

高油酸花生油酶促酯交换合成类可可脂工艺优化

康宝, 孙聪, 杨瑞楠, 张林尚, 张晓晓,

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:为促进高油酸花生油的高值化利用,在无溶剂体系中以高油酸花生油为原料,棕榈酸乙酯、硬脂酸乙酯为酰基供体,酶促酯交换合成类可可脂。以目标甘油三酯1,3-二棕榈酸-2-油酸(POP)、1-棕榈酸-2-油酸-3-硬脂酸(POS)、1,3-二硬脂酸-2-油酸(SOS)含量,硬脂酸指数和酰基位移率为评价指标,在单因素实验的基础上采用响应面法对酶促酯交换合成类可可脂的工艺条件进行优化。结果表明:酶促酯交换合成类可可脂的最佳工艺条件为硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比1.3:1、酰基供体与高油酸花生油物质的量比12:1、加酶量2.7%(以底物质量计)、反应温度60℃、反应时间7h,在该条件下产物甘油三酯中POP、POS、SOS的含量分别为14.55%、48.87%、25.17%,硬脂酸指数为0.56,酰基位移率为7.35%。产物的目标甘油三酯组成和脂肪酸组成与可可脂相近,可作为可可脂替代品应用。

关键词:类可可脂;酶促酯交换;高油酸花生油;脂肪酸乙酯;酰基位移

中图分类号:TS229;TS219

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2023)08-0096-09

Optimization of synthesis of cocoa butter equivalent from high oleic acid peanut oil by enzymatic transesterification

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

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

Abstract: In order to promote the high value utilization of high oleic acid peanut oil, cocoa butter equivalent was synthesized by enzymatic transesterification using high oleic acid peanut oil as raw material, ethyl palmitate and ethyl stearate as acyl donors in a solvent-free system. Taking the contents of target triglycerides POP, POS and SOS, stearic index and acyl migration rate as evaluation indexes, the process conditions of enzymatic synthesis of cocoa butter equivalent were optimized by response surface methodology on the basis of single factor experiment. The results showed that the optimal reaction conditions were obtained as follows: molar ratio of ethyl stearate to ethyl palmitate 1.3:1, molar ratio of acyl donors to high oleic acid peanut oil 12:1, enzyme loading amount 2.7% (based on the mass of substrate), reaction temperature 60℃ and reaction time 7 h. Under these conditions, the contents of POP, POS and SOS were 14.55%, 48.87% and 25.17% respectively, the stearic index was 0.56, and the acyl migration rate was 7.35%. The triglyceride and fatty acid composition of the product are similar to those of cocoa butter, and it can be applied as the cocoa butter equivalent.

Key words: cocoa butter equivalent; enzymatic transesterification; high oleic acid peanut oil; fatty acid ethyl ester; acyl migration

收稿日期:2022-11-17;修回日期:2023-04-25

基金项目:“十四五”国家重点研发计划(2021YFD2100304)

作者简介:康宝(1996),男,硕士研究生,研究方向为植物油料综合利用(E-mail)2486505031@qq.com。

通信作者:梁少华,教授,硕士生导师(E-mail)shaohualiang832@126.com。

可可脂是从可可豆中提取的天然植物油脂,广泛应用于糖果行业^[1]。近年来,受种植园减少、气

候变化和病虫害等的影响^[2-3],可可豆的产量受到严重影响,从而导致可可脂不能满足全球糖果市场高速发展的需要^[4-5]。因此,寻求一种合适的可可脂替代品成了糖果行业发展的重要任务^[6]。

目前,可可脂的替代品主要为代可可脂和类可可脂。代可可脂是一种物理性能与可可脂非常相似的油脂,但其化学组成与可可脂截然不同^[7],这使得代可可脂与可可脂的相容性不佳。类可可脂是一种非月桂酸型可可脂替代品,它不仅在化学组成上与可可脂相似,理论上还能与可可脂以任意比例混溶^[8],在物理性能上也与可可脂相似,是一种高品质的可可脂替代品,市场需求较大^[9-10]。类可可脂的制备方法主要是物理调配法^[11]、酯交换法^[12-13]、微生物法^[14]。酯交换法分为化学酯交换和酶促酯交换,酶促酯交换制备类可可脂具有多种优点,已成为近年来研究的热点,如:沈琪等^[15]对非水相条件下酶促酸解制备类可可脂的工艺进行了研究,Huang等^[16]研究了棕榈油中间熔点分提物与硬脂酸酶促酸解制备类可可脂的工艺,Sonprasert等^[17]通过酶促雾冰草脂与棕榈油中间熔点分提物酯交换制备类可可脂。

国内外使用乌柏脂、婆罗双树脂、棕榈油中间熔点分提物、乳木果油、芒果仁油、雾冰草脂和烛果油等作为原料油,通过分提、调配或者酯交换制备类可可脂的研究较为广泛^[18]。随着育种技术的发展,高油酸花生油作为一种特色油脂已成功走向市场,高油酸花生油中油酸含量大于70%,是制备类可可脂的理想原料之一。与脂肪酸相比,脂肪酸乙酯作为酰基供体在酯交换时具有更高的插入率,酰基位移率也较低^[19],同时还具有熔点低、黏度小、反应速度快、利于脂肪酶活力稳定等优点^[20],但使用脂肪酸乙酯制备类可可脂的研究较少。

本研究使用高油酸花生油作原料,棕榈酸乙酯与硬脂酸乙酯作酰基供体,NS40086脂肪酶作催化剂,采用酶促酯交换法制备一种1-棕榈酸-2-油酸-3-硬脂酸(POS)含量较高,1,3-二棕榈酸-2-油酸(POP)、1,3-二硬脂酸-2-油酸(SOS)含量与可可脂接近的类可可脂,为高油酸花生油酶促酯交换制备类可可脂提供参考,同时为高油酸花生油的深度开发利用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

高油酸花生油,山东鲁花集团;棕榈酸、硬脂酸,泰柯棕化(张家港)有限公司;棕榈酸乙酯(纯度

98%)、硬脂酸乙酯(纯度95%),实验室自制;NS40086脂肪酶(275 IUN/g),诺维信(中国)生物技术有限公司;正己烷、乙醚、冰乙酸,分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;正己烷、异丙醇、乙腈,色谱级,北京迈瑞达科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器责任有限公司;Waters e2695高效液相色谱仪,美国Waters公司;Shimadzu GC-2030型气相色谱分析仪,岛津(中国)有限公司;Sartorius BSA224型分析天平,赛多利斯科学仪器有限公司;TD4低速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 类可可脂的制备

在100 mL圆底烧瓶中加入一定量的高油酸花生油、棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯,在固定转速的恒温磁力搅拌器上预热至反应温度,添加一定量的NS40086脂肪酶反应一定时间后终止反应,过滤除去脂肪酶得到酯交换产物。

1.2.2 总脂肪酸组成测定

1.2.2.1 高油酸花生油总脂肪酸组成分析

按照GB 5009.168—2016对高油酸花生油甲酯化处理后,采用气相色谱法分析脂肪酸组成。气相色谱条件:HP-88毛细管脂肪酸分析柱(100 m × 0.25 mm × 0.20 μm);升温程序为初始温度140℃,保持5 min,以4℃/min升温至240℃;进样口温度260℃;氢火焰离子化检测器温度260℃;氮气流速24 mL/min;空气流速200 mL/min;进样量1 μL。根据标准品保留时间定性,采用峰面积归一化法定量。

1.2.2.2 酯交换产物甘三酯总脂肪酸组成分析

将1.2.1制得的酯交换产物采用薄层色谱法分离得到甘三酯(展开剂为正己烷-乙醚-冰乙酸,体积比80:20:2),其余操作同1.2.2.1,分析酯交换产物甘三酯总脂肪酸组成。

1.2.3 sn-2位脂肪酸组成测定

1.2.3.1 高油酸花生油的sn-2位脂肪酸组成测定

参考GB/T 24894—2010测定高油酸花生油的sn-2位脂肪酸组成,气相色谱条件同1.2.2.1,并采用峰面积归一化法定量。

1.2.3.2 酯交换产物甘三酯的sn-2位脂肪酸组成测定

采用薄层色谱法分离酯交换产物中的甘三酯,再按照1.2.3.1方法测定甘三酯的sn-2位脂肪酸组成。

1.2.4 甘三酯组成测定

1.2.4.1 高油酸花生油甘三酯组成测定

取一滴高油酸花生油,用2 mL 色谱级正己烷溶解,经无水硫酸钠除水后进高效液相色谱仪分析。高效液相色谱条件:Symmetry C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm);流动相为乙腈和异丙醇,梯度洗脱,洗脱条件见表1;柱温40℃;流速0.8 mL/min;空气发生器压力70 MPa;进样量10 μL;e2424 蒸发光检测器参数为漂移管温度55℃,增益5。根据出峰位置结合理论碳数定性,采用峰面积归一化法定量。反相高效液相色谱不能区分甘三酯的位置异构体,因此本研究所检测的甘三酯含量包括位置异构体。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	乙腈/%	异丙醇/%
0	58	42
40	58	42
45	53	47
55	53	47
60	58	42

1.2.4.2 酯交换产物甘三酯组成测定

采用薄层色谱法分离酯交换产物中的甘三酯,再按照1.2.4.1方法测定目标甘三酯(POP、POS、SOS)含量。

1.2.5 酰基位移率的计算

按式(1)计算酰基位移率(x)。

$$x = (c_0 - c_1) / c_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: c_0 为高油酸花生油中sn-2位油酸含量; c_1 为反应后甘三酯sn-2位油酸含量。

1.2.6 硬脂酸指数的计算

硬脂酸指数(Stearic index, SI)是衡量类可可脂的甘三酯与可可脂是否相似的指标之一,可可脂的SI为0.52~0.57,故产物SI在此范围内为佳。按式(2)计算SI^[21]。

$$I_s = \frac{b + 2c}{(a + b + c) \times 2} \quad (2)$$

式中: I_s 为SI值; a 、 b 、 c 分别表示POP、POS、SOS的相对含量。

1.2.7 数据处理

数据均用“平均值±标准偏差”的形式表示,每组实验至少有2个平行样。采用SPSS 20软件进行显著性分析(Duncan 检验), $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 原料组成

表2、表3分别为高油酸花生油总脂肪酸、sn-2

位脂肪酸与甘三酯组成及含量测定结果。

表2 高油酸花生油总脂肪酸、sn-2位

脂肪酸	脂肪酸组成及含量	
	总脂肪酸	sn-2位脂肪酸
C16:0	6.29 ± 0.01	0.93 ± 0.00
C18:0	2.98 ± 0.01	0.48 ± 0.05
C18:1	73.99 ± 0.01	84.92 ± 0.21
C18:2	8.55 ± 0.01	13.67 ± 0.25
C20:0	1.37 ± 0.04	ND
C20:1	1.86 ± 0.01	ND
C22:0	3.17 ± 0.00	ND
C24:0	1.81 ± 0.01	ND

注:ND表示未检出。下同

表3 高油酸花生油甘三酯组成及含量

甘三酯	含量/%
OOO	70.79 ± 0.34
POO	11.84 ± 0.80
POP	0.33 ± 0.06
POS	ND
SOS	ND
其他	17.04

注:P. 棕榈酸;O. 油酸;S. 硬脂酸

由表2、表3可知,高油酸花生油的总脂肪酸中油酸含量为73.99%,sn-2位油酸含量接近85%,OOO是高油酸花生油中的主要甘三酯,其次是POO,二者均是定向酶催化酯交换合成类可可脂的前体物质。综上可知,高油酸花生油是制备类可可脂的理想原料之一。

2.2 酶促酯交换制备类可可脂单因素实验

2.2.1 硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比对酯交换反应的影响

在反应温度60℃、反应时间4 h、加酶量3% (以底物质量计)、酰基供体与高油酸花生油物质的量比14:1的条件下,考察硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比对酯交换过程中目标甘三酯含量、SI和酰基位移率的影响,结果如图1所示。

由图1可知,随着硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比的增加,POP的含量降低,POS的含量先增加后下降,SOS的含量增加。当硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比从0.9:1增加到1.1:1时,POP的含量高于SOS,这可能是由于短碳链的饱和脂肪酸酰基要比长碳链的饱和脂肪酸酰基酯交换更容易^[22]。随着硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比从0.9:1增加到2.1:1,SI从0.42逐渐增大至0.68。这是因为NS40086脂肪酶为sn-1,3位特异性脂肪酶,在其催化作用下,棕榈酰基与硬脂酰基不断键入到甘油骨架的sn-1,3位上,同时,sn-

1,3位上的部分棕榈酸酰基也会被硬脂酸酰基替代,随着硬脂酸乙酯在酰基供体中比例的不断增大,硬脂酸酰基参与酯交换的概率增大,SOS含量不断升高,SI也逐渐增大。

在sn-1,3位特异性脂肪酶催化酯交换反应时,会产生中间产物甘二酯和甘一酯,中间产物容易发生酰基位移从而导致副产物如目标甘三酯的位置异构体的生成,因此需要控制反应条件,减少酰基位移。由图1可知,随着硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比的增加,酰基位移率在2%~5%的范围内呈波动趋势,硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比

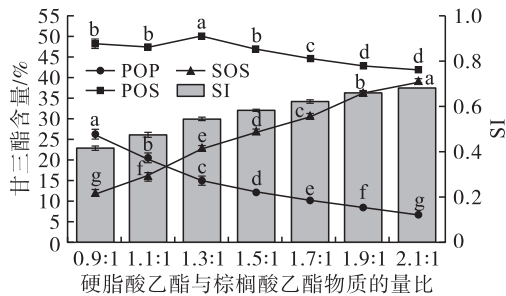


图1 硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比对酯交换反应的影响

2.2.2 酰基供体与高油酸花生油物质的量比对酯交换反应的影响

在反应温度60℃、反应时间4h、加酶量3%、硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比1.3:1的条件下,

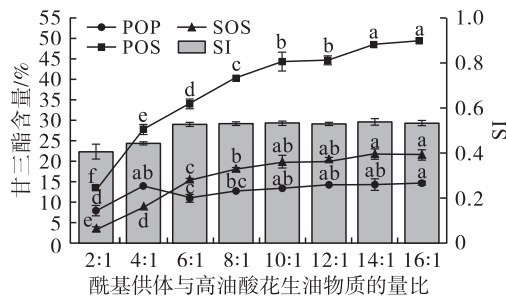
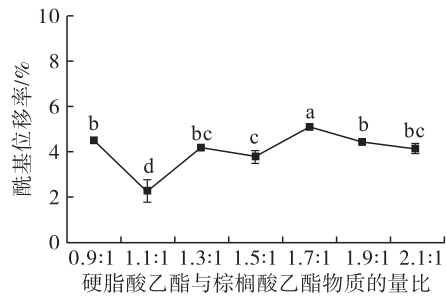


图2 酰基供体与高油酸花生油物质的量比对酯交换反应的影响

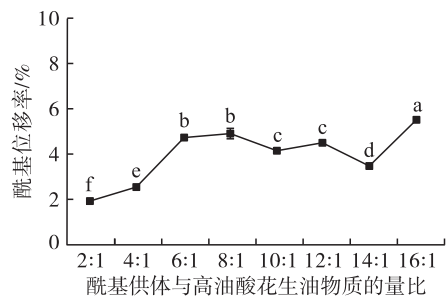
由图2可知:随着酰基供体与高油酸花生油物质的量比的增加,POP含量整体呈缓慢增加的趋势,POS的含量呈迅速增加的趋势,在酰基供体与高油酸花生油物质的量比为10:1后增速放缓,而SOS的含量呈缓慢增加的趋势,当酰基供体与高油酸花生油物质的量比大于6:1时,SI稳定在0.52~0.57范围内;随着酰基供体与高油酸花生油物质的量比的增加,酰基位移率在2%~6%的范围内呈波动趋势,酰基供体与高油酸花生油物质的量比的增加对酯交换过程中的酰基位移率影响不大。随着反应物酰基供体在反应体系中浓度的增大,促进了酯交换反应向正向进行,目标甘三酯的含量不断增加。本研究中当酰基供体与高油酸花生油物质的量比大于

对酯交换过程中的酰基位移率影响不大。酰基位移程度较低,说明酯交换反应主要发生在sn-1,3位上,目标甘三酯的位置异构体含量较少。

当本研究中的硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比为1.3:1时,产物甘三酯中POP、POS、SOS含量分别为14.82%、49.92%、22.68%,SI为0.54,酰基位移率为3.78%,目标甘三酯含量及SI与可可脂(POP 20.00%~29.35%、POS 26.30%~44.82%、SOS 20.00%~29.35%)^[11]接近,且酰基位移程度较低。因此,选择硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比1.3:1为后续工艺优化实验所采用的条件。



下,考察酰基供体与高油酸花生油物质的量比对酯交换过程中目标甘三酯含量、SI和酰基位移率的影响,结果如图2所示。



10:1时,继续增加酰基供体的量,POP、SOS的含量增加不明显,酰基供体利用率不高,但成本会提高。因此,在酰基供体与高油酸花生油物质的量比为10:1时进行酯交换反应比较理想,此时产物甘三酯中POP、POS、SOS含量分别为13.69%、44.73%、20.21%,SI为0.54,酰基位移率为4.13%。

2.2.3 加酶量对酯交换反应的影响

在反应温度60℃、反应时间4h、硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比1.3:1、酰基供体与高油酸花生油物质的量比14:1的条件下,考察加酶量对酯交换过程中目标甘三酯含量、SI和酰基位移率的影响,结果如图3所示。

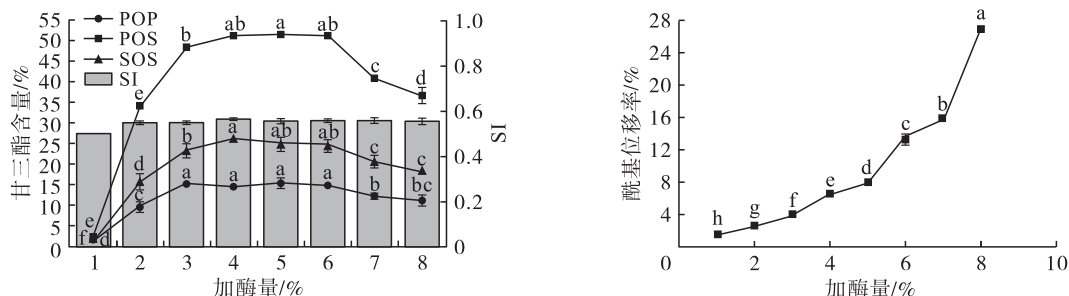


图3 加酶量对酯交换反应的影响

由图3可知,随着加酶量的增加,POP、SOS和POS的含量均呈先迅速增加后逐渐趋于平衡然后降低的趋势,SI先增加,在加酶量大于2%时稳定在0.52~0.57范围内,而酰基位移率呈不断增加的趋势。随着加酶量的增加,反应底物与酶活性部位接触增多,酯交换反应加快,目标甘油三酯含量迅速增加;继续增加加酶量,反应底物逐渐被酶所饱和,新增加的脂肪酶不能完全参与反应,目标甘油三酯含量增速变缓;此后再增加加酶量,酶自身所带水分导致体系中水分含量增大,使得甘油三酯酶促水解速率加快,体系产生了大量的甘二酯、甘一酯,加大了酰基位移的程度^[23],过量的酶也会增加体系的传质阻力,阻碍酯交换反应,导致目标甘油三酯含量降低。

当本研究中的加酶量低于3%时,酰基位移率缓慢增加,当加酶量大于5%时,酰基位移率增速加大,过高的加酶量会使目标甘油三酯的位置异构体含量增加。考虑到生产成本,选择加酶量3%作为后续工艺优化实验采用的条件,此条件下产物甘油三酯中POP、POS、SOS的含量分别为15.29%、48.45%、23.36%,SI为0.55,酰基位移率为3.75%。

2.2.4 反应温度对酯交换反应的影响

在反应时间4h、加酶量3%、硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比1.3:1、酰基供体与高油酸花生油物质的量比14:1的条件下,考察反应温度对酯交换过程中目标甘油三酯含量、SI和酰基位移率的影响,结果如图4所示。

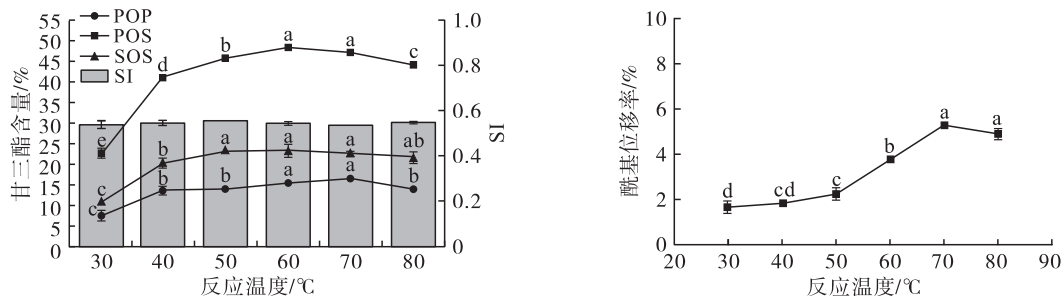


图4 反应温度对酯交换反应的影响

由图4可知,随着反应温度的升高,POP、POS、SOS的含量均呈先增加后降低的趋势,而SI变化趋势不明显,稳定在0.52~0.57范围内。当反应温度较低时,脂肪酶的活性较低,酶催化酯交换的能力较弱,此时反应体系的黏度也较大,酶与底物无法充分接触,反应难以正向进行;当反应温度上升时,体系传质阻力减小,酶与底物充分接触,反应温度处于酶的最适温度范围内,酶的活性增加,目标甘油三酯含量增加;当反应温度高于酶的最适温度时,酶的空间结构发生改变,导致酶的活性受到损害,甚至部分脂肪酶失活,酶催化酯交换的能力降低,酯交换反应受到影响,过高的温度也会使脂肪酶的特异性降低^[20],导致目标甘油三酯含量降低。由图4可知,随着反应温度的升高,酰基位移率呈先增加后降低的趋势。反应温度升高,酯交换反应充分进行,水解产生的甘

二酯、甘一酯增多,酰基位移的概率增加,当反应温度高于酶的最适温度后,酶的活性受到损害,体系中产生的中间产物甘二酯、甘一酯含量减少,酰基位移程度降低。

综合考虑产物中的目标甘油三酯含量及酰基位移率,选择在50°C进行酯交换反应较理想,此时产物甘油三酯中POP、POS、SOS的含量分别为13.87%、45.72%、23.22%,SI为0.56,酰基位移率为2.24%。

2.2.5 反应时间对酯交换反应的影响

在反应温度50°C、加酶量3%、硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比1.3:1、酰基供体与高油酸花生油物质的量比10:1的条件下,考察反应时间对酯交换过程中目标甘油三酯的含量、SI和酰基位移率的影响,结果如图5所示。

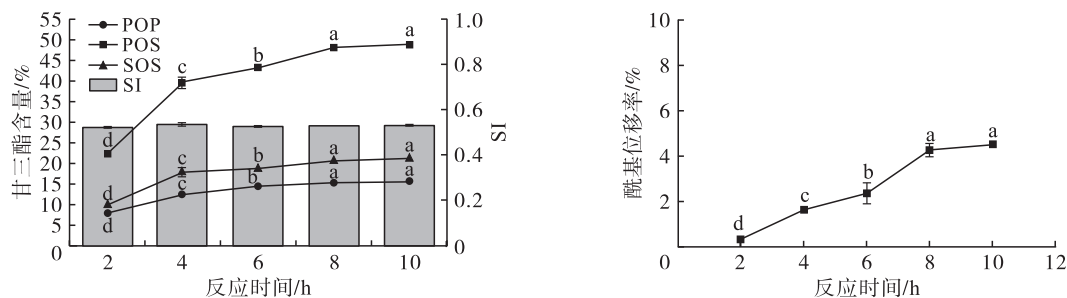


图5 反应时间对酯交换反应的影响

由图5可知,随着反应时间的延长,POP、POS、SOS的含量均呈先增加后稳定的趋势,而SI变化趋势不明显,稳定在0.52~0.57范围内。反应开始时,随着反应时间的延长,目标甘三酯含量迅速增加;反应时间从4 h延长至8 h时,随着反应的进行,底物浓度不断下降,产物浓度不断升高,逆反应加快,正向反应速度相对减小,目标甘三酯含量增速降低;当反应时间大于8 h时,目标甘三酯的含量均无显著增加,推测酯交换反应已达到动态平衡。由图5可知,随着反应时间的延长,酰基位移率呈先增加后稳定的趋势。这可能与酯交换反应过程中间产物甘二酯、甘一酯的生成量有关^[24]。随着反应时间延长甘二酯和甘一酯生成量增加,导致酰基位移程度增加;当酯交换反应达到动态平衡时,体系内甘二酯、甘一酯含量趋于稳定,酰基位移程度趋于稳定。

综上,考虑到延长反应时间会提高生产成本,酰基位移程度也会增加,导致副产物增多,不利于反应的进行^[25]。因此,选择反应时间6 h作为后续工艺优化实验采用的条件,此条件下POP、POS、SOS的

含量分别为14.38%、43.28%、18.87%,SI为0.53,酰基位移率为2.34%。

2.3 酶促酯交换制备类可可脂响应面实验

2.3.1 响应面实验设计及结果

在单因素实验基础上,固定硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比1.3:1,以酰基供体与高油酸花生油物质的量比(物质的量比,A)、加酶量(B)、反应温度(C)、反应时间(D)为因素,以POP含量(Y_1)、POS含量(Y_2)、SOS含量(Y_3)和酰基位移率(Y_4)为响应值,采用Design Expert 8.0.6软件进行四因素三水平的Box-Behnken响应面设计,对工艺条件进行优化。响应面实验因素与水平见表4,响应面实验设计及结果见表5,回归模型方差分析见表6。

表4 响应面实验因素与水平

水平	A 物质的量比	B 加酶量/%	C 反应温度/°C	D 反应时间/h
-1	8:1	2	40	4
0	10:1	3	50	6
1	12:1	4	60	8

表5 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /%	Y_4 /%
1	0	0	1	1	14.78	49.17	21.89	6.57
2	-1	0	0	-1	12.65	37.32	16.30	1.63
3	0	1	-1	0	13.65	47.12	24.90	8.75
4	1	0	1	0	15.43	49.09	23.53	8.92
5	1	1	0	0	15.03	49.40	24.81	12.55
6	0	0	-1	-1	13.05	40.55	17.82	1.50
7	-1	0	0	1	13.47	45.30	20.86	5.30
8	-1	0	1	0	14.17	43.24	21.62	9.51
9	1	-1	0	0	13.00	42.28	21.41	3.23
10	1	0	-1	0	14.09	45.71	23.03	8.85
11	-1	0	-1	0	13.45	39.53	19.04	6.01
12	0	0	0	0	14.01	46.38	23.08	7.28
13	0	1	1	0	13.63	47.84	24.45	14.46
14	-1	1	0	0	14.10	44.13	21.98	9.88
15	1	0	0	1	14.85	51.01	23.12	6.53
16	1	0	0	-1	14.11	45.01	20.93	2.51

续表 5

实验号	A	B	C	D	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$
17	0	0	0	0	13.62	46.58	24.43	8.26
18	0	-1	0	-1	10.37	25.29	11.02	0.13
19	-1	-1	0	0	9.92	32.29	17.11	3.59
20	0	0	1	-1	13.82	43.13	19.04	2.45
21	0	0	0	0	14.19	46.39	23.42	7.28
22	0	1	0	1	14.92	49.40	21.54	10.37
23	0	0	-1	1	14.70	47.91	20.28	3.36
24	0	-1	1	0	12.66	40.74	20.18	3.83
25	0	0	0	0	13.55	44.61	24.12	7.29
26	0	1	0	-1	14.26	46.36	21.08	5.12
27	0	0	0	0	14.59	47.36	23.76	7.29
28	0	-1	-1	0	10.78	30.98	14.89	6.27
29	0	-1	0	1	12.45	35.60	15.49	4.18

对表 5 中的数据进行多元回归拟合,得到二次多项回归方程:

$$Y_1 = 13.99 + 0.73A + 1.37B + 0.40C + 0.58D - 0.54AB + 0.15AC - 0.02AD - 0.48BC - 0.35BD - 0.17CD + 0.07A^2 - 1.12B^2 + 0.06C^2 - 0.04D^2$$

$$Y_2 = 46.26 + 3.39A + 6.42B + 1.78C + 3.39D - 1.18AB - 0.08AC - 0.49AD - 2.26BC - 1.82BD -$$

$$0.33CD - 0.44A^2 - 4.55B^2 - 0.36C^2 - 1.48D^2$$

$$Y_3 = 23.76 + 1.66A + 3.22B + 0.90C + 1.42D -$$

$$0.37AB - 0.52AC - 0.59AD - 1.43BC - 1.00BD + 0.10CD - 0.43A^2 - 2.29B^2 - 0.81C^2 - 3.47D^2$$

$$Y_4 = 7.48 + 0.56A + 3.32B + 0.92C + 1.91D +$$

$$0.76AB - 0.86AC + 0.09AD + 2.04BC + 0.30BD + 0.56CD + 0.01A^2 + 0.49B^2 + 0.26C^2 - 3.60D^2$$

表 6 回归模型方差分析

方差来源	F				p			
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
模型	13.394	16.672	17.740	28.303	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
A	25.684	32.501	26.979	4.706	0.000 2	<0.000 1	0.000 1	0.047 7
B	90.337	116.600	101.621	168.429	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
C	7.632	8.998	7.857	12.801	0.015 3	0.009 6	0.014 1	0.003 0
D	16.018	32.565	19.626	55.820	0.001 3	<0.000 1	0.000 6	<0.000 1
AB	4.652	1.311	0.440	2.913	0.048 9	0.271 2	0.517 5	0.109 9
AC	0.386	0.006	0.882	3.734	0.543 9	0.937 3	0.363 4	0.073 8
AD	0.006	0.230	1.145	0.038	0.937 2	0.638 3	0.302 6	0.846 5
BC	3.633	4.812	6.720	21.081	0.077 4	0.045 6	0.021 3	0.000 4
BD	2.029	3.112	3.279	0.457	0.176 2	0.099 5	0.091 6	0.510 0
CD	0.479	0.102	0.031	1.621	0.500 1	0.753 4	0.862 7	0.223 7
A^2	0.111	0.300	0.964	0.001	0.743 8	0.592 4	0.342 8	0.974 7
B^2	32.886	31.678	27.677	1.997	<0.000 1	<0.000 1	0.000 1	0.179 4
C^2	0.087	0.193	3.477	0.546	0.772 2	0.666 8	0.083 3	0.472 2
D^2	0.041	3.327	63.838	106.503	0.842 0	0.089 5	<0.000 1	<0.000 1
失拟项	1.503	5.446	5.534	5.399	0.369 6	0.058 4	0.056 8	0.059 2

注: $p < 0.01$ 为极显著; $p < 0.05$ 为显著; $p > 0.05$ 为不显著

由表 6 可知,4 个回归模型均极显著($p < 0.01$),失拟项均不显著($p > 0.05$), $Y_1 \sim Y_4$ 各回归模型的 R^2 分别为 0.930 5、0.943 4、0.946 6、0.965 9,各回归模型 R^2_{Adj} 分别为 0.861 1、0.886 8、0.893 3、0.931 7,说明各模型拟合程度较好,预测值与真实值之间的

相关性较高。由各模型 F 值可看出:各因素对 POP 含量影响的排序为加酶量 > 酰基供体与高油酸花生油物质的量比 > 反应时间 > 反应温度;各因素对 POS 含量影响的排序为加酶量 > 反应时间 > 酰基供体与高油酸花生油物质的量比 > 反应温度;各因素对

SOS含量影响的排序为加酶量 > 酰基供体与高油酸花生油物质的量比 > 反应时间 > 反应温度;各因素对酰基位移率影响的排序为加酶量 > 反应时间 > 反应温度 > 酰基供体与高油酸花生油物质的量比。

2.3.2 响应面验证实验

经 Design Expert 8.0.6 软件预测,得到回归模型的最佳工艺条件为酰基供体与高油酸花生油物质的量比 12:1、加酶量 2.71%、反应温度 59.99℃、反应时间 6.98 h,在此条件下 POP、POS、SOS 含量和酰基位移率预测值分别为 15.43%、50.48%、23.72% 和 7.00%。考虑到实际操作性,将工艺参数修正为酰基供体与高油酸花生油物质的量比 12:1、加酶量 2.7%、反应温度 60℃、反应时间 7 h,在此条件下进行验证实验,结果显示,POP、POS、SOS 含量分别为 14.55%、48.87%、25.17%,SI 为 0.56,酰基位移率为 7.35%,与预测值基本吻合,表明响应面的分析结果可靠。经测定,产物甘三酯的总脂肪酸组成为棕榈酸 24.19%、硬脂酸 35.02%、油酸 33.91%、亚油酸 4.61%、其他 2.26%,与天然可可脂的相近^[2]。

3 结论

采用 NS40086 脂肪酶催化高油酸花生油与酰基供体棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯交换制备类可可脂。通过单因素实验和响应面优化得到最佳工艺条件:酰基供体与高油酸花生油物质的量比 12:1,硬脂酸乙酯与棕榈酸乙酯物质的量比 1.3:1,反应温度 60℃,加酶量 2.7%,反应时间 7 h。在最佳工艺条件下,产物甘三酯中 POP、POS、SOS 的含量分别为 14.55%、48.87%、25.17%,SI 为 0.56,酰基位移率为 7.35%。产物的目标甘三酯组成和脂肪酸组成与可可脂相近,可作为可可脂替代品应用。

参考文献:

[1] KONZOCK O, MATSUSHITA Y, ZAGHEN S, et al. Altering the fatty acid profile of *Yarrowia lipolytica* to mimic cocoa butter by genetic engineering of desaturases[J/OL]. Microb Cell Fact, 2022, 21(1):25 [2023-04-24]. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01748-x>.

[2] SUH N N, MOLUA E L. Cocoa production under climate variability and farm management challenges: some farmers' perspective[J/OL]. J Agric Food Res, 2022, 8(6):100282 [2023-04-24]. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100282>.

[3] GHAZANI S M, MARANGONI A G. Novel cocoa butter equivalent from microalgal butters[J]. J Am Oil Chem Soc, 2020, 97(10):1095-1104.

[4] GHAZANI S M, ZOU L, RAKITSKY W G, et al. Algal

butter, a novel cocoa butter equivalent: chemical composition, physical properties, and functionality in chocolate[J]. J Am Oil Chem Soc, 2018, 95(10):1239-1251.

[5] NORAZLINA M R, JAHURUL M H A, HASMADI M, et al. Trends in blending vegetable fats and oils for cocoa butter alternative application: a review[J]. Trends Food Sci Tech, 2021, 116(10):102-114.

[6] LEE W J, QIU C, LI J, et al. Sustainable oil-based ingredients with health benefits for food colloids and products[J]. Curr Opin Food Sci, 2022, 43(10):82-90.

[7] BAHARI A, AKOH C C. Synthesis of a cocoa butter equivalent by enzymatic interesterification of illipe butter and palm midfraction[J]. J Am Oil Chem Soc, 2018, 95(5):547-555.

[8] CHANG Y, CHAN L Y, KONG F, et al. An innovative approach for real-time authentication of cocoa butter using a combination of rapid evaporative ionization mass spectrometry and chemometrics[J/OL]. Food Control, 2022, 133(3):108617 [2023-04-24]. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108617>.

[9] SAGIRI S S, SHARMA V, BASAK P, et al. Mango butter emulsion gels as cocoa butter equivalents: physical, thermal, and mechanical analyses[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(47):11357-11368.

[10] 刘陈钰,甄铖,郑小宇,等.类可可脂原料油中低熔点甘油三酯的组成、含量调控与综合利用[J/OL].中国油脂:1-10 [2023-04-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1099.TS.20220915.1747.006.html>.

[11] AUMPAI K, TAN C P, HUANG Q, et al. Production of cocoa butter equivalent from blending of illipe butter and palm mid-fraction[J/OL]. Food Chem, 2022, 384(8):132535 [2023-04-24]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132535>.

[12] ORNLA-IED P, PODCHONG P, SONWAI S. Synthesis of cocoa butter alternatives from palm kernel stearin, coconut oil and fully hydrogenated palm stearin blends by chemical interesterification[J]. J Sci Food Agric, 2022, 102(4):1619-1627.

[13] ZHANG Z, LEE W J, WANG Y. Evaluation of enzymatic interesterification in structured triacylglycerols preparation: a concise review and prospect[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(19):3145-3159.

[14] WANG M, WEI Y, JI B, et al. Advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for cocoa butter equivalent production[J/OL]. Front Bioeng Biotech, 2020, 8(10):594081 [2023-04-24]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.594081>.

- humans; some naturally occurring substances. food items and constituents [M]. Lyon, France: World Health Organization, 1993.
- [4] SCHWARTZBORD J R, BROWN D L. Aflatoxin contamination in Haitian peanut products and maize and the safety of oil processed from contaminated peanuts [J]. Food Control, 2015, 56: 114 – 118.
- [5] BATAL A, DALE N, CAFÉ M. Nutrient composition of peanut meal [J]. J Appl Poul Res, 2005, 14(2): 254 – 257.
- [6] ZHAO X, CHEN J, DU F. Potential use of peanut by – products in food processing: a review [J]. J Food Sci Technol, 2012, 49(5): 521 – 529.
- [7] RODRÍGUEZ A, RODRÍGUEZ M, MARTÍN A, et al. Evaluation of hazard of aflatoxin B₁, ochratoxin A and patulin production in dry – cured ham and early detection of producing moulds by qPCR [J]. Food Control, 2012, 27(1): 118 – 126.
- [8] MAO J, HE B, ZHANG L, et al. A structure identification and toxicity assessment of the degradation products of aflatoxin B₁ in peanut oil under UV irradiation [J/OL]. Toxins, 2016, 8(11): 332 [2022 – 05 – 10]. <https://doi.org/10.3390/toxins8110332>.
- [9] STEFANO V D, PITONZO R, BARTOLOTTA A. et al. Effects of γ – irradiation on the α – tocopherol and fatty acids content of raw unpeeled almond kernels (*Prunus dulcis*) [J]. LWT – Food Sci Technol, 2014, 59(1): 572 – 576.
- [10] STEFANO V D, PITONZO R, CICERO N, et al. Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma – irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations [J]. Food Addit Contam A, 2014, 31(12): 2034 – 2039.
- [11] VELAZHAHAN R, VIJAYANANDRAJ S, VIJAYA – SAMUNDEESWARI A, et al. Detoxification of aflatoxins by seed extracts of the medicinal plant, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turill – structural analysis and biological toxicity of degradation product of aflatoxin G₁ [J]. Food Control, 2010, 21(5): 719 – 725.
- [12] ORUÇ H H, SORUCU A, TÜRKMEN I I, et al. Determination of various mycotoxin concentrations in the feedstuffs and feed produced by a feed manufacturer in Turkey [J]. Kafkas Univ Vet Fak, 2012, 18(4): 633 – 638.
- [13] 赵国斌. 氨气熏蒸法降解花生中的黄曲霉素 B₁ [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3): 111 – 113.
- [14] 林叶, 李进伟, 蒋将, 等. 臭氧去除黄曲霉毒素 B₁ 工艺优化及其对花生粕营养品质的影响 [J]. 中国油脂, 2015, 40(11): 28 – 32.
- [15] 金华丽, 史秋映. 柠檬酸处理对花生粕中黄曲霉毒素 B₁ 脱毒效果的研究 [J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2013, 34(3): 39 – 42.
- [16] 陈璐. 工作场所空气中乙胺、异丙胺、正丁胺和二乙烯三胺的离子色谱法研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2021.
- [17] LIU R, LU M, WANG R, et al. Degradation of aflatoxin B₁ in peanut meal by electron beam irradiation [J]. Int J Food Prop, 2018, 21(1): 892 – 901.
- [18] 赵春霞, 王轶, 吕育财, 等. 黄曲霉毒素的生物降解研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(20): 5172 – 5176.
- [19] NICLIÁS – VÁZQUEZ I, MÉNDEZ – AIBORES A, MORENO – MARTÍNEZ E, et al. Role of lactone ring in structural, electronic, and reactivity properties of aflatoxin B₁: a theoretical study [J]. Arch Environ Con Tox, 2010, 59(3): 393 – 406.
- [20] 孙统政, 王娜, 田俊, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 检测与脱毒方法最新研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2021, 37(3): 789 – 799.

(上接第 103 页)

- [15] 沈琪, 刘元法, 徐振波, 等. 非水相酶促酸解制备类可可脂的工艺研究 [J]. 中国油脂, 2011, 36(7): 41 – 45.
- [16] 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(5): 128407 [2023 – 04 – 24]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128407>.
- [17] SONPRASERT T, ORNLA – IED P, SONWAI S. Synthesis of confectionery fat from illipé butter stearin and palm mid – fraction blend via enzymatic interesterification [J]. Int J Food Sci Tech, 2022, 57(5): 3150 – 3161.
- [18] 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.
- [19] 黄楚楚, 熊辉煌, 龚斌, 等. 脂肪酶催化单油酸甘油酯制备功能性 1,3 – 甘油二酯 [J]. 食品科学, 2015, 36(22): 1 – 5.
- [20] 万建春, 李维瑶, 俞建国, 等. 酶法合成类可可脂研究进展 [J]. 粮食与油脂, 2011(11): 1 – 4.
- [21] 谭志强. 酶促酯交换法制备低热量乌柏类可可脂的研究 [D]. 南京: 南京理工大学, 2013.
- [22] 徐学兵, 胡晓中, 张根旺. 茶油酶促改性一步反应影响因素研究 [J]. 中国油脂, 1996, 21(1): 33 – 35.
- [23] 池永清, 徐学兵, 毕艳兰, 等. 制备类可可脂原料用油的研究进展 [J]. 中国油脂, 2017, 42(5): 48 – 53.
- [24] 安晓东. 酶的非离子表面活性剂修饰对酶促酯交换行为的影响 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2014.
- [25] 马芳, 宋海东, 魏安池, 等. Lipozyme TL IM 酶促酯交换棕榈油中间熔点物制备类可可脂的研究 [J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2014, 35(3): 21 – 24, 36.