

溶剂对酶促大豆油甘油解反应制备单甘酯的影响

郭志超¹, 谢毅鹏¹, 石 剑², 周永生², 王车礼¹

(1. 常州大学 药学院, 江苏 常州 213164; 2. 常州大学 制药工程与生命科学学院, 江苏 常州 213164)

摘要:酶促法制备单甘酯具有绿色环保等优点,但其较低的传质速率限制了催化效率。基于此,探索了溶剂类型对酶促大豆油甘油解反应制备单甘酯的影响。结果发现,异丙醇可作为制备单甘酯的适宜溶剂。为深入研究溶剂比例对反应体系的影响,采用液液平衡三元恒温相图进行溶剂比例预测,得出最佳的溶剂比例(异丙醇体积与大豆油质量比)应低于4:1;通过实验测定,得到最佳溶剂比例为3:1,在此条件下于45℃反应10 h,单甘酯摩尔收率高达61.75%,Novozym®435酶比活力相对稳定,剩余酶活为反应前的70%左右。

关键词:单甘酯;溶剂;酶活;液-液平衡;相图

中图分类号:TQ423;TQ225

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)11-0068-05

Effect of solvent on preparation of monoglycerides by enzymatic glycerolysis of soybean oil

GUO Zhichao¹, XIE Yipeng¹, SHI Jian², ZHOU Yongsheng², WANG Cheli¹

(1. School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, China; 2. School of Pharmaceutical Engineering and Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, China)

Abstract: It is a green and environmental friendly way to synthesize monoglycerides by enzymes. However, the catalytic efficiency is significantly reduced by the low mass transfer rate. The effects of solvent type on the preparation of monoglycerides by enzymatic glycerolysis of soybean oil were studied. The results showed that isopropanol could be used as a suitable solvent for preparing monoglycerides. The solvent ratio was predicted by liquid-liquid equilibrium ternary constant temperature phase diagram, and it was found that the optimal solvent ratio should be lower than 4:1 (ratio of isopropanol volume to soybean oil mass). Through actual experiment, 3:1 was selected as the optimal solvent ratio. Under the optimal solvent ratio and reacting for 10 h at 45℃, the molar yield of monoglycerides was as high as 61.75%, the specific activity of Novozym®435 enzyme was relatively stable with the residual enzyme activity about 70% of that before the reaction.

Key words: monoglycerides; solvent; enzyme activity; liquid-liquid equilibrium; phase diagram

单脂肪酸甘油酯(Monoglyceride),简称单甘酯(MAG),具有一个亲油的长链烷基和两个亲水的羟基^[1-3],是一种重要的多元醇非离子型表面活性剂^[4],在食品^[5-6]、畜牧业^[7-8]以及塑料工业^[9]等方面都有着广泛的应用。

单甘酯的合成按照反应类型的不同可分为直接酯化法^[10]、水解法^[4]以及甘油解法^[11]等。其中,甘油解法无副产物生成,可完全反应,收率相对较高,被广泛用于单甘酯的合成。

在催化剂的选择上,目前工业上多采用无机化学催化剂高温下制备单甘酯,但所制备的产品质量较低,能源消耗大。相较于化学催化剂,酶催化具有反应高效、条件温和和可调控、绿色环保等优点。有多种脂肪酶可用于甘油解制备单甘酯,如Lipozyme TL IM^[12]、Novozym®435^[13]、猪胰脂肪酶^[14-15]等。其

收稿日期:2021-01-22;修回日期:2021-08-05

基金项目:江苏前瞻性联合研究项目(BY2012091)

作者简介:郭志超(1996),男,硕士研究生,研究方向为生物质绿色转化(E-mail)18253467486@163.com。

通信作者:王车礼,教授,博士(E-mail)clwang@cczu.edu.cn。

中,Novozym® 435 活性较高,且易于分离回收再利用,被广泛用于实验室研究中。

油脂甘油解为两相反应,溶剂的存在可增加底物分子碰撞概率,大幅提高传质效率。因此,可在溶剂存在的情况下以酶催化油脂甘油解制备高质量单甘酯^[16]。由于油脂和甘油为两相,如何选择合适的溶剂使油脂与甘油充分混合,提高反应效率,是当前亟待解决的问题。Wiphum 等^[17]以丙酮-异辛烷(体积比 3:1)作为溶剂制备单甘酯,单甘酯收率达 56%。叔丁醇/叔戊醇^[18]、叔戊醇^[19]作溶剂制备单甘酯亦有研究,但上述研究中所用溶剂均为过量,影响了酶催化效率。

基于此,且考虑到油脂和甘油的亲油亲水性相差较大,选择同时含有羟基和烃基短碳链饱和一元醇作为反应溶剂,以单甘酯收率和反应前后脂肪酶 Novozym® 435 活性变化作为衡量指标,系统研究溶剂碳链长短与结构对大豆油甘油解制备单甘酯反应的影响。同时,通过探究油相、甘油相和溶剂三组分液液平衡三元恒温相图预测刚好达到液-液平衡的溶剂比例,并以实际结果进行验证。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

大豆油,上海嘉里食品工业有限公司。甘油($\geq 99.5\%$),上海申博化工有限公司;无水甲醇、氢氧化钾,江苏强盛功能化学股份有限公司;无水乙醇、仲戊醇、叔戊醇、对硝基苯酚(p -NP),国药集团化学试剂有限公司;正丙醇、正丁醇、异丁醇、仲丁醇、正戊醇、对硝基苯酚棕榈酸酯(p -NPP)、异戊醇,上海麦克林生化科技有限公司;Na₂HPO₄·12H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O,均为分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司;正己烷、异丙醇,均为 HPLC 级,永华化学科技(江苏)有限公司;聚乙二醇辛基苯基醚(Triton® X-100),生化试剂级,阿拉丁试剂(上海)有限公司;Novozym® 435,诺维信(中国)生物技术有限公司。

1.1.2 仪器与设备

DHG-9070A 鼓风干燥箱,上海鳌珍仪器制造有限公司;BSM-120.4 分析天平,上海卓精电子科技有限公司;JB200-SH 数显恒温搅拌机,湖南力辰仪器科技有限公司;DW-2 数显调温电热器,南通长江光学仪器有限公司;Ex 1600 高效液相色谱仪,上海伍丰科学仪器有限公司;RI 201H 示差折光检测器,赛智科技有限公司;Intertsil® ODS-3 C₁₈ 色谱柱,上海月旭科技股份有限公司;DF-101S 恒温

加热磁力搅拌器,上海力辰邦西仪器科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆油的酶促甘油解反应制备单甘酯

按大豆油与甘油摩尔比 1:3 称取一定量大豆油、甘油溶于溶剂并置于密闭烧瓶中,于 45℃ 水浴下以 200 r/min 搅拌加热 30 min,待内温稳定后加入 2.0% 脂肪酶 Novozym® 435,反应 10 h 后,取样分析单甘酯摩尔收率和 Novozym® 435 剩余酶活。

1.2.2 单甘酯含量测定及摩尔收率的计算

采用高效液相色谱法测定单甘酯含量。将 1.2.1 所取样品过滤除去酶,蒸去溶剂后以流动相定容至 10 mL,进高效液相色谱仪测定单甘酯含量。高效液相色谱条件:Inertsil® ODS-3C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 260 mm, 5 μm)和示差折光检测器(RID);色谱柱温度 45℃,RID 温度 45℃;流动相为异丙醇和正己烷(体积比 97:3),流速 1.0 mL/min,等度洗脱;进样量 20 μL。

按式(1)计算单甘酯摩尔收率。

$$Y_{\text{MAG}} = \frac{C_{\text{MAG}} \times V \times M_{\text{TAG}}}{m \times M_{\text{MAG}} \times W_{\text{TAG}} \times 3} \times 100\% \quad (1)$$

式中: Y_{MAG} 为单甘酯摩尔收率; C_{MAG} 为单甘酯含量,mg/mL; V 为定容体积,mL; m 为样品质量,g; W_{TAG} 为样品对应初始时大豆油质量分数; M_{TAG} 、 M_{MAG} 分别为大豆油甘三酯和单甘酯的摩尔质量,mol/g。

1.2.3 Novozym® 435 酶比活力测定及剩余酶活的计算

1.2.3.1 标准曲线的绘制

分别配制不同浓度的 p -NP 溶液,以紫外可见光分光光度计测定其 275 nm 处吸光度。以(p -NP)浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,绘制脂肪酶比活力标准曲线,得到标准曲线方程为: $y = 7.00395x - 0.0271$,线性范围为 0.01 ~ 0.16 mmol/L, $R^2 = 0.9968$ 。

1.2.3.2 脂肪酶比活力测定及剩余酶活计算

称取一定量的脂肪酶于 10 mL 离心管中,加入 4 mL p -NPP 溶液(在酶的作用下转化为 p -NP),放入恒温摇床中(45℃)反应 5 min,加入 1 mL 三氯乙酸终止反应,以紫外可见光分光光度计测定 275 nm 处吸光度。根据脂肪酶比活力标准曲线计算 p -NP 浓度,按式(2)、(3)分别计算脂肪酶比活力(x)和剩余酶活(Y)。

$$x = \frac{c \times 0.005 \times 1000}{5m} \quad (2)$$

$$Y = \frac{x_2}{x_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中: c 为 p -NP浓度,mmol/L; m 为酶量,mg; x_2 为反应后脂肪酶比活力,IU/mg; x_1 为反应前脂肪酶比活力,IU/mg。

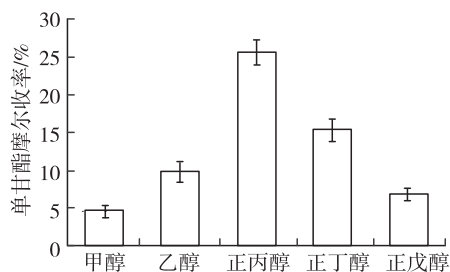
1.2.4 异丙醇-甘油-大豆油液液平衡三元相图的绘制

称取一定质量的大豆油和异丙醇于100 mL锥形瓶中,于45℃的恒温加热磁力搅拌器中预热10 min,向锥形瓶中逐滴滴加甘油,待澄清混合液出现浑浊时停止滴加,继续搅拌10 min,记录滴加的甘油的质量,绘制异丙醇-甘油-大豆油液液平衡三元恒温相图。

2 结果与讨论

2.1 不同反应溶剂对单甘酯摩尔收率和 Novozym® 435 剩余酶活的影响

按1.2.1方法,分别以甲醇、乙醇、正丙醇、正丁醇和正戊醇5种相同结构的直链烷基饱和一元醇为溶剂进行酶促大豆油的甘油解反应制备单甘酯,不同反应溶剂对单甘酯摩尔收率和 Novozym® 435 剩余酶活的影响分别见图1、图2。



注:溶剂比例5:1(溶剂体积与大豆油质量比)。下同

图1 直链烷基醇作溶剂对单甘酯摩尔收率的影响

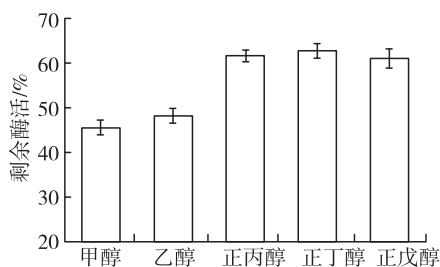


图2 直链烷基醇作溶剂对脂肪酶剩余酶活的影响

由图1可知,甲醇和乙醇作溶剂时单甘酯摩尔收率较低。这可能是因为甲醇和乙醇作为高极性(弱疏水性)的溶剂能吸附水分子,从酶分子上剥夺必要的水层,从而使脂肪酶不能发挥催化作用;也有可能是溶剂分子占据了酶分子中“结合水”的位置,酶催化部位多肽链构象发生改变,脂肪酶可逆性失活,无法发挥催化作用。正丙醇作溶剂时单甘酯摩尔收率高于正丁醇和正戊醇。这是因为正丁醇和正戊醇作为直链烷烃,其长链烷基表现为疏水,与底物

不能形成良好的均相,从而抑制了反应的进行。由图2可知,不同的有机溶剂对 Novozym® 435 酶活的影响不同,与反应前相比 Novozym® 435 酶活均有不同程度的下降,其中甲醇、乙醇作溶剂时,Novozym® 435 酶活降低更明显。

为考察支链对酶促大豆油甘油解反应的影响,按照1.2.1方法,分别以正丙醇、正丁醇、正戊醇及其同分异构体(见表1)为溶剂,进行甘油解反应,对比丙醇、丁醇和戊醇为溶剂时的单甘酯摩尔收率和 Novozym® 435 剩余酶活,结果如图3、图4所示。

表1 正丙醇、正丁醇、正戊醇及其同分异构体结构式

序号	一元醇	结构式	序号	一元醇	结构式
1	正丙醇	<chem>HO-CH2-CH2-CH3</chem>	6	正戊醇	<chem>HO-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3</chem>
2	异丙醇	<chem>HO-CH(CH3)-CH3</chem>	7	异戊醇	<chem>HO-CH2-CH2-CH(CH3)-CH3</chem>
3	正丁醇	<chem>HO-CH2-CH2-CH2-CH3</chem>	8	仲戊醇	<chem>HO-CH2-CH2-CH2-CH(OH)-CH3</chem>
4	异丁醇	<chem>HO-CH2-CH2-CH(CH3)-CH3</chem>	9	叔戊醇	<chem>HO-CH2-CH2-C(CH3)2-CH3</chem>
5	仲丁醇	<chem>HO-CH2-CH(OH)-CH2-CH3</chem>			

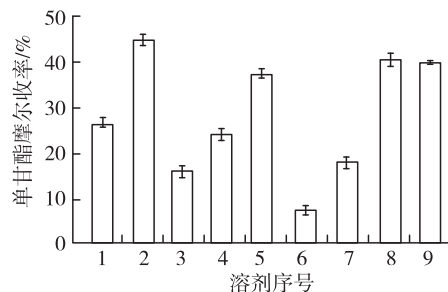


图3 支链烷基醇作溶剂对单甘酯摩尔收率的影响

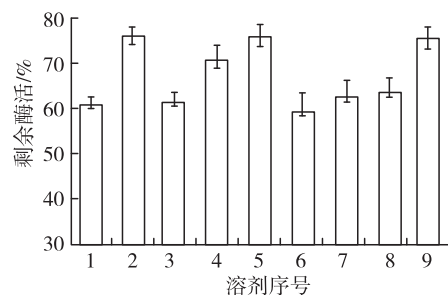


图4 支链烷基醇作溶剂对脂肪酶剩余酶活的影响

由图3和图4可知,异丙醇作溶剂时单甘酯摩尔收率最高,脂肪酶剩余酶活较高。这可能与异丙醇分子结构中羟基在2位碳上,左右各连有1个甲基,为左右对称结构有关。对比3种饱和一元醇的同分异构体发现,存在支链的溶剂收率明显高于直链溶剂,其可能原因有:①支链越多,其空间位阻越大,越不容易取代脂肪酶上的结合水,酶的剩余活性

越高;②支链空间位阻阻碍其与油脂副反应的发生。

综上,选择异丙醇作为酶促大豆油甘油解制备单甘酯的反应溶剂。

2.2 溶剂比例的液液平衡三元相图预测

为探究不同溶剂比例(异丙醇体积与大豆油质量比,下同)对反应体系催化效率的影响,在溶剂比例分别为1:1、2:1、3:1、4:1、5:1和6:1时,按照1.2.4方法记录三相溶液由澄清变浑浊所需的异丙醇、甘油和大豆油的质量分数(见表2),绘制异丙醇-甘油-大豆油液液平衡三元相图,并绘制液液平衡平衡曲线,结果见图5。液液平衡曲线上方为拟均相,下方为两相区域。

表2 不同溶剂比例的体系各物质质量分数

溶剂比例	甘油/%	异丙醇/%	大豆油/%
1:1	14.79	37.71	47.50
2:1	11.07	54.34	34.59
3:1	8.70	64.10	27.20
4:1	7.18	70.39	22.43
5:1	6.09	74.86	19.05
6:1	5.30	78.12	16.58

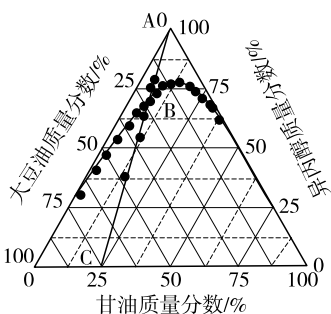


图5 不同溶剂比例在相图中的位置

由图5可知,当大豆油和甘油一定时,所对应相图点随溶剂增减在图5所示直线上移或下移。直线与液液平衡曲线相交于一点B。当溶剂比例所对应相图点处于平衡曲线下方即图中BC段时,无论如何改变溶剂比例,体系均为两相;反之,处于AB段体系均为拟均相。

如图5所示,溶剂比例为4:1时,该点刚好处于液液平衡曲线上,仅从底物相容性考虑4:1为加入溶剂的最佳比例,此时体系所需异丙醇量较少,传质阻力较小,所得单甘酯摩尔收率较高,对酶活影响较小。但产物单甘酯作为一种表面活性剂,可增加体系相容性;随着底物不断被消耗,体系更加趋向于均相,推动反应正向进行。因此,在实际反应中,溶剂的最佳比例应低于相图预测值。

2.3 溶剂比例对大豆油甘油解制备单甘酯的影响

按照1.2.1方法,以不同比例异丙醇作溶剂,进行大豆油甘油解反应制备单甘酯,测定不同溶剂比

例对单甘酯摩尔收率和Novozym®435剩余酶活的影响,结果分别见图6、图7。

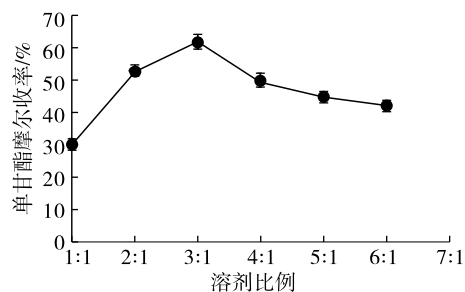


图6 溶剂比例对单甘酯摩尔收率的影响

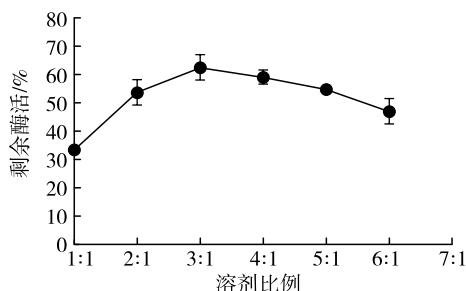


图7 溶剂比例对脂肪酶剩余酶活的影响

由图6可看出:溶剂比例为1:1时,单甘酯摩尔收率仅为30%左右,溶剂比例由1:1增加至2:1时单甘酯摩尔收率迅速增加,在溶剂比例为3:1时单甘酯摩尔收率达到最高,为61.75%;溶剂比例超过3:1时,随溶剂比例增加,单甘酯摩尔收率迅速下降。由图7可看出:溶剂比例为1:1~3:1时,随溶剂比例增加,Novozym®435剩余酶活随之增加;溶剂比例为3:1时,Novozym®435剩余酶活最高,为反应前的70%左右;溶剂比例超过3:1,Novozym®435剩余酶活基本呈直线下降,下降速度较快。因此,溶剂比例选择3:1。

3 结论

本研究考察了溶剂类型对酶促大豆油甘油解制备单甘酯反应的影响,结果发现,以饱和一元醇作反应溶剂,含有支链结构的溶剂参与反应时单甘酯摩尔收率明显高于直链结构,异丙醇作溶剂时单甘酯摩尔收率最高,Novozym®435剩余酶活也较高。以不同比例的异丙醇作为反应溶剂,研究发现,异丙醇体积为大豆油质量的3倍时单甘酯摩尔收率达到最高,为61.75%,脂肪酶活力相对稳定,剩余酶活为反应前的70%左右。

参考文献:

- [1] 顾怡,洪梅,周路,等. 酯化合成单甘酯的催化剂研究进展[J]. 化工时刊,2013,27(6):24-26.
- [2] 唐小磊,钱小青,吴鹏. 食品添加剂单甘酯的合成研究进展[J]. 化工管理,2018(17):15.

- [3] 贾文志,刘聪,胡一鸣,等.单甘酯合成方法的研究进展[J].湖北理工学院学报,2018,34(2):24-31.
- [4] 周路,洪梅,顾怡,等.单硬脂酸甘油酯的应用研究及其生产工艺现状[J].化工时刊,2013,27(5):44-49.
- [5] 彭立凤.脂肪酸单甘油酯的性能和酶法合成[J].粮油食品科技,2000,8(1):19-21.
- [6] CUI M N, MAO L, LU Y, et al. Effect of monoglyceride content on the solubility and chemical stability of β -carotene in organogels [J]. LWT - Food Sci Technol, 2019, 106:83-91.
- [7] 杨博,薛永强.月桂酸单甘酯在畜禽生产中应用的研究进展[J].饲料工业,2020,41(18):6-12.
- [8] 吴胜,彭艳.月桂酸单甘酯在畜禽生产中的应用效果及其机制的研究进展[J].饲料研究,2019,42(8):109-112.
- [9] 殷晶莉,杨占红.单甘酯的合成及在塑料工业中的应用[J].塑料助剂,2012(6):11-15.
- [10] HERMIDA L, ABDULLAH A Z, MOHAMED A R. Synthesis of monoglyceride through glycerol esterification with lauric acid over propyl sulfonic acid post-synthesis functionalized SBA-15 mesoporous catalyst [J]. Chem Eng J, 2011, 174(2/3):668-676.
- [11] 翟凤英,尹红娜,吕微.高纯度单甘油月桂酸酯的合成[J].河南科学,2013(9):1352-1354.
- [12] 胡隼,王鹏,王芳,等.脂肪酶催化大豆色拉油甘油解合成单甘酯[J].中国粮油学报,2007,22(3):80-84.
- [13] 朱启思,杨继国,曾凡逵,等.有机溶剂体系中酶法合成不饱和脂肪酸单甘酯[J].中国油脂,2010,35(4):37-40.
- [14] 徐怀德,唐菊,刘立芳.猪胰脂肪酶水解花椒籽油动力学及条件优化[J].食品科学,2010,31(15):55-59.
- [15] 曾哲灵,高道龙,龙俊敏,等.胰脂肪酶催化樟树籽仁和甘油合成中碳链单甘油酯[J].中国油脂,2012,37(1):23-28.
- [16] MONTEIRO J B, NASCIMENTO M G, NJNOW J L. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system [J]. Biotechnol Lett, 2003, 25(8):641-644.
- [17] WIPHUM K, ARAN H K. Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents [J]. Enzyme Microb Technol, 2004, 35(2/3):218-222.
- [18] YANG T K, REBSDORF M, ENGELRUD U, et al. Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(5):1475-1481.
- [19] DAMSTRUP M L, JENSEN T, SPARSØ F V, et al. Production of heat-sensitive monoacylglycerols by enzymatic glycerolysis in tert-pentanol: process optimization by response surface methodology [J]. J Am Oil Chem Soc, 2006, 83(1):27-33.

(上接第43页)

参考文献:

- [1] 王瑞元.中国菜籽油的生产和消费情况[J].中国油脂,2019,44(11):1-2.
- [2] 蒋黎艳,谭姣,肖新生.植物油中挥发性风味成分分析鉴定技术研究进展[J].中国粮油学报,2021,36(5):74-83.
- [3] 陈宜.顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术分析食用植物油的挥发性成分[J].福建轻纺,2019(4):24-32.
- [4] 孙亚娟,王进英,陈选,等.杏仁油挥发性成分指纹图谱的构建及掺伪定量检测方法研究[J].食品工业科技,2017(1):297-299.
- [5] 王茜茜,易起达,袁建,等.顶空-气质联用分析一级菜籽油储藏期间挥发性成分变化[J].食品科技,2013,38(1):187-190.
- [6] 孙卫华,马卉,李泉,等.顶空GC-MS法测定植物油中的6种挥发性苯系物[J].食品工业科技,2012(5):337-383.
- [7] 徐响,董捷,孙丽萍,等.油菜花粉油脂贮藏过程中挥发性成分变化研究[J].食品工业科技,2011(2):88-91.
- [8] 龙奇志,黄永辉,钟海雁,等.茶油挥发物质的固相微萃取条件的优化[J].中国粮油学报,2009,24(1):71-73.
- [9] 刘晓君,金青哲,王姗姗,等.HS-SPME-GC/MS分析花生油挥发性成分技术的优化[J].食品与生物技术学报,2010,29(4):501-504.
- [10] 田怀香,王璋,许时婴.顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法分离鉴定金华火腿的挥发性风味物质[J].色谱,2006,24(2):177-180.
- [11] 刘晓君,金青哲,刘元法,等.花生油挥发性风味成分的鉴定[J].中国油脂,2008,33(8):40-42.
- [12] 王怡娟,娄永江,陈梨柯.养殖美国红鱼鱼肉中挥发性成分的研究[J].水产科学,2009,28(6):303-307.
- [13] 李培武.甘蓝型油菜叶片与种子硫苷及其相关性研究[D].武汉:华中农业大学,2006.
- [14] 张谦益,包李林,熊巍林,等.不同产地浓香菜籽油中特征风味物质的研究[J].中国油脂,2018,43(8):23-28.
- [15] 杨湄,刘昌盛,周琦,等.加工工艺对菜籽油主要挥发性风味成分的影响[J].中国油料作物学报,2010,32(4):551-557.