

# T1 脂肪酶催化合成甘油酯过程中 MAG 与 DAG 最大含量预测模型研究

覃小丽<sup>1,2</sup>, 钟金锋<sup>1</sup>, 王永华<sup>2</sup>

(1. 西南大学食品科学学院, 四川重庆 400715) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 单甘酯 (MAG) 和甘油二酯 (DAG) 作为一类多功能添加剂, 广泛应用于食品和化妆品等行业。本文利用 T1 脂肪酶催化甘油和油酸酯化反应合成甘油酯, 探讨了底物摩尔比、水添加量、反应时间和温度对产物 MAG 和 DAG 含量的影响。结果表明, MAG 含量随着反应时间的进行呈现先增大后缓慢减少的趋势, DAG 含量则随着时间的进行先快速增大后趋于平衡的趋势, 甘油三酯呈现不断增加的趋势。在给定温度范围内 (40~60 °C), 温度对 DAG 和 MAG 含量影响可忽略不计。基于该过程摩尔比和水添加量的影响, 建立了 MAG 和 DAG 含量变化规律的预测模型,  $Er_{DAG}\% = 0.5967 \times r^{0.271} \times (-1.01D_w + 40.2)$ ,  $Er_{MAG}\% = 0.7422 \times r^{0.366} \times (-0.745 D_w + 23.7)$ , 实验实测值与模型预测值之间相近程度的曲线拟合相关系数 ( $R^2$ ) 均达到 0.99 以上。可见, 在本实验范围内, 该模型可有效预测反应过程 DAG 和 MAG 最大含量的变化规律。本模型将为 T1 脂肪酶催化合成甘油酯过程中 MAG 和 DAG 最大含量变化的生产实践提供很好的指导。

**关键词:** T1 脂肪酶; 酯化反应; 单甘酯; 甘油二酯; 预测模型

文章篇号: 1673-9078(2014)1-131-136

## Empirical Model for Predicting Contents of Monoglyceride and Diglyceride during the Synthesis of Acylglycerols by T1 Lipase-Catalyzed Esterification

QIN Xiao-li<sup>1,2</sup>, ZHONG Jin-Feng<sup>1</sup>, WANG Yong-hua<sup>2</sup>

(1. College of Food Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Monoglyceride (MAG) and diglyceride (DAG) are a kind of multifunctional additives. They are widely used in food and cosmetic industries. Acylglycerols are synthesized by esterification of glycerol with oleic acid in the presence of T1 lipase. The effects of substrate molar ratio (glycerol: oleic acid), water content, time and temperature on esterification progress were studied. An empirical model for predicting MAG and DAG contents during the synthesis of acylglycerols was proposed. The results showed that MAG content increased first and then slowly decreased with an increase of reaction time, DAG content increased rapidly first and tended to stable during the time increased, while triglyceride (TAG) content exhibited a keep increasing pattern. MAG and DAG contents were hardly influenced by reaction temperature ranging from 40~60 °C. Based on the effects of substrate molar ratio and water content, two empirical models [ $Er_{DAG}\% = 0.5967 \times r^{0.271} \times (-1.01D_w + 40.2)$  and  $Er_{MAG}\% = 0.7422 \times r^{0.366} \times (-0.745D_w + 23.7)$ ] were established for predicting MAG and DAG contents, respectively. The results showed that the present models had a good correlation ( $R^2 = 0.99$ ) with the experimental data for predicting MAG and DAG contents. Such data would be valuable for the process control and optimization of the synthesis of acylglycerols.

**Key words:** T1 Lipase; esterification; monoacylglycerol; diacylglycerol; predicted model

收稿日期: 2013-09-01

基金项目: 西南大学博士启动基金项目 (SWU112042); 中国博士后科学基金项目 (2013M531927); 中央高校基本科研业务费专项重点项目 (XDJK2013B034, SWU113036); 重庆市基础与前沿研究计划项目 (cstc2013jcyjA80024)

作者简介: 覃小丽 (1984-), 女, 博士, 讲师, 主要从事食品化学和酶法催化改性油脂的相关研究

通讯作者: 钟金锋 (1984-), 男, 博士, 讲师, 主要从事食品营养化学、碳水化合物改性及其过程的优化控制研究; 王永华 (1973-), 女, 博士, 教授, 主要从事食品化学、食品酶工程的相关研究

单甘酯(MAG)的结构包含一个亲油的中长链烷基和两个亲水的羟基而具有分散、润湿、乳化等功能,因此,MAG 作为一类重要的非离子型表面活性剂广泛应用于食品、化妆品等行业。甘油二酯(DAG)是指甘油的两个羟基与两个脂肪酸发生酯化得到的产物,其在油脂中含量较少。研究表明<sup>[1-2]</sup>, DAG 可显著降低人体餐后血脂含量,对防治高血压、高血脂等疾病有一定功效,所以它是一种极具有营养价值和市场潜力的功能性油脂<sup>[3]</sup>。同时,DAG 也可作为一种安全的非离子型食品乳化剂广泛应用于饮料、奶粉等产品<sup>[4-5]</sup>。因此,研究高效率获取安全性好、人体相容性高 MAG 和 DAG 的合成途径成为当前的研究热点。

目前,MAG 和 DAG 的合成主要有化学法和酶法,其中化学法的反应需要高温(>180 °C),不仅能耗大,而且容易使不饱和脂肪酸(油酸、亚油酸等)降解而影响最终产品质量。酶法合成以其催化专一性、反应条件温和和环境友好性等特点成为酶工程研究热点之一<sup>[6]</sup>。酶法催化合成MAG和DAG的途径主要有酯化反应<sup>[7]</sup>、水解反应<sup>[8]</sup>和甘油解反应<sup>[9]</sup>,其主要产物以 DAG、MAG,甘油三酯(TAG)为主。在后续的分选纯化中,MAG 可以通过较为简单的工艺即可从产物中完全分离,而以现有的分离技术难以彻底分离 DAG 和 TAG。如何避免酶催化合成过程大量的 TAG 产生是制备高纯度 MAG 和 DAG 的关键。因此,研究催化反应过程中 MAG 与 DAG 最大含量变化规律,对于生产控制尤其重要。研究者对 MAG 和 DAG 合成过程因素,如对不同脂肪酶催化特异性及其过程参数优化进行研究<sup>[3,10-11]</sup>。该类研究主要从酶催化的基元反应出发,推导并通过计算得到反应体系中产物和反应物含量变化规律,但是从基元反应出发推导的动力学模型(通常是浓度与时间之间变化的多元微分方程形式),其需要拟合求解的系数较多,计算较为繁琐。钟金锋等<sup>[12]</sup>建立了 Novozym 435 脂肪酶催化合成乳酸正丁酯过程酯化率变化的数学经验预测模型,该模型能较好预测双底物合成单一目标产物的过程酯化率变化规律。但是截止目前,对于脂肪酶催化双底物合成多种目标产物过程酯化率的变化,尤其是关于酶法催化合成用途更为广泛的 MAG 和 DAG 过程最大含量变化规律的数学经验模型尚未见报道。

Leow 等<sup>[13]</sup>从 *Geobacillus zalihae* strain T1 中分离得到一种新型 T1 脂肪酶,研究发现 T1 脂肪酶是一种较好的热稳定脂肪酶<sup>[14]</sup>,能较好水解中链的甘油酯,因此其在油脂改性工业化应用中具有较好的应用前景。目前对 T1 脂肪酶研究主要集中在酶的分离纯

化、酶学性质和分子改造方面<sup>[15-16]</sup>,对其应用于油脂改性的报道较少。Xu 等<sup>[17]</sup>用 T1 脂肪酶催化水解棕榈硬脂的产物中 MAG 和 DAG 含量(分别为 6.00% 和 28.10%)较低;同时关于 T1 脂肪酶催化酯化反应合成甘油酯的研究还没见文献报道。因此,本研究以油酸和甘油为底物,考察反应因素对 T1 脂肪酶粗酶催化油酸和甘油生成 MAG 和 DAG 的影响,以期产物中获得较高含量的 MAG 和 DAG,并依据 MAG 和 DAM 最大含量变化趋势,建立了 MAG 和 DAG 最大含量的数学经验预测模型,为 T1 脂肪酶催化合成 MAG 和 DAG 的实际生产过程的工艺优化和品质控制提供实践指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大肠杆菌 pET-23a-CBD-T1-BL21 由本课题组提供<sup>[17]</sup>;培养基胰蛋白胨和酵母提取物为 OXOID 公司产品;油酸(>76wt %,分析纯)购于上海晶纯试剂有限公司;甘油(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司;三油酸甘油酯(CAS no.:122-32-7),单油酸甘油酯(CAS no.:111-03-5)和甘油二酯(CAS no.:25637-84-7;由 15%的 1,2-二油酸甘油二酯和 85%的 1,3-二油酸甘油二酯组成)标准品均购于 Sigma-Aldrich 公司;正己烷、异丙醇,均为色谱纯,购自天津科密欧药品公司。其他药品和试剂均为分析纯或色谱纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 T1 脂肪酶的制备

T1 脂肪酶的制备按照参考文献<sup>[17]</sup>进行。简而言之,将含有重组质粒的 pET-23a-CBD-T1-BL21 菌种扩大培养后,按 2%接种量接种于 LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),在 37 °C、200 r/min 摇床下培养到 OD<sub>600</sub> 达到 0.6~0.8 时,加入诱导剂 IPTG 使其终浓度为 0.05 mmol/L 诱导后,置于 20 °C 继续培养 12 h。将诱导培养后的细胞在 4 °C、12857 g/min 下离心 20 min,收集菌体。将菌体重悬于细胞裂解 PBS 缓冲溶液(pH 7.4),然后置于冰浴中用超声波破碎仪下破碎细胞(功率 250 W,脉冲 3 s,间隔 3 s,15 min)。将细胞裂解液离心后(4 °C,12857 g/min,20 min)取上清液并真空冷冻干燥,制得 T1 脂肪酶粗酶。

#### 1.2.2 酶活测定

将 29.34 mmol 甘油和 14.67 mmol 油酸置于 25 mL 带塞三角瓶中,充分混合后加入适量的粗酶和 7% (占

底物重)的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mM, pH 9.0), 置于反应温度为 60 °C 恒温磁力搅拌器 (转速为 542 r/min) 下反应 20 min。对反应初始和 20 min 的反应物离心, 取上层油相。精确称取 0.1 g 油相, 充分溶于 25 mL 的异丙醇, 以 1% 酚酞为指示剂, 用 0.1 mol/L 的 KOH 标准溶液进行滴定至为红色。酯化酶活定义为: 将测定条件下每分钟消耗 1 μmol 脂肪酸所需要的酶量定义为一个脂肪酶活力单位 (U/g)。

### 1.2.3 酯化反应

称取一定量的甘油和油酸置于 25 mL 的具塞锥形瓶中, 充分混合后加入粗酶 (9.7 U/g, 占总底物重) 和一定的 Tris-HCl 缓冲液, 置于一定温度的水浴振荡器 (转速为 542 r/min) 中反应, 定时取样并采用高效液相色谱法分析酯化产物组成。同一条件进行两次平行试验, 以两次测定结果的算术平均值为最终测定结果。

### 1.2.4 酯化产物组成分析

取 0.5 mL 酯化产物于 1.5 mL 离心管中, 6950 g/min 离心 10 min 后, 取 20 μL 上层酯化产物于进样品中, 用 1 mL 流动相 (正己烷/异丙醇/甲酸 = 15:1:0.003) 溶解, 然后采用高效液相色谱法—示差检测器 (HPLC-RID) 对其组成进行分析。其分析条件为: Waters 1525 型 HPLC; 检测器, 2414 示差检测器; 色谱柱, Luna 5u Silica (2) 100A, 250 mm × 4.60 mm (phenomenex); 柱温, 35 °C; 流动相, 正己烷/异丙醇/甲酸 (15:1:0.003, 体积比), 流速 1.0 mL/min; 进样量, 10 μL。采用面积归一化法定量, TAG、DAG 和 MAG 含量分别指 TAG、DAG 和 MAG 占样品中脂肪酸和甘油酯 [TAG、DAG、MAG] 的比重。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酯化反应过程 MAG、DAG 和 TAG 的变化

图 1 (a、b、c) 是不同反应条件情况下, MAG、DAG 和 TAG 的含量随着反应时间进行的变化趋势图。通过实验样品的 HPLC 分析结果可知, T1 脂肪酶粗酶催化甘油与油酸的酯化反应过程, 同时生成了 MAG、DAG 和 TAG。从图可以得知, 在水添加量 (H<sub>2</sub>O) 和甘油/油酸摩尔比 (-OH:-COOH) 一定的情况下, MAG 含量呈现先快速增大后缓慢降低的变化趋势, DAG 含量则出现了快速增大到一定量后趋于平衡的趋势, 且可看到, 温度升高对 MAG 和 DAG 含量相对变化影响较小。TAG 含量则随着时间增大而增

大, 且温度越高, 其含量越高, 变化趋势越明显。在反应温度和 -OH:-COOH 一定的情况下, MAG 含量呈现随着时间的进行先增大后缓慢减少的趋势, 并且, 水添加量越多, 后期 MAG 含量下降趋势越明显。DAG 含量则随着时间的进行出现快速增大后趋于平衡, 并且水添加量较大的情况下, 达到平衡时 DAG 含量相对较少。TAG 含量则伴随时间的进行呈现一直增大的趋势, 水分的增大对其变化影响不大。在反应温度和水添加量一定的情况下, MAG 同样出现快速增大到最大后, 再呈现缓慢下降的趋势; -OH:-COOH 的比值越大, MAG 含量也越多。DAG 呈现出与前面类似的变化趋势, -OH:-COOH 较大时, 平衡时 DAG 含量也相对较大。此时, TAG 含量则呈现出快速增大的变化趋势, 并且, -OH:-COOH 越高的情况下, TAG 含量变化得越快。

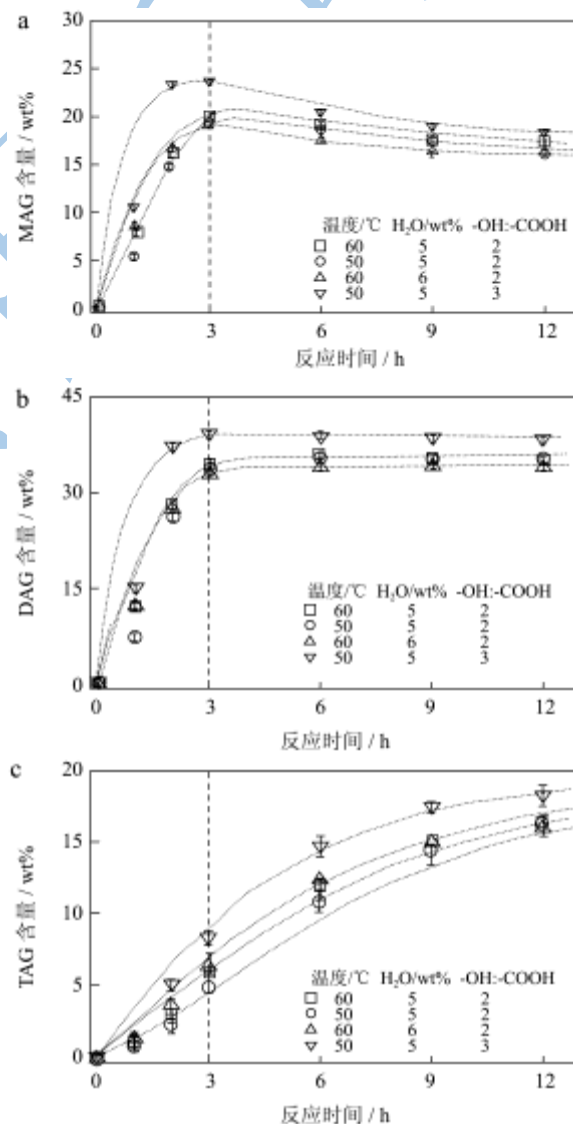


图 1 不同反应条件下反应时间对 MAG (a)、DAG (b) 和 TAG (c) 含量的影响

Fig.1 Effect of reaction time on MAG, DAG and TAG contents

综上所述,在T1脂肪酶粗酶催化甘油与油酸生成甘油酯的过程中,酯化产物的MAG和DAG最高含量可分别达23.51%和38.28%,同时MAG、DAG和TAG处于动态变化的过程,其过程存在着互相酯化、水解等的反应平衡过程。对于本实验而言,MAG和DAG是我们的目标产物,TAG则属于副产物。从反应效率和经济上考虑,希望反应得到的目标产物越多,副产物则尽可能的越少。本文旨在建立足够长的时间内各反应条件所能达到的MAG和DAG含量的预测方程,因此,我们需要考察整个反应过程中MAG和DAG最大含量的变化趋势。同时,我们从图1可以观察得知,反应的前期(如3、6h)MAG和DAG的含量达到了最大值,而TAG则一直呈现逐渐增加的趋势。因此,可以推断,在足够长的时间内(3h),MAG和DAG的含量随时间的延长能够达到最大值,而不是随着时间的进行呈现一直增加的趋势,因此,本文中,时间确定为3h,同时,时间不作为本研究的数学经验预测模型方程的变量。

## 2.2 MAG和DAG最大含量预测方程的建立

### 2.2.1 反应温度对MAG和DAG最大含量的影响

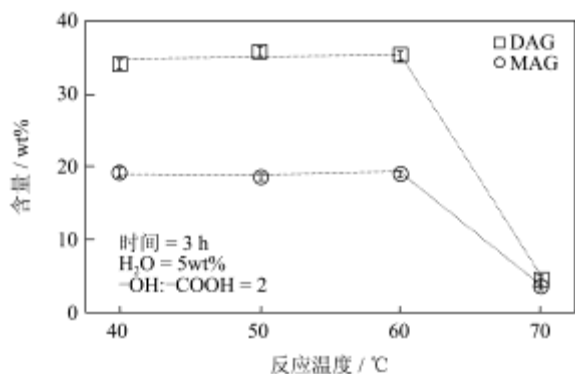


图2 反应温度对MAG和DAG最大含量的影响

Fig.2 Effect of reaction temperature on MAG and DAG contents

图2是反应温度对MAG和DAG最大含量的影响示意图。由图中可知,随着反应温度的升高,MAG和DAG的最大含量呈现出基本不变的趋势,当温度升高到一定程度(70°C)时,两者的含量均出现了迅速下降,这可能是较高的温度导致T1脂肪酶失活<sup>[13]</sup>,影响了其催化性能。因此,当温度选择合适的范围内时(40~60°C),对于T1脂肪酶而言,温度对MAG和DAG的最大含量的影响基本可以忽略,在合理温度范围内的MAG和DAG最大含量数学经验预测模型方程中可不考虑温度。

### 2.2.2 底物摩尔比对MAG和DAG最大含量的影响

图3是MAG与DAG最大含量与底物摩尔比(-OH:-COOH,用 $r$ 表示)的关系示意图。由图中可知,MAG与DAG含量均随着 $r$ 的增大。我们以 $r$ 的指数形式对DAG与MAG含量分别作图,得到新的变化趋势分别如图4、图5所示。

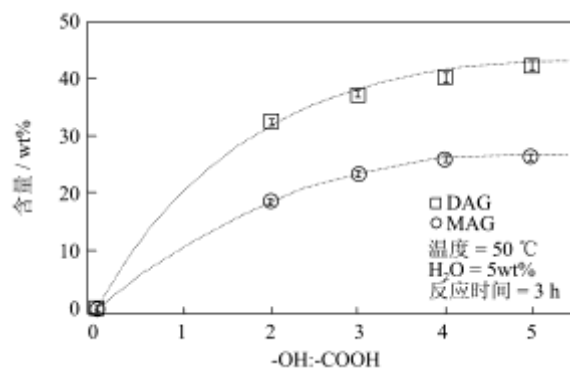


图3 底物摩尔比对MAG和DAG含量的影响

Fig.3 Effect of substrate molar ratio on MAG and DAG contents

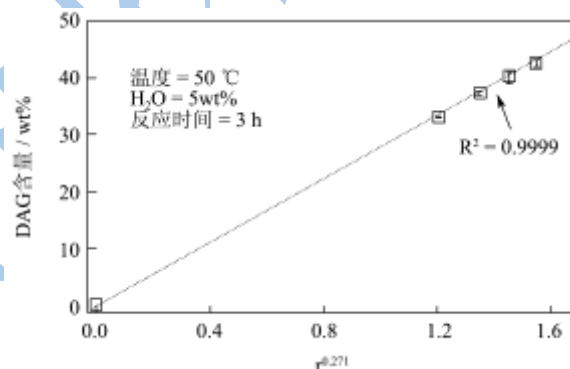


图4 DAG含量与 $r^{0.271}$ 的关系

Fig.4 The correlation between DAG content and  $r^{0.271}$

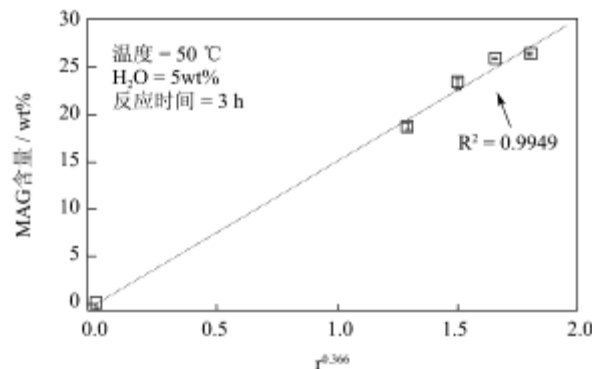


图5 MAG含量与 $r^{0.366}$ 的关系

Fig.5 The correlation between MAG content and  $r^{0.366}$

可以得知,DAG最大含量与 $r$ 的0.271次方程正比,其线性系数 $R^2=0.9999$ ,MAG的最大含量与 $r$ 的0.366次方成正比,其线性系数 $R^2=0.9949$ ,因此,

DAG 和 MAG 的最大含量与  $r$  的关系可表示为:

$$Er_{DAG} = k_1 r^{0.271} \quad (1)$$

$$Er_{MAG} = k_2 r^{0.366} \quad (2)$$

注: (1) 和 (2) 中,  $Er$ -MAG 和 DAG 的最大含量, %;  $r$ -底物摩尔比 (-OH:-COOH);  $k_1$ 、 $k_2$ -方程系数。

### 2.2.3 水添加量对 MAG 和 DAG 最大含量的影响

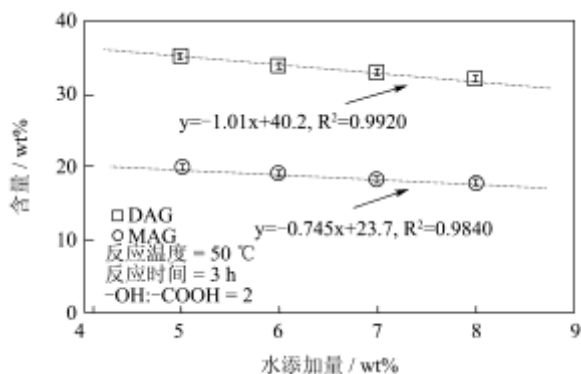


图 6 水添加量与 MAG、DAG 最大含量的关系

Fig.6 Relationship between water content and MAG and DAG contents

图 6 是水添加量与 DAG、MAG 最大含量的关系示意图。由图中可知, DAG 和 MAG 最大含量随着水添加量的增大而逐渐减小的趋势, 且呈现很好地线性关系。由此, 两种酯的最大含量与水添加量的关系式可表示为:

$$Er_{DAG} = k_3(-1.010D_w + 40.2) \quad (3)$$

$$Er_{MAG} = k_4(-0.745D_w + 23.7) \quad (4)$$

注: 式 (3) 和 (4) 中,  $Er$ -MAG 和 DAG 的最大含量, %;  $D_w$ -水添加量, wt%;  $k_3$ 、 $k_4$ -方程系数。

### 2.3 MAG 和 DAG 最大含量数学经验预测模型的建立与验证

根据等式 (1) ~ (4) 确立的底物摩尔比、水添加量与 MAG、DAG 最大含量之间的数学关系, 即 DAG、MAG 与底物摩尔比的衍生指数、水添加量的线性方程均呈现直接线性关系, 根据式子 (1) ~ (4) 和数学变换法则, 由此可得到基于两种反应参数下的甘油与油酸在 T1 脂肪酶粗酶催化作用下目标产物最大含量 (DAG 和 MAG) 与反应条件的总预测方程可表示为:

$$Er_{DAG} = K_{DAG} r^{0.271} (-1.010D_w + 40.2) \quad (5)$$

$$Er_{MAG} = K_{MAG} r^{0.366} (-0.745D_w + 23.7) \quad (6)$$

注:  $Er$ -含量, %;  $D_w$ -水添加量, wt%;  $r$ -底物摩尔比 (-OH:-COOH);  $K_{DAG}$ 、 $K_{MAG}$ -方程系数。

在改变上述反应参数(即底物摩尔比和水添加量)的情况下, 通过实验测得不同条件下的 DAG 和 MAG 最大含量, 代入式 (5) 和 (6) 进行数值拟合, 求得模型中的方程系数  $K_{DAG} = 0.5967$ ,  $K_{MAG} = 0.7422$ 。同时, 对 DAG 和 MAG 含量的实验值和预测值分别作图, 如由图 7 和图 8 所示, 两者相近程度的曲线拟合相关系数 ( $R^2$ ) 可达到 0.99 以上, 由此可知, 该模型可对本实验条件范围内甘油与油酸在 T1 脂肪酶粗酶催化反应过程中 MAG 和 DAM 的最大含量变化进行很好的预测。

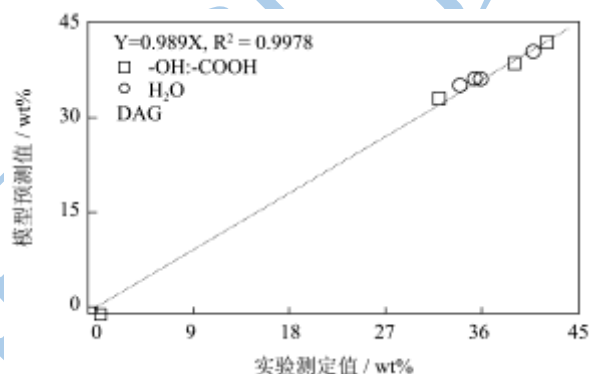


图 7 DAG 含量实验测定值与模型预测值之间的比较

Fig.7 Comparative result of DAG content obtained from experimental determination and model prediction

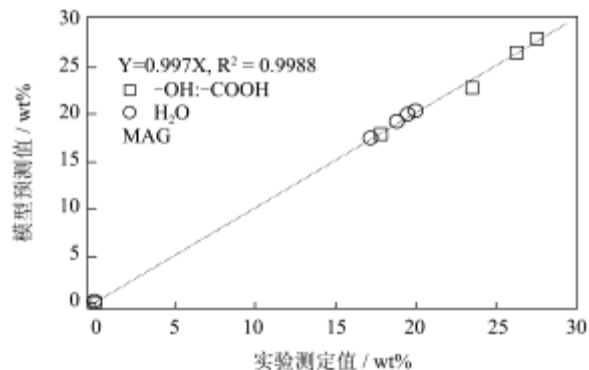


图 8 MAG 含量实验测定值与模型预测值之间的比较

Fig.8 Comparative result of MAG content obtained from experimental determination and model prediction

## 3 结论

本文研究确定了甘油与油酸在适宜的反应时间(3 h)后, 系统地考察 T1 脂肪酶催化反应过程中的反应温度、底物摩尔比 ( $r$ , -OH:-COOH) 和水添加量 ( $D_w$ ) 对目标产物 (MAG 和 DAG) 最大含量的影响, 通过 T1 脂肪酶催化反应实验数据分析可知, 反应温度对本

反应过程的目标产物影响可以忽略不计。同时,建立了 $r$ ,  $D_w$ 与目标产物最大含量的变化规律经验模型。通过对比目标产物最大含量的实验测定值和模型预测值后发现,两者的相关系数( $R^2$ )均可达0.99以上,说明该模型可很好地预测T1脂肪酶催化油酸和甘油合成甘油酯过程中的MAG和DAG的最大含量变化。

### 参考文献

- [1] NAGAO T, WATANABE H, GOTO N, et al. Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial [J]. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130(4): 792-797
- [2] LO S K, TAN C P, LONG K, et al. Diacylglycerol oil-properties, processes and products: a review [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2008, 1(3): 223-233
- [3] KRISTENSEN J B, XU X, MU H. Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(18): 7059-7066
- [4] Endalkachew S D. Fractionation of glycerides using supercritical carbon dioxide [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 1997, 36(11): 4906-4913
- [5] FERREIRA-DIAS S, CORREIA A, DA FONSECA M. Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 21(1): 71-80
- [6] XU X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2000, 102(4): 287-303
- [7] BORNSCHEUER U T. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17(7): 578-586
- [8] PLOU F J, BARANDIAR N M, CALVO M V, et al. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18(1): 66-71
- [9] KAEWTHONG W, SIRISANSANEEYAKUL S, PRASERTSAN P. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1525-1530
- [10] VALERIO A, KRUGER R L, NINOW J, et al. Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in surfactant system [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(18): 8350-8356
- [11] MOQUIN P H, TEMELLI F, KING J W, et al. Kinetic modeling of the glycerolysis reaction for soybean oils in supercritical carbon dioxide media [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2005, 82(8): 613-617
- [12] 钟金锋, 覃小丽, 王永华. 脂肪酶催化合成乳酸正丁酯过程中酯化率的预测模型[J]. 现代食品科技, 2013, 录用
- [12] ZHONG J F, QIN X L, WANG Y H. An empirical model for predicting conversion during the synthesis of *n*-butyl lactate by lipase-catalyzed esterification [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, accepted manuscript
- [13] LEOW T C, RAHMAN R N Z R A, BASRI M, et al. A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1 [J]. *Extremophiles*, 2007, 11(3): 527-535
- [14] ABD R R N, LEOW T C, SALLEH A B, et al. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia [J]. *BMC Microbiol.*, 2007, 7(1): 77-87
- [15] WANG Y, WEI D Q, WANG J F. Molecular dynamics studies on T1 lipase: insight into a double-flap mechanism [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2010, 50(5): 875-878
- [16] HASANUZZAMAN M, UMADHAY-BRIONES K M, ZSIROS S M, et al. Isolation, identification, and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1 [J]. *Current Microbiology*, 2004, 49(2): 108-114
- [17] XU Y, GUO S, WANG W, et al. Enzymatic hydrolysis of palm stearin to produce diacylglycerol with a highly thermostable lipase [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2013, 115(5): 564-570