

填充床反应器中酶法连续合成甘油二酯的研究

Synthesis of Diacylglycerol Using Immobilized 1, 3-Regiospecific Lipase in Continuously Operated Fixed Bed Reactors

孟祥河¹, 孙培龙¹, 杨 开¹, 何荣军¹, 毛忠贵^{2*}

MENG Xiang-He¹, SUN Pei-Long¹, YANG Kai¹, He Rong-Jun¹ and MAO Zhong-Gui^{2*}

1. 浙江工业大学生物与环境学院, 杭州 210032

2. 江南大学生物工程学院, 无锡 214036

1. College of Biological & Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 210032, China

2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

摘 要 近年来,1,3-甘油二酯(DAG)由于其广泛用途及健康作用日益受到人们的重视。报道了一种无溶剂条件下填充床反应器中连续酶促合成1,3-DAG的方法。研究了填充柱的长径比、进料体积流速、温度、底物摩尔比对酯化率和1,3-DAG产量的影响。结果表明固定化酶填充柱长径比7.8,亚油酸、甘油摩尔比1:2,进料速度1.2mL/min,65℃条件下酯化反应可实现脂肪酸酯化率、1,3-DAG纯度及生产效率的统一。填充床反应器中固定化酶连续催化酯化反应的一个主要问题即体系水分清除困难。实验研究了采用过量甘油吸附脱水的可行性,亚油酸、甘油摩尔比为1:2时,可明显改善固定化酶的稳定性,增加Lipozyme RM IM的使用寿命。连续运行10 d,残余酶活仍保持在80%以上,而对照组则仅为52%。

关键词 1,3-甘油二酯,合成,Lipozyme RM IM,填充柱反应器,脱水

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0425-05

Abstract Diacylglycerol, DAG, because of its multifunctional and nutritional properties, attracted considerable attention recently. Enzymatic synthesis of diacylglycerols from linoleic acid was investigated in a solvent-free reaction in a continuously operated fixed bed reactors containing Lipozyme RM IM. By appropriate manipulation of the fluid-residence time, the relative proportions of the various acylglycerols in the effluent stream can be controlled. In addition, the presence of excess glycerol is effective for the removal of water produced during the esterification reactions. Under the conditions of molar ratio of linoleic acid to glycerol of 0.5, the immobilized enzyme maintained high stability and allowed the reaction to continue for 10 days without significant deterioration in enzyme activity. It was determined that the conversion of fatty acid, content of 1,3-DAG and volume efficiency of reactor reached optima under the conditions: a packaged-bed reactor (with a ratio of packed length to inner diameter of 7.8), reacting temperature at 65℃, molar ratio of linoleic acid to glycerol of 0.5, and feeding flow rate of 1.2mL/min.

Key words 1, d-Diacylglycerol, synthesis, lipozyme RM IM, fixed bed reactor, water removal

1,3-甘油二酯(Diglyceride, DAG)是油脂的天然成分,属 GRAS 物质,其口感、色泽、风味与普通甘油

三酯(TAG)无异,因而是理想的油脂替代品^[1]。1,3-DAG最大特点是食用后不引起肥胖,同时能抑制实

Received: November 16, 2004; Accepted: February 3, 2005.

* Corresponding author. Tel: 86-510-5843740; E-mail: Maozg@vip.163.com

小鼠血清脂质的升高,减少肥胖大鼠内脏中性脂肪的蓄积^[2]。此外,1,3-DAG可调整奶油的熔点、塑性^[3],也可作为起始原料用于合成结构脂质、磷脂、糖脂、脂蛋白、酶的激活剂、抑制剂等^[4-6]。对于这类应用,纯的、特殊结构的位置异构体1,3-DAG是必需的。

1,3-DAG可通过化学方法获得,但近年来更倾向于采用反应条件温和、专一性强、环境友好的生物法。此前,我们曾对间歇条件下酶促脂肪酸、甘油酯化合成1,3-DAG进行了研究^[7]。然而在大规模的生产中,更希望采用连续的填充柱反应器^[8,9],以实现固定化脂肪酶利用最大化。在此系统中,随着反应的进行,作为副产物的水分会在反应器中逐步积累,从热力学平衡的角度考虑会使酯化反应过早进入平衡态,降低酯化率;作为反应物,水会与甘油竞争酰基酶中间体,使酯化的产物水解;另外水分过量吸附进入固定化酶中,会降低酶活,减少酶的使用寿命。因此及时除去水分是必须的。通常的除水方法主要有真空蒸发脱水、敞口反应除水、分子筛吸附、吹干空气法、循环饱和盐水膜分离法等^[10-15]。然而对于填充柱反应器,上述方法均受到不同程度的限制。本实验的主要目的是考察连续酯化反应中过量甘油吸附脱水的可能性,以探索简便、易行的有效方法,并对影响酯化率和1,3-DAG产量的因素进行研究,确定酶法连续生产甘油二酯的适宜条件。

1 材料和方法

1.1 材料

Lipozyme RM IM (Novozyme Co. 广州公司); 亚油酸(常州奥奇海洋生物有限公司); 甘油(AR级, 上海化学试剂公司); 甘油酯标准品(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)。夹层反应柱(26mm × 400mm, 16mm × 400mm), 普通层析柱(12mm × 400mm, 7.9mm × 400mm), 上海百特科技有限公司; 501型超级恒温循环水浴锅, 上海实验仪器厂; 81-2型恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器厂; HL-2D定时数显恒流泵, 上海沪西分析仪器三厂; TGL-16e台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; SHZ-22水浴振荡器, 太仓医疗器械厂; MA 40快速水份测定仪, Sartorius公司, 丹麦。

1.2 方法

1.2.1 固定化酶反应柱的准备:首先在反应器底部垫少量玻璃纤维防止酶流失,然后取10g干的Lipozyme RM IM手动充填入相应的夹层反应柱中,

酶上部再用玻璃纤维塞固定,拧紧两端旋帽使反应器内部呈密封状态。反应器套层连接循环水浴。对于细口径、无夹层的反应器,应将充填部分完全浸于水浴中。本实验中所用Lipozyme RM IM的空体积平均为1.80cm³/g,填充量为10g(除2.1外)原料在反应器内的保留时间 t_R 可由反应器的空体积 V_0 与进料的体积流速 F 比值求得。本试验中Lipozyme RM IM的酶活为940EU/g,1EU表示在无溶剂体系中,一定温度条件下,每分钟消耗1μmol亚油酸所需酶的微克数。酯化活力测定方法参考文献^[7]。

1.2.2 连续酯化方法:首先将原料预热至相应的反应温度,磁力搅拌混合,同时用恒流泵以一定流速输入反应器顶部入口,调整保留时间,开始酯化反应。每次试验前应先使用至少 $2V_0$ 的底物混合物(或正己烷)冲洗反应器。调整冲洗液流速使得保留时间为5min(反应器保留时间为反应物在填充柱中平均滞留时间),待实现稳定流动后调节流速达到期望的保留时间,定时取样分析。要求反应液不少于 $5V_0$,每流出 V_0 体积的反应液,应取样1次。

1.2.3 产物的分析方法(HPLC/ELSD法):A Hewlett packard 1050 HPLC, Column, Shim-pack HRC-Si L (25cm × 4.6mm), Alltech ELSD2000, drift tube temp 90℃。流动相正己烷、异丙醇、乙酸乙酯,组成及梯度洗脱程序详见AOCS Cd 11d-96^[16]。

1.2.4 甘油与固定化酶竞争吸水试验方法:首先将甘油、脂肪酸用预干燥过的分子筛充分干燥,同时取一定量固定化酶快速灭活,然后测其初始水分含量。分别称一定量甘油、脂肪酸、固定化酶于道夫管中混匀,添加既定数量的水,密封,于设定的温度下水浴,200r/min转速振荡1h,然后3000r/min离心5min,分别测各组分的水分含量。

1.2.5 水分含量的测定方法:水分含量采用Sartorius公司的MA40快速水分测定仪测定。

2 结果与讨论

2.1 反应柱内径对酯化率的影响

试验研究了固定化酶Lipozyme RM IM填充高度12.5cm、反应温度60℃、亚油酸、甘油摩尔比为2:1,保留时间12min的条件下,不同内径的反应器对亚油酸酯化率的影响。试验结果如图1所示。

通常条件下,对于理想的活塞流反应器,填充高度与内径的比率对反应程度不应有明显的影晌^[17]。但试验结果表明内径小的反应器有较高的酯化率。

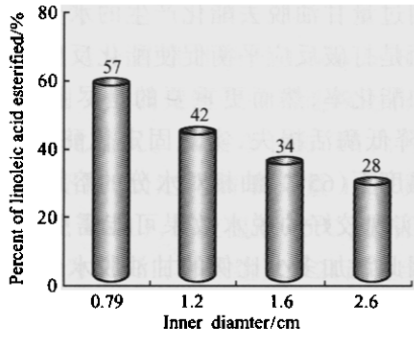


图1 反应柱内径对亚油酸酯化率的影响

Fig.1 Effects of the inner diameter of reactor on linoleic acid conversion

由于反应底物(甘油和亚油酸)是互不相溶的,因此尽管进柱前经过混合,但原料仍呈两相。甘油主要呈小液滴态分散在油相中。小口径的反应柱可增加底物接触面积,利于传质,因而反应速度较快。观察还发现甘油主要存在于反应柱中心,尤其在反应器入口处,管壁周围甚至不润湿。因此有理由认为柱壁附近极性的脂肪酶与甘油接触不良是大口径反应器酯化率低的主要原因。另外,也许由于传质原因,造成大口径柱偏离活塞流严重,所以出现上述现象。然而,也不是柱径越细越好,充填高度与反应柱内径之比过高会增加柱压,不利于工业化生产。因此以下试验均采用内径1.6cm的反应柱。

2.2 反应温度的影响

温度效应如图2所示。亚油酸、甘油摩尔比为2:1,保留时间12min。由实验结果不难发现亚油酸的酯化百分率随温度增加而增加,这是反应速率常数随温度升高而增大的结果。酯化率随温度的变化的趋势与间歇反应^[7]基本一致,与之不同的是70℃时的酯化率要高于60℃。这可能是填充柱避免了机械搅拌对酶稳定性的影响,酶因脱落而热失活损失减少,因此酯化率高。

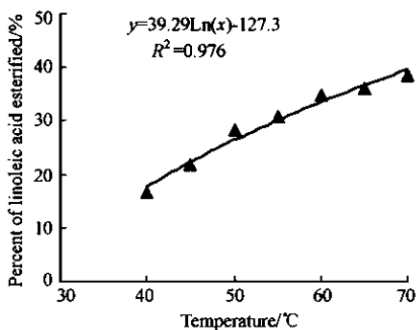


图2 温度对连续酯化反应中亚油酸酯化率的影响

Fig.2 Effects of temperature on linoleic acid conversion

2.3 脂肪酸、甘油摩尔比的影响

底物摩尔比对亚油酸的酯化率及甘油酯产物组成的影响分别如图3、4所示。

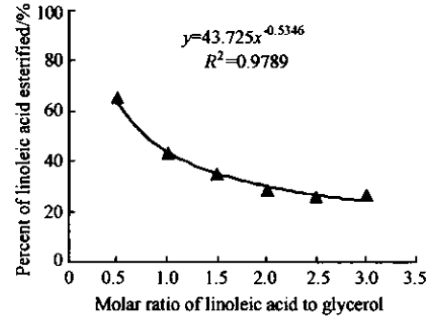


图3 底物摩尔比对亚油酸连续酯化反应酯化率的影响

Fig.3 Effects of ratio of linoleic acid to glycerol on conversion

Condition: 65℃, t_R :12min.

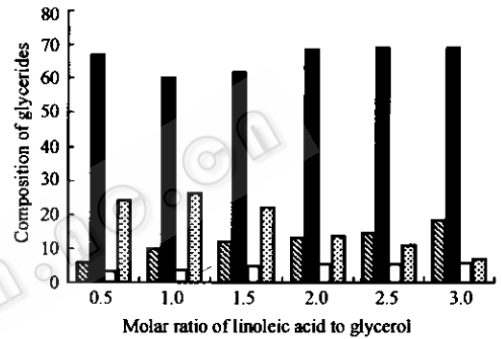


图4 底物摩尔比对亚油酸酯化产物组成的影响

Fig.4 Effects of ratio of linoleic acid to glycerol

on glyceride composition

Condition: 65℃; t_R :12min; ▨ TAG; □ 1,2-DAG; ■ 1,3-DAG;

▤ MAG.

实验发现,底物摩尔比较低时酯化率较高,此现象可能不仅仅与底物浓度有关,也许与过量甘油的干燥脱水作用有一定关系。当体系中甘油过量时,将充斥整个反应柱内部空间,由于甘油极性较强,极易吸收酯化反应产生的水分,因此可能降低了酶颗粒吸附的水分。本试验中亚油酸、甘油的摩尔比为0.5时,亚油酸酯化率最高为65.02%。

图4表明,酯化反应中DAG是主要产物。DAG得率高的原因可能如下:脂肪酸与甘油首先生成MAG,MAG是良好的乳化剂,主要存在于油、水界面处,因而会进一步酯化生成1,3-DAG。DAG亲油性强,不能继续停留在油水界面上,而是转移到油相中,因而很少生成TAG^[18]。此外1,3-DAG不能(或很少)直接酯化生成TAG,而要通过1,3-,1,2-DAG异构化,经由1,2-DAG生成。综合考虑酯化率及1,3-DAG的含量,选择亚油酸甘油摩尔比以1:2为

宜,这对于连续反应及时脱水、最大限度地利用酶活力也是有益的。

2.4 流速对连续酯化反应的影响

通常来讲,其它反应条件相同的情况下(反应温度 65℃,亚油酸、甘油摩尔比为 1:2),酶与底物接触越充分,亚油酸的酯化率就越高。进料速度越小,保留时间越长,酯化率就会越高。这一点在图 5 上表现得更为直观。然而低流速获得的高酯化率是以延长反应时间为代价的。试验发现流速 1.5 mL/min 时平均酯化速度最大,为 5.92 mmol FFA/g/h。

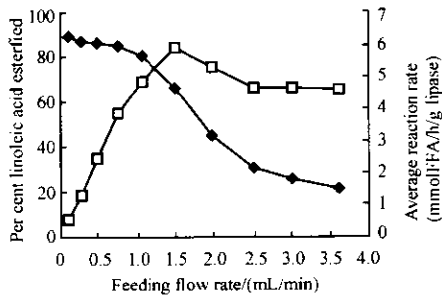


图 5 进料速度对亚油酸酯化率、酯化速度的影响

Fig. 5 Effects of flow rate on conversion and reaction rate of linoleic acid

□ Per cent linoleic acid esterified; ◆ Average reaction rate.

图 6 表明,流速低、保留时间长,产物中 TAG 含量高,而 MAG 含量低。MAG 的合成及进一步酯化受体系中酯化反应生成的水分影响很大。这种限制在一定程度上可由过量甘油的干燥作用缓解。进料速度高,保留时间适中时,1,3-DAG 得率高。随着保留时间的进一步延长,生成的 1,3-DAG 会在质子酸碱催化(非酶催化)作用下,部分异构化为 1,2-DAG^[19],后者会酯化生成 TAG。尽管异构化反应的速度较慢,但对 1,3-DAG 的终浓度会有一定影响。

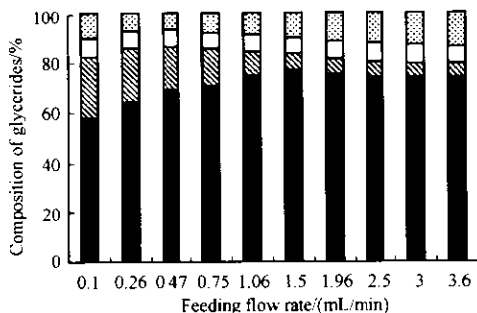


图 6 流速对甘油酯组成的影响

Fig. 6 Effects of flow rate to glycerides composition

■ TAG; □ 1,2-DAG; ■ 1,3-DAG; ▨ MAG.

2.5 过量甘油脱水效果的研究

2.5.1 不同添加量的甘油脱水效果的研究:本实验

尝试采用过量甘油脱去酯化产生的水分。脱水的目的方面是打破反应平衡促使酯化反应向合成方向移动增加酯化率,然而更重要的是尽量减少固定化酶吸水,降低酶活损失,实现固定化酶利用最大化。但酯化温度下(65℃)油相对水分的溶解度是不能忽略的,要实现较好的脱水效果可能需要较大的甘油比例。因此添加多少比例的甘油脱水效果最好是我们亟需考虑的问题。为此我们设计了如下模拟试验。

间歇酯化反应时,我们优化的条件为 25 mmol 亚油酸、12.5 mmol 甘油(摩尔比为 2:1),0.2445 g Lipozyme RM IM (3%, wt%), 65℃ 反应^[7]。假设亚油酸、甘油完全酯化,则会生成 25 mmol (0.45 g) 水、7.75 g 甘油酯混合物。本实验以 7.75 g DAG 油、0.45 g 水,0.2445 g 灭活的 Lipozyme RM IM 替代上述反应产物,在此基础上分别添加 0, 12.5 (1.15 g), 37.5 (3.45 g), 62.5 (5.75 g), 87.5 (8.05 g) mmol 甘油,模拟亚油酸、甘油摩尔比分别为 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 时的情形,混合后 65℃, 200 r/min 水浴振荡 1 h, 然后恒温静置分层,测各相水分含量。结果列于表 1。

表 1 甘油的添加量对水分分布的影响

Table 1 Effects of amount of glycerol on water distribution

Water/%	Molar ratio of linoleic acid to glycerol				
	2:1	1:1	1:2	1:3	1:4
Lipozyme RMIM (W %)	31.33	22.18	9.73	8.42	8.02
Water mass/g	0.077	0.0347	0.0042	0.0010	-
Oil phase (W %)	4.82	2.62	2.42	1.08	0.86
Water mass/g	0.373	0.203	0.1876	0.0837	0.0666
Water phase (W %)	-	18.45	7.84	6.36	4.76
Water mass/g	-	0.2122	0.2582	0.3653	0.3832

Note: Lipozyme RM IM with initial water content of 8.0%, oil phase with initial water content of 0.1%, glycerol with initial water content of 0.12%, water mass refer to weight of water absorbed.

亚油酸、甘油摩尔比为 2:1 时,原料完全消耗而无过量甘油存在,因此水分完全被“油相”、固相酶所吸附。此时固定化酶水分含量高达 31.33%,油相水分含量为 4.82%。然而随体系中甘油比例的增加,这两相中水分含量明显减少。表面看来“水相”中水分含量也随之在减少,但其绝对吸附量却在增加,从 2:1 时的 0g 增加到 1:4 时的 0.3832g。另外据 Novozyme 公司产品说明 Lipozyme RM IM 水分含量在 8%~10% 左右时酶活最高。观察上表中的数据可以发现,在亚油酸、甘油摩尔比 1:2 时既可明显降低油相中水分浓度,保持较高的酶活力,还可提高反应器单位体积效率,因此确定连续反应中亚油酸、

甘油的摩尔比为 1:2。

2.5.2 连续反应中过量甘油对 Lipozyme RM IM 稳定性的影响:图 7 是填充柱反应器连续运行 240h 过程中酶活的变化情况。实验条件如下:内径 16mm, 长 40cm 的填充柱,固定化酶填充量 10g,填充高度 12.5cm(空体积 18mL),反应温度 65℃,亚油酸、甘油的摩尔比分别为 1.5:1(对照组)、1:2(试验组),进料速度 1.2mL/min。每 24h 测一次酶活力。图中两条直线的斜率代表酶的失活常数,斜率越大,表明酶失活越快。底物摩尔比为 1.5:1 时,酶稳定性很差,可能是由于酯化产生的水份沉积到酶表面所致。

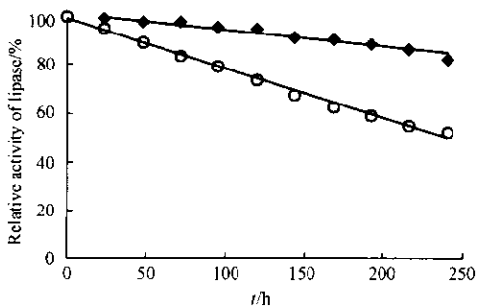


图 7 过量甘油除水对连续反应中酶稳定性的影响

Fig.7 Effects of water removal with excessive glycerol on the stability of Lipozyme RM IM in fixed-bed reactor

◆ R=0.5; ○ R=1.5.

连续运行 10 d 后,酶活损失接近一半,而过量甘油组(摩尔比为 1:2)的酶活力仍在 80% 以上。由此可见,填充柱反应器中过量甘油脱水对延长固定化酶的使用寿命是简便有效的。

3 结 论

无溶剂条件下,填充柱反应器中利用 Lipozyme RM IM 催化亚油酸、甘油连续合成 1,3-DAG 是可行的。实验发现反应器的长径比、反应温度、底物摩尔比、进料速度不仅影响脂肪酸的酯化率而且影响产物的组成。另外研究表明过量底物甘油脱水简便易行,可有效提高固定化酶的稳定性,连续运行 10 d 后,酶活仍在 80% 以上,而对照组仅为 52%。

REFERENCES(参考文献)

[1] Meng XH(孟祥河), Gao BJ(高保军), Mao ZG(毛忠贵) et al. Application of diacylglycerols. *China Food Additives* (中国食品添加剂), 2002, 153(4): 58-61

[2] 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. 16th International Congress of Nutrition, Montreal, Canada, 1997, pp. 341

[3] Doucet J. Shortening system, products therewith and methods for making and using the same. US patent, A23D, 955214. 1999-06-01

[4] Scriba GKE. Phenytoin-lipid conjugates as potential prodrug. *Arch pharm*, 1993, 326: 477-481

[5] Ikihel L. Letourneux synthesis and evaluation of anti-inflammatory. *Drug Res*, 1996, 46: 1046-1044

[6] Berger M. Regioisomerically pure MG DG as synthetical building blocks. *Fat Science & Technology*, 1993, 95: 169-175

[7] Meng XH(孟祥河), Pan QY(潘秋月), Zou DY(邹冬芽) et al. Study on enzymatic production of 1,3-diacylglycerol from linoleic acid and glycerol in a solvent free system. *China Oils and Fats* (中国油脂), 2004, 29: 47-51

[8] Carta G, Gainer JL, Benton AH. Synthesis of esters using a nylon-immobilized lipase in batch and continuous flow reactors. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37: 1004-1009

[9] Indlekofer M, Brotz F, Bauer A et al. Stereoselective bioconversions in continuously operated fixed bed reactors: Modeling and process optimization. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 52: 459-471

[10] Ergan, F, Trani M, Andre G. Production of glycerides from glycerol and fatty acid by immobilized lipases in non-aqueous media. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35: 195-200

[11] Fregapane G, Sarney DB, Greenberg SG et al. Enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their comparison with conventional products. *J Am Oil Chem Soc*, 1994, 71: 87-91

[12] Kim JE, Han JJ, Yoon JH et al. Effect of salt hydrate pair on lipase catalyzed regioselective monoacylation of sucrose. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 57: 121-125

[13] Kosugi Y, Azuma N. Continuous and consecutive conversion of free fatty acid in rice bran oil to triacylglycerol using immobilized lipase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 41: 407-412

[14] Padt AV, Sewalt JJW, Riet KV. On-line water removal during enzymatic triacylglycerol synthesis by means of pervaporation. *J Membrane Sci*, 1993, 80: 199-208

[15] Napier PE, Lacerda HM, Rosell CM et al. Enhanced organic-phase enzymatic esterification with continuous water removal in a controlled air-bleed evacuated-headspace reactor. *Biotechnol Prog*, 1996, 12: 47-50

[16] Mehlenbacher VC. Determination of mono and diglycerides by High Performance Liquid Chromatography. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Champaign, Illinois, USA. 1997. cd 116-191

[17] Hill Jr GG. An introduction to chemical engineering kinetics and reactor design. New York: John Wiley & Sons press. 1979. pp. 245-316

[18] Cui ZG(崔正刚), Yin FS(殷福珊). Micro-emulsion Technology and Application (微乳化技术及应用). Beijing: Chinese Press of Light Industry, 1999

[19] Ortie R, Trani M, Ergan F. Kinetic study of lipase-catalyzed synthesis of triolein. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 41: 1021-1026