

# 无溶剂体系中脂肪酶改造猪油制备功能性脂的研究 Production of Functional Lipids by Lipase-catalyzed Acidolysis of Lard in Solvent Free System

赵海珍, 陆兆新\*, 别小妹, 吕凤霞, 刘战民

ZHAO Hai-Zhen, LU Zhao-Xin\*, BIE Xiao-Mei, LÜ Feng-Xia, LIU Zhan-Min

南京农业大学食品科技学院, 南京 210095

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**摘 要** 我国有丰富廉价的动植物油脂资源,但这一资源并未得到有效的利用,为了充分利用这些资源,开展了无溶剂系统脂肪酶催化猪油与辛酸酸解制备功能性脂的研究工作。脂肪酶筛选实验表明,在所选用的五种脂肪酶中,来自 *T. languginosa* 的固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 的催化效果最好。以 Lipozyme TL IM 为催化剂,进一步研究了酶量、底物比率、反应时间、反应温度和水分添加量对猪油中辛酸插入率的影响。反应产物通过高效液相色谱法(HPLC)进行分析。研究结果表明,当脂肪酶量为 20% (底物重量百分比)时,猪油中辛酸插入率最高。反应时间研究表明,当反应时间达到 24h 时,辛酸的插入率最高,达到 38.77mol%。当猪油与辛酸的比率为 1:2 (摩尔比)时,辛酸的插入率最高,达到 30.95mol%。在 45~60℃ 范围之内,反应温度对辛酸插入率没有明显的影响,温度高于 60℃ 时,辛酸插入率降低。水分添加量为 2.5% 时,辛酸插入率最高,高达 35.76 mol%。

**关键词** 脂肪酶, 酸解反应, 猪油, 辛酸, 功能性油脂, 无溶剂体系

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0493-04

**Abstract** China has richly and inexpensive fat and oils from animal and plants, but these resources could not get effectively utilization. In order to make the best of these resources, lipase-catalyzed acidolysis of lard with caprylic acid to produce functional lipid in solvent free system was investigated. Of the five lipases that were tested in the initial screening, immobilized lipase TL IM from *T. languginosa* resulted in the highest incorporation of caprylic acid into lard. This enzyme was further studied for the effect of enzyme load, substrate ratio, reaction time, reaction temperature and added water content on the incorporation of caprylic acid into lard. HPLC analyzed the products from the acidolysis reaction. The highest incorporation was attained at 20% enzyme load. Time course studied suggest that the incorporation of caprylic acid into lard was increased up to 38.77mol% after 24h. Desirable mole ratio of substrates was 1:2 (lard: caprylic acid), caprylic acid incorporation up to 30.95mol%. In the range of 45~60℃, temperature had no significant effect on enzyme activity and caprylic acid incorporation changed little. When temperature was above 60℃, incorporation of caprylic acid into lard was decreased. The highest incorporation of caprylic acid into lard 35.76 mol% was attained when added water content was 2.5%.

**Key words** lipase, acidolysis, lard, caprylic acid, structured lipid, solvent free system

Received: December 9, 2004; Accepted: March 2, 2005.

\* Corresponding author. Tel: 86-25-84396583; E-mail: fmb@njau.edu.cn

随着人们生活水平的提高,猪油在人们日常饮食中所占比例越来越少,造成猪油的“过剩”。如何利用这些廉价的油脂资源来创造出高附加值的有利于人体健康的产品,是目前畜产加工业发展中所需解决的一个关键环节。这促使人们试图通过不同的途径对天然油脂进行改良。

结构脂质是最近几年新兴的一类功能性油脂,它是按照甘油三酯在人体内的代谢途径、吸收性能及热量来改变甘油骨架上脂肪酸的种类,以最大限度发挥其效用。利用区域特异性脂肪酶水解天然甘油三酯 Sn-1,3 位上的脂肪酸,然后接入其它有生理功能或低热量的脂肪酸,重新组成甘油三酯(MLM):脂肪酸在 Sn-1,3 位上,以游离态被吸收,而在 Sn-2 位上,则是以单甘酯的形式被吸收。短链和中链脂肪酸可溶于肠液而被吸收,并与蛋白结合,通过门静脉直接运输到肝脏。而长链脂肪酸是以乳糜微粒的形式经淋巴和体循环,最后运输至肝脏。结构脂质与长链甘油三酯相比有易消化、吸收快、氧化快、释放能量低的特点。中链脂肪酸直接被运输至肝脏,进入线粒体也不需要肉碱的帮助。与长链脂肪酸相比,中链脂肪酸较少沉积到脂肪组织,在高分解代谢情况下,可减少体内蛋白的分解代谢,提高甲状腺功能,不与胆固醇形成脂<sup>[1]</sup>。

有关酶法改造油脂制备功能性油脂的研究,国外相关报道非常多,但国内目前还处于刚起步阶段,相关研究报道比较少。

鉴于此,本文从食品卫生、降低生产成本和对环境友好的角度出发,采用无溶剂系统作为反应体系,利用脂肪酶催化的猪油与辛酸(中链脂肪酸)的酸解反应对猪油进行改良,并探讨了各相关因素对反应的影响,如脂肪酶、酶量、反应时间、反应温度、底物比率和添加水分等。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

精制猪油由天津塘沽牧羊油脂厂馈赠。固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 来源于 *T. languginosa* 购自丹麦 Novozyme 酶制剂公司。脂肪酶 AY-30 (*Candida rugosa*), FAP-15 (*Rhizopus oryzae*) 和 Amano 10 (*Mucor Javanicus*) 由日本 Amano 酶制剂公司馈赠,均为非固定化酶。辛酸、其它脂肪酸标样(>99%)以及猪胰脂酶(porcine pancreatic lipase, PPL)为美国 Sigma 公司产品。其它溶剂为分析纯或色谱纯。

### 1.2 脂肪酶催化的酸解反应

典型反应为:0.1mmol 猪油,0.2mmol 辛酸置于带螺旋盖的玻璃试管中,在 55℃ 下预热 5min,使反应物溶解,加入 10% 脂肪酶(底物重量百分比),旋紧盖子,在旋转水浴锅中以 200r/min 作用 24h。所有反应重复,计算平均值。

### 1.3 反应产物的分离

反应混合物离心,除去脂肪酶。用 GF<sub>254</sub> 硅胶板(厚度:0.5mm,20cm×20cm)对离心物进行薄层层析,展开剂为石油醚/乙醚/乙酸(80/20/0.5,体积比)。在紫外灯下刮下对应于甘油三酯的条带,用乙醚提取 2 次,合并醚提取物,减压下蒸

干溶剂,对之进行皂化反应。

### 1.4 皂化反应及衍生化反应

按照 GB/T-5534-1995<sup>[2]</sup> 对上述分离产物进行皂化反应。冷却反应产物,加入 6mol/L 的盐酸溶液 100μL,调节 pH 至 3.0,使脂肪酸呈游离状态。用乙醚提取 2 次,合并醚提取物,减压蒸干溶剂,按照 Rioux 等<sup>[3]</sup> 的方法对提取混合脂肪酸进行衍生化反应,形成苯乙酰酯。用 0.5mL 色谱甲醇溶解,过 0.45μm 滤膜,进行 HPLC 分析。

### 1.5 HPLC 检测

采用美国 Agilent 1100 系列 HPLC,配备有 ZORBAX-SB ODS 色谱柱(0.45μm,4.6mm×250mm)和紫外检测器。用甲醇/乙腈/水以 1.0mL/min 的流速进行梯度洗脱,洗脱程序为:80/10/10 的甲醇/乙腈/水在 30min 内过渡到 86/10/4,然后在 5min 内再回到起始比例。在 254nm 处检测产物,以十七碳链脂肪酸作为内标物,表示为摩尔百分比,即 mol%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脂肪酶的筛选

脂肪酶的来源不同,其稳定性、催化活性和底物专一性也不同<sup>[4]</sup>。为了确定一种最适宜本研究的脂肪酶,有必要进行脂肪酶的筛选。实验中所选用五种脂肪酶 Lipozyme TL IM、AY-30、FAP-15、Amano 10 和 PPL 分别来自 *T. languginosa*、*Candida rugosa*、*Rhizopus oryzae*、*Mucor javanicus* 和猪胰腺。由图 1 可知,所选用五种脂肪酶的催化活性由高到低依次为:Lipozyme TL IM > Amano 10 > FAP-15 > PPL > AY-30。其中,Lipozyme TL IM 的催化活性最高,辛酸的插入率达到了 27.00mol%。因此本实验就选用 Lipozyme TL IM 作为催化剂,进行其它反应参数的研究。

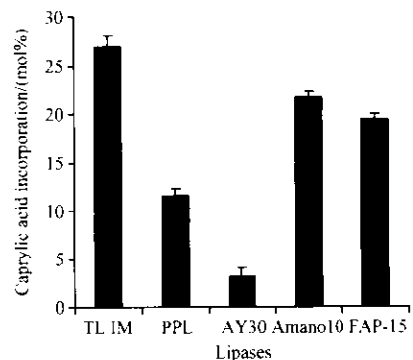


图 1 脂肪酶对猪油中辛酸插入率的影响(反应条件:温度:40℃,猪油/辛酸=1/2(摩尔比),酶量,10%,转速:200r/min,时间:24h)  
Fig. 1 The effect of lipase on the incorporation of caprylic acid into lard  
Reaction conditions: temperature:40℃,lard/caprylic acid=1/2(mol/mol),enzyme load:10%,shake speed:200r/min,time:24hours

### 2.2 酶量对猪油中辛酸插入率的影响

酶量对辛酸插入率的影响见图 2。当酶量为 20% 时辛酸插入率最高,达到了 32.87mol%。有研究报道,随着酶量增加,菜子油中辛酸插入率提高,但同时酰基转移率也提高<sup>[5]</sup>。由图 2 还可看出,当酶量 ≥ 10% 时,辛酸插入率差异

不大,说明酶量的增加并没有明显提高辛酸的插入率。酶量的增加只会加快反应速度,而酸解反应是复杂的可逆反应,酯合成反应加快的同时,油脂副水解反应也加速。酶量增加时会带入过多的水分,也加速水解副反应的发生 Akoh & Jennings<sup>6</sup>。在无溶剂系统中利用 Lipozyme IM60 催化癸酸与鱼油酸解制备功能性脂,结果酶量为 20% 时癸酸插入率最高 (48.6mol%), 与本研究结论一致。从经济利益方面考虑,为了降低生产成本,酶量在 10% ~ 20% 之间比较合理。

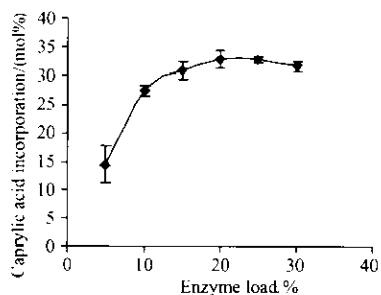


图2 酶量对辛酸插入率的影响(反应条件:温度:55℃,猪油/辛酸 = 1/2,摩尔比,酶量:5% ~ 30%,转速:200r/min,时间:24h)

Fig. 2 The effect of enzyme load on the incorporation of caprylic acid into lard (reaction conditions: temperature: 55℃, lard/caprylic acid = 1/2, mol/mol, enzyme load: 5% ~ 30%, shake speed: 200r/min, time: 24hours)

### 2.3 反应时间对辛酸插入率的影响

在酶催化的反应中,反应时间是一个重要的影响因子,它决定着在何种反应条件下可以以最低成本获得最高产物产率。图3是反应72h下猪油中辛酸插入率情况。当反应到达12h时,辛酸插入率急速上升,24h时,辛酸插入率达到最高(38.77mol%)。随后,随着时间的延长,辛酸插入率没有升高,反而下降。这说明反应时间的延长并不一定可以提高辛酸插入率。还有报道认为,比较长的反应时间可以提高产物产率,但酰基转移率也提高<sup>7</sup>。因此本研究认为反应时间为24h比较适宜。

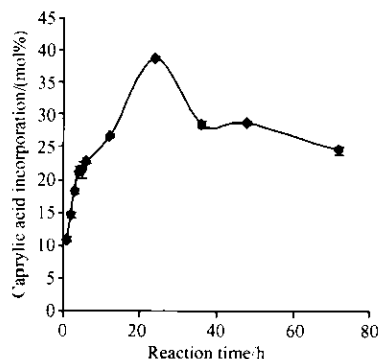


图3 反应时间对辛酸插入率的影响(反应条件:温度:55℃,猪油/辛酸 = 1/2,摩尔比,酶量:10%,转速:200r/min,时间:0 ~ 72h)

Fig. 3 The effect of reaction time on the incorporation of caprylic acid into lard (reaction conditions: temperature: 55℃, lard/caprylic acid = 1/2, mol/mol, enzyme load: 10%, shake speed: 200r/min, time: 0 ~ 72hours)

### 2.4 底物比率对辛酸插入率的影响

酸解反应是一个复杂的可逆反应,产物产率与两种底物的配比有关。本研究中保持猪油量的不变,同时改变辛酸的量,从0.1 ~ 0.8 mmol,使猪油/辛酸比率处于1:1到1:8。由图4可以看出,当底物比率为1:1时,辛酸插入率非常低,底物比率为1:2时,辛酸插入率急速提高,高达30.95mol%,随后,随着底物比率的升高,辛酸插入率并没有提高,反而急速降低。比较高的底物比率可以促使反应向产物合成方向进行。但本实验中,高的底物比率并没有提高辛酸的插入率,原因可能有以下几方面:首先,比较高的底物比率可能使酶处于过饱和状态,酶的活性位点全部被结合,而底物还有剩余;其次,高浓度的游离脂肪酸产生游离或离子化羧酸基团,从而使酶分子周围微环境酸化,或酶表面束缚水被剥夺;第三,由于中链脂肪酸在水中的溶解度增大,使得脂肪酸离开油水界面进入酶分子周围的水层,这样的分配限制了底物与油水界面接触的机会<sup>8</sup>。从经济利益和工业化生产方面考虑,比较高的底物比率,不仅增加了生产成本,同时为下游分离加工带来了困难。综合各方面的因素,选择底物比率为1:2比较令人满意。

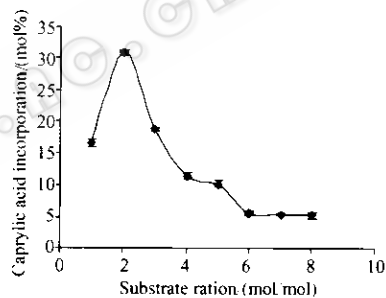


图4 底物比率对辛酸插入率的影响(反应条件:温度:55℃,猪油/辛酸 = 1/1 ~ 1/8,摩尔比,酶量:10%,转速:200r/min,时间:24h)

Fig. 4 The effect of substrate ratio on the incorporation of caprylic acid into lard (reaction conditions: temperature: 55℃, lard/caprylic acid = 1/1 ~ 1/8, mol/mol, enzyme load: 10%, shake speed: 200r/min, time: 24hours)

### 2.5 反应温度对辛酸插入率的影响

适当的温控条件对于酶催化的反应非常重要。温度变化不仅影响酶催化活性,而且影响底物的黏度,从而影响传质速度。而酶作用的最适温度条件又受酶的来源、固定化、化学修饰和反应混合物pH值影响<sup>9</sup>。本研究中温度范围在45 ~ 75℃之间,如图5所示。当反应温度在45 ~ 60℃之间时,酶比较稳定,催化活性比较高,因此辛酸插入率也比较高。随着温度的升高,酶的结构可能发生变化,部分酶开始失活,从而导致辛酸插入率的降低。为了保持酶的稳定性,提高酶的重复使用次数,反应温度应以不高于60℃为宜。

### 2.6 添加水分对辛酸插入率的影响

水分含量对于脂肪酶促反应的影响是十分复杂的。在一定范围内,脂肪酶的初始活性随着水分含量的增加而提高,然而水分含量过高时,不仅不能加速整个反应进程和提

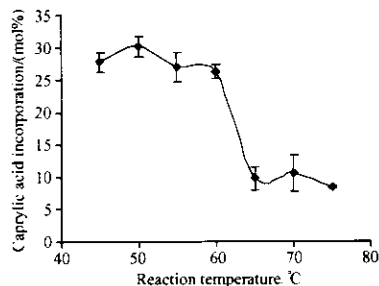


图5 反应温度对辛酸插入率的影响(反应条件:温度:45~75℃, 猪油/辛酸=1/2,摩尔比,酶量:10%,转速:200r/min,时间:24h)

Fig.5 The effect of reaction temperature on the incorporation of caprylic acid into lard(reaction conditions:temperature:45~75℃, lard/caprylic acid = 1/2, mol/mol, enzyme load:10%, shake speed:200r/min, time:24hours)

高终产率,而且还会导致脂肪酶酶活的降低及生成更多的副产物(水解)。因此,对于特定的反应来说,应该通过实验决定最佳水分含量<sup>[10]</sup>。由图6可以看出,当水分添加量为2.5%(酶量计算)时,水在底物中分散均匀,酶分子周围水适量,辛酸插入率最高。当添加水量高于2.5%时,辛酸插入率开始降低,因为添加水过多,会促进油脂水解副反应的发生。对于大多数反应,需要低于1.0%的水量。但由于脂肪酶的不同,系统最佳需水量也不同,大概在0.04%~11%(W/V)<sup>[11,12]</sup>。

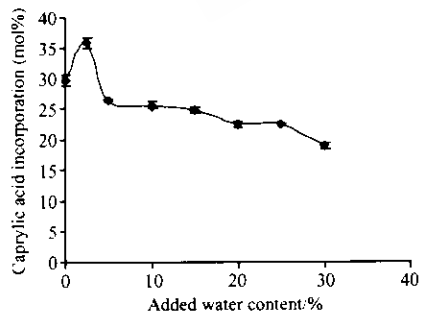


图6 添加水分对辛酸插入率的影响(反应条件:温度:55℃, 猪油/辛酸=1/2,摩尔比,酶量:10%,转速:200r/min,时间:24h, 水分添加量:0~30%)

Fig.6 The effect of added water content on the incorporation of caprylic acid into lard(reaction conditions:temperature:55℃; lard/caprylic acid = 1/2, mol/mol; enzyme load:10%; shake speed: 200r/min; time:24hours, added water content:0~30%)

### 3 结论

在无溶剂系统,利用 Lipozyme TL IM 脂肪酶催化猪油与辛酸进行酸解反应制备功能性脂。通过反应温度、反应时间、酶量、底物比率,和水分添加量的研究,建立了最佳的工艺条件。其最佳反应条件是:反应温度 50℃,底物比率 1/2 (猪油/辛酸),酶量 15%,反应时间 24h,水分添加量 2.5%。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Akoh CC, Yee LN. Enzymatic synthesis of positional-specific low-calorie structured lipids. *JAOCS*, 1997, **74**(11): 1409 - 1413
- [2] Wang ZC (王肇慈). Quality Analysis of Food and Oil (粮油食品质量分析). 2nd ed. Beijing: China Light Industry Press, 2000, pp. 442 - 444
- [3] Rioux V, Catheline D, Bouriel M *et al.* High performance liquid chromatography of fatty acid as naphthacyl derivatives. *Analysis*, 1997, **27**:186 - 193
- [4] Li XC (李香春), Zhen ZY (甄宗园). The properties and utilizations of lipases. *Journal of Food and Oil* (粮食与油脂), 2003, **3**: 19 - 20
- [5] Xu X, Skands ARH, Adler-Nissen J *et al.* Production of specific structured lipids by enzymatic interesterification: optimization of the reaction by response surface design. *Fettler Lipid*, 1998, **100**:463 - 471
- [6] Jennings BH, Akoh CC. Lipase-catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. *Food Chemistry*, 2001, **72**:273 - 278
- [7] Mu H, Xu X, Høy CE. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. *JAOCS*, 1998, **75**:1187 - 1193
- [8] Yankah VV, Akoh CC. Lipase-catalyzed acidolysis of tristearin with oleic or caprylic acids to produce structured lipids. *JAOCS*, 2000, **77**(5): 495 - 499
- [9] Eggers DK, Blanch HW, Prausnitz JM. Extractive catalysis: solvent effects on equilibria of enzymatic reactions in two-phase systems. *Enzyme Microbial Technology*, 1989, **11**(2):84 - 89
- [10] Guo BY (郭宝泳), Qiu AY (裘爱泳). Production of structured lipids by enzymatic interesterification. *Journal of Food and Oil* (粮食与油脂), 2001, **8**:31 - 33
- [11] Li ZY, Ward OP. lipase-catalyzed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate in organic solvent. *JAOCS*, 1993, **70**:745 - 748
- [12] Malcata FX, Reyes HR, Garcia HS. Kinetic and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Technology*, 1992, **14**:426 - 446