

# 液体脂肪酶催化制备甘油二酯油连续化工艺研究

王建芳<sup>1</sup>, 李 昕<sup>2</sup>, 张 蕊<sup>1</sup>

(1. 郑州福源动物药业有限公司, 郑州 450001; 2. 河南工业大学 化学化工学院, 郑州 450001)

**摘要:**旨在强化酶催化大豆油的甘油解反应为甘油二酯油的工业化生产提供技术支持,以大豆油和甘油为原料,液体脂肪酶为催化剂,利用微通道反应器制备甘油二酯油。通过单因素实验考察了液体脂肪酶用量、大豆油与甘油质量比、反应温度、反应时间对反应粗产物中甘油二酯质量分数的影响,设计中试放大实验考察工艺的稳定性,并采用分子蒸馏对中试粗产物进行纯化。结果表明:甘油二酯油制备的最佳工艺条件为液体脂肪酶(10 000 U/mL)用量3%(以大豆油质量计)、大豆油与甘油质量比10:1、反应温度50℃、反应时间9.0 s,在此条件下粗产物中甘油二酯的质量分数达44%;经中试实验放大后,粗产物中各组分(游离脂肪酸、单甘酯、甘油二酯和甘油三酯)的质量分数无明显变化,甘油二酯的质量分数为42%,反应可在微通道反应器中连续进行;经分子蒸馏纯化后,产物中甘油二酯的质量分数达到48%。综上,通过微通道反应器可以实现液体脂肪酶催化大豆油甘油解制备甘油二酯油的连续化生产,且该方法稳定性较好。

**关键词:**甘油二酯油;脂肪酶;微通道反应器;工艺优化

中图分类号:TS225.6;TS201.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)01-0043-05

## Continuous preparation process of diacylglycerol oil catalyzed by liquid lipase

WANG Jianfang<sup>1</sup>, LI Xin<sup>2</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>

(1. Zhengzhou Fuyuan Animal Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** In order to enhance the glycerolysis reaction of soybean oil catalyzed by enzyme, and provide technical support for the industrial production of diacylglycerol oil, diacylglycerol oil was prepared by microchannel reactor using soybean oil and glycerol as raw materials and liquid lipase as catalyst. The effects of dosage of liquid lipase, mass ratio of soybean oil to glycerol, reaction temperature and reaction time on the mass fraction of diacylglycerol in the crude product were investigated by single factor experiment. The stability of the process was studied by amplification experiment, and the amplification crude product was purified by molecular distillation. The results showed that the optimal conditions for the preparation of diacylglycerol oil were obtained as follows: dosage of liquid lipase (10 000 U/mL) 3% (on the basis of soybean oil mass), mass ratio of soybean oil to glycerol 10:1, reaction temperature 50℃ and reaction time 9.0 s. Under these conditions, the mass fraction of diacylglycerol in the crude product reached 44%. After amplification experiments, there was no significant change in the mass fraction of components (free fatty acid, monoacylglycerol, diacylglycerol, triacylglycerol) in the crude product, with the mass fraction of diacylglycerol 42%, and the reaction could proceed continuously in the microchannel reactor. After molecular distillation purification, the mass fraction of diacylglycerol reached 48%. In conclusion, the continuous preparation process of diacylglycerol oil catalyzed by liquid lipase can be realized by the microchannel reactor, and the method has good stability.

收稿日期:2023-05-27;修回日期:2024-07-30

基金项目:郑州市科技协同创新专项重点项目(21ZZXTCX02)

作者简介:王建芳(1978),男,研发员,研究方向为药物研发(E-mail)657867291@qq.com。

通信作者:张 蕊,研发员(E-mail)297223745@qq.com。

**Key words:** diacylglycerol oil; lipase; microchannel reactor; process optimization

甘油二酯 (Diacylglycerol, DAG) 是甘油三酯 (Triglycerides, TAG) 分子中一个脂肪酸被羟基取代的产物<sup>[1]</sup>, 天然存在于动植物油脂中, 是公认的食品安全成分<sup>[2]</sup>。根据脂肪酸在甘油分子碳骨架上的结合位置不同, DAG 分子有两种异构体, 即 1, 2-DAG 和 1, 3-DAG<sup>[3]</sup>, 其中 1, 3-DAG 被证实具有防止体质量增长、抑制脂肪在体内过多累积<sup>[6-8]</sup>、调节血脂水平、缓解糖尿病及其并发症等功能<sup>[4-8]</sup>。但天然来源的食用油中 DAG 含量较低<sup>[9]</sup>, 不能很好地发挥上述功能。

脂肪酶可以催化甘油三酯的水解、甘油解和转酯化等反应<sup>[10]</sup>, 其催化天然油脂的水解或甘油解制备 DAG 是现代工业常用的方法。Kahveci 等<sup>[11]</sup>以菜籽油和甘油为原料, 用 Novozym 435 脂肪酶催化反应, 所得产物中 DAG 含量为 40% ~ 50%。孙晓雪等<sup>[12]</sup>研究了在无溶剂条件下用 Lipozyme CALB 脂肪酶催化亚麻籽油和甘油合成 DAG, 结果表明, 在甘油与亚麻籽油物质的量比 20:1、反应时间 10 h、反应温度 80 °C、加酶量 2.0% 的条件下, 合成产物中 DAG 质量分数可达到 47.13%, 分子蒸馏后 DAG 质量分数达到 57.18%。在脂肪酶催化甘油解制备 DAG 的反应中, 由于甘油黏度大、亲水性强且与油脂互不相溶, 脂肪酶难以在甘油/水-油脂界面上实现快速传质, 导致反应效率低。另外, 催化剂成本高。因此, 如何降低催化剂的成本和提高反应效率是工业化合成 DAG 的关键。

微通道反应器是近十年发展起来的高效连续流反应器<sup>[13]</sup>。在微通道内, 流体以数微米厚的薄层相互接触, 具有混合速率快、传质传热效率高、停留时间短、响应快、反应速率高的特点, 可有效抑制副反应, 提高转化率和目的产物的选择性<sup>[14]</sup>。通过微混合器和管道反应器的组合, 微通道反应器能极大提高油水介质的传质速率, 同时具有占地面积小、无放大效应等优点<sup>[14]</sup>。目前, 微通道反应技术在油脂化工生产中已获得成功的应用。Santana 等<sup>[15]</sup>以葵花籽油和乙醇为原料, 氢氧化钠为催化剂, 采用 PDMS 微通道反应器生产生物柴油, 室温下、反应时间 1 min 内可实现 95.8% 的原料转化率, 而在间歇反应釜内, 反应时间 180 min 才能实现 94.1% 的原料转化率。张健<sup>[16]</sup>设计并构建了一台连续式微通道反应器用于油酸甲酯环氧化反应, 该反应以油酸甲酯、双氧水为原料, 甲酸为催化剂, 采用错流剪切和

对流碰撞两种方式实现了液液两相的高效混合, 在催化剂用量 4%, 反应温度 70 °C, 碳碳双键、甲酸与双氧水的物质的量比 1:9:9, 停留时间 17 min 条件下, 油酸甲酯环氧化率达 81.62%。然而, 目前利用微通道反应器进行酶法制备 DAG 的研究鲜有报道。

本研究以大豆油、甘油为原料, 国产液体脂肪酶为催化剂, 通过微流体反应制备 DAG, 对反应条件进行了优化, 以期对 DAG 的工业化生产提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

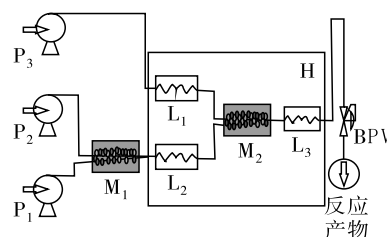
一级大豆油, 益海嘉里食品有限公司; 液体脂肪酶 (E. C 3. 1. 1. 3, 假丝酵母生产, 酶活力 100 000 U/g), 青岛蔚蓝生物技术公司; 甘油单油酸酯 (纯度 99%), 甘油二油酸酯 (纯度 99%), 上海 Merck 公司; 甘油, 分析纯, 天津市天力化学试剂有限公司; 正己烷、叔丁基甲醚, 均为色谱纯。

CPMM-R300-SS 微混合器; Waters2695 高效液相色谱仪、Waters2695 蒸发光检测器, 沃特世科技 (上海) 有限公司; 分子蒸馏仪, 美国 Pope 科学公司; 星层式微混合器, 参数为通量 12 ~ 150 L/h, 混合通道尺寸 50 μm, 停留时间 24 ~ 840 ms, 内部体积 2.8 mL, 设计流量 60 kg/h, 配备高压柱塞泵 (压力 50 MPa, 流量 1 ~ 195 L/h), 连续运行时间 50 h。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DAG 油的制备及纯化

DAG 油制备实验装置如图 1 所示。



注: P<sub>1</sub>. 大豆油进料泵; P<sub>2</sub>. 液体脂肪酶进料泵; P<sub>3</sub>. 甘油进料泵; M<sub>1</sub>. 酶-油微混合器; M<sub>2</sub>. 反应微混合器; L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>. 预热管; L<sub>3</sub>. 延时管; BPV. 背压阀; H. 恒温浴槽

Note: P<sub>1</sub>. Soybean oil feed pump; P<sub>2</sub>. Liquid lipase feed pump; P<sub>3</sub>. Glycerol feed pump; M<sub>1</sub>. Lipase-oil micromixer; M<sub>2</sub>. Reaction micromixer; L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>. Preheating pipe; L<sub>3</sub>. Delay tube; BPV. Back pressure valve; H. Constant temperature bath

图 1 DAG 油制备实验装置

Fig. 1 Experimental device for preparing DAG oil

DAG 油的制备: 如图 1 所示, 将一定流速的大

豆油、液体脂肪酶分别经进料泵  $P_1$ 、 $P_2$  进入酶-油微混合器  $M_1$  进行预混合,然后进入预热管  $L_2$  预热至一定温度,与来自  $P_3$  经  $L_1$  预热至一定温度的甘油在反应微混合器  $M_2$  中混合,进入延时管  $L_3$  中反应一定时间后进入背压阀 BPV,在恒定压力下流出,得到粗产物 DAG 油。

DAG 油的纯化:DAG 油经过滤后,利用分子蒸馏除去其中残留的甘油、游离脂肪酸(FFA)和单甘酯(MAG),收集重相得到纯化后的 DAG 油。分子蒸馏条件:蒸发面温度  $180\text{ }^\circ\text{C}$ ,进料速度  $10\text{ mL/min}$ ,蒸馏压力  $1\text{ Pa}$ ,冷凝面温度  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ,刮膜电机转速  $250\text{ r/min}$ 。

### 1.2.2 产物的组成分析

取  $20\text{ }\mu\text{L}$  样品,加入  $1\text{ mL}$  正己烷-叔丁基甲醚(体积比 15:1)溶解混匀,高速离心后取上清进高效液相色谱(HPLC)分析。

HPLC 条件:配备 Waters2695 蒸发光检测器的 Waters2424 系统;Kromat UNiversil CN 色谱柱( $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ );柱温  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ;流动相为正己烷-叔丁基甲醚(体积比 15:1);流速  $1.0\text{ mL/min}$ ;进样量  $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

利用标准品保留时间进行定性,产物中 FFA 和甘油酯的质量分数按式(1)计算。

$$X_i = \frac{A_i}{A_1 + A_2 + A_3 + A_4} \times 100 \quad (1)$$

式中: $X_i$  为第  $i$  组分的质量分数,%; $A_i$  为第  $i$  组分的峰面积; $A_1$  为 FFA 的峰面积; $A_2$  为 MAG 峰面积; $A_3$  为 DAG 的峰面积; $A_4$  为 TAG 的峰面积。

## 2 结果与讨论

### 2.1 液体脂肪酶活力的确定

脂肪酶为水溶性蛋白质,在油脂体系中不溶,可产生细小的颗粒,CPMM-R300-SS 微混合器通道直径为  $300\text{ }\mu\text{m}$ ,市售液体脂肪酶( $100\text{ }000\text{ U/mL}$ )和大豆油在微混合器中产生的固体颗粒可造成微混合器通道堵塞,而将液体脂肪酶用水稀释 10 倍时,产生的固体颗粒较少,不影响微混合器的运行,此时液体脂肪酶的活力为  $10\text{ }000\text{ U/mL}$ 。故实验中采用的液体脂肪酶活力为  $10\text{ }000\text{ U/mL}$ 。

### 2.2 微通道反应器制备 DAG 油单因素实验

#### 2.2.1 脂肪酶用量对甘油解反应的影响

设定甘油进料速度为  $10\text{ g/min}$ ,大豆油进料速度为  $100\text{ g/min}$ ,反应温度为  $50\text{ }^\circ\text{C}$ ,延时管长度为  $12\text{ m}$ (反应时间为  $9\text{ s}$ ),当脂肪酶进料速度分别为  $1, 2, 3, 4, 5\text{ g/min}$  时,脂肪酶用量对大豆油甘油解反应的影响见图 2。

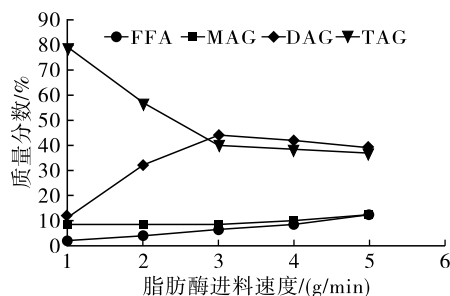


图 2 脂肪酶用量对反应粗产物中各组分质量分数的影响

Fig. 2 Influence of lipase dosage on mass fraction of components in crude product

由图 2 可知,随着脂肪酶用量的增加,粗产物中 FFA、MAG 的质量分数逐渐上升,TAG 的质量分数逐渐下降,而 DAG 的质量分数先升高后下降。当脂肪酶进料速度为  $3\text{ g/min}$  时,粗产物中 DAG 的质量分数最高,为  $44\%$ ,脂肪酶的进料速度继续增加,DAG 的质量分数降低,这是因为随着脂肪酶进料速度的增大,酶分子在微通道中被底物吸附饱和,未被吸附的酶分子与大豆油相遇时可能会凝结成颗粒,并随着进料速度增大聚集的颗粒物逐渐增大,进而影响物料的传质速率。因此,选择最佳脂肪酶进料速度为  $3\text{ g/min}$ ,此时脂肪酶用量为  $3\%$ (以大豆油质量计),反应器中酶分子的活力相当于  $300\text{ U/g}$ (以大豆油质量计)。

#### 2.2.2 底物质量比对甘油解反应的影响

设定脂肪酶进料速度为  $3\text{ g/min}$ ,大豆油进料速度为  $100\text{ g/min}$ ,反应温度为  $50\text{ }^\circ\text{C}$ ,延时管长度为  $12\text{ m}$ (反应时间  $9\text{ s}$ ),当甘油进料速度分别为  $2, 4, 6, 8, 10\text{ g/min}$  时,大豆油与甘油质量比对大豆油甘油解反应的影响见图 3。

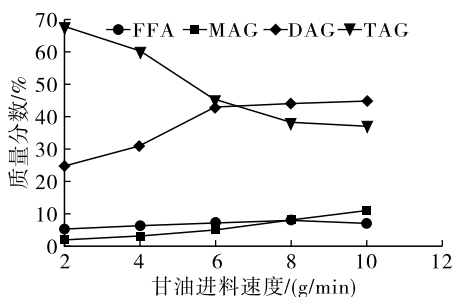


图 3 大豆油与甘油质量比对反应粗产物中各组分质量分数的影响

Fig. 3 Influence of mass ratio of soybean oil to glycerol on mass fraction of components in crude product

由图 3 可知,甘油进料速度的增加会促进反应向正反应方向进行。当甘油进料速度为  $10\text{ g/min}$  时,反应粗产物中 DAG 质量分数达到最大值

(44%),此时粗产物中TAG质量分数为38%,MAG质量分数为10%,FFA质量分数为6%,这是由于在甘油解反应中,首先是甘油分子与TAG在脂肪酶的作用下生成MAG和DAG,然后MAG和TAG反应生成2分子的DAG,适中的甘油浓度可产生较多的DAG。因此,选择最佳甘油进料速度为10 g/min,此时大豆油与甘油的质量比为10:1。

### 2.2.3 反应温度对甘油解反应的影响

设定脂肪酶进料速度为3 g/min,甘油进料速度为10 g/min,大豆油进料速度为100 g/min,延时管长度为12 m(反应时间9 s),当反应温度分别为30、40、50、60℃时,反应温度对大豆油甘油解反应的影响见图4。

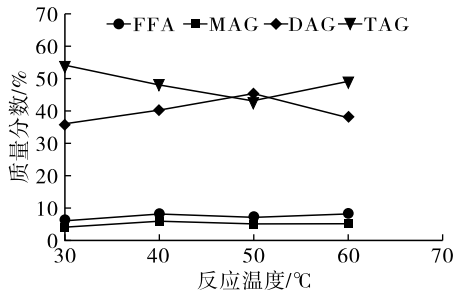


图4 反应温度对反应粗产物中各组分质量分数的影响

Fig. 4 Influence of reaction temperature on mass fraction of components in crude product

由图4可知,随着反应温度的升高,粗产物中TAG质量分数先降低后升高,FFA和MAG质量分数波动较小,DAG质量分数先升高后下降,其中50℃时DAG质量分数最高。这说明50℃是该脂肪酶的最适宜温度,超过50℃则可能导致部分酶分子失去活性,反应速度减慢。因此,选择反应温度为50℃。

### 2.2.4 反应时间对甘油解反应的影响

本实验中微反应器是由微混合器和延时管串联构成,微混合器主要起到使反应物料高效混合的作用,物料的反应主要在延时管中进行,改变延时管的长度,相当于改变反应时间(延时管为直径为6 mm的不锈钢管,每段长度为6 m,内部体积为7.5 mL,当物料流速为100 mL/min时,物料在延时管中的停留时间为4.5 s),因此通过改变延时管长度改变反应时间。设定脂肪酶进料速度为3 g/min,甘油进料速度为10 g/min,大豆油进料速度为100 g/min,反应温度为50℃。当延时管长度分别为0、6、12、18 m时,考察反应时间对大豆油甘油解反应的影响,结果见图5。

由图5可知,增加延时管长度有助于提高粗产

物中DAG质量分数,但延时管的长度超过12 m后,DAG质量分数增加缓慢,可能原因是此时反应已接近平衡,反应时间继续延长对DAG质量分数的影响减小。因此,选择最佳延时管长度为12 m,此时反应时间为9.0 s。而间歇法合成DAG反应时间大多在6~10 h<sup>[15]</sup>,可见微通道反应能极大地提高反应效率。

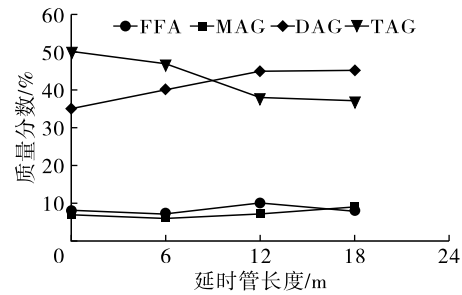


图5 反应时间对反应粗产物中各组分质量分数的影响

Fig. 5 Influence of reaction time on mass fraction of components in crude product

### 2.3 中试放大实验

为了考察液体脂肪酶催化大豆油甘油解法制备DAG油的连续化工艺的稳定性,选用星层式微混合器进行了10倍放大实验,运行条件:大豆油流速60 kg/h,脂肪酶(10 000 U/mL)流速1.8 kg/h,甘油流速6 kg/h,预热管为6 mm×10 m盘管,延时管为6 mm×60 m盘管,物料流经延时管时间约为60 s。该条件下连续运行10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 h时粗产物中各组分质量分数如图6所示。

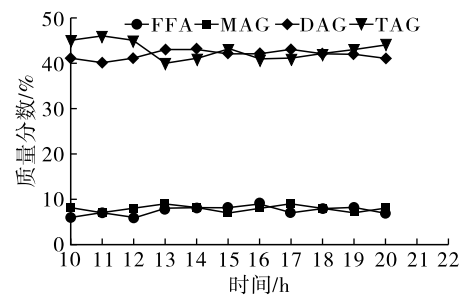


图6 放大实验粗产物中各组分质量分数的变化

Fig. 6 Changes in mass fraction of components in product of amplification experiment

由图6可以看出,中试放大实验各运行时间下粗产物中各组分的质量分数波动不大,粗产物中DAG质量分数最高为43%,最低为38%,平均值为42%。因此,微通道反应器性能比较稳定,无明显放大效应。此处中试反应时间(延时管长度)明显延长,这是因为微通道反应器分为实验型和生产型,鉴于市售商品型号限制,放大实验中选择的微混合器

型号和小试微混合器型号并不相同,设备参数差别大,故工艺参数做了相应的调整,优化后的结果差别不大,这是因为大豆油与甘油的反应是一个平衡反应,中试设备微观传质效率较小试设备差,故反应时间相对长,但达到平衡后,粗产物中 DAG 的质量分数接近。

将中试放大实验得到的粗产物进行分子蒸馏,纯化后产物中 DAG 的质量分数为 48%,MAG 的质量分数为 1.2%,FFA 的质量分数为 0.2%,TAG 的质量分数为 50.6%,产物符合中华人民共和国卫生部 2009(18)号公告关于新资源食品 DAG 油的质量标准(DAG 含量 $\geq$ 40%,TAG 含量 $\leq$ 58%,MAG 含量 $\leq$ 1.5%,FFA 含量 $\leq$ 0.5%)。

### 3 结 论

通过微通道反应器可实现液体脂肪酶催化大豆油甘油解反应制备 DAG 油的连续化生产,最佳工艺条件为液体脂肪酶(10 000 U/mL)用量 3%(脂肪酶进料速度 3 g/min)、大豆油与甘油质量比 10:1(大豆油进料速度 100 g/min、甘油进料速度 10 g/min)、反应温度 50℃、反应时间 9.0 s(延时管长度 12 m)。在最佳工艺条件下,粗产物中 DAG 的质量分数达到 44%。经中试实验放大后,粗产物中各组分的质量分数没有明显的改变,分子蒸馏纯化后产物中 DAG 的质量分数可达 48%。综上,以液体脂肪酶为催化剂,利用微通道反应制备 DAG 具有较好的稳定性,且反应效率高,所生产的 DAG 油符合中华人民共和国卫生部 2009(18)号公告关于新资源食品 DAG 油的质量标准,该方法具有良好的应用前景。

### 参考文献:

[1] LEE Y Y, TANG T K, PHUAH E T, et al. Production, safety, health effects and applications of diacylglycerol functional oil in food systems: A review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(15): 2509–2525.

[2] 邹冬芽, 孟祥河, 段作营, 等. 1,3-甘油二酯的功能性研究[J]. *中国油脂*, 2004, 29(2): 51–54.

[3] TADA N. Physiological actions of diacylglycerol outcome [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004, 7(2): 145–149.

[4] 程波, 王春明, 宋延玲, 等. 1,3-甘油二酯研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(8): 3891–3893.

[5] 李悦, 钟南京, 李洪广. 酶法制备甘油二酯的研究进展 [J]. *中国油脂*, 2022, 47(6): 77–84.

[6] 钟碧莹, 丁懿宁, 吴炳鑫, 等. 甘油二酯油对代谢综合征影响的研究进展 [J]. *中国油脂*, 2022, 47(10): 66–71.

[7] 王志宏, 孙静, 王惠君, 等. 中国居民膳食结构的变迁与营养干预策略发展 [J]. *营养学报*, 2019, 41(5): 427–432.

[8] XU T, LI X, ZHANG Z, et al. Effect of diacylglycerol on body weight: A meta-analysis [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2008, 17(3): 415–421.

[9] MATSUO N. Nutritional characteristics and health benefits of diacylglycerol in foods [J]. *Food Sci Technol Res*, 2004, 10(2): 103–110.

[10] 李晓如. 脂肪酶在油水界面的构型变化及催化机理应用 [D]. 太原: 山西大学, 2020.

[11] KAHVECI D, GUO Z, ÖZÇELİK B, et al. Lipase-catalyzed glycerolysis in ionic liquids directed towards diglyceride synthesis [J]. *Process Biochem*, 2009, 44(12): 1358–1365.

[12] 孙晓雪, 汪勇, 崔立明, 等. 酶法催化甘油解制备亚麻籽油甘油二酯及其氧化稳定性分析 [J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(6): 76–83.

[13] 路念明, 王欣. 推广微通道反应技术促进精细化工行业绿色安全发展 [J]. *精细与专用化学品*, 2020, 28(8): 1–3.

[14] 王晓晓. 瞬时纳米制备技术的连续化研究 [D]. 江苏扬州: 扬州大学, 2018.

[15] SANTANA H S, TORTOLA D S, SILVA J L, et al. Biodiesel synthesis in micromixer with static elements [J]. *Energy Convers Manag*, 2017, 141: 28–39.

[16] 张健. 微通道反应器中环氧脂肪酸甲酯的合成研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2016.