

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 13/00

C12P 9/00 A23L 1/035



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96106112. X

[43] 授权公告日 2003 年 2 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1100882C

[22] 申请日 1996.4.23 [21] 申请号 96106112. X

[30] 优先权

[32] 1995. 4. 24 [33] US [31] 427544

[71] 专利权人 雀巢制品公司

地址 瑞士沃韦

[72] 发明人 O·奇米尔 N·米拉库里斯

H·特来勒

[56] 参考文献

EP378893 1990.07.25 A23D9/00

JP5720894 1982.12.22 A23F5/46

WO9103564 1991.03.21 C12P13/00

审查员 谢 妍

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 田 舍

权利要求书 1 页 说明书 10 页

[54] 发明名称 磷脂的酯交换方法

[57] 摘要

本发明涉及使三酰基甘油与磷脂酯交换的改进的方法，它是用由固定化脂肪酶和固定化磷脂酶组成的酶体系进行的。所得磷脂具有比常规卵磷脂更好的热稳定性和更好的乳化性能，可用于乳化体系中或用于速溶粉的外层中。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 用三酰基甘油通过酶交换来交换磷脂中酰基的方法，其特征在于：反应在无溶剂条件下用由固定化脂肪酶和固定化磷脂酶的混合物组成的酶体系进行，所述三酰基甘油含有饱和的短链 C₂-C₄ 和/或中链 C₆-C₁₂ 酰基。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述三酰基甘油是甘油三乙酸酯、奶油或 C₆-C₁₂ 三酸甘油酯。
3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于所述三酰基甘油是甘油三乙酸酯，以及将磷脂与未反应的甘油三乙酸酯分离。
4. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于所述磷脂通过倾析与未反应的甘油三乙酸酯分离。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述反应在干燥的卵磷脂存在下进行。

磷脂的酯交换方法

本发明涉及通过与三酰基甘油进行酶催化酯交换来交换磷脂中酰基基团的方法。

甘油磷脂如磷脂酰胆碱是由被两个脂肪酰基酯化的甘油和一个磷酸根或酯化的磷酸根组成的。对于磷脂的某些应用来说，需要将磷脂中的酰基基团交换，例如以提高其热稳定性。

在这方面，在例如 US-A-5314706 中已经表明，用通过将卵磷脂用磷脂酶 A2 水解获得的外源溶血磷脂酰胆碱强化的蛋黄能够改善乳液的热稳定性、特别是蛋黄酱的热稳定性。

此外，在 WO 91/03564 中已表明用脂肪酸和固定化在大孔载体上的脂肪酶催化剂在有机溶剂中将磷脂酶催化酯交换能改善特定酰基部分在磷脂中的混入。在该方法中，使用过量的脂肪酸，在过程结束后仍残留在反应混合物中，并且难以从所需的改性卵磷脂中分离出来。

本发明的一个目的是将磷脂的脂肪酸组合物改性，使得长链不饱和脂肪酸与短链和中链脂肪酸进行交换。

我们惊讶地发现，能够在固定化脂肪酶和固定化磷脂酶的存在下使甘油三酯与磷脂进行酯交换，以在甘油部分的 1 和 2 位混入短链脂肪酸部分。在反应过程中未检测到游离脂肪酸的明显增加。此外，还惊讶地发现，对于某些乳化体系如蛋黄酱和沙拉调味品来说，改性的卵磷脂是比天然卵磷脂更好的乳化剂。而且，如果使用本发明方法的改性卵磷脂，粉、特别是卵磷脂化的奶制品和可可粉的润湿性得到惊人的改善。用本发明方法获得的改性的卵磷脂的另一决定性的优点是它不产生任何怪味。

本发明方法的特征在于，反应在无溶剂条件下用由固定化脂肪酶和固定化磷脂酶的混合物组成的酶体系进行。

本发明方法适用于任何所需种类的含脂肪酸酰基酯基团的磷脂。所述天然磷脂的例子是磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺和二磷脂酰甘油。也可以加工各种羟基化合物被酯化为磷酸酯基团的合成磷脂、1-烷基-2-酰基-磷脂和二酰基-磷脂。

该交换反应可用来将任何所需的脂肪酸部分混入磷脂。特别令人感兴趣的是短链例如 C_2-C_4 饱和脂肪酸和中链例如 C_6-C_{12} 饱和脂肪酸部分。因此，本发明中所用的三酰基甘油优选含有短链 C_2-C_4 饱和酰基和中链 C_6-C_{12} 饱和酰基。所用含有大量混入甘油三酯的这些脂肪酸部分的油和脂肪均可作为原料，特别是短链至中链甘油三酯和黄油，最优选甘油三乙酸酯。

所用的酶催化剂包括脂肪酶，它可以是动物、植物或微生物来源的，并且在位置上可以是非特异性的或特异性的，例如 Lipozyme(TM)、Novo Nordisk a/s。它还包括磷脂酶，优选细胞外磷脂酶 A2，例如 Lecitase(TM)，Novo Nordisk a/s。

在本发明方法中所用的酶是在粒状大孔有机或无机载体上固定化的，优选用适宜的连接剂例如戊二醛交联到载体上的酶。

固定化脂肪酶与固定化磷脂的比率应选择使脂肪酶占酶总 beats 的 25-75%(重量)，优选 30-70%(重量)，它也与酶体系的总活性的百分数相同。

酯交换过程应当在固定化酶能给出最佳活性和热稳定性的条件下进行，优选在 60-80℃ 进行 1-72 小时，优选大约 23 小时。在反应结束后，通过例如过滤而分离出酶。本发明方法的一个优点是，必要时可以容易地将磷脂与甘油三酯分离，特别是对于用甘油三乙酸酯作油的情况，因为在未反应甘油三乙酸酯和卵磷脂之间迅速产生相分离。

对于使用其它甘油三酯并且需要分离的情况，可以使用常规的卵

磷脂纯化方法，例如丙酮分馏或者用大约 0.3%磷酸于大约 90 °C 脱胶。或者使用一种最好不采用的方法：用高效薄层色谱(HPTLC)进行分离。

用本发明方法获得的改性卵磷脂可以用于食品乳剂，例如调味汁、蛋黄酱和沙拉调味品，并且明显地改善了所混入的产品的乳化性能以及热稳定性。

它们也可用于速溶粉例如奶粉、可可粉和咖啡粉的制造，它们能够提供比常规卵磷脂更好的润湿性。

通过下述实施例可进一步说明本发明，除非另外指明，其中份数和百分数均以重量计。

在实施例中，所用的固定化脂肪酶是 Lipozyme(TM)，Novo Nordisk a/s。

所用的固定化磷脂酶是固定在玻璃珠上的细胞外磷脂酶 A2，其制备方法如下：

将 0.5g 玻璃珠(氨基丙基化的，Sigma G-5019)置于 5ml 脱气的含有 2.5%戊二醛的 100 μ M NaH₂PO₄ 缓冲液(pH7)中，抽真空 1 小时。将玻璃珠依次用水、0.5M NaCl 溶液和 100mM NaH₂PO₄ (pH6)溶液、1ml Lecitase(TM)，Novo Nordisk a/s 洗涤，并将 4ml 后一脱气的缓冲液加到玻璃珠中，在温和搅拌下于 4 °C 保温过夜。在用后一缓冲液再次洗涤后，将玻璃珠储存在储存缓冲液中。

实施例 1

将 150g 去湿的卵磷脂与中链甘油三酯的混合物(1:2)混合并加热至 70 °C。然后加入 1.5g 固定化 Lipozyme(TM)和 0.3g 固定化磷脂 A2。将试样于该温度下保温 23 小时。将酶过滤回收。为进行分析，由磷脂通过加入 400 微升乙酰氯(Fluka)并于 100 °C 保温 20 分钟制得脂肪酸甲酯(FAMES)。通过 HPTLC(硅胶板 60F 254, Merk)两步迁移将磷脂从所

有其它中分离出来。其中，先用甲苯/己烷/甲酸混合物(混合比: 70:30:0.5)，然后用己烷/乙醚/甲酸混合物(混合比为 60:40:1)，用 2ml 己烷/甲醇混合物(混合比: 1:4)从硅胶中提取。用气相色谱分析制得的用于原料卵磷脂和按照本发明方法改性的卵磷脂的 FAMES。下列表 1 给出的数值均基于脂肪酸的重量计。

表 1

脂肪酸	原料卵磷脂	改性卵磷脂
C 4:0	-	-
C 6:0	-	-
C 8:0	-	18.4
C 10:0	0.1	9.1
C 12:0	-	-
C 14:0	1.8	1.5
C 16:0	17.7	21.4
C 18:0	5.9	4.1
C 18:1	11.1	4.6
C 18:2	57	35.7
C 18:3	6.6	4.5

为了比较的目的，将相同的卵磷脂或者用固定化 Lecitase(TM)处理(对比试样 1)或者用固定化 Lepozyme(TM)处理(对比试样 2)。对于对比试样 1，混入的新脂肪酸的量为 18% (摩尔)，对于对比试样 2，为 27% (摩尔)，然而对于用本发明方法的酶混合物改性的卵磷脂则为 45% (摩尔)。

实施例 2

采用实施例 1 的方法，不同之处在于将卵磷脂与甘油三乙酸酯反应。去湿卵磷脂与甘油三乙酸酯的比率为 1:1。将试样静置过夜以获得几乎完全的相分离。过滤回收酶。按照实施例 1 所述的方法分析代表卵磷脂的上层相中脂肪酸成分的含量，不同的是为了 C2:0 的更好的定量，使用文献中已充分描述的方法制得丁酯来代替甲酯。

下列表 1 给出的数值均基于脂肪酸的重量计。

表 2

脂肪酸	改性卵磷脂
C 2:0	3.5
C 4:0	0.3
C 14:0	1.9
C 16:0	24.5
C 18:0	5.4
C 18:1	11.3
C 18:2	45.5
C 18:3	7.7

实施例 3

制备了含有 30%大豆油、60%水、10%醋、0.3%黄嗜胶和 1%实施例 1 改性的卵磷脂的沙拉调味品。为了比较的目的，分别用常规卵磷脂(对比试样 3)或者用常规卵磷脂与中链甘油三酯的化合物(2:1)(对比试样 4)制得相同的沙拉调味品。

如下所述，相对于均匀性和粘度来测定热稳定性。

将 20ml 相应的沙拉调味品于 80 °C 保温 2 小时（水浴的温度）。保温后，含有常规卵磷脂的试样是非均匀性的，可观察到层叠形成；而含有改性卵磷脂的试样却是均匀性的，没有形成任何层叠。

用调羹试验（使试样从调羹上滴下）和流变仪（剪切速率对剪切应力）来检测粘度。两个的结果都表明，在 240/s 的剪切速率下，对于用常规卵磷脂制得的试样，剪切应力为 160；对于用改性卵磷脂制得的试样，剪切应力为 185。在热冲击之前，两试样的值均为 185。

中链甘油三酯不对这些因素的任何一个产生影响。用按照本发明方法改性的卵磷脂制得的试样比用常规卵磷脂制得的试样(对比试样 3)和用常规卵磷脂与中链甘油三酯的混合物制得的试样相比热稳定性更好。进行离心后，在顶部只发现很少的油，对于用常规卵磷脂加有或不加有中链甘油三乙酸酯制得的试样(分别为对比试样 3 和 4)为 0.25g 油，按照本发明改性的卵磷脂却只有 0.18g 油。在后一试样中也检测到异味的明显减小。

实施例 4

测试了按照本发明的改性卵磷脂的对于蛋黄蛋白质的稳定化效果。通过在 80 °C 水浴中放置 30 秒的方法将装在小瓶中的 10ml 稀释 5-10 倍的均化的蛋黄热冲击(h.s.)。

测定了热冲击前后的粒径($D(v,0.9) \mu m$)。结果示于下表 3 中。

表 3

D	不含卵磷脂	0.5% 卵磷脂	0.5% 改性 卵磷脂	1% 卵磷脂	1% 改性 卵磷脂	2% 卵磷脂	2% 改性 卵磷脂
热冲击前	28	18	11	9	4	4	6
热冲击后	75	60	41	55	17	15	13

可以观察到，用本发明的改性的卵磷脂制得的试样更稳定。一般来说，用一半量的本发明的改性的卵磷脂就可达到相同的卵磷脂稳定效果。

实施例 5

用 50g 蛋黄、3g 食盐、5g 芥末、200g 菜油、3g 醋、5ml 柠檬汁和 6ml 水，分别不加或者加入不同浓度的常规或改性的卵磷脂制得整个蛋黄酱。分别将 100g 蛋黄酱置于罐中，密封并于 100 °C 保温 2X30 分钟。然后将顶部的油完全离心并测定之。结果示于下表 4 中。

表 4

试 样	热处理后顶部油的量(g)
未加卵磷脂	13.2
加入 1%常规卵磷脂	6
加入 1.5%常规卵磷脂	5
加入 1%按照实施例 1 改性的卵磷脂	3.5

加入 2%按照实施例 1 改性的卵磷脂	1.1
加入 1%按照实施例 2 改性的卵磷脂	1
加入 2%按照实施例 2 改性的卵磷脂	0.5
加入 1%血溶卵磷脂	2.2
加入 2%血溶卵磷脂 (Emulfluid(TM),Lukas Meyer)	1

再一次观察到，与常规卵磷脂的量相比，不超过一半量的本发明的改性的卵磷脂便具有相同的稳定化效果，并且具有比市售溶血卵磷脂更好的稳定化效果。

实施例 6

将常规或改性的卵磷脂(实施例 2)分别溶于己烷中，然后在混合的同时喷洒在奶粉上。然后在搅拌下将己烷蒸发。

为测定润湿性，在室温下将 5g 奶粉用调羹加到 100ml 水中，测定奶粉完全沉到水面之下的时间。该时间表明，常规卵磷脂惊人地改善了奶粉的润湿性，但是也可以看到实施例 2 的改性卵磷脂效果更好。

沉没时间结果在下表 5 中给出。

表 5

试 样	沉没时间 (秒)
纯奶粉	> 120
奶粉 + 0.5%卵磷脂	21
奶粉 + 0.5%改性卵磷脂	9
奶粉 + 1%卵磷脂	15
奶粉 + 1%改性卵磷脂	7

实施例 7

象实施例 6 那样，测试含有蔗糖、荷兰可可粉、可可调味剂和 1% 卵磷脂的速溶可可制剂。分别制备了含有 1% 常规卵磷脂或甘油三乙酸酯改性卵磷脂(实施例 2)的两个试样。

将试样蒸汽聚结(steam agglomerated)制得市售可可制剂。为评定润湿性，将 21g 可可制剂在室温下加到 250ml 奶中，测定全部物料沉没的时间。对试样观察数天。结果在下表 6 中给出。

表 6

沉没时间 (秒) (天)	常规卵磷脂	改性卵磷脂
0	15	11
3	35	17
5	32	13
7	35	10
10	40	15
21	35	12
28	37	16
35	42	19
42	39	17

实施例 8

以 2:1 的比率将水份含量至多为 0.1% 的 ODELL'S(TM) 澄清黄油与卵磷脂混合，象上述实施例那样加入固定化脂肪酶和磷脂酶。反应条

件也如上所述。所得改性卵磷脂的脂肪酸成分如下表7所示。

表7

脂肪酸	改性卵磷脂
C 4:0	1.2
C 6:0	0.8
C 8:0	1.5
C 10:0	1.4
C 12:0	3
C 14:0	11.9
C 16:0	20.9
C 18:0	22.4
C 18:1	17.9
C 18:2	15.3
C 18:3	3