

文章编号:1003-8701(2012)06-0072-03

脂肪酶催化大豆油合成甘油二酯

吴琼¹, 邹险峰¹, 陈丽娜¹, 代永刚^{2*}

(1. 长春大学农产品深加工省重点实验室, 长春 130022; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘要:本研究在无溶剂体系中, 采用 Lipozyme RM IM 固定化脂肪酶催化大豆油合成甘油二酯, 考察了底物质量比(大豆油/甘油)、酶量、反应温度、反应时间对甘油二酯合成的影响。通过正交试验确定最佳工艺条件为:底物质量比(大豆油:甘油)2:1, 酶量 11%, 反应温度 60℃, 反应时间 12 h, 得到 DAG 含量为 52.6%。为合成甘油二酯提供了一条新途径, 为无溶剂体系中脂肪酶催化合成甘油二酯提供理论参考。

关键词:脂肪酶; 甘油二酯; 大豆油; 合成

中图分类号:TS22

文献标识码:A

Preparation of Diacylglycerol from Soybean Oil by Lipase Catalyzed Synthesis

WU Qiong¹, ZOU Xian-feng¹, CHEN Li-na¹, Dai Yong-gang^{2*}

(1. Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Changchun University, Changchun 130022;

2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Lipase-catalyzed synthesis of DAG was produced with soybean oil in a solvent-free system by Lipozyme RMIM. Effect of substance ratio (soybean / glycerol), the amount of enzyme, reaction temperature and reaction time on diacylglycerol yield was investigated. The results of orthogonal experiment showed the optimal conditions were as follows: substance ratio 2: 1, the amount of enzyme 11%, the reaction temperature of 60℃, the reaction time 12 h, DAG yield of 52.6%. It provides a new way for the synthesis of diacylglycerol and provides a theoretical reference for synthesis diacylglycerol in lipase-catalyzed solvent-free systems.

Keywords: Lipozyme; Diacylglycerol; Soybean oil; Synthesis

甘油二酯(Diacylglycerol, DAG)是甘油三酯(Triacylglycerol, TAG)中一个脂肪酸被羟基取代的结构脂质。它是天然植物油脂的微量成分及体内脂肪代谢的内源中间产物,是FDA认证的安全的食品成分。近年来发现,甘油二酯具有降血脂和抑制体重增加等功效^[1-3],其作为一种功能添加剂,在食品、医药、化工(化妆品)等行业中具有广泛的应用。甘油二酯在我国尚处于研发阶段,市场上没有相关产品出售^[4-5]。因此研究甘油二酯的合成

与生产具有重大的理论意义和现实意义。

本研究以吉林省产量丰富的大豆油为原料,采用脂肪酶催化,在无溶剂体系中合成甘油二酯,并对其工艺条件进行优化。大豆油的脂肪酸构成较好,含有丰富的亚油酸(50%~60%),原料来源丰富,成本低。采用酶法合成甘油二酯,条件温和,产品得率高^[6],整个反应在无溶剂体系中进行,相比有溶剂体系,具有更高的底物浓度,有利于后续分离以及更好地满足食品安全的要求,从而降低生产成本。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

大豆油(市售大豆,本实验室压榨);Novoyzm

收稿日期:2012-09-07

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(2011 220)

作者简介:吴琼(1978-),女,讲师,博士,从事食品化学研究。

通讯作者:代永刚,男,副研究员,硕士,

E-mail: daiyonggang1976@163.com

435、Lipozyme RM IM、Lipozyme TL IM,诺维信(中国)生物技术有限公司;甘油、正己烷等化学试剂均为分析纯。

YJY-2 型榨油机,北京益加益机械技术研究所;SHA-B 水浴恒温振荡器,金坛市金南仪器制造有限公司;循环水真空泵,LDZ4-12 台式低速离心机,北京医用离心机厂;LC-14C 气相色谱仪,日本岛津。

1.2 脂肪酶催化合成甘油二酯

精确称取 5 g 大豆油和一定质量比的甘油于 100 mL 的具塞锥形瓶中,在实验条件下预热 20 min,然后加入一定量的固定化脂肪酶,放入一定的温度、转速为 120 r/min 的恒温水浴振荡器中,反应一定的时间后,吸取 50 μ L 样品,用 4 mL 正己烷溶解,离心除去脂肪酶,滤液低温保存待分析^[7]。

1.3 甘油二酯含量的测定

采用气相色谱测定反应混合物中的甘油二酯含量^[8]。吸取滤液 1 μ L 试样进样。色谱条件:LC-14C 气相色谱仪, DB-WAX 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.1 μ m), FID 检测器,载气为高纯 N₂。采用程序升温,柱温 130 $^{\circ}$ C,维持 2 min;以 10 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 190 $^{\circ}$ C,维持 2 min;5 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 215 $^{\circ}$ C,维持 1 min;10 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 350 $^{\circ}$ C,维持 20 min。进样口温度和检测器温度分别为 360 $^{\circ}$ C 和 380 $^{\circ}$ C。甘油二酯含量的计算采用面积归一法。

$$w = m(\text{DAG}) / [m(\text{FFA}) + m(\text{MAG}) + m(\text{DAG}) + m(\text{TAG})]$$

式中:w 为甘油二酯的质量分数,m(FFA)、m(MAG)、m(DAG)和 m(TAG)分别为脂肪酸、单甘酯、二甘酯和三甘酯的质量。

2 结果与讨论

2.1 不同种类的酶对甘油二酯合成的影响

选择常用的 Novoyzm 435、Lipozyme RM IM、Lipozyme TL IM 3 种固定化脂肪酶,在大豆油:甘油=1:1,酶量 5%,反应温度 60 $^{\circ}$ C,反应时间 6 h 的条件下反应,考察 3 种酶对甘油二酯合成的影响。结果见图 1。由图 1 可见,不同的脂肪酶催化效率不同,Lipozyme RM IM 和 Novoyzm 435 催化合成的甘油二酯含量明显高于 Lipozyme TLIM,Lipozyme RM IM 具有 1,3 位专一性,而 Novoyzm 435 的位置专一性不确定,有时表现 1,3 位专一性,有时无专一性^[9],并且 Novoyzm 435 价格较高,综合考虑,本实验选择 Lipozyme RM IM 作为合成

甘油二酯的脂肪酶。

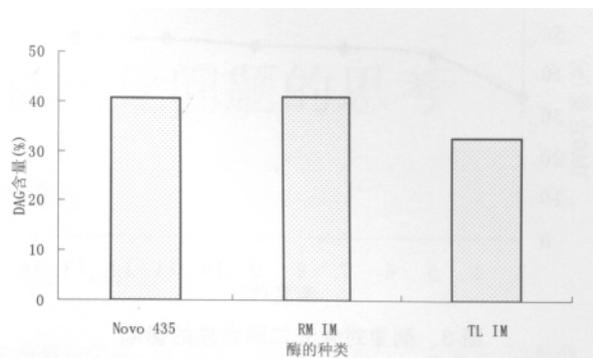


图 1 脂肪酶的种类对甘油二酯合成的影响

2.2 底物质量比对甘油二酯合成的影响

选择底物质量比(大豆油:甘油)为 1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1,固定酶的添加量 5%,反应温度 60 $^{\circ}$ C,反应时间 6 h,考察底物质量比对甘油二酯合成的影响。结果见图 2。随着底物质量比的增加,DAG 的含量也逐渐增加,当底物质量比达到 2:1 时,DAG 含量开始下降。改变底物的摩尔比不仅可以改变脂肪酸的转化率,还可以改变整个反应体系的稳定性。如果甘油含量过高,会使反应体系极性增强,降低甘油与脂肪酸的混溶程度,从而降低了反应速度^[10]。如果脂肪酸含量较高,会给后续的纯化带来困难,增加生产成本。

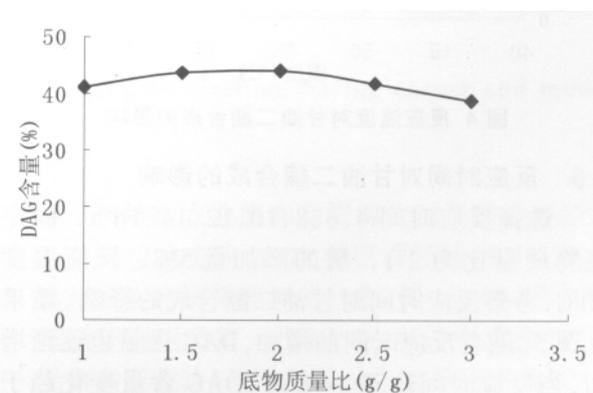


图 2 底物质量比对甘油二酯合成的影响

2.3 酶量对甘油二酯合成的影响

选择酶的添加量(占底物的质量)3%、5%、7%、9%、11%、13%、15%,固定底物质量比为 2:1,反应温度 60 $^{\circ}$ C,反应时间 6 h,考察酶添加量对甘油二酯合成的影响。结果见图 3。随着酶添加量的增加,DAG 的含量也逐渐增加,底物与酶的接触面积增大,加快了反应速度;当酶量达到 13%时,DAG 的含量增加比较缓慢,变化不大,酶与底物反应的量是有限的,当达到底物需要的酶量以后,继续再增加酶的浓度,也不会加快反应速度。

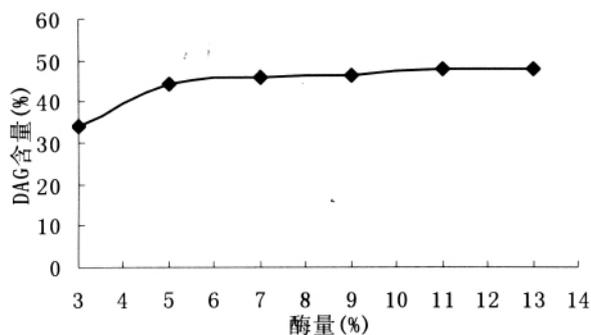


图3 酶量对甘油二酯合成的影响

2.4 反应温度对甘油二酯合成的影响

根据脂肪酶的最适作用温度,选择反应温度40、50、60、70℃,固定底物质量比为2:1,酶的添加量5%、反应时间6h,考察反应温度对甘油二酯合成的影响。结果见图4。随着温度的升高,DAG的含量也逐渐升高。温度升高有利于底物扩散,提高酯交换的速度。

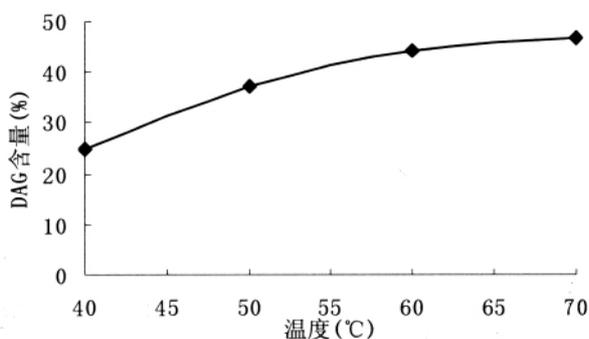


图4 反应温度对甘油二酯合成的影响

2.5 反应时间对甘油二酯合成的影响

选择反应时间4、6、8、10、12、14、16h,固定底物质量比为2:1,酶的添加量5%、反应温度60℃,考察反应时间对甘油二酯合成的影响。结果见图5。随着反应时间的增加,DAG含量也逐渐增加,当反应时间达到14h时,DAG含量变化趋于平稳,说明14h后,反应已经达到了动力学平衡。

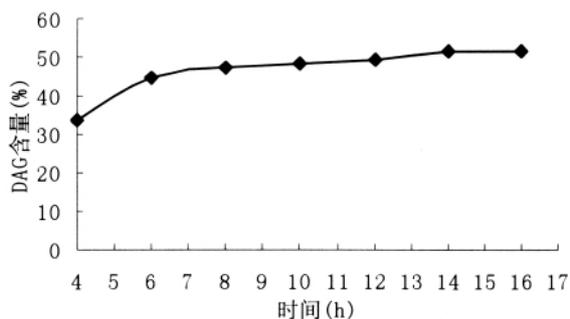


图5 反应时间对甘油二酯合成的影响

2.6 正交试验

正交试验及方差分析结果见表1、表2。

由表1、表2可见,4个因素对DAG合成的影响顺序为:底物质量比>酶量>反应时间>反应温度。脂肪酶催化大豆油合成甘油二酯的最佳工艺条件为A2B3C2D2,即底物质量比2:1,酶量11%,反应温度60℃,反应时间12h。在此最佳条件下做验证试验,得到DAG含量为52.6%。

表1 正交试验结果

试验号	A 底物质量比(g/g)	B 酶量 (%)	C 反应温度 (°C)	D 反应时间(h)	DAG 含量(%)
1	1(1.5:1)	1(7)	1(50)	1(10)	45.8
2	1	2(9)	2(60)	2(12)	46.9
3	1	3(11)	3(70)	3(14)	48.4
4	2(2:1)	1	2	3	50.6
5	2	2	3	1	48.5
6	2	3	1	2	51.7
7	3(2.5:1)	1	3	2	49.8
8	3	2	1	3	48.3
9	3	3	2	1	50.6
k1	47.033	48.733	48.600	48.300	
k2	50.267	47.900	49.367	49.467	
k3	49.567	50.233	48.900	49.100	
R	3.234	2.333	0.767	1.167	

表2 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
底物质量比	17.362	2	11.453	6.940	*
酶量	8.389	2	5.534	6.940	
反应温度	0.896	2	0.591	6.940	
反应时间	2.136	2	1.409	6.940	
误差	3.03	4			

3 结论

本研究在无溶剂体系中,采用Lipozyme RM IM固定化脂肪酶催化大豆油合成甘油二酯,通过正交试验确定最佳工艺条件为:底物质量比(大豆油:甘油)2:1,酶量11%,反应温度60℃,反应时间12h,得到DAG含量为52.6%。本研究选用的大豆油,原料来源丰富,成本低,为合成甘油二酯提供了一条新途径,为无溶剂体系中脂肪酶催化合成甘油二酯提供理论参考。

参考文献:

- [1] 钟南京,董玲燕,李琳,等.酶法酯化脂肪酸与甘油合成1,3-甘油二酯[J].河南工业大学学报(自然科学版),2010,31(2):59-61.

(下转第78页)

业废弃物资源化产业发展模式及农业发展战略。

参考文献:

- [1] 叶安珊. 节约型和合理理念与中国畜禽粪便资源化利用[J]. 世界环境, 2005(6): 68-70.
- [2] 闫 湘. 丹麦的环境保护[J]. 生态经济, 2007(10): 151-154.
- [3] 周 珂, 武亦文. 循环经济在我国农村固体废弃物治理中的实施[J]. 环境保护, 2007(10B): 12-14.
- [4] 章力建, 朱立志. 农村主体污染防治是当前环境保护工作的战略需求[J]. 环境保护, 2007(3A): 36-43.

(上接第 68 页)

- [7] 胡振琪, 王金, 杨成兵, 等. 基于 RS 与 GIS 的榆林地区土地动态变化分析[J]. 水土保持学报, 2008, 22(4): 82-85.
- [8] 刘春蕾, 王志明, 王欣欣, 等. 近 25 年常熟市土地利用变化及驱动力研究[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 518-521.
- [9] 范科红, 李阳兵. 1986~2007 年重庆主城区土地利用变化及其驱动因素研究[J]. 水土保持研究, 2012, 19(1): 168-173.
- [10] 陈 姝, 居为民. 常熟市土地利用覆盖变化研究[J]. 江苏农业科学, 2010(1): 352-355.
- [11] 唐 宏, 张新焕, 杨德刚, 等. 近 60a 三工河流域耕地利用动态变化与驱动力分析[J]. 干旱区地理, 2011, 34(5): 843-850.
- [12] 杨建军, 高小红, 吴国良, 等. 基于遥感与 GIS 的县域土地利用 / 覆被变化研究 - 以青海省湟中县为例[J]. 遥感技术与应用, 2011, 26(5): 561-568.

(上接第 74 页)

- [2] 孟祥河, 邹冬芽, 段作营, 等. 无溶剂体系合成 1,3- 甘油二酯用脂肪酶的筛选及其酯化性质[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(2): 31-35.
- [3] 胡士恒, 康建波, 马龙彪. 玉米油酶法合成甘油二酯工艺优化研究[J]. 现代化工, 2012, 32(5): 86-88.
- [4] De Guzman D. Kao's fat-reducing DAG oil scheduled for US introduction[J]. Chemical Market Reporter, 2001, 259(12): 8.
- [5] 华 娣, 温 琦, 裘爱泳, 等. 酶法甘油解连续制备甘油二酯的研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(5): 11-13.
- [6] 唐苏芬, 胡 焱, 刘维明, 等. 甘油二酯合成的研究进展[J]. 油脂工程, 2011(2): 81-85.
- [7] 王诗路, 刘 辉, 咸 漠. 响应面优化酶催化米糠油甘油解制备甘油二酯[J]. 食品工业科技, 2012, 33(14): 192-195.
- [8] 李 相, 刘 云, 杨江科. 基于响应面设计脂肪酶 Novo435 催化合成甘油二酯的工艺优化 [J]. 生物加工过程, 2009, 7(5): 13-18.
- [9] Ghangui H, Miled N, Reha A, et al. Production of mono-olein by immobilized Staphylococcus simulans lipase in a solvent-free system: optimization by response surface methodology[J]. Enzyme Microb Technol, 2006(39): 717-723.
- [10] Xu X B, Fomuso L B, Akoh C C. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(1): 3-10.

入 网 声 明

本刊已被中国知网(CNKI)中国期刊全文数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性支付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时向本刊声明,本刊将做适当处理。

《吉林农业科学》编辑部