

酶促油酸与棕榈硬脂反应制备 OPO 工艺条件优化

雷祎晨, 祝振杰, 肖亚浩, 徐梦琪, 张林尚, 毕艳兰

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:为优化 Novozym 40086 酶在无溶剂体系下催化油酸与棕榈硬脂酯交换制备 OPO 工艺条件,以 OPO 含量、PPP 含量以及 sn-2 位棕榈酸占有所有棕榈酸含量作为指标,通过单因素实验考察加酶量、底物摩尔比、反应时间和反应温度对反应效果的影响,在考察加酶量时对脂肪酶重复利用次数进行了研究,并通过酶成本的核算确定了加酶量。在单因素实验的基础上,采用响应面实验对 OPO 制备工艺条件进行了优化。结果表明:单因素实验确定最佳加酶量为 6% (以总底物质量计),酶可重复利用 6 次;响应面实验得到制备 OPO 的最佳工艺条件为加酶量 6.3%、油酸与棕榈硬脂摩尔比 5.7:1、反应时间 5.2 h、反应温度 60 °C,在此条件下,制备的产品中 OPO 含量为 43.13%,PPP 含量为 7.65%,sn-2 位棕榈酸占有所有棕榈酸含量为 61.28%,产品符合 GB 30604—2015 要求。

关键词:OPO; 酯交换; 脂肪酶; 油酸; 棕榈硬脂; 酶成本

中图分类号:TQ641; TS218

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)04-0064-08

Optimization of enzymatic reaction of oleic acid and palm stearin to prepare OPO

LEI Yichen, ZHU Zhenjie, XIAO Yahao, XU Mengqi, ZHANG Linshang, BI Yanlan

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

Abstract: The aim was to optimize the technological conditions of preparing OPO by transesterification of oleic acid and palm stearate catalyzed by Novozym 40086 enzyme in solvent-free system. Taking OPO content, PPP content and the content of palmitic acid at sn-2 position in all palmitic acid as indicators, the effects of enzyme dosage, substrate molar ratio, reaction time and reaction temperature on the transesterification were investigated by single factor experiment. The reuse times of lipase was studied, and the lipase dosage was determined by calculating the cost of the enzyme. Based on the single factor experiment, the OPO preparation conditions were optimized using response surface methodology. The results showed that the optimal lipase dosage determined by single factor experiment was 6% (on the basis of total substrate mass), which could be reused for 6 times. The optimal OPO preparation conditions were obtained by response surface methodology as follows: dosage of enzyme 6.3%, molar ratio of oleic acid to palm stearate 5.7:1, reaction time 5.2 h, reaction temperature 60 °C. Under the optimal conditions, the content of OPO, PPP and palmitic acid at sn-2 position in all palmitic acid were 43.13%, 7.65% and 61.28%, respectively, which matched the requirements of GB 30604-2015.

Key words: OPO; transesterification; lipase; oleic acid; palm stearate; enzyme cost

1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(β -OPO, 常被简称为“OPO”)的结构与人乳脂相似,对婴儿

有多种有益作用,如平衡肠道健康、促进脂肪酸和钙吸收、提升骨骼密度等^[1-4]。2008年,《中华人民共和国食品卫生法》和《食品添加剂卫生管理办法》批准了 OPO 作为营养强化剂可用于婴幼儿配方食品的生产。采用不同原料合成 OPO 的研究报道很多。其中,棕榈硬脂与高纯度油酸是制备 OPO 的理想原料^[5]。采用酶法催化合成 OPO,其优点是反应条件温和,对环境友好,产品安全,并且脂肪酶很容易从

收稿日期:2021-12-14;修回日期:2022-01-15

基金项目:河南工业大学博士启动基金(2021BS015)

作者简介:雷祎晨(1996),女,硕士研究生,研究方向为油脂化学(E-mail)1091566450@qq.com。

通信作者:毕艳兰,教授(E-mail)bylzy@126.com;张林尚,博士(E-mail)linshangzhang@qq.com。

产物中分离出来^[6-8]。

酶法合成 OPO 的方法可以分为酯化法和酯交换法。酯化法通常需要两步完成:先将 sn-2 位富含棕榈酸的油脂和乙醇进行醇解反应得到 sn-2 位富含棕榈酸的甘一酯;再将甘一酯与油酸在 sn-1, 3 位专一性脂肪酶的催化下酯化合成 OPO。Liu 等^[9]以 PPP 和油酸为原料,采用脂肪酶 *Candida* sp. 99-125 催化酯化法制备了 OPO, OPO 产率达到 85.06%, sn-2 位棕榈酸含量达到 80.17%。此方法合成 OPO 的纯度较高,但是工艺较复杂,并且中间产物 sn-2 位棕榈酸甘一酯需分离纯化,增加了生产成本。酯交换法可分为酸解法和转酯法。酸解法多采用 sn-2 位富含棕榈酸的油脂和油酸为底物,在 sn-1, 3 位专一性脂肪酶的作用下进行反应,此方法可制备出纯度高且副产物少的产品。Wang 等^[10]以棕榈硬脂与油酸(纯度 85%)和亚油酸(纯度 65%)为原料采用脂肪酶 NS40086 催化酸解法制备富含 OPO 和 OPL 的甘三酯,得到 OPO 和 OPL 联合收率为 69.26% 的产品, sn-2 位棕榈酸的相对含量达到 71.07%。转酯法为两种甘三酯或甘三酯与简单酰基酯之间发生酰基交换反应,此方法相比于酸解法而言利用率低,并且产物分离较困难,研究相对较少。综合比较,酸解法制备 OPO 为最经济有效的方法。

在酶法催化制备 OPO 反应过程中同时伴随着副反应,包括甘三酯水解生成甘二酯、甘一酯、脂肪酸,以及 OPO 发生酰基迁移转化成 POO 等^[11]。因此,GB 30604—2015《食品安全国家标准 食品营养强化剂 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯》理化指标中明确规定了 OPO 含量($\geq 40\%$)、三棕榈酸甘油酯(PPP)含量($< 10\%$)和 sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸的含量($\geq 52\%$)。

酶法合成 OPO 的主要成本来源之一是脂肪酶,脂肪酶昂贵的价格是生产 OPO 产品必须考虑的问题,脂肪酶的可重复利用次数越多,其生产成本就越低。因此,研究脂肪酶的可重复利用性具有重要意义。本研究旨在优化 Novozym 40086 酶催化油酸与棕榈硬脂制备 OPO 的工艺条件,特别是在加酶量的选择上考虑脂肪酶的可重复利用次数,以期工业应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

油酸(纯度 77.58%),阿拉丁试剂(上海)有限公司;棕榈硬脂(熔点 62℃,酸值(KOH)0.34 mg/g,过氧化值 4.40 mmol/kg,水分及挥发物含量 0.20%),丰益(上海)生物技术研发有限公司;Novozym 40086 酶(sn-1, 3 位专一性脂肪酶,来源

于米赫根毛酶,载体为树脂,酶活为 275 IUN/g),丹麦诺维信公司。正己烷,色谱纯;甲醇、乙醚、盐酸、无水硫酸钠,均为分析纯;薄层层析硅胶,化学纯;猪胰脂酶,自制。

Agilent 7890B、8860 气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器;BSA224S 分析天平(0.000 1 g);TDL-80-2B 离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 OPO 的制备

称取油酸与棕榈硬脂共 25 g 于圆底烧瓶中,在油浴磁力搅拌(400 r/min)下混合互溶后,加入一定量的 Novozym 40086 酶开始反应,一定时间后停止反应,离心除去脂肪酶得到反应产物。

1.2.2 OPO 含量和 PPP 含量的测定

参考宗蕾等^[12]的方法测定 OPO 含量和 PPP 含量。取 70 mg 反应产物溶于 1 mL 正己烷中,加入无水硫酸钠除水后,采用气相色谱仪分析其甘三酯组成,采用峰面积归一化法计算 OPO 和 PPP 占总甘三酯的相对含量。

气相色谱条件:Agilent 7890B 气相色谱仪;DB-1ht 色谱柱(30.0 m \times 250 μ m \times 0.1 μ m);载气为高纯氮气,流速 3 mL/min;进样口温度 350℃;升温程序为初始温度 100℃,以 50℃/min 升至 300℃,保持 5 min,以 20℃/min 升至 360℃,保持 15 min;氢火焰离子化检测器温度 350℃;分流比 20:1;进样量 1 μ L。

1.2.3 sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量的测定

1.2.3.1 总脂肪酸组成的测定

先采用薄层色谱法将反应产物中的甘三酯分离出来,然后参考 GB 5009.168—2016,对甘三酯进行甲酯化处理,采用气相色谱分析样品的脂肪酸组成,采用峰面积归一法定量,计算得到总棕榈酸含量。

气相色谱条件:Agilent 8860 气相色谱仪;SGE BPX-70 色谱柱(30.0 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m);载气为高纯氮气,流速 1 mL/min;进样口温度 250℃;升温程序为初始温度 170℃,以 2℃/min 升至 210℃;氢火焰离子化检测器温度 300℃;分流比 20:1;进样量 1 μ L。

1.2.3.2 sn-2 位脂肪酸组成的测定

先采用薄层色谱法将反应产物中的甘三酯分离出来,采用正己烷和甲醇萃取后,参考 GB/T 24894—2010 测定样品的 sn-2 位脂肪酸组成。先将样品进行猪胰脂酶水解处理,然后离心,取上清水解液点板,用展开剂(正己烷-乙醚-甲酸,体积比 70:30:1)展开,展开完全后,取出晾干,用 2', 7'-二

氯荧光素显色,刮下甘一酯条带,甲酯化后进行气相色谱分析。气相色谱条件同 1.2.3.1。采用峰面积归一化法定量,得到 sn-2 位棕榈酸含量。

sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量(w)按式(1)计算。

$$w = c_1 / (3 \times c_2) \times 100\% \quad (1)$$

式中: c_1 、 c_2 分别为 sn-2 位棕榈酸含量和总棕榈酸含量。

1.2.4 数据处理

实验平行重复两次,结果用“平均值 ± 标准偏差”表示。采用 SPSS 软件对实验数据进行单因素方差分析(Duncan 检验), $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 棕榈硬脂的主要组成(见表 1)

表 1 棕榈硬脂的主要组成

项目	原料	GB 30604—2015
OPO 含量/%	10.69 ± 0.04	≥40
PPP 含量/%	58.40 ± 0.12	<10
sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量/%	32.53 ± 1.58	≥52

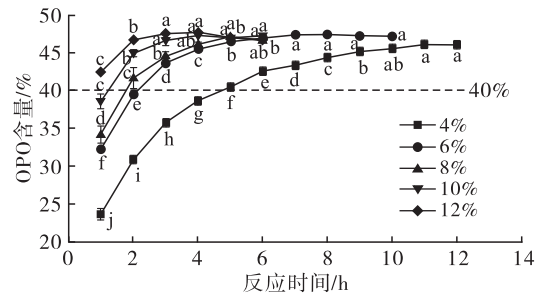
由表 1 可见,棕榈硬脂中 OPO 含量为 10.69%, PPP 含量为 58.40%, sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸的含量为 32.53%,与 OPO 的国家标准相比,需要提高 OPO 含量、降低 PPP 含量、提高 sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量。

2.2 酶法催化制备 OPO 单因素实验

2.2.1 加酶量的影响

脂肪酶是催化酯交换反应制备 OPO 的重要催化剂,加酶量影响反应效率和生产成本。在油酸与棕榈硬脂摩尔比 8:1,加酶量分别为 4%、6%、8%、10%、12% (以底物总质量计),反应温度 60 °C 条件下制备 OPO,反应过程中每隔 1 h 取样分析产物中 OPO 及 PPP 含量变化情况,结果如图 1 及图 2 所示。

由图 1 可知,在相同的加酶量下,随着反应时间的延长,OPO 含量逐渐增加。根据 GB 30604—2015 规定,OPO 含量需大于或等于 40%。加酶量为 4% 反应 5 h 时,OPO 含量为(40.53 ± 0.13)%,而反应 10 h 时才达到平衡;随着加酶量的增加,反应速度加快,加酶量为 6%、8%、10% 和 12% 时,OPO 含量达到平衡的时间分别为 6、4、3 h 和 3 h,平衡时 OPO 含量分别为(47.02 ± 0.08)%、(46.11 ± 0.24)%、(46.66 ± 0.69)% 和(47.58 ± 0.08)%,均符合国家标准。这说明较低的加酶量会降低反应效率,提高酶用量会加快反应效率,与 Zheng 等^[13]的研究结果一致。



注:图中不同的小写字母代表反应时间对指标的影响有显著性差异($P < 0.05$)。下同

图 1 加酶量对 OPO 含量的影响

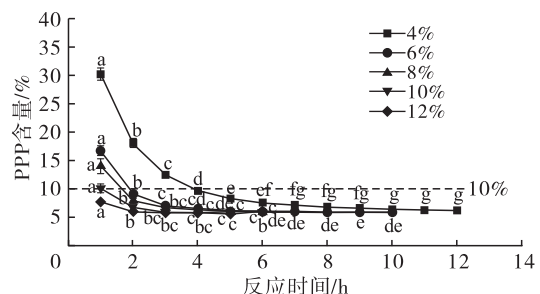


图 2 加酶量对 PPP 含量的影响

由图 2 可知,在相同的加酶量下,随着反应时间的延长,PPP 含量逐渐减少。根据 GB 30604—2015 规定,PPP 含量需低于 10%。加酶量为 4% 反应 7 h 时达到平衡,PPP 含量为(7.22 ± 0.03)%。加酶量为 6% 反应 5 h 时达到平衡,PPP 含量为(6.21 ± 0.19)%。加酶量为 8%、10% 和 12% 时,反应速度加快,PPP 含量达到平衡的时间均为 3 h,平衡时 PPP 含量分别为(6.75 ± 0.11)%、(5.98 ± 0.20)% 和(5.89 ± 0.12)%,均符合国家标准。

分析了 OPO 和 PPP 含量满足要求的样品中的 sn-2 位脂肪酸组成情况,结果见图 3。

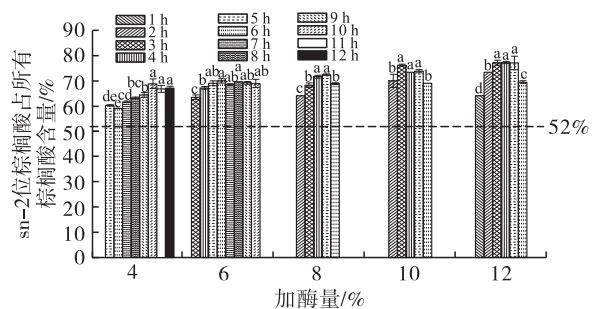


图 3 不同反应时间下加酶量对 sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量的影响

由图 3 可知:加酶量为 4% 和 6% 时,随着反应时间的延长,sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量呈现先增加后稳定的趋势;而加酶量为 8%、10% 和 12% 时,随着反应时间的延长,sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量呈现先增加后减少的趋势,说明延长反应时间促进了酰基迁移的发生。另外,随着加酶

量的增加,sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量达到平衡的时间缩短。

根据GB 30604—2015规定,sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量需大于或等于52%,从图3可看出,所测试样品的结果均符合要求。加酶量为4%反应10 h达到平衡时,sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量为(69.08±1.90)%;加酶量为6%、8%、10%和12%时,sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量达到平衡的反应时间分别为5、4、3 h和3 h,此时sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量分别为(69.17±1.00)%、(71.87±0.59)%、(76.41±0.37)%和(77.90±0.18)%。可见较高的加酶量可缩短反应

达到平衡的时间,从而降低酰基迁移的速率。

加酶量10%和12%相比,制备的产品组成(OPO含量分别为(46.66±0.69)%和(47.58±0.08)%、PPP含量分别为(5.98±0.20)%和(5.89±0.12)%、sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量分别为(76.41±0.37)%和(77.90±0.18)%)相似,且反应达到平衡的时间一致。因此,从生产成本方面考虑,加酶量12%不适合作为优选的条件。

选择4%、6%、8%和10%的加酶量,考察脂肪酶重复利用情况(按1.2.1方法每批反应结束后,离心分离出脂肪酶,在室温下干燥后在下一批次中使用),结果见表2。

表2 不同加酶量下酶的重复利用情况

重复次数	项目	加酶量4%	加酶量6%	加酶量8%	加酶量10%
第1次	OPO含量/%	44.53±0.24	47.46±0.34	47.42±0.25	47.98±0.08
	PPP含量/%	6.80±0.02	5.97±0.33	6.04±0.04	5.96±0.03
	sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量/%	63.62±0.28	65.95±2.77	68.59±0.08	69.76±0.34
第2次	OPO含量/%	44.27±0.57	44.52±0.33	46.64±0.50	46.47±0.29
	PPP含量/%	6.89±0.15	6.80±0.18	5.92±0.20	6.33±0.10
	sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量/%	63.53±0.59	65.86±3.71	67.44±0.33	67.46±0.75
第3次	OPO含量/%	42.46±0.56	45.74±0.74	46.07±0.06	45.91±0.20
	PPP含量/%	7.56±0.22	6.50±0.14	6.22±0.01	6.62±0.13
	sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量/%	61.30±1.12	66.55±1.19	65.55±0.08	65.71±0.11
第4次	OPO含量/%	35.94±1.17	44.56±0.96	45.75±0.00	45.99±0.07
	PPP含量/%	11.09±0.84	6.80±0.19	6.34±0.09	6.34±0.06
	sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量/%		63.92±1.19	66.12±0.02	66.24±0.45
第5次	OPO含量/%		42.23±1.37	43.90±0.45	44.86±0.11
	PPP含量/%		7.52±0.59	7.13±0.16	6.86±0.05
	sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量/%		60.37±1.70	62.99±0.37	63.94±0.28
第6次	OPO含量/%		40.54±1.88	42.87±0.34	43.54±0.11
	PPP含量/%		8.45±0.96	7.46±0.02	7.04±0.06
	sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量/%		59.30±2.96	62.76±0.54	62.40±0.06
第7次	OPO含量/%		37.44±2.85	40.81±0.21	42.52±0.20
	PPP含量/%		10.35±2.11	8.36±0.10	7.53±0.04
	sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量/%			59.84±0.02	62.21±0.44
第8次	OPO含量/%			39.51±1.11	40.39±0.79
	PPP含量/%			9.55±0.67	8.76±0.42
	sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量/%				58.76±1.05
第9次	OPO含量/%				39.49±1.09
	PPP含量/%				9.28±0.49
	sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量/%				

注:加酶量4%、6%、8%、10%时的反应时间分别为10、6、4、3 h。

由表 2 可知:加酶量 4% 反应 10 h 脂肪酶可重复利用 3 次,即制备 3 批次合格的产品共需 30 h;加酶量 6% 反应 6 h 脂肪酶可重复利用 6 次,共 36 h;加酶量 8% 反应 4 h 脂肪酶可重复利用 7 次,共 28 h;加酶量 10% 反应 3 h 脂肪酶可重复利用 8 次,共 24 h。

从生产成本考虑选择适宜加酶量:假设工厂一次反应投料 1 t (油酸和棕榈硬脂总质量),1 t 反应底物可生产 0.22 t OPO 产品(产品收率是实验室测定换算而得)。因原料成本相同,只计算酶的成本。假设工厂一年生产 300 d,每天生产 12 h,则一年共生产 3 600 h,加酶量 4%、6%、8%、10% 在一年内需要添加脂肪酶的次数则分别为 120、100、129 次和 150 次。由于生产时间相同(一年),在不考虑水、电及工人工资的情况下,假设工厂用 Novozym 40086 酶的价格 A 元/kg,则每生产 1 t OPO 产品,加酶量 4%、6%、8%、10% 时酶的成本核算(酶成本 = (脂肪酶添加次数 × 一次投料量 1 000 × 加酶量 × 酶的价格) / (脂肪酶添加次数 × 酶重复利用次数 × 0.22)) 分别为 60.61A、45.45A、51.95A、56.82A 元,加酶量 4%、8%、10% 时酶的生产成本分别是加酶量为 6% 时的 1.33、1.14、1.25 倍。说明加酶量为 6% 的综合生产成本最低,8%、10% 次之,成本最高的是 4%。该研究结果与 Wei^[14]、李世磊^[15]、Zou^[16] 等研究结果有所不同,主要是因为这些研究均只考虑缩短反应时间,没有全面考虑脂肪酶重复利用次数,特别是不同添加量下脂肪酶的重复利用次数差异很大所致。综合考虑,选择加酶量为 6%。

2.2.2 底物摩尔比的影响

在油酸与棕榈硬脂摩尔比分别为 4:1、6:1、8:1、10:1、12:1,加酶量 6%,反应温度 60℃ 条件下,制备 OPO,反应过程中每隔 1 h 取样分析产物中 OPO 含量、PPP 含量及 sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量(对于 OPO 和 PPP 含量满足国家标准的才分析 sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量,下同)变化情况,结果分别如图 4~图 6 所示。

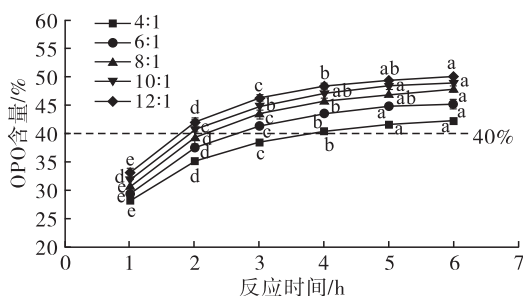


图 4 底物摩尔比对 OPO 含量的影响

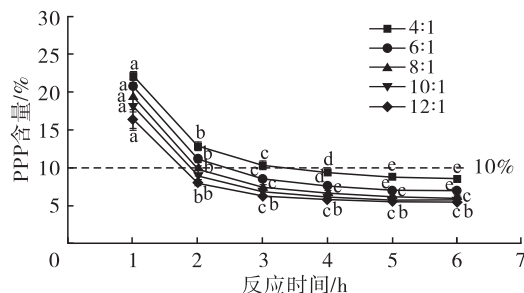


图 5 底物摩尔比对 PPP 含量的影响

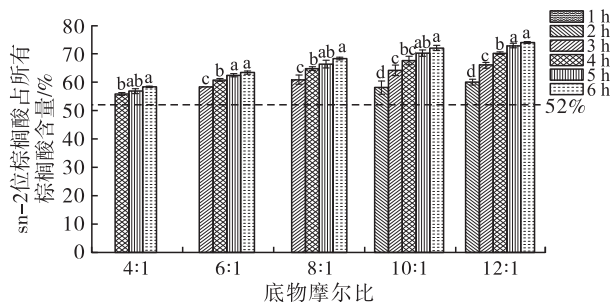


图 6 底物摩尔比对 sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量的影响

由图 4 可知:在相同的底物摩尔比下,随着反应时间的延长,OPO 含量逐渐增加,底物摩尔比分别为 4:1、6:1、8:1 和 12:1 时,OPO 含量均在 5 h 时达到平衡,此时 OPO 含量分别为(41.65 ± 0.17)%、(44.87 ± 0.07)%、(46.93 ± 0.15)% 和 (49.46 ± 0.07)%;底物摩尔比 10:1 反应 4 h 时达到平衡,此时 OPO 含量为(47.15 ± 0.78)%。在相同反应时间下,随着底物摩尔比的增加,OPO 含量增加。这是因为酶促酯交换反应为可逆反应,较高的底物摩尔比有利于平衡向正反应方向移动。

由图 5 可知:在相同的底物摩尔比下,随着反应时间的延长,PPP 含量逐渐减少;随着底物摩尔比的增加,PPP 含量达到平衡的时间缩短。底物摩尔比为 4:1 和 6:1 时,PPP 含量均在 5 h 达到平衡,且含量分别为(8.81 ± 0.07)% 和 (6.95 ± 0.25)%;底物摩尔比为 8:1、10:1 和 12:1 时,PPP 含量达到平衡的时间分别为 3.2 h 和 3 h,其含量分别为(7.40 ± 0.34)%、(8.94 ± 1.33)% 和 (6.26 ± 0.15)%。这说明较高的底物摩尔比增加了酶与底物之间的反应效率,有利于 PPP 转化为 OPO,然而过高的底物摩尔比会增加油酸的含量从而增加生产成本。

由图 6 可知:在相同的底物摩尔比下,随着反应时间的延长,sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量逐渐增加,这一结果与 Nagachinta 等^[17] 研究结果类似;在底物摩尔比为 4:1、6:1、8:1、10:1 和 12:1 时,sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量均在 5 h 达到平衡,平衡时 sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量分别为(56.61 ± 0.89)%、(62.13 ± 0.53)%、(66.07 ±

1.40)%、(69.95 ± 1.10)%和(72.55 ± 0.82)%。考虑到较低的底物摩尔比可节省生产成本,选择底物摩尔比为6:1。

2.2.3 反应温度的影响

在油酸与棕榈硬脂摩尔比6:1,加酶量6%条件下,分别在50、60、70℃下制备OPO,反应过程中每隔1h取样分析OPO含量、PPP含量及sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量的变化情况,结果分别如图7~图9所示。

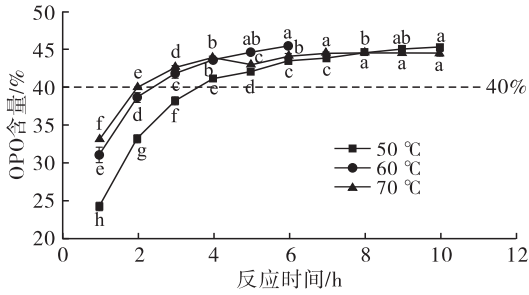


图7 反应温度对OPO含量的影响

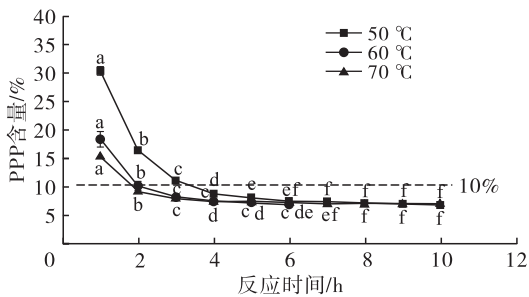


图8 反应温度对PPP含量的影响

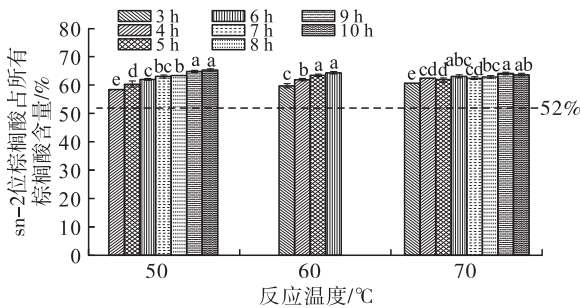


图9 反应温度对sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量的影响

由图7可知:在相同的反应温度下,随着反应时间的延长,OPO含量逐渐增加;当反应温度为50℃时,反应9h达到平衡,其产物中OPO含量为(45.06 ± 0.06)%;反应温度为60℃时,反应5h达到平衡,其产物中OPO含量为(44.63 ± 0.28)%;反应温度为70℃时,OPO含量先迅速增加再降低后缓慢增加,在7h时达到平衡,此时OPO含量为(44.45 ± 0.19)%。可能是较低的反应温度不利于提高脂肪酶的催化活性,而较高的温度破坏酶的结构,导致其不可逆失活,从而导致OPO含量降低^[18]。该研究结果与Wang等^[19]的研究结果相似。

由图8可知:在相同的反应温度下,随着反应时间的延长,PPP含量逐渐减少;反应温度50、60、70℃达到平衡的时间分别为6、3、7h,平衡时PPP含量分别为(7.46 ± 0.07)%、(8.23 ± 0.20)%和(6.99 ± 0.15)% ,均符合国家标准要求。

由图9可知,在相同的反应温度下,随着反应时间的延长,sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量逐渐增加,反应温度50、60℃和70℃时反应达到平衡的时间分别为9、5h和6h,平衡时sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量分别为(64.72 ± 0.38)%、(63.42 ± 0.22)%和(63.02 ± 0.48)% ,均符合国家标准要求。随着反应温度的提高,sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量增加的幅度变缓,说明较高的反应温度会增加酰基迁移的速率。综合考虑,选择反应温度为60℃。

2.3 酶法催化制备OPO响应面实验

在单因素实验的基础上,固定反应温度为60℃,采用Design Expert 8软件进行三因素三水平的响应面设计,以加酶量(A)、反应时间(B)、底物摩尔比(C)为因素,以OPO含量(Y₁)、PPP含量(Y₂)和sn-2位棕榈酸占有棕榈酸含量(Y₃)为响应值,对工艺条件进行优化。响应面实验因素及水平如表3所示,响应面实验设计及结果如表4所示。

表3 响应面实验因素及水平

水平	A/%	B/h	C
-1	4	4	4:1
0	6	5	6:1
1	8	6	8:1

表4 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /%
1	1	0	-1	42.12	8.45	58.95
2	1	0	1	46.46	6.35	69.04
3	-1	0	1	39.30	8.77	57.49
4	-1	1	0	39.19	9.21	56.15
5	-1	0	-1	35.29	12.07	51.43
6	0	-1	-1	38.70	10.03	55.02
7	0	1	-1	40.78	9.02	57.71
8	0	0	0	42.74	7.65	61.47
9	0	1	1	45.84	6.43	67.33
10	1	1	0	45.41	6.68	64.89
11	1	-1	0	44.17	7.24	62.83
12	0	0	0	43.15	7.56	61.11
13	0	0	0	43.86	7.26	61.62
14	0	0	0	43.82	7.40	62.24
15	-1	-1	0	36.11	11.78	52.04
16	0	0	0	44.58	7.19	63.56
17	0	-1	1	43.67	7.13	62.33

采用 Design Expert 8 软件对表 4 中的数据进行多元回归拟合,得到二次多项回归方程 $Y_1 = -22.51 + 8.59A + 7.14B + 3.69C - 0.23AB + 0.02AC + 0.01BC - 0.48A^2 - 0.48B^2 - 0.23C^2$, $Y_2 = 51.34 - 5.64A - 5.15B - 2.71C + 0.25AB + 0.07AC + 0.04BC + 0.26A^2 + 0.28B^2 + 0.12C^2$, $Y_3 = -9.03 + 8.77A + 9.77B + 0.84C - 0.26AB + 0.25AC + 0.29BC - 0.55A^2 - 0.82B^2 - 0.14C^2$ 。

对回归方程进行方差分析,结果分别如表 5、表 6、表 7 所示。

表 5 OPO 含量的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	173.89	9	19.32	56.71	<0.000 1
A	99.90	1	99.90	293.19	<0.000 1
B	9.17	1	9.17	26.93	0.001 3
C	42.20	1	42.20	123.84	<0.000 1
AB	0.84	1	0.84	2.48	0.159 6
AC	0.03	1	0.03	0.08	0.781 2
BC	0.00	1	0.00	0.00	0.946 0
A ²	15.75	1	15.75	46.21	0.000 3
B ²	0.95	1	0.95	2.80	0.138 2
C ²	3.47	1	3.47	10.18	0.015 3
残差	2.39	7	0.34		
失拟项	0.37	3	0.12	0.24	0.861 8
纯误差	2.02	4	0.50		
总和	176.28	16			

由表 5 可知,OPO 含量模型极显著 ($P < 0.000 1$),失拟项不显著 ($P > 0.05$),说明模型可信,可以预测 OPO 的含量。单因素对 OPO 含量的影响顺序为加酶量 > 底物摩尔比 > 反应时间。

表 6 PPP 含量的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	46.86	9	5.21	67.83	<0.000 1
A	21.49	1	21.49	279.95	<0.000 1
B	2.93	1	2.93	38.21	0.000 5
C	14.82	1	14.82	193.04	<0.000 1
AB	1.01	1	1.01	13.12	0.008 5
AC	0.36	1	0.36	4.68	0.067 2
BC	0.02	1	0.02	0.31	0.594 5
A ²	4.55	1	4.55	59.21	0.000 1
B ²	0.33	1	0.33	4.33	0.076 0
C ²	0.89	1	0.89	11.66	0.011 2
残差	0.54	7	0.08		
失拟项	0.39	3	0.13	3.38	0.134 8
纯误差	0.15	4	0.04		
总和	47.40	16			

由表 6 可知,PPP 含量模型极显著 ($P <$

$0.000 1$),失拟项不显著 ($P > 0.05$),说明模型可信,可以预测 PPP 含量。其中加酶量和反应时间的交互作用对 PPP 含量影响极显著,单因素对 PPP 含量的影响顺序为加酶量 > 底物摩尔比 > 反应时间。

表 7 sn-2 位棕榈酸占有所有棕榈酸含量的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	379.95	9	42.22	72.14	<0.000 1
A	186.26	1	186.26	318.27	<0.000 1
B	24.06	1	24.06	41.11	0.000 4
C	136.82	1	136.82	233.79	<0.000 1
AB	1.05	1	1.05	1.80	0.222 0
AC	4.06	1	4.06	6.94	0.033 7
BC	1.34	1	1.34	2.28	0.174 5
A ²	20.29	1	20.29	34.66	0.000 6
B ²	2.85	1	2.85	4.88	0.063 0
C ²	1.40	1	1.40	2.39	0.165 7
残差	4.10	7	0.59		
失拟项	0.39	3	0.13	0.14	0.929 7
纯误差	3.70	4	0.93		
总和	384.04	16			

由表 7 可知,sn-2 位棕榈酸占有所有棕榈酸含量模型极显著 ($P < 0.000 1$),失拟项不显著 ($P > 0.05$),说明模型可信,可以预测 sn-2 位棕榈酸占有所有棕榈酸含量。其中加酶量和底物摩尔比的交互作用对 sn-2 位棕榈酸占有所有棕榈酸含量影响显著,单因素对 sn-2 位棕榈酸占有所有棕榈酸含量的影响顺序为加酶量 > 底物摩尔比 > 反应时间。

利用 Design Expert 8 软件,综合考虑 3 个指标对制备 OPO 的最佳工艺条件进行预测,结果为加酶量 6.3% (以总底物质量计)、油酸与棕榈硬脂摩尔比 5.7:1、反应时间 5.2 h、反应温度 60℃。在最佳反应条件下进行验证实验,结果见表 8。

表 8 实验预测值与实际值比较

项目	GB 30604—2015	预测值	实际值
OPO 含量/%	≥40	43.90	43.13 ± 0.58
PPP 含量/%	<10	7.30	7.65 ± 0.16
sn-2 位棕榈酸占有所有棕榈酸含量/%	≥52	62.30	61.28 ± 0.51

由表 8 可知,在最佳反应条件下,产品中 OPO 含量为 43.13%,PPP 含量为 7.65%,sn-2 位棕榈酸占有所有棕榈酸含量为 61.28%,与预测值接近,表明响应面的分析结果可靠。

3 结论

本研究采用 Novozym 40086 酶催化油酸与棕榈硬脂反应制备 OPO,并在加酶量的选择上考虑了酶的重复利用次数和酶的成本。通过单因素实验和响

应面实验,得到最佳工艺条件为加酶量 6.3% (以总底物质量计),油酸与棕榈硬脂摩尔比 5.7:1、反应时间 5.2 h、反应温度 60℃。在最佳条件下,制备的产品中 OPO 含量为 43.13%,PPP 含量为 7.65%,sn-2 位棕榈酸占有棕榈酸含量为 61.28%,产品符合 GB 30604—2015 要求。

参考文献:

- [1] MU H, PORSGAARD T. The metabolism of structured triacylglycerols[J]. *Prog Lipid Res*, 2005, 44(6):430-448.
- [2] SRENSSEN A D M, XU X, LONG Z, et al. Human milk fat substitute from butter fat: production by enzymatic interesterification and evaluation of oxidative stability[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2010, 87(2):185-194.
- [3] WANG Y H, MAI Q Y, QIN X L, et al. Establishment of an evaluation model for human milk fat substitutes[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(1):642-649.
- [4] MILES E A, CALDER P C. The influence of the position of palmitate in infant formula triacylglycerols on health outcomes[J]. *Nutr Res*, 2017, 44:1-8.
- [5] PASTOR R, BOUZAS C, TUR J A. Beneficial effects of dietary supplementation with olive oil, oleic acid, or hydroxytyrosol in metabolic syndrome: systematic review and meta-analysis[J]. *Free Radical Bio Med*, 2021, 172:372-385.
- [6] SOUMANOU M M, MARLENE P, VILLENEUVE P. Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: a review[J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2013, 115(3):270-285.
- [7] 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(23):100-108.
- [8] 徐文迪. 富含中长碳链甘油三酯的人乳替代脂的酶法制备[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2019.
- [9] LIU C, TIAN J, ZHANG R, et al. Solvent-free alcoholysis of tripalmitin to produce 2-monoglyceride as precursor for 1,3-oleoyl-2-palmitoylglycerol[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 190(8):1-13.
- [10] WANG X, JIANG C, XU W, et al. Enzymatic synthesis of structured triacylglycerols rich in 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol and 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleoylglycerol in a solvent-free system[J]. *LWT - Food Sci Technol*, 2020, 118:1-7.
- [11] 徐雨茜. OPO 结构脂的制备及其水包油乳液性质研究[D]. 南昌:南昌大学, 2018.
- [12] 宗蕾, 毕艳兰, 程亚鹏. 酶促油酸乙酯与棕榈硬脂酯交换合成 OPO 工艺研究[J]. *中国油脂*, 2020, 45(6):82-87.
- [13] ZHENG M, WANG S, XIANG X, et al. Facile preparation of magnetic carbon nanotubes-immobilized lipase for highly efficient synthesis of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich human milk fat substitutes[J]. *Food Chem*, 2017, 228(1):476-483.
- [14] WEI W, FENG Y F, ZHANG X, 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.
- [15] 李世磊, 惠菊, 初柏君, 等. 酸解 52℃ 棕榈硬酯制备 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯的工艺研究[J]. *粮食与食品工业*, 2017, 24(6):9-14.
- [16] ZOU X, JIN Q, GUO Z, et al. Preparation of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich structured lipids from basa catfish oil: combination of fractionation and enzymatic acidolysis[J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2016, 118(5):708-715.
- [17] NAGACHINTA S, AKOH C C. Production and characterization of DHA and GLA-enriched structured lipid from palm olein for infant formula use[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2013, 90(8):1141-1149.
- [18] WANG X, CHEN Y, ZHENG L, et al. Synthesis of 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol by enzymatic acidolysis in a solvent-free system[J]. *Food Chem*, 2017, 228(1):420-426.
- [19] WANG Z, LIU L, LIU L, et al. 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich triacylglycerol characterization by three processing methods[J]. *Int J Food Prop*, 2019, 22(1):1156-1171.