

非水相酶促合成癸酸偏甘油酯的研究

夏咏梅¹ 方云^{1*} 章克昌² 石贵阳² 王征远¹

(江南大学¹ 化学与材料工程学院,² 生物工程学院, 无锡 214036)

摘 要 对无溶剂非水相中癸酸与甘油的酶促酯化反应进行了研究,发现 *Pseudomonas fluoresces* 脂肪酶(PFL)、*Mucor miehei* 脂肪酶(MML)和 *Candida antarctica* 脂肪酶(CAL)均有较好的催化活性。CAL 酶促转化癸酸的最适反应条件为 30℃,加酶量为 20~100u/g,初始加水量为甘油质量的 12%。CAL 的 1,3-位置专一性在最终产物中未表达。CAL 酶催化剂的失活主要与机械磨损有关,反应 5 批次后酶活残留量为 96.4%。敞开物系、真空脱水或分子筛脱水均为有效脱水方式。敞开物系中反应物量比不影响平衡转化率而会影响单甘酯平衡产率。用碳酸氢钠水溶液萃取可有效脱除产品中的残余癸酸,终产品酸价为 0.68mg KOH/g。提高甘油比例并使用非脱水原料,无外加水结合部分流加癸酸的工艺,可以减少减压脱水或敞开反应的时间,5h 后癸酸最高转化率可达 96.9%。

关键词 脂肪酶,癸酸甘油酯,非水相,催化,纯化

中图分类号 Q814.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0735-05

癸酸偏甘油酯可用作类固醇的溶剂,对溶解人体内的胆结石有显著作用,对胆汁酸的分泌有抑制作用^[1];也可用于婴儿及肠胃吸收功能障碍疾病患者的营养品中,还可用作无毒副作用的药物载体^[2]。癸酸偏甘油酯的化学生产工艺多采用脂肪酸与甘油的酯化反应,用过量甘油(甘油与酸的摩尔比为 1.15~1.5:1)在 150℃以上用酸催化反应,然后分相脱除甘油,续以碱水洗、蒸汽精炼、过滤、脱臭、活性炭脱色或分子蒸馏等工序。非分子蒸馏产品中单甘酯含量一般不高,市售进口产品中单甘酯含量以硬脂酸单甘酯(分子量 358)计时一般为 40%左右,以辛、癸酸单甘酯(平均分子量 232)计时一般为 25%左右。目前报道的酶法合成癸酸偏甘油酯基本为无溶剂相^[1-3]或有机溶剂相反应^[2,4,5],其中无溶剂相合成虽然为非均相反应,但其可操作性及经济性却远胜于有机溶剂相反应。Kim 等^[1]以 *Mucor miehei* 脂肪酶催化癸酸与甘油酯化,无溶剂相中 60h 后癸酸转化率达 85%;Anna 等^[3]以 *Rhizopus arrhizus* 脂肪酶为催化剂,无溶剂相中 24h 后癸酸转化率达 90%。本文将扩大试验酶种范围,全面研究并优化间歇反应器中无溶剂脂肪酶催化癸酸与甘油的酯化反应,

以期提高癸酸转化率和减少反应时间。

1 材料与方法

1.1 材料

甘油(AR);癸酸(CP);癸酸三甘酯及 1-癸酸单甘酯(色谱标样, Sigma 公司)。其余分析用试剂均为分析纯或色谱级。除特别说明外,所有反应原料使用前均经过分子筛脱水处理。固定化 *Candida antarctica* 脂肪酶(CAL 聚合物载体),橄榄油水解酶活为 7000u/g;固定化 *Mucor miehei* 脂肪酶(MML,无机材料载体),橄榄油水解酶活为 7500u/g,均由 Novo Nordisk 公司赠送。*Pseudomonas fluoresces* 脂肪酶(PFL,非固定化),橄榄油水解酶活为 30000u/g, Amano 公司赠送。显微摄影仪用皮肤表面观测仪改装(RS-88 型视频转换器转换),卡尔-费歇尔水分测定仪, Waters Alliance 2690 型 HPLC, Shimadzu IR。

1.2 方法

1.2.1 癸酸转化率的测定:吸取反应物样品约 0.1~0.3g 于三角瓶中,加 10mL 95%酒精使溶解并终止反应。以酚酞为指示剂用 NaOH 标准溶液滴定。转化率 $\alpha = 100(V_0 - V/W) / V_0$, 式中 V_0 为反应前每

收稿日期 2002-07-08, 修回日期 2002-09-02。

基金项目 国家工业技术“九五”攻关项目基金资助(No. 96-c03-02-05)

* 通讯作者。Tel: 86-510-5867220; Fax: 86-510-5867220; E-mail: ymxia@umich.edu

克样品消耗 NaOH 溶液的毫升数, V 为反应一定时间后 W 克样品消耗 NaOH 溶液的毫升数。

1.2.2 产品分析 癸酸含量用酸碱滴定分析。单癸酸甘油酯含量测定见前文^[6], 单甘酯分子量 M 为 246。IR, NaCl 盐片涂片。HPLC, 反相 C_{18} 柱, 柱温 40°C , UV 二极管阵列检测器(波长 215nm), 甲醇流动相流速 $1.0\text{mL}/\text{min}$ 。

1.2.3 癸酸甘油酯的合成 0.15mol 癸酸与适量甘油、水和酶置于一个 $\phi 3\text{cm} \times 5\text{cm}$ 的筒形玻璃反应器中, 用磁力搅拌使之均匀混合, 转速为 $400\text{r}/\text{min}$, 在水浴恒温下封闭反应(考察脱水方式时除外)至癸酸转化率不再升高为终点。水的加入量以甘油质量为基准, 加酶量以癸酸质量为基准。

2 结果与讨论

2.1 不同脂肪酶的催化活性

图 1 为分别以 *Candida antarctic* 脂肪酶(CAL), *Pseudomonas fluoresces* 脂肪酶(PFL)和 *Mucor miehei* 脂肪酶(MML)为催化剂, 在各自最佳反应温度和适宜加酶量^[9]下催化癸酸甘油酯化反应时, 癸酸转化率与时间的关系。初始加水量为甘油的 12% , 甘油: 癸酸 = $1:1$ (mol: mol)。3 种酶均有较好的催化活性

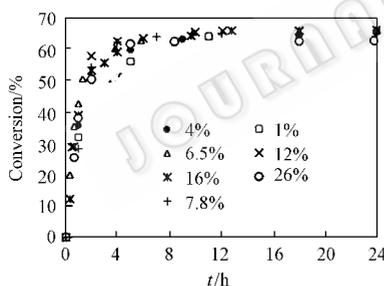


图 2 初始加水对平衡转化率和初速度的影响

Fig.2 Effect of initial water content in glycerol on the esterification

由图 2 可知, 甘油初始加水在 16% 以下时封闭物系内反应初速度随加水量增大而加快, 甘油初始加水在 12% 时初速度最快。甘油初始加水在 16% 以上时平衡转化率有所降低, 说明此时水解作用逐渐明显, 因此综合考虑平衡转化率和反应初速度可选择 12% 为最佳甘油初始加水量。

2.3 反应物摩尔比对癸酸转化率的影响

加水量固定为甘油质量的 12% , 加酶量 $100\text{u}/\text{g}$ 癸酸, 封闭物系反应温度 60°C 。不同反应物摩尔比(甘油: 癸酸)对反应的影响如图 3 所示。

尤以 CAL 最佳, 故在以下研究中均将以 CAL 为催化剂。

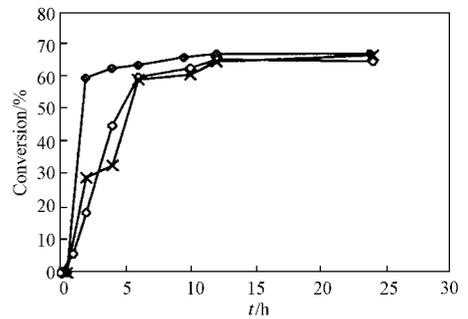


图 1 CAL, PFL 和 MML 酶促合成癸酸甘油酯的进程

Fig.1 Enzymatic synthesis of capric glycerides catalyzed by CAL, PFL and MML respectively

◆CAL $100\text{u}/\text{g}$, 60°C ; ◊PFL $1000\text{u}/\text{g}$, 55°C ; ×MML $100\text{u}/\text{g}$, 60°C

2.2 初始加水量的影响

初始加水量对平衡转化率和初速度的影响见图 2。其中甘油: 癸酸 = $1:1$ (mol/mol), 加酶量 $100\text{u}/\text{g}$ 癸酸, 封闭物系反应温度 60°C 。为保障数据的精确性, 在考察初速度效应时将加酶量降为 $20\text{u}/\text{g}$ 癸酸并对不同加水量的初始反应速率曲线进行回归分析以求出初速度。

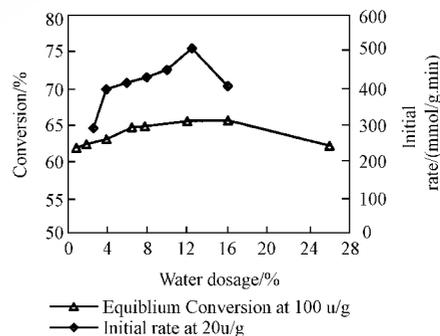


图 2 初始加水对平衡转化率和初速度的影响

Fig.2 Effect of initial water content in glycerol on the esterification

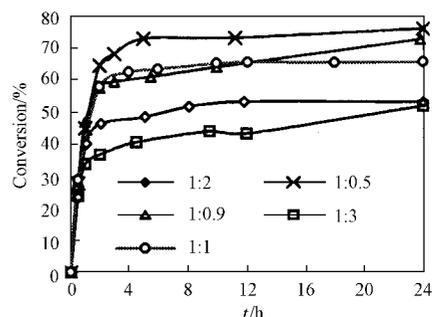


图 3 反应物摩尔比(甘油: 癸酸)对反应的影响

Fig.3 Effect of molar ratio (glycerol: capric acid) on the esterification in close system

封闭物系中甘油摩尔分数的增加使癸酸平衡转化率随之增大,对初速度的影响则较小且无规律可循。前者是因为反应平衡时体系的高分散性使得质量作用定律在此起主要作用;后者可能是因为多相体系中反应界面的摩尔比变化与体相并无线性对应关系。这一点可以通过用平板冷却猝灭结合显微摄影观察物系起始状态的相态得以证实^[9]:从反应器中吸出少量反应物液体并使其迅速在冷的载玻片表面铺展,如此反应得以猝灭及分散相态得以凝固,癸酸相及酶粒呈不透明状而甘油相透明,将此载玻片置于显微摄影仪下观察并摄像记录。

进一步试验了敞开物系中摩尔比的影响,在加水量 12%,加酶量 20u/g,封闭物系 60℃下分别以甘油与癸酸摩尔比为 1:1 或 1.5:1 反应,至转化速率明显降低时转敞开物系至癸酸转化率不再增加。图 4 中甘油:癸酸 = 1:1 (mol:mol) 时,反应 7h 后;甘油:癸酸 = 1.5:1 (mol:mol) 时,反应 5h 后由封闭物系改为敞开物系,48h 后产物中单甘酯含量分别为 20.7% 和 27% (后者分离出未反应甘油后单甘酯含量为 45.4%,远高于同摩尔比下化学反应所得产品中单甘酯含量),可见敞开物系中反应物起始摩尔比显著影响反应物平衡组成而对最终转化率影响不大。

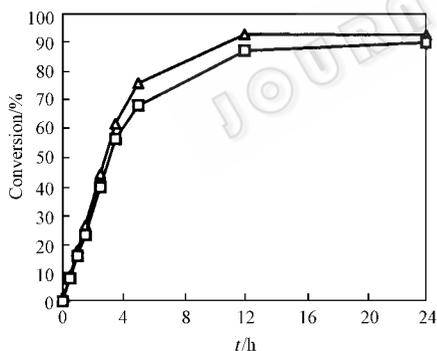


图 4 敞开物系中不同反应物起始摩尔比对最终转化率的影响

Fig.4 Enzymatic esterification at different molar ratios in open system

□ glycerol : capric acid = 1.5 : 1, applied reaction in open system after reacting 5h in close system

△ glycerol : capric acid = 1 : 1, applied reaction in open system after reacting 7h in close system

2.4 加酶量对癸酸转化率的影响

维持加水量为甘油质量的 12%,甘油与癸酸摩尔比为 1:1,封闭物系反应温度 60℃,不同加酶量下的反应结果如图 5 所示。当加酶量在 0 ~ 100u/g 癸

酸时,反应初速度与酶浓度成正比,加酶量为 200u/g 癸酸时,反应初速度达到最大值,以 100u/g 较为适宜。

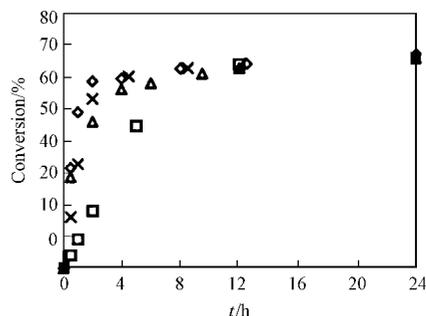


图 5 加酶量对癸酸转化率的影响

Fig.5 Effect of lipase dosage on esterification

□ 20u/g ; △ 50u/g ; × 100u/g ; ◇ 150u/g

2.5 脱水方式以及提高转化率的研究

已经报道过许多种脱水方法,如加入分子筛或减压脱水,也可以在敞开物系中藉蒸发脱水^[1]。本酶法反应需要维持较大的起始水含量(甘油质量的 12%),与化学法酯化中水脱除越充分越有利不同,也远高于高碳酸(C₁₂₋₂₂混合物)单甘酯合成所需水量(4%^[6])。实验尝试了不同脱水方法对最终转化率的影响。如图 6 所示,反应时间为 24h,分子筛加入或减压脱水在封闭反应 7h 后进行。

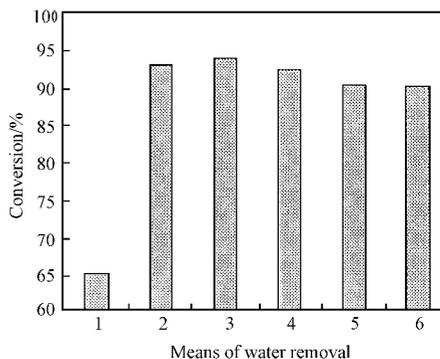


图 6 不同脱水方式下的最大转化率

Fig.6 Effect of dehydration method on maximum conversion

1. Close system

2. Open system

3. Vacuum with water jet pump

4. Addition 2g of molecular sieves

5. Addition 1g of molecular sieves

6. Addition 0.5g of molecular sieves

图 6 表明几种脱水方法对转化率的影响没有很大差别,都可以达到较高的最终转化率。但在间歇釜中加入分子筛不是一个好的选择,因为要多一步过滤以去除破碎的分子筛。减压脱水的效果虽好但长时间减压脱水则动力消耗较大。敞开物系反应最为经济但如果时间过长则不切合生产实际,而且产

品色泽会略有加深。考虑到过量甘油可以加快反应速度而且在反应结束后甘油可以很方便地分离出去,因此可以在反应初始状态时不加足量的水而使甘油过量,当反应进行到一定程度后虽然甘油过量程度降低但体系中有水生成,如此通过改变癸酸加料方式或调节摩尔比和初始加水量就可以提高最终转化率和减少反应时间,实验结果见图 7。

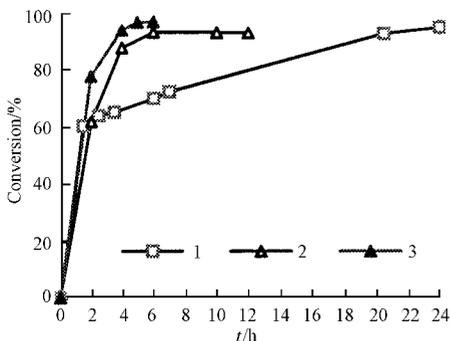


图 7 改变癸酸加料方式和初始加水方式对反应的影响

Fig.7 Effect of feeding manner of capric acid and initial water content on esterification

100u/g, 60°C; glycerol :capric acid(mol :mol)=1 :1 for No1-2 instead of 2 :1 for No3.

1. Feeding capric acid within the first 1h in close system with 1.14% initial water content, followed in open system
2. Feeding all the capric acid at the beginning in open system with 12% initial water content
3. Feeding 1/5 of capric acid at the beginning then the remainder within the first 1h in closed system with 1.14% initial water content, followed in open system for 2h then under 5mmHg for another 2h

如曲线 1 所示,按第一种方式起始反应速度较快但后续反应速度低于第二种方式(曲线 2),表明反应初期甘油大量过量时酶活可能有所损失。Hod^[8]也发现当甘油浓度达到 97% 时所用脂肪酶迅速失活。为此设计了曲线 3 的反应:封闭物系中甘油和癸酸的摩尔比定为 2 :1,反应初期将 1/5 癸酸与甘油均质后加入脂肪酶,其余癸酸 1h 内流加完毕,待癸酸转化基本达到平衡后改敞开物系。这样既避免了反应初期高浓度甘油的抑制作用,又降低了起始加水量,综合这两点就有可能做到既不外加水又缩短反应时间。曲线 3 表明反应 2h 达到封闭反应的最大平衡转化率(此平衡曲线在图 7 中未示出)后,转敞开物系反应 2h 癸酸转化率即达 94.1%,然后在 5mmHg 下减压反应 2h 癸酸转化率达 96.9%。

2.6 CAL 的操作稳定性

甘油 :癸酸 = 1 :1 (mol/mol),加酶量为 100u/g 癸酸,加水量 12%,封闭物系 60°C 反应 10h 后用布氏

漏斗将酶粉滤出。室温下用 15mL 丙酮分 4 次洗涤滤饼,除去附着的反应物和水。将酶粒抽干溶剂后在真空干燥箱中常温下干燥 2h。重复使用 5 次,结果如图 8。重复使用 5 次后 CAL 仍表现出较好的稳定性。

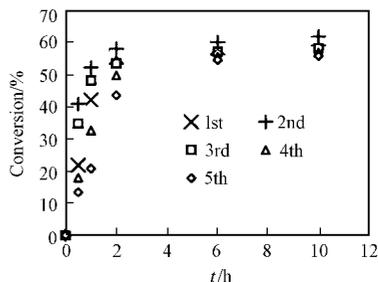


图 8 间歇釜中 CAL 的操作稳定性

Fig.8 The stability of CAL in batches esterification

实验发现酶粒粒度渐次减小,自第 3 次起的反应现象提示酯合成酶活的降低可能与载体脱落有关。用研钵将未使用过的酶颗粒研碎并筛分,取不同目数的酶粒进行催化反应,反应时间为 8h。筛分目数对酯化酶活的影响见图 9,其结果可解释图 8 的实验现象。

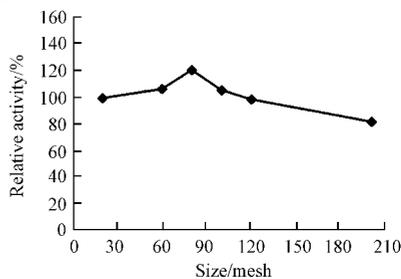


图 9 酶粒筛分目数对酯化酶活的影响

Fig.9 Effect of granularity of CAL on esterification

2.7 产品提纯及检测

反应结束后将产物保温静置 1h 左右使分层,可除去大部分残留含水甘油,但产物中仍尚存癸酸和少量甘油(1.5%)。分别采用吡啶型弱碱性离子交换树脂、731 型强碱性离子交换树脂、碳酸氢钠水溶液和碳酸钠水溶液对产品进行吸附或洗涤萃取以脱除残余的癸酸和少量甘油。

(1) 吸附实验:各取 5g 粗癸酸酯(或 5g 粗癸酸酯溶于 5mL 90% 乙醇中),根据粗癸酸酯的酸价(9.8mg KOH/g)按吸附剂交换当量等当量计算出所需吸附剂重量。称取计算值 2 倍量的吸附剂(树脂需预处理)装填于 50mL 酸式滴定管中。以 1mL/min 的速度收集癸酸酯(或醇溶液)并循环 3 次,用乙醇

洗脱。产品在 70℃ 下用循环水泵抽真空脱溶剂。

(2) 洗涤萃取实验 : 各取 10g 粗癸酸酯 , 根据粗癸酸酯的酸价 (9.8mgKOH/g) 按等当量计算出所需碱的重量。再配制 12mL 的碳酸氢钠 (过量 1.2 倍) 水溶液和碳酸钠 (过量 1.1 倍) 水溶液。分 3 次洗涤萃取 , 然后用 2 × 3mL 的 5% 氯化钠水溶液洗涤产品。产品在 80℃ 下用循环水泵抽真空脱除游离水。

表 1 癸酸甘油酯中残余癸酸的脱除

Table 1 Deacidifying by different means

Deacidifying protocol	Acid value (mgKOH/g)
Original	9.8
Alkalescence resin	8.6
Alkali resin (original sample)	3.6
Alkali resin (alcoholic solution of sample)	2.1
Sodium carbonate aqueous	0.68
Sodium bicarbonate aqueous	7.5

测定脱酸后产品的酸价 , 实验结果见表 1。碱洗后再用 5% 氯化钠水溶液洗去可能残留的碱 , 产品 IR 图中 1700cm⁻¹ 处羧酸的吸收峰已消失 , 表明癸酸已基本脱除 , 即采用碳酸钠水溶液对粗产品进行洗涤脱酸是行之有效的。HPLC 分析结果表明 : 产物中的两种单甘酯异构体含量没有显著区别 , 说明 CAL 的 1,3-位置专一性在此酯化反应中未表达。

Synthesis of Partial Glycerol Caprates by Using Lipase in Nonaqueous Media

XIA Yong-Mei¹ FANG Yun^{1*} ZHANG Ke-Chang² SHI Gui-Yang² Wang Zheng-Yuan¹

(¹ School of Chemical and Material Engineering , ² School of Biotechnology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract Enzymatic esterification by reacting capric acid with glycerol in solvent-free system was studied. Lipases from *Pseudomonas fluoresces* (PFL), *Mucor miehei* (MML) and *Candida antarctica* (CAL) possessed good catalytic activity. The optimal reaction conditions to convert capric acid with CAL are : 60℃ , 20 ~ 100u of CAL per gram capric acid , 12% (W/W) of initial water content in glycerol. CAL does not express its 1,3-specificity in final product. Mechanical fraying denatured CAL partly. 96.4% of catalytic activity of CAL recovered after 5 batches of reaction. Extraction with sodium carbonate solution can decrease acid value of product from 9.8 mg KOH/g to 0.68 mg KOH/g. Applying the enzymatic esterification in open system , under vacuum or dehydrating with molecular sieves all dehydrate effectively. Molar ratio of reactants does not influence the total conversion of capric acid but influences the yield of monoglyceride. With certain protocols , the reaction period could be shortened dramatically ; conversion of capric acid reached 96.9% in 5h.

Key words lipase , glycerol caprates , nonaqueous system , catalysis , purification

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kim S M , Rhee J S. Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system. *J Am Oil Chem Soc* , 1991 , **68** : 499 ~ 503
- [2] Wang W C , M Basri , C N A Razak , A B Salleh. Synthesis of medium-chain glycerides using lipase from *Candida rugosa* , *J Am Oil Chem Soc* , 2000 , **77** : 85 ~ 88
- [3] Anna Millqvist Fureby , Patrick Adlercreutz , Bo Mattiasson. Glyceride synthesis in a solvent - free system , *J Am Oil Chem Soc* , 1996 , **73** (11) : 1489 ~ 1495
- [4] Ghosh S , Bhattacharyya D K. Medium-chain fatty acid-rich glycerides by chemical and lipase-catalyzed polyester-monoester interchange reaction , *J Am Oil Chem Soc* , 1997 , **74** : 593 ~ 595
- [5] Dae Young Kwon , Hyo Nam Song , Suk Hoo Yoon. Synthesis of Medium-chain glycerides by lipase in organic solvent , *J Am Oil Chem Soc* , 1996 , **73** : 1521 ~ 1525
- [6] XIA Y M (夏咏梅) , ZHANG K C (章克昌). Studies on enzymatic glycerolysis of palm oil with temperature programming in solid state. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2000 , **16** (2) : 235 ~ 237
- [7] Zaks A , Klivanov A M. The effect of water on enzyme action in organic media. *J Biol Chem* , 1988 , **263** : 8017 ~ 8021
- [8] Hoq M M , Tagami H , Yamane T , Shimizu S. Some characteristics of continuous glyceride synthesis by lipase in a microporous hydrophobic membrane bioreactor. *Agric Biol Chem* , 1985 , **49** : 335 ~ 342
- [9] XIA Y M (夏咏梅). Enzymatic synthesis of partial glycerides in microaqueous media. *Ph D Thesis* , Wuxi University of Light Industry (无锡轻工大学博士论文) , 2000

Received : 07-08-2002

This work was supported partially by Grant from State Scientific and Technological Research project (No.96-c03-02-05).

* Corresponding author. Tel : 86-510-5867220 ; Fax : 86-510-5867220 ; E-mail : ymxia@umich.edu