

研究简报 ·

固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶催化合成甘油二酯

胡隼^{1,2} 王芳^{*1,2} 谭天伟^{1,2}

(北京化工大学 1. 生命科学与技术学院; 2. 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029)

摘要: 对无溶剂体系中自制固定化假丝酵母 99-125 脂肪酶催化油酸、甘油合成甘油二酯过程进行了研究, 比较了自制固定化酶与商业酶在催化该反应上的不同, 发现自然挥发脱水比真空脱水更适合自制固定化酶催化合成甘油二酯。对反应条件的研究表明: 底物摩尔比 2:1, 反应温度 50 °C, 酶量 0.6 g/5.65 g, 自然挥发脱水条件下油酸酯化率可达 92.64%, 甘油二酯含量可达 66.16%。

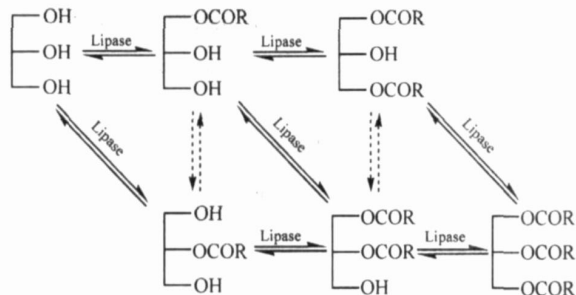
关键词: 甘油二酯; 脂肪酶; 酯化

中图分类号: TQ641

引言

甘油二酯(DG 或 DAG)简称二甘酯或双甘酯, 由甘油和两个脂肪酸酯化后得到, 是油脂的天然成分。根据酰基与甘油羟基结合的位置不同可将各种不同酰基构成的甘油二酯分为 1,2-DAG 和 1,3-DAG 两类。一直以来甘油二酯在食品添加剂、制药、化工等领域有广泛的应用^[1-2], 而近年来随着甘油二酯作为一种新的低脂健康食用油需求量明显增长。由于代谢途径的不同, 富含 1,3-DAG 的健康食用油不仅与同等量的甘油三酯(TAG)有相似的热值, 而且能防止体内脂肪的积累, 降低血脂浓度, 起到预防和治疗高血脂及与其相关的心脑血管疾病的作用^[3-6]。

合成甘油二酯的反应主要有酯化反应、甘油解反应、醇解反应和水解反应。从脂肪酸和甘油起始的酯化过程其反应式为



反应式中 COR 代表脂肪酸的酰基。

甘油二酯的生产传统上是采用化学甘油解法, 由于化学法中催化剂的专一性差, 使产物中甘油二酯的质量含量只有约 50%^[2,7], 而利用脂肪酶催化反应生产甘油二酯可实现更高的转化率^[2], 所以近年来酶法生产甘油二酯大有取代化学法的趋势。酶法反应过程中, 无溶剂反应体系较有溶剂体系具有更高的底物浓度, 有利于后续分离以及更好地满足食品安全的要求, 最终导致更低的生产成本。无溶剂酶促脂肪酸与甘油酯化合成甘油二酯的研究已进入工业化阶段^[8], 而工业化的一大困难在于: 广泛应用于生产甘油二酯的商业脂肪酶, 如 Novozym435^[9], Lipozyme RM IM^[10] 等价格较高, 使工业化很难实现。天然油脂产脂肪酸的主要成分之一是油酸, 因此以油酸作脂肪酸不失代表性。用商业脂肪酶催化酯化反应合成甘油二酯的转化率不同文献报道不一, 低的有 40%~45%^[11], 高的到 78%^[12]。

本文采用本实验室自主研发的固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶^[13] 酶布, 研究无溶剂体系中催化油酸与甘油酯化反应合成甘油二酯的反应过程, 在实现相对较高的转化率的同时降低了脂肪酶的经济成本。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

主要试剂 Novozyme435 (*Candida Antarctica* 脂肪酶)、Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus* 脂肪酶) 和 Lipozyme RM IM (*Rhizomucor*

收稿日期: 2006-04-28

第一作者: 男, 1977 年生, 硕士生

*通讯联系人

E-mail: wangfang@mail.buct.edu.cn

miehei 脂肪酶) 由丹麦诺维信公司提供。

固定化假丝酵母 (*Candida* sp. 99-125) 脂肪酶酶布, 由本实验室自制。油酸, 甘油, 5A 分子筛等试剂均为分析纯由北京试剂公司生产。

主要仪器 HZQ-X100 振荡培养箱 (哈尔滨东联电子公司), SHZ-3 循环水真空泵 (天津市自动化仪器十四厂), BL310 电子天平 (赛多利斯公司), GC-2010 气相色谱仪 (岛津公司), G103 空气发生器 (北京东西电子研究所), G101 氢气发生器 (北京东西电子研究所)。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化脂肪酶 以无纺布为载体, 吸附法制备。取 10 mL 含 10 mg 椰子油、10 mg 吐温 80 的己烷溶液与 3.3 mL 质量浓度 30 g/L 的 $MgSO_4$ 溶液, 搅拌制成乳浊液。与 10.00 g 无纺布混合, 干燥。加入 10.00 g 缓冲溶液, 干燥后称出 8.57 g。与 10 mL 酶液 (含 1.43 g 酶粉) 混合, 室温放置直至干燥。固定化酶的表现酶活力是理论酶活力的 80% 以上。

1.2.2 不同脱水方式对产物组成的影响 在 3 个 50 mL 锥形瓶中放入等量的反应底物油酸 0.02 mol、甘油 0.01 mol 和酶布 0.6 g。分子筛脱水采用向锥形瓶中加入 0.6 g 5A 分子筛脱水的方法并盖上瓶塞; 真空脱水采用循环水真空泵脱水, 泵真空表显示绝对压力为 5000 ~ 6000 Pa; 自然挥发脱水采用 50 mL 广口锥形瓶敞口反应。3 个锥形瓶均在 40 恒温, 180 r/min 下摇床振荡反应, 于 72 h 取样分析。

1.2.3 不同脂肪酶催化条件下的反应 在 5 个 50 mL 锥形瓶中放入等量的反应底物油酸 0.02 mol 和甘油 0.01 mol, 分别加入自产酶酶粉、Lipozym TL IM、Novozyme435、Lipozym RMIM 各 0.1 g 和自产酶酶布 0.6 g, 锥形瓶放入恒温 40 摇床敞口自然挥发脱水, 180 r/min 振荡反应, 于 72 h 取样分析。

1.2.4 酯化率和产物组成的测定 对产品进行初步分析可知其为: 单甘酯 (MAG)、DAG、TAG、游离脂肪酸 (FFA) 的混合物, 其中目标产物为 DAG, 副产物为 FFA、TAG、MAG 等。产物组成的质量分数用气相色谱进行面积归一法分析, 酯化率为产物中 MAG、DAG 和 TAG 质量分数之和。色谱柱: 30 m × 0.25 mm 毛细管柱 (Agilent, DB-1ht); 色谱条件: 起始柱温 100, 终止柱温 360, 汽化室温度 370, 检测器温度 375。

2 结果与讨论

2.1 不同脱水方式对产物组成的影响

在脂肪酶催化酯化过程中脂肪酶周围的微量水对于增加酶结构的“柔软性”, 使脂肪酶的“盖子”呈一种“开启”状态, 维持酶分子活性构象起到关键作用。宏观表现为: 反应体系中有适宜水的存在可显著提高转化率。但过多的水则会使脂肪酶由酯化酶活转变为水解酶活, 因此需要选择合适的措施脱除反应生成的水, 控制酯化反应过程中的水含量使反应既向酯化合成的方向进行, 又不破坏酶的活性。本文比较了 3 种脱水方法: 分子筛脱水、真空脱水和自然挥发脱水。实验结果如图 1 所示。

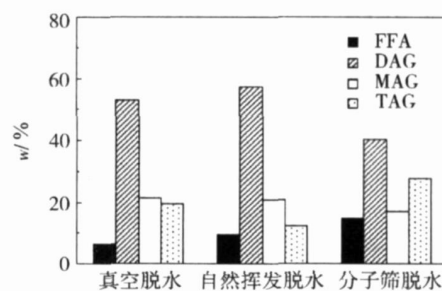


图 1 3 种脱水方法对反应体系中各组分质量分数的影响
Fig. 1 Comparison of the effect of three means of removing water on the percentage of the components in the reaction system

以分子筛为脱水剂, 酯化率可达到 85.03%, 是 3 种脱水方式中效果最差的, 当用丙酮洗脱吸水后的分子筛时发现含有未反应的甘油, 说明分子筛对于甘油有吸附作用。这种吸附性不仅降低了对水的吸附能力, 而且降低了反应体系中甘油的浓度, 进而影响了酯化率。真空脱水和自然挥发脱水酯化率分别为 93.74% 和 90.42%, 说明真空的脱水效果优于自然挥发, 但由于假丝酵母 99-125 脂肪酶没有较高的 1,3 位置专一性, 真空更高的脱水效果使得反应更容易继续生成 TAG, 导致反应产物中 DAG 的含量低于而 TAG 的含量高于自然挥发脱水, 此外, 考虑到反应产物中 DAG/TAG 比值高有利于提高下游分离产物中 DAG 的含量, 故以下反应中均采用自然挥发脱水。

2.2 不同脂肪酶的比较

脂肪酶是油水界面发生催化反应的酶。在该反应中根据脂肪酶催化甘油羟基位置的强弱可将脂肪酶分为 1,3 位置专一性、1,3 位置选择性和无 1,3

位置选择性 3 类。专一性脂肪酶催化甘油脂肪酸酯化反应时 2 位羟基的酯化反应较弱,这就使得 DAG 继续酯化反应生成 TAG 较难,从而可减少副产物 TAG 的含量,但另一方面也会造成反应不容易向酯化方向快速进行,导致酯化率降低。本文选择的 Lipozyme TL IM 及 Lipozyme RM IM 均为 1,3 位置专一性酶,Novozyme435 为 1,3 位置选择性酶,而假丝酵母 99-125 脂肪酶为无位置选择性酶。实验结果如图 2 所示。

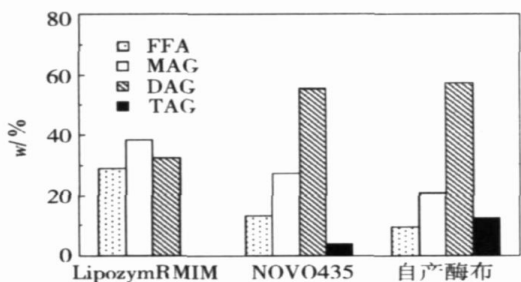


图 2 3 种脂肪酶对反应体系中各组分质量分数的影响
Fig.2 Comparison of the effect of three different lipases on the percentage of the components in the reaction system

反应产物中 TAG 的含量与脂肪酶 1,3 位置专一性的强弱呈负相关。实验表明:假丝酵母 99-125 脂肪酶酶粉和 Lipozyme TL IM 均不反应,这是因为 Lipozyme TL IM 的载体和假丝酵母 99-125 脂肪酶酶粉均具有亲水性,反应中甘油覆盖了酶颗粒的表面,使脂肪酸难以接触酶的活性中心,导致反应不能进行;尽管酶布也呈亲水性,但足够大的亲水区域使甘油不可能完全覆盖酶布上吸附的所有酶,所以酶布和 Novozyme435、Lipozyme RM IM 均能进行反应。Novozym435 和 Lipozyme RM IM 催化酯化反应合成 DAG 的转化率文献报道不一,低的有 40%~45%^[11],高的到 78%^[12],而本实验显示这两种酶的 DAG 转化率分别为 32.59% 和 55.40%,均低于固定化 *Candida* sp. 99-125 脂肪酶的 57.42%。

2.3 酶用量对反应酯化率的影响

当酶量较低时,反应体系中酶活位点较少,催化活性较低,降低了反应速率,使反应达到平衡的时间延长,而时间越长酶活越低,最终导致酯化率较低。当酶用量过多时,不仅酯化率的提高不明显,而且提高了反应成本,因此有必要找到最适酶量。本实验室制备的酶布采用橄榄油乳化液水解滴定法测定的表观酶活为 3000 U/g,酶用量从 0.2 g 到 0.6 g

酯化率随酶量的增大而增大,而当酶用量超过 0.6 g/ (5.65 g 油酸) 时,酯化率基本维持不变。故在反应体系中选择 0.6 g 酶为最适酶用量。为了预测其它酶量时的酯化率,根据图 3 酶量与酯化率的关系曲线,采用不同结构的数学方程拟合寻找到相关指数 R^2 最大达 0.9968 的如下方程

$$y = 89.75 - 92.699 / (1 + \exp((x - 0.19486) / 0.05687)) \quad (1)$$

其中, x 为每 5.65 g 油酸所加酶量, y 为酯化率。

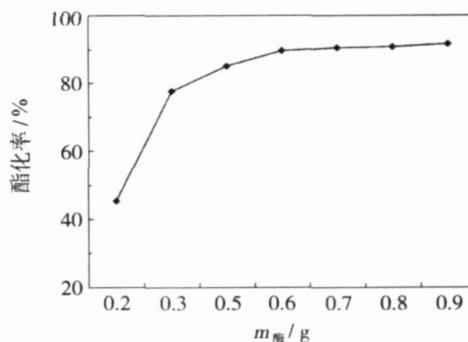


图 3 酶用量对反应酯化率的影响
Fig.3 Effect of varying the amount of lipase on conversion of oleic acid

2.4 底物摩尔比对酯化反应的影响

当油酸与甘油的摩尔比为 2 时,酯化率最高,可达到 89.67%。当两底物比大于 2 时,由于酶活性中心周围油酸浓度偏高,而局部甘油浓度较低,不利于相间传质,导致酯化率降低。当摩尔比降低,即增加甘油的比例,发现在大于 1/2 时酯化率变化不大,但降至 1/3 时,酯化率显著下降,这是由于甘油过多造成了反应体系黏度增大,传质受阻;同时过多的甘油会吸附在酶布上使酶失活,而且,反应体系中甘油

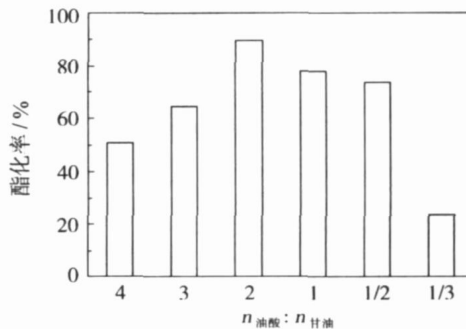


图 4 油酸和甘油不同摩尔比对反应酯化率的影响
Fig.4 Effect of varying the molar ratio of reactants on the conversion of oleic acid

成较大的液滴分散于甘油酯中,乳化液的界面积急剧减少,诸多因素导致酯化率降低。

2.5 温度对反应的影响

脂肪酶来源不同,最适温度也各不相同,多数脂肪酶催化反应的最佳温度范围介于 30~37℃,固定化增加了酶的构象稳定性,使最适温度会有所上升。温度的提高有利于酯化反应生成水的脱除,但过高的温度会使酶失活,所以实验需控制适宜的反应温度范围。不同温度对酯化反应产物组成的影响如图 5 所示。由于是自然挥发脱水,温度越高脱水效果越好,所以从 30~50℃ 酯化率和 DAG 含量呈上升趋势。当温度到 60℃ 时,由于酶的失活导致酯化率下降。

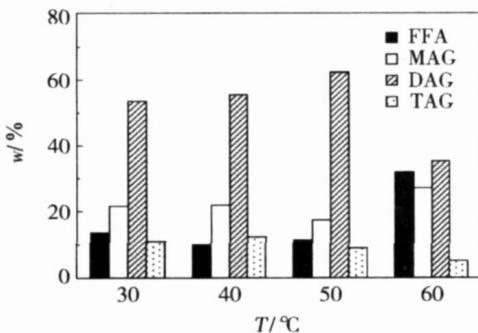


图 5 温度对反应体系中各组分质量分数的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the percentage of the components in the reaction system

2.6 反应时间对反应的影响

在上述各单因素分析得出的优化条件的基础上,考察反应时间对反应的影响。该反应产物组成随时间变化的趋势如图 6, MAG 和 TAG 在 24 h 达到最大值后开始减少,反应 72 h 后产物组成基本不变,因此反应时间可控制在 72 h 内。反应 144 h DAG 质量分数达到最大值 66.16%, 此时酯化率为 92.64%。

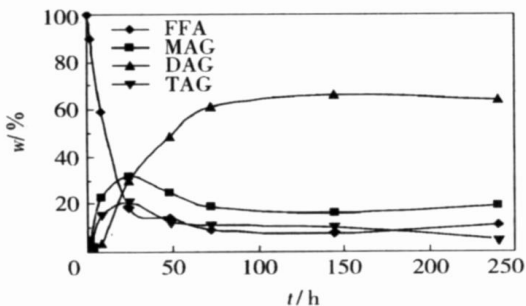


图 6 反应时间对反应的影响

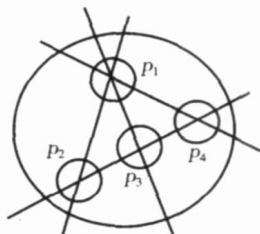
Fig. 6 Effect of varying reaction time

参考文献:

- [1] 孟祥河,毛忠贵. 甘油二酯的应用现状[J]. 中国食品添加剂, 2002(4): 58-61.
- [2] 陈福明,孙登文. 双甘酯的生产及应用[J]. 中国油脂, 1997, 22(5): 49-51.
- [3] NAITO S, WATANABE H, SHIMASAKI H, et al. Effect of dietary diacylglycerols on lipids metabolism in human: 1. The suppressive effect of dietary diacylglycerols on the increase of the serum triglycerides[C]. 16th International Congress of Nutrition, 1997: 341.
- [4] HIROYUKI T, TOMONORI N, HIROYUKI W, et al. Energy value and digestibility of dietary oil containing mainly 1,3-diacylglycerol are similar to those of triacylglycerol[J]. Lipids, 2001, 36(8): 379-382.
- [5] MENG Xianghe, ZOU Dongya, SHI Zhongping, et al. Dietary diacylglycerol prevents high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and abdominal adipose tissue [J]. Lipids, 2004, 39(1): 37-41.
- [6] 狄济乐. 一种新型的减肥食用油-二甘油酯及其生理功能[J]. 中国油脂, 2003, 28(6): 30-32.
- [7] LEWIS F, INMOK L, GEORGE P. Chemical process for the production of 1,3-diglyceride oils: USA, 20030104104109 A1[P], 2003-06-05.
- [8] WATANABE T, SUGIURA M, SATO M, et al. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 637-643.
- [9] JANNI B K, XU Xuebing, MU Huiling. Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis[J]. Journal of Agricultural And Food Chemistry, 2003, 51(12): 1201-1207.
- [10] TAKAKI W, MASAO S, MASA KATSU S, et al. Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1,3-regiospecific lipase Lipozyme RM IM [J]. Journal of the American Oil Chemist Society, 2003, 80(12): 1201-1207.
- [11] WEBER N, MUKHERJEE K D. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerols[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(17): 5347-5353.
- [12] 孟祥河,潘秋月,邹冬芽,等. 无溶剂体系下酶催化亚油酸、甘油生产 1,3-甘油二酯工艺的研究[J]. 中国油脂, 2004, 29(2): 47-50.
- [13] TAN Tianwei, ZHANG Mu, WANG Bingwu, et al. Screening of high lipase producing candida sp. and production lipase by fermentation [J]. Process Biochemistry, 2003, 39(4): 459-465.

$$C_{m+1}^0 t^n - C_{m+1}^0 t^{n-1} + \dots + (-1)^{n-1} C_{m+1}^n + (-1)^n C_m^n, |C(A)| = 2|C(A)| - b(A) = 1 + C_{m+1}^1 + C_{m+1}^2 + \dots + C_{m+1}^n + 2C_m^n - C_{m-1}^n.$$

例 3 如右图所示为一 R^2 中的复杂的混杂构形 B , $L_0(A) = \{p_1, p_2, p_3, p_4\}$, 计算其房的个数 $|C(B)|$ 。



由定理 6 可得:

$$|C(B_1)| = 6, |C(B_2)| = 4, |C(B_3)| = 4, |C(B_4)| = 4, \text{ 所以有 } |C(B)| =$$

$$18 + 6 + 4 + 4 + 4 = 36。$$

参考文献:

[1] HU Yi. On the homology of complements of subspaces and spheres[J]. Proceedings of the American Mathematical Society, 1994, 122: 285 - 290.
 [2] ORLIK P, TERAO H. Arrangements of Hyperplanes [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
 [3] STANLEY R P. An introduction to hyperplane arrangements [M]. Washington: IAS/ Park City Mathematics Series, 2004.

The characteristic polynomials of a class of mixed arrangements

DONG Yun JIANG GuangFeng

(School of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The lattice properties of a mixed arrangement A consisting of hyperplanes and spheres in R^l have been postulated and proved. The Möbius function of the mixed arrangement μ_A was subsequently derived. A class of mixed arrangements with more than one sphere was studied and, finally, the characteristic polynomials and the formulae for the number of chambers were obtained.

Key words: mixed arrangement; Möbius function; characteristic polynomial

(上接第 199 页)

Synthesis of diglycerides by enzymatic esterification using immobilized lipase from *Candida sp.* 99-125 in a solvent-free system

HU Sun^{1,2} WANG Fang^{1,2} TAN TianWei^{1,2}

(1. Beijing Key Laboratory of Bioprocess; 2. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Enzymatic synthesis of diolein using oleic acid and glycerol as substrates for immobilized lipase from *Candida sp.* 99-125 has been studied in a solvent-free system. The immobilized lipase from *Candida sp.* 99-125 and different commercial lipases were compared under same reaction conditions. Of three ways of removing water produced in the reaction, spontaneous evaporation was found to be most effective. After optimization of reaction conditions, the conversion of oleic acid can reach a maximum of 92.64% and the amount of diacylglycerol (DAG) in the product can reach 66.16% when using a substrate ratio (oleic acid to glycerol) of 2:1, reaction temperature of 50 °C, and enzyme dosage of 0.60 g/5.65 g oleic acid.

Key words: diglycerides; lipase-catalyzed; esterification