

工艺与设备

全酶法制备甘油二酯工艺放大研究

杨继国¹, 杨博², 王永华¹, 宁正祥¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510641;

2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510641)

摘要:通过对酶催化部分水解反应和酶催化酯化反应的有效整合, 提出发展了全酶法制备甘油二酯的专利工艺。在前期实验室研究的基础上, 进行全酶法制备甘油二酯整套工艺的放大研究。多批次的小试、中试实验结果与实验室研究的结果比较相近, 采用游离酶催化油脂部分水解反应及采用填充床酶反应器的酯化反应还具有反应效率较高、工艺操作简单、反应重现性好、生产成本低廉等优点, 是制备中、高含量甘油二酯产品的适宜方法; 反应后的半成品经过分子蒸馏的分离、提纯及进一步的精制, 可以获得符合相关国家标准的甘油二酯产品。

关键词:甘油二酯; 脂肪酶; 工艺放大; 分子蒸馏**中图分类号:** Q814; TS22**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-4320(2008)11-0060-05**Scale-up study on production process of diacylglycerol by holoenzymatic process**YANG Ji-guo¹, YANG Bo², WANG Yong-hua¹, NING Zheng-xiang¹

(1. School of Light Industry and Food Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;

2. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: The Patented holoenzymatic process which combines the enzymatic controlled hydrolysis with enzymatic esterification is developed to produce diacylglycerol. The successive scale-up of diacylglycerol production using the holoenzymatic process from laboratory-scale (gram) to pilot-scale (kilogram) is carried out, based on the early research on this process. Similar results of laboratory studies are achieved when the process is scaled up, indicating that scale-up of the whole process is successful, and the liquid lipase-catalyzed partial hydrolysis and immobilized lipase-catalyzed esterification has the advantages of higher reaction efficiency, simpler process operation, excellent recurrence of reaction, lower operating costs, etc. The holoenzymatic process is a feasible method to synthesize a series of diacylglycerol product. Diacylglycerol product in accord with the relatively national standard is obtained after molecular distillation, purified and semi-finished product further refined.

Key words: diacylglycerol; lipase; scale-up; molecular distillation

甘油二酯(DAG)是甘油三酯中一个脂肪酸被羟基取代的结构脂质。近年来发现膳食甘油二酯具有减少内脏脂肪、抑制体重增加、降低血脂等重要生理功能^[1-4], 因而受到广泛关注。甘油二酯所特有的功能性、安全性和通用性, 使得人们在不改变现有饮食习惯的前提下达到预防和缓解肥胖症、高血压、高血脂等病疾的保健效果, 在日本及美国市场一经推出就受到消费者的追捧, 经过短短几年时间, 该产品就成为国际上最为畅销的健康食用油脂。在国内市场至今没有甘油二酯食用油的生产和销售。

甘油二酯生产方法有化学催化法和生物酶催化法, 其中生物酶催化法是最有应用前景的甘油二酯生产方法。酶法制备甘油二酯可以采用油脂的甘油

解反应^[5]、油脂的醇解反应^[6-7]、油脂的水解反应^[8]、脂肪酸的酯化反应^[9]等形式, 但是单一的采用某个工艺来进行甘油二酯的制备, 在生产效率、可操作性、经济性等方面都或多或少地存在问题, 不是甘油二酯工业化生产的适宜选择。

到目前为止, 关于甘油二酯生产的研究报道, 主要还是实验室克级的规模, 集中在探讨工艺路线的可行性和进行工艺条件的优化上, 还很少有后续的公斤级及吨级规模的放大实验的报道, 仅有的几例关于甘油二酯生产工艺放大的研究, 其规模也都未超过 20 kg^[5, 10-11]。世界上掌握甘油二酯大规模生产核心技术的是日本花王公司(KAO), 采用的是油脂深度水解加酶催化酯化的工艺, 可以获得高甘油

收稿日期: 2008-07-30

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(20506007)

作者简介: 杨继国(1977-), 男, 博士, 主要研究领域为酶工程、油脂工程, 020-87113842, 13560396620, yjgscut@263.net。

二酯含量的产品^[12]。

作者所在课题组在系统研究各种工艺的基础上,通过对酶催化的部分水解反应、酶催化的酯化反应及分子蒸馏分离技术有效地整合,建立了具有自主知识产权的全酶法生产 DAG 的新工艺^[13]。前期的研究已经证实了该工艺的可行性,在适宜的工艺条件下,可以得到多种甘油二酯含量的产品。本文利用前期研究的结果,进行全酶法制备甘油二酯新工艺的放大实验,具体包括:酶催化的部分水解反应和酯化反应的小试及中试实验、反应后样品的分子蒸馏分离实验(采用中型分子蒸馏设备)、分离后样品的精制等,以验证实验室研究的结果及解决放大过程中出现的新问题,最终获得符合相关国家标准的甘油二酯产品。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

Lipozyme 20000 L(液体酶)、Lipozyme[®] RM IM(固定化酶)均由丹麦 Novozymes 公司馈赠;菜籽油,市售,南海油脂有限公司;白土,安徽省休宁县化工总厂;甘油、异丙醇等试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

小试设备:FJ-200 型高速均质机,上海标本模型厂;分子蒸馏设备,广州汉维 MD-S80 型分子蒸馏设备;填充床酶反应器,玻璃管 $\Phi 25 \text{ mm} \times 350 \text{ mm}$,带上下封头和筛板,上海华美实验仪器厂。

中试设备:反应釜(100 L)带搅拌和夹套,可抽真空,该课题组设计与定做;中型分子蒸馏设备,三级蒸馏,华南理工大学化工学院自制;填充床酶反应器,不锈钢筒 $\Phi 100 \text{ mm} \times 500 \text{ mm}$,带上下封头和筛板,该课题组设计与定做;WSL-2 罗维朋比色计,上海精密科学仪器有限公司。

1.3 酶法催化油脂部分水解反应及产物的分子蒸馏分离

酶法催化油脂部分水解反应的总工艺流程见图 1。

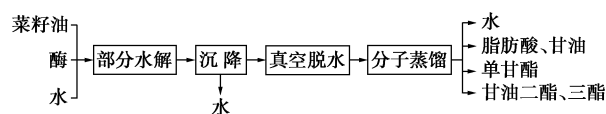


图 1 酶法部分水解反应工艺流程图

水解反应的小试操作流程:在 1 L 的三角瓶中加入 500 g 菜籽油后放入水浴锅中预热至 40℃,取出,加入已溶解好的含有 Lipozyme 20000 L 酶液的水

(加水量为油质量的 10%,加酶量为每克油 20 u),高速均质 2 min 后,置于水浴锅中保温,开启机械搅拌(300 r/min)开始反应,定时取样,离心后取上层油样分析酸度和其甘油酯组成。反应结束后,升温至 70℃,保温并静置,待油、水分层基本明显后,倾倒入上层油样,用油质量 5% 的热水水洗一次,在真空、90℃ 条件下脱除油样中残留的水分,油样再进行分子蒸馏分离。

中试操作流程:在 100 L 的反应釜中加入 50 kg 菜籽油,开启搅拌(200 r/min),夹套中通 40℃ 热水,将油加热至 40℃ 后加入已溶解好的含有 Lipozyme 20000 L 酶液的水(加水量为油质量的 10%,加酶量为每克油 20 u),开始反应,定时取样分析。反应结束后,升温至 70℃,保温并静置,待油水分层基本明显后,放出下层水相,再用油质量 5% 的热水水洗一次,在真空、90℃ 条件下脱除油样中残留的水分,油样进行分子蒸馏分离。

1.4 酶法催化酯化反应及产物的分子蒸馏分离

酯化反应总的工艺流程见图 2。

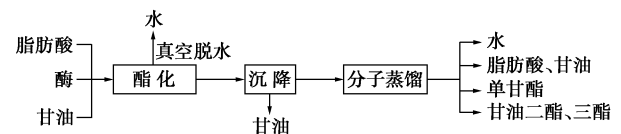
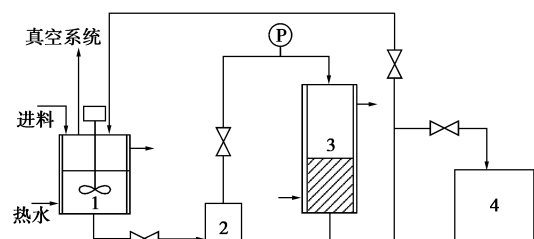


图 2 酯化反应工艺流程图

酯化反应的小试操作流程:将按一定比例配制好的反应底物(菜籽油水解反应产物经分子蒸馏所得的脂肪酸 500 g)高速均质后置于原料瓶中,20 g 固定化脂肪酶 Lipozyme[®] RM IM 装入反应柱(湿法装柱),密封反应柱上、下口,置于 60℃ 恒温水浴箱中,用蠕动泵控制不同的流速将反应底物泵入酶反应柱进行反应,反应后的产物进入产物瓶。反应进行一段时间、达到稳定后,在不同的时间取样进行高效液相色谱(HPLC)分析。

中试操作流程见图 3。



1—原料槽;2—计量泵;3—酶反应器;4—产物槽

图 3 酯化反应中试流程图

在较大规模的实验中,为了在降低所用酶的成

本的同时还保证酯化反应的效果,采用了底物多次循环操作方式的填充床酶反应器进行,以增加底物与酶接触反应的时间,这样可以降低填充床酶反应器中 Lipozyme[®] RM IM 的装填量(只相当于油质量的 2‰),同时原料槽抽真空以脱去底物经过酶柱发生反应所生成的水,促进酯化效率的提高。中试时具体参数为:原料槽中加入 50 kg 脂肪酸和一定量的甘油,酶反应器中装酶 100 g,酶柱保持温度 60℃。

1.5 半成品的精制

为提高成品的质量和食用安全性,需要对半成品进行精制,以去除微量金属离子、色素和其他杂质,并进一步降低游离脂肪酸含量,以提高产品的氧化稳定性。精制工艺流程见图 4。

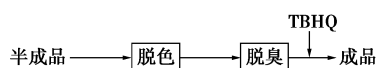


图 4 半成品精制工艺流程图

主要工艺指标^[14]:活性白土加量为油质量的 2%;在温度 100 ~ 105℃、真空度 5 kPa 的条件下脱色 20 ~ 30 min;脱臭条件为温度 220℃,真空度 200 ~ 300 Pa,时间 20 min;抗氧化剂 TBHQ 加量为每千克油 200 mg。

1.6 甘油酯组成的测定

甘油酯组成采用 HPLC 法测定,色谱系统采用 Waters 515 HPLC Pump 和 Waters 2410 示差折光检测器,色谱柱 Luna 5u Silica (2) 100A, 250 × 4.60 mm (phenomenex),测定条件为:流动相为正己烷/异丙醇(体积比为 50:1),流速 1.0 mL/min,柱箱温度 35℃,检测器温度 35℃;进样量 20 μL。样品经流动相 200 倍稀释并混合均匀,待 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 酶催化部分水解反应制备甘油二酯放大实验的结果

按 1.3 小节的步骤进行酶催化油脂部分水解的小试实验,采用液体脂肪酶 Lipozyme 20000 L 作为

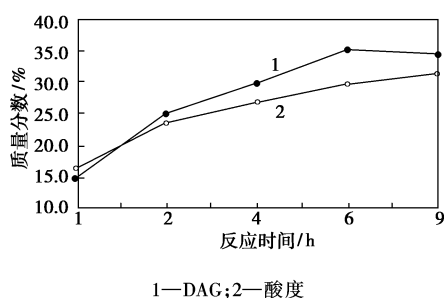


图 5 酶催化油脂部分水解的小试实验结果

催化剂,在不同反应时间取样测定油样的酸度和其甘油酯的组成,结果如图 5 所示。

由图 5 可知,规模放大以后的实验结果与摇瓶实验的结果基本吻合,在 6 h 反应体系油样酸度达到 29% ~ 30%,此时产物中甘油二酯的含量最高,达到 35%左右,再继续反应,产物中的酸度上升而甘油二酯的含量却在下降,所以在酶催化油脂部分水解制备甘油二酯的反应中,应控制一定的水解度,才能获得较高的甘油二酯产率。从前期的研究及小试的结果来看,应控制水解度达到油样酸度 28% ~ 30% 时停止反应。

在接下来的酶催化油脂部分水解的中试实验时,按 1.3 小节所述的步骤进行,每隔 1 h 取样分析,当反应时间为 7.5 h、油样酸度达到 29% 时停止反应,此时产物中的组成(质量分数)为:游离脂肪酸 29.3%,单甘酯 4.7%,甘油二酯 34.8%,甘油三酯 31.2%,与前期的实验结果比较吻合,只是反应时间有所延长,这可能是在中试的搅拌罐中的搅拌强度没有小实验的搅拌强度高,影响了反应体系的传质。总的来说,酶催化油脂部分水解制备甘油二酯的中试实验是成功的。

对在水解反应的中试实验中得到的油样进行了分子蒸馏的分离实验,采用的是中型的三级刮膜式分子蒸馏设备,具体的蒸馏条件为:一级分子蒸馏脱气(温度 100℃,真空度 500 Pa),二级分子蒸馏分离游离脂肪酸及少量甘油(温度 160℃,真空度 5 ~ 10 Pa),三级分子蒸馏分离单甘酯(温度 190℃,真空度 5 ~ 10 Pa),进料流速 10 kg/h,刮膜电机转速 250 r/min。在分子蒸馏系统稳定以后,收集三级蒸馏的重相,测定其甘油酯的组成(质量分数)为:游离脂肪酸 1.2%,单甘酯 0.8%,甘油二酯 52.4%,甘油三酯 45.8%。

由以上结果可知,控制合适的条件,油脂部分水解的产物经过分子蒸馏去除脂肪酸和单甘酯后,可得到质量分数 50% 以上的甘油二酯产品,即酶催化油脂的部分水解反应是比较适合用来制备中等含量的甘油二酯产品,而且从逐级放大的实验结果来看,该反应简单、设备要求低、操作容易、重现性良好,具有良好的工业应用前景。

2.2 酶催化酯化反应制备甘油二酯放大实验的结果

以在菜籽油部分水解产物分子蒸馏得到的脂肪酸为出发底物,按 1.4 小节所述的步骤进行酶催化的酯化反应,以固定化脂肪酶 Lipozyme[®] RM IM 为

催化剂,脂肪酸与甘油的摩尔比为1:1,以物料在填充床内的停留时间为基准进行放大,计算出在酯化反应小试的反应系统中,要得到前期小柱实验时较优的停留时间12 min,进料流速要达到3 mL/min,在此条件下进行反应,待系统稳定后,取样测定其甘油酯组成(质量分数),结果为:游离脂肪酸28.2%,单甘酯7.3%,甘油二酯59.7%,甘油三酯4.8%,此时的柱前压为0.13 MPa,与前期的实验结果相近,效果较好。在系统运行的5 d内,每隔8 h取样测定相关指标,在此期间,酶催化反应的效率缓慢下降,与前期相关实验的结果趋势一致。在系统运行5 d后所取样的甘油酯组成为:游离脂肪酸32.8%,单甘酯6.2%,甘油二酯55.3%,甘油三酯5.7%,此时的柱前压上升为0.16 MPa。实验结果表明,在此规模的填充床连续式酯化反应的放大是成功的,能够重现前期的实验结果。

在酯化反应的中试实验时,采用底物多次循环的方式,按1.4小节所述的流程进行。在反应过程中需控制一定的流速,使得柱前压不要超过0.2 MPa,因为对于填充床反应器来说,操作压力不能过大,否则填充的固定化酶颗粒将会越压越紧密,允许物料流过的速度会越来越低,一旦填充的酶层被压实以后,柱前压将快速上升,物料的通过速率将很低,为避免此情况出现,在开始反应时就要注意流速,控制好柱前压在一个合适的范围内,一般在0.2 MPa左右,对于本反应系统来说,合适的物料循环流速为1 L/min左右。在不同反应时间取样测定油样的酸度和其甘油酯的组成,结果如图6所示。

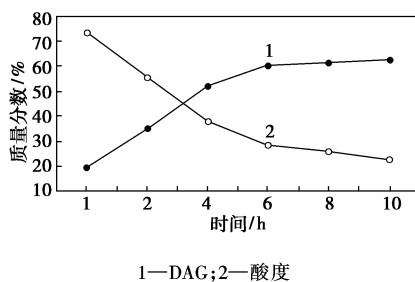


图6 底物多次循环的酯化反应制备甘油二酯中试实验结果

由图6可知,在所研究的条件下,酯化反应在6 h基本达到平衡,此时产物的游离脂肪酸含量为28.3%,甘油二酯含量为60.5%。再增加反应,酸度的下降及甘油二酯含量的上升幅度都较小,因此在底物多次循环的填充床酯化反应中,反应时间取6 h。

在一批酯化反应结束后,物料输送到产物储槽,底物储槽中再加入新的底物进行下一批反应。在此次酯化反应中试实验中,按以上步骤和条件一共进行了10批反应,每批反应6 h,对每批次反应油样分析的结果表明,酶催化反应的效率在缓慢下降,但幅度很小,第10批反应的油样的甘油酯组成:游离脂肪酸含量为31.6%,甘油二酯含量为56.1%;柱前压也在缓慢上升,需要降低流速来维持合适的柱前压,在第10批的反应中,流速需要调整到900 mL/min才能维持柱前压在0.2 MPa,这是为了达到一定的反应效果就需要适当地增加反应时间。总的来说,尽管操作较为复杂,但是在控制好一定条件的时候,采用填充床酶反应器进行酯化反应来制备甘油二酯产品是可行的,反应效率比较高,而且可以得到较高含量的甘油二酯产品,这是别的反应形式所不能及的。

对在酯化反应的中试实验中得到的油样进行了分子蒸馏的分离实验,所用设备及分子蒸馏的操作条件与水解反应产物的分子蒸馏分离条件相同。在分子蒸馏系统稳定以后,收集三级蒸馏的重相,测定其甘油酯的组成(质量分数)为:游离脂肪酸0.8%,单甘酯0.6%,甘油二酯90.7%,甘油三酯7.9%。

2.3 分子蒸馏半成品的精制

经过水解反应或酯化反应,并经过分子蒸馏分离后所得到甘油二酯半成品,为提高产品的稳定性和安全性,还需进一步精制,以除去残留的金属离子等杂质及进一步较低油样中FFA的含量。按1.5小节所述的方法对实验所得水解反应和酯化反应的样品进行进一步的精制,结果如表1所示。由表1可知,经过精制后,样品的一些指标都有较大的改观,产品符合国家的相关产品标准要求,具备了作为产品投放市场和推广的基本条件。

表1 精制前后样品相关指标的变化

样品	外观	色泽 (133.3 mm槽)		甘油酯组成/%			
		红	黄	FFA	MAG	DAG	TAG
水解反应样品							
精制前	混浊	5.1	26	1.20	0.8	52.4	45.8
精制后	澄清、透明	2.2	20	0.06	0.2	52.8	47.0
酯化反应样品							
精制前	混浊	5.8	28	0.80	0.6	90.7	7.9
精制后	澄清、透明	2.6	21	0.09	0.2	91.5	8.2

3 结语

多批次的小试、中试的逐级放大实验结果表明,采用游离酶催化油脂部分水解反应及采用填充床酶反应器的酯化反应具有反应效率较高、工艺操作较为简单、反应重现性好等优点,是制备中高含量的甘油二酯产品的适宜方法;分子蒸馏实验及精制实验结果表明,经过这两步的处理,可以有效地进行甘油二酯半成品的分离、提纯,获得合格的甘油二酯产品。

按整个工艺流程进行的放大实验结果表明,以生物酶催化技术为核心的整套甘油二酯制备工艺是切实可行的,可以得到满足相关国家标准的多种甘油二酯含量的产品,满足了不同市场的需求,而且由于采用了廉价的水解工艺,且水解反应的副产物又作为酯化反应的底物来合成更高甘油二酯含量的产品,基本实现了底物的全利用,所以采用此套工艺得到的甘油二酯产品的生产成本较低,利润空间较大。此外,此套工艺还具有环保性能好、工艺操作简单等优点。总之,该项目组提出并发展的全酶法制备甘油二酯的新工艺,已经初步具备了大规模工业化生产的条件,可以以较低的成本获得具备上市条件的系列甘油二酯产品,具有重要应用价值和推广前景。

参考文献

- [1] Takase H. Metabolism of diacylglycerol in humans[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2007, 16(1): 398 - 403.
- [2] Matsuo N, Tokimutsu I. Metabolic characteristics of diacylglycerol[J]. *Inform*, 2001, 12(11): 1098 - 1102.
- [3] Taguchia H, Omachia T, Nagaoa T, *et al*. Dietary diacylglycerol suppresses high fat diet-induced hepatic fat accumulation and microsomal triacylglycerol transfer protein activity in rats[J]. *The journal of nutrition biochemistry*, 2002, 13(6): 678 - 683.
- [4] Maki K C, Davidson M H, Ysushima R, *et al*. Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil[J]. *AM J Clin Nutr*, 2002, 76(6): 1230 - 1236.
- [5] Kristensen J B, Xu X, Mu H. Process optimisation using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalysed glycerolysis[J]. *Agric Food Chem*, 2005, 53(18): 7059 - 7066.
- [6] Watanabe T, Sugiura M, Sato M. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor[J]. *Process Biochem*, 2005, 40(2): 637 - 643.
- [7] Lo S K, Baharin B S, Tan C P, *et al*. Enzymecatalyzed production and chemical composition of diacylglycerols from corn oil deodorizer distillate[J]. *Food Biotechnol*, 2004, 18: 265 - 278.
- [8] 杨博, 杨继国, 王永华. 一种甘油二酯油脂的生产方法: 中国, 200310112327. X[P]. 2003 - 11 - 25.
- [9] 李铎, 张治国, 李华. 甘油二酯食用油的生产方法: 中国, 200610049242. 5[P]. 2006 - 01 - 24.
- [10] Cheong Ling-Zhi, Tan Chin-Ping, Long Kamariah, *et al*. Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology[J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(4): 1614 - 1622.
- [11] Lo Seong-Koon, Cheong Ling-Zhi, Arifin Norlelawati, *et al*. Diacylglycerol and triacylglycerol as responses in a dual response surface-optimized process for diacylglycerol production by lipase-catalyzed esterification in a pilot packed-bed enzyme reactor[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(14): 5595 - 5603.
- [12] 山田泰司, 清水雅美, 杉浦将胜, 等. 用于生产甘油二酯的方法: 中国, 1267322[P]. 1998 - 05 - 21.
- [13] 杨博, 杨继国, 王永华, 等. 全酶法生产甘油二酯的方法: 中国, 1884564A[P]. 2006 - 05 - 31.
- [14] Hui Y H. 贝雷油脂化学与工艺学[M]. 秦洪万, 译. 4版. 北京: 中国轻工业出版社, 1991. ■

欢迎登陆现代化工网站

现代化工网站是由中国化工信息中心《现代化工》编辑部主办的,目前开通近 10 年,已成为编辑部 and 外界联系的重要纽带和科技信息发布的窗口。为了丰富内容,为浏览者提供更多有价值的信息,编辑部已对网站进行了全新改版。改版后的《现代化工》网站不但可以提供电子版期刊内容,同时增设了“焦点论坛”、“专家介绍”、“企业推介”、“跨国公司动态”、“科技动态”、“行业信息”、“新技术新产品推介”、“会展信息”、“产品展示”等全开放栏目。欢迎登陆《现代化工》网站 <http://www.xdhg.com.cn>。