

大孔树脂负载南极假丝酵母脂肪酶 B 催化 甘油解和酯化反应制备甘油二酯

魏凌枫, 钟南京*

(广东药科大学食品科学学院, 中山 528458)

摘要: **目的** 采用 3 种大孔树脂(DA-201、ADS-17、DM-301)对南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB)进行固定化, 研究固定化脂肪酶催化甘油解和酯化反应制备甘油二酯(diacylglycerols, DAG)。**方法** 以大孔树脂为载体, 采用吸附法制备固定化脂肪酶; 通过单因素实验对固定化酶催化甘油解和酯化反应制备 DAG 的反应条件进行优化。**结果** CALB@DA-201 催化甘油解反应制备 DAG 的效率最高, 当反应温度为 70°C, 甘油解反应 24 h 后产物中的 DAG 含量最高为 64.52%; CALB@DM-301 催化酯化反应制备 DAG 的效率最高, 当反应温度为 80°C, 酯化反应 24 h 后产物中 DAG 含量高达 72.06%。此外, CALB@ADS-17 催化酯化反应具有选择性合成甘油三酯(triacylglycerols, TAG)的特性, TAG 含量可达 89.74%。**结论** 大孔树脂负载的 CALB 能够有效催化甘油解和酯化反应, 并获得可观含量的 DAG, 具有较好的应用前景。

关键词: 甘油解; 脂肪酶; 甘油二酯; 大孔树脂; 酯化反应

Preparation of diacylglycerols from glycerolysis and esterification reaction catalyzed by macroporous resins supported *Candida antarctica* lipase B

WEI Ling-Feng, ZHONG Nan-Jing*

(School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of immobilized lipases *Candida antarctica* lipase B (CALB) immobilized onto the 3 kinds of macroporous resins (DA-201, ADS-17 and DM-301) on the diacylglycerols (DAG) preparation through glycerolysis and esterification. **Methods** The immobilized lipase was prepared by adsorption method using macroporous resin as the carrier. The reaction conditions for the preparation of DAG from glycerolysis and esterification catalyzed by immobilized enzyme were optimized by single factor experiment. **Results** Better glycerolysis performance was obtained from CALB@DA-201, and DAG content up to 64.52% could be obtained after 24 h reaction at 70°C. On the other hand, better esterification performance was observed from CALB@DM-301, and DAG content at 72.06% was obtained after 24 h reaction at 80°C. Additionally, CALB@ADS-17 showed selectivity towards triacylglycerols (TAG) formation, and TAG content up to 89.74% was obtained. **Conclusion** The present macroporous resins supported CALB samples can efficiently catalyze the glycerolysis and esterification reactions, and considerable DAG content is obtained, which is potential in practical application.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772000)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31772000)

*通信作者: 钟南京, 博士, 副教授, 主要研究方向为油脂生物酶促改性。E-mail: adong473@163.com

*Corresponding author: ZHONG Nan-Jing, Ph.D, Associate Professor, School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China. E-mail: adong473@163.com

KEY WORDS: glycerolysis; lipase; diacylglycerols; macroporous resin; esterification

0 引言

甘油二酯(diacylglycerols, DAG)是油脂中的一种天然组分,但在常见的普通动植物油脂中含量较少,通常只有不到 10%。天然存在的 DAG 有两种形式,按照酰基与羟基结合位置的不同分为 1,3-DAG 和 1,2-DAG,其中 1,3-DAG 是主要成分^[1-2]。DAG 与普通油脂在风味、外观、口感等方面相似,能量值和消化率也相差不大;但两者代谢途径不同,DAG(尤其是 1,3-DAG)能够减少体内脂肪的堆积,可减轻体重、预防和治疗高血脂及相关代谢疾病^[3]。DAG 是公认安全的食品成分,可作为食品级乳化剂,被广泛应用于食品、医药、化妆品等领域^[4-6]。目前,DAG 主要采用化学催化或酶催化油脂甘油解、酯化和部分水解反应制备^[7-8]。化学法生产耗能大、专一性差、副反应多,且催化剂处理过程易造成环境污染^[9]。相对而言,酶法具有反应条件温和、选择性强、副产物少、过程绿色等优点;此外,通过酶的固定化技术可实现连续化和自动化操作,适宜规模化生产应用,是最有应用前景的生产工艺^[10-12]。

南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB)稳定性好、选择性强、催化效率高,被广泛应用于油脂改性领域^[13-15]。大孔树脂是一种具有较大孔径和比表面积的表面疏水载体,其理化性质稳定,可通过氢键和疏水作用力与酶分子结合,同时能维持脂肪酶在非水体系中发挥活性的微环境,显著提高其催化活性,是脂肪酶固定化的理想载体^[16-19]。尽管 CALB 的固定化已有不少的研究报道,然而稳定应用于产业化的固定化 CALB 目前仍以来自诺维信的 Novozym 435 为主。由于其技术的垄断,Novozym 435 的价格居高不下(1.2~1.5 万元/kg),限制了其在工业化的普及。本研究以大孔树脂为载体,负载 CALB 在无溶剂的条件下通过甘油解和酯化反应制备 DAG,考察大孔树脂固定化酶在不同温度和时间下对甘油解和酯化反应的影响,旨在为工业化生产 DAG 提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

CALB[酶活 3533.3 U/mL 酶液,诺维信(北京)有限公司];大孔树脂 ADS-17、DA-201、DM-301(天津浩聚科技有限公司);金龙鱼精炼一级大豆油(食品级,益海嘉里食品营销有限公司)。

十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、甘油、乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氢氧化钠(分析纯,广州化学试剂厂);三丁酸甘油酯[纯度 97.0%,Sigma-Aldrich(中国上海)贸易有限公司];乙腈、正己烷、

异丙醇(色谱纯,德国 Merck 公司)。

1.2 仪器与设备

RCT 加热磁力搅拌器(德国 IKA 公司);PHSJ-4A pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);DZF-6050 真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);BSA-224S-W 万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];Purospher® STAR RP-18e 反相 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 德国 MERCK 公司);LC-2010AHT 高效液相色谱仪、ELSD-LTII 蒸发光散射检测器(日本岛津公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大孔树脂的活化

称取 30 g 大孔树脂在烧杯中,加入 95%乙醇淹没大孔树脂即可。密封避光静止浸泡 24 h,抽滤浸泡液并用超纯水冲洗至无乙醇气味。之后依次使用 5%盐酸溶液和 5%氢氧化钠溶液淹没即可,密封避光静止浸泡 4 h,然后抽滤并用超纯水冲洗至中性(pH=7.0)。最后用磷酸缓冲溶液(pH=7.0)淹没即可,密封避光静止浸泡 2 h,抽滤至滤液与原磷酸缓冲液 pH 相同,密封存放冰箱待用。

1.3.2 大孔树脂负载 CALB

加入 50 mL、pH 7.0 的磷酸缓冲液(25 mmol/L)、CALB、0.5 g 已活化的大孔树脂,于 25℃恒温振荡器搅拌 4 h,之后抽滤得到固定化酶,在 30℃下真空干燥 6 h,密封,储藏在 4℃冰箱待用^[20]。

1.3.3 酶活测定

通过三丁酸甘油酯的水解反应来测定脂肪酶活性^[21]。将 1.0 mL 的三丁酸甘油酯加入到 50 mL 的磷酸盐缓冲液(25 mmol/L, pH 7.0)中,10 mg 的固定化酶,在 40℃、500 r/min 下搅拌 15 min,加入乙醇终止反应,用 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定(指示剂为酚酞)至反应终点,记录所消耗 NaOH 溶液体积。空白实验在不添加脂肪酶的条件进行相同的步骤。所有实验均进行 3 次。脂肪酶的一个酶活单位(U)定义为:在测定条件下每分钟水解三丁酸甘油酯产生 1.0 μmol 丁酸所需要的脂肪酶的量,其计算公式如式(1):

$$U = \frac{(V - V_0) \times N \times 1000}{T \times M} \quad (1)$$

其中, V 为添加脂肪酶后所消耗的 NaOH 溶液体积(mL); V_0 为空白对照消耗的 NaOH 溶液的体积(mL); N 为 NaOH 溶液的浓度(mol/L); T 为反应时间(min); M 为脂肪酶的用量(g)。

1.3.4 酸价的测定

采用 GB 5009.229—2016《食品安全国家标准 食品中酸价的测定》中的方法测定产物酸价。

1.3.5 固定化酶催化甘油解反应制备 DAG

将 0.184 g 甘油和 3.52 g 大豆油混合在反应瓶中,添

加 0.15 g 的固定化酶, 将反应瓶放入恒温油浴锅中充氮气保护并以 200 r/min 磁力搅拌进行催化反应。反应结束后, 将反应产物取出, 高温灭酶处理后 4°C 储存备用。每一组实验做两个平行。

1.3.6 固定化酶催化(油酸和甘油)酯化反应

将 0.005 mol 甘油和 0.015 mol 油酸混合在反应瓶中, 添加 0.2 g 的固定化酶, 将反应瓶放入恒温油浴锅中并以 200 r/min 磁力搅拌, 同时通入氮气。反应结束后, 将反应产物取出, 高温灭酶处理后 4°C 储存备用。每一组实验做两个平行。

1.3.7 反相高效液相色谱法检测甘油酯组成

检测分析前, 先取 20 μL 样品溶于 4 mL 流动相中, 用 0.45 μm 滤膜过滤后再装入色谱瓶, 等待液相色谱分析。根据本课题组之前建立的反相高效液相色谱法(reversed phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)测定样品的甘油酯组成^[22], 采用等度洗脱, 流动相为乙腈:正己烷:异丙醇(27:8:10, V:V:V), 柱温为 40°C, 进样体积为 10 μL , 洗脱流速为 1.0 mL/min。色谱柱为反相 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)检测条件: 漂移管温度为 35°C, 氮气通气气压为 350 KPa。甘油酯组分的定性和定量采用课题组之前建立的方法^[23]。

1.4 数据处理

采用 EXCEL 2021 整理实验数据, 采用 Origin 2021 作图。实验数据采用 SPSS 13.0 进行分析, 结果以“平均值±标准偏差”表示, 显著性水平 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂负载 CALB

对于不同的大孔树脂, 其制备的固定化酶酶活会有一些差异, 这可能由于大孔树脂的孔径、比表面积和极性的不同所导致的^[24-25]。本研究采用的 3 种大孔树脂均为大孔吸附树脂, 其物化性质如表 1 所示。

表 1 3 种大孔吸附树脂的物化性质

Table 1 Physical properties of 3 kinds of macroporous resins

大孔吸附树脂	极性	比表面积 (m^2/g)	平均孔径 (nm)	孔隙率 (%)
DA-201	极性	≥ 200	10~13	48~52
DM-301	中极性	≥ 330	14~17	42~46
ADS-17	中极性	90~150	25~30*	40~50

注: *表示大孔树脂孔径大小差异显著($P<0.05$)。

图 1 是酶液浓度对大孔树脂负载 CALB 酶活力的影响。固定化酶的活性随着酶蛋白浓度的增加而增大, 当酶蛋白浓度达到一定值时, 酶活有一定的下降趋势。选择合适的酶蛋白浓度不仅可以维持最大的固定化酶酶活, 而且

在工业化生产 DAG 时减少酶的使用, 从而降低成本。研究发现, 随酶浓度增大, ADS-17 固定 CALB 的酶活增长较为明显($P<0.05$), 其中 ADS-17 固定 CALB 的最适酶液浓度及其酶活分别为 90 mg/mL 和 1933.33 U/g; 而 DA-201 和 DM-301 固定 CALB 的酶活随酶浓度增大变化不明显, 且酶活相对较低, 最适酶液浓度及其酶活分别为 60 mg/mL 和 733.33 U/g 以及 30 mg/mL 和 800 U/g。3 种大孔树脂固定 CALB 的酶活大小可能与其孔径及酶蛋白吸附量有关^[26]。

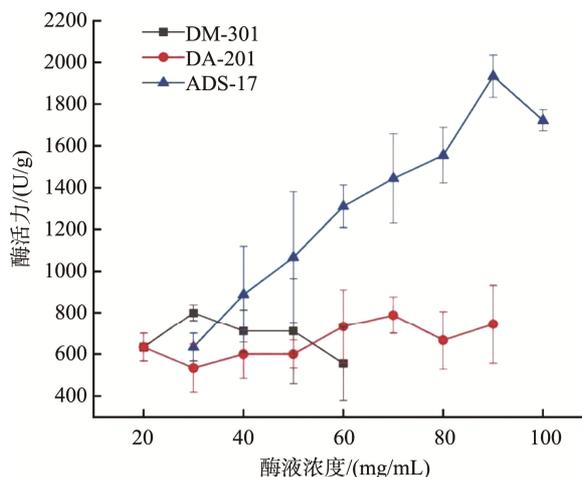


图 1 酶液浓度对大孔树脂负载 CALB 酶活力的影响

Fig.1 Effects of enzyme solution concentration on the activity of the macroporous resins supported CALB samples

2.2 固定化 CALB 催化甘油解反应的产物酸价

邵会等^[27]用硅酸钠催化制备 DAG 得到产物的酸价为 3.23 mg/g, 马传国等^[28]研究 Novozyme 435 催化高酸价米糠油和甘油得到产物的酸价为 3.3 mg/g。本研究采用 3 种固定化酶在同一条件下催化甘油解反应, 并测得其产物的酸价。结果表明, 3 种大孔树脂负载 CALB 催化甘油解反应所得产物的酸价均较低, 其中 CALB@ADS-17 催化甘油解反应产物的酸价最低, 为 2.76 mg/g; 而 CALB@DA-201 和 CALB@DM-301 催化甘油解反应产物的酸价分别为 4.16 和 3.54 mg/g。

2.3 固定化 CALB 催化甘油解反应

温度是影响甘油解反应的一个重要因素, 在一定的温度范围内, 适宜的温度能减少底物的黏度, 提高溶解度, 有利于底物和酶相互作用^[29]。但是温度不能无限的增加, 否则会影响酶的活性, 甚至失活。

2.3.1 CALB@DA-201 催化甘油解反应

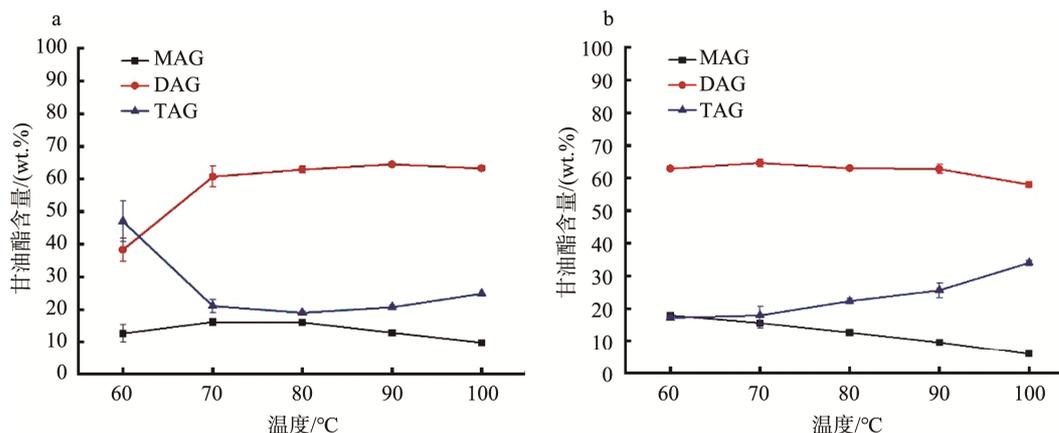
反应温度对 CALB@DA-201 催化甘油解反应的影响如图 2 所示, 由图 2a 可知, 在 60~70°C 范围内, DAG 含量随着温度升高而显著增加($P<0.05$), 随后缓慢增加直至 DAG 含量基本保持不变, 在 90°C 达到最高 64.40%。甘油一酯(monoacylglycerols, MAG)含量则先增加而后平稳再

下降的趋势。表明,在70°C反应12 h已基本接近平衡;随着温度进一步提高,MAG出现下降的原因是由于TAG转化率下降所致,而TAG转化率下降则可能是CALB@DA-201酶活下降引起的。由图2b可知,在60~90°C温度范围内,DAG含量基本保持不变,在70°C时DAG含量最高为64.52%,在90~100°C时DAG含量开始逐渐下降。MAG含量随着温度升高而降低,从17.92%降低至5.91%;相反,甘油三酯(triacylglycerols, TAG)含量则随着温度的升高而升高,从17.15%升高至33.96%,其原因是CALB@DA-201在长时间(24 h)高温下,酶失活而引起的。王卫飞^[30]在50°C条件下用Novozym 435催化甘油解反应24 h得到DAG含量为51.62%;而在相同的反应时间下,CALB@DA-201催化甘油解反应能得到更多的DAG。

2.3.2 CALB@DM-301 催化甘油解反应

反应温度对CALB@DM-301催化甘油解反应的影响如图3所示,由图3a可知,反应温度为60~80°C时,DAG

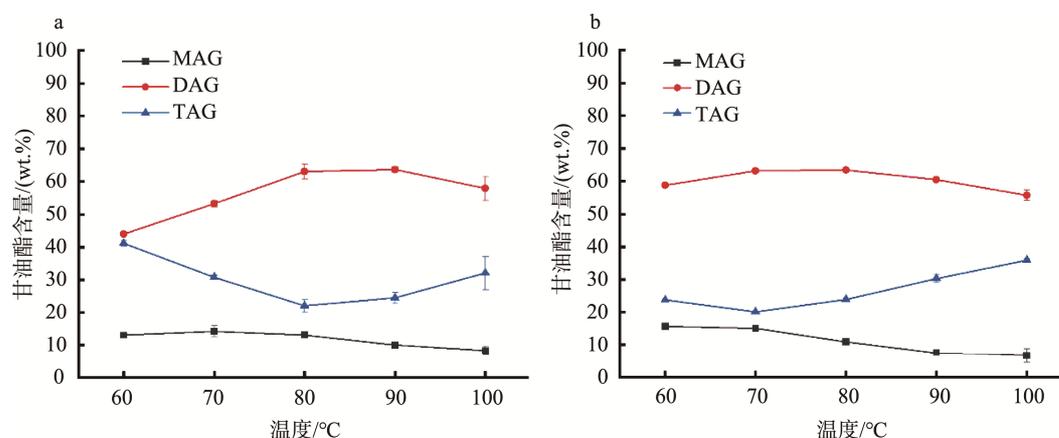
含量随着温度升高而显著增加($P<0.05$),随后DAG含量略有增长,在90°C达到最大为63.70%。TAG含量从80°C则呈现增加的趋势,表明CALB@DM-301甘油解的活性开始下降(TAG转化率降低),其原因与上述分析相同,是由于温度升高导致酶失活而引起。孙晓雪等^[31]以甘油和亚麻油为底物,并利用Lipozyme CALB催化甘油解反应得到产物中DAG含量为47.13%。由图3b可知,在60~80°C时,DAG含量随着温度升高而增加,在80~100°C时,DAG随着温度升高而下降,在80°C时,DAG含量最高达63.41%。MAG含量则随着温度的升高而下降,而在70~90°C下降明显,到达100°C时MAG含量最低为6.64%。MAG和DAG含量的降低,以及TAG含量的增加,都是由于固定化酶甘油解活性下降引起。由于长时间在较高温度下导致酶失活。研究表明:反应12 h时,温度从60°C升高至80°C时,DAG含量显著增加($P<0.05$);而在24 h时,温度影响并不显著,这可能是反应已经达到动态平衡导致的^[32]。



注: a: 12 h; b: 24 h。

图2 反应温度对CALB@DA-201催化甘油解反应的影响

Fig.2 Effects of reaction temperature on CALB@DA-201 catalyzed glycerolysis reaction



注: a: 12 h; b: 24 h。

图3 反应温度对CALB@DM-301催化甘油解反应的影响

Fig.3 Effects of reaction temperature on CALB@DM-301 catalyzed glycerolysis reaction

2.3.3 CALB@ADS-17 催化甘油解反应

反应温度对 CALB@ADS-17 催化甘油解反应的影响如图 4 所示, 由图 4 知, CALB@ADS-17 催化甘油解反应, 只有在 80~90°C 时表现出良好的催化效果, 在 90°C 反应 12 h 时 DAG 含量最高为 64.03%。在 60、70 和 100°C 反应时固定化酶部分黏附在反应瓶底部, 导致反应误差较大, 而在 80 和 90°C 则没有出现这种情况。在 80 和 90°C 反应 24 h 时, DAG 含量略有下降, 是因为长时间高温导致酶的活性降低。当反应 24 h 时, 无论是在 80°C 还是 90°C DAG 含量均出现下降; 但是在其他温度下的催化效果较差。该反应的误差较大, 是因为固定化酶在反应过程中载体会有部分脱落, 因此, 该固定化酶的稳定性不好。

2.4 大孔树脂固定化 CALB 催化酯化反应

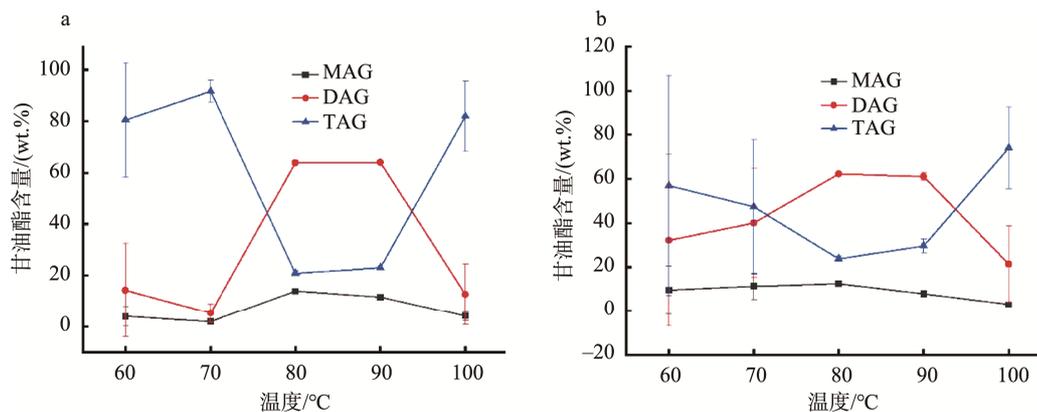
2.4.1 CALB@DA-201 催化酯化反应

反应时间对 CALB@DA-201 催化酯化反应的影响如图 5 所示, 由图 5a 得出, 当反应 12 h, 产物主要生成 DAG, 当反应时间增加至 24 h, TAG 含量上升, 而 DAG 含量有所下降, 当油酸几乎转化完全时, DAG 含量达 71.49%; 徐扬等^[33]的研究发现酯化反应 96 h 得到了 43.89% 的 DAG, 且

反应时间的延长对 MAG 影响不大, MAG 含量始终维持在 10% 以下。由图 5b 得出, TAG 含量随着时间的延长而升高, DAG 含量则随着时间的延长而下降。在反应 12 h 时 DAG 最高达到 43.96%, 而在 36 h, TAG 含量达 93.73%。该结果表明, CALB@DA-201 在 70°C 能选择性生产 DAG, 温度升高则有利于生成 TAG。该结果对于酯化选择性合成 DAG 或 TAG 具有重要的指导意义。

2.4.2 CALB@DM-301 催化酯化反应

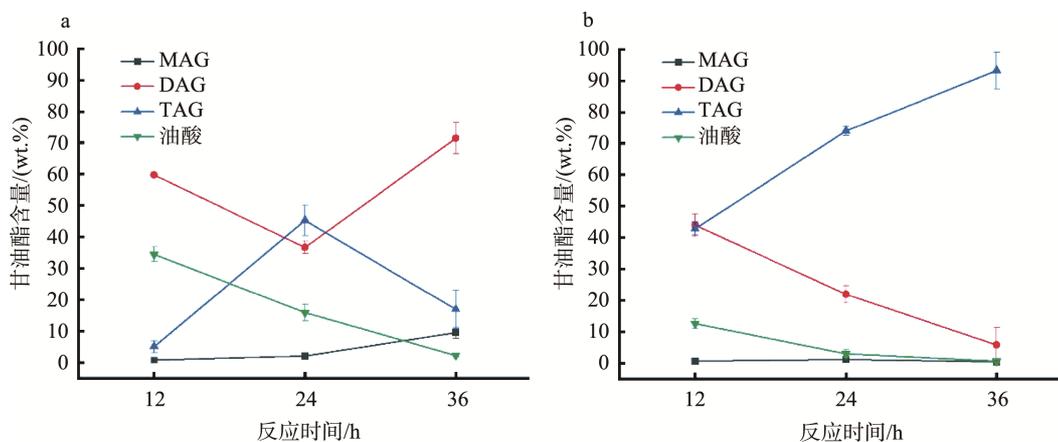
反应时间对 CALB@DM-301 催化酯化反应的影响如图 6 所示, 由图 6a 得出, 反应时间在 12~36 h 内, DAG 含量变化不大, 均维持在 60% 以上; 而 MAG 和 TAG 含量始终在 10% 以下; 反应时间增加对油酸的转化率影响不大, 这说明在 12 h 时反应已经达到动态平衡。由图 6b 得出, DAG 含量在反应 12~24 h 范围内随反应时间的延长而增加, 而继续延长至 36 h DAG 出现下降, 在 24 h 最高, 达到 72.06%, 此时酯化率最高达到 80.58%。随着反应时间增加, MAG 含量均在 1% 以下, 但 TAG 含量则随着时间的增加而升高。研究表明, CALB@DM-301 催化油酸的转化率相比较差, 但在 70°C 下 DAG 能始终保持在 60%, 具有很高的选择性。



注: a: 12 h; b: 24 h。

图 4 反应温度对 CALB@ADS-17 催化甘油解反应的影响

Fig.4 Effects of reaction temperature on CALB@ADS-17 catalyzed glycerolysis reaction



注: a: 70°C; b: 80°C。

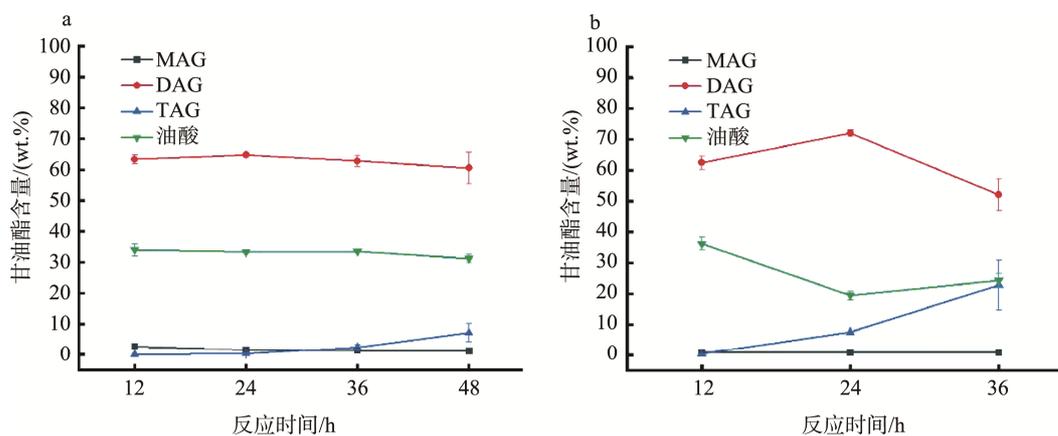
图 5 反应时间对 CALB@DA-201 催化酯化反应的影响

Fig.5 Effects of reaction time on CALB@DA-201 catalyzed esterification reaction

2.4.3 CALB@ADS-17 催化酯化反应

反应时间对 CALB@ADS-17 催化酯化反应的影响如图 7 所示, 由图 7a 得出, 反应 12 h 时, DAG 含量最高为 34.52%, 反应时间增加, DAG 含量下降, 随后趋于平缓, 而 TAG 含量随反应时间增加而增加, 在 24 h 时达到最高为 83.27%, 随着反应时间的增加, 各组分含量变化不大, 反应达到动态平衡。由图 7b 得出, 在反应 12 h

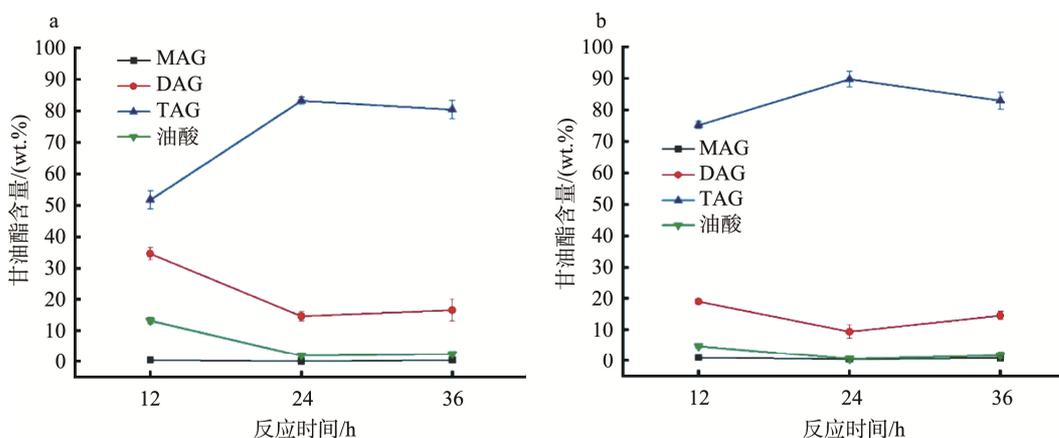
时, 油酸转化率达到 95.17%, 主要产物为 TAG。反应 24 h 时, TAG 含量达到最大 89.74%; DAG 含量始终保持在 20% 以下, MAG 含量保持在 1% 以下。该研究表明, CALB@ADS-17 催化酯化反应适合于 TAG 的制备, 具有选择性合成 TAG 的特性。因此, CALB@ADS-17 可在高酸值油脂的脱酸(比如米糠油、茶油等脱酸)领域具有潜在的应用前景。



注: a: 70°C; b: 80°C。

图 6 反应时间对 CALB@DM-301 催化酯化反应的影响

Fig.6 Effects of reaction time on CALB@DM-301 catalyzed esterification reaction



注: a: 70°C; b: 80°C。

图 7 反应时间对 CALB@ADS-17 催化酯化反应的影响

Fig.7 Effects of reaction time on CALB@ADS-17 catalyzed esterification reaction

3 讨论与结论

本研究探讨了 DA-201、DM-301、ADS-17 负载 CALB 过程中酶液浓度对固定化酶的酶活力的影响, 同时研究了温度和时间对其催化甘油解和酯化反应的影响。酶液浓度的增加能提高固定化酶的活力, 但增加至一定浓度时, 酶活达到平衡甚至下降。固定化脂肪酶在 80~90°C 下催化甘油解反应均能得到较高含量的 DAG。CALB@DM-301 催

化酯化反应适合于 DAG 的制备, 而 CALB@ADS-17 催化酯化反应则适合于 TAG 的制备。本研究将为酶法生产 DAG 和 TAG 提供了理论指导和技术支撑。

固定化酶的催化性能受载体性质和固定化条件的影响, 其中载体的性质是一个重要的影响因素。本课题组前期研究表明, 在离子液体修饰的 SBA-15 负载酶催化性质上, 适度极性的离子液体修饰 SBA-15 有助于其负载 CALB 酶催化甘油解选择性制备 DAG^[34]。此外, 对于既定

的一种载体, 其负载不同的脂肪酶, 所得固定化酶的催化性能也有很大的差异, 即不同的脂肪酶, 其载体所需的“适度极性”的修饰基团是不同的^[35]。另外, 对于同一种酶, 其催化不同的反应, 所体现的催化活性是不同的。本研究也表明, CALB@ADS-17 的酶活(水解甘油三酯酶活)是最高, 但是, 在催化甘油解制备 DAG 上, CALB@DA-201 则体现了更好的性能。

参考文献

- [1] TALBOT G. Reducing saturated fats in foods [M]. Oxford: Woodhead Publishing, 2011.
- [2] LEE WJ, ZHANG Z, LAI OM, *et al.* Diacylglycerol in food industry: Synthesis methods, functionalities, health benefits, potential risks and drawbacks [J]. Trends Food Sci Technol, 2020, 97: 114–125.
- [3] PHUAH ET, TANG TK, LEE YY, *et al.* Review on the current state of diacylglycerol production using enzymatic approach [J]. Food Bioprocess Technol, 2015, 8(6): 1169–1186.
- [4] LUBARY M, HOFLAND GW, HORST JH. A process for the production of a diacylglycerol-based milk fat analogue [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2010, 113(4): 459–468.
- [5] ZHANG Z, HUANG HH, XIANG M, *et al.* Production of diacylglycerols by esterification of oleic acid with glycerol catalyzed by diatomite loaded $\text{SO}_4^{2-}/\text{TiO}_2$ [J]. J Ind Eng Chem, 2017, 53: 307–316.
- [6] PALACIOS D, ORTEGA N, RUBIO-RODRIGUEZ N, *et al.* Lipase-catalyzed glycerolysis of anchovy oil in a solvent-free system: Simultaneous optimization of monoacylglycerol synthesis and end-product oxidative stability [J]. Food Chem, 2019, 271: 372–379.
- [7] SATRIANA, ARPI N, LUBIS YM, *et al.* Diacylglycerol-enriched oil production using chemical glycerolysis [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2016, 118(12): 1880–1890.
- [8] LO SK, TAN CP, LONG K, *et al.* Diacylglycerol oil-properties, processes and products: A review [J]. Food Bioprocess Technol, 2008, 1(3): 223–233.
- [9] ZHONG NJ, LI L, XU XB, *et al.* Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis [J]. Food Chem, 2010, 122(1): 228–232.
- [10] ZHENG PY, XU Y, WANG WF, *et al.* Production of diacylglycerol-mixture of regioisomers with high purity by two-step enzymatic reactions combined with molecular distillation [J]. J Am Oil Chem Soc, 2013, 91(2): 251–259.
- [11] REIS CLB, SOUSA EYA, SERPA JF, *et al.* Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities [J]. Quim Nova, 2019, 42(7): 768–783.
- [12] LEE YY, TANG TK, PHUAH ET, *et al.* Production, safety, health effects and applications of diacylglycerol functional oil in food systems: A review [J]. Crit Rev Food Sci, 2020, 60(15): 2509–2525.
- [13] IDRIS A, BUKHARI A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis [J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(3): 550–563.
- [14] NICHOLSON RA, MARANGONI AG. Lipase-catalyzed glycerolysis extended to the conversion of a variety of edible oils into structural fats [J]. Curr Res Food Sci, 2021, 4: 163–174.
- [15] WANG WF, LI T, NING ZX, *et al.* Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis [J]. Enzyme Microb Technol, 2011, 49(2): 192–196.
- [16] 李道明, 王卫飞, 蓝东明, 等. Lipozyme TL 100L 的固定化及其催化甘油解制备甘油二酯的研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(11): 36–39.
LI DM, WANG WF, LAN DM, *et al.* Immobilization of Lipozyme TL 100L and its application in synthesis of diglycerides by glycerolysis [J]. China Oils Fats, 2014, 39(11): 36–39.
- [17] CANTONE S, FERRARIO V, CORICI L, *et al.* Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42(15): 6262–6276.
- [18] BOLIVAR JM, NIDETZKY B. The microenvironment in immobilized enzymes: Methods of characterization and its role in determining enzyme performance [J]. Molecules, 2019, 24(19): 3460
- [19] XUE Y, ZHANG XG, LU ZP, *et al.* Enhancing the catalytic performance of *Candida antarctica* Lipase B by chemical modification with alkylated betaine ionic liquids [J]. Front Bioeng Biotech, 2022, 10: 850890.
- [20] 钟南京, 林少燕, 冯思婷, 等. 大孔树脂 NKA-9 负载 RML 催化高酸价油脂脱酸及制备甘油二酯[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 147–152.
ZHONG NJ, LIN SY, FENG ST, *et al.* Enzymatic deacidification of high-acid oil for diacylglycerol production using NKA-9 macroporous resin-supported *Rhizomucor miehei* [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(8): 147–152.
- [21] CAI CS, GAO YQ, LIU Y, *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto SBA-15 and their application in glycerolysis for diacylglycerols synthesis [J]. Food Chem, 2016, 212: 205–212.
- [22] HUANG YS, GAO YQ, ZHONG NJ. Selective production of diacylglycerols through glycerolysis by ionic liquid: 1-butyl-3-methylimidazolium imidazolidine as catalyst and reaction medium [J]. J Am Oil Chem Soc, 2015, 92(6): 927–931.
- [23] ZHONG NJ, LI L, XU XB, *et al.* An efficient binary solvent mixture for monoacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis [J]. J Am Oil Chem Soc, 2009, 86(8): 783–789.
- [24] NIELSEN AVF, ANDRIC P, NIELSEN PM, *et al.* Activity and spatial distribution of *Candida antarctica* Lipase B immobilized on macroporous organic polymeric adsorbents [J]. Langmuir, 2014, 30(19): 5429–5434.
- [25] CHEN B, MILLER EM, MILLER L, *et al.* Effects of macroporous resin size on *Candida antarctica* Lipase B adsorption, fraction of active molecules, and catalytic activity for polyester synthesis [J]. Langmuir, 2007, 23(3): 1381–1387.
- [26] 曹茜, 汪勇, 唐书泽. 磷脂酶 A₁ (Lecitase Ultra) 大孔树脂固定化研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(8): 32–35.
CAO X, WANG Y, TANG SZ. Immobilization and application of phospholipase A₁ [J]. Food Res Dev, 2012, 33(8): 32–35.
- [27] 邵会, 刘国琴, 李琳, 等. 用硅酸钠催化制备甘油二酯的研究[J]. 河南工

- 业大学学报(自然科学版), 2012, 33(2): 39–42.
- SHAO H, LIU GQ, LI L, *et al.* Preparation of diacylglycerol by using sodium silicate as catalyst [J]. *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2012, 33(2): 39–42.
- [28] 马传国, 潘思轶, 张科红, 等. 酶促高酸价米糠油制备富含甘二酯油脂[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(4): 57–62.
- MA CG, PAN SY, ZHANG KH, *et al.* Enzymatic production of diacylglycerols rich oil using high-acid-value rice bran oil [J]. *J Chin Cereals Oils Ass*, 2011, 26(4): 57–62.
- [29] DUAN ZQ, DU W, LIU DH. Novozym 435-catalyzed 1,3-diacylglycerol preparation via esterification in t-butanol system [J]. *Process Biochem*, 2010, 45(12): 1923–1927.
- [30] 王卫飞. 酶法甘油解合成甘油二酯工艺的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- WANG WF. Study on synthesis of diacylglycerol by lipase-catalyzed glycerolysis [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [31] 孙晓雪, 汪勇, 崔立明, 等. 酶法催化甘油解制备亚麻籽油甘油二酯及其氧化稳定性分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(6): 76–83.
- SUN XX, WANG Y, CUI LM, *et al.* Preparation of diglyceride from flaxseed oil by enzymatically catalyzed glycerolysis and analysis of its oxidative stability [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2022, 41(6): 76–83.
- [32] 蒋羽鸽, 王志耕, 梅林, 等. 无溶剂体系甘油解法制备乳脂 1,3-甘油二酯[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(7): 176–180.
- JIANG YG, WANG ZG, MI L, *et al.* Prepare of milk fat 1,3-diacylglycerol by enzymatic glycerolysis in solvent-free system [J]. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(7): 176–180.
- [33] 徐扬, 王卫飞, 陈华勇, 等. 固定化脂肪酶 Lipase G50 催化合成甘油二酯的研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(9): 205–208.
- XU Y, WANG WF, CHEN HY, *et al.* Study on immobilization of Lipase G50 and its synthesis of diacylglycerol [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2012, 33(9): 205–208.
- [34] ZHONG N, LI Y, CAI C, *et al.* Enhancing the catalytic performance of *Candida antarctica* lipase B by immobilization onto the ionic liquids modified SBA-15 [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2018, 120: 1700357.
- [35] ZHONG N, CHEN W, LIU L, *et al.* Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production [J]. *Food Chem*, 2019, 271: 739–746.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



魏凌枫, 硕士研究生, 主要研究方向为油脂改性。

E-mail: 1120436700@qq.com



钟南京, 博士, 副教授, 主要研究方向为油脂生物酶促改性。

E-mail: adong473@163.com