

酶催化酯化法降低模型油中 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯前体物质工艺研究

冯兆寒, 周燕霞, 孙尚德

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:旨在解决精炼过程中的高温条件易使油脂产生对人体有害的风险因子 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯问题, 采用脂肪酶催化脂肪酸(油酸)与大豆模型油中的甘油一酯、甘油二酯进行酯化, 以降低 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的前体物质甘油一酯和甘油二酯的含量。采用单因素试验和响应面法对酯化反应温度、脂肪酶添加量(以原料总质量计)、底物比(脂肪酸物质的量与将大豆模型油中甘油一酯和甘油二酯完全酯化为甘油三酯所需要脂肪酸总物质的量比)和反应时间等酯化反应条件进行优化。同时, 使用酯化前后大豆模型油进行模拟脱臭反应, 对比两种脱臭油中 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的含量。结果表明: 最优酯化反应条件为以 Lipozyme RM IM 为酯化用酶、脂肪酶添加量 5.64%、反应温度 78.82℃、底物比 17.31:1、反应时间 29.05 h, 在此条件下经过 10 倍放大试验, 得到的酯化产物中甘油一酯含量为(0.29±0.01)%, 甘油二酯含量为(2.39±0.03)%, 甘油三酯含量为(97.32±0.04)%, 甘油一酯和甘油二酯的含量分别较大豆模型油降低 92.01% 和 75.05%。与未经过酯化反应的大豆模型油相比, 经模拟脱臭后酯化大豆模型油中 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯含量分别降低 58.06% 和 89.72%, 分别为 0.26 mg/kg 和 0.51 mg/kg, 均符合欧盟标准要求。综上, 通过酯化反应降低前体物质甘油一酯和甘油二酯的含量, 可有效控制脱臭工序中 3-氯丙醇酯尤其是缩水甘油酯的产生。

关键词: 3-氯丙醇酯; 缩水甘油酯; 甘油一酯; 甘油二酯; 大豆模型油; 酯化反应

中图分类号: TS224.6; TQ426.97 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2025)06-0036-08

Reduction of 3-chloropropanol esters and glycidyl esters precursors in model oils by enzyme-catalyzed esterification

FENG Zhaohan, ZHOU Yanxia, SUN Shangde

(College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Aimed at solving the problem of high temperature conditions during the refining process that predispose oils to the production of 3-chloropropanol esters and glycidyl esters, which are risk factors that are harmful to human beings, enzyme-catalyzed esterification of fatty acid oleic acid with the monoglycerides and diglycerides in soybean model oils was conducted to reduce the contents of monoglycerides and diglycerides, precursors of 3-chloropropanol esters and glycidyl esters. The esterification reaction conditions were optimized using single factor experiment and response surface methodology, including reaction temperature, lipase dosage (based on the total mass of raw materials),

substrate ratio (molar ratio of the amount of fatty acid substances to the total amount of fatty acid substances required for the complete esterification of monoglycerides and diglycerides to triglycerides in soybean model oils) and reaction time. At the same time, the deodorization reaction was simulated for soybean model oils before and after

收稿日期: 2024-01-24; 修回日期: 2024-12-08

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目 (2021YFD2100302-05)

作者简介: 冯兆寒(1999), 男, 硕士研究生, 研究方向为油脂加工与安全 (E-mail) fengzhaohan2020@163.com。

通信作者: 孙尚德, 教授, 博士生导师, 博士 (E-mail) shangdesun@haut.edu.cn。

esterification, and the contents of 3-chloropropanol esters and glycidyl esters in the two deodorized oils were compared. The results showed that the optimal esterification reaction conditions were Lipozyme RM IM as the enzyme, lipase dosage 5.64%, reaction temperature 78.82 °C, substrate ratio 17.31:1, and reaction time 29.05 h. Under these conditions, the esterified products obtained after 10-fold scale-up test contained (0.29 ± 0.01)% of monoglycerides, (2.39 ± 0.03)% of diglycerides, and (97.32 ± 0.04)% of triglycerides, and the contents of monoglycerides and diglycerides were 92.01% and 75.05% lower than that of the soybean model oils, respectively. Compared with the soybean model oils without esterification, the contents of 3-chloropropanol esters and glycidyl esters of esterified soybean model oils after simulated deodorization were reduced by 58.06% and 89.72%, which were 0.26 mg/kg and 0.51 mg/kg, respectively, and they were in line with the requirements of the EU standard. In conclusion, the production of 3-chloropropanol esters, especially glycidyl esters, can be effectively controlled by reducing the contents of monoglycerides and diglycerides through esterification reaction.

Key words: 3-chloropropanol esters; glycidyl esters; monoglycerides; diglycerides; soybean model oils; esterification

近年来,油脂中的风险因子3-氯丙醇酯和缩水甘油酯受到广泛关注,市售食用油中3-氯丙醇酯和缩水甘油酯(以3-氯丙醇计)检出率较高^[1-2]。3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的危害来自其水解产物3-氯丙醇和缩水甘油。体外模拟肠道试验发现,3-氯丙醇酯可在短时间内完全水解^[3],其水解产物3-氯丙醇具有很强的毒性^[4-8];而对于缩水甘油的研究发现,其具有遗传毒性,可能会引发癌症;3-氯丙醇和缩水甘油已经被国际癌症研究机构分别列为2B类和2A类风险物质^[7,9]。欧盟标准EU 2020/1322规定:对于椰子油、玉米油、菜籽油、葵花籽油、大豆油、棕榈仁油、橄榄油(精炼橄榄油和初榨橄榄油)及其混合油,3-氯丙醇酯(以3-氯丙醇计)的含量不得超过1.25 mg/kg;对于其他植物油、鱼油、其他海洋生物油及其混合油,3-氯丙醇酯的含量不得超过2.5 mg/kg;对于缩水甘油酯(以缩水甘油计),任何进入消费市场的鱼油和其他海洋生物油中缩水甘油酯的含量不得超过1.0 mg/kg^[10]。因此,抑制油脂中3-氯丙醇酯及缩水甘油酯的产生至关重要。

研究发现,3-氯丙醇酯和缩水甘油酯主要存在于精炼油中。油脂的精炼过程,尤其是脱臭的高温条件是诱发3-氯丙醇酯和缩水甘油酯产生的主要原因^[11-13]。油脂中的甘油一酯、甘油二酯和氯离子在高温下很容易反应产生3-氯丙醇酯和缩水甘油酯^[13-17]。当前,降低3-氯丙醇酯的研究集中于去除其前体物质氯离子^[2,18-19],然而这种方法对于缩水甘油酯含量的降低效果不明显,甚至会导致缩水甘油酯含量的升高。因此,本研究考虑将油脂中的

甘油一酯和甘油二酯与脂肪酸发生酯化反应,以降低3-氯丙醇酯和缩水甘油酯前体物质甘油一酯和甘油二酯的含量,从而抑制其在后续高温过程中的产生。根据催化剂的不同,酯化反应分为化学催化法和酶法。化学催化法反应温度较高,反应难以操控,副反应较多,且易产生废水。相较于化学催化法,酶法的反应条件更温和^[20-21],有利于保证食用油的品质,同时固定化酶可以重复使用以降低成本。

因此,本研究选择脂肪酶作为反应的催化剂。通过向大豆油中加入甘油一酯和甘油二酯的混合物,配成富含甘油一酯和甘油二酯的大豆模型油,将其与脂肪酸(油酸)进行酯化反应,采用单因素试验和响应面试验对酯化反应条件进行优化,对酯化前后大豆模型油进行模拟脱臭,对比2种脱臭油样中3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的含量,分析酯化方法对于其中3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的防控效果,以期为油脂中3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆油,一级浸出油;3-氯丙醇酯和缩水甘油酯标准品,上海安谱实验科技股份有限公司;N-甲基-N-(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺(MSFTA)、油酸甘油酯(甘油一酯含量27.95%,甘油二酯含量49.09%,甘油三酯含量22.96%)、油酸、PA脂肪酶、PS脂肪酶,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;苯硼酸(PBA)、溴化钠,上海麦克林生化科技有限公司;Novozym 435脂肪酶、Lipozyme TL IM脂肪酶、

Lipozyme RM IM 脂肪酶, 丹麦诺维信公司; Eversa transform 2.0 (Ev 20)、*Candida antarctica* lipase - B (CALB)、*Thermomyces lanuginosus* (TL 100), 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 石油醚、无水乙醇、冰乙酸、硫酸(质量分数 98%), 分析纯, 天津市科密欧有限公司; 正己烷、乙酸乙酯、甲基叔丁基醚、异辛烷、无水乙醇、丙酮, 色谱纯, 赛摩飞世尔科技(中国)有限公司。

BSA224S 分析天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; LD5-10 高速离心机, 北京京立离心机有限公司; Agilent8860 气相色谱(GC)仪, 安捷伦科技公司; ISQ7000 气相色谱-质谱联用仪, 美国 Thermo Fisher 公司; RCT 基本型恒温磁力搅拌器, 艾卡仪器设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆模型油的制备

按质量比 8:2 向大豆油中加入油酸甘油酯, 配成富含甘油一酯和甘油二酯的大豆模型油(GC 检测得到其甘油酯组成为甘油一酯含量 3.63%、甘油二酯含量 9.58%、甘油三酯含量 86.79%, 制备的每批样品的甘油酯组成会有所差异), 超声 20 min 后充氮气保护, 于 -20 °C 冷藏保存备用。

1.2.2 大豆模型油的酯化反应

将大豆模型油在抽真空条件下于 100 °C 进行脱水, 称取适量脱水后的大豆模型油于圆底烧瓶中, 加入一定量的脂肪酶和油酸, 于恒温磁力搅拌器中进行反应。反应结束后, 离心, 除去脂肪酶, 得酯化产品。

1.2.3 模拟脱臭反应

取一定量 1.2.2 得到的酯化产品进行常规碱炼脱酸, 然后将脱酸产品加入至 10 mL 带有聚四氟乙烯密封塞的耐高温高压玻璃管中, 氮气去除上层空气后, 于 240 °C 磁力搅拌器中加热(以硅油为加热介质)1 h 后, 取出玻璃管迅速降温、充氮气后, 于 -20 °C 保存。

1.2.4 甘油酯组成的分析

采用气相色谱法分析甘油酯组成。

样品前处理: 将 50 mg 样品在室温下加入 150 μ L MSFTA 衍生 20 min, 氮吹除去过量的 MSFTA, 使用正庚烷溶解并加入适量无水硫酸钠干燥, 得到的上清液过 0.22 μ m 微滤膜进 GC 仪分析。

GC 条件: DB-1ht 色谱柱(30 m \times 250 μ m \times 0.10 μ m); 载气为 N₂, 流速 4.41 mL/min; 进样量 1 μ L; 分流进样, 分流比 40:1; 进样口温度 350 °C; 检测器温度 380 °C; 柱温箱升温程序为 50 °C 保持 1 min, 以 25 °C/min 升至 180 °C, 再以 45 °C/min 升

至 360 °C, 保持 14 min。采用标准品进行定性, 代入绘制的质量浓度-峰面积标准曲线方程计算甘油一酯、甘油二酯和甘油三酯含量^[22-23]。按公式(1)计算甘油一酯和甘油二酯转化率(x)。

$$x = \frac{(M_{\text{反应前}} - M_{\text{反应后}}) + (D_{\text{反应前}} - D_{\text{反应后}})}{M_{\text{反应前}} + D_{\text{反应前}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $M_{\text{反应前}}$ 为反应前甘油一酯含量; $M_{\text{反应后}}$ 为反应后甘油一酯含量; $D_{\text{反应前}}$ 为反应前甘油二酯含量; $D_{\text{反应后}}$ 为反应后甘油二酯含量。

1.2.5 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯含量的测定

参照 SN/T 5220—2019《出口食品中 3-氯丙醇酯及缩水甘油酯的测定 气相色谱-质谱法》以及刘瑶等^[24]的方法进行 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯含量的测定。

1.2.6 数据统计分析

试验均重复 3 次, 结果以“平均值 \pm 标准偏差”表示, 并结合 SPSS 数据处理软件进行统计分析。 $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 大豆模型油酯化的单因素试验

2.1.1 脂肪酶种类对酯化反应的影响

本试验选择 3 种液体脂肪酶(CALB、TL 100 和 Ev 20)、2 种固体脂肪酶(PA 和 PS)以及 3 种固定化脂肪酶(Novozym 435、Lipozyme TL IM、Lipozyme RM IM), 在底物比(脂肪酸物质的量与将大豆模型油中甘油一酯和甘油二酯完全酯化为甘油三酯所需要脂肪酸总物质的量的比)4:1, 酶添加量 5% (以原料总质量计), 液体脂肪酶和固体脂肪酶最适温度 60 °C, 固定化脂肪酶最适温度 80 °C 的条件下, 进行催化酯化反应, 考察不同酶催化下甘油一酯和甘油二酯转化率。结果发现, 3 种液体脂肪酶和 2 种固体脂肪酶催化反应时得到的甘油一酯和甘油二酯转化率均为负, 即发生水解反应, 因此仅列出 3 种固定化脂肪酶的酯化效果, 结果见图 1。

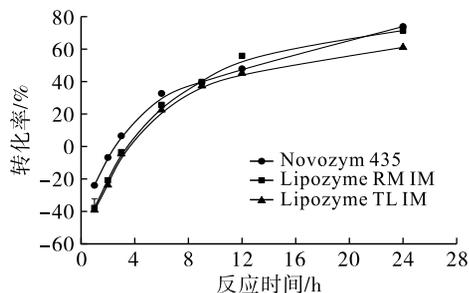


图 1 脂肪酶种类对酯化反应的影响

Fig. 1 Effect of lipase type on esterification reaction

由图 1 可看出, Lipozyme RM IM 催化酯化反应的效率总体最高, 反应 24 h 对应的甘油一酯和甘油二酯转化率为 $(71.39 \pm 1.08)\%$, 酯化产物中甘油一酯含量为 $(0.26 \pm 0.02)\%$, 甘油二酯含量为 $(3.52 \pm 0.11)\%$, 甘油三酯含量为 $(96.22 \pm 0.16)\%$ 。因此, 选择固定化脂肪酶 Lipozyme RM IM 作为大豆模型油与油酸酯化反应的催化用酶。

2.1.2 反应温度对酯化反应的影响

在底物比 4:1、Lipozyme RM IM 添加量 5% 的条件下, 考察反应温度对酯化反应的影响, 结果见图 2。

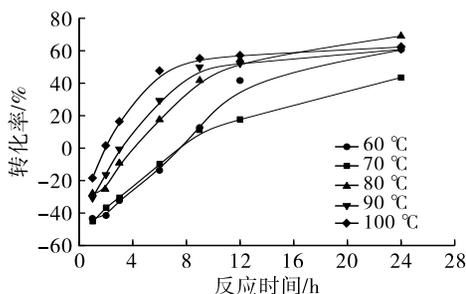


图 2 反应温度对酯化反应的影响

Fig. 2 Effect of reaction temperature on esterification reaction

温度的升高有助于提高分子热运动速率, 增加分子间有效碰撞的概率。由图 2 可看出, 随着反应温度的升高, 甘油一酯和甘油二酯转化率显著升高。在 80 °C 反应 24 h 时, 甘油一酯和甘油二酯转化率达到最高值, 为 69.07%。此时酯化产物中甘油一酯含量为 $(0.21 \pm 0.14)\%$, 甘油二酯含量为 $(4.33 \pm 0.40)\%$, 甘油三酯含量为 $(95.47 \pm 0.26)\%$ 。因此, 选择 80 °C 为后续试验条件。

2.1.3 脂肪酶添加量对酯化反应的影响

在反应温度 80 °C、底物比 4:1 的条件下, 考察脂肪酶添加量对酯化反应的影响, 结果见图 3。

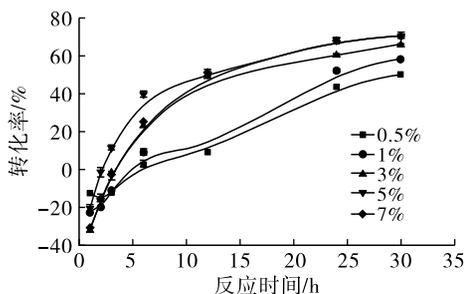


图 3 脂肪酶添加量对酯化反应影响

Fig. 3 Effect of lipase dosage on esterification reaction

合适的脂肪酶添加量可以使反应在达到所需要效果的同时降低成本。由图 3 可看出, 反应初期甘油一酯和甘油二酯转化率为负值, 可能是固定化脂肪酶和大豆模型油在保存期间存在少量的水, 导致

反应初期出现甘油三酯少量水解。随着脂肪酶添加量的增加, 甘油一酯和甘油二酯转化率总体增大。当脂肪酶添加量为 5% 时, 经过 30 h 反应后, 甘油一酯和甘油二酯转化率达到 $(70.18 \pm 0.10)\%$, 此时酯化产物中甘油一酯含量为 $(0.37 \pm 0.10)\%$, 甘油二酯含量为 $(3.86 \pm 0.22)\%$, 甘油三酯含量为 $(95.77 \pm 0.12)\%$ 。继续提高脂肪酶添加量至 7%, 经过 30 h 反应后, 甘油一酯和甘油二酯转化率无明显变化, 甘油酯组成的变化也不显著。因此, 选择脂肪酶添加量 5% 作为后续试验条件。

2.1.4 底物比对酯化反应的影响

在反应温度 80 °C、脂肪酶添加量 5% 的条件下, 考察底物比对酯化反应的影响, 结果见图 4。

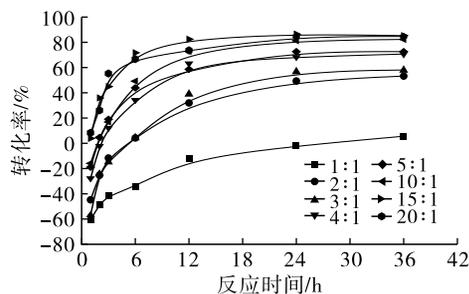


图 4 底物比对酯化反应的影响

Fig. 4 Effect of substrate ratio on esterification reaction

由图 4 可知, 当底物比为 1:1 时, 反应 36 h 后酯化反应基本达到平衡, 但此时甘油一酯和甘油二酯转化率很低, 酯化产物中甘油一酯含量为 $(0.34 \pm 0.01)\%$, 甘油二酯含量为 $(14.15 \pm 0.03)\%$, 甘油三酯含量为 $(85.51 \pm 0.03)\%$, 与初始状态相比, 甘油一酯和甘油三酯的含量下降, 而甘油二酯的含量有所升高。可能是当底物比过低时, 反应向水解反应方向进行。此外, 在这个过程中, 甘油一酯和甘油三酯之间可能也发生了酯交换反应, 这使得甘油二酯的含量增加同时甘油一酯和甘油三酯的含量下降。随着底物比的升高, 甘油一酯和甘油二酯转化率增大。底物比为 15:1 时, 反应 36 h 后甘油一酯和甘油二酯转化率为 $(85.28 \pm 2.48)\%$, 此时甘油一酯含量为 $(0.20 \pm 0.04)\%$, 甘油二酯含量为 $(2.37 \pm 0.25)\%$, 甘油三酯含量为 $(97.43 \pm 0.29)\%$ 。当底物比大于 15:1 后, 继续增加底物比, 甘油一酯和甘油二酯转化率变化不大。因此, 选择底物比为 15:1 作为后续试验条件。

2.2 大豆模型油酯化的响应面试验

2.2.1 响应面试验设计及结果

在单因素试验基础上, 以反应温度(A)、脂肪酶添加量(B)、底物比(C)、反应时间(D)为反应因素,

酯化产物中甘油一酯含量(Y_1)、甘油二酯含量(Y_2)和甘油三酯含量(Y_3)为响应值,采用 Box - Behnken

响应面设计对酯化反应条件进行优化。大豆模型油酯化反应的响应面试验设计及结果见表 1。

表 1 大豆模型油酯化反应的响应面试验设计及结果

Table 1 Response surface methodology design and results of soybean model oil esterification reaction

试验号	A/°C	B/%	C	D/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$
1	90	5	10:1	24	0.48 ± 0.04	3.01 ± 0.35	96.51 ± 0.38
2	90	5	20:1	24	0.50 ± 0.01	2.49 ± 0.11	97.01 ± 0.12
3	80	5	10:1	36	0.47 ± 0.02	2.72 ± 0.10	96.81 ± 0.08
4	70	7	15:1	24	0.64 ± 0.01	2.99 ± 0.07	96.37 ± 0.06
5	80	7	10:1	24	0.56 ± 0.11	2.65 ± 0.12	96.79 ± 0.23
6	70	5	15:1	36	0.01 ± 0.02	3.15 ± 0.28	96.84 ± 0.30
7	70	5	10:1	24	0.52 ± 0.10	3.32 ± 0.01	96.16 ± 0.09
8	90	5	15:1	36	0.51 ± 0.04	2.56 ± 0.30	96.93 ± 0.27
9	80	3	20:1	24	0.67 ± 0.05	2.62 ± 0.16	96.71 ± 0.11
10	90	7	15:1	24	0.44 ± 0.05	2.29 ± 0.08	97.27 ± 0.13
11	80	5	15:1	24	0.29 ± 0.01	1.96 ± 0.38	97.75 ± 0.37
12	80	3	15:1	36	0.52 ± 0.06	2.45 ± 0.24	97.03 ± 0.18
13	80	3	15:1	12	0.37 ± 0.01	2.75 ± 0.35	96.88 ± 0.34
14	80	5	15:1	24	0.05 ± 0.06	1.85 ± 0.13	98.10 ± 0.20
15	70	5	15:1	12	0.57 ± 0.16	3.24 ± 0.05	96.19 ± 0.11
16	70	5	20:1	24	0.75 ± 0.04	3.05 ± 0.01	96.20 ± 0.03
17	80	7	15:1	36	0.35 ± 0.01	2.33 ± 0.23	97.32 ± 0.21
18	90	3	15:1	24	0.41 ± 0.01	3.22 ± 0.01	96.37 ± 0.02
19	80	7	20:1	24	0.52 ± 0.13	2.07 ± 0.28	97.41 ± 0.41
20	80	5	15:1	24	0.46 ± 0.18	1.70 ± 0.08	97.84 ± 0.10
21	80	5	15:1	24	0.11 ± 0.01	2.01 ± 0.10	97.88 ± 0.11
22	80	5	15:1	24	0.28 ± 0.13	1.96 ± 0.06	97.76 ± 0.08
23	80	5	20:1	36	0.47 ± 0.01	2.19 ± 0.01	97.34 ± 0.01
24	80	3	10:1	24	0.44 ± 0.09	3.16 ± 0.15	96.40 ± 0.24
25	80	5	20:1	12	0.36 ± 0.12	2.64 ± 0.05	97.00 ± 0.08
26	80	7	15:1	12	0.43 ± 0.08	2.86 ± 0.04	96.71 ± 0.03
27	80	5	10:1	12	0.47 ± 0.05	3.07 ± 0.13	96.46 ± 0.26
28	90	5	15:1	12	0.42 ± 0.05	2.93 ± 0.12	96.65 ± 0.11
29	70	3	15:1	24	0.48 ± 0.08	2.99 ± 0.04	96.53 ± 0.03

试验发现,在理想的反应条件下,甘油一酯的含量在较短时间内达到较低水平,后期反应进程中仅波动而未有明显变化,不具有代表性,因此选择甘油二酯和甘油三酯含量变化考虑反应进程。通过响应面试验设计和分析,得到 Lipozyme RM IM 催化甘油一酯和甘油二酯与油酸酯化反应产生甘油三酯的过程中,甘油二酯(Y_2)和甘油三酯(Y_3)的含量与反应温度(A)、脂肪酶添加量(B)、底物比(C)和反应时间(D)之间的二次项多项式方程: $Y_2 = 51.83 - 1.11A + 0.48B - 0.55C - 0.07D - 0.02AB + 0.0003AC - 0.0006AD + 0.002BC - 0.002BD - 0.0004CD + 0.007A^2 + 0.08B^2 + 0.02C^2 + 0.002D^2$; $Y_3 = 41.25 +$

$1.22A - 0.12B + 0.58C + 0.19D + 0.01AB + 0.001AC - 0.001AD + 0.005BC + 0.0004BD - 0.0004CD - 0.01A^2 - 0.12B^2 - 0.02C^2 - 0.003D^2$ 。

甘油二酯和甘油三酯回归模型的方差分析分别见表 2、表 3。

由表 2 可看出,甘油二酯回归模型 p 值小于 0.000 1,模型显著,失拟项 p 值为 0.526 4,大于 0.05,说明失拟项不显著。各因素对于甘油二酯含量的影响大小为底物比(C) > 反应温度(A) > 反应时间(D) > 脂肪酶添加量(B)。模型的决定系数(R^2)为 0.968 8,校正决定系数(R_{Adj}^2)为 0.937 6,说明模型拟合效果较好,模型具有可靠性。

表 2 甘油二酯回归模型的方差分析
Table 2 Analysis of variance of diglycerides regression model

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>p</i>
模型	6.94	14	0.49	31.04	<0.000 1
<i>A</i>	0.46	1	0.46	45.09	<0.000 1
<i>B</i>	0.25	1	0.25	11.74	0.004 1
<i>C</i>	0.67	1	0.67	55.78	<0.000 1
<i>D</i>	0.47	1	0.47	22.78	0.000 3
<i>AB</i>	0.34	1	0.34	27.68	0.000 1
<i>AC</i>	0.02	1	0.02	0.04	0.846 1
<i>AD</i>	0.46	1	0.46	1.23	0.286 7
<i>BC</i>	0.25	1	0.25	0.06	0.815 8
<i>BD</i>	0.67	1	0.67	0.83	0.378 3
<i>CD</i>	0.47	1	0.47	0.16	0.698 4
<i>A</i> ²	0.34	1	0.34	221.29	<0.000 1
<i>B</i> ²	0.02	1	0.02	44.42	<0.000 1
<i>C</i> ²	0.46	1	0.46	63.19	<0.000 1
<i>D</i> ²	0.25	1	0.25	51.75	<0.000 1
残差	0.22	14	0.02		
失拟项	0.16	10	0.02	1.05	0.526 4
绝对偏差	0.06	4	0.02		
总和	7.17	28			

表 3 甘油三酯回归模型的方差分析
Table 3 Analysis of variance of triglycerides regression model

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>p</i>
模型	8.11	14	0.58	36.50	<0.000 1
<i>A</i>	0.46	1	0.46	28.99	<0.000 1
<i>B</i>	0.25	1	0.25	16.08	0.001 3
<i>C</i>	0.67	1	0.67	42.34	<0.000 1
<i>D</i>	0.47	1	0.47	29.73	<0.000 1
<i>AB</i>	0.34	1	0.34	21.19	0.000 4
<i>AC</i>	0.02	1	0.02	1.06	0.319 7
<i>AD</i>	0.03	1	0.03	2.16	0.164 1
<i>BC</i>	0.01	1	0.01	0.69	0.418 6
<i>BD</i>	0.05	1	0.05	3.33	0.089 3
<i>CD</i>	0.00	1	0.00	0.00	0.968 9
<i>A</i> ²	4.10	1	4.10	258.56	<0.000 1
<i>B</i> ²	1.39	1	1.39	87.59	<0.000 1
<i>C</i> ²	1.96	1	1.96	123.26	<0.000 1
<i>D</i> ²	1.13	1	1.13	70.96	<0.000 1
残差	0.22	14	0.02		
失拟项	0.14	10	0.01	0.71	0.701 8
绝对偏差	0.08	4	0.02		
总和	8.34	28			

由表 3 可看出,甘油三酯回归模型 *p* 值小于

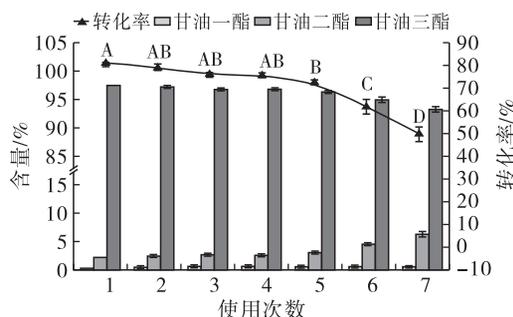
0.000 1,模型显著,失拟项 *p* 值为 0.701 8,大于 0.05,说明失拟项不显著。各因素对甘油三酯含量的影响大小为底物比(*C*) > 反应时间(*D*) > 反应温度(*A*) > 脂肪酶添加量(*B*)。模型 *R*² 为 0.973 3, *R*_{Adj}² 为 0.946 7,说明模型拟合效果较好,模型具有可靠性。

2.2.2 响应面优化条件与放大试验

经过响应面优化,取甘油二酯含量最低、甘油三酯含量最高时的反应条件为模型预测最优条件,即反应温度 78.82 °C、脂肪酶添加量 5.64%、底物比 17.31:1、反应时间 29.05 h,在此条件下酯化产物中甘油二酯含量为 1.88%,甘油三酯含量为 97.85%。在优化条件下进行 3 次放大 10 倍试验,得到酯化产物的甘油酯组成为甘油一酯含量(0.29 ± 0.01)%、甘油二酯含量(2.39 ± 0.03)%、甘油三酯含量(97.32 ± 0.04)%、甘油一酯和甘油二酯的含量分别较大豆模型油降低 92.01% 和 75.05%。

2.3 酶的重复利用效果

在上述最优条件下进行固定化脂肪酶催化酯化反应后,离心回收固定化脂肪酶,正己烷冲洗后冻干,再次用于大豆模型油的催化酯化反应中,考察固定化脂肪酶重复利用后甘油一酯和甘油二酯转化率及酯化产物组成,结果见图 5。



注:不同字母表示转化率存在显著差异($p < 0.05$)

Note: Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) for conversion rate

图 5 酶重复利用试验结果

Fig. 5 Experimental results of enzyme reuse

由图 5 可看出,经过 4 次反应后,Lipozyme RM IM 的催化效率(当次酶催化反应转化率与首次酶催化反应转化率之比)仍在 90% 以上。

2.4 酯化前后产品的模拟脱臭

按 1.2.3 方法对酯化反应前后大豆模型油进行脱臭,2 种脱臭样品的 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的含量见表 4。

由表 4 可看出,与未酯化相比,大豆模型油酯化产物经过模拟脱臭反应后,其 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的含量均符合欧盟标准的要求,其中:3-氯

丙醇酯含量降低 58.06%，缩水甘油酯含量降低 89.72%。以上结果说明通过酯化降低油脂中 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的主要前体物质甘油一酯和甘油二酯含量可有效抑制脱臭工序中 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的产生。

表 4 酯化反应前后大豆模型油经脱臭后的 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的含量

Table 4 Contents of 3-chloropropanol esters and glycidyl esters in soybean model oil

	after simulated deodorization	mg/kg
大豆模型油	3-氯丙醇酯	缩水甘油酯
酯化反应前	0.62 ± 0.07	4.96 ± 0.45
酯化反应后	0.26 ± 0.02	0.51 ± 0.02

3 结论

采用酶法催化大豆模型油中甘油一酯和甘油二酯酯化为甘油三酯,以达到降低其在高温下产生 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的目的。通过单因素试验及响应面试验对酯化反应温度、脂肪酶添加量、底物比和反应时间进行优化,得到优化后的酯化反应条件为反应温度 78.82℃、脂肪酶 Lipozyme RM IM 添加量 5.64%、底物比 17.31:1、反应时间 29.05 h,在此条件下经过 10 倍放大试验,得到的酯化产物中甘油一酯含量为(0.29 ± 0.01)%、甘油二酯含量为(2.39 ± 0.03)%、甘油三酯含量为(97.32 ± 0.04)%、甘油一酯和甘油二酯的含量分别较大豆模型油降低 92.01% 和 75.05%。同时,经过酯化反应处理后,模拟脱臭得到油样的 3-氯丙醇酯含量为(0.26 ± 0.02) mg/kg,缩水甘油酯含量为(0.51 ± 0.02) mg/kg,较未酯化油样分别降低 58.06% 和 89.72%。经酯化反应处理后,这两种物质的含量皆符合欧盟标准的要求。综上,通过酯化反应降低油脂中 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的主要前体物质甘油一酯和甘油二酯含量,可有效控制脱臭工序中 3-氯丙醇酯尤其是缩水甘油酯的产生,为降低油脂中的 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯提供了有效的技术支持。

参考文献:

[1] 谷瑞丽, 宁亚萍, 刘璐, 等. 河南省市售食用植物油中 3-氯丙醇酯污染状况分析[J]. 中国油脂, 2024, 49(1): 84-89.

[2] 张家枫, 刘玉兰, 孙国昊, 等. 不同食用油的甘油酯组成、3-MCPD 酯和 GEs 含量研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 38-43.

[3] SEEFELDER W, VARGA N, STUDER A, et al. Esters of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) in vegetable

oils: Significance in the formation of 3-MCPD[J]. Food Addit Contam A, 2008, 25(4): 391-400.

- [4] BRAEUNING A, SAWADA S, OBEREMM A, et al. Analysis of 3-MCPD- and 3-MCPD dipalmitate-induced proteomic changes in rat liver[J]. Food Chem Toxicol, 2015, 86: 374-384.
- [5] CHO W S, HAN B S, NAM K T, et al. Carcinogenicity study of 3-monochloropropane-1, 2-diol in Sprague-Dawley rats[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(9): 3172-3177.
- [6] YANG P, HU J, LIU J, et al. Ninety-day nephrotoxicity evaluation of 3-MCPD 1-monooleate and 1-monostearate exposures in male Sprague Dawley rats using proteomic analysis[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(9): 2765-2772.
- [7] 黄会娜. 食用植物油中 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的控制与脱除研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2020.
- [8] SYED PUTRA S S, BASIRUN W J, ELGHARBAWY A A M, et al. 3-Monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD): A review on properties, occurrence, mechanism of formation, toxicity, analytical approach and mitigation strategy[J]. J Food Meas Charact, 2023, 17(4): 3592-3615.
- [9] WEI T, LIU W, ZHENG Z, et al. Bibliometric analysis of research trends on 3-monochloropropane-1, 2-diol esters in foods[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(49): 15347-15359.
- [10] SUN C, WU N, KOU S, et al. Occurrence, formation mechanism, detection methods, and removal approaches for chloropropanols and their esters in food: An updated systematic review[J/OL]. Food Chem X, 2023, 17: 100529[2024-01-24]. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100529>.
- [11] 刘玉兰, 黄会娜, 范文鹏, 等. 小米糠(胚)制油及油脂品质研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(5): 44-49, 55.
- [12] 刘玉兰, 黄会娜, 王璐阳, 等. 大豆油吸附脱色过程氯离子含量变化及对脱臭油中 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯的影响[J]. 中国油脂, 2019, 44(10): 85-89.
- [13] FREUDENSTEIN A, WEKING J, MATTHÄUS B. Influence of precursors on the formation of 3-MCPD and glycidyl esters in a model oil under simulated deodorization conditions[J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2013, 115(3): 286-294.
- [14] ŠMIDRKAL J, TESAŘOVÁ M, HRÁDKOVÁ I, et al. Mechanism of formation of 3-chloropropan-1, 2-diol (3-MCPD) esters under conditions of the vegetable oil refining[J]. Food Chem, 2016, 211: 124-129.

(下转第 64 页)

- [10] 盛灵芝, 曾巧华, 丘建峰, 等. 可食性涂膜保鲜技术在食品中的应用进展[J]. 广东化工, 2017, 44(12): 166-167.
- [11] SHUKLA R, CHERYAN M. Zein: The industrial protein from corn[J]. *Ind Crops Prod*, 2001, 13(3): 171-192.
- [12] 李萍, 张慧君, 郭浩, 等. 糖基化改性玉米醇溶蛋白膜的性能及硬胶囊体外释放分析[J]. 农业工程学报, 2021, 37(14): 302-309.
- [13] WANG Q, CHEN W, MA C, et al. Enzymatic synthesis of sodium caseinate - EGCG - carboxymethyl chitosan ternary film: Structure, physical properties, antioxidant and antibacterial properties [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 222: 509-520.
- [14] SHI K, KOKINI J L, HUANG Q. Engineering zein films with controlled surface morphology and hydrophilicity[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(6): 2186-2192.
- [15] CASALI D M, YOST M J, MATTHEWS M A. Eliminating glutaraldehyde from crosslinked collagen films using supercritical CO₂[J]. *J Biomedical Materials Res*, 2018, 106(1): 86-94.
- [16] 胡起华, 马传国, 陈小威, 等. 乙基纤维素油凝胶及其在食品中应用的研究进展[J]. 中国油脂, 2020, 45(1): 115-120.
- [17] ZAHEDI Y, GHANBARZADEH B, SEDAGHAT N. Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids[J]. *J Food Eng*, 2010, 100(1): 102-108.
- [18] 王立巧. 玉米醇溶蛋白的特性与应用[J]. 河北化工, 2011, 34(1): 37-39.
- [19] WU K, YAN X, ZHU D, et al. Formation and characterization of konjac glucomannan/ethyl cellulose films by using ethanol and water as the solvents[J/OL]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 241: 124629 [2024-03-25]. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124629>.
- [20] 任聪. 储藏条件对玉米醇溶蛋白膜的性能影响研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2021.
- [21] 李倩宇, 朱婷伟, 郭兴凤, 等. 基于包装油/盐的玉米醇溶蛋白膜中甘油迁移规律及变化机制[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2024, 45(2): 58-65.
- [22] 孙阳, 张利铭, 刘战丽, 等. 油酸对壳聚糖/玉米醇溶蛋白膜性能的影响[J]. 精细化工, 2019, 36(12): 2378-2384.
- [23] 贾祥祥. 制备条件对玉米醇溶蛋白膜性能的影响研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2012.
- [24] LU H, WANG Q, LI G, et al. Electrospun water-stable zein/ethyl cellulose composite nanofiber and its drug release properties[J]. *Mater Sci Eng C*, 2017, 74: 86-93.
- [25] 马欣. 负载生育酚的乙基纤维素颗粒在高温油脂中的抗氧化作用[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2021.
- [26] NIU B, ZHAN L, SHAO P, et al. Electrospinning of zein-ethyl cellulose hybrid nanofibers with improved water resistance for food preservation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 142: 592-599.

(上接第 42 页)

- [15] 王风艳, 周澍堃, 刘孟涛, 等. 食用油加工过程中 3-氯丙醇脂肪酸酯生成的影响因素研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(10): 106-110, 122.
- [16] LI C, LI L, JIA H, et al. Formation and reduction of 3-monochloropropane-1, 2-diol esters in peanut oil during physical refining[J]. *Food Chem*, 2016, 199: 605-611.
- [17] SHIMIZU M, VOSMANN K, MATTHÄUS B. Generation of 3-monochloro-1, 2-propanediol and related materials from tri-, di-, and monoolein at deodorization temperature[J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2012, 114(11): 1268-1273.
- [18] 刘玉兰, 王璐阳, 马宇翔, 等. 不同油脂精炼过程中氯离子、3-氯丙醇酯和缩水甘油酯含量的变化[J]. 中国油脂, 2020, 45(10): 10-15.
- [19] 黄会娜, 刘玉兰, 刘配莲, 等. 工艺软水中氯离子含量对油脂中氯离子、3-氯丙醇酯和缩水甘油酯含量的影响[J]. 中国油脂, 2021, 46(7): 92-98.
- [20] 王升帆, 王庭, 郝锋剑, 等. 固定化脂肪酶催化制备甘油三酯型鱼油[J]. 中国油脂, 2021, 46(8): 97-100, 109.
- [21] 刘书成, 鲁海龙, 张林尚, 等. 酶在油脂制取、精炼与改性中的应用[J]. 中国油脂, 2023, 48(12): 31-39.
- [22] DIAS A N, CERQUEIRA M B R, DE MOURA R R, et al. Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography[J]. *Fuel*, 2012, 94: 178-183.
- [23] 吕亚萍. 蓖麻油基表面活性剂的制备研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2021.
- [24] 刘瑶, 高彤, 张浩, 等. 气相色谱-串联质谱法同时测定食用油脂中 3-氯丙醇酯和缩水甘油酯[J]. 中国油脂, 2025, 50(2): 87-94.