

酶法催化生产 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯

蒋与燕, 金子, 林影, 郑穗平, 韩双艳

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(OPO)是母乳脂肪中甘油三酯的重要组成成分, 可有效改善和保证棕榈酸在婴幼儿体内的吸收和利用。本文对其脂肪酶催化生产进行了简单探索, 以三棕榈酸甘油酯(PPP)和油酸(OA)为底物, 通过1,3-特异性脂肪酶 RMIM 催化的酸解反应成功制备了 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯。经单因素优化后最佳反应条件为: PPP 与油酸摩尔比 1:6, 加酶量 8%, 反应温度 50 °C, 反应时间 6h, 反应产物中脂肪酸组成为: 油酸 54.86%, sn-2 位棕榈酸含量为 87.64%。

关键词: 母乳脂肪替代物 OPO; 脂肪酶 RMIM; 酸解反应

文章编号: 1673-9078(2013)5-1048-1051

Enzyme Catalyzed Preparation of 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol

JIANG Yu-yan, JI Zi, LIN Ying, ZHENG Shui-ping, HAN Shuang-yan

(School of Bioscience and Bioengineering of South China University of Technology, Guangzhou, 51006)

Abstract: 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol (OPO) is an important component of triglycerides in human milk fat. The research focused on the optimization of different reaction factors to produce 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol as human milk fat substitute catalyzed by the immobilized lipase RM^{IM} with tripalmitin (PPP) and oleic acid (OA) as substrates. The optimum reaction conditions were as follows: the molar ratio of PPP and oleic acid 1:6, the enzyme dosage 8% of the weight of substrates, the reaction temperature 50 °C and the reaction time 6 h. In the products, the concentrations of oleic acid and palmitic acid in sn-2 position were 54.86% and 87.64%, respectively, of the total fatty acids..

Key words: human milk fat substitute OPO; lipase RMIM; acidolysis reaction

母乳中脂肪成分提供了婴儿 50% 以上的能量, 其中占 98% 左右的为甘油三酯^[1-2]。这种甘油三酯组成往往有以下特点: 不饱和脂肪酸如油酸、亚油酸等主要分布在 sn-1,3 位, 油酸含量最大; 而饱和脂肪酸多位于 sn-2 位上, 如占总脂肪酸含量 20~25% 的棕榈酸, 其中的 60~70% 位于 sn-2 位上^[3]。棕榈酸是婴儿生长最重要的脂肪酸, 为机体的生长发育、大脑活动、新陈代谢提供能量, 棕榈酸结合在甘油三酯的 sn-2 位时最容易被婴幼儿消化, 能够促进机体对能量物质(脂肪)的吸收, 而在 sn-1,3 位则大部分不能被吸收, 这是因为 sn-1,3 位的棕榈酸在胰脂肪酶作用下形成游离的棕榈酸, 而棕榈酸熔点(63 °C)高于人体体温, 在小肠的酸性环境下容易与矿物质发生皂化反应, 形成不溶性的盐, 最终被排出体外, 而 sn-2 位上的棕榈酸则能以 sn-2 棕榈酸甘油单酯的形式被人体吸收。因此 sn-2 位棕榈酸能够促进钙、镁等骨骼矿物质的吸收,

促进婴幼儿身体骨骼的生长^[4-5]。因此可水解为 sn-2 棕榈酸单甘脂和游离油酸的 1,3-二油酸 2-棕榈酸甘油三酯(OPO)不仅符合人体的消化习惯, 更能在一定程度上促进钙的吸收, 促进婴儿发育, 降低便秘和肠梗塞发生的可能性。2008 年中华人民共和国卫生部第 13 号公告批准了 1,3-二油酸 2-棕榈酸甘油三酯(OPO)作为营养强化剂可用于婴儿配方奶粉中, 并规定了其生产技术指标及强化量^[6]。研究酶法绿色催化合成母乳脂肪替代物 OPO 具有重要的现实意义。

本实验以三棕榈酸甘油酯(PPP)为底物, 选用 1,3-特异性脂肪酶为催化剂, 合成结构脂 OPO。从温度, 底物摩尔比, 时间, 催化剂用量等因素, 探讨了结构脂 OPO 生产过程中的关键反应-酸解反应中的影响因素, 优化了反应条件。

1 材料与amp;方法

1.1 主要材料

Lipozyme RMIM, 诺维信公司; 猪胰脂肪酶, 胆酸钠, 三羟甲基氨基甲烷, 购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 油酸(85%)和 PPP(98%), 正己烷, 异辛烷等色谱纯试剂, 均购于阿拉丁试剂公司; 乙醚、氯化钠、甲醇、氢氧化钾、三氟化硼甲醇溶液

收稿日期: 2013-01-11

项目基金: 广东省高新技术产业化-工业攻关项目, 新型脂肪酶 RML 生产 OPO (2012B010300008)

作者: 蒋与燕(1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为酶法催化生产母乳脂肪替代物

通讯作者: 韩双艳, 博士, 硕士生导师, 研究方向为微生物发酵与酶工程

(14%)、无水硫酸钠、盐酸、氯化钙等,均为市售分析纯试剂。

1.2 主要仪器

GC-7890A 型气相色谱仪, Agilent 公司, 配氢离子火焰检测器(FID); 水浴恒温振荡器, 金坛市宏华仪器制造厂; 试管涡旋振荡器, 江苏海门市其林尔仪器制造有限公司; SB-2 型薄层色谱喷雾泵, 天津市天分分析仪器厂。

1.3 酸解反应

PPP (100 mg) 与油酸(OA)按设定比例混合加入具塞三角瓶中, 加入 RMIM 作为催化剂, 3 mL 正己烷作溶剂。置于不同温度, 200 r/min 摇床中。

1.4 甲酯化方法

根据 ISO 6800: (1997) 的方法, 取待测样品, 加入 4 mL NaOH 甲醇溶液, 置于 80 °C 水浴, 接入冷凝装置, 至沸腾 10 min 后加入 5 mL BF₃ 甲醇溶液, 继续加热 5 min 加入 3 mL 异辛烷, 2 min 后加入饱和食盐水, 吸取上层有机相于样品瓶中, 加入无水硫酸钠后吸取澄清液待气相色谱测定。

1.5 脂肪酸检测

1.5.1 总脂肪酸分布测定

通过薄层层析进行甘油三酯的分离。硅胶板用之前在 105 °C 烘箱中进行活化 30 min。取出的反应产物样品通过去除催化剂, 点样于层析的硅胶板上 (10 cm×20 cm), 置于层析缸中进行薄层层析。层析液为石油醚:乙醚:乙酸=90:10:0.1 (V/V/V), 以三油酸甘油三酯作为对比物, 找出甘油三酯 (TAG) 条带^[7]。刮取条带, 根据“材料与方法”1.4 甲酯化方法进行甲酯化, 待气相色谱进行检测。

1.5.2 脂肪酸 sn-2 位位置分析

根据 Sahin et al^[8]提供的方法, 将 1 mL 样品真空浓缩成 200 μL 后, 加入 10 mL 试管中, 加入 20 mg 胰脂肪酶和 2 mL Tris-HCL 缓冲液 (2 mol/L, pH=8), 摇匀后加入 0.5 mL 胆酸钠溶液 (1 g/L) 及 0.2 mL 氯化钙溶液 (220 g/L), 摇匀, 置于 40 °C 水浴锅中 5 min, 混合振荡摇匀后再置于水浴锅 5 min, 再振荡摇匀后, 加入 1 mL 无水乙醚和 1 mL HCL 溶液 (6 mol/L)。振荡摇匀后 5000 r/min 离心 2 min, 取上层乙醚层经氮吹至约 100 μL, 点样于硅胶板进行薄层层析。刮取单甘酯条带, 根据“材料与方法”1.4 甲酯化方法进行甲酯化后待气相检测。

1.6 气相色谱检测条件

采用 Agilent 7890A (氢离子火焰检测器) 进行气相色谱分析。色谱柱: DB-FFAP 毛细管色谱柱 (0.25 μm×0.25 mm×30 m): Agilent 公司; 载气 (N₂), 20

mL/min; 前进样口: 250 °C, 分流比 40:1; 前检测器 (FID): 260 °C, 干燥空气流速 350 mL/min, 氢气流速 30, 尾吹 10 mL/min; 柱箱: 60 °C 维持 2 min, 20 °C/min 升温至 180 °C, 维持 2 min, 5 °C/min 升温至 230 °C, 维持 10 min, 共运行 30 min。进样量: 1 μL。采用面积归一化法进行数据处理分析。

1.7 OPO 评分原则

酸解反应平衡后, 产物的结构分析可以从两个重要的方面评价: 总脂肪酸和 sn-2 位脂肪酸的分布情况。因此, 对于富含 OPO 的产物, sn-2 位棕榈酸 (PA) 的相对含量和油酸在总脂肪酸的含量是两个重要指标, 在此基础上建立了一个模型, 用于评估富含 OPO 的甘油三酯^[9]。方法如下:

$$\text{总分 } G = G_{\%sn-2C16:0} + G_{C18:1n-9c}$$

$$G_{\%sn-2C16:0} = 50 - E_{\%sn-2C16:0}$$

$$G_{C18:1n-9c} = 50 - E_{C18:1n-9c}$$

假定 G 最大值为 100, 两个指标满分各为 50。

$E_{\%sn-2C16:0}$ 和 $E_{C18:1n-9c}$ 有如下计算:

$$E_{\%sn-2C16:0} = 50 \times (C_{\%sn-2C16:0} \times D_{\%sn-2C16:0})$$

$$E_{C18:1n-9c} = 50 \times (C_{C18:1n-9c} \times D_{C18:1n-9c})$$

$D_{\%sn-2C16:0}$ 和 $D_{C18:1n-9c}$ 为指标的权重, 设定它们均为 1。 $C_{\%sn-2C16:0}$ 和 $C_{C18:1n-9c}$ 是指标的浮动率, 计算如下:

$$C_{\%sn-2C16:0} = \frac{|B_{\%sn-2C16:0} - A_{\%sn-2C16:0}|}{A_{\%sn-2C16:0}}$$

$$C_{C18:1n-9c} = \frac{|B_{C18:1n-9c} - A_{C18:1n-9c}|}{A_{C18:1n-9c}}$$

$B_{\%sn-2C16:0}$ 是指样品中 C16:0 分布在 sn-2 位上的比例 (相对值), 计算如下:

$$B_{\%sn-2C16:0} = \frac{\text{sn-2位C16:0含量}}{\text{总体脂肪酸C16:0含量}} \times 100\%$$

$B_{C18:1n-9c}$ 是指总脂肪酸分布中油酸占的比例, $A_{\%sn-2C16:0}$ 和 $A_{C18:1n-9c}$ 是纯 OPO 中 PA 和 OA 的理论值, 分别为 100% 和 66.67%。

2 结果与讨论

2.1 底物比对酸解反应的影响

由于催化剂 RMIM 的 sn-1,3 特异性, 在一定的反应时间内, 油酸只会与 PPP sn-1,3 位的棕榈酸 (PA) 进行反应, 在此过程中 sn-2 位棕榈酸不参与反应, 从而最大程度的保持了 PA 在 sn-2 的含量。理论上 PPP 与 OA 在 1:2 的摩尔比时能发生完全的酯交换, 但适当增加酰基供体 (酸) 的比例, 可使反应平衡向右移动, 利于反应的快速进行。因此, PPP 与油酸按 1:2、1:4、1:6、1:8、1:10 等不同摩尔比配制, 分别加入 10%

底物重量的酶, 在 55 °C, 200 r/min 摇床中反应, 定时取样检测产物, 研究底物的摩尔比例随时间对油酸并入率的影响(图 1)。实验发现, 较高的底物比例下, 反应能快速达到平衡, 产物中油酸含量也越高, 6h 左右, 反应都接近平衡, 达到最高值。考虑到酸解反应过程中 sn-1,3 位特异性的脂肪酶先催化 sn-1,3 位的酰基转移, 同时随着反应时间延长, 脂肪酶会催化 sn-2 位的酰基部分迁移到 sn-1 位或者 sn-3 位, 从而出现 sn-2 位的脂肪酸变化, 但油酸含量比例高可能降低酰基迁移^[9]。因此, 将反应时间延长到 8h, 测定 sn-2 位 PA 含量情况(图 2), 底物比大于 1:6 时, sn-2 位 PA 比例变化不大。反应 6h 时, 1:6 的底物比下, 油酸并入率最高(54.53%), 后期优化其它条件时底物摩尔比选择 1:6 的比例。

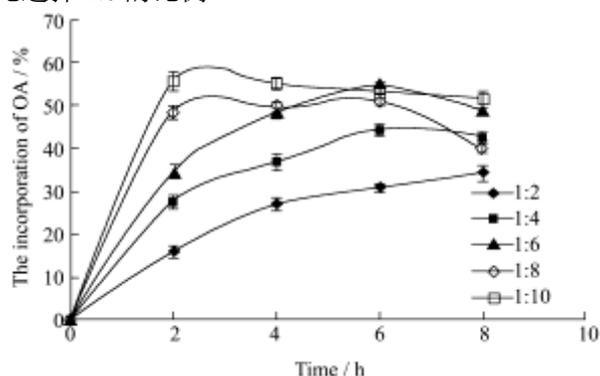


图 1 底物比对油酸含量变化的影响

Fig.1 The effect of molar ratio of substrates on oleic acid (OA) content

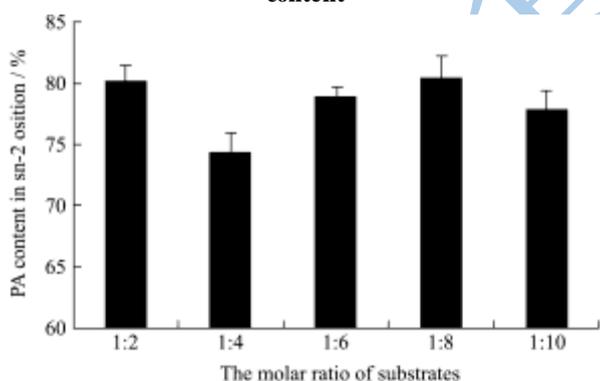


图 2 不同摩尔比对 sn-2 位棕榈酸含量的影响 (8 h)

Fig.2 The effect of molar ratio of substrates on the content of sn-2 PA

2.2 时间对酸解反应的影响

同时, 在 PPP 与油酸的摩尔比为 1:6 时, 探讨了反应时间对于反应中油酸并入情况的影响(图 3), 55 °C 时产物中油酸含量随反应时间增加而积累, 6h 时候达到最大 54.53%, 24 h 后为 53.83%, 但 sn-2 位 PA 含量随时间增加而下降明显(图 4)。Lee 等也发现时间对酰基迁移的影响最为显著, 当反应时间从 3 h

增加至 12 h, 酰基迁移率从 6.50% 增加到了 29.50%^[10]。在 RMIM 催化的酸解反应中, 反应后期的酰基迁移导致产物中 sn-2 位 PA 含量急剧降低, 10 h 以后降至了 70% 以下, 综合产物中 OA 含量和 sn-2 位 PA 含量考虑, 选取反应时间为 6 h 较为合适。

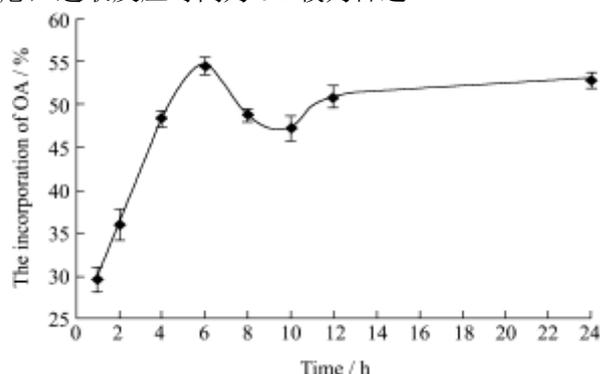


图 3 时间对油酸含量变化的影响

Fig.3 The effect of reaction time on OA content

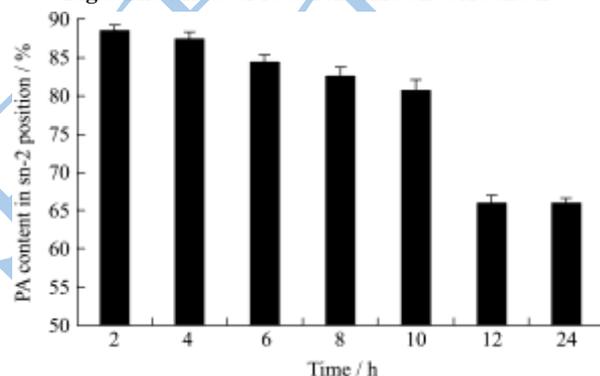


图 4 时间对 sn-2 位棕榈酸含量变化的影响

Fig.4 The effect of reaction time on sn-2 PA content

2.3 催化剂添加量对酸解反应的影响

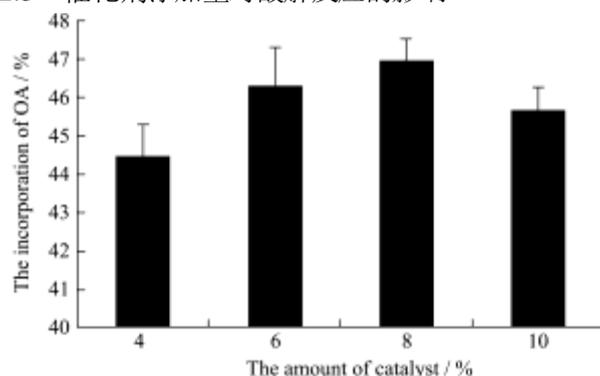


图 5 加酶量对油酸含量变化的影响

Fig.5 The effect of enzyme dosage on OA content

当催化剂用量低时, 反应体系中存在的酶活位点较少, 导致催化活性降低, 降低了反应速率, 当催化剂用量过多时, 不仅提高 OA 的并入率不明显, 而且也提高了反应的成本。因此, 优化催化剂的用量也十分重要。PPP 与油酸按摩尔比 1:6 混合加入, 3 mL 正己烷作溶剂, 分别加入不同量的 RMIM 作为催化剂,

200 r/min, 55 °C下反应 6 h 测定其产物脂肪酸组成。由图 5 可以看出, 酶量为 8%时油酸的并入比例为最高, 酶量继续升高, 油酸并入率有所下降。因此, 从油酸含量和经济因素考虑, 加酶量 8%最为合适。

2.4 温度对酯交换反应的影响

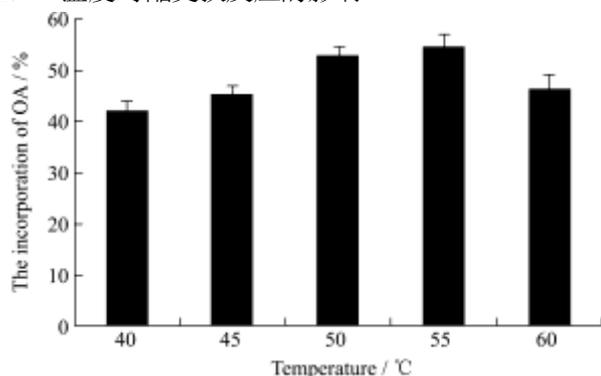


图 6 反应温度对油酸含量的影响

Fig.6 The effect of temperature on OA content

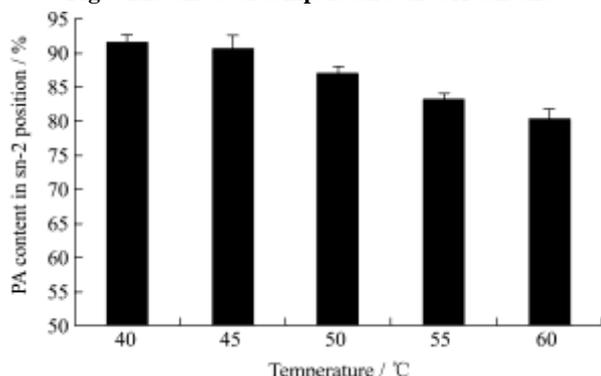


图 7 温度对 sn-2 位 PA 含量变化的影响

Fig.7 The effect of reaction temperature on sn-2 PA content

温度是结构脂生产中的重要参数, 影响着酶的稳定性、酶与底物的亲和力以及副反应-酰基迁移反应等。为了阐明温度对反应的影响, 考察了 40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C下油酸并入率以及 sn-2 位 PA 含量变化情况。由图 6 可以看出, 55 °C内, 油酸含量随温度上升而增加显著, 反应 6 h 内, 50 °C和 55 °C下油酸的含量较高。但图 7 显示, sn-2 位棕榈酸在 55 °C时较 50 °C含量低, 这可能是因为低温度对酰基迁移的影响相对小^[11]。故综合总脂肪酸和 sn-2 位脂肪酸分布考虑, 选取 50 °C为反应的最佳温度。

2.5 酯交换反应产物的脂肪酸组成

表 1 评分原则下最佳条件下产物的得分

Table 1 Scores of the products

Sample	Index	A	B/%	C/%	D	E	总分 G
The optimal product	%sn-2C16:0	100	74.52	25.48	1.00	12.74	78.38
	C18:1n-9c	66.7	54.86	17.75	1.00	8.88	

注: %sn-2C16:0 指 sn-2 位中 C16:0 的百分数; C18:1n-9c 指总脂肪酸中油酸的百分数; A 和 B 分别代表 sn-2 位中 C16:0 和总脂肪酸中 C18:1n-9c 的百分数的理论值和实验所得值; C 代表浮动率; D 代表两个指标的权重; E 代表评分原则下各指标的得分; G 代表评分原则下的总得分。

通过上述条件优化, 发现将 PPP 与油酸以 1:6 摩尔比混合, 加入 8% (m/V 底物) 的 RMIM 酶, 200 r/min, 50 °C 摇床中反应 6 h, 所得的甘油三酯的总脂肪酸所含油酸达到 54.86%, sn-2 位 PA 含量为 87.64%。根据 OPO 的评分原则分析计算 (表 1), 得到评价总分为 78.38, 分值较高, 说明所含 OPO 类型的结构脂比例较高。

3 结论

本文通过对母乳脂肪中重要结构脂 1,3 二油酸-2-棕榈酸甘油酯 (OPO) 的合成过程进行优化, 采用正己烷作为溶剂, 50 °C, 200 r/min 摇床中反应, 控制 PPP 与 OA 的摩尔比例为 1:6, 催化剂 RMIM 含量加入 8%, 反应 6 h 后得到的产物总脂肪酸中含棕榈酸 39.20%, 油酸 54.86%, sn-2 位棕榈酸含量为 87.64%。实验结果为 1,3 特异性脂肪酶特别是 RMIM 在甘油三酯酸解生产 OPO 提供了参考和思路。

参考文献

- [1] R G Jensen, G L Jensen. Specialty lipids for infant nutrition. I. milks and formulas [J]. *Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1992, 15: 232-245
- [2] C H Winter, E B Hoving, F A J Muskiet. Fatty acid composition of human milk triglyceride species: possible consequences for optimal structures of infant formula triglycerides [J]. *Chromatogr.*, 1993, 616: 9-24
- [3] Xu X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review S. M. Innis: Human milk and formula fatty acids [J]. *Pediatr.*, 1992, 120: S56-S61
- [4] A Lucas, P Quinlan, S Abrams, et al. Randomized controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants [J]. *Arch. Dis. Child.*, 1997, 77: F178-F184
- [5] 何川. 人乳脂的脂肪酸分布及人工构造方法 [J]. *食品科技*, 2001, 5: 11-13
- [6] N Akoh C C, Karaali A. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes [J]. *Agric. Food Chem.*, 2005, 53: 5779-5783
- [7] Sahin N, Akoh C C, Karaali A. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to

- produce human milk fat substitutes [J]. *Agric. Food Chem.*, 2005, 53: 5779-5783
- [8] Qin X L, Wang Y M, Wang Y H, et al. Preparation and characterization of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol [J]. *Agric. Food Chem.*, 2011, 59: 5714-5719
- [9] Lee J H, Son J M, Akoh C C, et al. Optimized synthesis of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich triacylglycerol via interesterification catalyzed by a lipase from *Thermomyces lanuginosus* [J]. *New Biotechnol.*, 2010, 27, 38-45
- [10] 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]. *Am. Oil Chem. Soc.*, 1998, 75: 1197-1186

现代食品科技