

# 固定化脂肪酶催化酱油糟油脂合成甘油二酯的研究

刘放<sup>1,2,3</sup>, 苗建银<sup>1,2</sup>, 黄早成<sup>1,3</sup>, 郑仲沐<sup>3</sup>, 戴伟杰<sup>1,3</sup>, 周匆<sup>1,3</sup>, 曹庸<sup>1,2</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642)  
(3. 广东惠尔泰生物科技有限公司, 广东广州 510642)

**摘要:** 本文以酱油糟为研究对象, 利用实验室自主研发的低温连续相变萃取技术提取其中的油脂, 并对提取出来的油脂主要理化指标进行分析, 选用自制的具有 Sn-1,3 位专一性固定化脂肪酶 HM IM 对其油脂中丰富的游离脂肪酸(含量为 61.50%)酯化合成甘油二酯。通过酶的添加量、甘油添加量、反应温度、搅拌速度、金属离子和不同辅助脱酸处理这几个因素进行优化, 得到最佳的酯化合成甘油二酯条件为: 自制固定化脂肪酶 00S 添加量 1%、甘油添加量为理论所需量的 1.2 倍、反应温度 65 °C、真空度 0.098 MPa+氮吹, 2 mmol K<sup>+</sup>处理固定化酶、搅拌速度 120 r/min 下反应 10 h, 酱油糟油脂的游离脂肪酸酯化率达 96.36%, 甘油二酯含量达 48.65% (43.65%的 1,3-DG、5.00%的 1,2-DG)、2.24% FFA、9.31%的 MG、39.80%的 TG, 而且酯化反应不会改变油脂的脂肪酸组成。酶法酯化处理既降低了酱油糟油脂的酸值, 又富含功能性甘油二酯, 对其开发再利用提供新的途径。

**关键词:** 固定化脂肪酶; 酱油糟油脂; 甘油二酯; 酯化

文章编号: 1673-9078(2017)11-110-118

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.017

## Synthesis of Diacylglycerol in Soy Sauce Residue Oil Catalyzed by Immobilized Lipase

LIU Fang<sup>1,2,3</sup>, MIAO Jian-yin<sup>1,2</sup>, HUANG Zao-cheng<sup>1,3</sup>, ZHENG Zhong-mu<sup>3</sup>, DAI Wei-jie<sup>1,3</sup>, ZHOU Cong<sup>1,3</sup>, CAO Yong<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Engineering Research Center of Natural Active Substance, Guangzhou 510642, China)

(3. Guangdong Huiltai Biological Technology Co., Ltd, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Soy sauce residue oil was extracted with free fatty acids content of 61.50% by a novel continuous phase transition extraction method at low temperature, and the self-made immobilized lipase HMIM with Sn-1, 3 specificity was used to catalyze the synthesis of diacylglycerol. The enzyme dosage the content of glycerin, reaction temperature, metal ions and auxiliary acid treatment methods were optimized, and the optimal conditions were determined as follows: immobilized lipase dosage 1%, content of glycerol 1.2 times of the required, reaction temperature: 65 °C, vacuum degree; 0.098 MPa, K<sup>+</sup> concentration 2 mmol/L, stirring speed 20 r/min and reaction time 10 h. Under these conditions, the free fatty acid esterification rate was 96.36% and the content of diglyceride was 48.65% (43.65% of 1,3-DG, 5.00% of 1,2-DG). The contents of FFA, MG and TG were 2.24%, 9.31% and 39.80%, respectively. Results showed that esterification reaction would not change the fatty acid composition of soy sauce residue oil. Process of Enzymatic esterification not only reduced the acid value of soy sauce residue oil but also increased the contents of functional diacylglycerol, which provided a new method for the development and utilization of soy sauce residue.

**Key words:** immobilized lipase; soy sauce residue oil; diacylglycerol; esterification

酱油糟, 即酱油生产酿造时其原料(主要是大豆)经过发酵后产生的酱醪经过淋油、压榨或抽油后剩下

收稿日期: 2017-04-27

基金项目: 广东省省科技计划项目(2015B020230008); 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2016LM2151)

作者简介: 刘放(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 食品化学与营养、天然产物与功能性食品开发

的固体残渣, 通常又被简称为酱油渣, 一般呈深棕色。酱油作为日常生活中必备的调味料, 其产量正以 10% 以上的速率逐年增长, 研究发现酱油产量与酱油糟的产量之间存在约 1:0.67 比例<sup>[1,2]</sup>, 因此酱油糟的年产量也十分巨大, 据统计 2013 年我国酱油糟的(干基)产量达 160 万 t 以上<sup>[3]</sup>。酱油原料在发酵过程中除蛋白质、淀粉部分被利用外, 还有大量的油脂(30.9%~36.5%, 以干基计)、膳食纤维、蛋白质和异黄酮等营养成分保

留在酱油渣中,具有很高的利用价值<sup>[4,5]</sup>。但是发酵导致残留的油脂与纤维结合紧密导致油脂很难有效的萃取出来<sup>[3]</sup>,严重制约了其他成分的进一步利用。传统的目前关于酱油渣油脂的提取主要有压榨法和溶剂萃取法。其中压榨法存在提取率低且压榨过程中物料易发生热变性,如钟振声等<sup>[5]</sup>用压榨浸出法提取的油脂其过氧化值比直接浸出法高 26.09%;溶剂萃取法中有使用异丙醇<sup>[6]</sup>、石油醚-乙醇<sup>[7]</sup>、6 号溶剂进行萃取,但是这些方法容易存在溶剂残留;近年来还有研究用亚临界流体萃取技术对酱油糟油脂进行提取<sup>[7]</sup>,其提取率可达 96.1%,但是目前仍停留在实验室研究阶段,未能实现产业化应用。由于长时间的发酵使得酱油渣油脂中游离脂肪酸含量升高,目前主要用于制备生物柴油和提取脂肪酸的原料,存在成本较高和附加值较低的问题,因此,本研究考虑是否存在一种方法不需要经过分离提取直接利用其中丰富的游离脂肪酸。

甘油二酯(Diacylglycerol, DG)是一类中性油脂(甘油三酯 TG)中的一个脂肪酸被羟基取代的功能性结构脂质,具有安全、营养和人体相容性高等诸多优点,在食品、医药和化工等领域广泛应用。天然的动植物油脂中的甘油二酯含量较低(0.8%左右)<sup>[8]</sup>,甘油二酯需要达到一定的含量,才具有相应的预防和治疗肥胖和降血脂等功效<sup>[9,10]</sup>,因此,开发较高浓度的甘油二酯油脂成为研究的热点。目前甘油二酯可以通过化学法和酶法催化油脂水解、甘油解、脂肪酸酯化制得<sup>[12-15]</sup>,其中以利用酶催化脂肪酸和甘油酯化形成甘油二酯应用最广,但大多仅停留在用纯游离脂肪酸原料进行,未见有利用富含游离脂肪酸的油料直接进行酯化合成甘油二酯的报道。

本研究利用一种新型低温连续相变萃取技术,实现酱油糟中油脂的高效萃取,为后期大豆异黄酮、膳食纤维的综合深加工提供便利条件。该技术是利用萃取剂(丁烷)在不同压力和温度下的两相变化,以及一定压力下萃取剂的强穿透性,高效地脱除油脂。低温连续性体现在,萃取剂在低于其临界压力和临界温度条件下压缩成液体(压力 0.5~0.8 MPa,温度 40~50 °C),流经萃取釜对物料进行萃取后,在解析釜中相变为气体,实现溶剂和萃取物的分离,气态萃取剂再次经过压缩又成液体,二次流经萃取釜,对物料进行反复萃取。整个工艺过程反应条件温和,无污染,无有毒有害物质生成,对酱油渣中的活性成分具有保护作用。同时利用自制的 Sn-1,3 位专一性固定化脂肪酶 HM IM,在温和的条件下,催化酱油糟提取油脂的丰富 FFA 酯化合成甘油二酯,为酱油糟油脂进一步深加工和高值化利用提供条件<sup>[16]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

酱油糟(购买于佛山市海天调味食品股份有限公司);丁烷(广州深岩燃气有限公司);氢氧化钾、冰乙酸、三氯甲烷、无水乙醇和无水硫酸钠等试剂均为分析纯;异辛烷(色谱纯)、甲醇(色谱纯);固定化脂肪酶 HM IM(自制)。

119 型中药粉碎机(浙江瑞安永历制药机械);低温连续相变萃取装置(自制);GCMS-气相色谱-质谱仪(安捷伦),旋蒸蒸发仪(上海申生科技有限公司);DF-101S 集热式恒温磁力搅拌水浴锅(巩义市予华仪器有限公司);PB-10 型精密 pH 计(赛多利斯科学仪器有限公司);UV-1750 型紫外可见分光光度计(岛津);PL203 型电子天平(梅特勒-托利多);DZF-6020B 型真空干燥箱(上海齐欣科学仪器);L530 台式低速离心机(湖南湘仪)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酱油糟原料主要成分分析

水分测定参考直接干燥法(GB/T 5009.3-2010);灰分测定参考(GB/T 5009.4-2010);蛋白质测定参考凯氏定氮法(GB/T 5009.5-2010);IDF 测定参考中性洗涤剂法(GB/T 5009.88-2008);脂肪测定参考索氏提取法(GB/T 14772-2008);粗纤维测定参考(GB/T 5009.10-2003)。

#### 1.2.2 酱油糟油脂的低温连续相变萃取

利用低温连续相变提取技术对酱油糟油脂进行提取,参考课题组前期研究得到的最佳提取工艺<sup>[6]</sup>:取新鲜酱油糟干燥后,粉碎过 45 目筛,以丁烷为萃取剂,在温度为 45 °C、压力为 0.5 MPa 下萃取 45 min。

#### 1.2.3 酱油糟油脂的理化指标分析

①酸值-按照 GB/T 5530-2005 规定测定;②过氧化值-按照 GB/T 5538-2005 规定测定;③碘值-按照 GB/T 5532-2008 规定测定;④皂化值-按照 GB/T 5534-2008 规定测定;⑤水分及挥发性成分-按照 GB/T 5009.3-2010 进行。

#### 1.2.4 酶法催化酱油糟油脂合成甘油酯

取 50 g 脱胶后的酱油糟萃取油和一定量的甘油置于 250 mL 烧瓶中,混均并预热至预定温度后,加入一定量的固定化脂肪酶,在一定的温度和真空条件下开始酯化反应。定时取样分析样品的游离脂肪酸含量,计算方法见公式(1),从而测得反应过程酯化率的变化,计算方法见公式(2)。

$$\text{游离脂肪酸含量 (FFA\%)} = \frac{C \times V \times M}{10m} \times 100\% \tag{1}$$

式中: C-KOH 标准滴定液的浓度 (mol/L); V-消耗 KOH 的体积 (mL); M-脂肪酸的分子量, 以油酸计为 282 g/mol; m-试样质量 (g); AV-油样酸值。

$$\text{酯化率 (\%)} = \frac{\text{FFA}_{\text{前}} - \text{FFA}_{\text{后}}}{\text{FFA}_{\text{前}}} \times 100\% \tag{2}$$

$$\text{甘油一酯 (\%)} = \frac{\frac{S1}{S0}}{\left(\frac{S1}{S0} + \frac{1}{2} \frac{S2}{S0} + \frac{1}{3} \frac{S3}{S0} + \frac{S4}{S0}\right)} \times 100\% \tag{3}$$

$$\text{甘油二酯 (\%)} = \frac{\frac{1}{2} \frac{S2}{S0}}{\left(\frac{S1}{S0} + \frac{1}{2} \frac{S2}{S0} + \frac{1}{3} \frac{S3}{S0} + \frac{S4}{S0}\right)} \times 100\% \tag{4}$$

$$\text{甘油三酯 (\%)} = \frac{\frac{1}{3} \frac{S3}{S0}}{\left(\frac{S1}{S0} + \frac{1}{2} \frac{S2}{S0} + \frac{1}{3} \frac{S3}{S0} + \frac{S4}{S0}\right)} \times 100\% \tag{5}$$

$$\text{游离脂肪酸 (\%)} = \frac{\frac{S4}{S0}}{\left(\frac{S1}{S0} + \frac{1}{2} \frac{S2}{S0} + \frac{1}{3} \frac{S3}{S0} + \frac{S4}{S0}\right)} \times 100\% \tag{6}$$

### 1.2.5 甘油酯分析方法

#### 1.2.5.1 薄层色谱法 (TLC) 分析甘油酯组成<sup>[17,18]</sup>

将不同反应时间的油样点样在 10×20 cm 的硅胶板 (用前在 110 °C 活化 1 h), 然后再层析缸中层析分离, 展开剂为: 正己烷/乙醚/冰乙酸=45:25:1, 分离结束后用碘蒸汽进行显色。

#### 1.2.5.2 甘油酯的定量分析<sup>[19]</sup>

将硅胶板上各甘油酯的谱带刮下, 然后在甘油一酯、甘油二酯和甘油三酯中加入相同量的内标物癸酸, 甲酯化后用 GC-MS 进行分析。

GC 条件: 色谱柱为 DB-5MS 石英毛细柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 前进样口温度 250 °C; 载气流速: 1.0 mL/min (高纯氦气); 分流比=50:1; 升温程序: 40 °C 保留 1 min; 然后 10 °C/min 到 120 °C 保留 5 min; 然后 15 °C/min 到 250 °C 保留 5 min (总共运行时间 27.667 min)。

MS 端参数: 辅助通道温度: 280 °C, 四级杆温度 150 °C, 离子源温度: 230 °C; 采集方式: 全扫描;

扫描质量范围: 40~330 u; 进样量: 1 μL。利用出峰时间进行定性, 峰面积进行定量。

根据质谱图进行定性, 采用内标法进行定量, 内标物为癸酸。将各组分的 GC-MS 色谱图中除癸酸之外的峰面积相加 (S1、S2、S3 和 S4), 然后比上癸酸的峰面积 S0, 及得到甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯和游离脂肪酸相对癸酸的量, 然后按照公式 (3)、(4)、(5)、(6) 计算出各组分的相对含量。

### 1.3 数据分析方法

运用 Origin Pro 8.5、Excel 2007 对数据进行绘图分析, 运用 SPSS Statistics 18.0 对测定的数据进行显著性比较分析 (p<0.05 时具有显著性差异; p<0.01 时具有极显著性差异; p>0.05 时无显著性差异)。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 酱油糟样品的主要成分分析

表 1 低温连续相变提油前后酱油糟的成分分析

Table 1 Analysis of components of soy sauce residue oil with and without the treatment of continuous phase transition extraction method at low temperature

	干基含量/%					
	水分	蛋白质	粗脂肪	IDF	盐分	灰分
原渣	36.50±0.31	16.76±0.07	33.23±0.38	23.10±0.71	10.90±0.23	15.40±0.42
脱脂渣	41.31±0.37	21.40±0.21	0.80±0.43	45.40±0.57	11.81±0.27	14.42±0.36

由上表可知：海天酱油糟中营养丰富，干基中含有大量的蛋白 16.76%、IDF 23.1%和油脂 33.23%，其中以油脂的含量最多，其次是 IDF 和蛋白，潜在价值很高，极具开发价值。通过对比低温连续相变萃取前后，几大主要成分的含量变化，可以看到利用低温连续相变萃取技术可以高效进行酱油糟的脱脂，并得到高纯度的膳食纤维。

## 2.2 低温连续相变萃取与索氏抽提对比

由表 2 看出，连续相变的脱脂效果与索氏相比，前者得率平均高出 3% 左右，提取率可达 96.60%~99.31%。且连续相变的萃取时间短，时间仅

需 45 min，在低温 45 °C 下进行，溶剂残留低，优势明显。

表 2 两种提取方式下提取率对比

Table 2 Comparison of extraction rates in two extraction methods

提取方式	油脂得率	提取率
低温连续相变	32.1%~33.0%	96.60%~99.31%
索氏抽提 6 h	28.8%~30.4%	86.67%~91.48%

## 2.3 低温连续相变萃取酱油糟油脂理化指标分析

表 3 低温连续相变萃取酱油糟油脂理化指标分析

Table 3 Physicochemical indexes of soy sauce residue oil with continuous phase transition extraction at low temperature

	水分/%	酸值/(mg KOH/g)	过氧化值/(mmol/kg)	皂化值/(g/100 g)	碘值/(g/100 g)
酱油糟萃取油	0.12±0.02	123.00±0.16	0.83±0.01	193.06±0.26	138.93±0.15
四级豆油标准	≤0.2	≤3.0	≤6.0	189~195	124~139

参照国标检测方法对低温连续相变萃取出来的酱油糟油脂进行水分、酸值、过氧化值、皂化值和碘值的测定，结果如表 3。通过对比四级豆油中相关指标的国标范围，可以看出利用低温连续相变萃取出来的酱油糟油脂中过氧化值、皂化值和碘值这几个指标都在国标范围上，主要存在的问题是油脂的酸值严重超标，因此不能直接作为食用油。根据其酸值可以算出，酱油糟萃取油中游离脂肪酸含量达 61.50%，该油脂完全可以直接用于合成甘油二酯的原料。

程中两者的变化、以及利用 TLC 对比不同甘油酯组分的含量变化，从而验证该酶的催化酯化合成甘油二酯的效果，结果如图 1 和 2 所示。

## 2.4 自制固定化脂肪酶 OOS 催化酱油糟油合成甘油二酯专一性验证

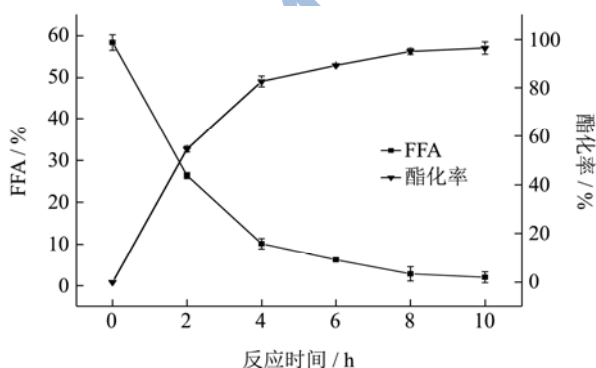


图 1 反应时间对固定化脂肪酶 OOS 催化酱油糟油脂酯化反应的影响

Fig.1 Effect of time on esterification reaction catalyzed by immobilized lipase OOS

以油样中游离脂肪酸含量、酯化率为指标，通过检测加入自制固定化脂肪酶 HM IM 催化酯化反应过

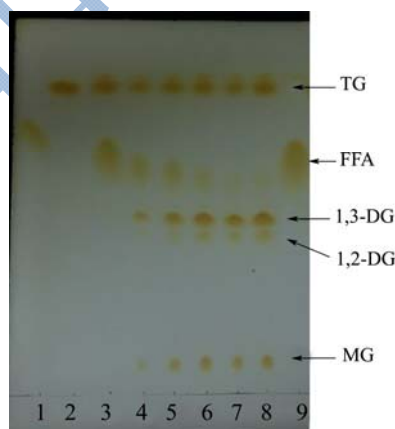


图 2 酯化反应油脂中甘油酯 TLC 分析图

Fig.2 TLC analysis diagram of glyceride in deacidified oil

注：其中点 1 和 9-油酸样品；2-甘油三酯样；3~8 依次为反应 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h 和 7 h 的油样。

由图 1 可知，随着反应时间的增加，酱油糟萃取油脂中游离脂肪酸 (FFA) 含量逐渐减少，酯化率逐渐增大；通过 TLC 分析可以看出，酱油糟中萃取油脂主要是游离脂肪酸 (FFA) 和甘油三酯 (TG) 组成，在固定化脂肪酶 HM IM 催化酯化反应过程中，油中的游离脂肪酸含量逐渐减少，甘油三酯 (TG) 含量变化不大，甘油一酯 (MG)、甘油二酯 (DG) 含量逐渐增加，其中以 1,3-DG 含量增加最多。由此可以说明自制的固定化脂肪酶 HM IM 具有良好的 Sn-1,3 位专一性，且反应后的 1,3-DG 含量与酯化率呈正相关。

## 2.5 固定化酶 OOS 催化酱油糟萃取油脂合成

### 甘油二酯条件优化

#### 2.5.1 酶添加量对酯化反应的影响

在甘油添加量为形成甘油二酯理论值，温度 65 °C，真空度 0.098 MPa 下搅拌反应，考察不同酶添加量对酯化反应的影响，结果如下图所示。

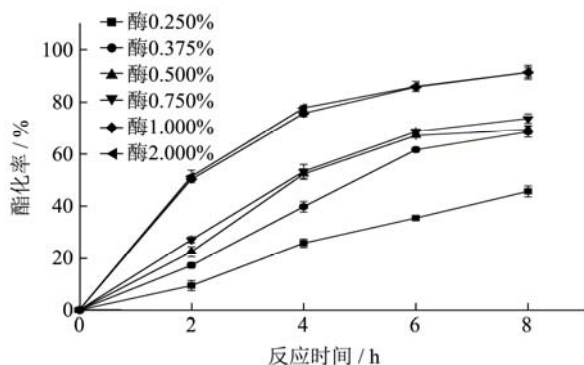


图3 酶添加量对酯化反应的影响

Fig.3 Effect of enzyme addition on esterification reaction

由图3可以看出，脂肪酶的添加量对酯化反应影响较大。随着脂肪酶添加量的增加，酯化反应的反应速率逐渐加快，且整个反应过程中前4h脱酸速度较快，之后由于反应底物减少、生成物增多抑制酯化反应进程，从而酯化反速率应逐渐减缓。其中酶添加量在1%时的脱酸曲线与2%添加量时的酯化反应曲线几乎重合，反应8h后，两者的酯化率分别达到91.29%和91.35%，说明当酶添加量达到1%时，继续增加酶量对酯化速率影响不大。从反应速率和使用成本上考虑，选用1%的脂肪酶添加量进行后期实验。

#### 2.5.2 甘油添加量对酯化反应的影响

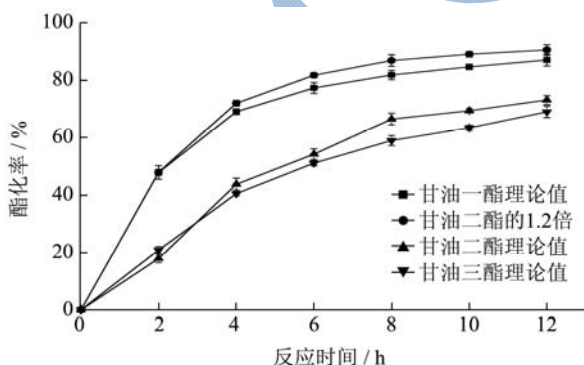


图4 甘油添加量对酯化反应的影响

Fig.4 Effect glycerol addition on esterification reaction

以游离脂肪酸反应形成甘油一酯、二酯和三酯所需的甘油理论计算值，对比四种情况下不同甘油添加量酶法脱酸效果。结果如图4所示，由图4可知，随着甘油添加量的增加，固定化脂肪酶 HM IM 催化酯

化合成甘油酯的速率先逐渐增快，这与徐杨、Yomi Watanabe 等人<sup>[20]</sup>的研究结果相同，其中在油脂中游离脂肪酸理论形成甘油二酯的1.2倍时酯化效果最佳；当甘油量增加到形成甘油一酯理论值时，其酯化速率反而有些许降低，可能是甘油添加过多改变了体系的黏度，传质受阻，同时过多的甘油会吸附在酶表面<sup>[21]</sup>，从而影响固定化脂肪酶 HM IM 的活性。因此，固定化脂肪酶 HM IM 催化酱油糟油脂酯化的最佳甘油添加量为油脂中游离脂肪酸理论形成甘油二酯的1.2倍。

#### 2.5.3 反应温度对酯化反应的影响

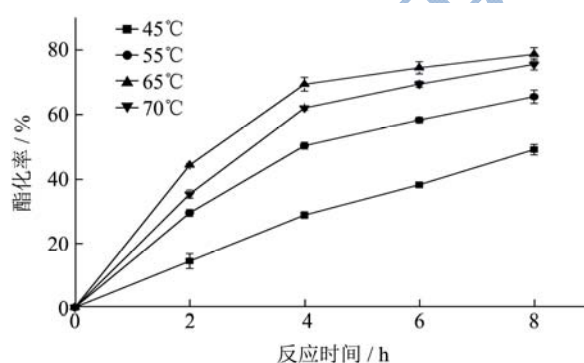


图5 反应温度对酯化反应的影响

Fig.5 Effect of reaction temperature on esterification reaction

通过对比自制固定化脂肪酶 HM IM 分别在 45 °C、55 °C、65 °C 和 70 °C 四个不同温度下酯化效果，由图5可知，在 65 °C 以下时，相同时间内，随着温度升高，反应体系中生成的水更容易脱除，酯化速率随温度升高而增大。65 °C 反应 8 h 后酯化率达 78.44%；当温度升至 70 °C 时酯化率下降到 75.37%，这可能是酶在高温下发生部分失活，从而使其酯化率降低。因此，选择 65 °C 为固定化脂肪酶 HM IM 催化酱油糟油脂酯化合成甘油二酯的最适温度。

#### 2.5.4 搅拌速度对酯化反应的影响

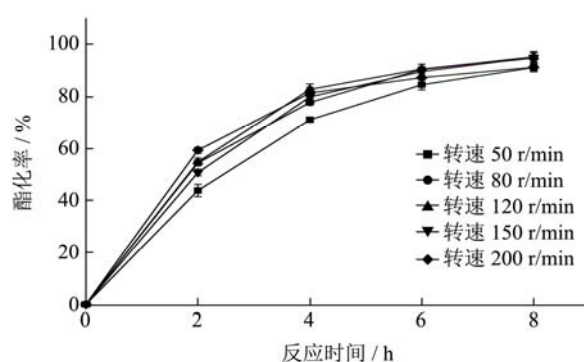


图6 搅拌速度对酯化反应的影响

Fig.6 Effect of stirring rate on esterification reaction

在甘油添加量为形成甘油二酯理论值的1.2倍，温度 65 °C，真空度 0.098 MPa 下，酶添加量为 1% 条件下，考察不同搅拌速度对酯化反应的影响，结果如

图6所示。

由图6可知,酯化反应的速度随搅拌速度的增加呈先逐渐增加后降低的趋势。转速在50~120 r/min时,搅拌速度的增大,加快了底物与酶之间的作用面积,从而加快酯化速率;当转速在120~200 r/min时,搅拌太剧烈会导致固定化酶发生破碎,从而酶活性降低。因此,反应体系搅拌速度控制在120 r/min效果最佳,8 h后酯化率达93.70%。

### 2.5.5 金属离子对酯化反应的影响

前人研究表明,目前已知的酶中约有三分之一以上的酶需要有金属离子的存在才能充分表现其催化活性。基于此,取一定量固定化酶,用2 mmol/L的不同金属离子溶液(Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>)处理后,在相同的条件下,研究了七种不同金属离子对自制固定化脂肪酶活性的影响。结果如图7所示。

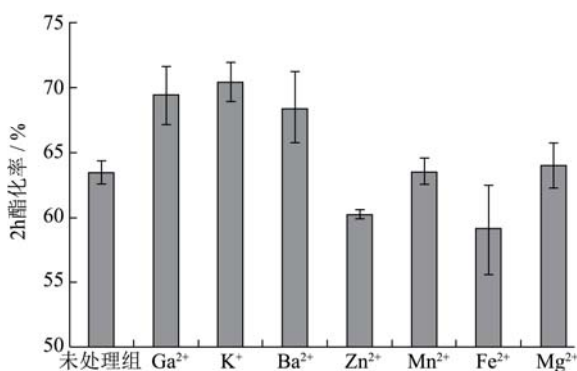


图7 不同金属离子对固定化酶OOS酯化率的影响

Fig.7 Effects of different metal ions on esterification rate of the immobilized enzyme OOS

通过对比添加不同金属离子溶液处理前后固定化酶的酯化率可以发现,在2 mmol/L浓度下,金属离子对固定化酶活力的影响可以分为两种类型:(1)激活作用:Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Ba<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>表现出激活作用,其中以K<sup>+</sup>激活作用最佳,其处理后酯化率从63.45%增加到70.35%;(2)抑制作用:Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和Fe<sup>2+</sup>表现出抑制作用,其中以Fe<sup>2+</sup>抑制作用最强。因此,可以通过对固定化酶用2 mmol/L的Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>进行处理,从而加快酶催化酱油糟油脂酯化脱酸的速度。

### 2.5.6 不同辅助脱水处理对酯化反应的影响

脂肪酶催化FFA和甘油的酯化反应是一个可逆反应,当反应进行到一定程度时反应底物逐渐减少、生成物的量逐渐增加,从而抑制反应进行,达到一种动态平衡。如果想打破这个平衡,可以通过不断将酯化反应生成的水从系统中除去,使得反应一直向酯化

反应方向进行,从而得到更好的酯化合成甘油酯效果。因此,本研究尝试了抽真空、添加分子筛及通氮气等几种不同处理,对比其对自制固定化脂肪酶HMIM催化合成甘油酯的影响,结果如图8所示。

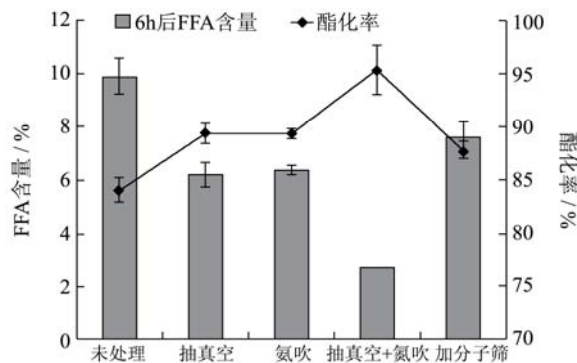


图8 不同辅助脱水处理对酯化反应的影响

Fig.8 Effect of different auxiliary-dehydration treatment on esterification reaction

从上图可知,与未处理组对比,通过对反应体系增加抽真空、氮吹、加分子筛都可以起到促进酯化反应的进行。其中抽真空和氮吹两者单独作用促进效果相当,可以使反应的酯化率提高5%;两者结合在一起边抽真空边通氮气时,两者发生协同作用,酯化效果更佳,相对于未处理组酯化率增加10%左右。添加分子筛也可通过吸附反应生成的水,从而提高反应的酯化率,但是使用后回收时容易造成固定化酶的损失。因此,选择边抽真空、边通氮气的方式进行反应过程中辅助脱水、提高酯化率。

## 2.6 酶法催化酯化反应产物分析

### 2.6.1 GC-MS分析油脂的脂肪酸组成

利用气相色谱质谱联用对酯化反应前后油脂的脂肪酸组成进行测定,得到的GC-MS图谱如图9所示。

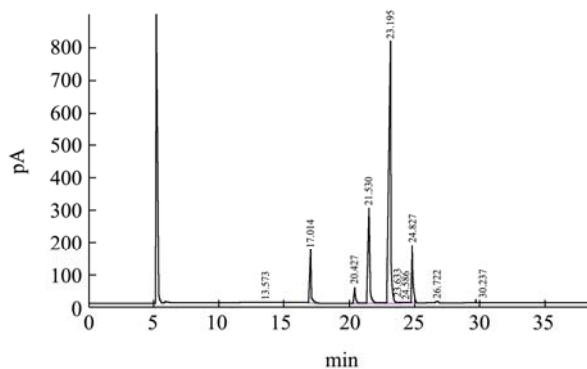


图9 酱油糟萃取油脂的脂肪酸气质图

Fig.9 GC-MS chromatogram of fatty acid in soy sauce residues oil

表 4 酱油糟萃取油、酯化反应合成甘油二酯油的脂肪酸组成对比

Table 4 Comparison of fatty acid composition before and after esterification reaction in soy sauce residues oil

脂肪酸组成	酱油糟萃取油脂/%	甘油二酯油/%	P 值	大豆油国标/%
肉豆蔻酸 (C14:0)	0.08±0.01	0.07%±0.02	0.561	ND~0.2
棕榈酸 (C16:0)	8.17%±0.01	13.39%±0.44	0.116	8.00%~13.50
硬脂酸 (C18:0)	2.80%±0.01	4.12%±0.14	0.121	2.50%~5.40
油酸 (C18:1)	19.49%±0.01	18.77%±0.13	0.076	17.70%~28.00
亚油酸 (C18:2)	58.76%±0.01	53.77%±0.46	0.106	49.80%~59.00
亚麻酸 (C18:3)	9.61%±0.03	8.58%±0.05	0.477	5.00%~11.00
花生酸 (C20:0)	0.35%±0.03	0.31%±0.03	0.133	0.10%~0.60

从图 9 可知, 甲酯化后的脂肪酸分离效果较优, 峰形良好。结合质谱数据库分析, 酱油糟油脂主要含有 7 种脂肪酸, 匹配相似度高, 均在 95% 以上。结果如表 4 所示。对比发现, 酯化反应前后油脂的脂肪酸组成总体上较接近, 含量均在大豆油国标范围中; 酯化后油中棕榈酸、硬脂酸含量有所升高, 亚油酸相对降低, 但是并无统计学差异 ( $p>0.05$ )。因此, 说明, 固定化酶 HM IM 催化酯化合成甘油二酯不会改变油脂的脂肪酸组成。

### 2.6.2 GC-MS 分析酯化反应后油脂中甘油酯含量

将酯化反应后的油样点样在 10×20 cm 的硅胶板 (用前在 110 °C 活化 1 h), 然后再层析缸中层析分离, 展开剂为: 正己烷/乙醚/冰乙酸=45:25:1, 分离结束后用碘蒸汽进行显色后, 将硅胶板上各甘油酯的谱带刮下, 然后在甘油一酯、甘油二酯和甘油三酯中加入相

同量的内标物癸酸, 甲酯化后用 GC-MS 进行分析。

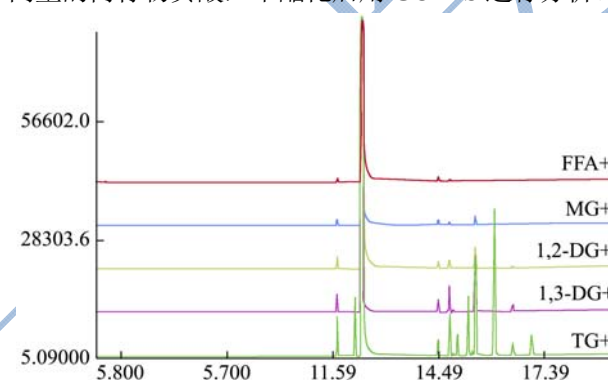


图 10 酯化油脂中甘油酯各组分+癸酸 (内标) GC-MS 分析色谱图

Fig.10 GC-MS analysis chromatogram of each glyceride component and caprylic acid (internal standard) in deacidified oil

表 5 酯化后油中甘油酯各组分含量分析表

Table 5 Content of each glyceride component in deacidified oil

出峰时间/min	对应物质	峰面积				
		TG+内标	FFA+内标	1,3-DG+内标	1,2-DG+内标	MG+内标
11.730	棕榈酸 (甲酯)	141136	6741	62785	47407	18384
12.211	棕榈酸 (乙酯)	238836	-	-	-	-
12.430	癸酸 (内标)	8344857	3666673	2983944	11438201	5122146
14.499	硬脂酸 (甲酯)	73318	8127	48556	26995	21559
14.805	油酸 (甲酯)	182574	-	114839	37641	5288
15.017	硬脂酸 (乙酯)	90731	-	-	-	-
15.313	油酸 (乙酯)	276709	-	-	-	-
15.522	亚油酸 (甲酯)	458949	-	245885	95299	41148
16.038	油酸 (乙酯)	281739	-	-	-	-
16.542	亚麻酸 (甲酯)	23279	-	-	-	-
17.054	亚麻酸 (乙酯)	38327	-	-	-	-
	相对内标含量	0.072124	0.004055	0.079101	0.009064	0.016864
	油样中相对含量	39.80%	2.24%	43.65%	5.00%	9.31%

注: “-”代表未检出。

按照 1.2.4 中的甘油酯含量计算公式进行计算, 结果如图 10 和表 5 所示。固定化脂肪酶 HM IM 催化酱油糟萃取油 (游离脂肪酸含量 61.50%, 甘油三酯 38.50%) 酯化反应 10 h 后, 酯化率达 96.36%, 反应后油脂中含有 2.24% 游离脂肪酸、甘油二酯含量为 48.65% (43.65% 的 1,3-DG、5.00% 的 1,2-DG)、9.31% 的甘油一酯、39.80% 的甘油三酯。

### 3 结论

3.1 海天酱油糟中油脂含量达 33.23%±0.38% 的油脂, 利用低温连续相变提取率可达 96.60%~99.31%, 萃取出的油脂游离脂肪酸含量达 61.50%, 酸值过高不能直接使用。

3.2 酶添加量、甘油添加量、反应温度、反应时间、搅拌速度以及反应体系辅助脱水方法都对自制固定化脂肪酶 HM IM 催化酱油糟油脂酯化合成甘油二酯有影响。当甘油添加量=游离脂肪酸理论形成甘油二酯的 1.2 倍、反应温度 65 °C、脂肪酶的添加量为 1%、搅拌速度为 120 r/min, 反应过程中边抽真空边通氮气时, 酯化反应速率最快。另外, 不同的金属离子对固定化脂肪酶 HM IM 有不同的影响: 在 2 mmol/L 浓度时  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  表现出激活作用, 其中以  $\text{K}^{+}$  激活作用最佳 (2 h 酯化率可达到 70.35%);  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  表现出抑制作用, 其中以  $\text{Fe}^{2+}$  抑制作用最强。

3.3 通过对酯化反应后产物分析, 发现自制固定化脂肪酶 HM IM 催化酱油糟油脂酯化合成甘油二酯时不会改变油脂的脂肪酸组成, 反应前后酱油糟油脂脂肪酸组成均在大豆油国标范围内; 自制固定化脂肪酶 HM IM 具有良好的 Sn-1,3 位专一性, 催化酱油糟油脂 (含 FFA 61.50%, 甘油三酯 38.50%) 酯化反应 10 h 后, 酯化率达 96.36%, 合成产物中含有 2.24% 游离脂肪酸 (FFA)、39.80% 甘油三酯 (TG)、43.65% 的 1,3-甘油二酯 (1,3-DG)、5.00% 的 1,2-甘油二酯 (1,2-DG)、9.31% 的甘油一酯 (MG)。不仅达到降低酱油糟油脂的酸值, 而且利用其合成富含甘油二酯的油脂, 为其再利用提供了新思路。

### 参考文献

- [1] 巩欣,程永强,纪凤娣,等.酱油渣的再利用研究进展[J].食品工业科技,2013,34(5):384-387  
GONG Xin, CHENG Yong-qiang, JI Feng-di, et al. Research progress in the comprehensive utilization of soy sauce residue [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(5): 384-387
- [2] 卜春文.酱油渣的生物技术开发利用[J].饲料研究,2001,22(12):49-50  
BU Chun-wen. The biotechnology development and utilization of soy sauce residue [J]. Feed Research, 2001, 22(12): 49-50
- [3] ZHAO Li-chao, ZHANG Yong, HE Li-ping, et al. Soy Sauce residue oil extracted by a novel continuous phase transition extraction under low temperature and its refining process [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(14): 3230-3235
- [4] 阎杰,宋光泉.值得开发的“废物”-酱油渣[J].中国调味品, 2006,10:14-17  
YAN Jie, SONG Guang-quan. Soy sauce residue-a kind of industrial garbage being worth studying [J]. China Condiment, 2006, 10: 14-17
- [5] 杨莹莹,姚舜,万海清,等.酱油渣中油脂提取工艺的研究及其脂肪酸成分分析[J].中国酿造,2011,30(11):174-177  
YANG Ying-ying, YAO Shun, WAN Hai-qing, et al. Fat extraction from soy sauce residues and fatty acids composition analysis [J]. China Brewing, 2011, 30(11): 174-177
- [6] 钟振声,王亚丽,齐玉堂,等.酱油渣中油脂的提取及其质量指标分析[J].中国油脂,2006,31(11):21-23  
ZHONG Zhen-sheng, WANG Ya-li, QI Yu-tang, et al. Analysis on the extraction of oil from soy sauce residue and its quality index [J]. China Grease, 2006, 31(11): 21-23
- [7] 刘志伟,况伟,杨钦阶,等.酱油渣中提取油脂和黄酮[J].嘉应学院学报,2012,30(11):66-70  
LIU Zhi-wei, KUANG Wei, YANG Qin-jie, et al. Extraction of oil and flavonoids from soy sauce residue [J]. Journal of Jiaying University, 2012, 30(11): 66-70
- [8] 李脉,张松涛,杨继国,等.酱油渣中油脂的亚临界流体提取及酶法脱酸的研究[J].农业机械,2011,20:52-55  
LI Mai, ZHANG Song-tao, YANG Ji-guo, et al. Study on subcritical fluid extraction and enzymatic deacidification of oil in soy sauce [J]. Farm Machinery, 2011, 20: 52-55
- [9] Flickinger B D, Noboru M. Nutritional characteristics of DAG oil [J]. Lipids, 2003, 38(2): 129-132
- [10] Osamu M, Yasushi T, Jeannie B K, et al. Safety assessment of heated diacylglycerol oil: sub-chronic toxicity study in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(8): 2748-2757
- [11] Yasukawa T. Nutritional functions of dietary diacylglycerols [J]. Journal of Oleo Science, 2001, 50(5): 427-432
- [12] 董攀,李鑫,李丹丹,等.响应曲面法优化 Lipozyme TL IM 催化大豆油制备 1,3-甘油二酯[J].食品工业科技,2013,34(7):



- 190-194,198
- DONG Pan, LI Xin, LI Dan-dan, et al. Optimization of production condition of diacylglycerol from soybean oil hydrolyzed by lipozyme TL IM by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(7): 190-194, 198
- [13] 邹冬芽.甘油二酯的酶法制备及其功能性研究[D].无锡:江南大学,2004
- ZHOU Dong-ya. Study on enzymatic preparation and functional study of glyceride diester [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2004
- [14] 胡士恒.玉米油酶法合成甘油二酯研究[D].长春:吉林大学,2013
- HU Shi-heng. Study on enzymatic synthesis of diglycerides by corn oil [D]. Changchun: Jilin University, 2013
- [15] 刘小如,张超,胡蒋宁,等.酶催化茶油合成甘油二酯工艺及脂肪酸变化[J].食品科学,2013,34(2):36-41
- LIU Xiao-ru, ZHANG Chao, HU Jiang-ning, et al. Lipase-catalyzed synthesis of diacylglycerol from camellia oil and fatty acid profile change [J]. Food Science, 2013, 34(2): 36-41
- [16] 曹庸.一种连续相变萃取酱油渣油脂的方法:中国,CN103173280A [P] 2013-06-26
- CAO Yong. A continuous phase transition extraction method of soy sauce residue oil: China, CN103173280A [P] 2013-06-26
- [17] FUCHS Beate, SÜSS Rosmarie, TEUBER Kristin, et al. Lipid analysis by thin-layer chromatography-a review of the current state [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(19): 2754-2774
- [18] 鲍方宇,张敏.薄层色谱法测定油脂中甘油三酯含量[J].食品科学,2013,34(4):125-128
- BAO Fang-yu, ZHANG Min. Determination of triglyceride content in oils and fats by thin layer chromatography [J]. Food Science, 2013, 4(34): 125-128
- [19] 韩抒.高酸值米糠油酯化脱酸工艺的研究[D].合肥:合肥工业大学,2009
- HAN Shu. Esterifical refine technics of high acid value of rice bran oil [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2009
- [20] Yomi W, Yoshie Y, Toshihoro N, et al. Production of mono-acylglycerol of conjugated linoleic acid by esterification followed by dehydration at low temperature using *Penicillium camembertii* lipase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 27: 249-254
- [21] 胡隼,王芳,谭天伟.固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶催化合成甘油二酯[J].北京化工大学学报(自然科学版),2007,34(2): 196-199,210
- HU Sun, WANG Fang, TAN Tian-wei. Synthesis of diglycerides by enzymatic esterification using immobilized lipase from *Candida* sp.99-125 in a solvent-free system [J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2007, 34(2): 196-199, 210