

超临界体系酶催化制备甘油二酯及其纯化

陈晓慧, 王 雪, 刘 晶, 周晓丹, 于殿宇*

(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 以二氧化碳为流体, 在超临界体系中用脂肪酶催化大豆油脂与甘油反应制备甘油二酯及其纯化研究。选取 Lipozyme RMTM、Novozyme 435、Lipozyme TLTM 三种固定化脂肪酶为试验酶进行酯化反应, 通过单因素试验, 分别确定 3 种酶的最佳工艺条件, 3 种酶的最佳添加量分别为 2.5%、3%、8%; 反应温度分别为 65、70、65℃, 反应时间分别为 7、8、9h, 底物比均为 2:1, 得甘油二酯含量分别为 68.6%、67.7%、64.8%。采用二级分子蒸馏工艺对超临界体系生产的甘油二酯混合物进行纯化, 甘油二酯产品纯度从 68.6% 提高到 90.4%, 产品得率为 60.0%。综合考虑, 在工业生产中, 建议用脂肪酶 Lipozyme RMTM。

关键词: CO₂ 超临界; 脂肪酶; 甘油解; 甘油二酯; 分子蒸馏

Lipase-Catalyzed Synthesis in Supercritical System and Purification of Diacylglycerol

CHEN Xiao-hui, WANG Xue, LIU Jing, ZHOU Xiao-dan, YU Dian-yu*

(School of Food Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Diacylglycerol (DG) was prepared through lipase-catalyzed reaction between soybean oil and glycerol in the supercritical system with carbon dioxide as the fluid. Three kinds of immobilized lipases such as Lipozyme RMTM, Novozyme 435 and Lipozyme TLTM were screened. The optimal esterification conditions for three kinds of immobilized lipases were achieved through single-factor tests. The results showed that the optimal preparation process parameters for three kinds of lipases were the addition amounts of 2.5%, 3% and 8% for Lipozyme RMTM, Novozyme 435 and Lipozyme TLTM, reaction temperatures of 65, 70 °C and 65 °C for three lipases, reaction time of 7, 8 h and 9 h for three lipases, and substrate ratio of 2:1. The yields of DG for three lipases were 68.6%, 67.7% and 64.8%, respectively, under their optimal reaction conditions. A two-step distillation technology was used to purify DG in the supercritical system. After the purification, the yield of DG was up to 60% and the purity of DG was improved to 90.4% from 68.6%. According to the comprehensive consideration, Lipozyme RMTM is recommended as lipase for the preparation of DG in industrial production.

Key words: CO₂ supercritical system; lipase; glycerolysis; diacylglycerol; distillation

中图分类号: TS229

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)02-0043-05

甘油二酯(diglyceride, DAG 或 DG)是油脂的天然成分, 也是最大的单一类型食品级乳化剂, 目前已被广泛应用于食品、药品、化妆品中^[1-2]。根据酰基与甘油羟基结合的位置不同可将其分为 1,2-DAG 和 1,3-DAG 两类。根据生产过程中使用催化剂不同, 甘油二酯制取方法可分为化学法和生物酶法; 根据体系中油脂反应机理不同, 可分为甘油解法、水解法、水解-酯化联用法^[3]。从现有信息来看, 甘油解法似乎是生产甘油二酯最经济的方法, 也是目前工业上主要采用的方法^[4-6]。

溶剂使用在一定程度上提高了反应速率, 但不能从根本上改变酶法转化率和目标产物产量低的现象; 同时

从工业生产角度看, 安全性降低, 成本加大。采用超临界体系具有黏度低、溶解性高等优势^[7]。超临界状态下流体二氧化碳具有类似于液体的密度和气体的扩散性与黏度, 可大大降低反应过程的传质阻力, 提高反应速率^[8-9], 同时起到溶剂和催化剂的作用, 可避免其他方法出现催化剂失活现象。另外, 重要的是在该反应环境下可阻止甘油解逆反应^[10]。

酶是一种生物催化剂, 其优势在于高效、无毒以及温和的反应条件^[11-12]。酶法制备甘油二酯, 关键就是对酶的选择, 该酶需要具有高甘油解和低水解活性。固定化脂肪酶 Lipozyme RMTM、Novozyme 435、Lipozyme

收稿日期: 2011-05-18

基金项目: 国家“863”计划项目(2010AA101503); “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD02B01)

作者简介: 陈晓慧(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: chenxiaohui1021@yahoo.com.cn

* 通信作者: 于殿宇(1964—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为大豆精深加工技术。E-mail: dyu2000@yahoo.com.cn

TLTM 是现在生产甘油二酯研究中较常用的脂肪酶,但在超临界体系中的性质及转化率尚未发现相应的报道。本实验以大豆油为底物,考察3种脂肪酶在超临界体系中的生产甘油二酯的性能。可为工业化生产甘油二酯提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆一级油 黑龙江龙江福粮油有限公司;甘油(AR级)、4A型分子筛 中国医药(集团)上海化学试剂公司;Lipozyme RMTM、Novozyme 435、Lipozyme TLTM 德国 Novo 公司;乙醚、石油醚、甲酸、氯仿、碘、正己烷、异丙醇等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

硅胶板、层析缸 上海信仪仪器厂;恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;CJF0.5L 高压反应釜(青岛科技大学于世涛教授提供) 大连通达反应釜厂;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 巩义市英峪高科仪器厂;LD4-2A 低速离心机 北京医用离心机厂;E2695 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司;刮膜式分子蒸馏设备 德国 VTA 公司。

1.3 酶催化甘油解反应

将大豆一级油和经分子筛脱水后的甘油以一定的物质的量的比加入到 150mL 不锈钢高压釜中,添加一定量的脂肪酶后快速搅拌,加入 1% 的水,密封高压釜,通入 CO₂ 进行试漏,再用 CO₂ 置换不锈钢高压釜中的空气。置换完成后,在室温条件下,充入 CO₂ 使压力达 7.5MPa,将反应釜置于集热式恒温加热磁力搅拌器中加热,调节一定的转速,恒温反应一段时间。反应结束后,将不锈钢高压釜冷却至室温,放出气体,打开高压釜,取出流体物,用离心机离心分离除去催化剂,得反应产物,取反应产物进行液相测定,得出甘油二酯占反应产物的含量。反应装置系统示意图见图 1。

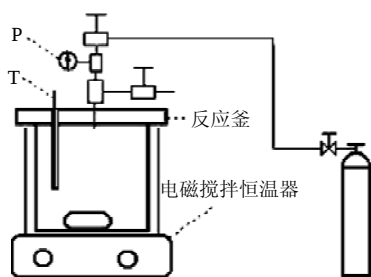


图1 反应装置系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of reaction device system

1.4 甘油二酯含量计算

取薄层显色效果好的反应产物一滴,准确称量,用 1mL 正己烷:异丙醇 50:1(V/V)溶解,进样分析。色谱条件:检测器:Waters 2410 示差折光检测器;主机泵:Waters 515 HPLC Pump;色谱柱:No-va-Pak(3.9mm × 150mm, 5 μm)液相色谱柱。流动相:正己烷:异丙醇 50:1(V/V);流速 1.0mL/min;柱箱温度 35℃;检测器温度 35℃;进样量 20 μL。

各种组分的计算采用面积归一法。

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

式中: w 为甘油二酯的质量分数; $m(\text{FFA})$ 、 $m(\text{MAG})$ 、 $m(\text{DAG})$ 和 $m(\text{TAG})$ 分别为脂肪酸、甘油一酯、甘油二酯(1,3-甘油二酯, 1,2-甘油二酯)和甘油三酯的质量。

混合甘油酯标准样品液相图见图 2,可知各物质出峰时间对应物质分别为: 1.915min 溶剂峰; 2.173min 甘油三酯; 2.373min 脂肪酸; 2.915min 1,3-甘油二酯; 3.948min 1,2-甘油二酯; 6.432min 甘油一酯。

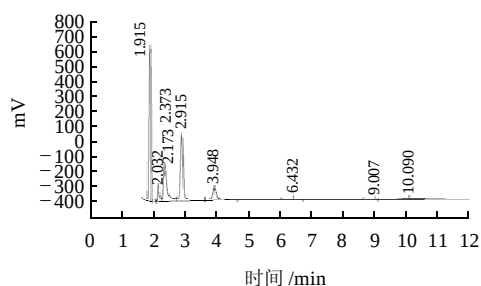


图2 混合甘油酯标准样品液相图

Fig.2 Liquid chromatograph of standard sample of mixed glyceride

1.5 分子蒸馏纯化甘油二酯

采用二级分子蒸馏工艺对产物中甘油二酯进行蒸馏提纯。选择操作压力为 1.0Pa,分子蒸馏提纯工艺参数:进料温度 80℃,进料速率 90mL/h,刮膜器转速 150r/min,一级蒸馏温度 130℃,二级蒸馏温度 210℃。

2 结果与分析

2.1 加酶量对脂肪酶催化甘油解反应的影响

选择反应条件:反应时间 9h,反应温度 70℃,底物比 2:1,考察 3 种常用脂肪酶的添加量对 CO₂ 超临界体系催化甘油解反应的影响。

加酶量的变化和反应速度密切相关,酶量增加,甘油解的速度加快。但是酶促甘油解过程是一个动力学平衡过程,加酶量的多少只对反应的速度有影响,即对反应达到平衡的时间有影响,而和反应达到平衡的状

态没有关系。可通过加大酶用量来缩短反应时间,但过多脂肪酶会使体系形成少量糊状物,导致分离困难;此外,在实际生产中,会导致生产成本增加。

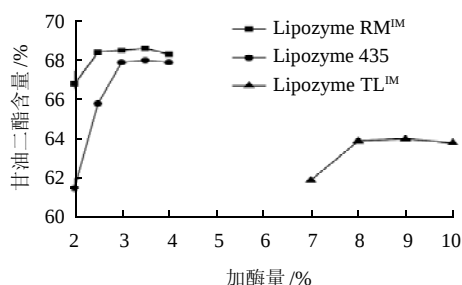


图3 加酶量对脂肪酶催化甘油解反应的影响

Fig.3 Effect of lipase addition amount on glycerolysis

由图3可见,脂肪酶Lipozyme RM™、Novozyme 435、Lipozyme TL™催化大豆油甘油解反应的最适加酶量分别为2.5%、3%、8%(质量分数),在此之后随着加酶量的增加,DG含量变化较小,因此,此时加酶量为最适用量。

2.2 温度对脂肪酶催化甘油解反应的影响

选择反应条件:反应时间9h,脂肪酶Lipozyme RM™、Novozyme 435、Lipozyme TL™添加量分别为2.5%、3%、8%,底物比2:1,考察温度对CO₂超临界体系催化甘油解反应的影响。

酶促甘油解反应是一个热力学过程,反应温度的高低不仅影响底物的溶解状态和黏度,还影响底物在反应体系中的传质过程、酶的活性和操作稳定性。较高的反应温度可以降低体系中油脂的黏度,加快底物分子热运动的速度,提高底物分子由反应体系向固定化酶表面运动的传质系数。研究表明,适当提高反应温度,可以增加酶活的稳定性,有助于甘油解的提高。但过高的反应温度,对酶的空间结构和构象有较大的影响,使酶活降低并减少酶的使用寿命,促使酶反应速度不是增大反而减小^[14]。

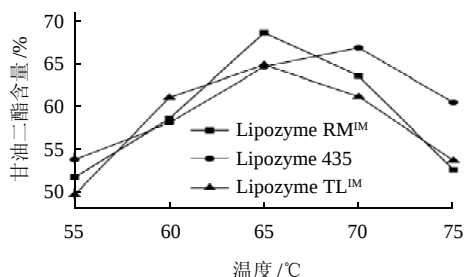


图4 温度对脂肪酶催化甘油解反应的影响

Fig.4 Effect of temperature on glycerolysis

由图4可见,脂肪酶Lipozyme RM™、Novozyme 435、Lipozyme TL™催化大豆油甘油解反应的最适温度分别为65、70、65℃,在此之后随着温度的升高,DG含量基本趋于不变,因此,此时温度为最适温度。

2.3 时间对脂肪酶催化甘油解反应的影响

选择反应条件:脂肪酶Lipozyme RM™、Novozyme 435、Lipozyme TL™添加量分别为2.5%、3%、8%,反应温度分别为65、70、65℃,底物比2:1,考察时间对CO₂超临界体系催化甘油解反应的影响。

脂肪酶所催化的甘油解反应可分为两步完成。在脂肪酶的催化作用下,甘油三酯与甘油先醇解为甘油一酯和甘油二酯(由于酶中有活性水使甘油三酯部分水解生成甘油二酯、甘油一酯和脂肪酸),然后甘油一酯和甘油三酯再酯交换为甘油二酯^[15],油脂中饱和脂肪酸含量及其碳链长短与甘油解有关,若饱和脂肪酸含量高,反应速率慢^[6]。选择较为合适的反应时间,是提高甘油二酯总得率的前提。

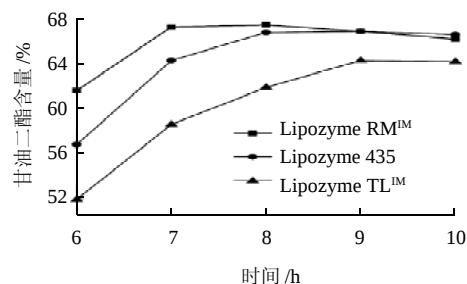


图5 时间对脂肪酶催化甘油解反应的影响

Fig.5 Effect of reaction time on glycerolysis

由图5可见,脂肪酶Lipozyme RM™、Novozyme 435、Lipozyme TL™催化大豆油甘油解反应的最适时间分别为7、8、9h,在此之后随着反应时间的延长,甘油二酯含量基本趋于不变,因此,此时时间为最适反应时间。

2.4 底物物质的量比对脂肪酶催化甘油解反应的影响

选择反应条件:脂肪酶Lipozyme RM™、Novozyme 435、Lipozyme TL™添加量分别为2.5%、3%、8%,反应温度分别为65、70、65℃,反应时间分别为7、8、9h,考察底物物质的量比对CO₂超临界体系催化甘油解反应的影响。

底物比与反应时间、温度、加酶量等因素不同,以上因素主要是通过影响反应速度来影响反应达到平衡的时间,底物比不仅影响反应时间也影响平衡状态。

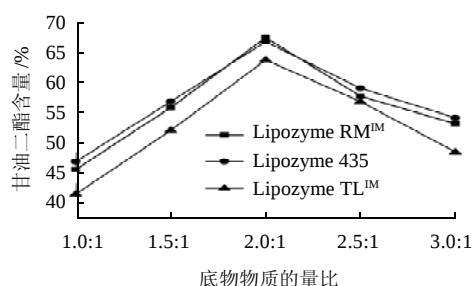


图6 底物物质的量比对脂肪酶催化甘油解反应的影响

Fig.6 Effect of substrate molar ratio on glycerolysis

由图6可见, 脂肪酶 Lipozyme RM[™]、Novozyme 435、Lipozyme TL[™] 催化大豆油甘油解反应的最适底物比均为 2:1。

通过以上 3 种酶的单因素试验, 确定 Lipozyme RM[™]、Novozyme 435、Lipozyme TL[™] 的最佳添加量分别为 2.5%、3%、8%; 反应温度分别为 65、70、65 °C, 反应时间分别为 7、8、9 h, 底物比均为 2:1, 在最佳实验条件下分别进行超临界甘油解反应, 得甘油二酯含量分别为 68.6%、67.7%、64.8%。

2.5 产品理化性质

对提纯后的甘油二酯理化性质进行分析, 见表 1。

表1 甘油二酯产品理化性质

Table 1 Physiochemical properties of DG

检测项目	甘油二酯	原料大豆一级油
透明度	澄清、透明	澄清、透明
气味、滋味	无味、口感好	无味、口感好
酸价/(mg KOH/g)	0.1	0.21
碘价/(g I/100g)	93.1	121
皂化价/(mg KOH/g)	185	191
过氧化价/(mmol/kg)	1.81	4.5
色泽(罗维朋比色槽 33.4mm ≤)	R1.9Y20	R1.6Y20
烟点/°C	211	217

从表 1 可以看出, 经过分子蒸馏的甘油二酯产品在酸价、过氧化价方面比较低; 但烟点不是很高, 这是因为产品的主要成分为甘油二酯, 它的沸点比相同脂肪酸组成的甘油三酯要低, 造成了甘油二酯在 215 °C 烟点实验中提前发烟, 一定程度上影响了它作为煎炸油的应用。

2.6 甘油二酯粗品经分子蒸馏前与蒸馏后比较

甘油二酯粗品经分子蒸馏前后色谱见图 7, 各成分含量见表 2。

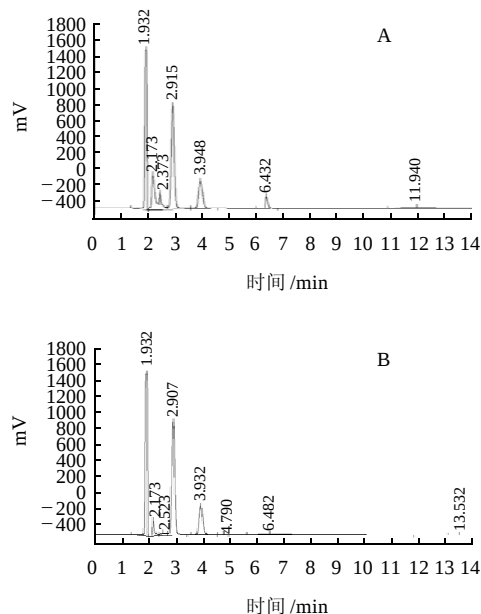


图7 分子蒸馏前产品(A)和分子蒸馏后产品(B)的液相色谱图

Fig.7 Liquid chromatographs of products before (A) and after (B) distillation

表2 分子蒸馏前后产品组成的对比

Table 2 Comparison of product compositions before and after distillation

	甘油二酯/%	甘油三酯/%	甘油一酯/%	脂肪酸/%
分子蒸馏前	68.60	21.45	5.23	4.72
分子蒸馏后	90.40	7.54	1.05	1.01

从表 2 可以看出, 蒸馏前甘油一酯、甘油三酯含量较高, 而蒸馏后甘油一酯、甘油三酯含量下降, 甘油二酯含量上升, 达到 90.40%。甘油二酯粗品为 2.5kg, 分子蒸馏后, 二次蒸馏的蒸馏后甘油二酯的质量为 1.50kg, 产品得率: $1.50/2.5 = 60.0\%$ 。

3 结 论

3.1 通过单因素试验, 得到脂肪酶 Lipozyme RM[™] 在 CO₂ 超临界体系中催化甘油解反应生成甘油二酯含量最高, 其次是 Novozyme 435, 最后是 Lipozyme TL[™], 可生成甘油二酯含量分别在 68.6%、67.7%、64.8%。虽然 Lipozyme TL[™] 的价格相对以上两种脂肪酶较便宜, 但在用量上较多, 而且生成甘油二酯含量相对其他两种脂肪酶来说较低, 所以在工业生产中, 建议用脂肪酶 Lipozyme RM[™]。

3.2 经二级分子蒸馏工艺对产物中甘油二酯进行蒸馏提纯, 得到甘油二酯产品纯度从 68.6% 提高到 90.4%, 产品得率为 60.0%。

参考文献:

- [1] 邱寿宽, 毕艳兰, 杨天奎, 等. Lipozyme RMTM 酶促豆油甘油解制备甘二酯的研究[J]. 郑州工程学院学报, 2004, 25(1): 33-36.
- [2] ARCOS J A, OTERO C. Enzyme medium and reaction engineering to design a low-cost, selective production method for mono and dioleoylglycerols[J]. J Am Oil Chem Soc, 1996, 73(6): 673-682
- [3] 张科红, 马传国, 王高林. 制备富含甘油二酯油脂研究新进展[J]. 粮食与油脂, 2009(5): 7-9.
- [4] 魏金霞, 毕艳兰. 甘二酯的制取与应用研究进展[J]. 粮油加工与食品机械, 2005(2): 45-48.
- [5] 阎杰, 姚灿杰. 几种酶促制备双甘酯方法的对比[J]. 粮油加工, 2008(5): 80-83
- [6] 邹冬芽. 甘油二酯的酶法制备及其功能性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005
- [7] 孙登文, 湛日景. 用溶剂结晶法分离单脂肪酸甘油酯的工艺: 中国, CN92100594.6[P]. 1992-01-31.
- [8] 赵成祺. 超临界流体及其应用[J]. 郑州粮食学院学报, 1990(1): 88-95.
- [9] 王丹蕊, 许浹, 石阶平. 以超临界 CO₂ 为介质利用固定化脂肪酶进行酶促水解反应表观动力学研究初探[J]. 北京石油化工学院学报, 2003, 11(1): 40-43.
- [10] MOQUIN P H L, TEMELLI F, KING J W, et al. Kinetic modeling of the glycerolysis reaction for soybean oils in supercritical carbon dioxide media[J]. J Am Oil Chem Soc, 2005, 82(8): 613-617.
- [11] TSUNEO Y, MOHAMMAD M H, SUMIYO I, et al. Glycerolysis of fat by lipase[J]. J Jpn Oil Chem Soc, 1986, 35(8): 625-631.
- [12] MALCATA F X, HACTOR R R, HUGO S G, et al. Immobilized lipase reactors modification of fats and oils: a review[J]. J Am Oil Chem Soc, 1990, 67(12): 890-910.
- [13] 郑渊月, 高荫榆, 孙志芳. 分子蒸馏在食品工业中的应用[J]. 江西食品工业, 2005(1): 18-20
- [14] XU X B, FOMUSO L B, AKOH C C. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(1): 3-10.
- [15] 邱寿宽. 酶促大豆油甘油解制备甘二酯的研究[D]. 郑州: 郑州工程学院, 2003.