

无溶剂体系酶催化酯化反应合成 1,3-甘油二酯的研究

鲁珊, 黄健花, 王兴国*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在无溶剂体系中以油酸、甘油为原料, 用专一性脂肪酶中合成 1,3-DAG, 实验发现真空脱水可以有效的增加油酸的转化率。在真空脱水的条件下, 探讨了反应底物摩尔比、酶量和温度等因素对油酸的转化率和 1,3-DAG 质量分数的影响。结果表明: 油酸与甘油摩尔比为 2:1 时, 酶量为 6%, 温度为 65 °C 时 1,3-DAG 质量分数达到 62%。

关键词: 酯化反应; 1,3-DAG; Lipozyme RM IM; 油酸; 甘油

中图分类号: O 623.624 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)04—0358—04

Enzymatic Esterification of 1,3-Diacylglycerol from Oleic Acid and Glycerol in a Solvent Free System

LU Shan, HUANG Jian-hua, WANG Xing-guo*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: 1,3-diglyceride was esterified by oleic acid and glycerol using Lipozyme RM IM in a solvent free system. The effects of substrate molar ratio, reaction temperature and enzyme loading on the conversion rate of oleic acid and yield of 1,3-DAG were discussed in this paper. The results were as follows: molar ratio of oleic acid and glycerol 2:1, reaction temperature 65 °C, enzyme loading 6%, under these conditions, the 1,3-DAG yield was up to 62%.

Keywords: esterification reaction, 1,3-DAG, Lipozyme RM IM, oleic acid, glycerol

甘二酯, 也称为脂肪酸甘油二酯(DAG), 是由丙三醇(甘油)与两个脂肪酸酯化得到的产物, 按空间异构分为 1,3-甘二酯(1,3-DAG)和 1,2-甘二酯(1,2-DAG)。其中, 天然食用油脂中的甘二酯以 1,3-DAG 为主, 占甘二酯总量的 70% 左右。1,3-DAG 具有很好的乳化性能, 可作为乳化剂广泛应用于食品、药品和化妆品等行业; 另一方面还具有许

多生理功能, 可用于预防与治疗高脂血症及与高脂血症密切相关的心脑血管疾病, 近年来受到人们的广泛关注^[1-3]。

目前合成 1,3-DAG 主要有化学法和酶法。化学法得到高纯度的产品比较困难, 往往需要多步骤的反应以及繁琐的纯化操作^[4]。酶法反应条件温和, 且由于酶的选择性, 较易得到高纯度的 1,3-DAG。

收稿日期: 2012-10-29

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD02B04)。

* 通信作者: 王兴国(1962—), 男, 浙江台州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事油脂深加工研究。E-mail: wxg1002@qq.com

角田昭等人研究了在脱水条件下利用碱性脂肪酶进行的酯化反应,反应 48h 酯化率达到 96%,甘油二酯质量分数为 60%^[5]。Masakatsu^[6]等人利用固定化脂肪酶作为催化剂进行酯化反应,酯化率能达到 86%左右,甘油二酯质量分数可达 65%,但是反应使用的是非特异性脂肪酶,所以得到的 DAG 是 1,3-DAG 和 1,2-DAG 的混合物。邱寿宽等人用 Lipozyme RM IM 做催化剂,以大豆和甘油为底物,在最适条件下,甘二酯得率为 51.7%。

作者选用特异性酶 Lipozyme RM IM 做催化剂,以脂肪酸、甘油为原料直接酯化生成 1,3-DAG,不仅反应方便,可一步完成,且产物纯度较高,反应时间较短,为进一步放大和商业化提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

Lipozyme RM IM(物理吸附大孔阴离子交换树脂):诺维信生物技术有限公司产品;甘油(AR 级):国药化学试剂有限公司产品;油酸(AR 级):国药化学试剂有限公司产品。

Re-52 型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂产品;集热式恒温磁力搅拌水浴锅:金坛市医疗仪器厂产品;Waters 1525 高效液相色谱:美国 Waters 公司产品;TGL-16B 离心机:上海安亭科学实验仪器厂产品。

1.2 试验方法

1.2.1 酯化方法 取 16.14 g 油酸,然后将油酸与甘油按一定摩尔比混合,于一定温度、80 r/min 搅拌均匀,添加一定量的固定化酶于真空反应器(真空度 0.07 MPa)或常压反应器反应一定时间。反应过程中,按一定时间间隔取样分析反应物组成。

1.2.2 酸值的测定 按 GBT 5530-2005 进行。

1.2.3 酯化率的计算

酯化率(%)=[(反应起始酸价-反应物的酸价)/反应起始酸价]×100%

1.2.4 甘油酯组成分析 酯化产物用正己烷萃取,加少量水离心收集油相,吹氮气除溶剂,HPLC 分析。分析条件:Waters Spherisorb Silica 色谱柱(2.0 mm×250 mm);流动相 A:正己烷-异丙醇(体积比 99:1);流动相 B:正己烷-异丙醇-乙酸(体积比 1:1:0.01)进行梯度洗脱,柱温:35 ℃;进样量:5 μL;漂移管温度:75 ℃;流动相流量:0.5 mL/min。检测器:蒸发光散射检测器,面积归一化法定量。

2 结果与讨论

2.1 反应产物组成

甘油与油酸反应后的产物组分有 TAG、FFA、1,3-DAG、1,2-DAG 和 MAG,如图 1 所示:

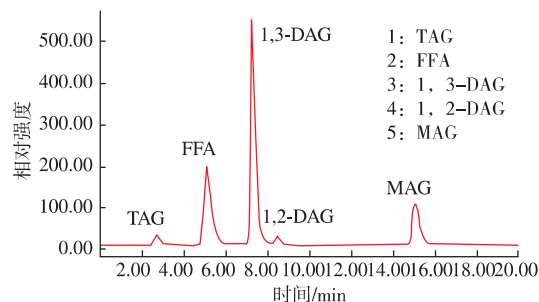


图 1 反应产物的高效液相图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reaction products

2.2 真空脱水对酯化率的影响

适宜的水分含量是维持酶活力所必须的。但当水分含量超过一定量后,脂肪酶的酯化活力会大大降低,而表现为较高的水解活力。在酶催化酯化反应过程中,会生成水,水的存在不利于平衡向酯化方向进行。因此,采用一定措施去除体系中过量的水使反应平衡向合成方向移动,不仅可以提高酶活,也可以增加酯化率。作者考察了常压及真空条件下进行的酯化反应的进程曲线。

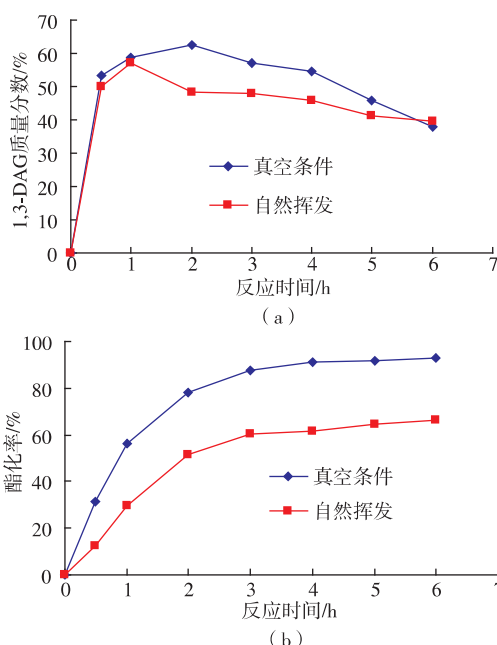


图 2 脱水对 1,3-DAG 质量分数和酯化率的影响

Fig. 2 Effect of water removal on 1,3-DAG yield and conversion rate

由图 2 可知,在常压下,反应 2h,1,3-DAG 含量和酯化率分别是 48%和 52%;在真空条件下,反应 2h,1,3-DAG 含量和酯化率分别为 62%和 78%。之所以有这样的差距,可能是因为甘油是极性分子,在常温常压条件下甘油和脂肪酸供体之间的相容性很差,当甘油和脂肪酸供体混合后与脂肪酶接触时,极性的甘油分子倾向于包裹在脂肪酶上而造成酶的催化效率降低^[8]。由此可见,在酯化生产 1,3-DAG 反应中除去反应生成的水分是十分必要的。

2.3 底物摩尔比的影响

任何一种底物摩尔数的改变,都会影响体系的稳定性及产物的扩散速率与含量,从理论上脂肪酸与甘油的摩尔比例在化学计量比 (2:1) 会使 1,3-DAG 质量分数达到最佳。如果脂肪酸质量分数过高,则底物利用率不高;如果甘油质量分数过高,不仅使体系的黏度加大,不利于反应的进行,而且体系极性增加,甘油与脂肪酶易沉积在底部,难以与脂肪酸有效的混合,使反应速率降低^[9-10]。

作者以 1,3-DAG 质量分数及酯化率为指标,研究了反应温度 65℃,Lipozyme RM IM 添加量 6% (以底物总质量计),真空脱水 (0.07MPa) 的条件下,油酸、甘油的摩尔比对酯化合成 1,3-DAG 的影响,结果如图 3 所示。

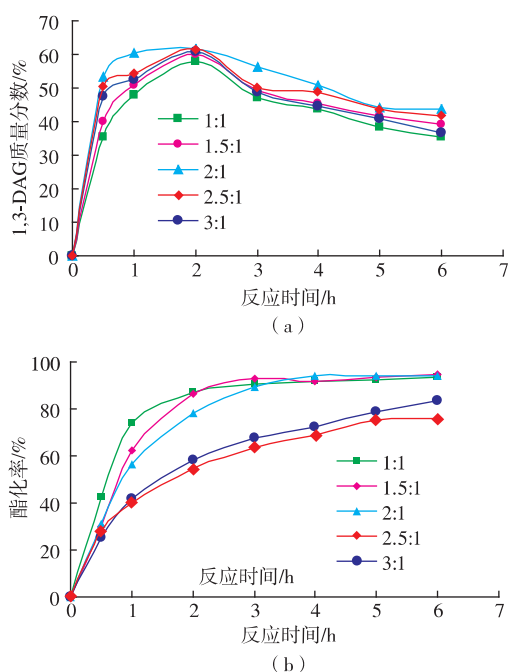


图 3 底物摩尔比对 1,3-DAG 质量分数和酯化率的影响
Fig. 3 Effect of the molar ratio on 1,3-DAG yield and conversion rate

由图 3 可知,1,3-DAG 质量分数随着底物摩尔比(油酸与甘油的摩尔比)的增加而出现先上升后下降的趋势。在底物摩尔比为 2:1 时,反应 2 h,1,3-DAG 得率最高,可达到 62%,酯化率为 78%。当油酸与甘油的摩尔比例大于 2:1 而小于 3:1 (理论上生成 TAG 的比例)时,1,3-DAG 得率和酯化率都会下降,这可能是因为体系中更多的油酸会趋向于转化为 TAG,所以造成 DAG 的得率下降,进而 1,3-DAG 得率会下降。因此,反应体系中底物摩尔比采用 2:1 为宜。

2.4 酶量的影响

在油酸与甘油摩尔比为 2:1, 反应温度为 65℃, 真空脱水 (0.07 MPa), 4%、6%、8% (底物总质量计) 作为酶量研究的变量条件下, 考察了加酶量对 1,3-DAG 质量分数和酯转化率的影响, 结果见图 4。

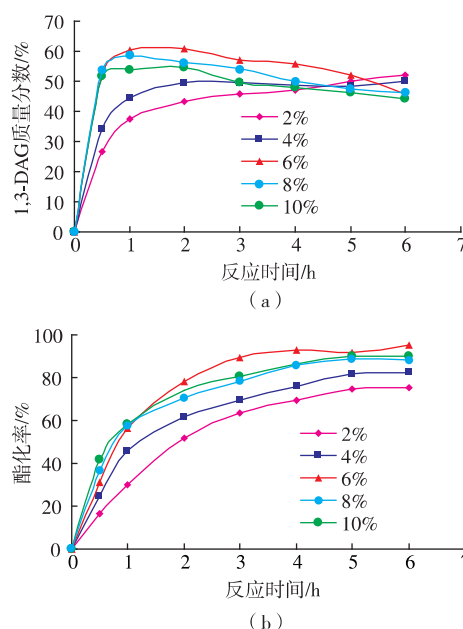


图 4 酶量对 1,3-DAG 质量分数和酯化率的影响
Fig. 4 Effect of enzyme load on 1,3-DAG yield and conversion rate

由图 4 可知,当酶量从 2%增加到 6%时,反应到 2h 时,1,3-DAG 质量分数从 50%上升到 62%;酯化率从 52%上升到 78%,当继续增加酶量到 10%时,1,3-DAG 的质量分数和酯化率都是呈下降趋势的,这可能是由于酶底物数量有限,达到饱和,并且固体脂肪酶量过大,反应体系流动性差,反应一定程度受阻^[11]。同时发现,随着反应时间的增加,1,3-DAG 含量呈下降趋势,而酯转化率呈上升趋势,当反应时间到 4 h 后,酯化率为 94%后,基本保持不

变,由此可见酯化率最高时,1,3-DAG 含量并非最高,这可能是由于体系反应过程中的酰基转移产物中 1,2-DAG 和 TAG 含量增加存在所致,因此以后的研究中酶添加量采用 6%为宜。

2.5 温度的影响

适宜的温度控制对酶催化反应是重要的。脂肪酶来源不同,最适温度也各不相同。一般而言温度升高,有利于酯化反应副产物水的脱除,加快反应速率,但温度过高,则会影响酶的空间结构和构象,从而降低酶活力。所以实验需控制适宜的反应温度。研究了不同的温度对反应产物中 1,3-DAG 含量及酯化率的影响。如图 5 所示。其他反应参数为:油酸与甘油底物摩尔比 2:1,Lipozyme RM IM 添加量 6%(以底物总质量计),真空脱水(0.07 MPa)。

由图 5 可知,随着温度的升高,1,3-DAG 的含量和反应初速度都是增加的,当温度为 65 ℃时,反应时间为 2 h 时,1,3-DAG 的质量分数最高达到 61%,酯化率为 78%。当温度高于 60 ℃时,1,3-DAG 的质量分数和反应初速度则降低。这可能是由于反应温度升高时,物质在反应体系中的溶解度会有很大提高,体系黏度低,传质速率就快,进而反应速度快。然而,随着温度的进一步升高(温度高于 65 ℃),热力学平衡占据主导地位,酰基位移增加(1,2-DAG 由 4.1%上升至 8.9%),使 1,3-DAG 质量分数下降^[12]。另外可以看到,随着反应时间的增加,1,3-DAG 的质量分数呈下降趋势,当 5 h 后趋于平衡,而酯化率则缓慢增加,当 4 h 后保持不变。综合考虑

以上因素,选择 65 ℃作为反应温度较佳。

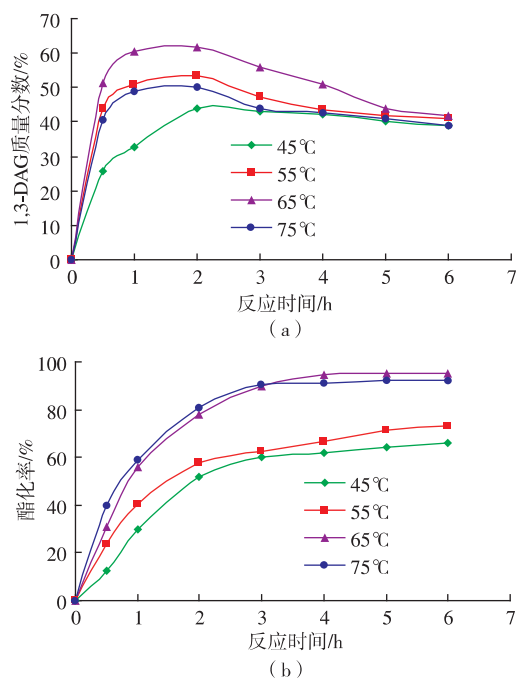


图 5 温度对 1,3-DAG 质量分数和酯化率的影响

Fig. 5 Effect of temperature on 1,3-DAG yield and conversion rate

3 结 语

采用 RM IM 酶催化脂肪酸与甘油合成 1,3-DAG,利用真空脱水,油酸与甘油的摩尔比为 2:1,温度为 65 ℃,酶量为底物总质量的 6%时,1,3-DAG 得率最高为 62%。

参考文献:

- [1] Yang T,Zhang H,Mu H,et al. Diacylglycerols from butterfat:production by glycerolysis and short-path distillation and analysis of physical properties[J]. *J Am Oil Chem Soc*,2004,81:979-987.
- [2] Lo S K,Cheong L Z,Arifin N,et al. Diacylglycerol and triacylglycerol as responses in a dual response surface -optimized for diacylglycerol production by lipase-catalyzed esterification in a pilot packed-bed enzyme reactor [J]. *J Agric Food Chem*, 2007,55:5595-5603.
- [3] LIU Ning,WANG Yong,ZHAO Qiang-zhong,et al. Fast synthesis of 1,3-DAG by Lecitase Ultra-catalyzed esterification in solvent-free system[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*,2011,113:973-979.
- [4] Ikeda I,Gu X P,Miyamoto I,et al. Preparation of 1,3-diacylglycerols and 1-alky-3-acylglycerols in the presence of quaternary ammonium salt[J]. *J Am Oil Chem Soc*,1989,66:822-824.
- [5] 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.
CHEN Fu-ming,SUN Deng-wen. The production and application of diglyceride[J]. *China Oils and Fats*,1997,22(5):49-51. (in Chinese)
- [6] 翟丹丹,张建法,蒋鹏举,等. 甘油二酯的制备、纯化及分析[J]. *河南化工*,2004,5:4-6.
ZHAI Dan-dan,ZHANG Jian-fa,JIANG Peng-ju,et al. Preparation,purification and analysis of diglyceride [J]. *China Oils and Fats*,2004,5:4-6. (in Chinese)