

脂肪酶催化大豆色拉油甘油解制备二甘酯

张 骏 王 芳 邓 利 聂开立

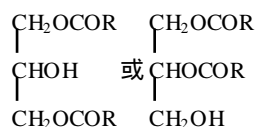
(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 研究了脂肪酶催化大豆色拉油甘油解制备二甘酯过程。对多种商业化和自制固定化酶进行了筛选, 并对影响甘油解过程的几个重要参数进行了研究, 如底物油与甘油摩尔比、酶剂量、初始水质量分数、温度、搅拌方式和溶剂效应。采用递进法进行实验, 优化参数的最佳条件为: 油与甘油摩尔比 1:1, Novozym435 脂肪酶 (油质量 10%), 初始水质量分数 0%, 反应温度 50℃。在无溶剂体系中, 反应 16 h, 二甘酯质量分数达到 56.3%; 当采用叔丁醇作为溶剂, 反应 24 h, 二甘酯质量分数达到 70.4%。

关键词: 二甘酯; 甘油解; 脂肪酶催化

中图分类号: TQ645.56

双甘酯或二甘酯 (diglyceride), 其分子结构式如下:



其中, COR, COR 为饱和或不饱和脂肪酰基。

二甘酯是油脂代谢的中间产物, 它与单甘酯一样, 对人体无害, 二甘酯是一种亲油性能较强的乳化剂, 主要应用在食品、医药、日用、化妆品工业^[1-3]。

二甘酯的生产工艺, 化学催化法已趋成熟。工业主要采用油脂甘油解, 一般采用碱性催化剂, 在 200~250℃ 及惰性气体的保护下进行, 生产单甘酯, 反应中副产物质量分数约 40% 的二甘酯, 这是目前双甘酯的主要来源。高温会导致二甘酯中不饱和脂肪酸发生降解或聚合, 且产品的色泽深, 有异味^[1,4]。近年来, 人们开始探索以脂肪酶为催化剂来制备二甘酯, 而日本的角田昭等^[1]研究了利用碱性脂肪酶在脱水条件下进行甘油脂肪酸酯化法, 甘油与油酸的摩尔比 1:1.7, 反应温度 40℃, 反应时间 48 h, 得到二甘酯的质量分数为 60%。我国仅限于化学法生产。由于酶法可以避免高温操作, 且产品质量较好, 目前为止, 国内还没有用酶法生产二甘酯的报道。鉴于此, 本文用酶法进行了二甘酯的生产

工艺的研究。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

主要试剂 Novozym435 (Novo435), (*Candida Antarctica* 脂肪酶), Lipozyme TL IM (TL IM), (*Thermomyces lanuginosis* 脂肪酶), Lipozyme RM IM (RM IM), (*Rhizomucor miehei* 脂肪酶), 以上 3 种酶由丹麦的 Novo 公司生产。LA201 (LA), (*Thermomyces lanuginosis* 脂肪酶, 固定化载体不同于 TL IM 酶); 假丝酵母 (*Candida* sp99-125) 脂肪酶 (本实验室自制), 棕榈油, 甘油, 正己烷, 石油醚, 叔丁醇等试剂均为分析纯由北京试剂公司生产。

主要仪器 SHJ-A 水浴恒温磁力搅拌器 (金坛市华峰仪器有限公司); 岛津 GC-14A 气相色谱; 电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司); HZQ-X100 振荡培养箱 (中国哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); G103 色谱用空气发生器, G103 高纯氢发生器 (北京三雄科技公司)。

1.2 实验方法

甘油解催化反应。在 100 mL 具塞锥形瓶将 4 g 色拉油和甘油质量比 1.5:1, 2:1, 1:1, 2:1, 初始水质量分数为 0%, 5%, 10%, 在设定温度 40~60℃ 下, 先把底物预置在振荡器中, 搅拌 15 min, 然后加入酶与油质量比 10% 的脂肪酶, 开始计时反应, 反应定时取样, 取 1 μL 反应液到 10 mL 具塞试管, 然后加入 5 mL 的正己烷稀释作为待测样品, 用气相色谱进行分析。

收稿日期: 2004-01-08

基金项目: 国家 863 资助项目 (2002AA514030); 北京市生物加工过程重点实验室开放基金 (2003-05)

第一作者: 男, 1977 年生, 硕士生

E-mail: zhtaon@sina.com

气相色谱分析方法。15 m × 0.25 mm 毛细管 (Agilent, DB-1ht, Temperature limits: - 60 ~ 400 °C), 分流比为 1/40, 进样口温度为 370 °C, 检测器温度为 375 °C, 柱箱初始温度为 100 °C, 三阶升温过程: 第一阶以 10 °C/min 升温, 升温 7 min; 第二阶以 20 °C/min 升温, 升温 5.5 min; 第三阶以 10 °C/min 升温, 升温 7 min。取上述待测分析样品 0.0055 mL 进样, 待测组分的定量采用峰面积归一法进行计算。

$$w = m(\text{DAG}) / (m(\text{FFA}) + m(\text{MAG}) + m(\text{DAG}) + m(\text{TAG}))$$

式中, w 代表双甘酯的质量分数, $m(\text{FFA})$, $m(\text{MAG})$, $m(\text{DAG})$, $m(\text{TAG})$ 分别代表脂肪酸 (FFA)、单甘酯 (MAG)、二甘酯 (DAG)、三甘酯 (TAG) 的质量。

2 实验结果及分析

2.1 固定化酶的选择

为寻找高效廉价的脂肪酶, 本文分别采用 Novo435, RM IM, TL IM, LA 以及本实验室自己固定的假丝酵母脂肪酶催化反应, 根据文献[2, 5, 7-9]建立初始反应条件: 底物油/甘油摩尔比 1:5, 初始水质量分数 5%, 反应温度 40 °C, 采用摇床震荡搅拌, 摇床转速为 170 r/min, 酶与油质量比 10%, 不同固定化酶对甘油解反应的催化效果如图 1。结果表明, 使用 Novo435 催化本反应, 二甘酯的质量分数可以达到 43.8%, 催化效果明显优于其他固定化

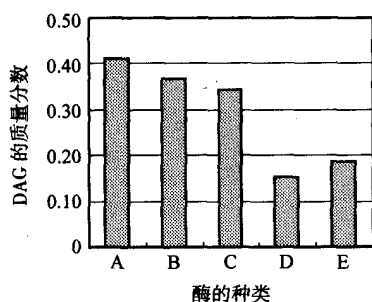


图 1 不同固定化酶对甘油解反应的催化效果

Fig. 1 Effect of various enzymes on glycerolysis

酶, 因此本文选择 Novo435 进行下一步的研究。A- Novozym435, B- Lipozyme RM IM, C- Lipozyme TL IM, D-LA201, E- 假丝酵母。

反应条件: 底物摩尔比 1:5, 初始水质量分数 5%, 40 °C, 170 r/min 摇床, 酶与油质量比 10%, 时间 $t = 48$ h。

2.2 底物摩尔比对反应的影响

根据化学计量式可知, 反应合成二甘酯的理论油和甘油摩尔比为 2:1, 但在实际反应中由于多种因素的影响, 导致两种反应物配比的最佳值与理论值有一定的偏差, 且底物油和甘油摩尔比的大小直接影响反应速度及反应平衡, 本文对反应的最佳底物油和甘油摩尔比进行了研究, 结果如图 2 所示。

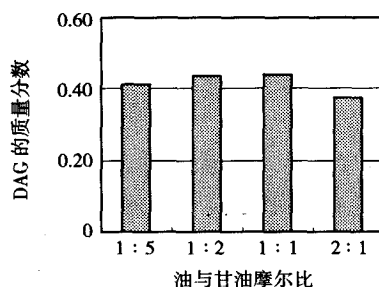


图 2 摩尔比对二甘酯质量分数的影响

Fig. 2 Effect of different molar ratios of glycerol oil on DAG

反应条件: 初始水质量分数 5%, 40 °C, 摇床转速 170 r/min, Novo435 质量分数为 10%, $t = 48$ h

从图 2 中可以看出, DAG 的转化率随着底物油和甘油摩尔比的减少而增加, 当达到 1:2 时开始下降。DAG 的质量分数随甘油加入量的增大而升高, 这是由于底物浓度的增加促使反应平衡向正反应方向移动的结果, 当甘油加入量继续增加, 由于甘油的黏度大, 可能导致固定化酶表面孔道的堵塞, 影响底物与酶的接触进而影响了酶的催化效果。同时, 甘油的强极性可能剥夺酶分子微环境中的微量水而改变了酶的构象, 影响了酶的活性。多方面的负面影响而导致在甘油含量过高时 DAG 的质量分数降低。鉴于此, 本文选择油与甘油摩尔比 1:1。

2.3 初始水质量分数对反应的影响

根据脂肪酶的催化机理可知: 脂肪酶是作用在油水界面上的催化反应, 水是维持酶催化活性的必备条件。然而当系统中水质量分数超过一定限度, 由于脂肪酶同时可以催化水解反应, 导致水解反应的几率大大增加, 使反应产物中脂肪酸质量分数增加。因此, 反应初始水质量分数是一个重要的影响因素。根据文献[2, 4]的报道, 甘油解合成 DAG 体系中采用 5% 的初始水质量分数, 为此本文考察了三种初始水质量分数 (0%, 5%, 10%) 对实验结果的影响, 实验结果如图 3 所示。

反应条件: 底物油和甘油摩尔比 1:1, 40 °C, 170 r/min 摇床, Novo435 质量分数为 10%, $t = 48$ h。

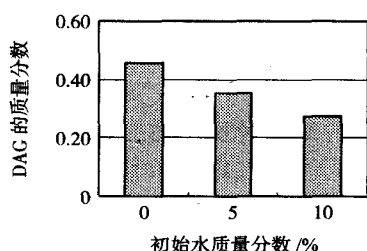


图3 初始水质量分数对二甘酯质量分数的影响

Fig. 3 Effect of initial water content on glycerolysis

从图3可以看出,随着初始水质量分数的增加,DAG质量分数降低。当初含水质量分数0%时,DAG的生成量最大,质量分数为45.5%。说明酶促甘油解体系中固定化酶中的微量水已经满足酶的催化作用,过多的水将不利于二甘酯的合成。因此,反应初始水质量分数为0%,这个结果与二甘酯合成中需要外加一部分水分的文献报道不相符,这可能是由于Novo435这种酶本身的特性所致,该固定化酶本身水质量分数较大,而过多的水份会影响酶的活性。这样本文采用初始水质量分数为0%进行下面的实验。

2.4 温度对酶促反应的影响

反应温度影响到底物分子之间的相互碰撞的频率,进而影响反应的速度,所以相对高的温度利于反应的快速进行。但是由于酶是具有生物活性的大分子,当温度过高时会破坏酶的空间结构,从而导致酶的活性丧失。酶反应的最适宜温度是这两个方面平衡考虑的结果。本文分别在40,50,60进行实验,结果如图4。最终选择50作为反应的最适温度。

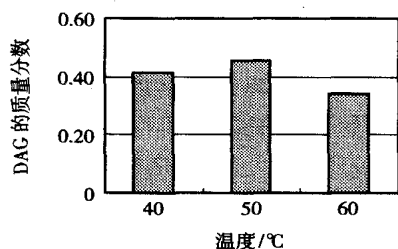


图4 温度对二甘酯的质量分数的影响

Fig. 4 Effect of reaction temperature on DAG

底物摩尔比1:1,初始水质量分数0%,170 r/min 摇床,Novo435 质量分数为10%, $t = 48$ h。

2.5 搅拌方式对反应的影响

由于反应为两相反应,如何使反应底物更好的接触成为制约反应进行的关键因素。本文对比了摇床和磁力搅拌两种搅拌方式的反应效果。实验结果

如图5。

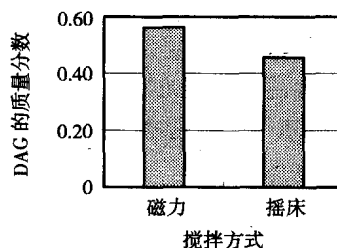


图5 不同搅拌对二甘酯质量分数的影响

Fig. 5 Effect of stirring mode on DAG

反应条件:底物摩尔比1:1,初始水质量分数0%,50,Novo435 质量为10%, $t_A = 16$ h $t_B = 48$ h。

从图5中可以看出,摇床进行搅拌时,反应时间较长,DAG质量分数不高,磁力搅拌要明显优于摇床搅拌,转化率提高了10.8%,时间缩短了32 h。磁力搅拌时,底物间混合比较均匀,相互进行了有效的接触,提高了反应速度,也提高了转化率。

2.6 溶剂对反应的影响

溶剂是酶促反应中的重要影响因素。适当的溶剂可以稳定酶的结构,促进底物的互溶,有利于反应过程中传质,提高反应的转化率。本文对比了无溶剂体系与有溶剂体系对反应的影响,以及不同溶剂对催化反应的影响。本文使底物在正己烷,石油醚(馏程60~90),叔丁醇,乙醚和无溶剂体系中进行酶促转酯化反应。溶剂影响如图6所示。

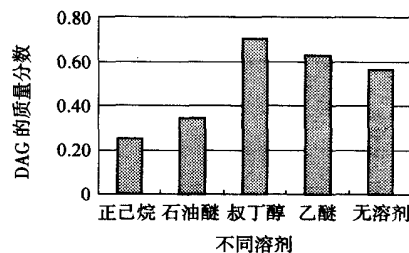


图6 不同溶剂对反应的影响

Fig. 6 Effect of different solvents on glycerolysis

反应条件:底物油和甘油摩尔比1:1,初始水质量分数0%,50,磁力搅拌,Novo435 质量分数为10%, $t = 24$ h。

从图6的结果中发现,不同溶剂对酶的催化效果影响很大,对于本文的反应底物而言,叔丁醇效果最好,这是由叔丁醇本身的性质决定的,它是很好的促溶剂,把两种不互溶的底物有机的混溶在一起,促使产物DAG的质量分数提高。由图6可知,叔丁醇体系有利于本实验的进行。

2.7 反应时间对 DAG 合成的影响

DAG 随反应时间的变化曲线如图 7 所示。

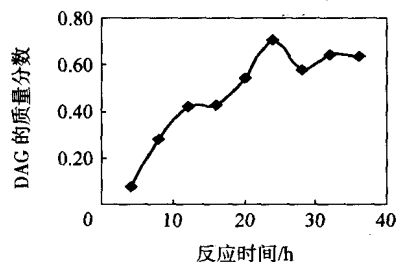


图 7 甘油解合成 DAG 反应历程

Fig. 7 Time course of production of DAG by enzymatic glycerolysis

反应条件:底物油与甘油摩尔比 1:1,初始水质量分数 0%,反应温度 50℃,磁力搅拌,Novo435 质量分数为 10%,溶剂为叔丁醇。

从图 7 可以看出,反应开始阶段,二甘酯随着时间的增加而不断的增加,反应 24 h 后,二甘酯质量分数达到 70.4%。随时间的延长,二甘酯质量分数开始下降,这是由于发生副反应,二甘酯进一步转化导致。28 h 后反应体系趋于平衡。因此,在上述条件下应该控制反应时间在 24 h 左右。

参 考 文 献

[1] 陈福明,孙登文. 双甘酯的生产及应用[J]. 中国油脂, 1997,20(5):49

[2] Ikehara Toshinori, Noshio Yasuharu. Preparation of diglyceride with shortened time by transesterification of monoglyceride and oil/fat composition comprising the diglyceride[P]. JPN, 2000345189A2. 2000-12-12

[3] Plou, Francisco J, Barandiaran, *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

[4] 吴可克,陈丽凤. 酶促玉米油甘油解制备双、单甘酯[J]. 中国油脂,2000,25(1):55

[5] Noshio Yasuharu, Ikehara Toshinori. Preparation of oil and fat crystal modifier comprising diglyceride having satd.fatty and trans-unsatd[J]. fatty derivative and its uses thereof[P]. JPN, 2000345185A2. 2000-12-12

[6] 黄显慈. 脂酶法制取单、双甘油酯的新技术[J]. 商业科技开发,1996(3):38-40

[7] Sugiura Masakatsu, Yamaguchi Hiroaki. Preparation of highpurity diglyceride[P]. USA, 20010004462 A1. 2001-06-21

[8] Fureby, Anna Millqvist, Tian Li. Preparation diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997,20(3):198-206

[9] Ferreira-Dias S, Correia A C. 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,2003,21:71-80

Preparation of diglyceride by lipase-catalyzed glycerolysis of soybean salad oil with glycerol

Zhang Tao Wang Fang Deng Li Nie Kai-li

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Preparation of diglyceride by lipase-catalyzed glycerolysis of soybean salad oil with glycerol in a batch stirred tank reactor was studied. The lipases preparation was chosen based on screening of the lipases from commercial sources as well as that produced in the laboratory. The effect of various parameters including the substrate molar ratio, water content, temperature, enzyme dosage and solvent on the glycerolysis catalyzed by Novozym 435 was studied and the 70% DAG was obtained under the conditions of 10% lipase dosage, 1:1 molar ratio of oil/glycerol, no initial water content at 50℃ after 24 h reaction time.

Key words: diglyceride; glycerolysis; lipase-catalyzed

(责任编辑 云志学)