

## 生物工程

## 响应面优化脂肪酶催化合成三棕榈酸甘油酯

徐坤华<sup>1</sup>,王东铭<sup>2</sup>,葛赞<sup>1</sup>,史立文<sup>1</sup>,计晓黎<sup>1</sup>,雷小英<sup>1</sup>,李伏益<sup>1</sup>,耿二欢<sup>1</sup>

(1. 赞宇科技集团股份有限公司,杭州 310030; 2. 浙江公正检验中心有限公司,杭州 310030)

**摘要:**以单因素实验为基础,采用响应面法优化脂肪酶 CalB immo Plus 在无溶剂体系中催化棕榈酸和甘油酯化反应合成三棕榈酸甘油酯工艺。结果表明:最佳合成工艺条件为反应时间 12.8 h、底物摩尔比 2.9:1、反应温度 75℃、加酶量 4.4%,在此条件下,酯化率和甘三酯含量分别为 95.44% 和 85.75%。

**关键词:**脂肪酶 CalB immo Plus;三棕榈酸甘油酯;响应面法;酯化

中图分类号:Q814.9;O621.3 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)11-0105-05

### Optimization of lipase – catalyzed synthesis of tripalmitin by response surface methodology

XU Kunhua<sup>1</sup>, WANG Dongming<sup>2</sup>, GE Zan<sup>1</sup>, SHI Liwen<sup>1</sup>, JI Xiaoli<sup>1</sup>, LEI Xiaoying<sup>1</sup>, LI Fuyi<sup>1</sup>, GENG Erhuan<sup>1</sup>

(1. Zanyu Technology Group Co., Ltd., Hangzhou 310030, China; 2. Zhejiang Gongzheng Inspection Center Co., Ltd., Hangzhou 310030, China)

**Abstract:**Based on single factor experiment, the synthesis process of tripalmitin (PPP) from palmitic acid and glycerol by CalB immo Plus lipase catalysis in a solvent free system was optimized by response surface methodology. The results showed that the optimal synthesis process conditions were obtained as follows: reaction time 12.8 h, molar ratio of palmitic acid to glycerol 2.9:1, reaction temperature 75℃ and enzyme dosage 4.4%. Under these conditions, the esterification rate and the triglycerol content were 95.44% and 85.75%, respectively.

**Key words:**CalB immo Plus lipase; tripalmitin; response surface methodology; esterification

三棕榈酸甘油酯(PPP),又称三软脂酸甘油酯或棕榈精,是一种重要的甘三酯<sup>[1]</sup>,被广泛应用于化妆品、食品、制药等领域<sup>[2-4]</sup>。在化妆品行业中,PPP可用作粉底或片剂的润滑剂,还可作为稠度调节剂、成核剂等<sup>[5]</sup>;在食品行业中,PPP是理想的乳脂添加剂,还能用于食用薄膜<sup>[6]</sup>;在制药行业中,PPP常用作药物转运替代载体<sup>[7-9]</sup>。此外,PPP还是一种重要的中间体,用于制备1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(OPO)等重要结构脂<sup>[10-12]</sup>。

目前,甘三酯的制备方法主要有化学法、物理法、微生物法和酶法。化学法需要碱或固体酸作为催化剂,具有产品特异性差、污染严重、后期处理成

本高等局限性<sup>[13]</sup>。物理法主要是通过萃取分离的原理,已有从银杏叶、卫矛等提取的报道<sup>[14-15]</sup>,但产品得率低,且存在有机溶剂残留等问题。Amer等<sup>[16]</sup>利用 *Sphingomonas* sp. EGY1 DSM 29616 菌株发酵 34 h 后,得到了 PPP 和三油酸甘油酯(OOO)的混合物,含量达 13.8 g/L。发酵法制备甘三酯,产品天然无污染,但含较多的其他代谢产物,且耗时长。而酶法具有很高的选择性和专一性,且反应条件温和,制备的产品纯度高。Yang等<sup>[17]</sup>利用脂肪酶 Novozym-435 催化中长碳链脂肪酸与甘油进行酯化反应,在温度 90℃、加酶量 4.80%、脂肪酸与甘油摩尔比 3:1、反应时间 12.37 h 条件下,产物得率可达 93.54%。Arifin等<sup>[18]</sup>研究了利用 Lipozyme RM IM 脂肪酶,酶促催化癸酸、硬脂酸与甘油的酯化反应,得率分别为 95.07%、93.15%。Martinez等<sup>[19]</sup>使用

收稿日期:2018-03-21;修回日期:2018-08-23

作者简介:徐坤华(1985),男,博士,研究方向为油脂和表面活性剂的应用(E-mail) huawei845@163.com。

南极假丝酵母脂肪酶催化共轭亚油酸和甘油反应,酯化率可达90%以上。

脂肪酶 CalB immo Plus 是将重组南极假丝酵母脂肪酶吸附固定化在大孔吸附树脂 ECR1030M 上,降低了固定化酶在机械搅拌时的破碎率,延长了脂肪酶的使用寿命<sup>[20]</sup>。该酶对众多脂类物质具有较高的催化活性,尤其适用于长链脂肪酸的酶促反应<sup>[21-22]</sup>。本文利用脂肪酶 CalB immo Plus 催化棕榈酸和甘油进行酯化反应,并通过响应面法进行工艺优化,为酶促催化合成 PPP 提供一种新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

PPP 标准品(纯度 $\geq 99\%$ ),三十七烷酸甘油酯标准品(纯度 $\geq 99\%$ ),三硬脂酸甘油酯标准品(纯度 $\geq 99\%$ ),购自 Sigma - Aldrich (中国);脂肪酶 CalB immo Plus,购自英国 Purolite 公司;棕榈酸,工业级,购自泰柯棕化(张家港)有限公司;甘油(纯度 $\geq 99\%$ ),工业级;正己烷,色谱纯;无水硫酸钠,分析纯。

7890B 气相色谱仪(配 FID 检测器),美国 Agilent 公司;HZQ - F160 恒温振荡培养箱;试管涡旋振荡器;AL204 分析天平,瑞士梅特勒 - 托利多公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 PPP 的合成

准确称取(100 $\pm$ 0.01)g 棕榈酸,在一定的底物摩尔比(棕榈酸与甘油摩尔比,下同)、反应时间、反应温度和加酶量(以棕榈酸的质量计,下同)的条件下,用脂肪酶 CalB immo Plus 催化棕榈酸和甘油进行酯化反应。反应效果以酯化率(Y)和甘三酯含量(TG)表示。

$$Y = \frac{X_1 m_1 - X_2 m_2}{X_1 m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $X_1$  为样品反应前的酸值(KOH),mg/g; $m_1$  为反应前的底物总质量,g; $X_2$  为样品反应后的酸值(KOH),mg/g; $m_2$  为反应后的底物总质量,g。

$$TG = \frac{m_{\text{甘三酯}}}{m_{\text{总}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $m_{\text{甘三酯}}$  为反应后样品中甘三酯的质量,g; $m_{\text{总}}$  为棕榈酸和甘油的总质量,g。

#### 1.2.2 PPP 的含量分析

利用气相色谱仪(高温柱)对产物成分进行检测,分析产物中 PPP 的含量。气相色谱仪分析条件:氢火焰离子化检测器;DB - 1ht 毛细管柱(30 m $\times$ 250  $\mu\text{m}$  $\times$ 0.1  $\mu\text{m}$ );柱初始温度 300 $^{\circ}\text{C}$ ,保持 3 min,10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温到 350 $^{\circ}\text{C}$ ,保持 20 min;进样口温度

380 $^{\circ}\text{C}$ ;分流比 50:1;检测器温度 370 $^{\circ}\text{C}$ ;高纯氮气流速 3.0 mL/min,氢气流速 35 mL/min,空气流速 350 mL/min。

### 1.2.3 数据处理

采用 Design Expert 8.0.6 软件对实验数据进行显著性检验及方差分析。 $p < 0.05$  表示具有显著性差异, $p < 0.01$  表示具有极显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

#### 2.1.1 反应时间的影响

在底物摩尔比 3:1、反应温度 65 $^{\circ}\text{C}$ 、加酶量 1% 的条件下,研究反应时间对酯化效果的影响,结果见图 1。

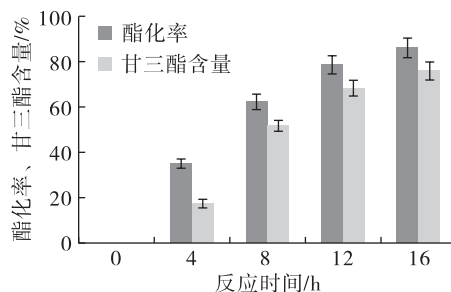


图 1 反应时间对酯化效果的影响

由图 1 可知,随着反应时间的延长,酯化率和甘三酯含量均增加。当反应时间为 12 h 时,酯化率和甘三酯含量分别为 78.69% 和 68.12%;当继续延长反应时间至 16 h 后,酯化率和甘三酯含量分别为 86.05% 和 75.82%,增长幅度降低;说明反应时间对正反应的贡献率逐渐减小。综合考虑,确定较适宜的反应时间为 12 h。

#### 2.1.2 底物摩尔比的影响

在反应时间 12 h、反应温度 65 $^{\circ}\text{C}$ 、加酶量 1% 的条件下,研究底物摩尔比对酯化效果的影响,结果见图 2。

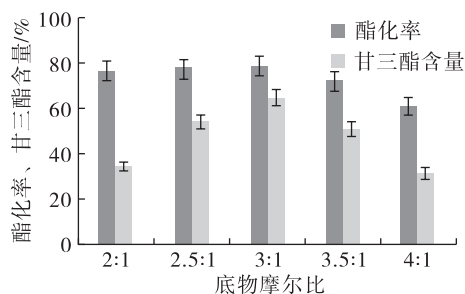


图 2 底物摩尔比对酯化效果的影响

由图 2 可知,当棕榈酸与甘油的摩尔比为 2:1 ~ 3:1 时,酯化率均保持在较高的水平,分别为 76.68%、78.10% 和 78.69%。这是由于棕榈酸与甘油进行酯化反应的理论摩尔比为 3:1,当摩尔比小于 3:1

时,过量的甘油会促进酯化反应向正方向进行。因此,酯化率保持在较高的水平。随着底物摩尔比继续增大(摩尔比大于3:1),棕榈酸过量,酯化率逐渐减小。

甘三酯含量则随着底物摩尔比的增加呈现先增大后减小的趋势。这是因为在整个酯化反应过程中会产生甘一酯、甘二酯和甘三酯,随着棕榈酸的增加,部分甘一酯和甘二酯转化成了甘三酯;但当棕榈酸过量后,过量的棕榈酸不参加反应,导致了甘三酯在整个体系中的比例减少。因此,确定较适宜的底物摩尔比为3:1。

### 2.1.3 反应温度的影响

在底物摩尔比3:1、反应时间12 h、加酶量1%的条件下,研究反应温度对酯化效果的影响,结果见图3。

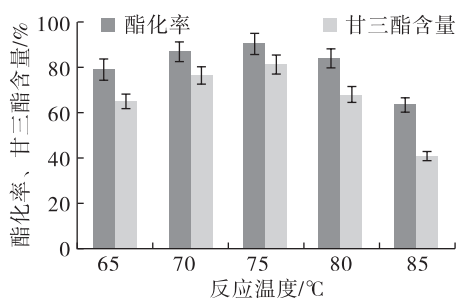


图3 反应温度对酯化效果的影响

由图3可知,随着反应温度的升高,酯化率和甘三酯含量均呈现出先增加后减小的趋势,在75℃时均达到最高,分别为87.01%和76.15%。这是因为酶促反应既有普通化学反应的特性,即升高温度可以加快反应速率;但由于酶的本质是蛋白质,升高温度会导致酶变性,在超过适宜反应温度时,反应速率随温度升高的效应将逐渐被酶变性效应抵消,从而导致反应速率下降。因此,确定较适宜的反应温度为75℃。

### 2.1.4 加酶量的影响

在底物摩尔比3:1、反应时间12 h、反应温度65℃的条件下,研究加酶量对酯化效果的影响,结果见图4。

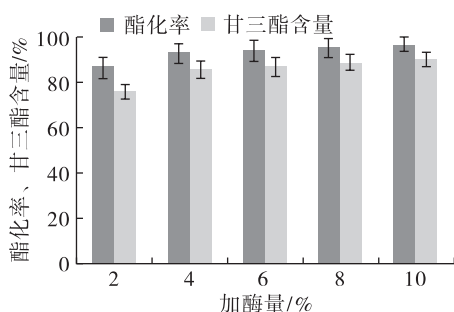


图4 加酶量对酯化效果的影响

由图4可知,随着加酶量的增加,酯化率和甘三酯含量增加,当加酶量达到4%时,酯化率和甘三酯含量分别为93.05%和85.88%;当加酶量继续增加至6%时,分别为94.15%和86.98%,增加幅度非常小。因此,确定较适宜的加酶量为4%。

## 2.2 响应面实验

在单因素实验的基础上,采用 Design Expert 8.0.6 软件进行响应面设计,以反应时间(A)、底物摩尔比(B)、反应温度(C)和加酶量(D)为自变量,以酯化率(Y)和甘三酯含量(TG)为响应值,设计四因素三水平的响应面实验。响应面实验因素水平见表1,响应面实验设计及结果见表2。

表1 响应面实验因素水平

水平	A/h	B	C/°C	D/%
-1	10	2.8:1	70	3
0	12	3.0:1	75	4
1	14	3.2:1	80	5

表2 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	Y/%	TG/%
1	-1	-1	0	0	90.04	58.97
2	1	-1	0	0	93.79	68.01
3	-1	1	0	0	81.56	74.45
4	1	1	0	0	85.34	89.07
5	0	0	-1	-1	90.55	46.66
6	0	0	1	-1	86.19	59.86
7	0	0	-1	1	93.91	90.23
8	0	0	1	1	91.07	88.43
9	-1	0	0	-1	78.97	39.64
10	1	0	0	-1	93.54	87.48
11	-1	0	0	1	94.94	90.34
12	1	0	0	1	96.05	94.14
13	0	-1	-1	0	94.09	68.28
14	0	1	-1	0	83.55	79.13
15	0	-1	1	0	93.98	62.32
16	0	1	1	0	83.67	86.08
17	-1	0	-1	0	88.86	71.14
18	1	0	-1	0	93.63	95.01
19	-1	0	1	0	89.38	72.74
20	1	0	1	0	93.20	83.62
21	0	-1	0	-1	89.64	65.50
22	0	1	0	-1	74.74	49.52
23	0	-1	0	1	95.36	72.01
24	0	1	0	1	84.81	83.74
25	0	0	0	0	93.05	90.81
26	0	0	0	0	94.60	90.33
27	0	0	0	0	93.86	90.98

## 2.2.1 酯化率的响应面模型

### 2.2.1.1 模型的建立和方差分析

各因素经回归拟合得到酯化率与反应时间、底物摩尔比、反应温度和加酶量的二次多项式回归模型:

$$Y = 93.84 + 2.65A - 5.27B - 0.59C + 3.54D + 0.01AB - 0.24AC - 3.37AD + 0.06BC + 1.09BD + 0.38CD - 1.21A^2 - 4.80B^2 - 0.86C^2 - 2.40D^2$$

该模型的方差分析如表3所示。

表3 酯化率方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	756.50	14	54.04	13.38	<0.000 1	**
A	84.27	1	84.27	20.86	0.000 6	**
B	333.17	1	333.17	82.47	<0.000 1	**
C	4.20	1	4.20	1.04	0.328 0	
D	150.59	1	150.59	37.28	<0.000 1	**
AB	0.00	1	0.00	0.00	0.994 2	
AC	0.23	1	0.23	0.06	0.817 2	
AD	45.29	1	45.29	11.21	0.004 8	**
BC	0.01	1	0.01	0.00	0.955 3	
BD	4.73	1	4.73	1.17	0.300 5	
CD	0.58	1	0.58	0.14	0.711 9	
A <sup>2</sup>	7.79	1	7.79	1.93	0.190 3	
B <sup>2</sup>	122.86	1	122.86	30.41	0.000 1	**
C <sup>2</sup>	3.95	1	3.95	0.98	0.342 1	
D <sup>2</sup>	30.71	1	30.71	7.60	0.017 4	*
残差	48.48	12	4.04			
失拟项	47.28	10	4.73	7.87	0.118 0	
误差项	1.20	2	0.60			
总和	804.97	26				

注: \* 表示显著,  $p < 0.05$ ; \*\* 表示极显著,  $p < 0.01$ 。下同。

由表3可知,模型  $p < 0.000 1$ , 极显著;且失拟项  $p = 0.118 0$ , 不显著;说明该回归方程模型达到了极显著的水平,4个因素与酯化率之间的模拟关系是可行的,误差小,可以应用该回归方程模拟代替实验真实点,对实验结果进行数据分析。由表3还可知,一次项A、B和D对酯化率的影响极显著,二次项B<sup>2</sup>对酯化率的影响极显著,二次项D<sup>2</sup>对酯化率的影响显著,交互项AD对酯化率的影响极显著。因此,各因素对酯化率的影响比较复杂,不是简单的线性关系。

### 2.2.1.2 响应面模型分析和最优点的确定

利用 Design Expert 软件进行岭脊分析,得到模型最佳点为:反应时间 12.78 h,底物摩尔比 2.91:1,反应温度 75.1℃,加酶量 4.39%。

## 2.2.2 甘三酯含量的响应面回归模型

### 2.2.2.1 模型的建立及方差分析

各因素经回归拟合得到甘三酯含量与反应时间、底物摩尔比、反应温度和加酶量的二次多项式回归模型:

$$TG = 84.91 + 2.48A - 4.35B - 0.55C + 3.32D + 0.02AB - 0.22AC - 3.15AD + 0.05BC + 1.04BD + 0.36CD - 1.13A^2 - 4.55B^2 - 0.81C^2 - 2.25D^2$$

该模型的方差分析如表4所示。

表4 甘三酯含量方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	601.61	14	42.97	12.08	<0.000 1	**
A	73.95	1	73.95	20.80	0.000 7	**
B	227.03	1	227.03	63.84	<0.000 1	**
C	3.69	1	3.69	1.04	0.328 8	
D	132.34	1	132.34	37.21	<0.000 1	**
AB	0.00	1	0.00	0.00	0.983 7	
AC	0.20	1	0.20	0.06	0.817 4	
AD	39.75	1	39.75	11.18	0.005 9	**
BC	0.01	1	0.01	0.00	0.955 4	
BD	4.37	1	4.37	1.23	0.289 5	
CD	0.51	1	0.51	0.14	0.712 4	
A <sup>2</sup>	6.79	1	6.79	1.91	0.192 1	
B <sup>2</sup>	110.38	1	110.38	31.04	0.000 1	**
C <sup>2</sup>	3.47	1	3.47	0.98	0.342 9	
D <sup>2</sup>	27.04	1	27.04	7.60	0.017 4	*
残差	42.67	12	3.56			
失拟项	41.62	10	4.16	7.89	0.117 6	
误差项	1.05	2	0.53			
总和	644.28	26				

由表4可知,模型  $p < 0.000 1$ , 极显著;且失拟项  $p = 0.117 6$ , 不显著;说明该回归方程模型达到了极显著的水平,4个因素与甘三酯含量之间的模拟关系是可行的,实验误差小,即可以应用该回归方程模拟代替实验真实点,对实验结果进行数据分析。由表4还可知,一次项A、B和D对甘三酯含量的影响极显著,二次项B<sup>2</sup>对甘三酯含量的影响极显著,二次项D<sup>2</sup>对甘三酯含量的影响显著,交互项AD对甘三酯含量的影响极显著。因此,各因素对甘三酯含量的影响比较复杂,不是简单的线性关系。

### 2.2.2.2 响应面模型分析和最优点的确定

利用 Design Expert 软件进行岭脊分析,得到模型的最佳点为:反应时间 12.78 h,底物摩尔比 2.91:1,反应温度 75.1℃,加酶量 4.39%。

### 2.2.3 响应面模型的验证

通过比较可以发现,酯化率和甘三酯含量达到最大值的最佳工艺条件相同。考虑实验的易操作

性,选取反应时间为 12.8 h,底物摩尔比为 2.9:1,反应温度为 75℃,加酶量为 4.4%。在最佳工艺条件下,进行 3 次平行实验,得到的酯化率分别为 95.10%、95.68% 和 95.54%,甘三酯含量分别为 85.96%、85.76% 和 85.54%;酯化率和甘三酯含量平均值分别为 95.44% 和 85.75%;而在该条件下酯化率和甘三酯含量的预测值分别为 96.39%,87.01%。实验误差小,证明通过响应面模型得到的数据是可行的。

### 3 结论

利用脂肪酶 CalB immo Plus 催化棕榈酸和甘油酯化反应合成三棕榈酸甘油酯,并通过响应面法优化,得到最佳条件为:反应时间 12.8 h,底物摩尔比 2.9:1,反应温度 75℃,加酶量 4.4%。在最佳条件下,酯化率和甘三酯含量的平均值分别为 95.44% 和 85.75%。

### 参考文献:

- [1] 孙宝国. 日用化工辞典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] GIRALDO L J L. Lipophilisation enzymatique de composés phénoliques et évaluation de leurs propriétés antioxydantes [J]. OCL - Ol Corps Gras Li, 2009, 16(4): 273 - 275.
- [3] OSBORN H T, AKOH C C. Structured lipids - novel fats with medical, nutraceutical, and food applications [J]. Compr Rev Food Sci F, 2010, 1(3): 110 - 120.
- [4] VOGELHUBER W, MAGNI E, MOUROI M, et al. Monolithic triglyceride matrices: a controlled - release system for proteins [J]. Pharm Dev Technol, 2003, 8(1): 71 - 79.
- [5] 蒋茂星. SAS - A 技术制备胰岛素微纳米颗粒及其复合微粒[D]. 福建 厦门: 厦门大学, 2008.
- [6] 朱明, 胡金莲, 王利平. 用电子显微镜和差热扫描仪等方法研究乳脂的结构和性质[J]. 冷饮与速冻食品工业, 1996(1): 22 - 23.
- [7] FANG W, MAYAMA H, TSUJII K. Spontaneous formation of fractal structures on triglyceride surfaces with reference to their super water - repellent properties [J]. J Phys Chem B, 2007, 111(3): 564 - 571.
- [8] CORTESI R, ESPOSITO E, LUCA G, et al. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds[J]. Biomaterials, 2002, 23(11): 2283 - 2294.
- [9] DLUSKA E, MARKOWSKA A. One - step preparation method of multiple emulsions entrapping reactive agent in the liquid - liquid Couette - Taylor flow [J]. Chem Eng Process, 2009, 48(1): 438 - 445.
- [10] WEI W, FENG Y, ZHANG Z, et al. Synthesis of structured lipid 1,3 - dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol in both solvent and solvent - free system [J]. LWT - Food Sci Technol, 2015, 60(2): 1187 - 1194.
- [11] LIU S, DONG X, WEI F, et al. Ultrasonic pretreatment in lipase - catalyzed synthesis of structured lipids with high 1,3 - dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol content [J]. Ultrason Sonochem, 2015, 23(3): 100 - 108.
- [12] 蒋与燕, 金子, 林影, 等. 酶法催化生产 1,3 - 二油酸 - 2 - 棕榈酸甘油三酯[J]. 现代食品科技, 2013, 29(5): 1048 - 1052.
- [13] 毕艳兰. 油脂化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [14] 陶冉. 银杏叶类脂分离、衍生物合成及其生物活性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.
- [15] 王腾华. 卫矛抗炎物质基础及其质量控制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [16] AMER N N, ELBAHLOUL Y, EMBABY A M, et al. The novel oleaginous bacterium *Sphingomonas* sp. EGY1 DSM 29616: a value added platform for renewable biodiesel [J]. World J Microb Biot, 2017, 33(7): 145.
- [17] YANG K, BI Y, SUN S, et al. Optimisation of Novozym - 435 - catalysed esterification of fatty acid mixture for the preparation of medium - and long - chain triglycerides (MLCT) in solvent - free medium [J]. Int J Food Sci Tech, 2014, 49(4): 1001 - 1011.
- [18] ARIFIN N, SOO - PENG K, LONG K, et al. Modeling and optimization of Lipozyme RM IM - catalyzed esterification of medium - and long - chain triacylglycerols (MLCT) using response surface methodology [J]. Food Bioprocess Tech, 2012, 5(1): 216 - 225.
- [19] MARTINEZ C E, VINAY J C, BRIEVA R, et al. Preparation of mono - and diacylglycerols by enzymatic esterification of glycerol with conjugated linoleic acid in hexane [J]. Appl Biochem Biotech, 2005, 125(1): 63 - 75.
- [20] BASSO A, FROMENT L, HESSELER M, et al. New highly robust divinyl benzene/acrylate polymer for immobilization of lipase CALB [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2013, 115(4): 468 - 472.
- [21] 朱艳飞, 杨博. CALB 脂肪酶在毕赤酵母中的组成型表达及纯化[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(10): 55 - 59.
- [22] 刘向前, 李道明, 王卫飞, 等. Lipozyme®CALB L 固定化及催化合成 EPA/DHA 甘油酯的研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(11): 21 - 26.