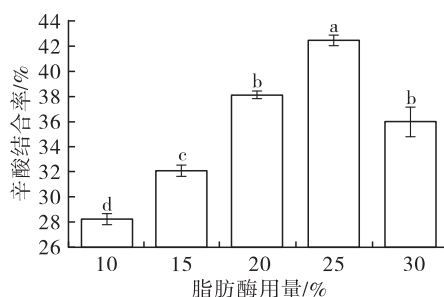


图4 脂肪酶用量对辛酸结合率的影响

由图 4 可知,当脂肪酶用量在 10% ~ 25% 范围内时,辛酸结合率随着脂肪酶用量的增加而增加,在脂肪酶用量为 25% 时辛酸结合率可达 42.48%。当脂肪酶用量进一步增加到 30% 时,辛酸结合率下降到 36.01%,可能是因为热力学平衡向水解方向转变,或是过高的酶用量导致传质限制^[5]。Vikbjerg 等^[6]在研究酶用量对 Lipozyme RM IM 在无溶剂条件下催化磷脂与辛酸反应的影响时也发现了同样的趋势。多项研究表明酶用量对脂肪酸掺入磷脂的影响最为显著^[7]。由于脂肪酶用量在 25% 时辛酸结合率最高,因此选择脂肪酶用量为 25%。

2.2.4 底物质量比对辛酸结合率的影响

在脂肪酶用量 25%、反应温度 55 °C、反应时间 36 h 的条件下,考察底物质量比对辛酸结合率的影响,结果见图 5。

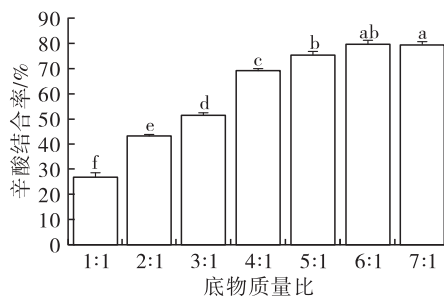


图5 底物质量比对辛酸结合率的影响

由图 5 可知,随着底物质量比的增加,辛酸结合率呈上升趋势。因此,适当增加脂肪酸用量可以促进酯交换反应效率。当底物质量比超过 4:1 时,辛酸结合率的增幅开始减弱,这是因为底物逐渐饱和,脂肪酶在一定量下无法继续提高反应速率。Ochoa 等^[8]在研究固定化磷脂酶 A₁ 催化磷脂酰胆碱和游

离中链脂肪酸发生酸解反应时发现,磷脂酰胆碱浓度对中链脂肪酸掺入磷脂的贡献为正,且高浓度磷脂酰胆碱会抑制副反应的进行。也有研究发现,磷脂酰胆碱的进一步增加会使脂肪酸的结合率降低^[9],这可能是由于反应体系的影响,在无溶剂体系中磷脂酰胆碱的增加会导致底物黏度增加从而影响传质。因此,选用合适的有机溶剂体系可以解决高底物质量比时无溶剂体系反应速率低,不利于搅拌,产品分离困难的问题^[10]。由于底物质量比在6:1和7:1时辛酸结合率无显著差异,综合考虑选择底物质量比为6:1。

2.3 脂肪酶催化磷脂改性的正交试验

在单因素试验的基础上,固定反应时间36 h,以反应温度(A)、脂肪酶用量(B)和底物质量比(C)为因素,辛酸结合率(Y)为指标,设计 $L_9(3^4)$ 空一列正交试验,对脂肪酶催化磷脂改性工艺进行优化。正交试验因素及水平如表1所示,正交试验设计及结果如表2所示。

表1 正交试验因素及水平

水平	A 反应温度/°C	B 脂肪酶用量/%	C 底物质量比
1	55	20	5:1
2	60	25	6:1
3	65	30	7:1

表2 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	空列	Y/%
1	1	1	1	1	76.13
2	1	2	2	2	77.60
3	1	3	3	3	82.21
4	2	1	2	3	77.17
5	2	2	3	1	81.39
6	2	3	1	2	72.12
7	3	1	3	3	76.81
8	3	2	1	2	76.15
9	3	3	2	1	69.40
k_1	78.65	76.70	74.80	75.64	
k_2	76.89	78.38	74.72	75.29	
k_3	74.12	74.58	80.14	78.73	
R	4.53	3.80	5.41	3.44	

由表2可知,各因素对辛酸结合率的影响大小依次为底物质量比(C) > 反应温度(A) > 脂肪酶用量(B)。最佳反应条件组合为 $A_1B_2C_3$,即反应温度55°C、脂肪酶用量25%、底物质量比7:1,对最佳反应条件进行验证得辛酸结合率为 $(78.79 \pm 0.81)\%$ 。

正交试验方差分析如表3所示。

表3 正交试验的方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	p
A	31.209	2	15.605	1.451	0.408
B	21.807	2	10.903	1.014	0.497
C	57.785	2	28.892	2.686	0.271

由表3可知,方差分析结果与极差分析一致,通过p值可知,3个因素在0.05水平上影响均不显著,后期可进一步进行工艺优化。

2.4 脂肪酶的重复利用

按1.2.1方法在2.3最佳反应条件下进行磷脂的脂肪酸催化改性,再按1.2.3方法对脂肪酶进行回收并重复利用,其重复利用结果如图6所示。

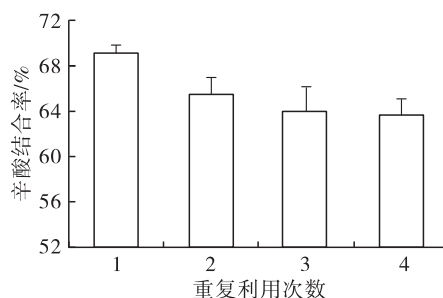


图6 脂肪酶的重复利用结果

由图6可知,经过4次重复后,辛酸结合率下降程度不大,仍能达到 $(63.67 \pm 1.50)\%$,经测定,此时的酶活为初始酶活的81.40%,说明脂肪酶Novozym 435具有较好的稳定性。

3 结论

本研究在对酶法改性磷脂的3种脂肪酶进行筛选的基础上,通过单因素试验与正交试验优化了酶法催化磷脂改性的工艺条件,并考察了脂肪酶的重复利用性。结果表明:Novozym 435脂肪酶的催化效果强于Lipozyme RM IM和Lipozyme TL IM;在反应温度55°C、反应时间36 h、Novozym 435用量25%、底物质量比(辛酸与大豆磷脂质量比)7:1的条件下,辛酸结合率为 $(78.79 \pm 0.81)\%$;Novozym 435脂肪酶经过4次重复利用后,辛酸结合率仍能达到 $(63.67 \pm 1.50)\%$ 。

参考文献:

- [1] GABIZON A, GOREN D, HOROWITZ A T, et al. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: A review of biodistribution studies in tumor-bearing animals [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 24(2/3): 337-344.
- [2] JAEGER K E, DIJKSTRA B W, REETZ M T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 315-351.

(下转第143页)

- [11] 赵锦妆. 高酯橘皮果胶脂肪替代物的研究及应用[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2019.
- [12] 刘贺. 以桔皮果胶为基质的脂肪替代品的研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2007.
- [13] 李红娟, 刘婷婷, 李丹, 等. 热变性乳清蛋白-黄油乳液凝胶对减钠再制干酪品质的影响[J]. 中国食品学报, 2022, 22(4): 189-195.
- [14] 李诗义. 曲奇用油凝胶的构建及其对曲奇品质的影响机制[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2022.
- [15] 张静祎. 红小豆淀粉及 NaCl、蔗糖、油脂添加前后对淀粉特性的影响研究[D]. 黑龙江 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2020.
- [16] 韩冰霜, 安俊晓, 杜先锋. 紫甘薯全粉对面团流变特性与曲奇饼干品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(19): 58-63.
- [17] 王撼辰. 典型化学加工条件对苹果果胶与多酚复配物流变、凝胶及质构特性的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [18] 王颖周, 仰振中, 潘阳, 等. 玉米曲奇饼干配方优化及其质构研究[J]. 包装与食品机械, 2013, 31(3): 22-24, 6.
- [19] 孙静阳, 肖志刚, 张一凡, 等. 玉米皮膳食纤维脂肪替代物曲奇饼干配方优化研究[J]. 农业科技与装备, 2021(5): 36-39.
- [20] 罗紫明. 菊粉低脂曲奇饼干的研制及质量控制[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
- [21] 陆林. 鹰嘴豆粉强化对饼干淀粉消化性与质构的影响及其机制[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2022.
- [22] 贾梦云. 绿色木霉发酵制备脱脂米糠可溶性膳食纤维及其在饼干中的应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- [23] 皮俊翔. 茶多酚对面筋蛋白网络结构影响机制的研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2020.
- [24] 高杰, 刘卫光, 钟昔阳. 羟丙基甲基纤维素对面团性质及油条品质的影响[J]. 农产品加工, 2018(18): 1-5.
- [25] LUTFI Z, NAWAB A, ALAM F, et al. Influence of xanthan, guar, CMC and gum acacia on functional properties of water chestnut (*Trapa bispinosa*) starch[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 103: 220-225.
- [26] 翟羽恒. 果胶对糯米淀粉特性的影响及在汤圆中的应用[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2022.
- [27] 冷雪, 曹龙奎. 利用差示扫描量热仪研究小米淀粉及小米粉的糊化特性[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 60-66.
- [28] 张莹莹, 郭兴凤, 王瑞红, 等. TSP 与 SPH 复合物对面团特性及面条品质的影响机制[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 37-42.
- [29] 赵天天, 赵丹, 马小涵, 等. 菊糖对面团流变学特性及面包品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(7): 115-121.
- [30] 张瑶. 右旋糖苷对面包品质的影响及机理研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2020.
- [31] 姚舒婷, 智慧, 沈欣怡, 等. 脂肪替代品在烘焙行业中的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(6): 285-291.
- [32] 段丽丽, 贾洪峰, 赵美丽, 等. 辣木叶粉在曲奇饼干中的应用[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(1): 38-41.
- [33] PAREYT B, DELCOUR J A. The role of wheat flour constituents, sugar, and fat in low moisture cereal based products: A review on sugar-snap cookies[J]. Crit Rev Food Sci, 2008, 48(9): 824-839.

.....

(上接第 130 页)

- [3] 高亮, 余旭伟, 邹凤, 等. 酶法合成 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯结构脂的研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(8): 66-70.
- [4] 班婷婷. 醇溶性大豆磷脂与棕榈酸酶促酸解反应的研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2011.
- [5] HAMA S, OGINO C, KONDO A. Enzymatic synthesis and modification of structured phospholipids; Recent advances in enzyme preparation and biocatalytic processes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(19): 7879-7891.
- [6] VIKBJERG A F, MU H, XU X. Parameters affecting incorporation and by-product formation during the production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis in solvent-free system[J]. J Mol Catal B Enzym, 2005, 36(1/2/3/4/5/6): 14-21.
- [7] ANG X, CHEN H, XIANG J Q, et al. Preparation and functionality of lipase-catalysed structured phospholipid: A review[J]. Trends Food Sci Technol, 2019, 88: 373-383.
- [8] OCHOA A A, HERNÁNDEZ-BECERRA J A, CAVAZOS-GARDUÑO A, et al. Phosphatidylcholine enrichment with medium chain fatty acids by immobilized phospholipase A₁-catalyzed acidolysis[J]. Biotechnol Prog, 2013, 29(1): 230-236.
- [9] 薛静, 崔益玮, 沈清, 等. 富含 EPA/DHA 型结构磷脂的酶法合成条件优化及表征[J]. 核农学报, 2020, 34(12): 2780-2792.
- [10] 谷倩倩. 脂肪酶催化制备改性磷脂的工艺研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2021.