

高油酸花生油酶促酯交换制备 1,3 - 二棕榈酸 - 2 - 油酸甘油三酯

张晓晓, 孙 聪, 杨瑞楠, 张林尚, 康 宝, 陈雁然, 梁慧敏, 梁少华

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:旨在为可可脂生产提供新的基料油,同时为高油酸花生油的高值化利用提供研究基础,以高油酸花生油和棕榈酸乙酯为原料,脂肪酶 NS40086 为催化剂,在无溶剂体系下酶法合成 1,3 - 二棕榈酸 - 2 - 油酸甘油三酯(POP)。采用单因素实验研究反应条件对 POP 含量、酰基位移、sn - 2 位油酸相对含量的影响,并采用响应面法进行优化。结果表明:高油酸花生油酶促酯交换制备 POP 的最佳反应条件为反应时间 3 h、底物(棕榈酸乙酯与高油酸花生油)物质的量比 11:1、酶添加量(以底物总质量计)3%、反应温度 50 ℃,在此条件下 POP 含量为 86.48%,酰基位移为 3.25%,sn - 2 位油酸相对含量为 72.88%。

关键词:酶促酯交换;高油酸花生油;1,3 - 二棕榈酸 - 2 - 油酸甘油三酯;酰基位移;响应面法

中图分类号:TS225.1; TS201.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1003 - 7969(2023)09 - 0060 - 08

Preparation of 1,3 - dipalmitoyl - 2 - oleoylglycerol with high - oleic peanut oil by enzymatic transesterification

ZHANG Xiaoxiao, SUN Cong, YANG Ruinan, ZHANG Linshang,
KANG Bao, CHEN Yanran, LIANG Huimin, LIANG Shaohua

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

Abstract: In order to provide new base oil for the production of cocoa butter and research basis for the high - value utilization of high - oleic peanut oil, with high - oleic peanut oil and ethyl palmitate as raw materials, NS40086 lipase as catalyst, 1,3 - dipalmitoyl - 2 - oleoylglycerol (POP) was synthesized by enzymatic transesterification in a solvent - free system. The effects of reaction conditions on the POP content, acyl migration and the relative content of sn - 2 oleic acid were studied by single factor experiment, and response surface methodology was used to determine the optimal reaction conditions. The results showed that the optimal reaction conditions were obtained as follows: reaction time 3 h, molar ratio of ethyl palmitate to high - oleic peanut oil 11:1, dosage of enzyme 3% (based on total substrates mass), reaction temperature 50 ℃. Under these conditions, the POP content, acyl migration and the relative content of sn - 2 oleic acid were 86.48%, 3.25% and 72.88%, respectively.

Key words: enzymatic transesterification; high - oleic peanut oil; 1,3 - dipalmitoyl - 2 - oleoylglycerol; acyl migration; response surface methodology

收稿日期:2023 - 01 - 02;修回日期:2023 - 03 - 04

基金项目:“十四五”国家重点研发计划项目(2021YFD2100304)

作者简介:张晓晓(1997),女,硕士研究生,研究方向为植物油料综合利用(E-mail)xiaoxiaomysunshine@163.com。

通信作者:梁少华,教授,硕士生导师(E-mail)shaohualianguang@126.com。

天然可可脂具有独特的物化性质和熔融性能,是巧克力等糖果中的重要成分^[1]。据统计,2016—2017年全球可可脂产量为 474.8 万 t^[2],2021 年全球可可收获面积超过 1 223 万 hm²,可可豆总产量约 560 万 t^[3]。但天然可可脂的生产大多集中在拉美和非洲国家,加上较低的年产量以及地域所带来的运输限

制,其供应远不能满足世界巧克力消费的需求^[4]。

目前缓解可可脂制品短缺的有效途径之一是使用接近可可脂的替代品。类可可脂在组成和性质上与天然可可脂非常接近,能以任意的比例与天然可可脂互溶^[5]。近年来,研究者主要以棕榈油中间馏分^[6-7]、乳木果油^[8-9]、芒果仁油^[10]、烛果油^[11]、砂拉越野芒仁油(BKF)^[12]等为原料制备类可可脂。作为类可可脂基料油,结构脂1,3-二棕榈酸-2-油酸甘油三酯(POP)主要从棕榈油中分提得到,来源范围窄。因此,研究开发以结构脂POP为主要组成成分的甘油酯,对拓宽类可可脂原料范围,进而提高类可可脂产量,以弥补天然可可脂应用市场的需求具有十分重要的意义。

结构脂的制备方法主要分为化学酯交换和酶法酯交换,其中酶法酯交换具有特异性强、反应条件温和、绿色环保等优点,具有更广阔的发展前景。根据酰基供体的不同,酯交换又分为醇解、酶促酸解和酯-酯交换^[13]。Adlof等^[14]首先以三棕榈酸甘油三酯和甘油为原料醇解制备甘油二酯,其次采用1,3-二棕榈酸甘油二酯和油酸为原料制备了化学纯度为98%和结构纯度大于98%的POP并研究了其物理性能,但醇解过程烦琐且使用苯等有毒试剂。陈琰^[15]以山茶油和棕榈酸为原料在无溶剂体系下酶促酸解合成的结构脂POP含量较低,稳定在40%左右。王灵燕^[16]、陈洋^[17]、Kadivar^[18]等以高油酸葵花籽油与硬脂酸或主要成分为棕榈酸或硬脂酸的混合脂肪酸为原料进行酶促酸解反应,最优条件下1,3-二硬脂酸-2-油酸甘油三酯(SOS)含量分别为41.05%、66.10%、59.10%,但反应温度(70℃)或酶添加量(12%)较高。孙晓洋等^[19]指出选择富含POP或SOS的原料可以弥补反应时间过长(14h)导致酰基位移程度较高(约20%)的不足。宋海东等^[20]以棕榈油中间熔点物(POMF)和硬脂酸酶促酸解反应制备类可可脂,但酶添加量(10%)和酰基转移率(12.30%)较高。在酶促酸解反应制备结构脂过程中,作为酰基供体的棕榈酸或硬脂酸熔点高,导致反应温度高于特异性脂肪酶最适温度或可选范围窄,另外,反应温度过高会降低酶活力,增加酶添加量并加剧酰基位移现象,存在目标产物中结构脂含量低、酶消耗量大或反应时间过长等问题。

基于上述研究现状,本研究以高油酸花生油和棕榈酸乙酯为原料,脂肪酶NS40086为催化剂,在无溶剂体系下采用酶催化酯-酯交换合成结构脂POP,以期为类可可脂生产提供一种新型基料油,同时为高油酸花生油的高值化利用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

鲁花高油酸花生油;棕榈酸乙酯(纯度为98.84%),实验室自制;脂肪酶NS40086,郑州贝莱德生物技术有限公司;猪胰脂酶,实验室自制;薄层层析硅胶,化学纯;娃哈哈纯净水;无水乙醚、无水乙醇、正己烷、冰乙酸、胆酸钠、氯化钙、无水硫酸钠、氢氧化钠、盐酸、Tris缓冲液、2,7-二氯荧光素、甲醇钠,分析纯;乙腈、异丙醇、甲醇、正己烷,色谱纯。

1.1.2 仪器与设备

Shimadzu GC-2030气相色谱仪,日本Nexis公司;Waters e2695型高效液相色谱仪、2424蒸发光散射检测器,美国Waters公司;集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;数显搅拌水浴锅,上海维诚仪器有限公司;旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;离心机,河南树仁仪器设备维修有限公司;HZA2000电子天平,郑州华志科学仪器有限公司;SartoriusBSA224S分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;涡旋振荡器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 结构脂POP的制备

将一定物质的量比的棕榈酸乙酯和高油酸花生油在恒温加热磁力搅拌器中混合预热至设定的反应温度,加入一定量的特异性脂肪酶NS40086,在不断搅拌下反应一定时间,反应结束后过滤除去脂肪酶,将产物转移至样品瓶中备用。

1.2.2 全样脂肪酸组成分析

参照文献[21]将样品经薄层色谱法分离得到相应的甘油三酯,然后参照GB 5009.168—2016对样品进行甲酯化处理,采用气相色谱法分析其脂肪酸组成。

气相色谱条件:HP-88色谱柱(100.0 m×0.25 mm×0.2 μm);氢火焰离子化检测器;载气为氮气,流量24 mL/min;燃气为氢气,流量32 mL/min;空气流量200 mL/min,分流比50:1;进样量1 μL;进样口温度260℃;柱温初始温度140℃,保留5 min,以4℃/min速度升至240℃,保留5 min。采用面积归一化法计算各脂肪酸含量。

1.2.3 sn-2位脂肪酸组成分析

参照文献[22]将样品通过猪胰脂酶水解得到其相应的水解产物,然后采用薄层色谱法分离得到对应的甘油一酯,参照GB 5009.168—2016进行甲酯化处理,采用气相色谱法分析其sn-2位脂肪酸组成。

气相色谱条件:进样量8 μL,其余条件同1.2.2。

1.2.4 sn-2 位油酸相对含量和酰基位移的计算

sn-2 位油酸相对含量(ω , sn-2 位油酸占有油酸含量)^[23]和酰基位移(y)分别按式(1)和式(2)计算。

$$\omega = \omega_1 / (3\omega_2) \times 100\% \quad (1)$$

$$y = (\omega_3 - \omega_1) / \omega_3 \times 100\% \quad (2)$$

式中: ω_1 为产物 sn-2 位油酸含量; ω_2 为产物全样油酸含量; ω_3 为高油酸花生油 sn-2 位油酸含量。

1.2.5 甘油三酯组成分析

将样品经薄层色谱法分离得到相应的甘油三酯,乙醚萃取两次并氮吹干后,将样品使用色谱级的正己烷振荡溶解 3 min,无水硫酸钠干燥后,采用液相色谱法分析甘油三酯组成。

液相色谱条件:Lichrospher C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μ m);蒸发光检测器温度 55 $^{\circ}$ C;色谱柱温度 40 $^{\circ}$ C;增益 5;流动相为乙腈和异丙醇,流速 0.8 mL/min;洗脱程序为 0~40 min 42% 异丙醇,40~45 min 47% 异丙醇,45~55 min 47% 异丙醇,55~60 min 42% 异丙醇。采用面积归一化法计算各甘油三酯含量。

1.2.6 数据处理

采用 GraphPad Prism 9 和 SPSS 2.0 对数据进行处理,以“平均值 \pm 标准偏差”表示,所有实验至少重复两次。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 结果与讨论

2.1 高油酸花生油的脂肪酸和甘油三酯组成

高油酸花生油的脂肪酸和甘油三酯组成分别见表 1 和表 2。

表 1 高油酸花生油的脂肪酸组成及含量 %

脂肪酸	全样	sn-2 位
C16:0	6.29 \pm 0.10	0.93 \pm 0.00
C18:0	2.96 \pm 0.01	0.48 \pm 0.05
C18:1	73.99 \pm 0.07	84.92 \pm 0.04
C18:2	8.55 \pm 0.01	13.67 \pm 0.25
C20:0	1.37 \pm 0.04	ND
C20:1	1.86 \pm 0.01	ND
C22:0	3.17 \pm 0.00	ND
C24:0	1.81 \pm 0.01	ND

注:ND 表示未检出。下同

表 2 高油酸花生油的甘油三酯组成及含量

甘油三酯	含量/%
OOO	70.79 \pm 0.34
POO	11.84 \pm 0.08
POP	0.33 \pm 0.06
POS	ND
SOS	ND
其他	17.04

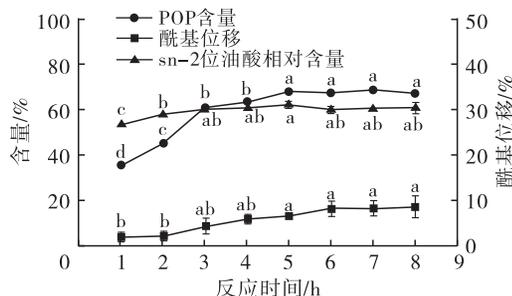
注:S. 硬脂酸;P. 棕榈酸;O. 油酸

由表 1 可知,高油酸花生油总脂肪酸中油酸含量为 73.99%, sn-2 位油酸含量为 84.92%,均在 70% 以上。由表 2 可知,高油酸花生油的甘油三酯组成中三油酸甘油三酯(OOO)含量为 70.79%。以上结果说明高油酸花生油是合成结构脂 POP 的理想原料。

2.2 POP 制备单因素实验

2.2.1 反应时间对 POP 合成效果的影响

在底物(棕榈酸乙酯与高油酸花生油,下同)物质的量比 5:1、反应温度 60 $^{\circ}$ C、酶添加量(以底物总质量计,下同)3% 条件下,考察反应时间对 POP 含量、sn-2 位油酸相对含量和酰基位移的影响,结果如图 1 所示。



注:同一指标不同字母表示有显著差异($p < 0.05$)。下同

图 1 反应时间对 POP 合成效果的影响

由图 1 可知,POP 含量随反应时间的延长呈现先上升后平缓的趋势。反应在 1~5 h 内 POP 含量呈上升趋势,在 5 h 时达到平衡且 POP 含量为 68.15%,超过 5 h,POP 含量无显著变化($p > 0.05$)。这是因为反应初期,底物浓度较高,酰基供体插入到 sn-1,3 位速率快,随着反应的进行,酰基供体浓度逐渐降低,反应速率减慢,反应达到平衡。目标产物 POP 含量达到最大值时所需反应时间为 5 h,短于宋海东等^[20]酶促酸解制备结构脂时最优反应时间 10 h。

sn-2 位油酸相对含量随反应时间的延长呈现先上升后平缓的趋势,在 5 h 达到最大值 62.44%。特异性脂肪酶 NS40086 酯交换发生在甘油三酯的 sn-1,3 位酯键^[24],sn-1,3 位油酸随反应时间的延长逐渐被棕榈酸所交换,致使总脂肪酸组成中油酸含量逐渐降低,因而 sn-2 位油酸相对含量增加。

酰基位移随反应时间的延长呈现出与 sn-2 位油酸相对含量类似的趋势。这是因为甘油三酯在 sn-1,3 特异性脂肪酶作用下形成 1(3),2-DAG 和 2-MAG 中间产物,而 1(3),2-DAG 和 2-MAG 尤其是 2-MAG 化学结构不稳定,容易发生酰基位移^[25],且随着反应时间延长,1(3),

2-DAG和2-MAG酰基位移程度增大,但酰基位移在实验设定反应时间范围内始终低于10%,且低于孙晓洋等^[19]酶促酸解制备结构脂时的酰基位移(约20%)。

综上,选择5 h作为后续工艺优化实验的反应时间。

2.2.2 底物物质的量比对POP合成效果的影响

在反应时间5 h、反应温度60℃、酶添加量3%条件下,考察底物物质的量比对POP含量、sn-2位油酸相对含量和酰基位移的影响,结果如图2所示。

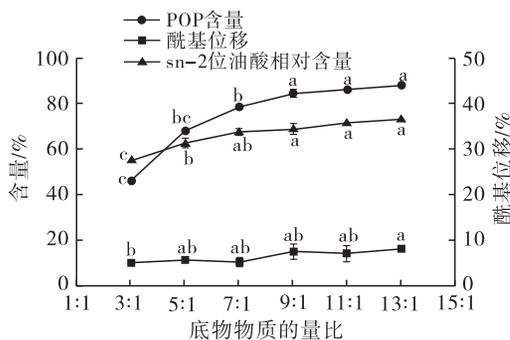


图2 底物物质的量比对POP合成效果的影响

由图2可知,POP含量随底物物质的量比的增加呈现上升的趋势,底物物质的量比超过9:1时POP含量无显著变化($p > 0.05$)。这是因为随着底物物质的量比的增加,作为酰基供体的棕榈酸乙酯在反应体系中浓度增加,促使反应向着生成POP的方向进行,POP含量逐渐升高,继续增加底物物质的量比,定向酯交换反应达到平衡,POP含量无显著变化,当底物物质的量比过高时,过量的酰基供体会增加纯化成本^[26]。

sn-2位油酸相对含量随底物物质的量比的增加呈现相对缓慢的上升趋势,底物物质的量比超过7:1时无显著变化($p > 0.05$)。这是因为其他条件相同时,随着底物物质的量比的增加酯交换反应生成POP含量会逐渐增大,sn-1,3位上的油酸含量降低,致使反应后甘油三酯的总脂肪酸组成中油酸含量降低,sn-2位油酸相对含量增加。

酰基位移随底物物质的量比的增加在5%~10%很小范围内变化。这是因为其他条件相同时,底物物质的量比的变化对酯交换反应过程中甘油三酯转化为中间产物1(3),2-DAG和2-MAG与中间产物进一步生成POP两者反应速率的差异影响不大,因此底物物质的量比对酰基位移影响不大。

综上,选择底物物质的量比9:1作为后续工艺优化实验的条件。

2.2.3 酶添加量对POP合成效果的影响

在底物物质的量比9:1、反应温度60℃、反应时间5 h条件下,考察酶添加量对POP含量、sn-2位油酸相对含量和酰基位移的影响,结果如图3所示。

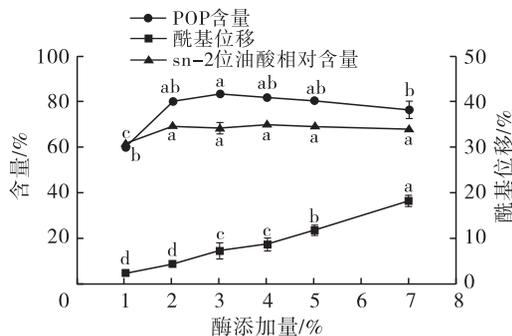


图3 酶添加量对POP合成效果的影响

由图3可知,POP含量随酶添加量的增加呈现先上升后下降的趋势。这是因为在酶添加量较小时,催化位点不足,反应速率慢;随着酶添加量的增加,催化位点增多,反应速率加快^[27];继续增加酶添加量,POP含量下降,可能是因为酶自身携带的水分促进反应向水解方向偏离^[28]。目标产物POP含量达到最大时酶添加量为3%,远少于Kadivar^[18]、陈洋^[17]等的酶促酸解制备结构脂时的最优酶添加量10%、12%。

sn-2位油酸相对含量随酶添加量的增加呈现先增加后平缓的趋势,在酶添加量2%时达到最大值。这是因为在其他条件相同时,随着酶添加量的增加,定向酯交换的反应速率增大,sn-1,3位油酸被棕榈酸所交换的量增多,酯交换后甘油三酯的总脂肪酸组成中油酸含量降低,sn-2位油酸相对含量增加;过量的酶会加剧酰基位移,sn-2位油酸迁移至sn-1,3位,且被棕榈酸所交换,致使sn-2位油酸相对含量变化不显著。

酰基位移随酶添加量的增加呈现上升趋势。是由于在其他条件相同时,随着酶添加量的增加,酯交换反应过程中甘油三酯转化为中间产物1(3),2-DAG和2-MAG与中间产物进一步生成POP两者反应速率的差异进一步增大,致使酯交换过程中间产物1(3),2-DAG和2-MAG浓度增大,加剧酰基位移的发生。

综上,选择酶添加量2%作为后续工艺优化实验的条件。

2.2.4 反应温度对POP合成效果的影响

在底物物质的量比9:1、酶添加量3%、反应时间5 h条件下,考察反应温度对POP含量、sn-2位油酸相对含量和酰基位移的影响,结果如图4所示。

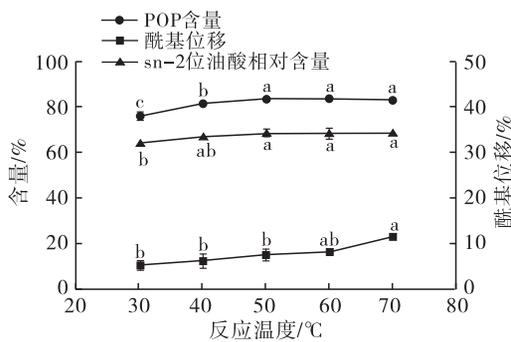


图4 反应温度对POP合成效果的影响

由图4可知,POP含量随反应温度的升高呈现先增加后平缓的趋势,并在50℃时反应达平衡。反应温度较低时,反应速率较慢,升高反应温度加快酶催化酯交换反应速度,在相同时间条件下,温度越高生成POP的量越多,但反应温度过高会破坏酶的构象,降低酶的位置特异性^[29]。目标产物POP含量达到最大值时反应温度为50℃,低于王灵燕^[16]的酶促酸解反应中最优反应温度70℃。

sn-2位油酸相对含量随反应温度的升高呈现出与POP含量相似的变化趋势,并在50℃时反应达平衡。sn-2位油酸相对含量升高的原因是,在其他条件相同时,随着反应温度的升高,定向酯交换的反应速率增大,sn-1,3位油酸被棕榈酸所交换的量增多,酯交换后甘油三酯的总脂肪酸组成中油酸含量降低,sn-2位油酸相对含量增加。

酰基位移随反应温度的升高呈现上升趋势。由于在其他条件相同时,随着反应温度的升高,酯交换反应过程中甘油三酯转化为中间产物1(3),2-DAG和2-MAG与中间产物进一步生成POP两者反应速率的差异增大,致使酯交换过程中中间产物1(3),2-DAG和2-MAG浓度增大,加剧酰基位移的发生。

综上,选择反应温度50℃作为后续工艺优化实验的条件。

2.3 POP制备响应面实验

2.3.1 响应面实验设计

在单因素实验的基础上,根据Box-Behnken实验设计原理,利用Design expert 10.0.6软件对工艺条件进行优化,选取反应时间(A)、底物物质的量比(B)、酶添加量(C)、反应温度(D)4个影响因素为自变量,以POP含量、酰基位移、sn-2位油酸相对含量为响应值,设计并进行四因素三水平响应面优化实验以确定结构脂POP合成的最佳工艺条件。响应面实验因素与水平见表3,响应面实验设计及结果见表4,方差分析见表5~表7。

表3 响应面实验因素与水平

水平	A 反应时间/h	B 底物物质的量比	C 酶添加量/%	D 反应温度/℃
-1	3	7:1	1	40
0	5	9:1	2	50
1	7	11:1	3	60

表4 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	POP含量/%	酰基位移/%	sn-2位油酸相对含量/%
1	-1	-1	0	0	71.45	2.51	65.67
2	1	-1	0	0	77.92	6.01	66.64
3	-1	1	0	0	78.92	2.31	68.52
4	1	1	0	0	87.74	6.92	74.26
5	0	0	-1	-1	60.85	1.69	58.34
6	0	0	1	-1	81.99	7.53	67.17
7	0	0	-1	1	68.64	3.27	63.52
8	0	0	1	1	84.19	8.71	68.84
9	-1	0	0	-1	65.22	0.74	66.41
10	1	0	0	-1	79.14	5.81	66.95
11	-1	0	0	1	76.85	3.00	70.12
12	1	0	0	1	84.09	6.49	72.01
13	0	-1	-1	0	57.42	1.81	61.69
14	0	1	-1	0	70.90	3.11	65.51
15	0	-1	1	0	76.70	8.59	66.03
16	0	1	1	0	86.04	9.31	69.37
17	-1	0	-1	0	53.95	0.03	60.97
18	1	0	-1	0	79.85	0.97	67.69
19	-1	0	1	0	79.26	1.95	72.48
20	1	0	1	0	78.59	10.61	71.85
21	0	-1	0	-1	67.80	4.75	62.66
22	0	1	0	-1	79.98	5.24	68.34
23	0	-1	0	1	70.66	5.90	64.68
24	0	1	0	1	79.49	8.84	71.45
25	0	0	0	0	78.75	4.59	66.21
26	0	0	0	0	78.55	4.75	67.43
27	0	0	0	0	78.65	4.91	69.36
28	0	0	0	0	75.89	5.18	68.04
29	0	0	0	0	75.72	5.30	68.09

表5 POP含量的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	1766.97	14	126.21	16.62	<0.0001**
A	317.04	1	317.04	41.75	<0.0001**
B	311.30	1	311.30	41.00	<0.0001**
C	754.62	1	754.62	99.38	<0.0001**
D	69.79	1	69.79	9.19	0.0090**
AB	1.38	1	1.38	0.18	0.6763
AC	176.49	1	176.49	23.24	0.0003**

续表 5

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>AD</i>	11.16	1	11.16	1.47	0.245 5
<i>BC</i>	4.28	1	4.28	0.56	0.465 0
<i>BD</i>	2.81	1	2.81	0.37	0.553 0
<i>CD</i>	7.81	1	7.81	1.03	0.327 6
<i>A</i> ²	1.40	1	1.40	0.18	0.674 0
<i>B</i> ²	1.82	1	1.82	0.24	0.631 7
<i>C</i> ²	96.65	1	96.65	12.73	0.003 1**
<i>D</i> ²	10.88	1	10.88	1.43	0.251 2
残差	106.30	14	7.59		
失拟项	96.56	10	9.66	3.96	0.098 3
绝对误差	9.75	4	2.44		
总离差	1 873.28	28			

注:**表示差异高度显著($p < 0.01$);*表示差异显著($p < 0.05$)。下同

表 6 酰基位移的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>p</i>
模型	217.03	14	15.50	82.93	<0.000 1**
<i>A</i>	57.51	1	57.51	307.67	<0.000 1**
<i>B</i>	3.16	1	3.16	16.92	0.001 1**
<i>C</i>	106.92	1	106.92	572.02	<0.000 1**
<i>D</i>	9.10	1	9.10	48.68	<0.000 1**
<i>AB</i>	0.31	1	0.31	1.65	0.220 1
<i>AC</i>	14.90	1	14.90	79.71	<0.000 1**
<i>AD</i>	0.62	1	0.62	3.34	0.089 1
<i>BC</i>	0.08	1	0.08	0.45	0.513 3
<i>BD</i>	1.50	1	1.50	8.03	0.013 3*
<i>CD</i>	0.04	1	0.04	0.21	0.650 8
<i>A</i> ²	12.56	1	12.56	67.22	<0.000 1**
<i>B</i> ²	4.71	1	4.71	25.19	0.000 2**
<i>C</i> ²	0.08	1	0.08	0.44	0.516 4
<i>D</i> ²	1.23	1	1.23	6.59	0.022 4*
残差	2.62	14	0.19		
失拟项	2.27	10	0.23	2.62	0.183 0
绝对误差	0.35	4	0.09		
总离差	219.65	28			

表 7 sn-2 位油酸相对含量的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>p</i>
模型	338.39	14	24.17	13.91	<0.000 1**
<i>A</i>	19.31	1	19.31	11.12	0.004 9**
<i>B</i>	75.40	1	75.40	43.39	<0.000 1**
<i>C</i>	120.45	1	120.45	69.32	<0.000 1**

续表 7

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>D</i>	35.94	1	35.94	20.69	0.000 5**
<i>AB</i>	5.71	1	5.71	3.29	0.091 4
<i>AC</i>	13.52	1	13.52	7.78	0.014 5*
<i>AD</i>	0.45	1	0.45	0.26	0.617 3
<i>BC</i>	0.06	1	0.06	0.04	0.854 6
<i>BD</i>	0.30	1	0.30	0.17	0.685 8
<i>CD</i>	3.08	1	3.08	1.77	0.204 6
<i>A</i> ²	23.46	1	23.46	13.50	0.002 5**
<i>B</i> ²	1.27	1	1.27	0.73	0.407 6
<i>C</i> ²	22.53	1	22.53	12.97	0.002 9**
<i>D</i> ²	6.28	1	6.28	3.62	0.078 0
残差	24.33	14	1.74		
失拟项	19.08	10	1.91	1.45	0.383 2
绝对误差	5.25	4	1.31		
总离差	362.71	28			

利用 Design expert 10.0.6 软件对表 4 中 29 组响应值进行多次拟合回归分析,可得到 POP 含量(Y_1)、酰基位移(Y_2)、sn-2 位油酸相对含量(Y_3)的二次多项式模型,其模型的表达式分别为: $Y_1 = 77.51 + 5.14A + 5.09B + 7.93C + 2.41D + 0.59AB - 6.64AC - 1.67AD - 1.04BC - 0.84BD - 1.40CD + 0.46A^2 - 0.53B^2 - 3.86C^2 - 1.30D^2$; $Y_2 = 4.95 + 2.19A + 0.51B + 2.99C + 0.87D + 0.28AB + 1.93AC - 0.39AD - 0.14BC + 0.61BD - 0.10CD - 1.39A^2 + 0.85B^2 - 0.11C^2 + 0.44D^2$; $Y_3 = 67.83 + 1.27A + 2.51B + 3.17C + 1.73D + 1.19AB - 1.84AC + 0.34AD - 0.12BC + 0.27BD - 0.88CD + 1.90A^2 - 0.44B^2 - 1.86C^2 - 0.98D^2$ 。

POP 含量(Y_1)、酰基位移(Y_2)、sn-2 位油酸相对含量(Y_3)3 个数学模型的相关系数(R^2)分别为 0.943 3、0.988 1、0.932 9($p < 0.000 1$),都接近于 1,模型高度显著,校正相关系数分别为 0.886 5、0.976 2、0.865 9,说明不确定因素干扰较小,方程拟合性较好。3 个模型的失拟项分别为 0.098 3、0.183 0、0.383 2,在 $\alpha = 0.05$ 的水平下均不显著。因此,这 3 个模型可以预测酯交换工艺参数与响应值的内在关系。

由表 5 可知:一次项 *A*、*B*、*C*、*D* 对 POP 含量的影响高度显著($p < 0.01$),交互项 *AC*、二次项 *C*² 影响高度显著($p < 0.01$);由 *F* 值可知,各因素对 POP 含量影响的顺序依次为酶添加量 > 反应时间 > 底物物质的量比 > 反应温度。

由表 6 可知:一次项 A 、 B 、 C 、 D 对酰基位移的影响高度显著($p < 0.01$),交互项 AC ,二次项 A^2 、 B^2 影响高度显著($p < 0.01$),交互项 BD 、二次项 D^2 影响显著($p < 0.05$);由 F 值可知,各因素对酰基位移影响的顺序依次为酶添加量 > 反应时间 > 反应温度 > 底物物质的量比。

由表 7 可知:一次项 A 、 B 、 C 、 D 对 sn-2 位油酸相对含量的影响高度显著($p < 0.01$),交互项 AC 影响显著($p < 0.05$),二次项 A^2 、 C^2 影响高度显著($p < 0.01$);由 F 值可知,各因素对 sn-2 位油酸相对含量影响的顺序依次为酶添加量 > 底物物质的量比 > 反应温度 > 反应时间。

2.3.2 工艺条件确定与验证

结合 POP 含量、酰基位移和 sn-2 位油酸相对含量 3 个指标,利用 Design expert 10.0.6 软件预测的最佳条件为反应时间 3 h、底物物质的量比 10.86:1、酶添加量 3%、反应温度 49.71 °C,在此条件下 POP 含量预测值为 86.27%,酰基位移为 3.08%,sn-2 位油酸相对含量为 72.30%。考虑到实际操作的可行性,调整工艺参数为反应时间 3 h、底物物质的量比 11:1、酶添加量 3%、反应温度 50 °C,在此条件下进行 3 次平行验证实验,POP 含量为 86.48%,酰基位移为 3.25%,sn-2 位油酸相对含量为 72.88%,与预测值相近。

3 结论

本文以高油酸花生油为原料,棕榈酸乙酯为酰基供体,采用脂肪酶 NS40086 为催化剂催化酯交换合成可可脂替代品基料油 POP。通过单因素实验和响应面实验优化得到最佳反应条件为反应时间 3 h、底物物质的量比 11:1、酶添加量 3%、反应温度 50 °C,在此条件下 POP 含量为 86.48%,酰基位移为 3.25%,sn-2 位油酸相对含量为 72.88%。利用该方法合成的产物 POP 含量高、酰基位移小,且反应时间短、工艺简单环保,提供了一种新的可可脂替代品基料油,同时为高油酸花生油高值化利用提供了技术支持。

参考文献:

[1] ORNLA-IED P, RUNGSANG S, TAN C P, et al. Production of cocoa butter substitute via enzymatic interesterification of fully hydrogenated palm kernel oil, coconut oil and fully hydrogenated palm stearin blends [J]. J Oleo Sci, 2022, 71(3): 343-351.

[2] 刘文韬. 可可脂结晶机制及其分馏物的应用研究 [D]. 天津:天津科技大学,2020.

[3] 赵溪竹,朱自慧,秦晓威,等. 槟榔间作条件下不同修

剪方式对可可生长和产量的影响 [J]. 中国热带农业, 2021(1): 69-73.

[4] 沈琪. 酶促酸解制备类可可脂的研究 [D]. 江苏 无锡: 江南大学,2012.

[5] ZAIDUL I S M, NIK NORULAINI N A, MOHD OMAR A K, et al. Blending of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extracted palm kernel oil fractions and palm oil to obtain cocoa butter replacers [J]. J Food Eng, 2007, 78(4): 1397-1409.

[6] UNDURRAGA D, MARKOVITS A, ERAZO S. Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction [J]. Process Biochem, 2001, 36(10): 933-939.

[7] HUANG Z, GUO Z, XIE D, et al. *Rhizomucor miehei* lipase-catalysed synthesis of cocoa butter equivalent from palm mid-fraction and stearic acid: characteristics and feasibility as cocoa butter alternative [J/OL]. Food Chem, 2021, 343:128407[2023-01-02]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128407>.

[8] KANG K K, JEON H, KIM I H, et al. Cocoa butter equivalents prepared by blending fractionated palm stearin and shea stearin [J]. Food Sci Biotechnol, 2013, 22(2): 347-352.

[9] HWANG J, JUN H, ROH S, et al. Preparation of low-diacylglycerol cocoa butter equivalents by hexane fractionation of palm stearin and shea butter [J/OL]. Molecules, 2021, 26(11): 3231[2023-01-02]. <https://doi.org/10.3390/molecules26113231>.

[10] SONWAI S, KAPHUEAKNGAM P, FLOOD A. Blending of mango kernel fat and palm oil mid-fraction to obtain cocoa butter equivalent [J]. J Food Sci Technol, 2014, 51(10): 2357-2369.

[11] 金俊, MWINYI P W, 郑立友, 等. 5 种亟待开发的类可可脂木本油料脂肪 [J]. 中国油脂, 2017, 42(4): 1-7.

[12] JAHURUL M H A, SOON Y, SHAARANI SHARIFUDIN M, et al. Bambang (*Mangifera pajang*) kernel fat: a potential new source of cocoa butter alternative [J]. Int J Food Sci Tech, 2018, 53(7): 1689-1697.

[13] KIM B H, AKOH C C. Recent research trends on the enzymatic synthesis of structured lipids [J]. J Food Sci, 2015, 80(8): 1713-1724.

[14] ADLOF R O, LIST G R. Synthesis and physical properties of symmetrical and non-symmetrical triacylglycerols containing two palmitic fatty acids [J]. J Am Oil Chem Soc, 2007, 85(2): 99-104.

[15] 陈琰. 特异性脂肪酶催化甘油三酯酯交换反应影响因素的研究 [D]. 江苏 无锡: 江南大学,2013.

- identification of iron - chelating peptides from defatted walnut flake by nanoLC - ESI - MS/MS and de novo sequencing [J]. *Process Biochem*, 2017, 59:223 - 228.
- [6] 郭蔓莉, 吴澎, 赵路苹, 等. 核桃加工副产物的综合利用及精深加工[J]. *粮油食品科技*, 2018, 26(2): 25 - 29.
- [7] 李昌文, 张丽华, 纵伟. 核桃多肽制备技术及生理活性研究进展[J]. *食品工业*, 2020, 41(9):257 - 259.
- [8] 姜莉, 徐怀德, 陈金海, 等. 核桃多肽果味酸奶的研制[J]. *中国乳品工业*, 2012, 40(12): 54 - 57.
- [9] 张兴灿. 核桃蛋白多肽新型酶解制备工艺的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2012.
- [10] CHEN N, YANG H, SUN Y. Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates[J]. *Peptides*, 2012, 38(2): 344 - 349.
- [11] 谢翠品, 敬思群, 刘帅, 等. 核桃蛋白酶解物分离纯化及体外抗氧化活性研究[J]. *食品科技*, 2013(3): 67 - 70.
- [12] 慈傲特. 山核桃饼粕抗氧化肽的制备与鉴定[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.
- [13] 姜丽, 徐怀德, 陈金海. 核桃多肽功能特性的研究[J]. *食品科技*, 2013, 38(1): 228 - 231.
- [14] YANG Z, LIU J, YAN X, et al. Effect of walnut polypeptide on lipids in *D* - galactose induced senile dementia model mice [J]. *Food Sci*, 2015, 31(4): 575 - 582.
- [15] 陈树俊, 李乐, 胡洁, 等. 核桃多肽 - 苦荞 - 藜麦复合粉制备工艺及体外消化和抗氧化功能特性分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(12):254 - 261.
- [16] JAHANBANI R, GHAFARI S M, SALAMI M, et al. Antioxidant and anticancer activities of walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates using different proteases [J]. *Plant Food Hum Nutr*, 2016, 71(4):402 - 409.
- [17] 郭兴峰, 陈计峦, 林燕, 等. 热榨和冷榨核桃饼粕中蛋白质提取及其性质研究[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(18):287 - 292.
- [18] 张红, 姚舜, 李国军, 等. 核桃仁脱皮和蛋白提取研究[J]. *粮食与油脂*, 2003(12):22 - 23.
- [19] 裴昊铭, 张彩猛, 李兴飞, 等. 去皮处理对水法提取核桃仁蛋白质和脂质的影响[J]. *中国油脂*, 2021, 46(12):11 - 15.
- [20] 薛蕾, 李大文, 尉芹, 等. 苦杏仁蛋白的功能特性[J]. *食品科学*, 2013, 34(7): 70 - 75.
- (上接第 66 页)
- [16] 王灵燕. 可可脂改良剂的生物合成[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2011.
- [17] 陈洋, 董鹏, 王小三, 等. 无溶剂体系酶促酸解合成富含 1,3 - 二硬脂酸 - 2 - 油酸甘油三酯的工艺研究[J]. *中国油脂*, 2018, 43(7): 57 - 60.
- [18] KADIVAR S, DE CLERCQ N, VAN DE WALLE D, et al. Optimisation of enzymatic synthesis of cocoa butter equivalent from high oleic sunflower oil [J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(7): 1325 - 1331.
- [19] 孙晓洋, 孟宏昌, 毕艳兰, 等. Lipozyme TL IM 脂肪酶催化茶油酯交换制备类可可脂的研究[J]. *中国粮油学报*, 2009, 24(12): 72 - 76,87.
- [20] 宋海东, 魏安池, 赵凯艳, 等. 影响酶催化制备类可可脂过程中酰基位移和酯交换因素研究[J]. *粮食与油脂*, 2014, 27(2): 1 - 4.
- [21] 邹孝强, 高盼, 徐林海, 等. 基于核桃油的中长链甘油三酯的酶法制备及纯化[J]. *中国油脂*, 2022, 47(4): 58 - 63.
- [22] 孙聪, 张浩, 敖小惠, 等. 酶促酸解制备 1 - 油酸 - 2 - 棕榈酸 - 3 - 亚油酸甘油三酯[J]. *中国油脂*, 2021, 46(4): 92 - 98.
- [23] 孙聪. 人乳替代脂的组成、相似性评价及制备研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2018.
- [24] LEE J H, SON J M, AKOH C C, et al. Optimized synthesis of 1,3 - dioleoyl - 2 - palmitoylglycerol - rich triacylglycerol via interesterification catalyzed by a lipase from *Thermomyces lanuginosus* [J]. *New Biotechnol*, 2010, 27(1): 38 - 45.
- [25] MACRAE A R. Lipase - catalyzed interesterification of oils and fats [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1983, 60(2): 291 - 294.
- [26] CIFTCI O N, FADILUOLU S, GOGUS F. Conversion of olive pomace oil to cocoa butter - like fat in a packed - bed enzyme reactor [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(1): 324 - 329.
- [27] 陆继源. 酶法酯交换合成中长碳链结构甘油三酯[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2017.
- [28] 范晓波, 孟宗, 陈琰, 等. 油酸与极度氢化大豆油酶促酸解过程中油酸位置分布规律研究[J]. *粮食与食品工业*, 2016, 23(2): 13 - 18.
- [29] 周海燕. Lipozyme TL IM 催化棕榈液油酯交换规律研究及产品特性表征[D]. 广州: 暨南大学, 2021.