

摘 要

α -亚麻酸在人体内具有多种重要生理作用，是一种人体必需脂肪酸。目前，生产 α -亚麻酸等多价不饱和脂肪酸工艺中大多以鱼油和藻类为原料，通过强酸、强碱催化水解后，以常规有机溶剂为介质对产品进行分离提纯。存在的主要问题有：原料来源单一；强酸、强碱催化剂无选择性，且容易破坏多价不饱和脂肪酸结构；甲醇等常规有机溶剂残留降低了产品质量。

亚麻是我国北方广泛种植的作物之一。亚麻油所含各种脂肪酸中 α -亚麻酸含量高达 46%；生物酶催化和超临界二氧化碳流体技术分别以其不同于常规酸碱催化剂和常规有机溶剂的特性而日益受到研究人员重视，成为近年来蓬勃发展的“绿色化学”新技术。

本文以亚麻油为原料开发 α -亚麻酸产品；以两种不同脂肪酶代替常规酸碱催化剂，研究了亚麻油水解、醇解反应；以高压二氧化碳为反应介质代替各种常用有机溶剂；通过超临界流体萃取技术与其他分离技术，如精馏、化学吸附等结合分离提纯产物，进行 α -亚麻酸类产品的开发研究。解决了常规方法中存在的问题。所得主要结果如下：

(1) 常压无溶剂体系中酶催化亚麻油水解反应研究表明：两种脂肪酶的催化活性温度范围、最佳催化活性温度和完全失活温度均存在较大差异。L-lipase 催化亚麻油水解反应的温度明显低于 N-lipase，因此 L-lipase 更适合于常压无溶剂体系中酶催化亚麻油水解反应。

(2) 高压二氧化碳介质中酶催化亚麻油水解反应结果表明：在相应的最佳实验条件下，N-lipase 具有较高的催化活性和较宽的催化活性温度范围，因此 N-lipase 更适合于高压二氧化碳介质中酶催化亚麻油水解反应。与无溶剂体系中的最大催化活性温度（35℃）相比，超临界二氧化碳中 L-lipase 的最大催化活性温度为 37℃；而 N-lipase 在超临界二氧化碳介质中的最大催化活性温度为 50℃，比其在无溶剂体系中的最大催化活性温度（67.5℃）降低 17.5℃。N-lipase 的失活机理可能与水热条件下酶分子分解有关。

(3) 酶催化亚麻油醇解反应制备脂肪酸乙酯工艺研究表明：反应物摩尔比（乙醇：亚麻油）为 3:1 时醇解反应转化率最高。比例低于此值，甘油三酯转化不完全；比例过高，乙醇可能与脂肪酶催化活性位发生络合而抑止酶的催化活性；两种脂肪酶在催化亚麻油醇解反应时，均优先生成碳链较短的饱和脂肪酸乙酯。

(4) 脂肪酸乙酯分离工艺研究表明：尿素包合法的主要优势在于可将醇解反应产物按照饱和脂肪酸乙酯和不饱和脂肪酸乙酯分离；超临界萃取结合精馏柱精馏法可较好地将产物从醇解反应所得的混合物体系中分离，但很难分离诸如亚油酸乙酯和 α -亚麻酸乙酯等碳链长度相等但双键数目不同的脂肪酸类化合物；超临界萃取结合银离子络合吸附法可将醇解反应产物按碳链长度及不饱和度分离，实验中收集得到的以 α -亚麻酸乙酯为主要成分样品中， α -亚麻酸乙酯含量均在 93% 以上。

关键词：酶催化，超临界二氧化碳， α -亚麻酸，水解反应，醇解反应，分离，

亚麻油

Lipase-Catalyzed Hydrolysis, Alcoholysis of Linseed Oil and Separation of Products

Wang Yingxiong (Physical Chemistry)

Directed by Prof. J.G. Wang and Prof. X.L. Hou

Abstract

Alpha-linolenic acid is physiologically important in the human body. At present, it is prepared through hydrolysis of fish oil and algae, which were catalyzed by strong acid or alkali, followed by separation and purification of the product in organic solvent. Main problems concerned with current process includes limit of raw material; poor selectivity of catalysis destruct the functional group of polyunsaturated fatty acid. Remains of organic solvent such as methanol in the product.

Flax is a familiar plant in the north China, and there is about 46% of alpha-linolenic acid in the fatty acid composition of linseed oil. Enzyme-catalysis and supercritical carbon dioxide extraction nowadays have acted as new techniques in the field of "green chemistry". In this work two kinds of lipase as the substitute of conventional catalysis were employed in the hydrolysis and alcoholysis of linseed oil, and the supercritical carbon dioxide as the substitute of conventional organic solvent. The results showed that:

(1) The study of lipase-catalyzed hydrolysis of linseed oil in the solvent-free medium indicated that the temperature range of activation and deactivation of two lipases employed were different. The temperature for catalyzed-hydrolysis by L-lipase is lower than that by N-lipase. As a result, L-lipase is more suitable for the hydrolysis of linseed oil in the solvent-free medium.

(2) The study of lipase-catalyzed hydrolysis of linseed oil in the high-pressure carbon dioxide medium indicated that for the optimized reaction condition of hydrolysis, N-lipase possess the higher catalysis activity and wider activity temperature range than the L-lipase. As a result, N-lipase is more suitable to the hydrolysis of linseed oil in the high-pressure carbon dioxide medium. Interestingly, the optimized temperature of L-lipase in the supercritical carbon dioxide is 37 °C, which is 2 °C higher than the corresponding

temperature in the solvent-free medium. And the optimized activity temperature of N-lipase in the supercritical carbon dioxide is 50 °C, which is 17.5 °C lower than the corresponding temperature in the solvent-free medium. The deactivation mechanism may be related to hydrolysis decomposition of N-lipase.

(3) The study on the preparation of ethyl alpha-linolenate by lipase-catalyzed alcoholysis of linseed oil indicated that the optimized linseed oil/ethanol molar ratio is 1:3. If the concentration of ethanol below this value, conversion of triglyceride is inadequate. When excess ethanol was added, part of the activity of lipase lost due to the formation of complex between ethanol and activity site of catalysis. Furthermore, the Lipase-catalyzed alcoholysis release preferably the short-chained saturated fatty acid ester.

(4) The study on separation of fatty acid ethyl esters indicated that urea adduction could separate the mixture of fatty acid ethyl esters into two groups, i.e. the saturated fatty acid ethyl esters and unsaturated fatty acid ethyl esters. Combination of supercritical carbon dioxide extraction with rectification can separate fatty acid ethyl ester from the alcoholysis product mixture. But the efficiency of separation is poor when dealing with the fatty acid ethyl ester such as ethyl linolenate and ethyl alpha-linolenate with the same carbon number and different double bond. Supercritical carbon dioxide extraction combined with chemical adsorption by silver nitrate supported on Al₂O₃ column can separate the fatty acid ethyl esters efficiently. The ethyl alpha-linolenate with purity of above 93% is achieved with this method.

Keywords: Enzyme-catalyzed; Supercritical carbon dioxide; α -linolenic acid; Hydrolysis; Alcoholysis; Separation; linseed oil

目 录

1.1	文摘	1
1.2	英文文摘	2
1.3	第一章文献综述及选题	3
1.3.1	1.1 引言	4
1.3.2	1.2 生物酶催化反应	5
1.3.2.1	1.2.1 酶及其结构特点	6
1.3.2.2	1.2.2 酶催化特点及机理	7
1.3.2.3	1.2.3 影响酶催化反应的因素	8
1.3.3	1.3 超临界二氧化碳的特点	9
1.3.3.1	1.3.1 超临界流体	10
1.3.3.2	1.3.2 超临界二氧化碳的特点	11
1.3.4	1.4 超临界二氧化碳中的酶催化反应	12
1.3.4.1	1.4.1 超临界二氧化碳作为酶催化反应介质的优势	13
1.3.4.2	1.4.2 影响超临界二氧化碳介质中酶催化反应的因素	14
1.3.4.3	1.4.3 超临界二氧化碳中酶催化反应实例	15
1.3.4.4	1.4.4 超临界二氧化碳作为酶催化反应介质存在的问题	16
1.3.4.5	1.4.5 超临界二氧化碳流体中酶催化反应展望	17
1.3.5	1.5 脂肪酸及其衍生物的分离提纯	18
1.3.5.1	1.5.1 单一分离技术	19
1.3.5.2	1.5.2 组合分离技术	20
1.3.6	1.6 选题意义和研究内容	21
1.3.6.1	1.6.1 选题目的和意义	22
1.3.6.2	1.6.2 本文研究内容	23
1.4	参考文献	24
2.1	第二章常压无溶剂体系中酶催化亚麻油水解反应研究	25
2.1.1	2.1 引言	26
2.1.2	2.2 原料、试剂与实验设备	27
2.1.3	2.3 实验装置图	28

第一章 文献综述及选题

1.1 引言

α -亚麻酸，学名 Z, Z, Z-9, 12, 15-十八碳三烯酸 (cis-9, 12, 15-octadecatrienoic acid, 或 α -linolenic acid, 缩写为 ALA)，为全顺式非共轭 N-3 系列多价不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, 缩写为 PUFA)。 α -亚麻酸的分子式为 $C_{18}H_{30}O_2$ ，分子结构如图 1.1 所示。室温下为无色油状液体，具有一般油脂类物质的特性，易溶于醚、氯仿、丙酮、醇等有机溶剂。由于其不饱和度较高，因此易与氢或卤素发生加成反应，在空气中不稳定，高温下易氧化；另外，碱性条件下可发生双键位置及构型的异构化反应，形成共轭多烯酸。

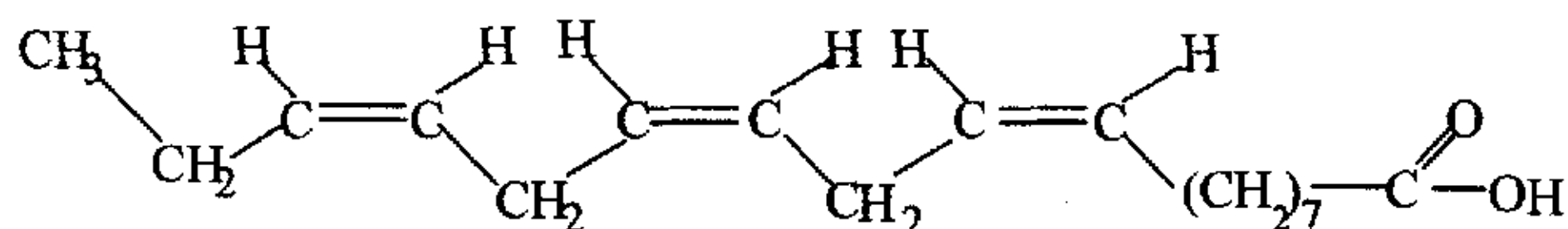


图1.1 α -亚麻酸分子结构

Figure 1.1 Configuration of α -linolenic acid molecular

人体内， α -亚麻酸具有多种重要生理作用^[1-6]，因此，联合国粮农组织早在 1987 年就将其列为人类食物的必需成分^[4]。但 α -亚麻酸不能由人体自身产生，必须从外界食物中摄取，属人体必需脂肪酸 (Essential Fatty Acids, 缩写为 EFA)。

在自然界中， α -亚麻酸广泛存在于各种油料作物所含的油脂中。其中以紫苏籽油、亚麻籽油中含量较为丰富，分别为 64 % 和 48 % 左右。虽然上述油脂中 α -亚麻酸含量较高，但在紫苏油、亚麻油中 α -亚麻酸等各种天然的脂肪酸与甘油以酯基结合为甘油三酯 (TG)，导致其在分解为自由脂肪酸 (FFA) 之前很难被人体吸收。

欲使人体比较容易地吸收利用 α -亚麻酸类产品，需要采取如下措施：首先，将富含该类脂肪酸的植物油脂通过水解反应或醇解反应，转化为分子量较小的脂肪酸或脂肪酸乙酯类化合物；之后，通过化工分离提纯技术提高 α -亚麻酸类产品的纯度，避免了其与 N-6 系列脂肪酸在人体内的竞争性反应。

目前，分离 α -亚麻酸的方法按其脂肪酸产品的化学型式可分为：甘油三酯的直接分离，或转化为亚麻酸或其一元醇酯后分离。前者的机理在于：天然油脂是各种甘

第一章 文献综述及选题

1.1 引言

α -亚麻酸, 学名 Z, Z, Z-9, 12, 15-十八碳三烯酸 (cis-9, 12, 15-octadecatrienoic acid, 或 α -linolenic acid, 缩写为 ALA), 为全顺式非共轭 N-3 系列多价不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, 缩写为 PUFA)。 α -亚麻酸的分子式为 $C_{18}H_{30}O_2$, 分子结构如图 1.1 所示。室温下为无色油状液体, 具有一般油脂类物质的特性, 易溶于醚、氯仿、丙酮、醇等有机溶剂。由于其不饱和度较高, 因此易与氢或卤素发生加成反应, 在空气中不稳定, 高温下易氧化; 另外, 碱性条件下可发生双键位置及构型的异构化反应, 形成共轭多烯酸。

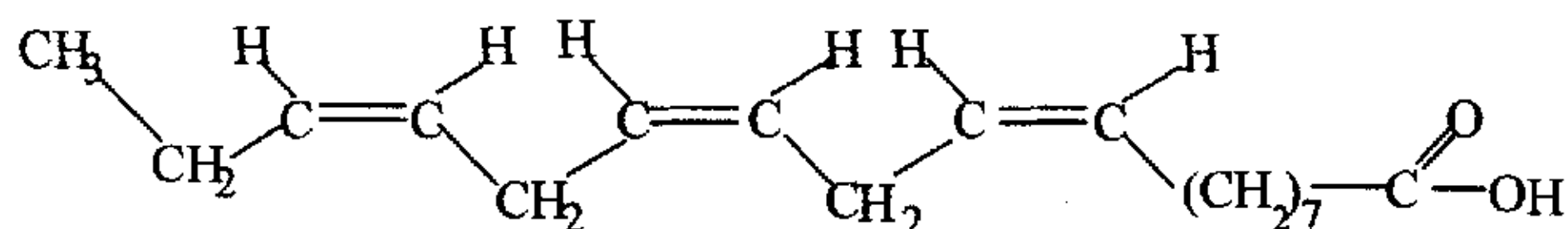


图1.1 α -亚麻酸分子结构

Figure 1.1 Configuration of α -linolenic acid molecular

人体内, α -亚麻酸具有多种重要生理作用^[1-6], 因此, 联合国粮农组织早在 1987 年就将其列为人类食物的必需成分^[4]。但 α -亚麻酸不能由人体自身产生, 必须从外界食物中摄取, 属人体必需脂肪酸 (Essential Fatty Acids, 缩写为 EFA)。

在自然界中, α -亚麻酸广泛存在于各种油料作物所含的油脂中。其中以紫苏籽油、亚麻籽油中含量较为丰富, 分别为 64 % 和 48 % 左右。虽然上述油脂中 α -亚麻酸含量较高, 但在紫苏油、亚麻油中 α -亚麻酸等各种天然的脂肪酸与甘油以酯基结合为甘油三酯 (TG), 导致其在分解为自由脂肪酸 (FFA) 之前很难被人体吸收。

欲使人体比较容易地吸收利用 α -亚麻酸类产品, 需要采取如下措施: 首先, 将富含该类脂肪酸的植物油脂通过水解反应或醇解反应, 转化为分子量较小的脂肪酸或脂肪酸乙酯类化合物; 之后, 通过化工分离提纯技术提高 α -亚麻酸类产品的纯度, 避免了其与 N-6 系列脂肪酸在人体内的竞争性反应。

目前, 分离 α -亚麻酸的方法按其脂肪酸产品的化学型式可分为: 甘油三酯的直接分离, 或转化为亚麻酸或其一元醇酯后分离。前者的机理在于: 天然油脂是各种甘

油三酯的混合物，混合物中的不同甘油三酯分子，其 α -亚麻酸基的构成比例会有所不同。将 α -亚麻酸基构成比例较高的甘油三酯成分分离富集，可得到富含 α -亚麻酸的油脂产品。目前，该类方法多为由油料压榨、过滤、精制后得到较高含量 α -亚麻酸的甘油三酯型。但就人体对 α -亚麻酸的吸收状况而言，游离酸型最佳，乙酯型次之，甘油三酯型最差。因此，人们希望将脂肪酸从甘油三酯中解离并转化为小分子酯类化合物，然后采用适当方法富集，得到高纯度 α -亚麻酸产品。目前比较常见的方法有两种：一为转化为脂肪酸一元醇酯，即将富含 α -亚麻酸的甘油三酯中的脂肪酸转化为脂肪酸甲酯或乙酯，然后再采用适当的方法进行浓缩；另一种是将甘油三酯水解为混合脂肪酸，然后再采用特定的分离手段将 α -亚麻酸从混合酸中分离出来。夏宗建^[7]等利用 NaOH 溶液将亚麻油皂化切断酰基后用硫酸酸化，得到各种脂肪酸的混合物，之后在甲醇溶液中通过尿素包合，实现了不同脂肪酸的分离，从而得到较高纯度的 α -亚麻酸。但是，该过程存在强酸、强碱催化剂和有机溶剂残留问题，不符合“绿色化学”和环境保护的要求。

产物的分离提纯是制备 α -亚麻酸类产品关键步骤之一，因此成为很多研究人员追求的目标。常用的分离提纯方法主要包括^[8]：低温结晶法、尿素包合法、超临界流体萃取精馏法、分子蒸馏法、吸附分离法、脂肪酶浓缩法等。在分离提纯 α -亚麻酸产品时，上述方法均存在一定的弊端。

鉴于常规方法在制备、分离 α -亚麻酸类产品方面的局限性，本文希望通过以脂肪酶代替常规酸碱催化剂，进行亚麻油水解、醇解反应过程基础研究；以超临界二氧化碳或近临界二氧化碳为反应介质代替各种常用有机溶剂；另外，通过超临界流体技术与其他分离技术，如精馏、化学吸附等的结合分离提纯产物，实现 α -亚麻酸类产品的开发研究，以期达到“绿色化学”的要求。

1.2 生物酶催化反应

1.2.1 酶及其结构特点^[9~10]

常见生物酶的种类很多，按照所催化的反应类型可以将酶分为：氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶等。但从本质上讲以上各种生物酶都是具有催化功能的蛋白质。人们利用酶的历史较长，但直到近代生物化学诞生之后人们才真正认识到“酶”这种

物质的存在。1930年，酶是一种“蛋白质催化剂”的概念被确立。

作为一种蛋白质，酶具有一般蛋白质共有的物理、化学性质。如分子有复杂的多级构象：一级结构，分子中氨基酸残基的排列顺序，不同的酶分子内有不同的氨基酸排列顺序；二级结构，分子的局部空间排列，主要指侧链形成的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角等二级结构；三级结构，整个分子或亚基的空间排列；四级结构，亚基的相互作用。有了二级和三级结构(通常称之为高级结构)之后，生物酶才具有催化活性。

1.2.2 酶催化特点及机理

酶具有一般催化剂的共性，如少量存在即可大大加快反应速度；能使反应迅速达平衡而不改变化学反应平衡点位置；反应前后本身无变化并可重复使用。但是，作为一类特殊的高效催化剂，酶催化还具有以下几个方面的特点。

催化效率高

酶催化的反应速率是相应无催化反应速率的 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍，且至少是非酶催化反应速率的 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。酶催化高效性的主要原因在于：其一，与普通催化剂相比，酶可更大程度地降低化学反应所需的活化能，使反应更易于进行。图 1.2 定性给出了酶催化剂、非酶催化剂及无催化剂条件下的反应活化能。

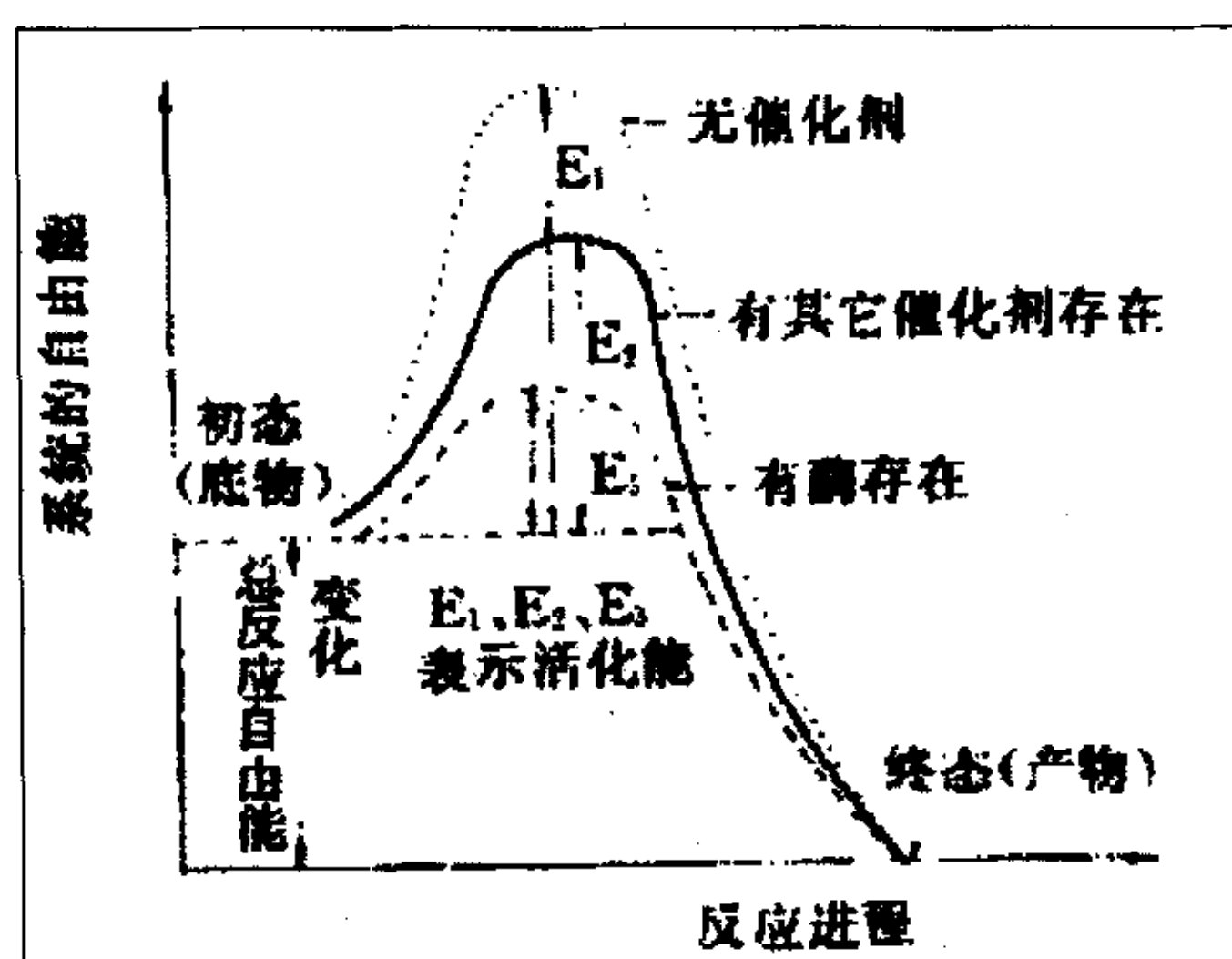


图 1.2 酶催化剂和常规催化剂降低反应活化能示意图

Figure 1.2 The schematic diagram of reduce activity energy by enzyme and ordinary catalyst

可以看出与其他两种情况相比，酶催化条件下反应具有最低的活化能。活化能的

降低极大地提高了反应速度；其二，酶催化是多种催化因素的协同作用，如酶与底物的邻近效应和定向效应、酶与底物相互诱导的扭曲变形和构象变化的催化效应等均可在一定程度上提高酶的催化活性。

专一性高

酶的专一性主要包括酶与底物结合的专一性和酶催化的专一性。酶是由数以百万计的氨基酸组成的活性大分子，但其分子结构中只有一小部分基团具有催化作用，被称为催化活性位。酶的催化活性位具有一定大小和几何形状，当底物的大小不当或几何形状不合适时，均不能与酶的活性部位结合，这是酶与底物的结合专一性；另外，酶催化活性位的基团和底物分子上的基团要有必要的相互作用力，通过这种作用力，酶才能和底物结合，这是酶对底物催化专一性。

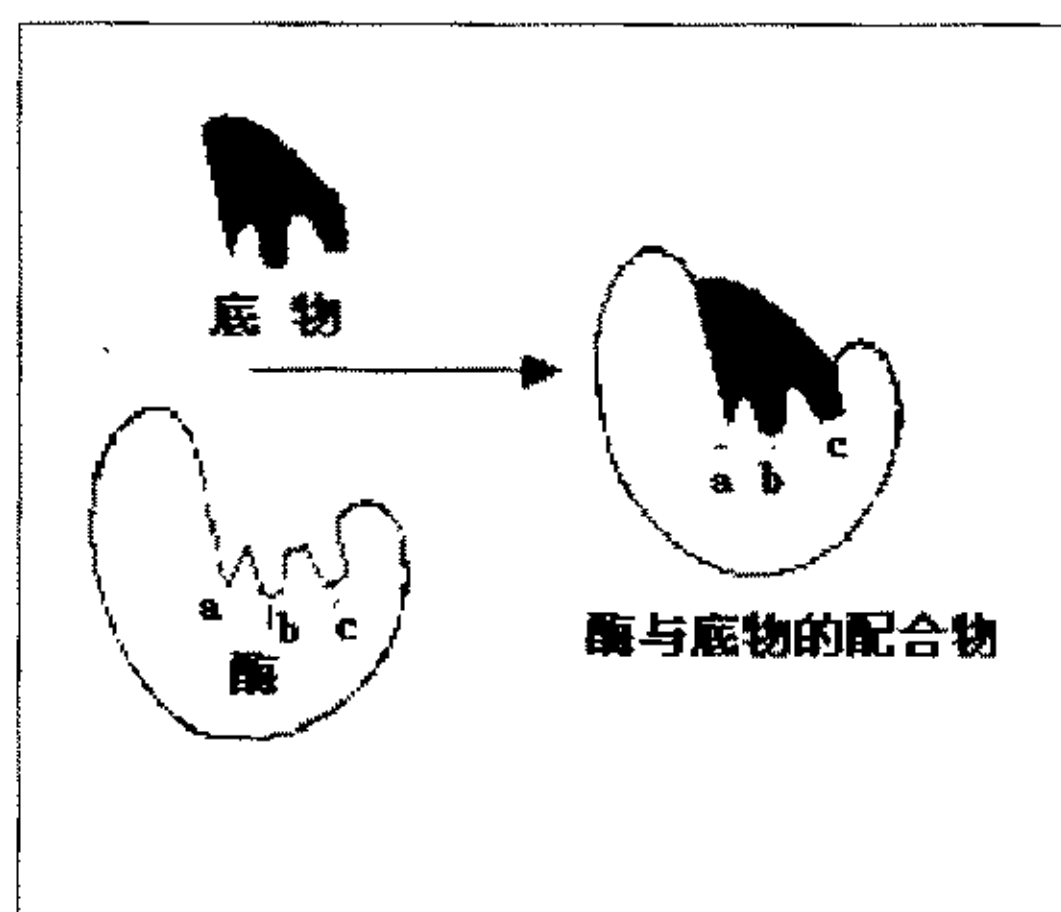


图 1.3 底物与酶的匙钥关系学说图

Figure 1.3 Profile of Lock and Key Theory
in the enzyme-catalyzed reaction

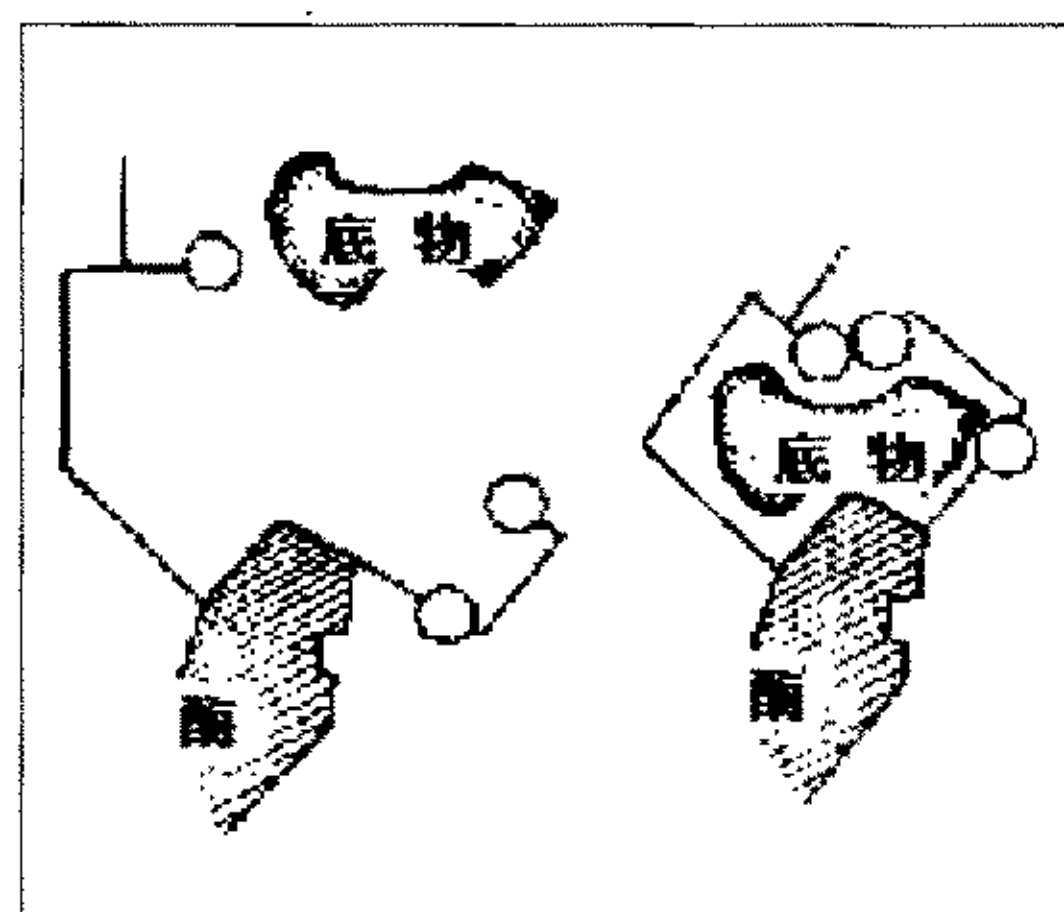


图 1.4 酶与底物的诱导契合学说图

Figure 1.4 Profile of Induced-fit Hypothesis
in the enzyme-catalyzed reaction

在解释酶对底物的专一性方面有两个较合理的假说：其一是刚性模板或匙钥学说 (Lock and Key Theory)，该理论认为底物分子与酶结合的非共价力在本质上与维持酶本身立体构象的力是相同的，主要包括范德华力、静电力、氢键等。通常酶分子中与底物的结合部位，即酶的活性位，是由其分子表面的凹槽或空穴组成的，其形状与底物分子形状互补。底物分子或其一部分像钥匙一样，立体专一地楔入到酶活性位，通过多个结合位点的结合，形成“酶—底物”复合物；同时，酶活性中心的催化基团正好可以和底物的有关活性键结合，迅速完成催化反应。但是，匙钥学说却无法解释为什么具有刚性结构的酶活性中心既能适合一个可逆反应的底物，又适合此反应的产物。

因此, 研究人员提出了解释酶对底物专一性的第二个假说, 即诱导契合假说(Induced-fit Hypothesis): 当酶分子与底物邻近时, 由于受底物的诱导作用, 其构象将发生有利于与底物结合的变化, 最终形成酶与底物的互补契合复合物, 完成催化反应。因此该理论可以很好地解释酶催化可逆反应。两种理论的直观说明如图 1.3 和 1.4 所示。

反应条件温和

酶催化反应无需高温、高压操作, 在温度低于 100 °C, 正常大气压, 中性 pH 环境下即可进行。与之相比, 一般化学催化反应或无催化剂反应往往要在较高的温度、压力下才能进行。

催化活性可调

许多酶的催化活性可受到多种调节机制的灵活调节, 这些调节机制包括: 抑制剂的调节、酶的共价修饰、酶合成与降解的调节、金属离子和其他小分子化合物的调节等。

热稳定性差

作为一种蛋白质, 高温下酶易于变性失活。因此, 大多数情况下, 酶的使用温度不超过 100 °C。

1.2.3 影响酶催化反应的因素^[1]

温度

温度是影响酶催化反应的重要因素之一, 其对酶催化反应的影响表现在以下两个方面: 一是对酶蛋白稳定性的影响; 二是对酶催化反应体系本身的影响。酶热变性失活的活化能为 50000~150000 cal/mol, 约是一般酶催化反应的活化能 (5000~15000 cal/mol) 的十倍。当温度低于 30 °C 时, 由于体系提供的能量远低于酶热变性失活的活化能, 因此酶的热失活作用很慢, 此时温度对酶催化反应无明显影响。但是由于酶的热失活作用温度系数远大于酶催化反应的温度系数, 因此随温度升高, 酶变性失活对反应的负面影响远大于温度升高本身对反应速度的促进作用。

以酶催化反应速度对温度作图可得到一条钟罩形曲线。反应速度在某一温度出现最大值, 通常称这个温度为酶催化反应的最适温度。另外, 酶在高温下失活往往和体

系中的水分子有关, Klibanov 给出了如图 1.5 的解释^[12]。

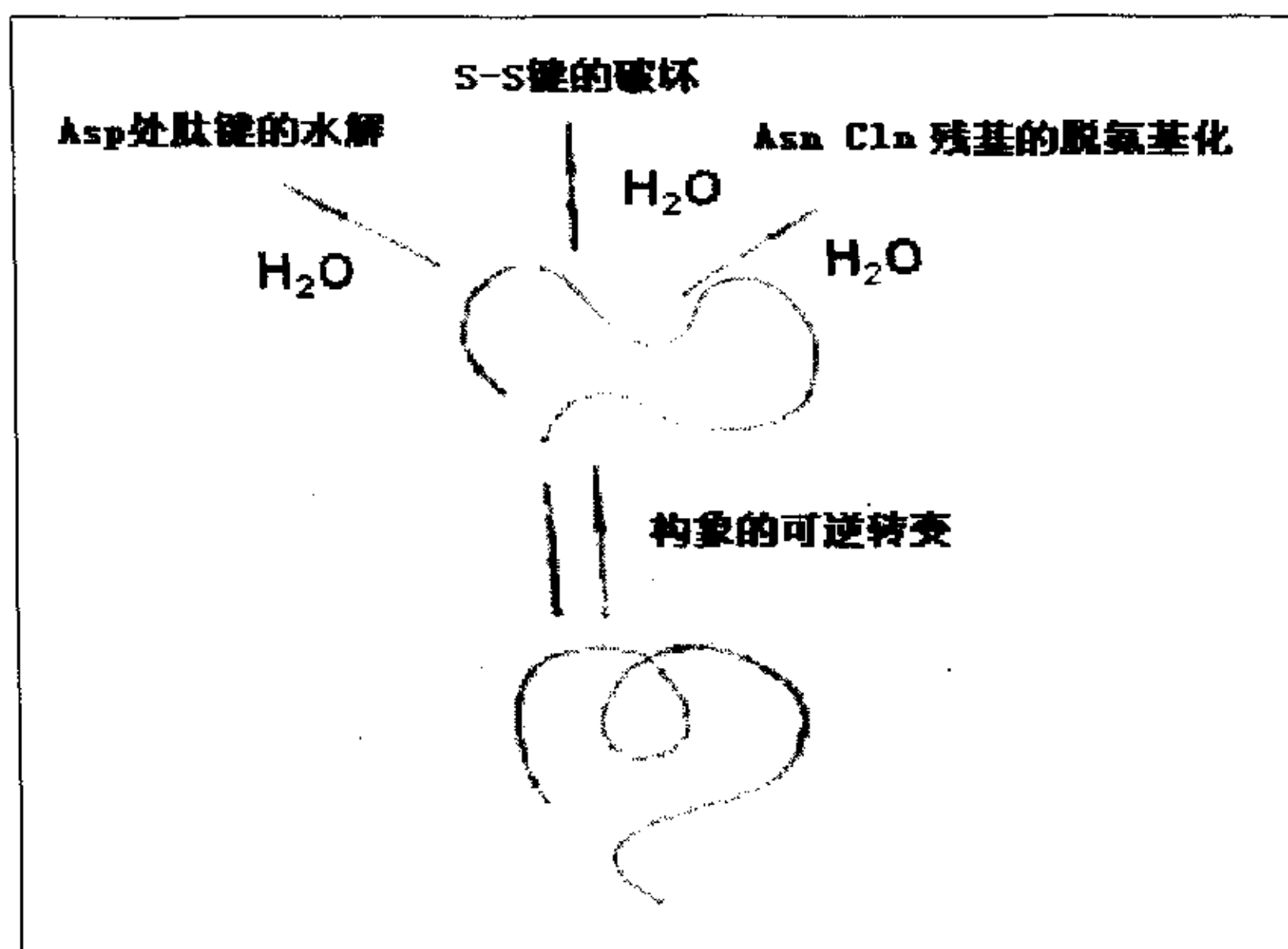


图 1.5 高温下酶的热失活机理

Figure 1.5 Mechanism of activity lost of enzyme at high temperature circumstance

酸碱度

由于酶分子结构的复杂性, 因此 pH 变化对酶催化反应的影响也较复杂。在酶分子结构中存在许多酸性、碱性氨基酸侧链基团, 上述基团随 pH 值的变化可处于不同的解离状态。侧链基团的不同解离状态可能直接影响酶与底物的结合; 也可能改变酶的空间结构, 从而影响酶的催化活性。研究表明, pH 值对酶活性的影响主要有以下几个主要方面:

- (1) 酸或碱可以破坏酶的空间结构, 导致酶可逆失活或不可逆失活;
- (2) 酸或碱影响酶活性部位结合基团的解离状态, 导致底物不能和它结合;
- (3) 酸或碱影响酶活性部位催化基团的解离状态, 导致底物不能分解为产物;
- (4) 酸或碱影响底物的解离状态, 导致其不能与酶结合或结合后不能转化为产物。

酶催化的最适 pH 值范围是上述几种因素共同作用的结果, 因此酶催化活性有一个最适 pH 值范围, 以酶活力对 pH 值作图, 也可得到一条钟罩形曲线。

水量

通常认为, 酶分子有“开启”和“紧锁”两种存在状态^[13]。当体系中仅含少量水

或没有水时，酶分子处于“紧锁”状态，酶的催化活性位被包裹在分子内部，不能与底物分子接触，此时酶不具有催化活性。当体系中的含水量增加到某一程度后，酶分子的结构便由“紧锁”状态转变为“开启”状态，酶具有了催化活性。但如果体系中含水量过高，酶分子的活性中心附近将聚积大量的水分子，使不溶或难溶于水的底物与酶催化活性位的接触几率变小，导致酶催化活性降低。图 1.6 是酶在有机溶剂中的催化活性和含水量关系，可用上述机理很好的解释。另外，研究表明，使酶的结构由“紧锁”状态转变为“开启”状态所需的最小含水量随酶的种类及反应条件而异^[14]。

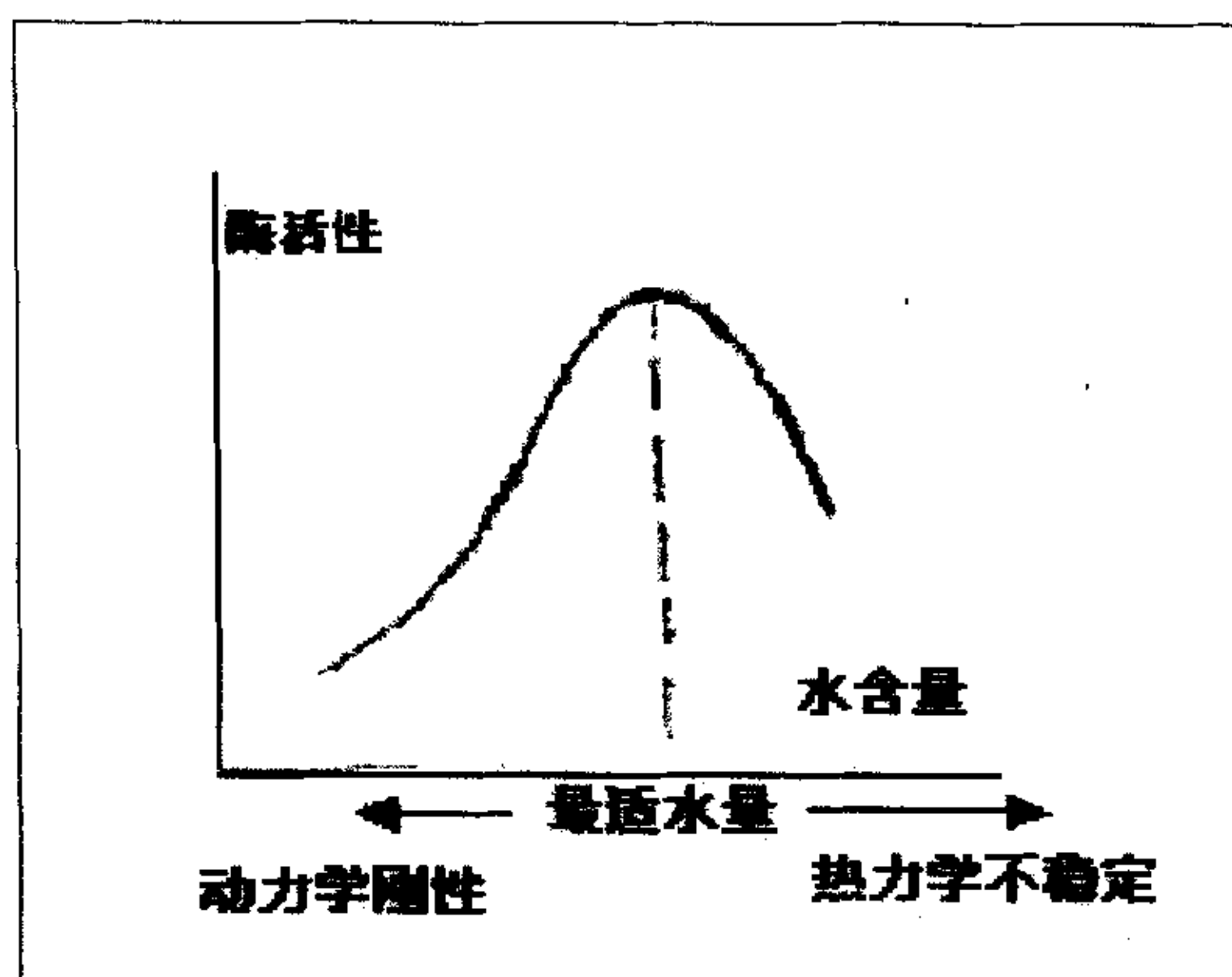


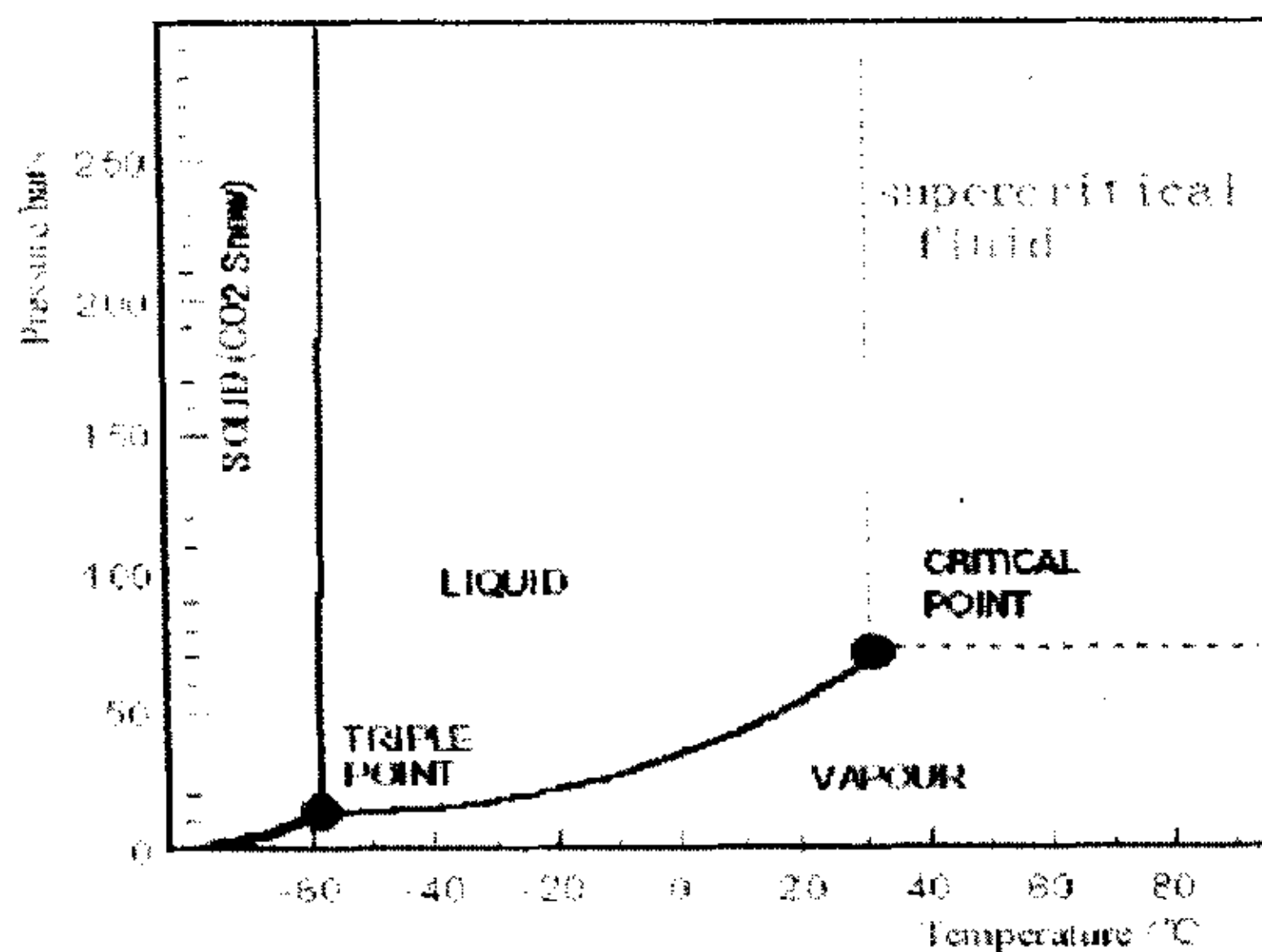
图 1.6 有机溶剂中酶活性和体系含水量的关系

Figure 1.6 The relationship between enzyme activity and the water content in organic solution

1.3 超临界二氧化碳的特点

1.3.1 超临界流体

当一种物质所处的温度和压力同时超过其临界温度 (T_c) 和临界压力 (P_c) 时，即为超临界流体^[15] (Supercritical Fluid, 缩写为 SCF)。图 1.7 是 CO_2 的相图，当温度超过 304.19 K 且压力高于 7.38 MPa 时，二氧化碳的气液界面消失，形成均一稳定相，即图 1.7 中所示的“Supercritical Fluid”部分。有关超临界流体的优良传质传热性能，文献中论述较多^[16-17]。表 1.1 是气体、液体和超临界流体的常规物理化学性质比较。可以看出，超临界流体兼具气体和液体的特性，如其密度与液体接近，而粘度和扩散系数则与气体相似。

图 1.7 CO₂ 的相图Figure 1.7 Phase diagram of CO₂

另外，在临界点附近，温度和压力的微小变化，会显著影响超临界流体的密度及与密度相关的物理化学性质，如粘度、介电常数、扩散系数、溶解度参数等。上述性质对于 SCF 在反应与分离中的应用具有决定性作用。

表 1.1 气体、液体和超临界流体的物理化学性质比较^[18]

Table 1.1 Comparison of the properties of gas liquid and supercritical fluid

物理性质	气体	超临界流体	液体
	(Ambient)	(T _c , P _c)	(Ambient)
密度, ρ (kg/m ³)	0.6~2	200~500	600~1600
动力粘度, η (mPa.s)	0.01~0.03	0.01~0.03	0.2~3
运动粘度, $\nu = \eta / \rho$ (10 ⁶ m ² /s)	5~500	0.02~0.1	0.1~5
扩散系数, D (10 ⁶ m ² /s)	10~40	0.07	0.0002~0.002

1.3.2 超临界二氧化碳的特点

近年来，有关超临界流体的研究和应用发展很快。常用的超临界介质很多，如：

C_2H_4 、 C_2H_6 、 C_3H_8 、 $CHCl_3$ 、 SF_6 、 H_2O 、 NH_3 、 CO_2 等。表 1.2 列出了它们的临界温度、临界压力和相应的临界密度。从表 2 中的数据可以看出, CO_2 的临界温度($T_c=304.19\text{ K}$)是文献报导过的超临界溶剂临界点最接近于室温的; 其临界压力($P_c=7.38\text{ MPa}$)比较适中; 临界密度($\rho_c=0.4682\text{ g/cm}^3$)是常用超临界流体中较大的, 而超临界流体的溶解能力一般随密度增加而增加; 另外, CO_2 无毒、廉价、环境友好。因此目前超临界二氧化碳($SCCO_2$)已成为全球可持续化工技术的重要研究方向, 已应用于萃取分离、纳米级微粒制备、手性化合物拆分、沉淀分离、精密电子器件洗涤及化学反应等诸多领域^[19-24]。

表 1.2 几种常见超临界流体的临界参数^[25]

Table 1.2 Critical constants of several supercritical fluids

	临界温度 (K)	超临界压力 (bar)	临界密度(g/cm^3)
C_2H_4	282.36	50.32	0.2174
C_2H_6	305.42	48.80	0.2840
C_3H_8	369.82	42.49	0.2174
$CHCl_3$	536.40	54.72	0.4995
SF_6	318.69	73.60	0.7357
H_2O	647.13	220.55	0.3220
NH_3	405.65	112.78	0.2350
CO_2	304.19	73.82	0.4682

1.4 超临界二氧化碳中的酶催化反应

1.4.1 超临界二氧化碳作为酶催化反应介质的优势

作为酶催化反应的常用介质之一, 超临界二氧化碳具备以下几点优势^[23, 27]:

适用面广

超临界二氧化碳作为一种特殊的非水介质, 很多性质与有机溶剂非常相似, 甚至可以认为超临界二氧化碳在本质上就是一种特殊的有机溶剂。因此, 凡可在传统有机溶剂中进行的酶催化反应, 均可通过选择适当的反应条件在超临界二氧化碳流体中进行。

反应速率快

超临界二氧化碳具有超临界流体特有的高扩散系数、低粘度和低表面张力等性质，因此可有效降低反应过程中的传质阻力，提高反应速率。有时还可以利用共溶剂提高底物在 SCCO_2 中的溶解度，并通过溶剂协同作用影响生物酶的催化性质，提高反应速率。

分离提纯简单

超临界二氧化碳对温度和压力的影响非常敏感。在反应过程中，通过调节体系的温度和压力影响底物和产物的在超临界二氧化碳的溶解度，实现反应分离一体化操作。

绿色环保

超临界二氧化碳无毒、阻燃、化学惰性，以其为化学反应介质，不污染环境、生物酶可保持较高活性。另外，与常规有机溶剂相比，二氧化碳在常压下是气体，反应后期易于从反应体系中分离，无溶剂残留，符合“绿色化学”要求。

由于超临界二氧化碳作为酶催化反应介质具有以上优点，因此在食品加工、医药、纺织、日用化工和制革等行业中得到了广泛关注。

1.4.2 影响超临界二氧化碳介质中酶催化反应的因素

由于超临界二氧化碳具有与常规反应介质不同的性质、生物酶具有与常规催化剂不同的催化特性，因此影响超临界二氧化碳中酶催化反应的因素较多，如温度、压力、超临界二氧化碳溶剂特性、共溶剂、底物摩尔比等。

温度

所有生物酶均存在最佳使用温度范围。因此，温度是影响酶催化活性的重要因素。当温度低于最佳使用温度时，酶的构象不能完全展开，催化活性大幅度降低^[28]；在最佳使用温度范围内，升高温度，一般有利于提高酶的催化活性。同时，升高温度能够增加底物在超临界二氧化碳中的溶解度，促进平衡控制反应的右移；当温度超过最佳使用温度范围后，酶分子二级结构开始出现变形，失活几率随之增加。David L^[29]等人在研究超临界二氧化碳介质中假丝酵母脂肪酶催化葵花油醇解反应时发现，当温度高于 80 °C 时，所用脂肪酶开始失活；在低于 50 °C 时，脂肪酶活性不能完全表现。Dauglas A M^[30]等人以高压二氧化碳为反应介质，以脂肪酶（*Rhizopus arrhizus* Lipase）为催化剂，研究了甘油三月桂酸酯与肉豆蔻酸的酸解反应，结果发现，反应压力为 9.66 MPa、

反应温度为 35 °C 时, 反应速率常数最大, 表明在此温度下酶呈现最大活性, 且在此条件下连续反应 80 h 后, 脂肪酶活性未见下降。另外, 温度还可通过影响酶的催化选择性, 进而影响产物中各组分的比例。Karamatollah R^[31]等人以超临界二氧化碳为反应介质, 在流动床反应器中研究脂肪酶催化菜籽油的水解反应时发现, 当压力恒定为 38 MPa, 反应温度由 35 °C 升至 55 °C, 反应 4 h 后, 产物中甘油单酯和甘油二酯摩尔含量由 14.4%、42.8% 分别降为 13.4% 和 39.7%, 而体系中自由脂肪酸 (Free Fat Acid, FFA) 的相对含量得到提高。

压力

压力对酶活性的直接影响相对较小, 但过高的压力容易导致二氧化碳在酶活性部位的浓度增加, 从而使二氧化碳与酶分子表面上的氨基自由基之间的相互作用增强, 二者生成了不稳定的氨基甲酸酯配合物。Kamat S^[32-33]等人在这方面做了大量工作, 并利用激光解析质谱法 (Laser Desorption Mass Spectroscopy, 缩写为 LD-MS) 检测到了该配合物。此外, 压力影响酶催化活性的另一可能原因在于: 高压下, 维持酶分子活性构象所必需的微量水中二氧化碳浓度增加, 改变了酶活性位微环境的 pH 值, 导致酶不能与底物有效接触, 催化活性降低。但也有学者提出了不同的观点, John C Erickson^[34]等在研究了超临界二氧化碳和超临界乙烷中的酶催化反应后提出: 超临界二氧化碳中的 pH 效应不是导致酶活性下降的主要因素, 其真正原因在于: 超临界流体压力的微小改变明显影响了流体密度及其相关的其他物理性质, 如介电常数、溶解度常数等, 上述物理性质的改变最终导致酶催化活性的降低。可见, 有关压力对酶催化活性的影响在今后的研究探索中仍需做大量的基础性研究工作。

此外, 压力对酶的催化选择性也存在一定的影响。在研究有机溶剂中的酶催化反应时, 人们一般通过改变溶剂的类型来改变酶的催化选择性, 而在超临界二氧化碳中, 通过调节体系的压力即可达到相同的效果。相关内容在文献^[35-38]中有较全面的论述。

二氧化碳溶剂特性

超临界二氧化碳的 Hildebrand 溶解度参数 (δ)、疏水参数^[32] (LogP, 其中 P 表示该溶剂在水和辛醇之间的分配系数) 及介电常数 (ϵ) 等特性对酶的催化活性同样存在一定影响。Vermue M H^[39]认为, 只有当溶质和溶剂形成均相溶液时, 酶的催化活性才能得到最大限度地发挥。有关溶质溶解度的计算方法, Vermue M H 给出了相应的公

式和计算过程,具体步骤可参见相关文献^[39]。另外,Laane C^[40]等人通过校正 Brink 和 Triamper^[41]的结论后得出:反应介质的疏水性是影响脂肪酶催化活性的重要因素,当介质疏水参数 $\text{LogP} < 2$ 时,酶几乎不具有催化活性;当 $\text{LogP} > 4$ 时,酶的催化活性相对较高; LogP 介于 2 和 4 之间时,酶的催化活性很难直接判断。清华大学的杨基础^[42]等在这一方面做了大量的研究工作,结果表明,对于月桂酸与正丁醇的酶催化酯化反应,其最大反应速率与超临界二氧化碳介质的介电常数间存在如下关系:

$$\ln[V_{\max}] = 4.187 - 8.318(\varepsilon - 1)/(\varepsilon + 1)$$

共溶剂

共溶剂对酶催化活性的影响具有两面性^[13]。一方面,在超临界二氧化碳中加入少量共溶剂(如醇),能够增加超临界二氧化碳的极性,增加其对极性底物的溶解能力,从而提高反应速率;另一方面,加入的共溶剂可以与水发生作用,导致酶催化活性位的微环境发生变化,降低酶的催化活性和结构稳定性。因此,对于共溶剂的选择和加入,一定要谨慎对待。

反应物之间摩尔比

底物摩尔比对酶催化活性的影响主要体现在酯的醇解反应中。因为过量的醇会与酶的催化活性位发生络合,导致酶催化活性降低或失活^[43]。Jackson M A^[44]等人在连续反应器中研究了固定化脂肪酶催化油脂的甲醇解反应,其反应温度、压力分别为 50 °C、24.1 MPa,结果表明,在甲醇流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时,酶的活性出现最大值,之后脂肪酶的活性随甲醇流速增加而迅速降低。对于酶催化水解、酯交换和酸解等反应类型,类似现象未见报导。

固定化及其载体

超临界二氧化碳中酶催化反应同样涉及酶的固定化问题。酶的固定化主要是为了提高酶的稳定性,扩展酶的使用范围,减少酶的流失。当时,固定化对酶催化活性的影响目前存在一定的争议。一般认为,经固定化后,酶的活性均有所下降^[45]。但谢智东等人^[46]研究猪胰脂肪酶催化丁酸甲酯与四氢糠醇的醇解反应时,比较了自由脂肪酶和固定化脂肪酶的活性,结果表明:固定化后的猪胰脂肪酶活性提高了 25%。此外,固定化载体对酶的催化活性也存在一定影响^[47],比表面较大的惰性载体可增大酶与底物的接触面积,从而提高酶的催化活性。

1.4.3 超临界二氧化碳中酶催化反应实例

超临界流体作为酶催化反应介质报导始见于 1985 年, Randolph 等人^[48]和 Hammond 等人^[49]分别考察了碱性磷酸酶、多酚氧化酶在超临界流体中的活性,从而说明了酶催化反应在超临界流体中进行的可能性。表 1.3 是以超临界二氧化碳为介质的酶催化反应研究实例。其中酯化、醇解、酸解反应是其中研究最多的反应类型。

表 1.3 超临界流体中酶催化反应的一些例子

Table 1.3 Examples of enzyme-catalyzed reaction in supercritical carbon dioxide

反应类型	底物	酶(来源)	最佳反应条件	特点	参考文献
水解反应 Hydrolysis	菜籽油	脂肪酶 (<i>Mucor miehei</i>)	连续反应 24 MPa、35 °C	超临界二氧化碳 反应、分离一体化	[31]
	p-硝基磷酸苯酯	碱性磷脂酶	间歇反应 10 MPa、35 °C	首次将超临界二氧化碳 用作酶催化反应介质	[48]
醇解反应 Alcoholysis	维生素 A (维生素 E)+乙醇	脂肪酶	间歇反应 36 MPa、80 °C	超临界二氧化碳 反应、分离一体化	[50]
	乙酸乙酯+异戊醇	脂肪酶	连续反应 10 MPa、60 °C	离子交换树脂固定化 脂肪酶	[27]
酸解反应 Acidolysis	C ₈ ~C ₁₂ 酸甘油三酯+ 油酸、(EPA)	脂肪酶	连续反应 10 MPa、60 °C	与正己烷为溶剂的 反应作了对比	[51]
	三辛酸甘油酯+油酸	脂肪酶	连续反应 10 MPa、60 °C	未向反应体系中加入水	[52]
氧化反应 Oxidization	胆固醇	假单细胞 脂肪酶等	间歇、连续反应 10 MPa、35 °C	加入叔丁醇、异丁醇有利 于提高反应转化率	[53]
酯交换反应 Transesterifi- cation	三辛酸甘油酯+ 油酸甲酯	脂肪酶 (<i>Mucor miehei</i>)	连续反应 10 MPa、40 °C	超临界二氧化碳萃取与 精馏柱精馏结合分离产物	[54]

1.4.4 超临界二氧化碳作为酶催化反应介质存在的问题

尽管超临界二氧化碳中酶催化反应研究取得了很大进展,但仍有一些实验结果不尽人意。例如,到目前为止,发现能够在超临界二氧化碳中起催化作用的生物酶仅有十几种。另外,与超临界乙烷或丙烷相比,超临界二氧化碳中的溶剂化效应大、反应活化能高^[55],反应速率相对较慢。Kamat S^[32]在研究异丁烯酸甲酯和2-乙基乙醇间的醇

解反应时发现,对于该反应而言,超临界二氧化碳并不是一种良好的溶剂,因为超临界二氧化碳可能改变了酶催化活性位周围微环境的pH值或者与酶分子中的氨基形成共价配合物,使酶的活性大大降低。因此,超临界二氧化碳在向人们提供广阔选择空间的同时,也提出了一些挑战。

1.4.5 超临界二氧化碳流体中酶催化反应展望

目前,超临界二氧化碳中的酶催化反应虽然仅集中在酯化、醇解和酸解等几个方面。但是,大量实验结果依然表明,与水基介质或有机介质相比,超临界二氧化碳在作为酶催化反应介质表现出了强大的优势。因此随着超临界流体应用基础理论不断完善和一些新的技术组合方法的出现,超临界二氧化碳中酶催化反应必将成为一个重要研究方向,同时也将为酶科学的发展提供更广阔的空间。

1.5 脂肪酸及其衍生物的分离提纯

常用的分离提纯脂肪酸及其衍生物的方法可分为单一分离技术和组合分离技术两大类。

1.5.1 单一分离技术

低温结晶法^[56]

低温结晶法利用低温下不同的脂肪酸或脂肪酸衍生物在有机溶剂中的溶解度差异对其进行分离纯化。一般情况下,脂肪酸在有机溶剂中的溶解度随碳链长度的增加而减小,随双键数的增加而增加。另外,随温度降低上述溶解度的差异表现更为显著。所以将混合脂肪酸溶于有机溶剂,通过降低溶液温度就可过滤除去其中大量的饱和脂肪酸和部分单不饱和脂肪酸,从而获得纯度较高的多价不饱和脂肪酸。实际应用中,丙酮和乙醇是常用的有机溶剂。低温结晶法工艺原理简单、操作方便,但需要回收大量的有机溶剂,且容易造成溶剂残留影响产品质量。

尿素包合法^[57~59]

尿素包合法是一种较常用的多价不饱和脂肪酸类化合物分离方法。其原理为:尿素分子在有机溶剂中结晶时,能够与饱和脂肪酸类化合物形成较稳定的晶体包合物析出,同时,能与单价不饱和脂肪酸类化合物形成不稳定的晶体包合物析出,而多价不饱和脂肪酸类化合物则不易与尿素形成包合物,过滤除去饱和脂肪酸和单价不饱和脂

肪酸与尿素形成的包合物,蒸发溶剂后可得到较高纯度的多价不饱和脂肪酸类化合物。尿素包合的分离效果受结晶温度和尿素用量的影响,结晶温度越低,尿素用量越多,所得产品纯度越高。有时,为了提高产品纯度,可采用多次尿素包合法。尿素包合法的成本较低,应用普遍,但存在的缺点是难以将双键数相近的脂肪酸类化合物分开。

分子蒸馏法^[60-61]

分子蒸馏不同于一般蒸馏技术,它是利用不同物质分子在高真空度条件下运动自由程的差别,对含有多种组分的物料在液-液状态下进行分离的技术。分子蒸馏能使液体在远低于沸点的温度下将其所含的不同物质分离,分离效率高、受热时间短,因此不会破坏多价不饱和脂肪酸等热敏性物质结构,从而解决了常规蒸馏技术所不能解决的问题。张其德^[62]等利用分子蒸馏技术分离提纯了鱼油醇解反应后的脂肪酸乙酯混合物,得到了纯度为 50~90% 的 DHA 和 EPA 产品,产品收率约为 80%。

硝酸银层析法

硝酸银层析法常用来分离碳原子数相同而碳碳双键数目不等的一系列化合物,如不饱和脂肪醇、酸、酯等。其机理是:碳碳键的成键 π 轨道能与银的 s 轨道形成一个 σ 配位键,同时银的 d 轨道与碳碳双键的反键 π 轨道结合,形成一个 π 配位键。通过上述两种作用力,含有双键的不饱和化合物可与银离子形成稳定的配位络合物而与饱和化合物分离,而且化合物的不饱和度越高,形成的络合物越稳定,分离效果相应增加。

层析时饱和脂肪酸化合物由于吸附最弱而 R_f 最高,不饱和化合物随不饱和度增高, R_f 值降低。因此在硝酸银薄层上,各种化合物可根据饱和程度不同而被分离。此法分离效果好,但产量小成本高,难以进行大规模生产。

超临界流体萃取法

超临界流体萃取(SCE)是近年来发展起来的一种新的分离技术,也是目前国内研究的热点。超临界流体萃取的基本原理是通过调节温度和压力使原料各组分在超临界流体中的溶解度发生大幅度变化而达到分离的目的。与传统萃取方法相比,由于超临界流体具有良好的近于液体的溶解能力和近于气体的扩散能力,因此萃取效率大大提高。另外,超临界流体萃取常选用二氧化碳(临界温度 304.19 K,临界压力 7.38 MPa)

等临界温度低且化学惰性的物质为萃取剂，因此该方法特别适用于热敏物质和易氧化物质的分离。

Liong 等^[63]测定了不同温度和压力下多种脂肪酸酯在超临界二氧化碳中的溶解度后发现：各种脂肪酸酯的溶解度均随二氧化碳密度增加而增加。另外，在相同条件下，短链脂肪酸酯的溶解度比长链脂肪酸酯的溶解度大。相同碳链长度脂肪酸酯的溶解度随双键数的增加而减小，但这种变化并不明显。因此，可以断言：利用超临界流体萃取可有效分离链长差别较大的脂肪酸，但欲将碳链长度相近的脂肪酸分开，还必须结合其他分离技术。

1.5.2 组合分离技术

如前所述：超临界流体萃取可以分离碳链长度不同的脂肪酸及其衍生物，却难以分离链长相同而不饱和度不同的脂肪酸及其衍生物。若将超临界流体萃取和其他方法相结合，则有可能提高分离效果，使各种脂肪酸或其衍生物得到进一步分离。

超临界流体萃取-尿素包合法

Arai K.等^[64]于 1986 年提出将尿素包合法与超临界流体萃取法相结合从鱼油中提纯 EPA、DHA。如前所述，尿素包合法的优势在于可按不饱和度分离脂肪酸及其衍生物，而超临界流体萃取法的优势在于按碳链长度分离脂肪酸。因此，将两者结合起来，优势互补，就可得到高纯度的多价不饱和脂肪酸。

超临界流体萃取-精馏法

1984 年 Eisenbach^[65]提出将超临界流体萃取与精馏结合分离多价不饱和脂肪酸，并设计了相应实验装置。该装置在萃取釜上设有分馏柱，柱顶设有热交换器。超临界二氧化碳首先在样品池内与原料接触传质，选择性萃取原料中轻组分，然后沿分馏柱上升至热交换器。由于二氧化碳流体在热交换器中受热，密度减小，流体中溶解的组分就会分离出来形成回流被富集于分馏柱中。Nilsson 等^[66]在 Eisenbach 工作的基础上，对上述装置进行了改进：在分馏柱内设置不同的温度区，温度由下向上逐步升高，形成温度梯度，并以此提高了分馏柱的分离性能。

超临界流体萃取-银离子络合法

银离子络合法是基于双键数的不同来分离脂肪酸及其衍生物的，而超临界二氧化

碳萃取法能较好地以碳原子数为序分离脂肪酸及其衍生物。所以，银离子络合法结合超临界二氧化碳萃取法是分离提纯脂肪酸及其衍生物的具有重要开发前景的工艺路线。

Tatsuru 等^[67]进行了 AgNO_3 水溶液络合和超临界二氧化碳萃取两步法从沙丁鱼油乙酯中提纯 EPA、DHA 的研究。结果表明，当 AgNO_3 浓度为 5 M 时，含四个以上双键的多价不饱和脂肪酸酯全部与银离子形成络合物而分配到水相中，而其他脂肪酸酯则仍留在油相中，然后用超临界二氧化碳萃取 AgNO_3 水相，获得了 90% 以上的 DHA。

Sakae 等^[68]将 AgNO_3 溶解于乙腈溶液中，再加入硅胶，混合物于 40 °C 蒸干，所得的干燥物质作为超临界二氧化碳分馏柱上的填充剂。当超临界二氧化碳携带鱼油甲酯通过该分馏柱时，不与银离子作用的饱和脂肪酸酯以及与银离子作用力较弱的低度不饱和脂肪酸酯，直接通过分馏柱；高不饱和度的 EPA、DHA 甲酯与填充剂中的银离子作用而滞留在柱内，通过调节温度、压力或打入夹带剂就可将吸附于填充剂中的 EPA、DHA 分别萃取出来，达到分离效果。

1.6 选题意义和研究内容

1.6.1 选题目的和意义

α -亚麻酸等 N-3 系列多价不饱和脂肪酸在人体内具有多种重要生理作用，但人体自身不能产生，必须从外界食物中摄取，属人体必需脂肪酸（Essential Fatty Acids，缩写为 EFA）。然而，我国居民饮食结构普遍不合理，表现为饱和脂肪酸摄入量过高，而不饱和脂肪酸的摄入量则相对较低。另外，在所摄入的不饱和脂肪酸中，由于 N-6 系列脂肪酸含量较高，因此导致 N-3、N-6 两种多价不饱和脂肪酸比例失调，直接影响人体健康。解决上述问题的可行的办法之一是适当补充 α -亚麻酸类产品等 N-3 系列多价不饱和脂肪酸。

目前， α -亚麻酸等多价不饱和脂肪酸生产大多以鱼油和藻类为原料，而以植物油为原料开发多价不饱和脂肪酸系列产品则可扩大原料来源，降低生产成本。亚麻是一种高寒作物，在我国主要分布于华北、西北部地区，以内蒙、山西、甘肃、新疆四省区产量最大，陕西、青海次之。将亚麻籽中所含的亚麻油甲酯化后经气相色谱分析可知：其中的 α -亚麻酸约占其总脂肪酸含量的 46% 左右。可见亚麻是一种廉价易的

生产 α -亚麻酸的原料。生物酶催化和超临界二氧化碳流体技术分别以其不同于常规酸碱催化剂和常规有机溶剂的特性而日益受到研究人员重视,成为近年来蓬勃发展的“绿色化学”新技术。

本文将生物酶催化和超临界二氧化碳流体技术联合应用于 α -亚麻酸类产品的开发研究,并为该工艺路线的工业化提供了基础数据和必要的技术准备,达到 α -亚麻酸类产品制备开发研究及亚麻综合利用的双重效果。

1.6.2 本文研究内容

本文的主要研究内容包括:

- (1) 常压无溶剂体系中酶催化亚麻油水解反应工艺探讨;
- (2) 高压二氧化碳介质中酶催化亚麻油水解反应工艺探讨;
- (3) 常压无溶剂体系中酶催化亚麻油醇解反应工艺探讨;
- (4) 脂肪酸乙酯分离研究。

参考文献:

- [1] Leaf. A., Weber P. C. Cardiovascular effects of N-3 fatty acids. *New England J. Med.* 1988, 318: 549~552.
- [2] Chan. J. K, Bruce V. M., McDonald B. E. Dietary α -linolenic acid is as effective as oleic acid and linoleic acid in lowering blood cholesterol in normolipidemic men. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, 53: 1230~1235.
- [3] Singer P, Jaeger W, Berger. Effects of dietary oleic, linoleic and α -linolenic acids on blood pressure, serum lipids, lipoproteins and the formation of eicosanoid precursors in patients with mild essential hypertension. *J Human Hypertension.*, 1990, 4: 227~231.
- [4] Christon R, Haloue R, Durand G. Dietary polyunsaturated fatty acids and aging modulate glutathione-related antioxidants in rat liver *J Nutr*, 1995, 125: 3062~3065.
- [5] Bjerve K S, Fischer S, Slinn K. α -linolenic acid deficiency in man: effect of ethyl linolenate on plasma and erythrocyte fatty acid composition and biosynthesis of prostanoids. *Am J Clin Nutr*, 1987, 46(4): 570~576.
- [6] 李英霞, 武继彪, 钟方晓. α -亚麻酸的研究进展. *中草药*, 2001, 32 (7): 766~669.
- [7] 夏宗建, 关勇, 罗倩. 亚麻油中 α -亚麻酸的分离提纯, 专利申请号: CN1162009A.
- [8] 黄惠琴, 鲍时翔. 多价不饱和脂肪酸分离与纯化技术进展. *中国油脂*, 1999, 24 (2): 32~34.

- [9] 单锦宇. 芳香胺及酚类衍生物在二氧六环中的酶催化聚合 (硕士学位论文), 郑州, 郑州大学, 2001.
- [10] 邹国林, 朱汝璠. 酶学. 武汉大学出版社, 1997, 150~180.
- [11] 吴显荣. 植物生理化学. 科学出版社, 1982, 52~70.
- [12] Klibanov A. M., Oxender D. L., Fox C. F., Protein Engineering, Alan R. Liss, New York, 1987.
- [13] Rasndolph T. W, Blanch H. W., Prausnitz J. M., Enzyme-Catalyzed Oxidation of Cholesterol in Supercritical Carbon Dioxide. *AIChE Journal*, 1988, 34(8): 1354~1360.
- [14] Alain M., Continuous Reaction-Separation Process for Enzymatic Esterification in Supercritical Carbon Dioxide. *Biotechnology and Bioengineering* 1994, 43(6): 487~504.
- [15] Darr J. A., M. Poliakoff. New Direction in Inorganic And Metal-Organic Coordination Chemistry in Supercritical Fluids. *Chem. Rev.*, 1999, 99(2): 495~541.
- [16] 宋瑞琦. 超(近) 临界二氧化碳介质中的钨催化羰基化反应研究 (博士学位论文), 北京, 中国科学院研究生院, 2002.
- [17] Poliakoff M., King P. Phenomenal fluids, *Nature*, 2001, 412: 125~128.
- [18] 陈维柵. 超临界流体萃取的原理和应用. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 1998 年 28~37
- [19] 桂椿雄. 超临界流体萃取法之简介. *CHEMISTRY (The Chinese CHEM. SOC. TAIPEI)*, 1998, 56(4): 303~309.
- [20] Warwick B., Regtop H. L., Synthesis, purification and micronization of pharmaceuticals using gas antisolvent techniques. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2000, 39(12): 4571~4579.
- [21] York P., Supercritical fluids ease drug delivery. *Manufacturing chemist*, 2000, 6: 26~29.
- [22] Zingg S. P., Arnett E. M., Mcphail A. T. Chiral discrimination in the structures and energetics of association of stereo someric salts of mandelic acid with 2-phenethy lamine, eqhedrine and psuedophedrine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 110(5): 1565~1580.
- [23] 朱白强. 超临界流体技术. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2000 年. 528~538.
- [24] 张镜澄. 超临界流体萃取. 第一版. 北京: 化工工业出版社, 2000 年. 185~213.
- [25] Jessop P. G., Leitner W, Chemical synthesis using supercritical fluids. New York: Wiley-VCH, 1999, 10~13.
- [26] Eckert C. A., Bush D., Brown J. S., Liotta C. L., Tuning solvents for sustainable technology. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2000, 39(12): 4615~4621.
- [27] Kozo N. Biochemical Reaction in Supercritical Fluids. *TIBITECH.*, 1990, 8(10): 288~292.
- [28] Srivastava S., Giridhar M., Hydrolysis of pNPL to pNP in Supercritical Carbon Dioxide with Two Enzymes. *J. Chem. Tech. Biotech.*, 2001, 76: 890-893.

- [29] David L. C., Jerry W. K. Lipase-Catalyzed Synthesis of Triolein Based Sunscreens in Supercritical CO₂. J. AM. Oil Chem. Soc., 2001, 78(1): 43~47.
- [30] Douglas A. M. Enzyme-catalyzed Interesterification of Triglycerides in Supercritical Carbon Dioxide. Ind. Eng. Chem., 1991, 30: 939~946.
- [31] Rezaei K., Temelli F. On-line Extraction-reaction of Canola oil Using Immobilized Lipase in Supercritical CO₂. Journal of Supercritical Fluids, 2001, 19(3): 263~274.
- [32] Kamat S. Biocatalytic synthesis of Acrylates in Organic solvents and Supercritical Fluids: 1. Optimization of Enzyme Environment. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40: 158~166.
- [33] Kamat S., Critchley G., Beckman E. J., Russell A. J. Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Organic Solvents and Supercritical Fluids: 3. Does Carbon Dioxide Covalently Modify Enzymes? Biotechnol. Bioengin, 1995, 46(6): 610~624.
- [34] Erickson J. C., Effect of Pressure on an Enzymatic Reaction in a Supercritical Fluid. AIChE Journal, 1990, 36 (2): 299~231.
- [35] Elena C. Celia, High yield and optical purity in Biocatalysed Acylation of trans-2-phenyl-1-cyclohexanol with *Candida rugosa* lipase in Non-conventional media. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1999, 6(5): 495~503.
- [36] Andreas A, Karlheinz S., Karl S, Phase equilibria with supercritical carbon dioxide for the enzymatic pyrethroid component part 1: binary system, J. Chem. Eng. Data, 1997, 42: 551~557.
- [37] Kamat S., Beckman E. J. Russell, A. J. Control of enzyme enantioselectivity with pressure changes in supercritical fluoroform. J. Amer. Chem. Soc., 1993, 115: 8845~8846.
- [38] Sunwook K, Johnston K P. Chem. Eng. Commun., 1988, 63:49~52.
- [39] Vermuë M-H, Tramper J. Enzymic transesterification in near-critical carbon dioxide: Effect of pressure, Hildebrand solubility parameter and water content. Enzyme Microb. Technol., 1992, 14: 649~655.
- [40] Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C. Biotech. Bioeng., 1987, 1: 81~87.
- [41] Brink L E, Triamper S. Biocatalysis in Organic media Amsterdam: Elsevier Science publishers B V, 1986, 133~146.
- [42] 陈惠晴, 杨基础. 超临界二氧化碳的溶剂特性对脂肪酶催化反应的影响. 清华大学学报(自然科学版), 1999, 39 (6): 31~34.
- [43] Helga G., björn S., Lipased-catalyzed Alcoholysis of God Liver Oil in Supercritical Carbon Dioxide. J. Am. Oil Chem. Soc., 1995, 72 (1): 399~405.
- [44] Jackson M. A., King, J. W. Methanolysis of seed oils in flowing supercritical carbon dioxide. J. Am. Oil Chem. Soc. 1996, 73: 353~356.

- [45] 周晓云. 酶技术. 北京: 石油工业出版社(Petroleum Industry Press), 1995: 37~76.
- [46] 谢智东. 南开大学学报(自然科学版), 1996, 29(4): 61~66.
- [47] Wisdom R A, Dunnill P, Lilly M D. *Enzyme Microb. Technol.*, 1984, 6: 443~446.
- [48] Randolph T. W, *Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. Biotech. Lett.* 1985, (7): 325~330.
- [49] Hammond D. A. *Appl. Biochem. Biotech* 1985,11, 393~400.
- [50] Turner C. Lipase-catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: Application to fat-soluble vitamin determination in milk powder and infant formula. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 29(2-3): 111~121.
- [51] Akiniro S., kenshiro F., Teruhiko S. kunlo A. Improved lipase-catalyzed incorporation of long fatty acids into the medium-chain triglycerides assisted by supercritical carbon dioxide *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1994, 71 (9), 961~967.
- [52] Fjimoto K, Shishkura A, Arai K. Abstracts ISF-JOCS World Congress (Tokyo, Japan) Japan Oil Chemists Soc., 1988, 286~290.
- [53] Rasndolph T. W., *Enzymatic Oxidation of Cholesterol Aggregates in Supercritical Carbon Dioxide. Science*, 1988, 239: 387~390.
- [54] Tadafumi Adschiri. Lipase-catalyzed Interesterification of Triglyceride with Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 1992, 25(1): 104~105.
- [55] Almeida M C, Ruivo R, Maia C. Novozym 435 activity in compressed gases. Water activity and temperature effects. *Enzyme and Microbial Tech.*, 1998, 22(6): 494~499.
- [56] Tor-Chern C, Yi-Hsu J. An Improved Fractional Crystallization Method for the Enrichment of α -Linolenic Acid in Borage Oil Fatty Acid. *Ind. Eng. Chem. Res*, 2001, 40: 3781~3784.
- [57] Schlenk. H., Holman. R. Separation and Stabilization of Fatty Acids by Urea Complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72: 5001~5005.
- [58] Borch-Jensen. C.; Staby. A.; Mollerup. J. Phase Equilibria of Urea-Fractionated Fish Oil Fatty Acid Ethyl Esters and Supercritical Carbon Dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1994, 33: 1574~1582.
- [59] Canas B. Yurawecz M., Ethyl Carbamate Formation During Urea Complexation for Fractionation of Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, 76: 537~542.
- [60] 喻健良, 翟志勇. 分子蒸馏技术的发展及研究现状. *化学工程*, 2001, 29(5): 70~75
- [61] 傅红, 裘爱咏. 分子蒸馏法制备鱼油多不饱和脂肪酸. *无锡轻工大学学报*, 2002, 21(6): 617~621.
- [62] 张其德, 张鸣. 二十二碳六烯酸乙酯和二十碳五烯酸乙酯的制备和分离工艺. 国家发明专利申请号: 99115429.0.
- [63] Liong K. K., Foster N. R, Ting S. S. T. solubility of fatty acid ester in supercritical carbon dioxide,

- Ind. Eng. Chem. Res., 1992, 31: 400~408.
- [64] Arai K., Saito S. Fractionation of Fatty Acids and their Derivatives by Extractive Crystallization using Gas as a Solvent, World Congress III of Chemical Engineering, Tokyo, 1986.
- [65] Eisenbach W. Supercritical Fluid Extraction: A Film Demonstration. Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem. 1984, 88: 882~887.
- [66] Nilsson W. B., Gauglitz E., Hudson J. Fractionation of Menhaden Oil Ethyl Esters using Supercritical Fluid CO₂. J. Am. Oil Chem. Soc., 1988, 65 (1): 109~112.
- [67] Tatsuru S. Supercritical Fluid Extraction of Polyunsaturated Fatty Acid EthylEsters from Aqueous Silver Nitrate Solution. Bioseparation, 1993(3): 197~204.
- [68] Sakae H. Enrichment of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Esters from Esterified Fish Oil by Programmed Extraction-elution with Supercritical Carbon Dioxide. Journal of Chromatography, 1990, 515: 295~303.

第二章 常压无溶剂体系中酶催化亚麻油水解反应研究

2.1 引言

油脂水解反应按所用催化剂类型可分为^[1]：硫酸法；金属氧化物（CaO、MgO、ZnO）法；碱皂化法^[2]；酶催化法。其中研究较多的是常规工业酸碱催化剂催化的水解反应，但该方法存在反应温度和反应压力高，易破坏多价不饱和脂肪酸的碳碳双键；催化剂选择性难以控制，易发生其他副反应等问题。

与常规工业催化剂催化的水解反应相比，酶催化水解反应具有很多优点：其反应条件温和，反应能耗低；无毒、无污染，所得脂肪酸色泽好，纯度高。近年来，随着生物催化技术的迅速发展，研究人员对生物酶在有机溶剂^[3-5]、超临界流体^[6-7]中的催化性能做了大量研究工作，对于无溶剂体系中酶催化反应的研究相对较少^[8-9]。但 Boulbaba selmi^[10-12]指出，无溶剂体系可避免有机溶剂的毒性、易燃及后期分离困难等问题，同时，在无溶剂体系中生物酶可直接作用于底物，且产物分离纯化过程简单、步骤少^[13]。因此，无溶剂体系是酶催化反应较为理想的环境之一。

2.2 原料、试剂与实验设备

实验中所用两种脂肪酶分别由深圳市绿微康生物工程有限公司（Leveking lipase，以 **L-lipase** 表示，微生物发酵生产，无选择性，未固定化）和诺维信（Novozymes）（沈阳）生物加工有限公司广州分公司（**Lipozyme® TL IM** *Thermomyces lanuginosa* lipase，基因改良性米曲霉，经微生物深层发酵生产，1, 3 位专一，固定化于颗粒状硅胶，以 **N-lipase** 表示）提供，使用前均未作任何处理。亚麻油为亚麻籽经超临界二氧化碳萃取所得，分析测试结果显示，各项指标均符合国家标准(GB 8235-87)。其脂肪酸含量与文献^[2]所报导的含量比较列于表 2.1 中。无水乙醇（分析纯），北京精细化学品有限公司提供（纯度大于 99.0%）；乙醚（分析纯），天津化学试剂一厂提供（纯度大于 99.0%）。

离心机（上海云楼医用仪器厂制造，800 型）；电动搅拌器（上海标本模型厂制造，JB50-D 型）。精密天平（北京光学仪器厂制造，DT-100A 型，精度 0.0001g）。

表 2.1 原料中脂肪酸含量与文献报导值比较

Table 2.1 The composition of fatty acid in the linseed oil compared with literature.

	软脂酸, %	硬脂酸, %	油酸, %	亚油酸, %	α -亚麻酸, %
文 献	6.38	4.66	26.34	12.21	50.51
超临界萃取	5.42	4.04	25.14	16.44	48.96

2.3 实验装置

常压无溶剂体系中酶催化水解反应装置如图 2.1 所示。该装置由恒温水浴系统、搅拌器、反应器、加热器等部分组成。

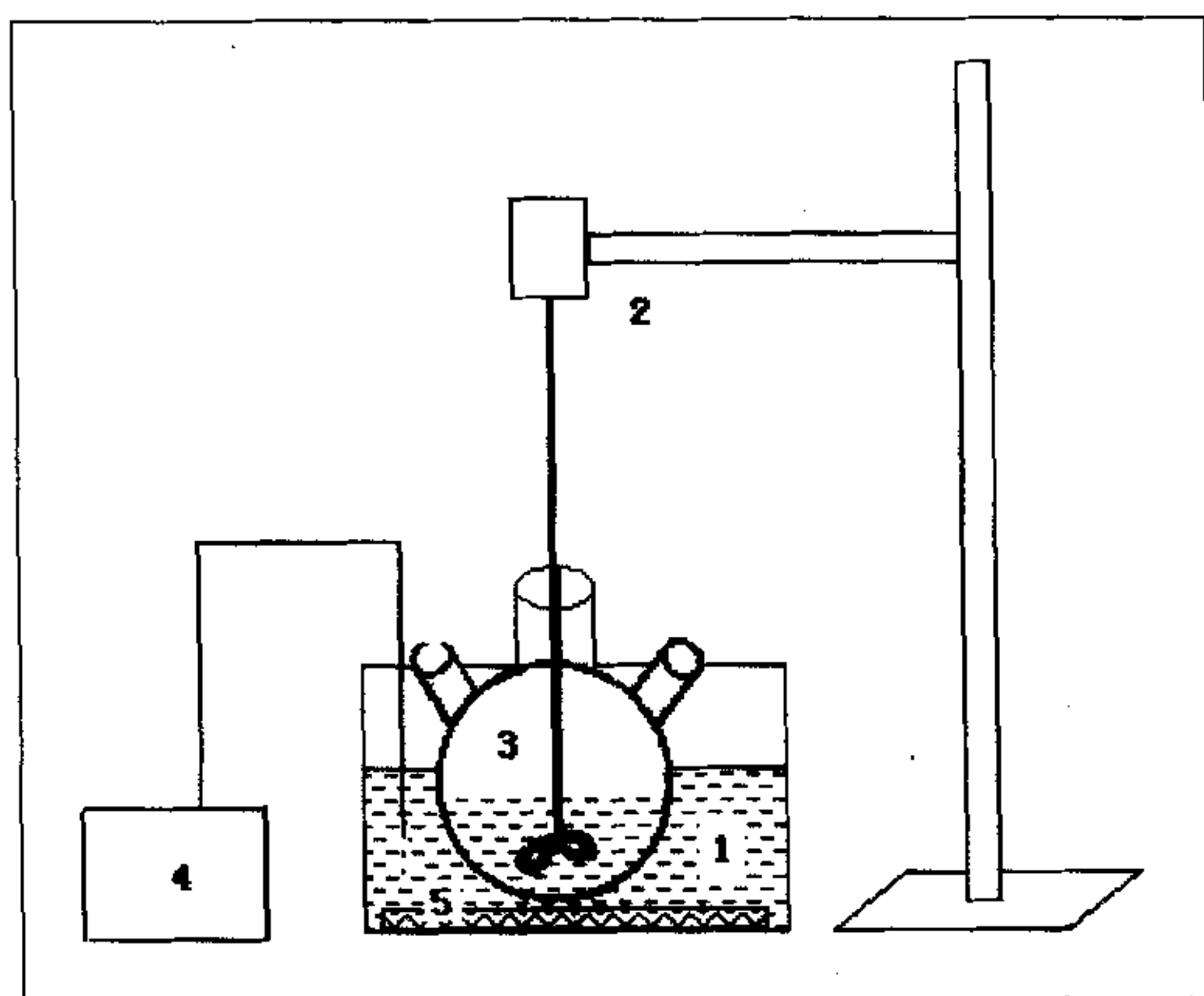


图 2.1 常压无溶剂体系酶催化亚麻油水解反应装置图

Figure 2.1 Schematic diagram of enzyme-catalyzed hydrolysis reaction in solvent-free system

1. 恒温水浴系统; 2. 搅拌器; 3. 反应器; 4. 控温装置; 5. 加热器

1. Water bath equipment; 2. Stirrer; 3. Reactor; 4. Temperature-controlling equipment; 5. Heater

2.4 实验

2.4.1 实验操作

将亚麻油与水按一定比例混合, 水浴加热到反应所需温度, 快速加入定量脂肪酶,

同时搅拌记时。实验过程中定时取样，为保证反应温度恒定、反应物比例及催化剂相对含量不变，每次取样时少量快速。将所取样品置于试管中，并迅速将试管移入 80 ℃ 水中加热 2 min，使脂肪酶变性失活，停止反应。离心分离除去水和脂肪酶，取油层测其酸价，计算水解反应转化率。

2.4.2 反应方程式

酶催化亚麻油水解为分步进行的反应，因此反应方程式可表示为：



其中，TG：甘油三酯；DG：甘油二酯；MG：甘油单酯；FFA：各种自由脂肪酸；GL：甘油。

当反应过程中有部分甘油二酯、甘油单酯生成后，上述三种反应同时进行，生成物为甘油二酯、甘油单酯、各种自由脂肪酸以及甘油的混合物。

总反应方程式可表示为：



2.4.3 分析方法

水解反应转化率 $x(\%)$ 的测定按文献^[14-17]提供的方法，计算公式如下：

$$x(\%) = \frac{\text{释放的脂肪酸}}{\text{基于酯键的底物浓度}} \times 100 = AV/SV \times 100$$

其中：AV(mgKOH/g 油)，反应过程中亚麻油酸价 (Acid value)，按下式计算：

$$AV = \frac{V \times N \times 56.1}{W}$$

其中， V 表示滴定样品所消耗氢氧化钾溶液体积，ml； N 表示氢氧化钾溶液摩尔浓度；56.1 为氢氧化钾摩尔质量； W 为样品重量，g。

SV (mgKOH/g 油), 亚麻油的皂化价 (Saponification value), 计算公式如下:

$$SV = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 56.1}{W}$$

其中 V_1 : 滴定皂化反应中过量氢氧化钾所消耗的盐酸溶液体积, ml; V_2 : 滴定不加样品只加入氢氧化钾溶液的空白对照实验所消耗盐酸溶液体积, ml。所用原料经三次测定取平均值, 得皂化价为 193 mg KOH/g 油。

2.5 结果与讨论

常压无溶剂体系中酶催化亚麻油水解反应的影响因素较多, 包括水/亚麻油摩尔比、脂肪酶用量、反应温度等。本文以 L-lipase 和 N-lipase 为催化剂, 对上述因素做了系统研究。

2.5.1 L-lipase 为催化剂的亚麻油水解反应

反应物摩尔比

油脂水解反应中物料配比是影响反应转化率的重要因素之一。水/亚麻油比例过高, 导致产物分离困难; 过低, 反应进行不完全。图 2.2 是反应温度 33 °C、L-lipase 用量为反应物重量的 5 wt% 时、不同水/亚麻油摩尔比条件下的实验结果。

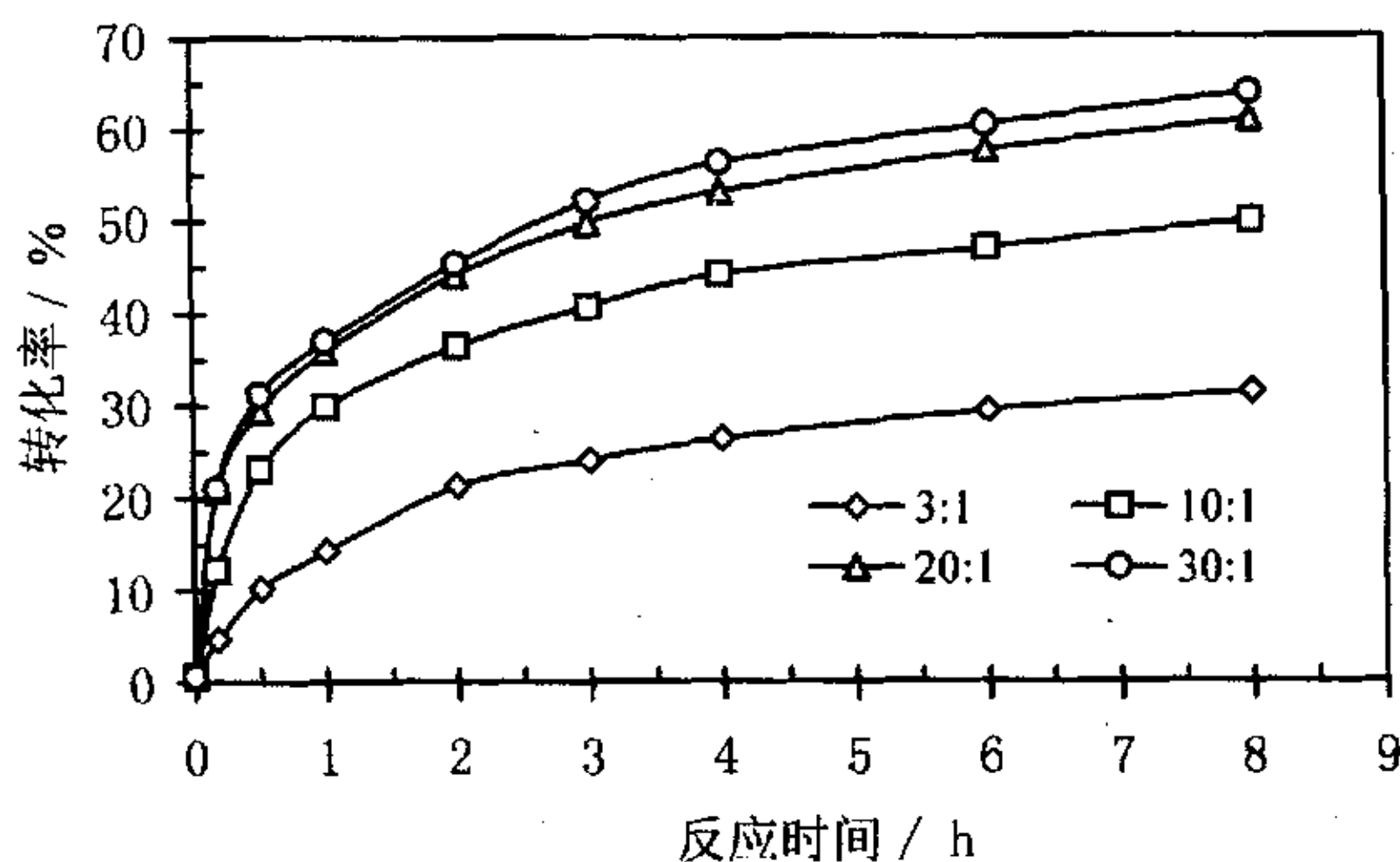


图 2.2 L-lipase 为催化剂, 不同反应物摩尔比条件下的实验结果

Figure 2.2 The relationship of time-conversion at various molar ratio of water/linseed for L-lipase

可以看出, 在所考察的范围内, 随着水/亚麻油摩尔比增加, 水解反应转化率一直

保持上升趋势。但在水/亚麻油比例小于 20:1（摩尔比）时，转化率上升迅速；当比例超过 20:1 后，转化率上升缓慢。上述实验现象的原因在于：体系中过量的水增加了水、亚麻油及催化剂的接触几率，导致水解反应速率上升，同时，生成的脂肪酸和甘油分别分散于油相和水相，它们的分离在一定程度上有利于反应进行。当水/亚麻油比例超过 20:1 后，上述两种因素的影响可能已经接近极限，转化率上升变的较为缓慢。考虑到过高的水含量会影响甘油与水的分离，同时可能会有相对较多的脂肪酸溶解于水相中而难以收集，因此本文在考察其他因素时，水/亚麻油比例固定为 30:1。

酶用量

酶用量是影响酶催化反应转化率和初始速率的因素之一。图 2.3 是反应温度 33℃、水/亚麻油 30:1（摩尔比）、不同 L-lipase 用量条件下的实验结果。

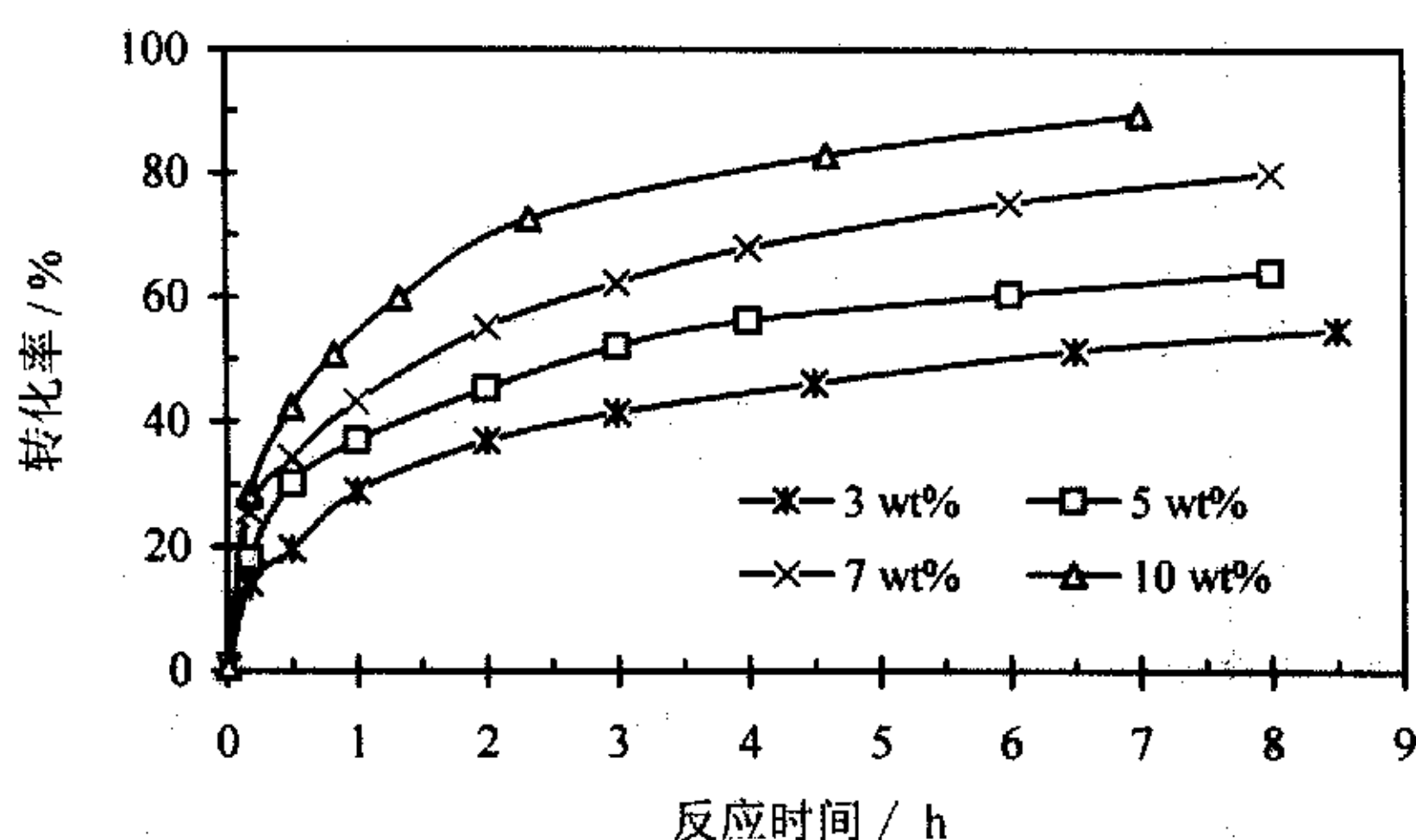


图 2.3 反应温度 33℃、反应物摩尔比 30:1、不同 L-lipase 用量条件下的实验结果

Figure 2.3 The relationship of time-conversion at various L-lipase loads

可以看出，在反应温度及反应物摩尔比确定的前提下，随 L-lipase 用量的增加，相同时间内的转化率也相应增加。以 3 h 的转化率为例，L-lipase 用量 3 wt% 时，转化率仅为 41.4%；当 L-lipase 用量增至 7 wt% 时，转化率则高达 62.2%。因此欲缩短反应时间，在一定范围内可以通过加大酶用量得以实现。但过高的脂肪酶用量会使油相、水相和脂肪酶形成糊状物，导致产物脂肪酸分离困难。另外，实际生产过程中，脂肪酶用量过高会增加生产成本，因此，适宜的 L-lipase 用量为 5 wt% 左右。

反应温度

温度是影响脂肪酶催化活性的重要因素之一，所有生物酶都存在最佳使用温度范围。温度过高，生物酶活性降低或消失；温度过低，由于活性构象不能完全展开，生物酶活性大幅度降低。Mittelbach. M^[18]在研究了有机溶剂中 *Mucor miehei* 脂肪酶催化向日葵油与乙醇的醇解反应后得出：所用脂肪酶的活性温度范围为 40~70 °C。

图 2.4 是 L-lipase 用量为 5 wt%、水/亚麻油 30:1（摩尔比）、不同反应时间条件下的温度/转化率关系图。可以看出，在温度及 L-lipase 用量确定的条件下，反应时间越长，转化率越高；在同一反应时间下，温度在 20~33 °C 区间内，转化率随反应温度升高而缓慢上升，说明在该区间内，脂肪酶的活性构象正在逐步展开；当温度到达最佳使用范围后，转化率快速上升，直至最高值，随后开始下降；当温度高于最佳使用范围时，转化率急剧下降，直至为 0，此时脂肪酶已完全失去活性。从实验结果可以看出，L-lipase 催化亚麻油水解反应的最大活性温度是 35 °C，完全失活温度为 45 °C。

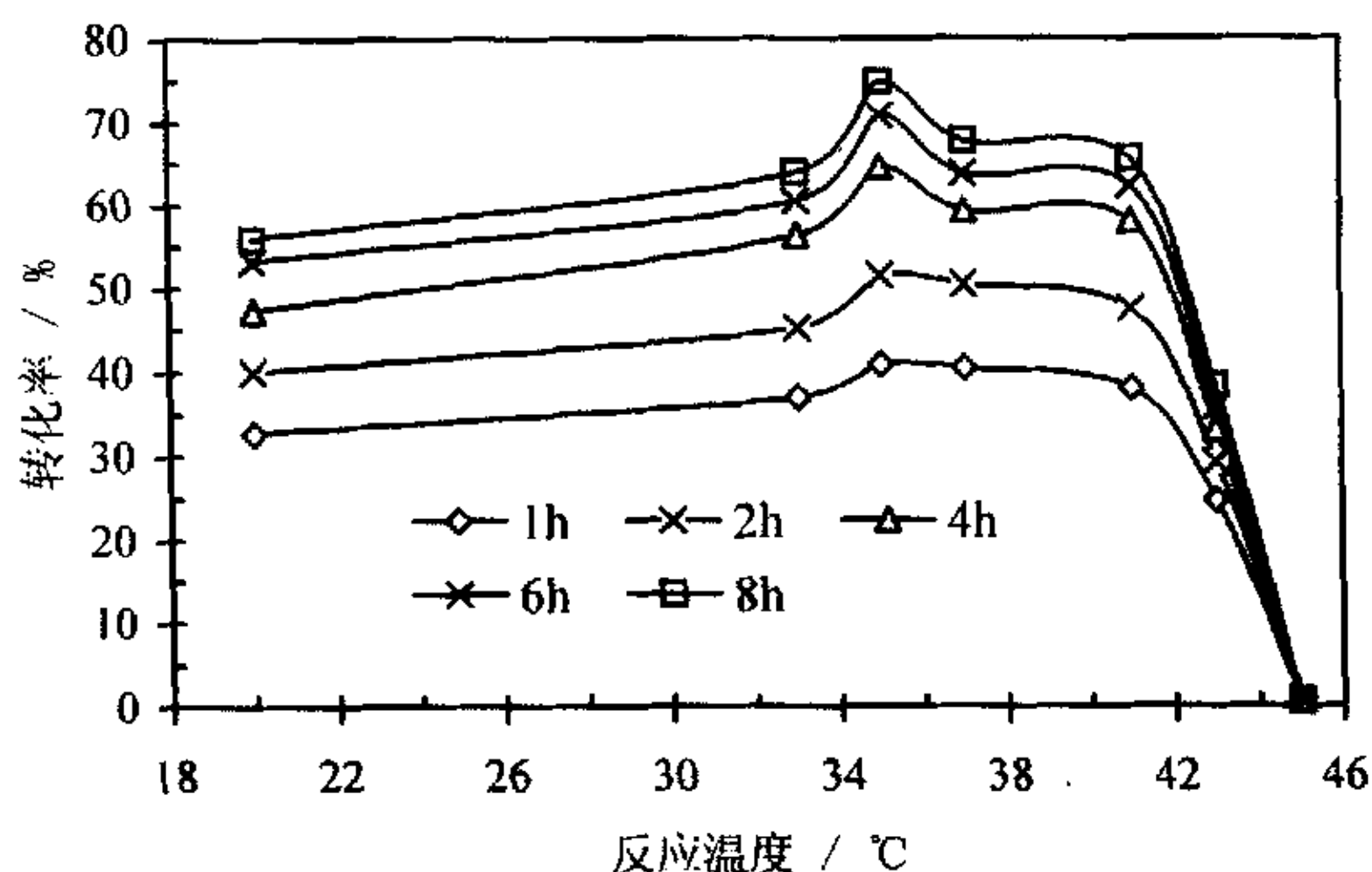


图 2.4 反应物比例 30:1、L-lipase 用量 5 wt%、不同反应温度条件下的转化率图

Figure 2.4 The relationship of temperature-conversion at various times for L-lipase

对照实验

水/亚麻油摩尔比 30:1，反应温度 35 °C，无 L-lipase 条件下搅拌 5 h，将反应后混合物离心分离，取上层油样分析，经测定，其酸价与原料酸价一致，说明其他实验结果中酸价上升为 L-lipase 催化亚麻油水解所致。

2.5.2 N-lipase 为催化剂的亚麻油水解反应

反应物摩尔比

如前所述，亚麻油水解反应过程中反应物摩尔比是影响反应转化率的重要因素。图 2.5 是反应温度为 67.5 °C、N-lipase 用量为 3 wt% 时、不同水/亚麻油摩尔比下的实验结果。可以看出，在所考察的水/亚麻油摩尔比范围内，随水含量的增加，转化率一直保持上升趋势。由图中给出的信息可知，当反应物摩尔比由 10:1 逐渐增加到 30:1 时，相同时间内的转化率不断提高，而当摩尔比为 30:1 和 40:1 时，转化率基本相同。产生上述实验结果的原因在于：一方面，体系中过量的水增加了水、亚麻油及脂肪酶的接触几率，对反应速率有一定的促进作用；另一方面，由于油脂水解反应发生在油水界面上，过量的水可溶解稀释生成的甘油，降低其在油水界面的浓度，对反应有一定的促进作用。但是，水量增加后降低了反应体系中底物甘油三酯与酶的相对含量，导致二者的结合几率变小，对反应速率产生不利影响。当水/亚麻油比例超过 30:1 后，上述几种因素相互作用明显，转化率上升趋势减缓。因此本文在考察其他因素时，水/亚麻油比例固定为 30:1。

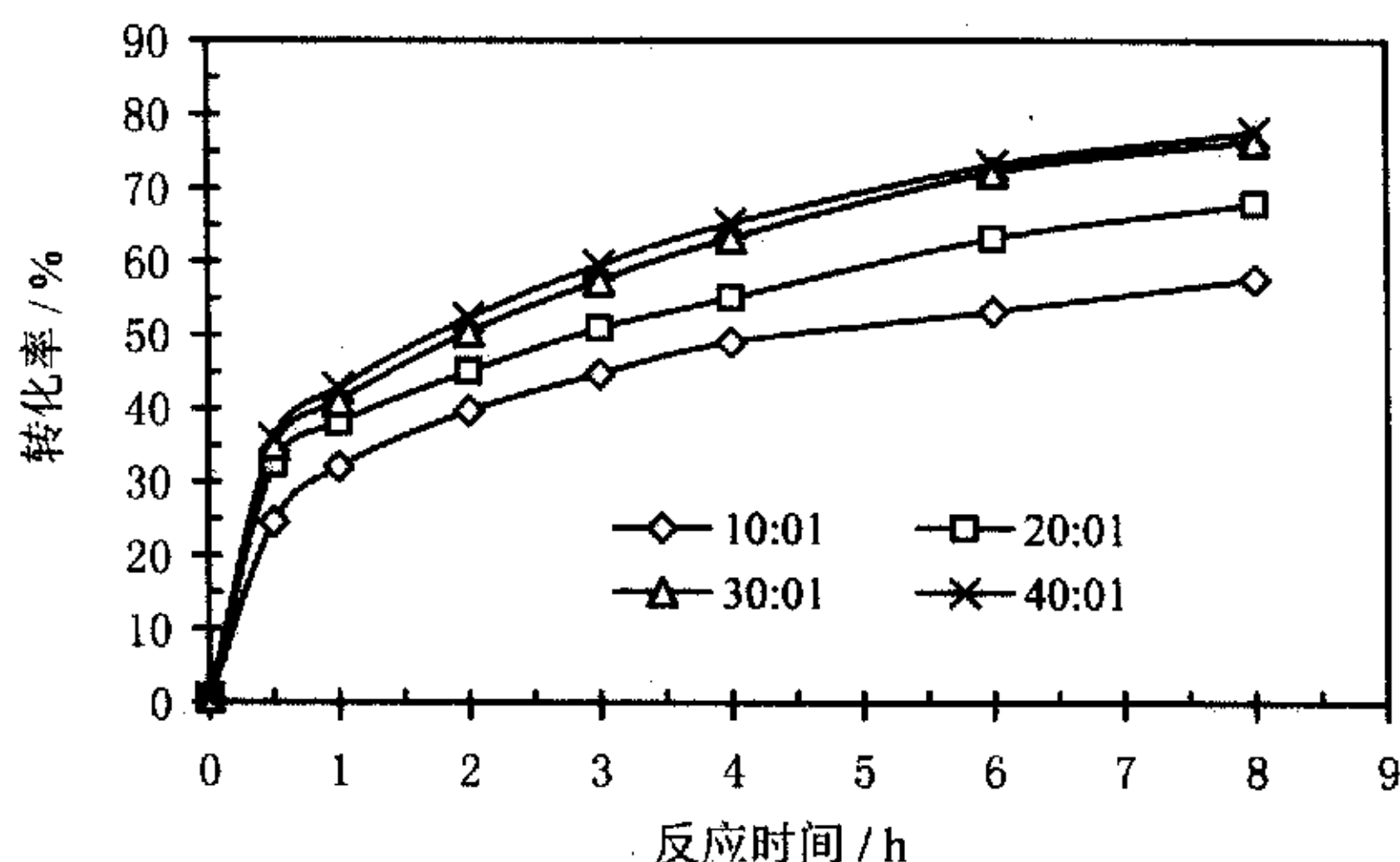


图 2.5 N-lipase 为催化剂，不同水/亚麻油摩尔比时的实验结果

Figure 2.5 The relationship of time-conversion at various molar ratio of water/linseed for N-lipase

需要注意的是，N-lipase 是固定化的 1,3 位专一性脂肪酶，其催化油脂水解反应时专一性地水解 1,3 位上的酯基，因此油脂水解反应的最大理论转化率为 66%。但图 2.5 中的实验数据表明：反应物摩尔比大于 20:1 后，水解反应转化率均超过了该极限值。

其原因在于，反应过程中，中间产物甘油二酯、甘油单酯分子内连接于 β 位（2 位）的脂肪酸链和连接于 α 位（1 位和 3 位）的脂肪酸链之间存在平衡关系。当连接于 α 位上的脂肪酸链在脂肪酶的作用下水解后，上述平衡被打破，随后， β 位上的脂肪酸链向 α 位迁移，并被 N-lipase 催化水解所致。类似的实验现象在以后的 N-lipase 催化水解反应中多次出现，其原因可能与此相同，因此不在赘述。

酶用量

图 2.6 是反应物摩尔比为 30:1、反应温度 67.5 $^{\circ}\text{C}$ ，不同反应时间内催化剂 N-lipase 用量与转化率之间的关系曲线，其中曲线 4 h 表示反应时间为 4 h 时的 N-lipase 用量与转化率关系图；曲线 8 h 表示反应时间为 8 h 时的 N-lipase 用量与转化率关系图。以曲线 4 h 为例，可以看出反应转化率随 N-lipase 用量增加而逐渐升高，但也不是成比例的一直增加。产生上述现象的原因在于：当反应体系中 N-lipase 浓度过高时会发生团聚现象，进而降低了其在反应体系中的分散度，限制了催化性能最大程度地发挥。

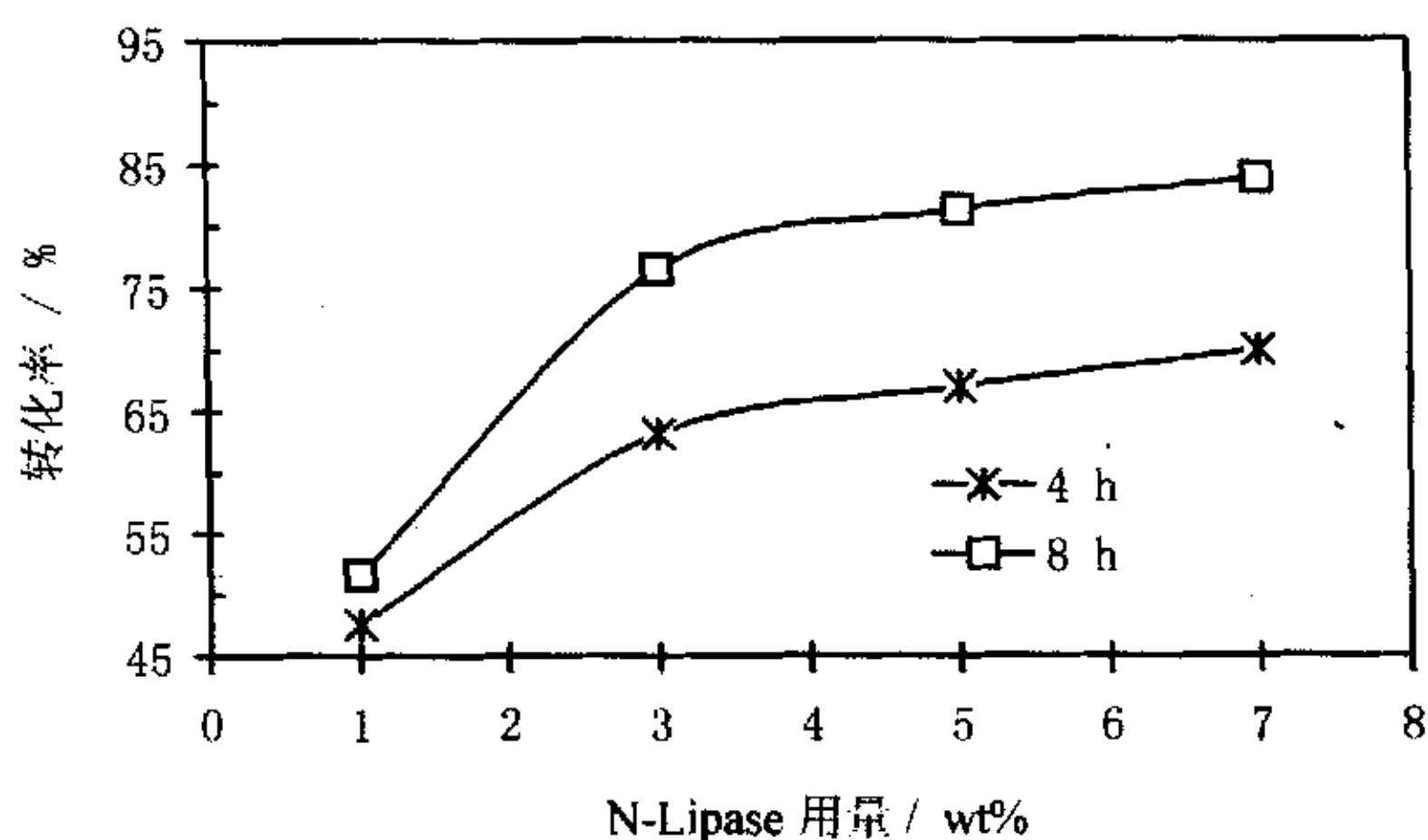


图 2.6 反应物摩尔比 30:1、反应温度 67.5 $^{\circ}\text{C}$ ，N-lipase 用量与转化率关系图

Figure 2.6 The relationship of time-conversion at various N-lipase loads

反应温度

温度是影响亚麻油水解反应速率及脂肪酶催化活性的重要因素。升高温度，可以增加水和亚麻油的互溶程度，增强反应混合物的流动性，减小传质阻力，有利于水解反应进行。但是，对于酶催化反应，还应考虑生物酶的最佳使用温度范围^[9]。图 2.7

是水/亚麻油摩尔比 30:1、N-lipase 用量 5 wt%、不同反应时间条件下的温度/转化率关系图。从图中可以看出：N-lipase 的活性温度范围为 45~75 °C，最大活性温度和完全失活温度分别为 67.5 °C 和 80 °C。

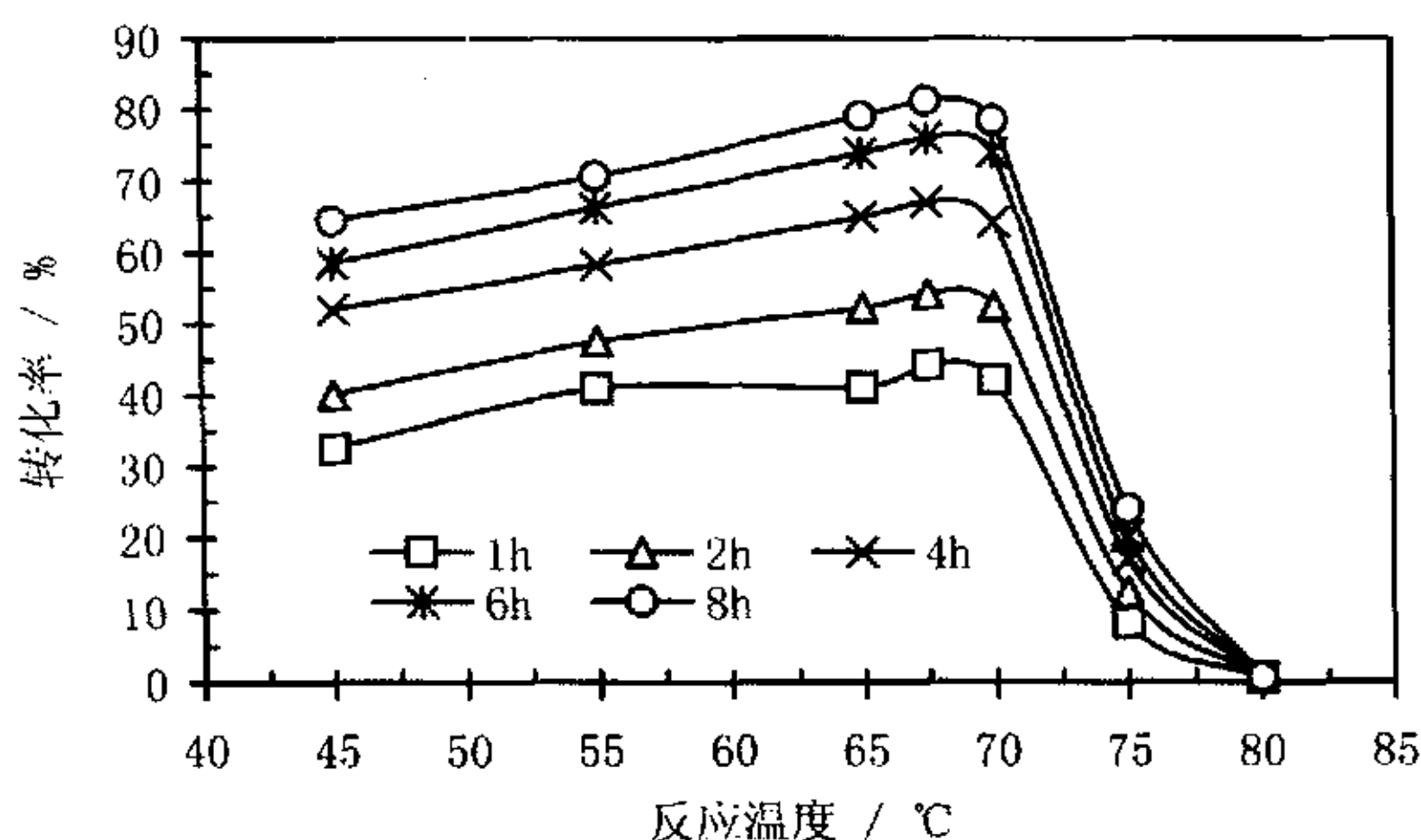


图 2.7 反应物比例 30:1、N-lipase 用量 5 wt%、不同反应温度条件下的转化率图

Figure 2.7 The relationship of temperature-conversion at various times for N-lipase

2.6 两种脂肪酶催化性能的比较

实验中所用的两种脂肪酶在来源及是否固定化等方面存在一定差异。因此尽管二者在各自的最佳反应条件下催化亚麻油水解时的反应速度率相差不大，但二者的使用温度范围和最大活性温度却各不相同。

2.6.1 催化活性温度范围比较

对于所研究的酶催化亚麻油水解反应体系来说，当反应物摩尔比、脂肪酶用量等其他条件确定后，反应温度则成为影响酶催化活性的最关键因素。又因为酶的催化活性与反应转化率成线性关系，因此本文通过测定水解反应的转化率来判定酶的催化活性高低。表 2.2 和表 2.3 是分别以 L-lipase、N-lipase 为催化剂时，不同反应时间下的实验结果。可以看出：L-lipase 催化亚麻油水解反应的活性范围为 20~43 °C，最大活性温度为 35 °C，完全失活温度为 45 °C；而 N-lipase 的活性温度范围为 45~75 °C，最大活性温度和完全失活温度分别为 67.5 °C 和 80 °C。两种脂肪酶存在上述差异的原因在于：第一，两种酶分子内的各种高级构象不同；第二，由于 N-lipase 是固定化脂肪酶，大

量的酶分子吸附于硅胶载体的内外表面, 在受热条件下分子链自由旋转受到限制, 使其在相同温度下, 失活几率减小。

表 2.2 反应温度对 L-lipase 催化的水解反应转化率的影响^a

Table 2.2 Influence of temperature on the L-lipase catalyzed hydrolysis of linseed oil

	20 °C	33 °C	35 °C	37 °C	41 °C	43 °C	45 °C
2 h	40.0	45.1	51.4	50.4	47.4	29.2	0.64
4 h	47.3	56.3	64.5	59.3	58.0	33.2	0.64
8 h	56.0	63.9	74.8	67.7	65.5	38.2	0.64

^a实验条件: 反应物摩尔比 30:1、L-lipase 用量 5 wt%。

因此, N-lipase 的活性温度范围、最大活性温度和完全失活温度均高于 L-lipase。此外, 从表中的数据还可以看出, 随着温度的升高, 二者催化活性的变化规律基本一致: 在一定反应时间内, 转化率随反应温度增加而逐渐升高, 说明在该区间内脂肪酶的活性构象正在逐步展开, 催化活性位逐渐暴露。当温度达到最大活性温度时, 脂肪酶催化活性达到极值, 之后, 随反应温度的升高而迅速降低, 直至为 0, 这说明维持酶催化活性的三维构象正逐渐变型直至坍塌, 脂肪酶完全失去活性。

表 2.3 反应温度对 N-lipase 催化的水解反应转化率的影响^a

Table 2.3 Influence of temperature on the N-lipase catalyzed hydrolysis of linseed oil

	45 °C	55 °C	65 °C	67.5 °C	70 °C	75 °C	80 °C
2 h	40.1	47.6	52.3	54.3	52.5	12.4	0.64
4 h	52.1	58.3	65.0	67.0	64.3	17.0	0.64
8 h	64.5	70.6	79.1	81.3	78.4	24.0	0.64

^a实验条件: 反应物摩尔比 30:1、N-lipase 用量 5 wt%。

2.6.2 最佳实验结果比较

图 2.8 是常压无溶剂体系中, 反应物摩尔比 30:1, 脂肪酶用量 5 wt%时, 两种脂肪酶分别在其最佳催化活性温度下的实验结果比较。

其中曲线 N-lipase 表示以 N-lipase 为催化剂, 反应温度 67.5 °C 时的实验结果; 曲

线 L-lipase 表示以 L-lipase 为催化剂，反应温度 35 °C 时实验结果。可以看出，在相应的最佳反应条件下，无溶剂体系中两种脂肪酶催化的亚麻油水解反应具有几乎相同的反应速率。但以 L-lipase 为催化剂的水解反应温度远远低于以 N-lipase 为催化剂的反应温度。因此，对于无溶剂体系中的酶催化亚麻油水解反应，L-lipase 是较 N-lipase 更为合适的催化剂。

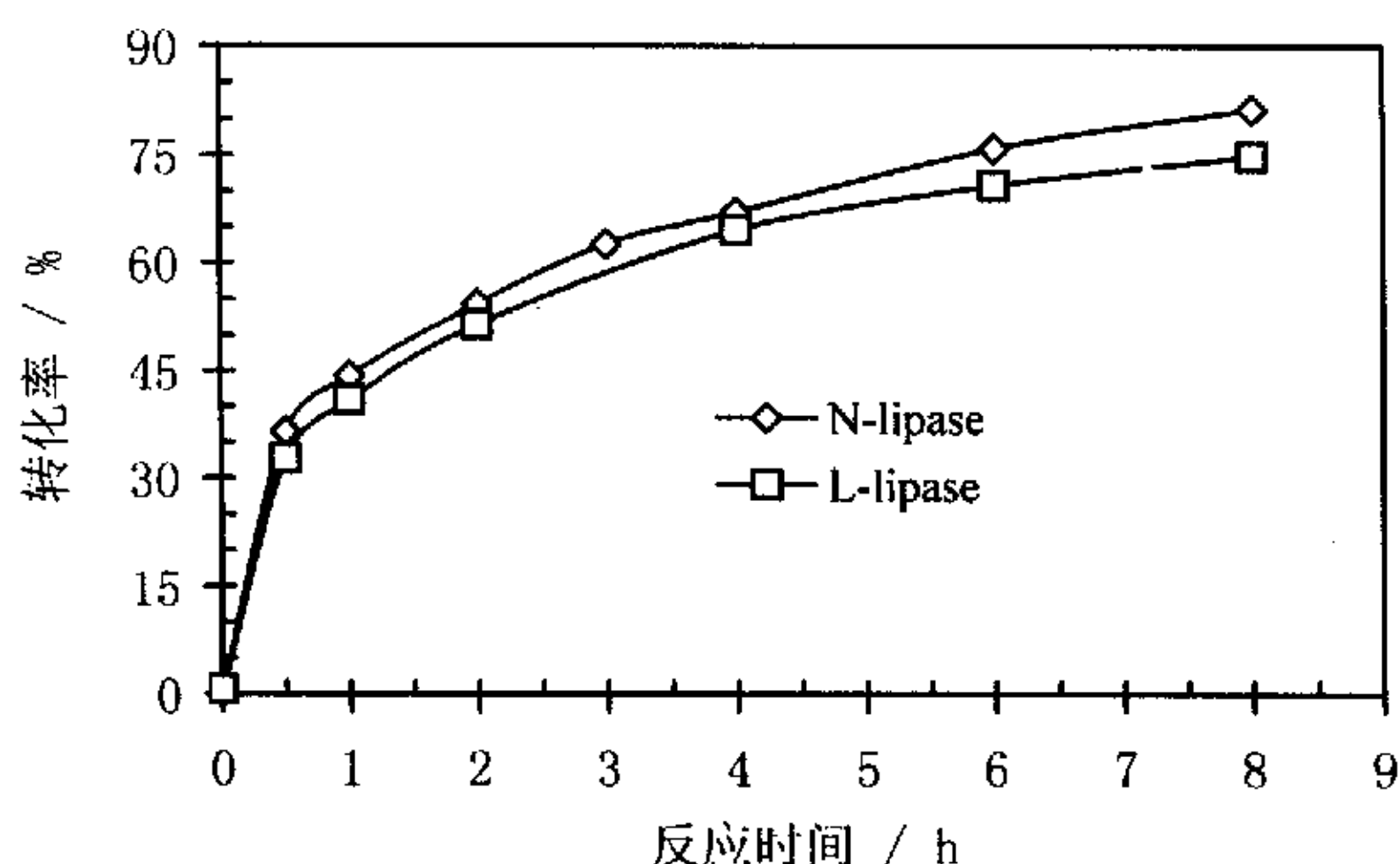


图 2.8 最佳催化活性温度下，两种脂肪酶催化亚麻油水解反应结果

Figure 2.8 The experiment result of different lipase at their optimized reaction temperature

2.7 常压处理过的脂肪酶的反应结果

为了解脂肪酶在无溶剂体系中催化亚麻油水解反应时的失活机理，本文考察了 L-lipase 经过常压无水条件下，恒温 45 °C（反应体系中完全失活温度）处理 24 h 后的催化活性；考察了恒温 80 °C（反应体系中完全失活温度）处理 24 h 后 N-lipase 的催化活性。

图 2.9 中曲线 A 表示 L-lipase 为催化剂，反应温度 35 °C，反应物摩尔比 30:1，脂肪酶用量 5 wt% 时的实验结果；曲线 B 表示以常压、恒温 45 °C（反应体系中完全失活温度）处理 24 h 后的 L-lipase 为催化剂，在 A 给定条件下的实验结果；曲线 C 表示 L-lipase 为催化剂，反应温度 45 °C，反应物摩尔比 30:1，脂肪酶用量 5 wt% 时的实验结果。图 2.10 中曲线 A 表示 N-lipase 为催化剂，反应温度 67.5 °C，反应物摩尔比 30:1，脂肪酶用量 3 wt% 时的实验结果；曲线 B 表示以常压、恒温 80 °C（反应体系中完全失

活温度) 处理 24 h 后的 N-lipase 为催化剂, 在 A 给定条件下的实验结果: 曲线 C 表示 N-lipase 为催化剂, 反应温度 80 °C, 反应物摩尔比 30:1, 脂肪酶用量 3 wt% 时的实验结果。

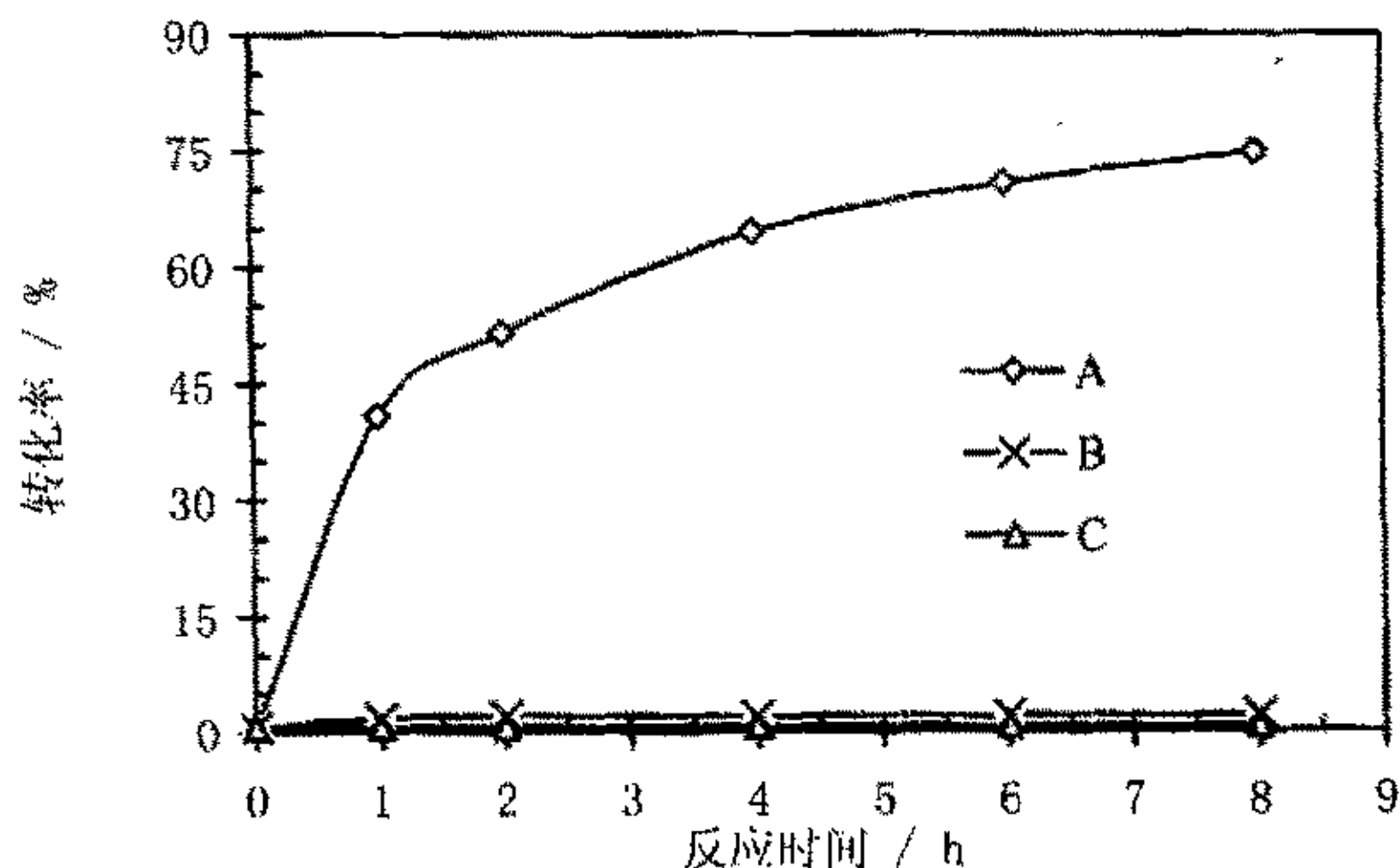


图 2.9 不同状态下的 L-lipase 催化亚麻油水解反应性能比较

Figure 2.9 The catalyze capability of L-lipase at different state in the reaction of linseed oil hydrolysis

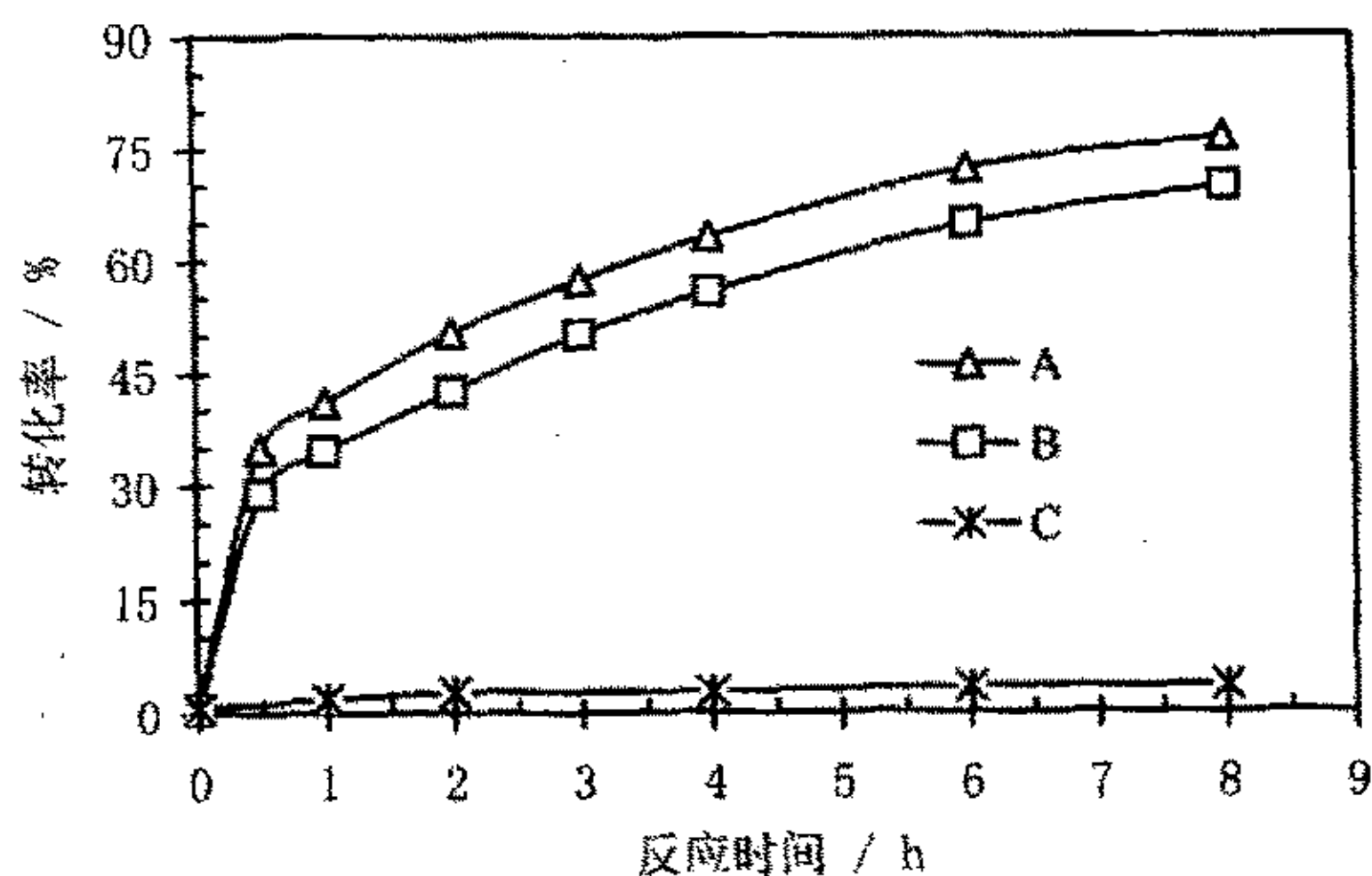


图 2.10 不同状态下的 N-lipase 催化亚麻油水解反应性能比较

Figure 2.10 The catalyze capability of N-lipase at different state in the reaction of linseed oil hydrolysis

由图 2.9 和图 2.10 中的曲线 B 可以看出, 两种脂肪酶在常压无水条件下, 以反应体系中各自完全失活温度处理 24 h 后, 在相应的最佳实验条件下催化亚麻油水解反应时, L-lipase 已完全失活, 而 N-lipase 却仍能保持较高的催化活性。上述现象的发生与

酶的含水量及酶是否固定化有关。首先, 二者的含水量不同, 经测定 L-lipase 含水量为 9.2%, N-lipase 含水量仅为 4.4%。由于 L-lipase 含水量较高, 因此, 在常压下, 以其在反应体系中相应的完全失活温度处理时, L-lipase 可能会发生图 1.5 给出的各种有水参与地失活反应^[19]; 而 N-lipase 由于含水量较低, 减少了发生上述各种反应的几率。另外一个可能的原因在于 N-lipase 是固定化脂肪酶。由于脂肪酶是长链大分子, 因此当温度升高时, 分子内的各种化学键振动、转动频率加剧, 会导致分子链断裂, 或活性中心 α -螺旋结构变形^[20]。N-lipase 经固定化后和载体之间发生了比较强的相互作用, 分子链的振动、转动受到一定限制而不易断裂, 且活性中心结构变形几率降低。N-lipase 在 80 °C 的反应体系中完全失活, 则可能也与反应体系中的水直接参与酶的失活反应有关。

2.8 小结

本章考察了两种脂肪酶在常压无溶剂体系中催化亚麻油水解反应的实验结果, 并比较了高温处理对二者催化活性的影响, 结论如下:

- (1) 无溶剂体系中 L-lipase 催化的亚麻油水解反应, 适宜温度、L-lipase 用量、水/亚麻油摩尔比分别为 35 °C、5 wt% 和 30:1;
- (2) 无溶剂体系中 N-lipase 催化的亚麻油水解反应, 适宜温度、N-lipase 用量、水/亚麻油摩尔比分别为 67.5 °C、3 wt% 和 30:1;
- (3) 在相应的最佳实验条件下, 无溶剂体系中两种脂肪酶催化的亚麻油水解反应具有几乎相同的反应速率和催化活性;
- (4) 在常压无水条件下, 对于 L-lipase, 恒温 45 °C (反应体系中完全失活温度) 处理 24 h 后, 其催化活性完全丧失; 而对于 N-lipase, 恒温 80 °C (反应体系中完全失活温度) 处理 24 h 后, 其催化活性仍保持较高水平。

参考文献:

- [1] 阿鲁楚尼亚恩. H. C. 油脂加工工艺 第 1 版. 北京: 中国商业出版社 1990, 223~230.
- [2] 夏宗建. 亚麻油中 α -亚麻酸的分离提纯. 中国专利: CN1162009A, 1997-10-15.

- [3] 曹淑桂. 有机溶剂中酶催化研究的新进展. 化学通报, 1995, 15(5): 5~12.
- [4] 彭立凤. 有机溶剂对酶催化活性和选择性的影响. 化学进展, 1997, 12(3): 296~304.
- [5] Douglas A. M. Kinetics of Lipase-catalyzed Interesterification of Triglycerides in Cyclohexane. Enzyme Microb. Technol., 1991, 13 (2): 98~103.
- [6] Helga G. Lipase-catalyzed Alcoholysis with Supercritical Carbon Dioxide Extraction 1. Influence of Flow Rate. J. AM. Oil Chem. Soc., 1997, 74: 1483~1490.
- [7] Michael A. J, Jerry W. K. Ethanolysis of Seed Oil in Flowing Supercritical Carbon Dioxide. J. AM. Oil Chem. Soc., 1996, 73: 353~356.
- [8] Mittelbach M. Lipase-catalyzed Alcoholysis of sunflower oil. J. AM. Oil Chem. Soc., 1990, 67: 168~170.
- [9] Berger M., Laumen K. S. Enzymatic Esterification of Glycerol. Lipase-Catalyzed synthesis of Regioisomerically Pure 1,3 s, n-Diacylglycerols. J. Am. Oil Chem. Soc., 1992, 69: 955~960.
- [10] Selmi B., Gontier E., Ergon F., Barbotin J. N., D. Thomas. Lipase-Catalyzed synthesis of Tricaprylin in a Medium Solely Composed of substrates. Water Production and Elimination. Enzyme Microb. Technol. 1997, 20: 322~325.
- [11] Boulbaba S. Immobilized Lipase-catalyzed Ethanolysis of Sunflower Oil in a Solvent-free Medium. J. Am. Oil Chem. Soc., 1998, 75 (6): 691~695.
- [12] Selmi B., Gontier E., Ergon F., Thomas D. Enzymatic Synthesis of Tricaprylin in a Solvent-free System: Lipase Regiospecificity as Controlled by Glycerol Adsorption on Silica Gel. Biotechnol. Techn. 1997, 11: 543~547.
- [13] Gandhi. N. N, Sawant. S. B., Joshi J. B. Studies on the Lipozyme-catalyzed synthesis of butyl Laurate, Biotechnol Bioeng. 1995, 56: 1~12.
- [14] GB/T 5530-1998, 中华人民共和国国家标准 植物油脂检验 酸价测定法[S].
- [15] GB/T 5534-1995, 中华人民共和国国家标准 植物油脂检验 皂化价测定法[S].
- [16] 盛梅, 曹国民. 蚕丝固定化脂肪酶催化猪油水解. 中国油脂, 1999, 24(4): 36~38.
- [17] 王康, 何志敏, 范庆军. 有机相中壳聚糖-海藻酸钠固定化脂酶的特性. 化学工程, 2001, 29(5): 39~42.
- [18] Mittelbach. M. Lipase-catalyzed Alcoholysis of Sunflower Oil. J. AM. Oil Chem. Soc., 1990, 67: 168~170.
- [19] Klibanov A. M., Oxender D. L., Fox C. F., Protein Engineering, Alan R. Liss, New York, 1987.
- [20] Shireesh S, Giridhar M. Short Communication Hydrolysis of p-nitrophenyl laurate in Supercritical Carbon Dioxide: comparison of two different enzymes. Journal of Technology and Biotechnology, 2001, 76: 890~892.

第三章 高压二氧化碳介质中酶催化亚麻油水解反应研究

3.1 引言

目前,常用的酶催化反应介质有水、有机溶剂(丙酮、正己烷等)、超临界流体(主要为超临界二氧化碳, SCCO_2)。由于油脂在水中的溶解度小及微生物污染等问题,以水为反应介质的酶催化反应受到了一定限制。近年来有研究表明酶在有机溶剂中能够保持良好的催化活性^[1],因此人们选用有机溶剂代替水为酶催化反应介质。但有机溶剂存在如下问题:其一,较大的多相传质阻力限制了反应速率的提高;其二,溶剂残留降低了产品质量,被“绿色食品”市场所不容;另外,有机溶剂较高的价格使产品成本大为增加。

作为酶催化反应介质之一,超临界二氧化碳(SCCO_2)因具有如下优点^[2]而日益受到人们的重视:

- (1) 二氧化碳廉价、阻燃、化学惰性;
- (2) SCCO_2 具有高扩散系数、低粘度和低表面张力等特性,可有效降低反应过程中的传质阻力,有利于反应进行;
- (3) 二氧化碳的临界温度($T_c=304.19\text{ K}$)接近室温,临界压力($P_c=7.382\text{ MPa}$)也比较适中,操作安全;
- (4) 以 SCCO_2 为反应介质,反应后期的产物提纯与溶剂分离过程简单;
- (5) SCCO_2 无毒,随着人类对自身健康和环境保护的日益重视,它的应用前景将更为广阔。

由于超临界二氧化碳具有上述优点,因此,越来越多的研究人员将其作为酶催化反应介质。

1985年, Randolph^[3]等人以 SCCO_2 为反应介质研究了碱性磷脂酶催化 p-硝基磷酸苯酯水解反应。这是迄今为止报导最早的以 SCCO_2 为介质的酶催化反应研究之一。但有关 SCCO_2 中酶催化亚麻油水解反应的研究尚未见报导。本章以两种脂肪酶(L-lipase, N-lipase)为催化剂,考察了反应物摩尔比、脂肪酶用量、反应温度、二氧化碳压力等

因素对亚麻油水解反应速率及转化率的影响,得到了该反应的最优条件及脂肪酶的最佳使用温度;另外,比较了两种脂肪酶在常压、高压下催化亚麻油水解反应的结果;考察了经高温、高压处理的 N-lipase 催化活性。本章的研究内容,将为开发高附加值 α -亚麻酸产品生产工艺提供基础数据。此外,鉴于超临界二氧化碳在分离方面的优越性,本文希望通过探讨高压二氧化碳介质中酶催化水解反应的最佳条件,为后期进行反应分离一体化研究工作做准备。

3.2 实验

3.2.1 原料与试剂

两种脂肪酶分别由深圳市绿微康生物工程有限公司 (Leveking lipase, 以 **L-lipase** 表示,微生物发酵生产,无选择性,未固定化)和诺维信 (Novozymes) (沈阳)生物加工有限公司广州分公司 (**Lipozyme® TL IM** *Thermomyces lanuginosa* lipase, 基因改良性米曲霉,经微生物深层发酵生产,1,3 位专一,固定化于颗粒状硅胶,以 **N-lipase** 表示)提供,使用前均未作任何处理。亚麻油为 SCCO_2 萃取所得,经分析测试,各项指标均符合国家标准(GB 8235-87)。二氧化碳(食品级),山西宜虹气体工业有限公司提供,(纯度 99.9%);无水乙醇(分析纯),北京精细化学品有限公司生产(纯度大于 99.0%);乙醚(分析纯),天津化学试剂一厂(纯度大于 99.0%)。

3.2.2 实验设备

离心机(上海云楼医用仪器厂生产,800 型);电动搅拌器(上海标本模型厂制造,JB50-D 型);GS 型磁力搅拌高压釜(威海化工器械有限公司制造,容积 250 mL);精密天平(北京光学仪器厂制造,DT-100A 型,精度 0.0001 g)。

3.2.3 反应装置

水解反应在搅拌式高压釜内进行,实验装置如图 3.1 所示。该装置由二氧化碳供给系统、250 mL 高压釜和控温水浴系统等几部分组成。

3.2.4 实验操作

将亚麻油与水按一定比例混合,装入高压釜中,水浴加热到设定温度后加入定量脂肪酶,密封,用低压二氧化碳排除反应釜和管路中的空气,调节二氧化碳压力到设

定值，同时开启搅拌并记时。反应过程中定时取样，所取样品置于试管中，并快速放入 80 °C 水中加热 2 min，使脂肪酶变性失活停止反应。离心分离除去水和脂肪酶，取油层测其酸价，计算转化率。

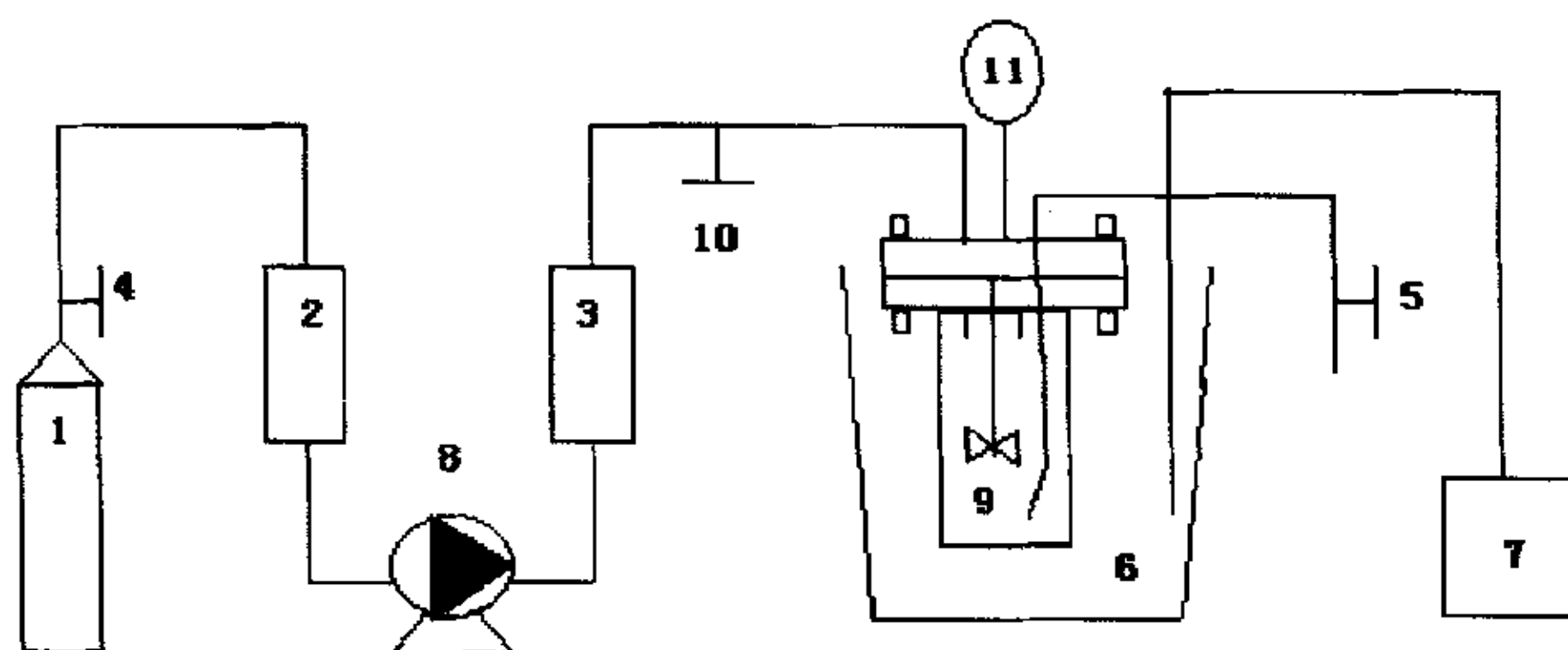


图 3.1 高压二氧化碳介质中酶催化亚麻油水解反应装置图

1. CO₂ 气瓶, 2. 制冷系统, 3. 预热系统, 4. 截至阀, 5. 取样阀, 6. 恒温水浴装置, 7. 控温装置, 8. 高压柱塞泵, 9. 250 mL 高压釜, 10. 微调阀, 11. 压力表

Figure 3.1 Schematic diagram of enzyme-catalyzed hydrolysis reaction in high-pressure carbon dioxide

1. CO₂ cylinder; 2. Cooling system; 3. Preheater system; 4. Shut-off valve; 5. Sample collect valve; 6. Water bath equipment; 7. Thermocouple thermometer; 8. Liquid pump; 9. 250 mL Autoclave; 10. Check valve; 11. Pressure gauge

3.2.5 反应方程式

反应方程式请参见本论文第 2.4.2 小节。

3.2.6 分析方法

所用分析方法及原理与本论文第 2.4.3 小节相同。

3.3 结果与讨论

亚麻油水解反应过程中，影响反应速率的因素较多，如温度、压力、反应物摩尔比等。另外，酶催化反应还具有其他常规催化反应不同的特点。本实验选用两种不同来源的脂肪酶作为催化剂，考察了二者催化亚麻油水解反应过程中的上述各影响因素，并将所得的部分结果与常压下的实验结果进行了比较。

3.3.1 高压二氧化碳介质中 L-lipase 催化亚麻油水解反应研究

水/亚麻油摩尔比

亚麻油水解反应过程中,反应物摩尔比是影响反应速率及转化率的重要因素之一。因此,实验中希望通过增加反应体系中水含量提高水解转化率。但水/亚麻油比例过高,会导致产物与原料分离难度增加。图 3.2 是反应温度 35 °C、二氧化碳压力 7.5 MPa、亚麻油和 L-lipase 用量为 30 g 和 2.42 g 时,不同水用量(以水/亚麻油摩尔比计)时的反应时间/转化率关系图。

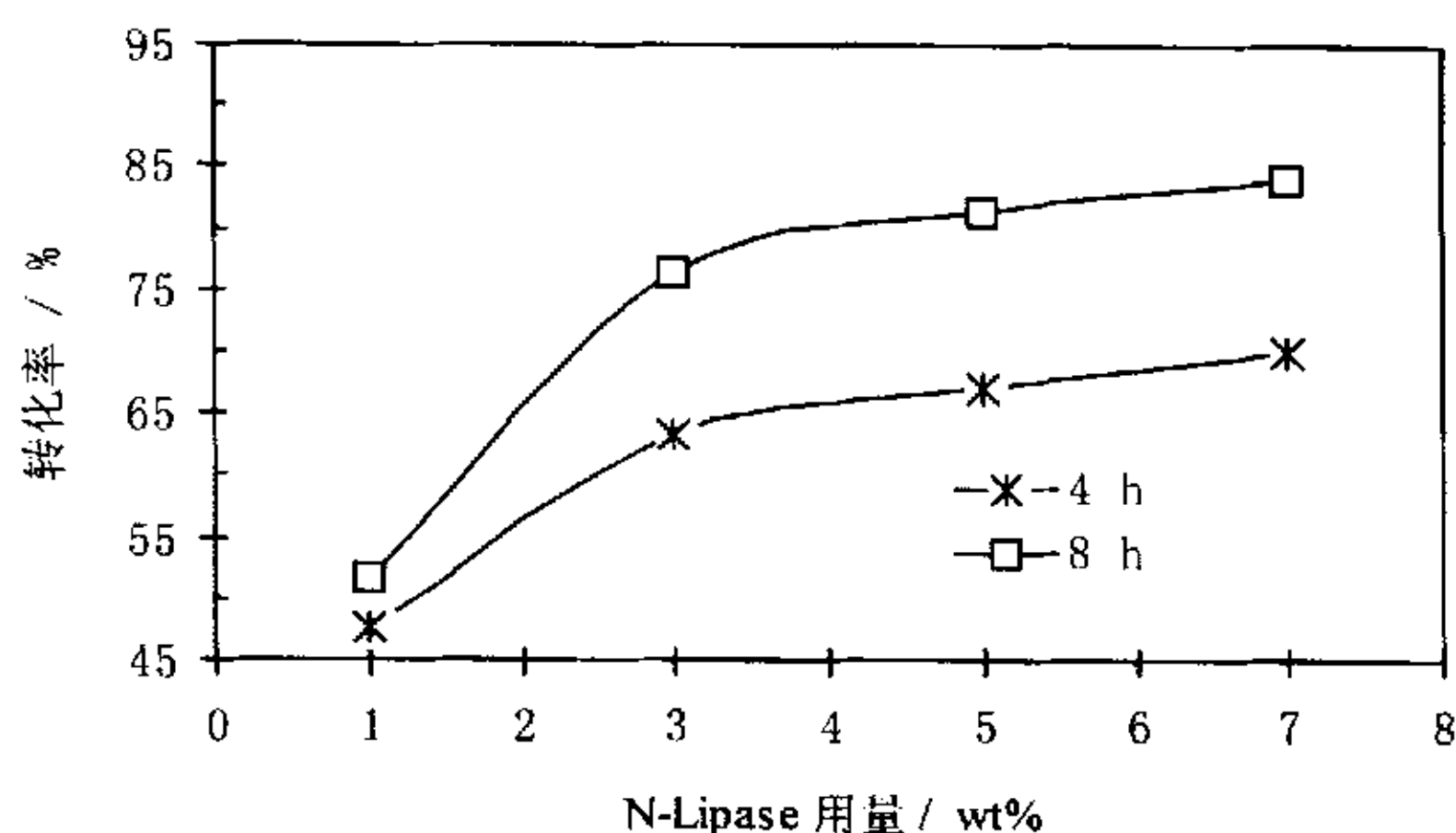


图 3.2 L-lipase 为催化剂,不同水/亚麻油摩尔比条件下的时间/转化率图

Figure 3.2 The relationship of time-conversion at various molar ratio of water/linseed for L-lipase

可以看出,随着水/亚麻油摩尔比增加,相同时间内的转化率在 20:1 处出现最大值,反应物摩尔比高于或低于此值,转化率均下降;反应物比例为 10:1 和 30:1 时,二者的转化率几乎相同;当反应物比例由 30:1 增加到 40:1 时,相同时间内的转化率明显降低。产生上述现象的原因在于:一方面,当反应物摩尔比低于 20:1 时,体系中水含量的增加推动了反应进行;同时,由于水解反应发生在油水界面上,过量的水可溶解稀释生成的甘油,降低了其在油水界面的浓度,同样推动水解反应进行。另一方面,当水/亚麻油比例超过 20:1 后,上述两种因素的影响接近极限,此时,增大水的用量会导致反应体系中催化剂相对含量偏低,降低反应速度。例如,与反应物摩尔比为 20:1 时相比,反应物摩尔比为 40:1 时,相同质量的 L-lipase (2.42 g) 由占反应物总质量的 5.7 wt % 降低为 4.4 %,催化剂含量降低使反应速率降低。另外,可以看出当反应历时 48 h 后,反应物摩尔比为 30:1 和 20:1 时的转化率相差不大。因此,为了能与常压下所得的数据做比较,本文在考察其它因素时,水/亚麻油比例固定为 30:1。

L-lipase 用量

图 3.3 是反应温度 35 °C、压力 7.5 MPa、水/亚麻油摩尔比 30:1、不同 L-lipase 用量条件下的时间/转化率图。可以看出,对于 L-lipase 催化的亚麻油水解反应,当其他条件确定后,相同反应时间内,酶用量越高转化率越高。以 24 h 时的转化率为例,酶用量为反应物总质量 2 wt% 时,转化率仅为 24.9%;酶用量增至 7 wt% 时,转化率则高达 42.5%。但实验过程中发现脂肪酶用量过高会使反应物、生产物和脂肪酶形成糊状物,导致分离困难;此外,实际生产过程中脂肪酶用量过高,生产成本相应增加。因此,适宜的 L-lipase 用量为 5 wt% 左右。

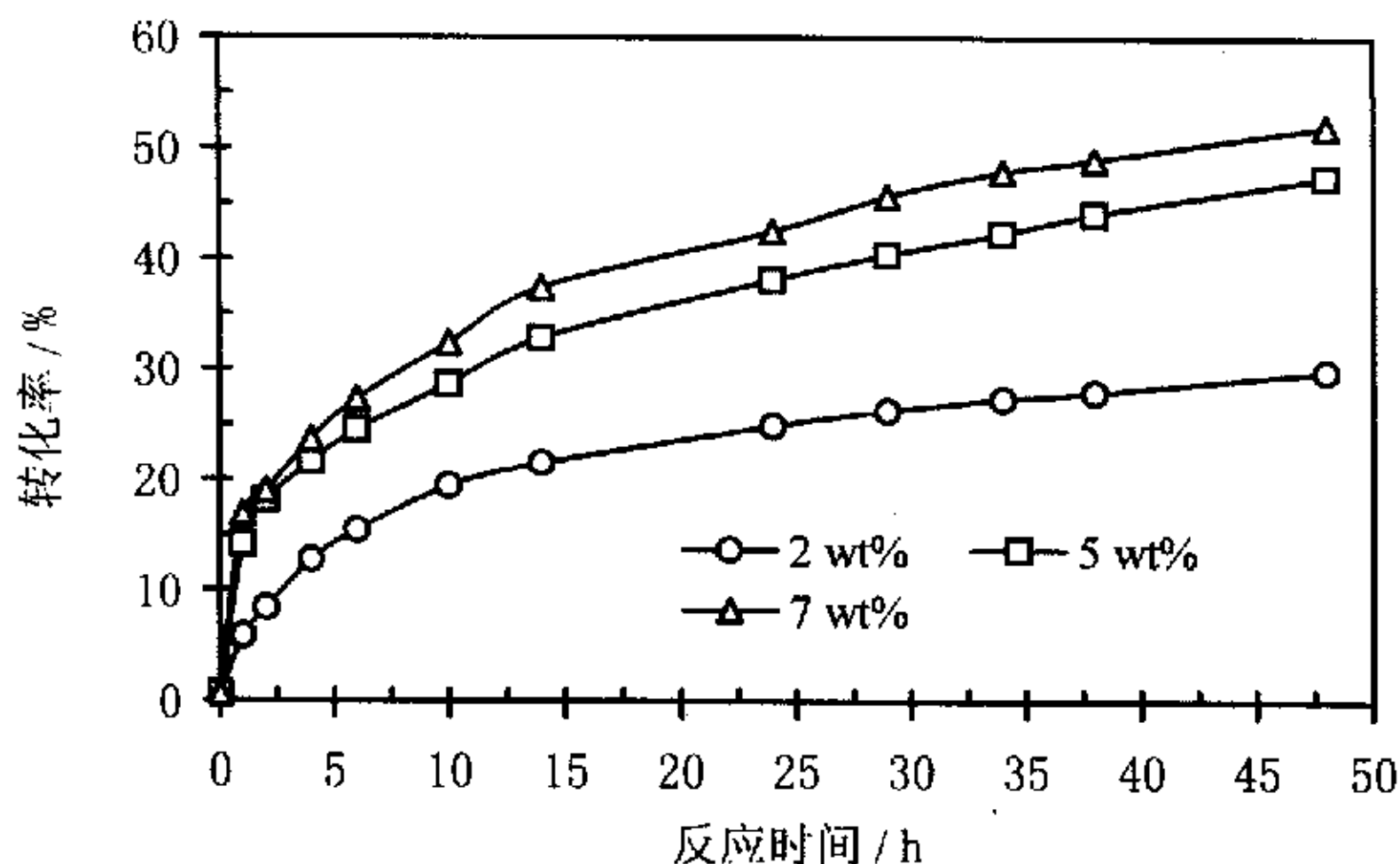


图 3.3 不同 L-lipase 用量条件下的时间/转化率图

Figure 3.3 The relationship of time-conversion at various L-lipase loads

温度

温度是影响亚麻油水解反应转化率及酶催化活性的另一重要因素。碱皂化法、无催化剂法等油脂水解时,升高温度可以增加水和油脂的互溶度,增强反应混合物的流动性,减小传质阻力,有利于水解反应进行。但对于高压二氧化碳介质中的酶催化水解反应,还应考虑超临界流体的“温度负效应”以及脂肪酶的最佳使用温度范围^[3]两个因素的影响。图 3.4 中系列 A、B、C、D 为超临界二氧化碳介质中,水/亚麻油摩尔比为 30:1、L-lipase 用量 5 wt%、二氧化碳压力 7.5 MPa 条件下反应历时 4、10、24、48 h 后所得的实验结果。可以看出,当其他条件确定后,延长反应时间,转化率增高;此外,随反应温度升高, L-lipase 活性变化规律为:对于图中任一系列,初始阶段,转

化率随反应温度增加而逐渐上升,说明在该区间内脂肪酶的活性构象正在逐步展开,催化活性位逐渐暴露;当温度达到最大活性温度时,脂肪酶催化活性达到极值;之后,随温度升高,脂肪酶催化活性快速下降,相同时间内的转化率相应降低,这说明维持酶催化活性的三维构象正逐渐变形直至坍塌,L-lipase 逐步失活^[4]。由图中给出的数据可知,高压二氧化碳中酶催化亚麻油水解反应的最大活性温度为 37 °C。

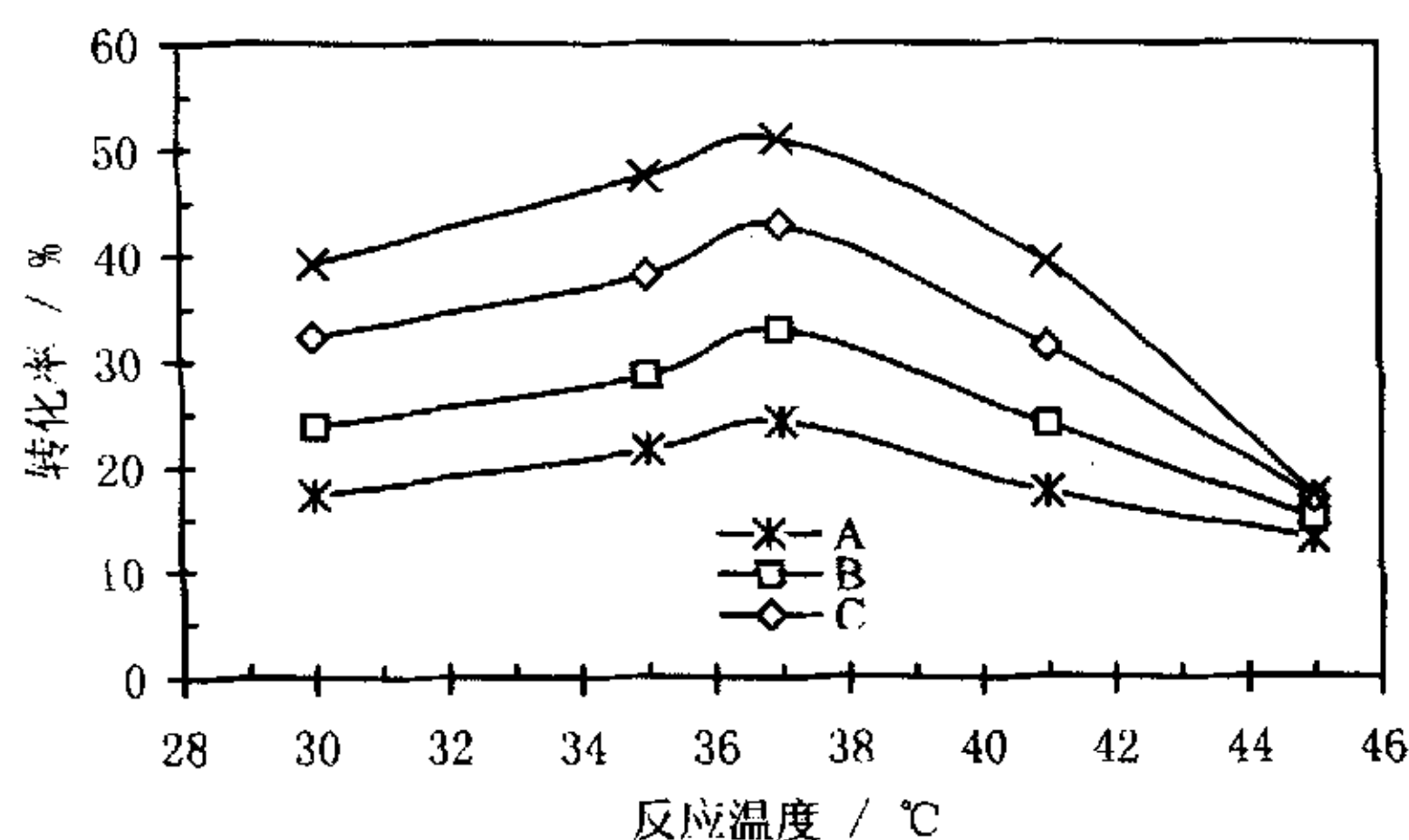


图 3.4 高压二氧化碳介质中 L-lipase 催化亚麻油水解的温度/转化率图

Figure 3.4 The relationship of temperature-conversion at various times for L-lipase

二氧化碳压力

超临界流体 (SCF) 中酶催化反应的常见问题之一是: 高压下维持酶活性的二级构象发生变化, 导致酶催化活性降低或完全失活。但也有研究表明^[5], 以超临界二氧化碳为反应介质, 一般情况下其压力不足以产生上述作用。

图 3.5 是水/亚麻油摩尔比 30:1、L-lipase 用量 5 wt%、反应温度 35 °C、不同二氧化碳压力下的时间/转化率关系图。结果表明, 当压力处于 3.5~7.5 MPa 区间内, 相同反应时间内的转化率随压力升高而降低。原因在于: 第一, 亚麻油水解过程中生成自由脂肪酸 (FFA), 而二氧化碳使反应体系的酸性增强, 对水解反应产生不利影响, 且在一定范围内, 二氧化碳压力越高上述作用越明显。第二, 高压下, 大量的二氧化碳溶解于维持酶活性构象的“必需的水”中, 导致其 pH 值偏离脂肪酶的最佳使用 pH 范围, 使酶的活性下降。L-lipase 的最佳使用 pH 范围在 7.5~11.5 之间, 而二氧化碳可使反应体系的 pH 值降为 3.8 以下, 因此压力升高 L-lipase 活性降低。另外, Kamat S^[6-7]

等人的研究表明, 高压下二氧化碳在酶活性部位的浓度增加, 并与其生成不稳定的氨基甲酸酯配合物, 可能是导致高压二氧化碳介质中酶催化活性较低的另一重要因素。

另外一个值得注意的实验现象是: 超临界条件下所得的两组实验结果表明, 压力由 7.5 MPa 提高到 8.5 MPa, 在一定时间内对水解反应速率无任何影响, 只是压力为 8.5 MPa 时, 水解反应转化率较低。考虑到低于临界压力时, 二氧化碳的溶解能力较小, 很难进行亚麻油水解反应分离一体化实验操作。因此, 考察其他条件对反应的影响时, 本文将反应压力确定为 7.5 MPa。

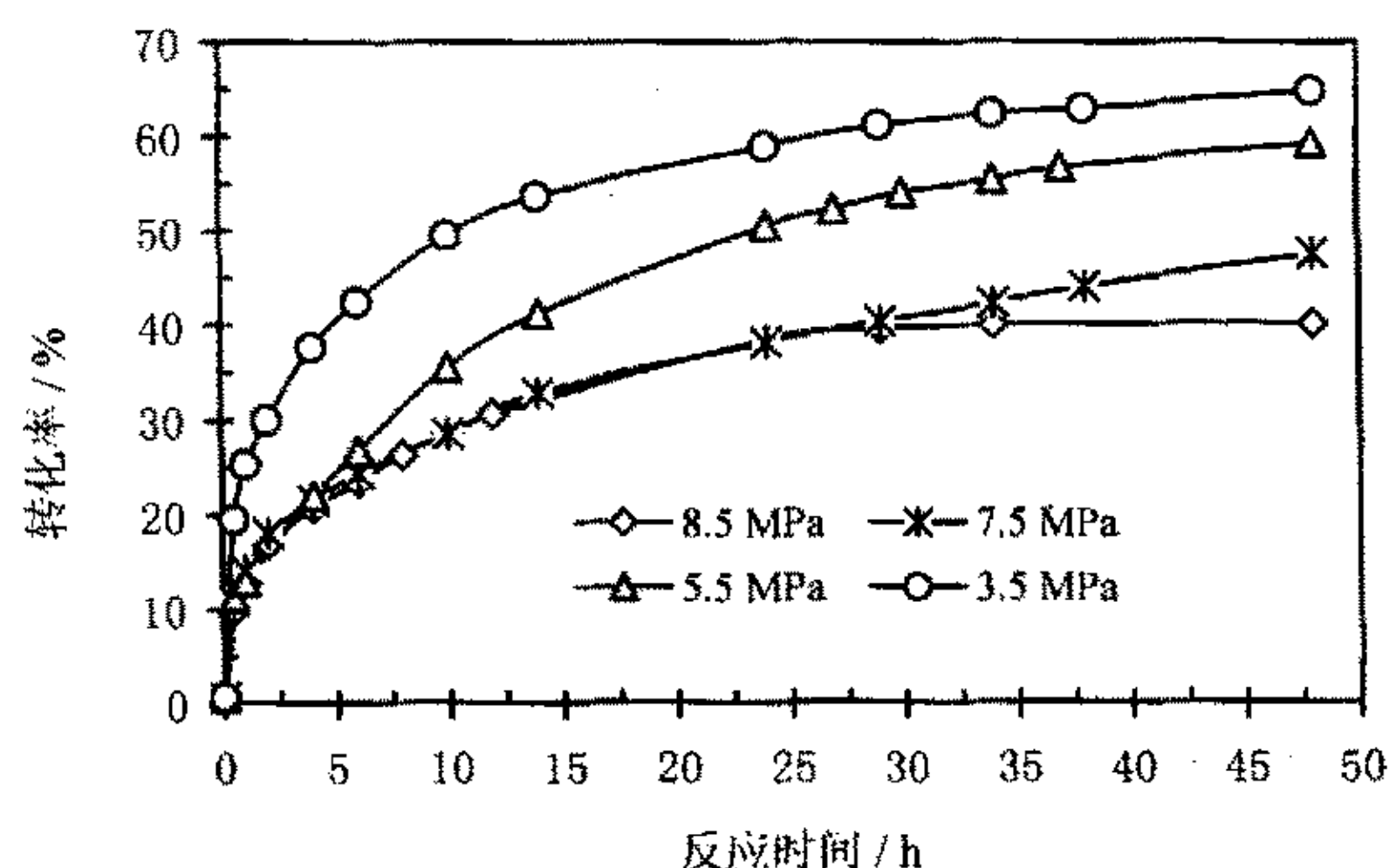


图 3.5 L-lipase 为催化剂, 不同二氧化碳压力下反应时间/转化率图

Figure 3.5 The relationship of carbon dioxide pressure-conversion at various times for L-lipase

添加物及共溶剂

已有的研究表明, 向体系中加入添加物或共溶剂会对反应速率及转化率产生一定的影响。本文考察了向体系中加入硅胶、乙醇等物质对水解反应的影响, 结果列于表 3.1, 其中 1[#] 为水/亚麻油摩尔比 30:1, L-lipase 用量 5 wt%, 反应温度 35 °C, 二氧化碳压力 7.5 MPa, 反应历时 24 h 的结果。2[#] 反应条件与 1[#] 相同, 只是向体系中又加入了与 L-lipase 等质量的硅胶。可以看出, 与 1[#] 比较, 加入硅胶后转化率由 38.13% 上升为 41.15%。原因在于硅胶对聚集在脂肪酶活性位附近的极性物质有一定的吸附作用, 这有利于催化活性位与底物亚麻油的充分接触, 从而提高了催化剂的催化效率^[8]。3[#] 为相同反应条件下, 反应介质为乙醇饱和的二氧化碳, 可以看出加入乙醇后转化率

上升,这是因为乙醇提高了二氧化碳的极性,促进了其对水等极性底物的溶解,有效提高了超临界二氧化碳相中的反应物浓度,反应速度加快。Rasndolph T W^[9]等在SCCO₂中研究胆甾醇氧化酶催化胆甾醇氧化反应时发现:加入乙醇可以改变反应物或催化剂的聚集状态,使其更好的分散于反应体系中,提高反应速率,这可能是3[#]实验结果中转化率较高的另一个原因。4[#]为相同条件下,向体系中加入与L-lipase等质量CaCl₂后的结果。据文献报导^[10-11],少量的Ca²⁺是一种较好的脂肪酶激活剂。但从本实验结果看,加入CaCl₂后,脂肪酶的活性反而降低,其原因在于Ca²⁺与脂肪酶分子中具有催化作用的氨基酸残基发生络合作用,占据了酶的催化活性位,使其不能与底物充分接触所致。

表 3.1 添加物和共溶剂对水解反应转化率的影响

Table 3.1 Effect of additive and co-solvent on the conversion of hydrolysis

实验编号	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]
转化率 (%)	38.13	41.15	41.13	5.94

对照实验

反应压力 7.5 MPa, 反应温度 35 °C, 水/亚麻油摩尔比 30:1, 无 L-lipase 条件下搅拌 24 h, 将混合物离心分离, 取上层油样分析, 经测定, 其酸价与原料酸价一致, 说明其它实验结果中转化率上升为 L-lipase 催化亚麻油水解所致。

3.3.2 N-lipase 催化亚麻油水解反应研究

水/亚麻油摩尔比

如前所述, 反应物摩尔比是影响亚麻油水解反应速率及转化率的重要因素之一。图 3.6 是反应温度 50 °C、二氧化碳压力 7.5 MPa、N-lipase 用量 3 wt% 时, 不同水/亚麻油摩尔比条件下的反应时间/转化率关系图。可以看出, 在所考察的范围内, 相同时间内的转化率并未随水/亚麻油摩尔比增加而增加。水/亚麻油摩尔比为 20:1 和 30:1 时, 二者具有相同的转化率。当反应物摩尔比高于 30:1 时, 转化率随反应物摩尔比增加而降低。产生上述结果的原因与 L-lipase 催化亚麻油水解反应一致, 相关内容参阅 3.3.1 小节中内容, 此处不再赘述。

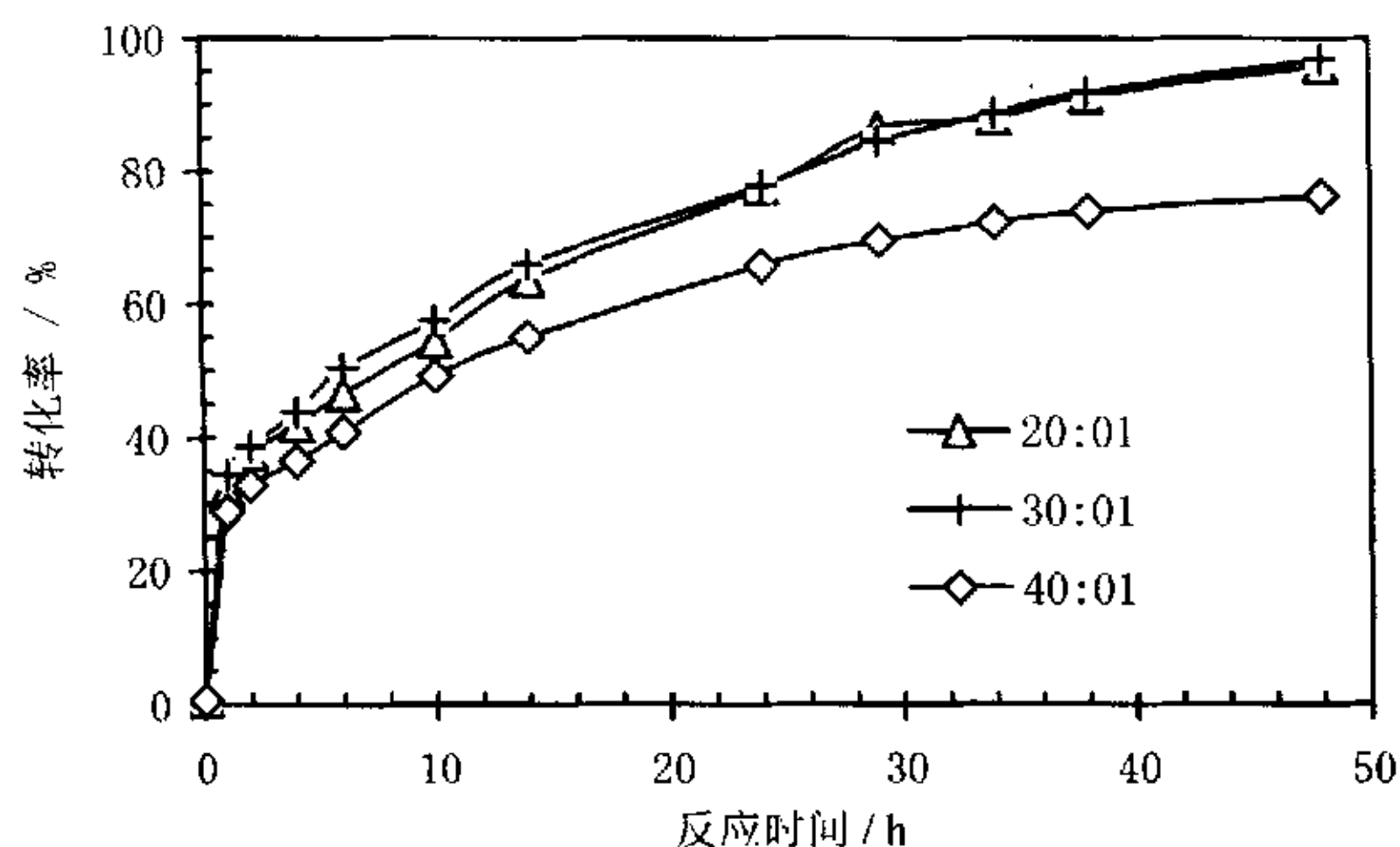


图 3.6 N-lipase 为催化剂, SCCO_2 介质中不同水/亚麻油摩尔比条件下的实验结果

Figure 3.6 The relationship of time-conversion at various molar ratio of water/linseed for N-lipase

温度

反应温度不仅影响到水解反应的速率, 还会影响脂肪酶的催化活性。图 3.7 是水/亚麻油摩尔为 30:1、N-lipase 用量 3 wt%、二氧化碳压力 7.5 MPa 时不同反应温度下的反应时间/转化率关系图。

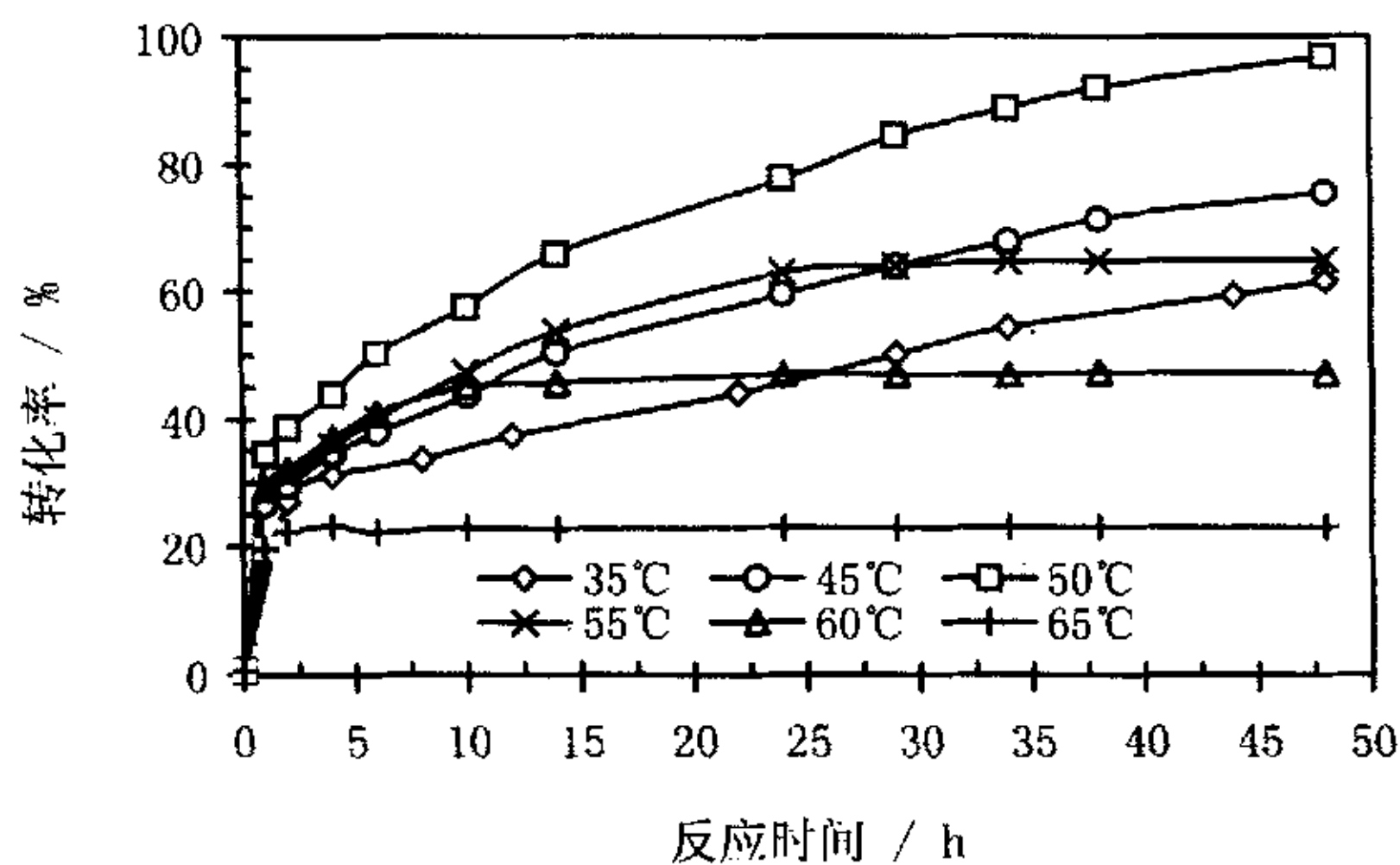


图 3.7 N-lipase 为催化剂, 高压二氧化碳介质中不同反应温度下实验结果

Figure 3.7 The relationship of temperature-conversion at various times for N-lipas

可以看出, 反应温度在 35~50 °C 区间内, 随着反应温度的升高, N-lipase 催化活

性逐渐升高,当温度达到 50 ℃时,酶催化活性达到极大值。此外,反应温度大于 50 ℃的三组实验结果表明,在 50~65 ℃区间内,反应温度升高,酶催化活性降低,且温度越高,N-lipase 失活速度越快。原因在于:反应温度升高,脂肪酶分子链的自由旋转和振动加剧,蛋白质变性速度加快,酶的失活几率和失活速度相应增加。

二氧化碳压力

二氧化碳压力是影响酶催化亚麻油水解反应速率的另一个重要因素。图 3.8 是水/亚麻油摩尔比 30:1、N-lipase 用量 3 wt%、反应温度 50 ℃、不同二氧化碳压力下的反应时间/转化率关系图。

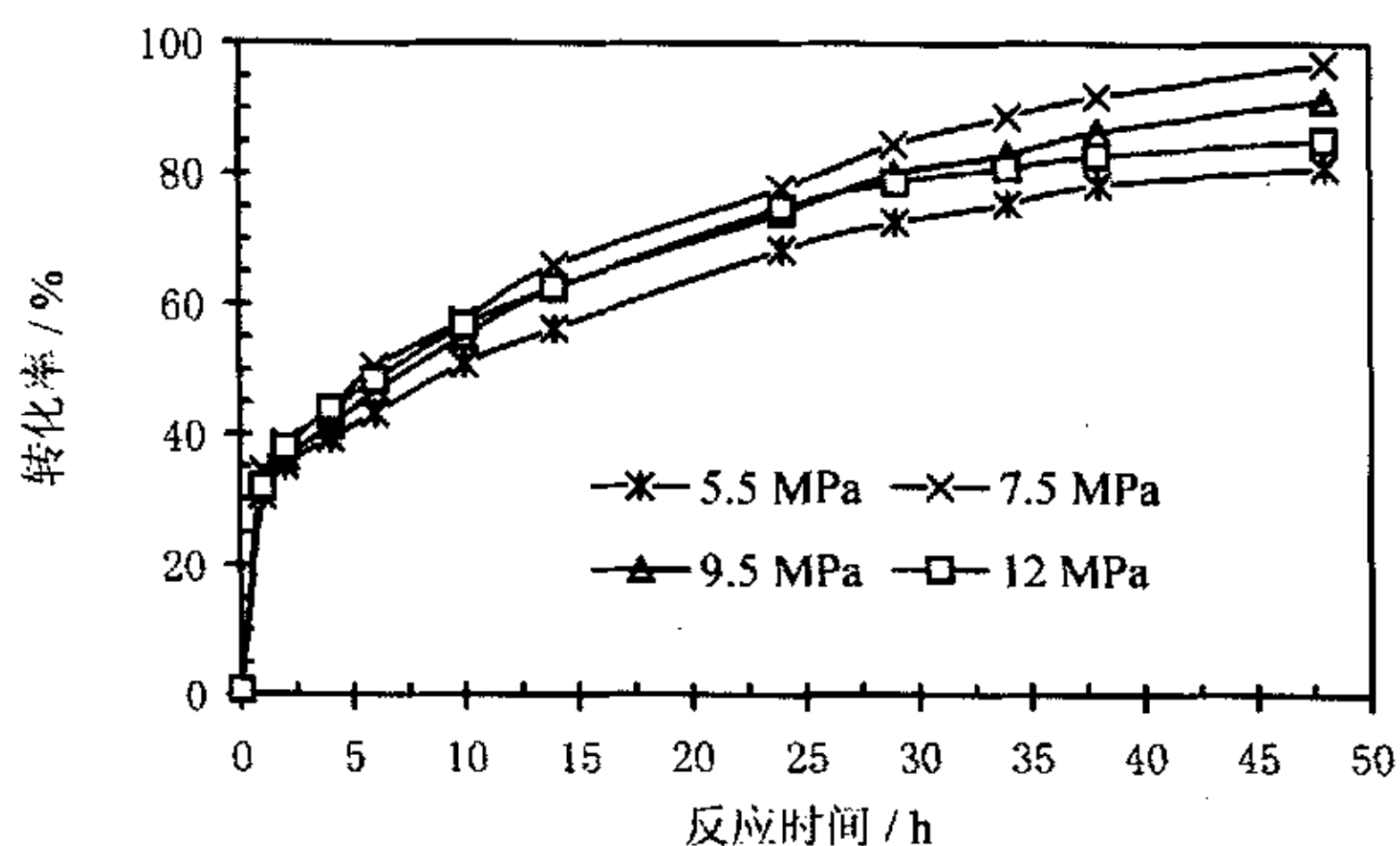


图 3.8 N-lipase 为催化剂, 不同二氧化碳压力下反应时间/转化率图

Figure 3.8 The relationship of carbon dioxide pressure-conversion at various times for N-lipase

图中数据表明,当二氧化碳压力由 5.5 MPa 增加到 7.5 MPa,即由高压气相区进入超临界相区时,相同时间内的转化率随压力升高而上升。原因在于:第一,超临界二氧化碳具有高扩散系数、低粘度和低表面张力等特性,可有效降低反应过程中的传质阻力,提高反应速率。第二,与反应物甘油三酯相比,生成物脂肪酸的分子量较小,其在超临界二氧化碳中的溶解度较高,从而富集于超临界二氧化碳相中,而反应物甘油三酯仍留在液相中,二者的分离有利于转化率的提高。然而,当反应压力由 7.5 MPa 增加到 12 MPa 时,相同时间内的转化率却逐渐降低。其可能的原因在于:当二氧化碳压力升至 7.5 MPa 时,上面提到的促进作用已达到极限,继续增加压力对反应已无明显作用;另外,根据 Kamat S^[6-7]等人的研究结果,高压下二氧化碳在酶活性部位的浓

度增加，并与其生成不稳定的氨基甲酸酯配合物，可导致酶催化活性较低。

3.3.3 高压下两种脂肪酶催化亚麻油水解反应的结果比较

L-lipase、N-lipase 在催化亚麻油水解时，具有不同的最佳反应条件和催化活性。图 3.9 给出了两种脂肪酶分别在其最大活性温度下的实验结果。可以看出，在反应初始阶段，两种情况下的反应转化率均迅速上升，随后二者的上升速率逐渐减缓。由图 2.8 中数据可知：常压下两种脂肪酶催化亚麻油水解反应过程中，水解反应具有几乎相同的反应速率及转化率。而图 3.9 中数据表明，高压二氧化碳介质中 N-lipase 为催化剂时的转化率明显高于 L-lipase 为催化剂时的结果，这说明在各自最大活性温度下，N-lipase 的催化活性高于 L-lipase。上述实验现象的原因可能在于，高压二氧化碳介质对 L-lipase 催化活性的不利影响更为显著，因此起在高压下的活性降低更为显著。另外，N-lipase 的最大催化活性温度与二氧化碳的临界温度之间的温差为 $18.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，比 L-lipase 的最大催化活性温度与二氧化碳的临界温度之间的温差大，这为以后的反应分离一体化研究提供了较大的温度调节范围。由此可见，对于超临界二氧化碳介质中的酶催化亚麻油水解反应，N-lipase 是相对较好的生物催化剂。

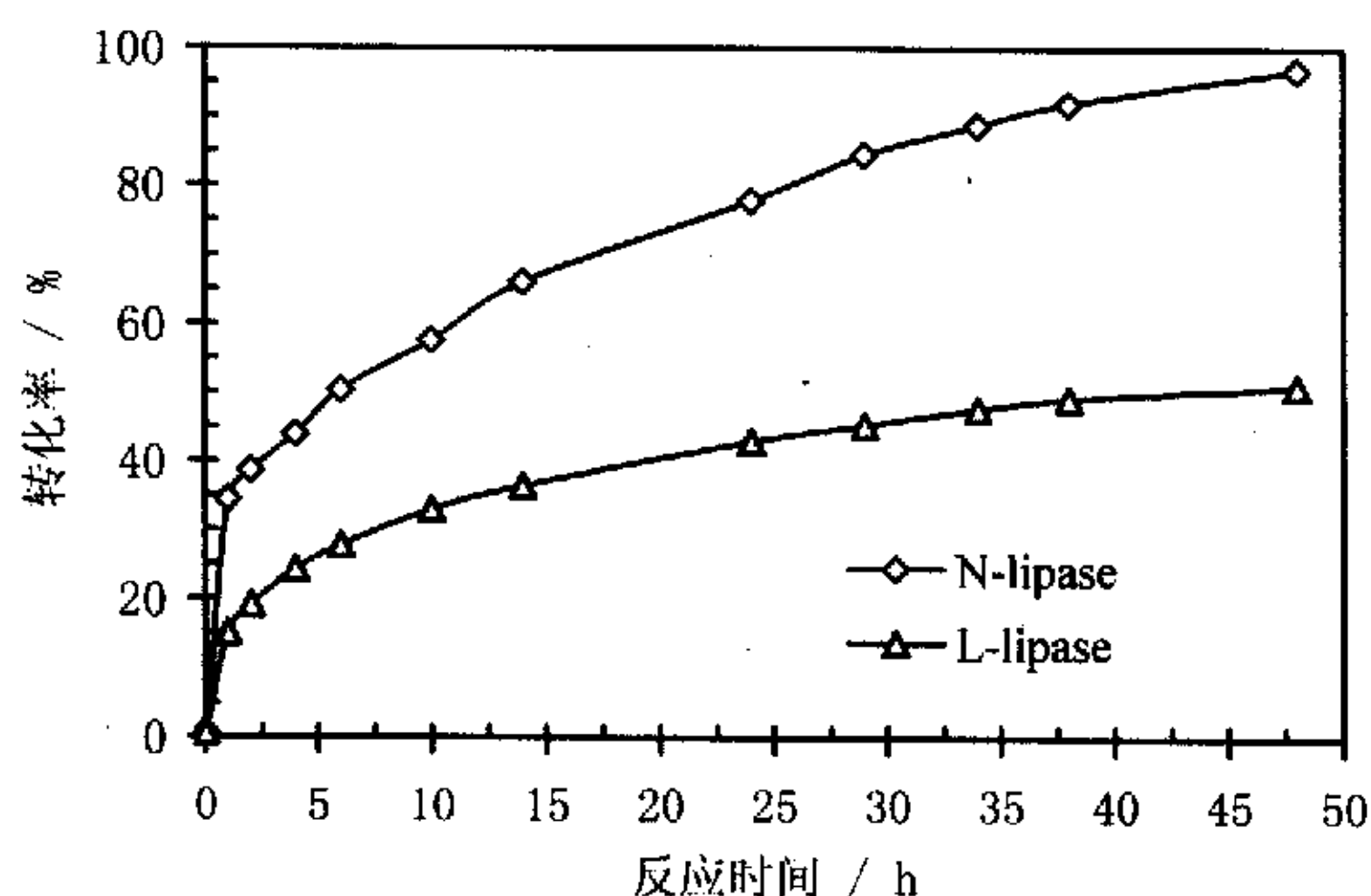


图 3.9 超临界二氧化碳介质中，最佳活性温度下两种脂肪酶催化性能比较

Figure 3.9 The catalyze ability of N-lipase and L-lipase in supercritical carbon dioxide at their optimized reaction temperatures

3.3.4 两种脂肪酶常压、高压下催化亚麻油水解反应结果比较

图 3.10 为 L-lipase 在常压无溶剂体系和高压二氧化碳介质中催化亚麻油水解反应

的结果比较。可以看出,常压和高压下的亚麻油水解反应转化率相差较大。以反应历时 6 h 为例,常压下转化率 (70.77%) 为高压二氧化碳介质中转化率 (27.87%) 的 2.54 倍。另外, L-lipase 在超临界二氧化碳中最大催化活性温度 (37 °C) 比在无溶剂体系中的最大催化活性温度 (35 °C) 高出 2 °C 的,原因在于:高压二氧化碳可与 L-lipase 分子发生相互作用,使其展开活性构象较无溶剂体系中困难^[4]。另外, 45 °C 时, L-lipase 在无溶剂体系中已完全失活,而在超临界二氧化碳介质中仍然具有部分催化活性,这可能仍与上述原因有关。综上所述,高压二氧化碳对 L-lipase 的催化活性产生不利影响,但对其热稳定性却有一定促进作用。

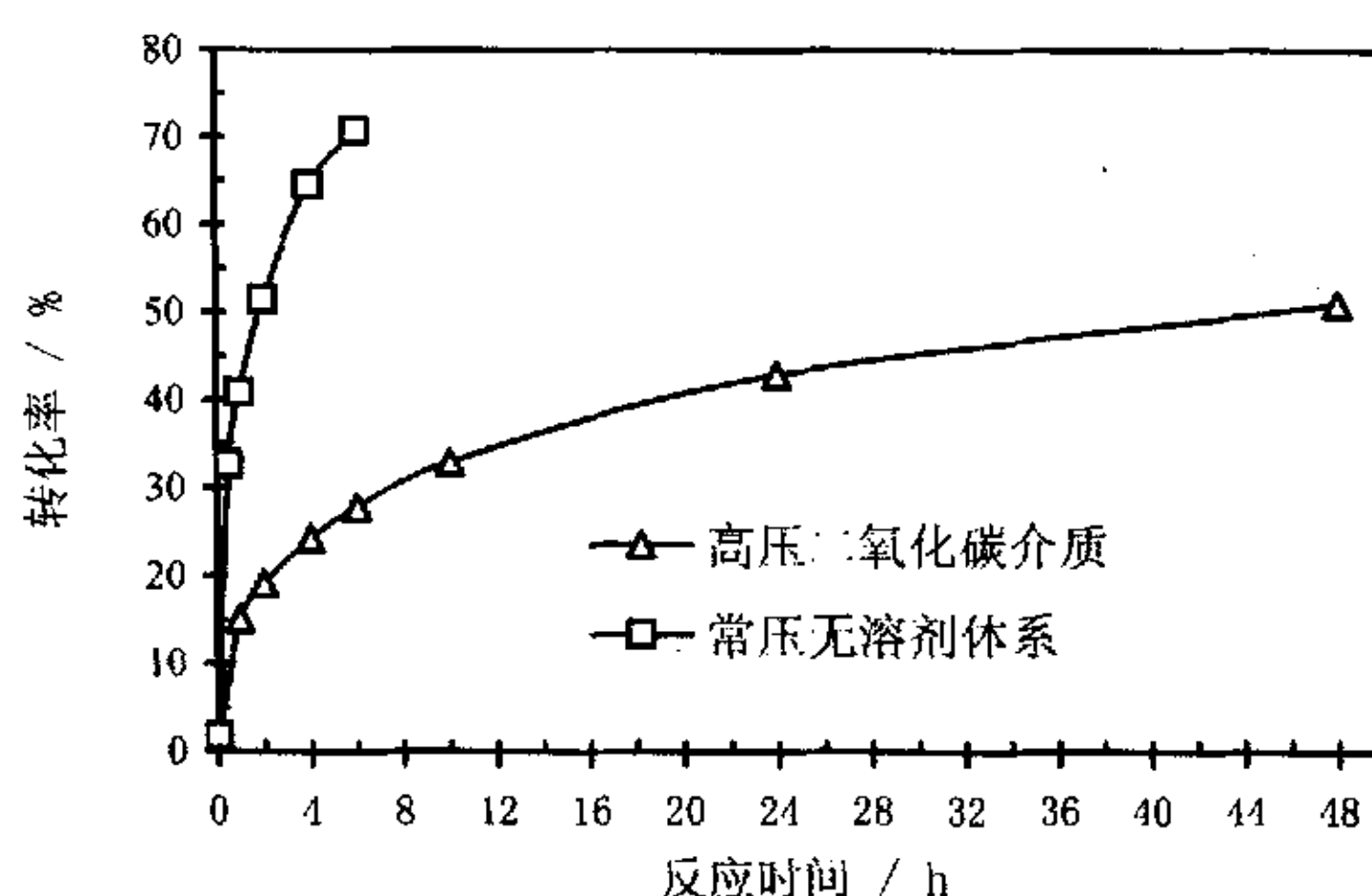


图 3.10 L-lipase 为催化剂, 常压无溶剂体系和高压二氧化碳介质中水解反应最佳结果比较

Figure 3.10 The optimized experiment results of hydrolysis at atmosphere pressure and high-pressure carbon dioxide for L-lipase

图 3.11 为 N-lipase 在常压无溶剂体系和高压二氧化碳介质中催化亚麻油水解反应时的结果。可以看出,与 L-lipase 比较, N-lipase 为催化剂时,常压和高压条件下的实验结果相差较小。仍以反应历时 6 h 为例,常压下转化率 (72.26%) 为高压二氧化碳介质中转化率 (50.37%) 的 1.43 倍。然而,与无溶剂体系中的最大催化活性温度 (67.5 °C) 相比, N-lipase 在超临界二氧化碳中的最大催化活性温度降低了 17.5 °C, 为 50 °C。可见高压二氧化碳对 N-lipase 的催化活性也有一定的不利影响,但它可以使 N-lipase 在相对较低的温度下达到最佳催化活性状态。产生上述结果的原因在于:超临界二氧化碳破坏了 N-lipase 催化剂的固定化结构,降低了 N-lipase 的热稳定性,使其在超临界二氧化碳介质中的催化活性温度降低。另外,与超临界二氧化碳介质中 L-lipase 催

化的亚麻油水解反应比较, 随反应时间延长 N-lipase 催化的亚麻油水解反应转化率一直呈上升趋势, 反应历时 48 h 后, 转化率接近 97%。可见, 以 N-lipase 为催化剂时, 超临界二氧化碳介质中的酶催化亚麻油水解反应分离一体化研究是可行的。

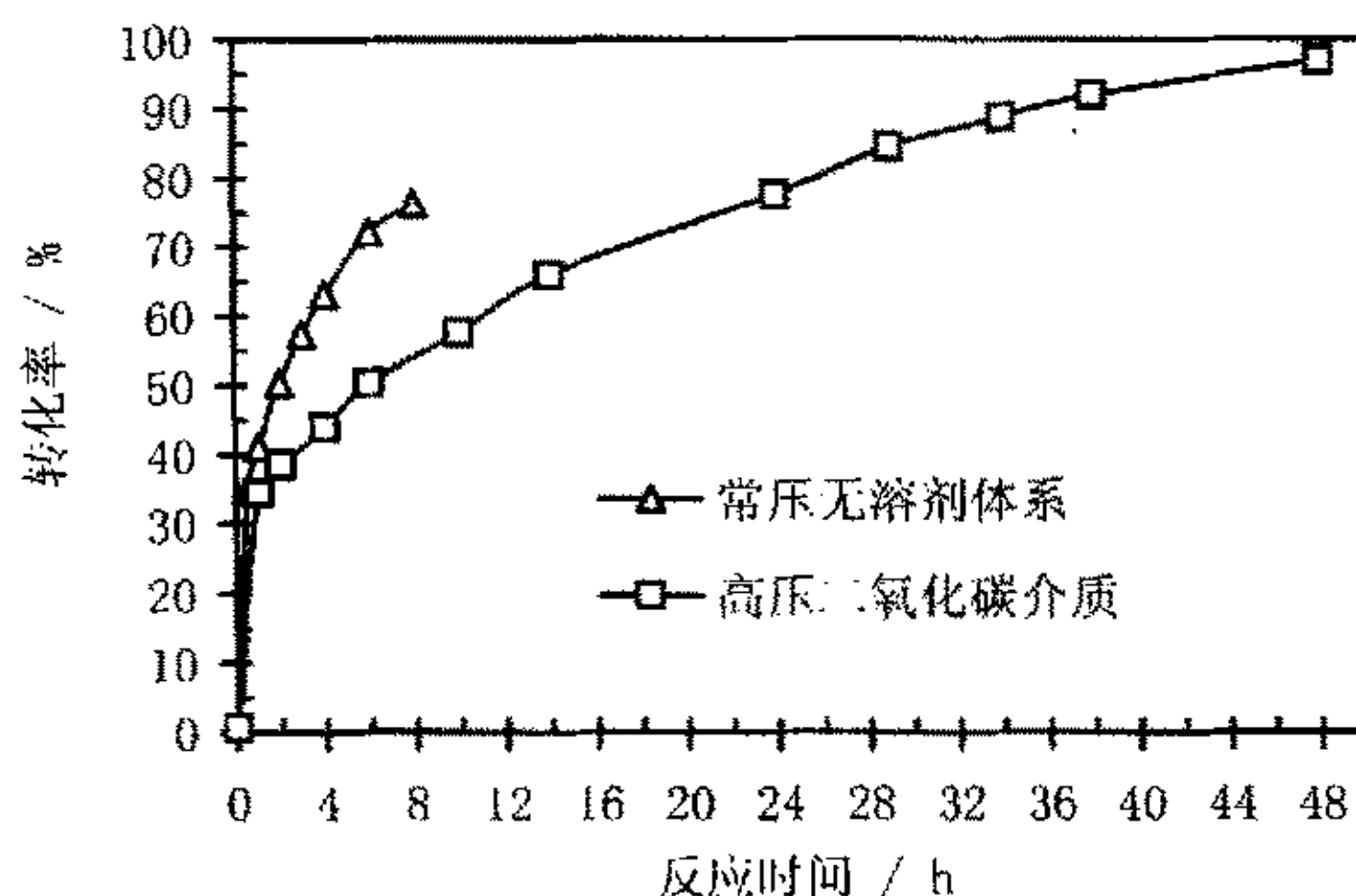


图 3.11 N-lipase 为催化剂, 常压无溶剂体系和高压二氧化碳介质中水解反应最佳结果比较

Figure 3.11 The optimized experiment results of hydrolysis at atmosphere pressure and high-pressure carbon dioxide for N-lipase

3.4 经高温、高压处理的 N-lipase 催化活性研究

有关超临界二氧化碳处理对酶催化活性的影响, 已有文献报导^[12], Taniguchi^[13]等研究了水含量为 5~7 wt% 的 R-淀粉酶、葡萄糖氧化酶、脂肪酶、过氧化氢酶, 经超临界二氧化碳处理后的活性。Hiroya Ishikawa^[14]等以圆二色性谱 (circular dichroism spectrum) 为表征手段, 研究了超临界二氧化碳处理的 (35 °C, 25 MPa, 30 min) 葡萄糖淀粉酶和酸性蛋白酶的催化活性与其分子中 α -螺旋结构间的关系, 结果表明: 酶的失活与超临界二氧化碳的温度和压力的协同作用有关, 分子中 α -螺旋结构分解和变形程度越大, 酶失活程度越大、活性越低。Chen^[15]等人利用相同的表征手段研究了高压二氧化碳中多酚氧化酶的失活, 结果与 Hiroya Ishikawa 等人的相符。

由上述文献中的研究结果可知, 经超临界二氧化碳处理后, 酶的催化活性降低。本实验过程中以 N-lipase 催化亚麻油水解反应为研究对象, 考察了高温、高压处理对酶催化活性的影响。图 3.12 中曲线 A 表示常压下, 反应温度 67.5 °C, 水/亚麻油摩尔比 30:1, N-lipase 用量 3 wt% 时的实验结果; 曲线 B 表示以超临界二氧化碳处理 (7.5

MPa, 67.5 °C, 恒温恒压 24 h 后, 缓慢降至常压) 后的 N-lipase 为催化剂, 其他反应条件与曲线 A 相同时的实验结果。曲线 C 表示以常压、高温处理 (80 °C, 恒温 24 h) 后的 N-lipase 为催化剂, 其他反应条件与曲线 A 相同时的反应结果。可以看出: 经超临界二氧化碳 (7.5 MPa, 67.5 °C) 处理后, N-lipase 的催化活性变化不大。而图 3.7 中给出的实验数据表明, 在相近的实验条件下 (7.5 MPa, 65 °C), N-lipase 在反应体系中很快失活。比较两组数据可以得出: 反应体系中 N-lipase 迅速失活与水的存在有关, 可能是 N-lipase 在水的作用下分解变性所致。另外, 由曲线 C 可知, 经常压高温处理后, 脂肪酶的催化活性有所降低, 但变化不大。图 2.7 的实验结果表明, 在常压反应体系体系中, 当温度为 75 °C 时, 催化剂活性明显降低, 而当反应温度为 80 °C 时 N-lipase 完全失活。综上所述, 可以得出如下结论: 相对较低的二氧化碳压力 (7.5 MPa) 不足以导致 N-lipase 失活; 反应体系体系中大量水的存在使脂肪酶在相对较低的温度下变性失活, 故 N-lipase 失活机理可能与水热条件下的酶分子分解有关^[8]。

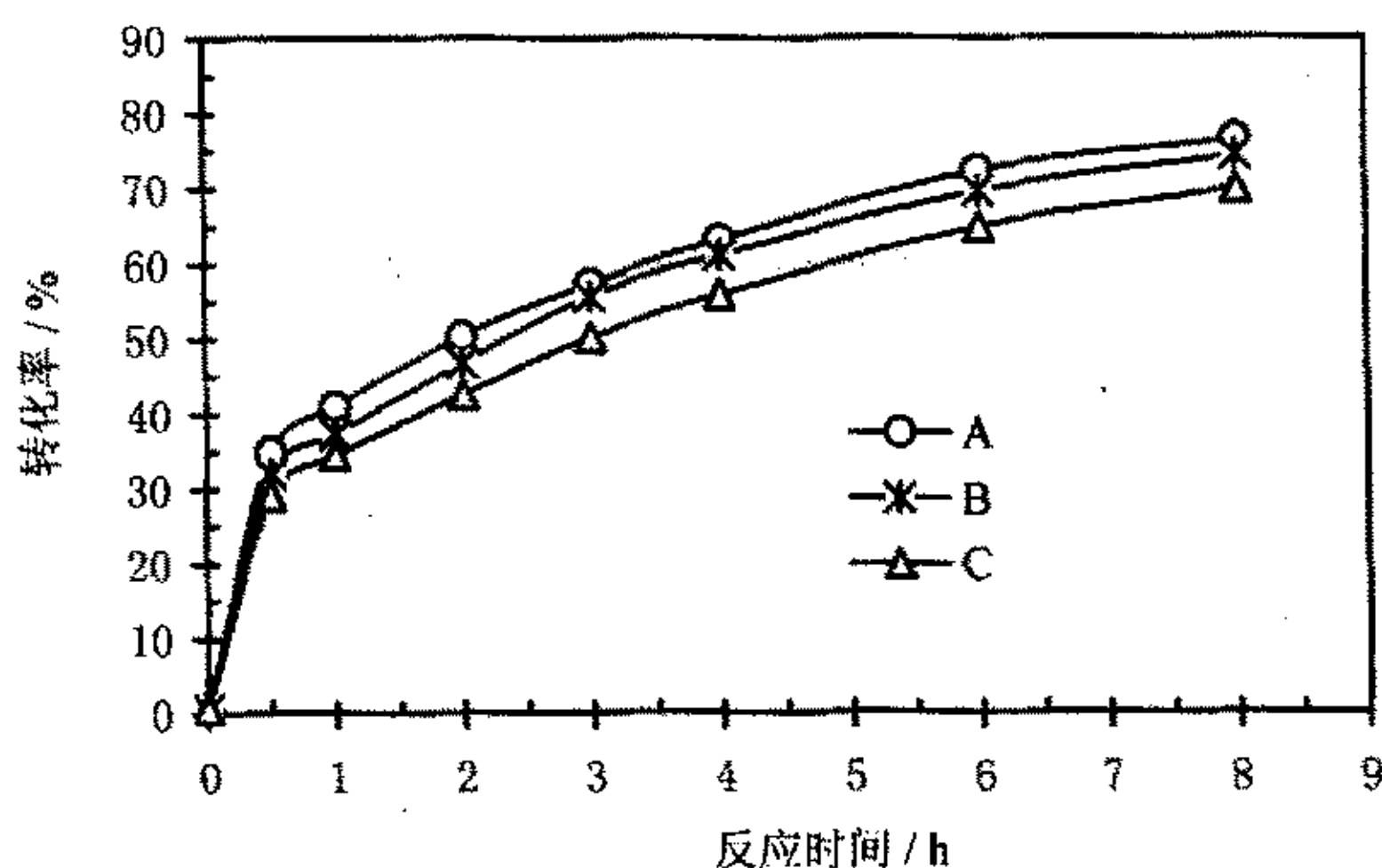


图 3.12 经高温、高压处理的 N-lipase 催化活性研究

Figure 3.12 The catalysis activity of N-lipase after being treated in high pressure or temperature

3.5 小结

本章研究了高压二氧化碳介质中两种脂肪酶催化亚麻油水解反应的情况。考察了不同因素对转化率的影响, 并对部分实验数据进行了比较, 结论如下:

(1) 临界二氧化碳介质中, L-lipase 催化亚麻油水解反应的适宜温度、压力、酶用量、水/亚麻油摩尔比分别为 37 °C、7.5 MPa、5 wt% 和 30:1, 加入硅胶和乙醇对反应

转化率有促进作用, 而加入 CaCl_2 对 L-lipase 催化活性有抑止作用;

(2) 高压二氧化碳介质中, N-lipase 催化亚麻油水解反应的适宜温度、压力、水/亚麻油摩尔比分别为 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 、 7.5 MPa 、 $30:1$;

(3) 高压二氧化碳介质中, 两种脂肪酶催化亚麻油水解反应的结果表明: 在相应的最佳实验条件下, N-lipase 具有更高的催化活性和更宽的催化活性温度范围。

(4) 两种脂肪酶在常压无溶剂体系和高压二氧化碳介质中催化亚麻油水解反应的结果表明: 与无溶剂体系中的最大催化活性温度 ($35\text{ }^\circ\text{C}$) 相比, 超临界二氧化碳中 L-lipase 的最大催化活性温度升高 $2\text{ }^\circ\text{C}$, 为 $37\text{ }^\circ\text{C}$; 而 N-lipase 与无溶剂体系中的最大催化活性温度 ($67.5\text{ }^\circ\text{C}$) 相比, 超临界二氧化碳中酶的最大催化活性温度降低 $17.5\text{ }^\circ\text{C}$, 为 $50\text{ }^\circ\text{C}$;

(5) 经高温、高压处理的 N-lipase 催化活性研究表明: 对较低二氧化碳压力 (7.5 MPa) 不足以导致 N-lipase 失活, N-lipase 失活机理可能与水热条件下的酶分子分解、变性有关。

参考文献:

- [1] Hailing P J. Thermodynamic prediction for biocatalysis in non-conventional media. *Enzyme Microb. Tech.*, 1994, 16: 178~205.
- [2] 徐惠娟, 朱白强, 杨立荣. 超临界流体中的酶催化反应. *化学反应工程与工艺*, 1996, 12 (3): 232~237.
- [3] Rasndolph T W. Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotech. Lett.*, 1985, (7): 325~330.
- [4] Shireesh S, Giridhar M. Short Communication Hydrolysis of p-nitrophenyl laurate in Supercritical Carbon Dioxide: comparison of two different enzymes. *Journal of Technology and Biotechnology*, 2001, 76: 890~892.
- [5] Philipg. J., Walter L eitner (EDS). *Chemical Synthesis Using Supercritical Carbon Dioxide*, First edition, NEW YORK: Wiley-VCH 1999, 415~429.
- [6] Kamat S, Critchley G, Beckman E J. Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Organic Solvents and Supercritical Fluids: 3. Does Carbon Dioxide Covalently Modify Enzymes?. *Biotechnol. Bioengin.*, 1995, 46: 610~620.
- [7] Kamat S, Barrera J, Beckman E J. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and

- supercritical fluids. I. Optimization of enzyme environment. *Biotechnol. Bioengin.*, 1992, 40: 158~166.
- [8] Klibanov A. M., Oxender D. L., Fox C. F., *Protein Engineering*, Alan R. Liss, New York, 1987.
- [9] Rasndolph T W, Blanch H. W., Prausnitz J M. Enzyme-Catalyzed Oxidation of Cholesterol in Supercritical Carbon Dioxide. *AIChE Journal*, 1988, 34(8): 1354~1360.
- [10] 薛震役, 林文楚, 尹光琳. 维生素 C 发酵中 L-山梨糖脱氢酶的研究. *中国医药工业杂志*, 2001, 32 (3): 102~104.
- [11] 马晓军, 张晓君, 杨玲, 冯清平. 支链淀粉酶产生菌的筛选及发酵条件的研究. *兰州大学学报 (自然科学版)*, 2001, 37 (12): 80~86.
- [12] Balaban M. O., Arreora A. G., Marshall M.. Inactivation of pectinesterase in orange juice by supercritical carbon dioxide. *J. Food Sci.*, 1991, 56: 743~746.
- [13] Taniguchi M, Kamihara M., Kobayashi T. Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity. *Agric. Biol. Chem.* 1987, 51: 593~594.
- [14] Hiroya I., Mitsuya S., Akiyoshi Y.. Inactivation of Enzymes and Decomposition of α -Helix Structure by Supercritical Carbon Dioxide Microbubble Method. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44: 2646~2649.
- [15] Chen J. S, Balaban, M. O. Arreora A. G. Interaction of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40: 2345~2349.

第四章 酶催化醇解反应制备脂肪酸乙酯工艺研究

4.1 引言

不饱和脂肪酸的化学性质不稳定,暴露于空气中易被氧化。研究表明不饱和脂肪酸的双键数目和氧化速度的关系为:油酸(C18:1):亚油酸(C18:2):亚麻酸(C18:3):花生四烯酸(C20:4)为1:40:100:200。可见其氧化速度随分子中双键数目的增多而迅速增加。另外,高温、光照和氧化剂等可使不饱和脂肪酸发生聚合、降解、氧化、转位和异构化等反应。在制备不饱和脂肪酸过程中,上述各种副反应往往很难避免,导致副产物增多、产品质量降低。另有研究表明,不饱和脂肪酸中的甲酯和乙酯化物稳定性较强,因此有人提出将富含不饱和脂肪酸的甘油酯通过与直链醇之间的醇解反应制备为脂肪酸甲酯或乙酯类化合物,从而有利于存储运输。考虑到甲醇的毒性对实验操作及产品的不利影响,因此,多数情况下以乙醇和甘油酯间的醇解反应制备脂肪酸乙酯化合物^[1]为主。

李润^[2]提出了以粗鱼油为原料制备鱼油多价不饱和脂肪酸乙酯的工艺,该工艺首先将原料油在搅拌下加入氢氧化钠乙醇溶液,反应温度为40~60℃,反应时间为2~6h,得脂肪酸乙酯化合物,对产物进行尿素包合、精馏处理后可得脂肪酸乙酯产品,该工艺的优点在于生产周期短,降低了原料消耗,同时提高了产品的产量。

张其德^[3]等将含有DHA和EPA的海洋鱼油和无水乙醇在酸类催化剂的存在下,加热回流8~10h后得到混合脂肪酸乙酯的粗制品。然后将该脂肪酸乙酯粗制品加入到分子蒸馏装置中,进行真空精馏,得到纯度为50~90%的DHA和EPA产品,产品收率约为80%。

上述两种方法中以强酸强碱为催化剂,不可避免的酸碱残留严重影响了产品质量。研究表明,脂肪酶不但可以催化油脂水解反应,在甘油三酯与短链脂肪醇的醇解反应中,也可表现出较好的催化活性^[4~5]。

宋光森等^[6]将油脂在脂肪酶催化条件下水解,得到脂肪酸混合物,然后加入乙醇进行酯化反应,得到各种脂肪酸乙酯混合物。由于反应过程步骤较多,因此脂肪酸乙酯收率较低。

为避免上述各种方法的不利之处,本文通过酶催化条件下亚麻油与乙醇的醇解反应制备脂肪酸乙酯,反应条件温和(50℃, 6~8 h),不破坏不饱和脂肪酸化合物的碳碳双键结构;同时,以脂肪酶为催化剂不造成产品及环境污染,符合绿色化学要求。

4.2 实验

4.2.1 原料与药品

两种脂肪酶分别由深圳市绿微康生物工程有限公司(Leveking lipase, 以 L-lipase 表示,微生物发酵生产,无选择性,未固定化)和诺维信(Novozymes)(沈阳)生物加工有限公司广州分公司(Lipozyme® TL IM *Thermomyces lanuginosa* lipase, 基因改良性米曲霉,经微生物深层发酵生产,1,3 位专一,固定化于颗粒状硅胶,以 N-lipase 表示)提供,使用前均未作任何处理。亚麻油为 SCCO_2 萃取所得,经分析测试,各项指标均符合国家标准(GB 8235-87)。无水乙醇(分析纯)北京精细化学品有限公司(纯度大于 99.0%);正己烷(分析纯)北京化工厂(纯度大于 95.0%);苯(分析纯)西安化学试剂厂(纯度 99.5%);正十八烷,(化学纯)西安化学试剂厂(纯度 95%)。

4.2.2 实验装置

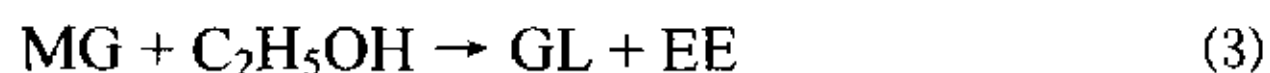
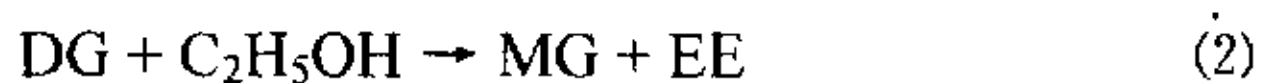
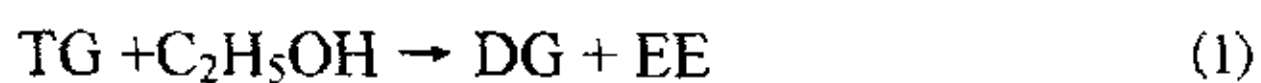
离心机(上海云楼医用仪器厂制造,800 型);电动搅拌器(上海标本模型厂制造,JB50-D 型)。精密天平(北京光学仪器厂制造,DT-100A 型,精度 0.0001 g);87-1 型磁力加热搅拌器(杭州仪表电机厂制造);自动控温水浴装置,控温精度 1℃。

4.2.3 实验操作

将亚麻油与乙醇按一定摩尔比混合,水浴加热到反应所需温度后,快速加入定量脂肪酶,同时搅拌记时。实验过程中定时取样,为保证反应温度恒定、反应物比例及催化剂相对含量不变,每次取样时要少量快速。将所取样品转入试管中,并快速放入 80℃ 水中加热 2 min,使脂肪酶变性失活停止反应,离心分离除去脂肪酶。样品经处理除去乙醇后用气相色谱法分析脂肪酸乙酯含量。

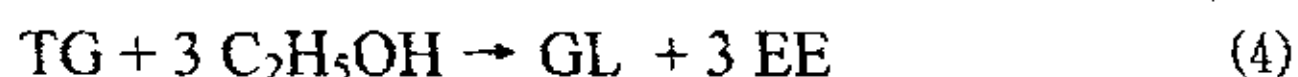
4.2.4 反应方程式

与酶催化亚麻油水解反应相同,亚麻油与乙醇的酶催化醇解反应也分步进行,反应方程式可表示为:



其中, TG: 甘油三酯; DG: 甘油二酯; MG: 甘油单酯; EE: 脂肪酸乙酯 (主要包括: 棕榈酸乙酯, Ethyl Palmitate; 硬脂酸乙酯, Ethyl stearate; 油酸乙酯, Ethyl oleate; 亚油酸乙酯, Ethyl linoleate; α -亚麻酸乙酯, Ethyl linolenate); GL: 甘油。当反应开始且有部分甘油二酯、甘油单酯生成后, 上述反应(1)、(2)、(3)同时进行, 所以生成物为甘油二酯、甘油单酯、各种脂肪酸乙酯和甘油的混合物。

总反应方程式可表示为:



4.2.5 分析

内标法

由于常规的实验室操作不能很好地分离未反应的原料甘油三酯、生成物脂肪酸乙酯、反应副产物甘油二酯和甘油单酯。另外, 甘油酯的沸点过高, 欲使其完全从色谱柱中流出, 往往需要很高的柱温。因此, 实验过程中采用内标法定量分析脂肪酸乙酯含量, 不检测甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯含量, 以避免归一化法的局限性。

内标法的计算公式: $C\% = (W_{is} / W_{spl} \times A_i / A_{is} \times f_i / f_{is}) \times 100$

其中:

$C\%$: 待测组份的百分含量;

A_{is} : 内标组份的峰面积;

W_{is} : 内标组份的重量;

f_i : 待测组份的响应因子;

W_{spl} : 样品重量;

f_{is} : 内标组份的响应因子。

A_i : 待测峰的面积;

色谱条件

实验中脂肪酸乙酯含量用 Shimadzu GC-14B 气相色谱仪测定。色谱柱： $\Phi 1.5 \text{ m} \times 2 \text{ mm}$ 石英玻璃填充柱；担体：硅烷化 102 型白色担体，60~80 目；固定液：3% OV-1；载气：高纯氮气，流量为 30 mL/min；检测器：氢火焰离子化检测器（FID）；柱温：225 °C 恒温 1 min，5 °C/min 升温至 240 °C 后恒温 3 min；气化室、检测室温度：260 °C；进样量：1 μL ；内标物：正十八烷；数据处理系统：TL9900 色谱数据工作站。

图 4.1 为按照上述分析方法所得的反应产物脂肪酸乙酯的色谱分析结果。可以看出，根据脂肪酸乙酯中碳链的长度将色谱峰分为两组，其中 2 为棕榈酸乙酯即棕榈酸乙酯，3 是由产物中所有十八碳酸乙酯组成的未完全分离的两个峰。

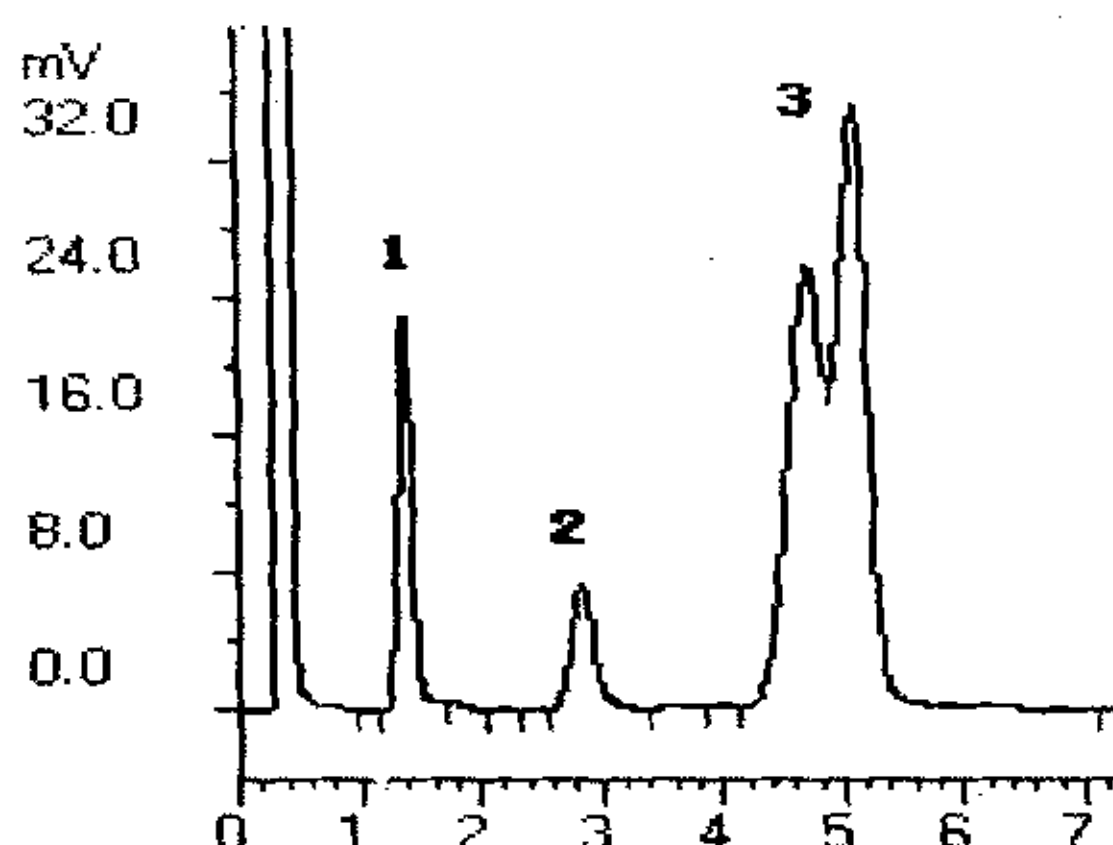


图 4.1 反应产物脂肪酸乙酯色谱图，其中 1，2，3 为内标物、棕榈酸乙酯、十八碳酸乙酯

Figure 4.1 Packed gas chromatographic profile for fatty acid ethyl esters from transesterification of linseed oil and ethanol, where the numbers 1, 2, 3 refer to internal standard ethyl palmitate and ethyl ester of C18

4.3 结果与讨论

亚麻油与乙醇的酶催化醇解反应受热力学平衡控制，因此可通过调节实验操作条件影响反应达到平衡所需的时间及转化率。本文考察了反应物摩尔比、反应温度、催化剂用量等因素对反应的影响，以期得到最佳的反应工艺条件及较高的亚麻油转化率。

4.3.1 反应物摩尔比

反应物摩尔比是影响化学反应转化率的主要因素之一。通常情况下，增大其中某一反应物的摩尔分数可有效提高其他反应物的转化率及产物收率。图 4.2 是反应温度 50 °C、N-lipase 用量 5 wt%、不同反应物摩尔比条件下的实验结果。可以看出，当反应物摩尔比（乙醇:甘油三酯）由 2:1 增加为 3:1 时，相同时间内的转化率明显升高。

可见,在此区间内加大乙醇的摩尔分数对转化率有利,该实验结果与常见的反应物摩尔比对反应转化率的影响规律一致。另外,当反应物摩尔比为 2:1 时,由于低于化学反应计量比,因此醇解反应进行不完全,反应的转化率仅为 44%。但是实验中同时观察到,当反应物摩尔比(乙醇:甘油三酯)由 3:1 增加为 6:1 后,虽乙醇过量但相同时间内的转化率却明显下降,8 h 内转化率仅为 35.97%,低于反应物摩尔比为 3:1 和 2:1 时所得结果。类似的现象在文献^[7]中也有报导,Boulbaba Selmi 在间歇式常压反应器中研究葵花油与乙醇的醇解反应时得到的实验结果与本文完全一致,即反应物摩尔比为化学计量比(3:1)时,转化率最高。Jackson M A^[8]等人在高压连续反应器中研究固定化脂肪酶催化油脂的甲醇解反应时发现,若反应温度、压力恒定为 50 °C、24.1 MPa,则当甲醇流速为 5 μ L/min 时,酶的活性呈现最大值,反应的单程转化率最高。流速高于、低于此值脂肪酶活性均明显降低。产生上述实验现象的主要原因在于:过量的乙醇与脂肪酶催化活性位的氨基酸残基发生络合作用,导致酶的活性位不能与甘油三酯分子有效接触,酶催化活性降低甚至失活^[9-10]。

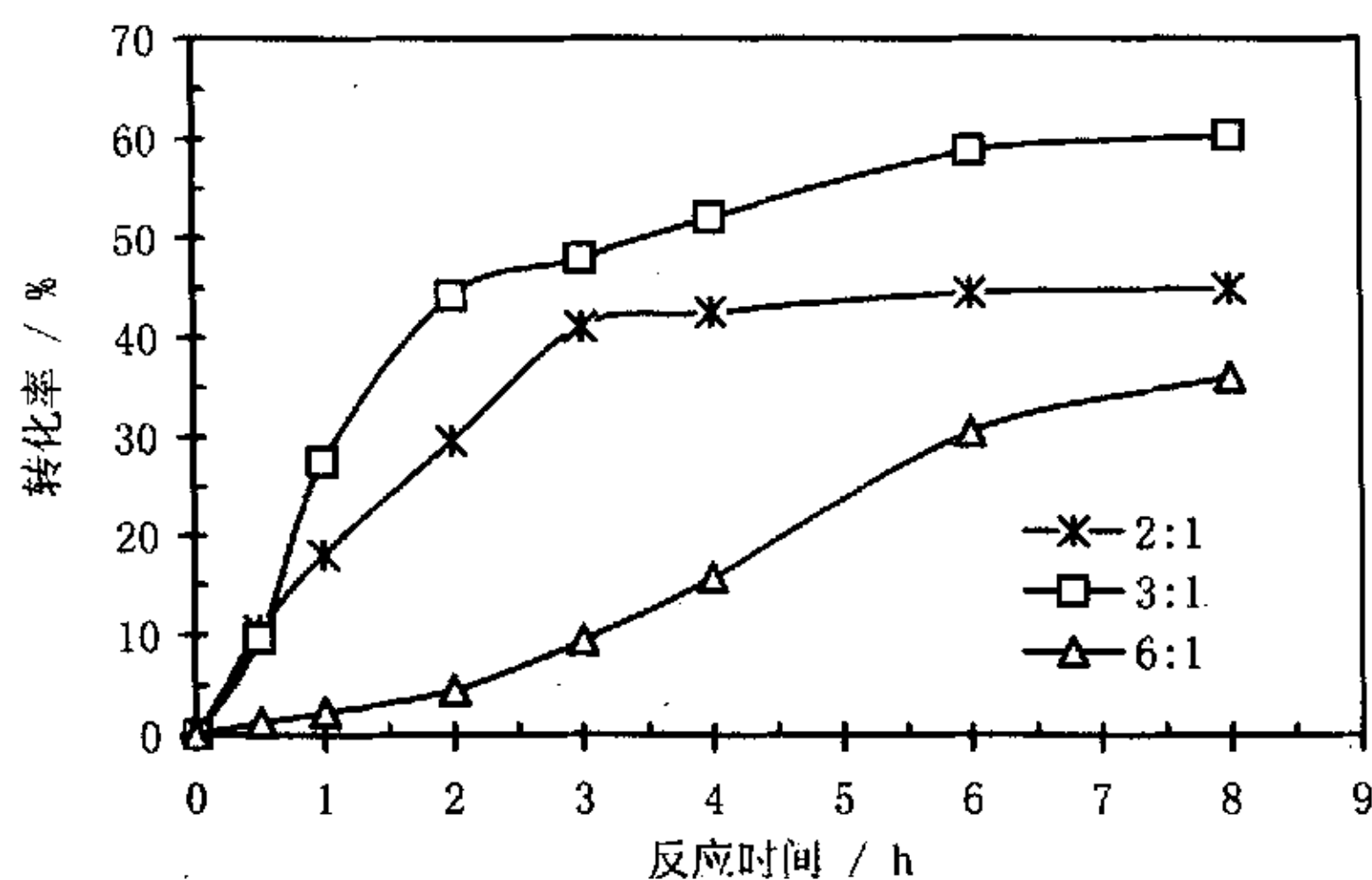


图 4.2 N-lipase 为催化剂,不同反应物摩尔比条件下的实验结果

Figure 4.2 The relationship of time-conversion at various molar ratio of ethanol/linseed oil for N-lipase

另外,实验中以 L-lipase 为催化剂,反应温度为 35 °C,其他条件与图 4.2 中相同时,验证了上述反应物摩尔比对转化率的影响,实验结果列于图 4.3 中。与 N-lipase 为催化剂时相同,当反应物摩尔由 3:1 增加为 6:1 时,相同时间内的转化率明显降低。另外, L-lipase 为催化剂时,亚麻油与乙醇的醇解反应速率明显低于 N-lipase 为催化剂

时的结果。以反应时间 8 h 为例, N-lipase 催化的亚麻油醇解反应转化率最大可达 60.28%, 而在相同的反应时间内, 以 L-lipase 为催化剂的亚麻油醇解反应最大转化率仅为 12.42%。因此, N-lipase 较 L-lipase 更适合于催化亚麻油醇解反应。

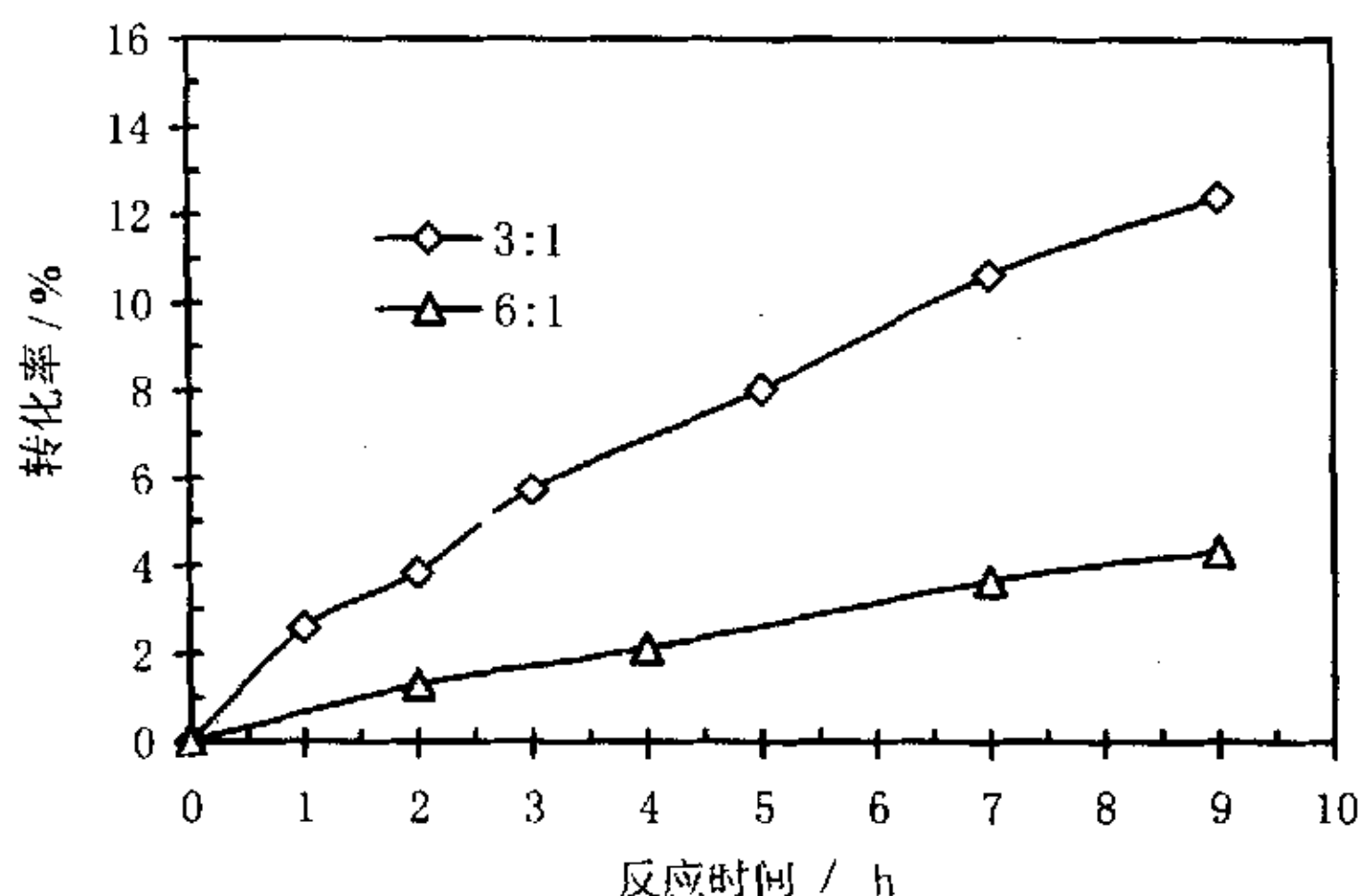


图 4.3 L-lipase 为催化剂, 不同反应物摩尔比时的实验结果

Figure 4.3 The relationship of time-conversion at various molar ratio of ethanol/linseed oil for L-lipase

4.3.2 反应温度

反应温度是影响酶催化亚麻油醇解反应的重要因素之一。图 4.4 为反应物摩尔比 3:1 (乙醇:甘油三酯), N-lipase 用量 5 wt% 时, 不同反应温度下酶催化亚麻油与乙醇醇解反应结果。可以看出, 当反应温度在 40~50 °C 范围内变化时, 相同时间内的转化率随反应温度升高而相应上升。仍以反应历时 8 h 为例, 反应温度为 40 °C 时转化率为 53 %, 而反应温度为 50 °C 时转化率则升至 60.3 %。另外, 反应温度由 50 °C 升高到 60 °C 时, 相同时间内的转化率随反应温度升高迅速下降, 当反应温度为 60 °C 时, 8 h 时的转化率仅为 39%。高温下脂肪酶的变性失活可能与其分子链的扭曲变形遮盖了分子中的催化活性位有关。

上述结果表明: 对于 N-lipase 催化的亚麻油与乙醇的醇解反应, 最佳的反应温度为 50 °C, 与文献^[7]报导的结果一致。因此, 在考察其他条件对反应的影响时将实验温度确定为 50 °C。

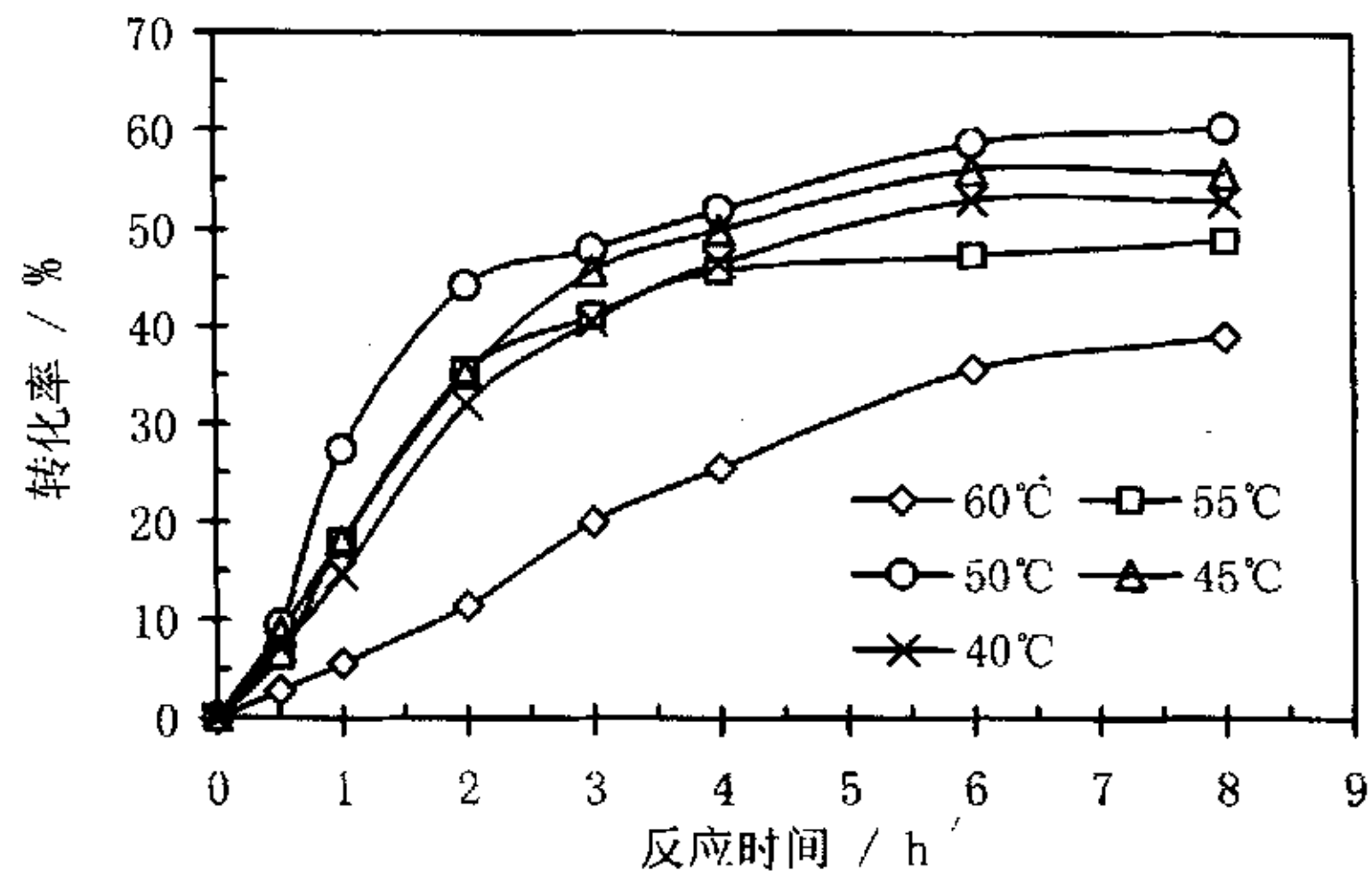


图 4.4 反应物比例 3:1、N-lipase 酶用量 5 wt%、不同反应温度条件下的转化率图

Figure 4.4 The relationship of temperature-conversion at various reaction times for N-lipase

4.3.3 催化剂用量对反应的影响

图 4.5 是反应温度 50 °C、反应物摩尔比 3:1、不同 N-lipase 用量条件下的时间—转化率关系图。

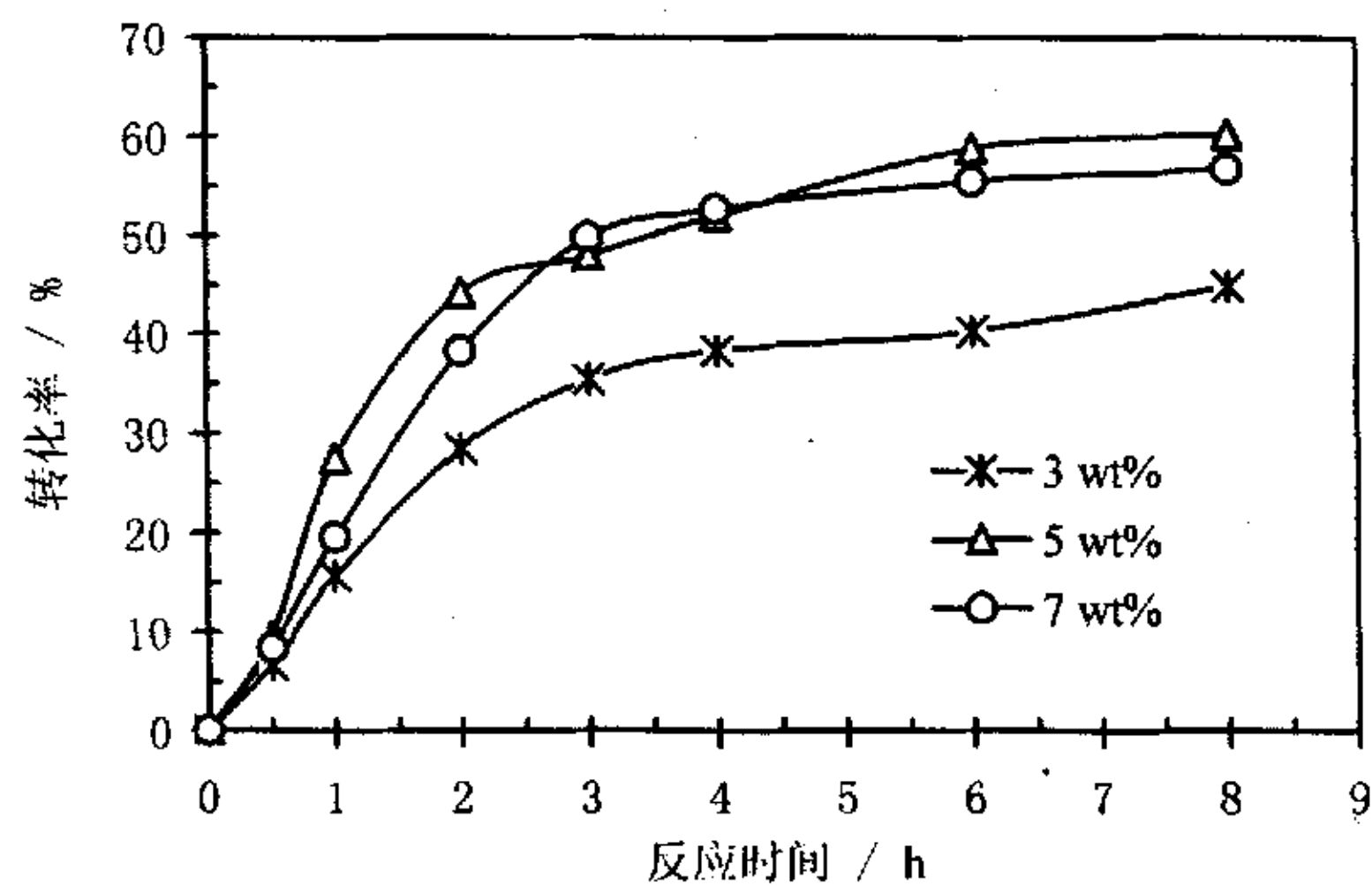


图 4.5 反应温度 50 °C、反应物比例 3:1、不同 N-lipase 用量下的实验结果

Figure 4.5 The relationship of time-conversion at various N-lipase loads

可以看出，当催化剂用量由反应物总质量的 3 wt% 增加到 5 wt% 时，相同反应时间内，转化率随酶用量增加明显升高。当 N-lipase 用量为 3 wt% 时，反应 3 h 后其转化

率为 35.5%，而用量为 5 wt% 时，相同时间内的转化率可达 48%。可见在一定范围内，增加催化剂用量可以明显提高反应速率。但值得注意的是当催化剂用量由反应物总质量的 5 wt% 增加到 7 wt% 时，相同时间内的转化率变化不明显，这一点与常压下 N-lipase 催化亚麻油水解反应中得到的结果一致。其原因可能是：由于反应物体系对催化剂的溶解能力有限，因此催化剂用量加大到一定程度后，将不能很好的分散于反应体系中，导致 N-lipase 分子间发生团聚现象，阻碍了催化活性的进一步提高。

4.3.4 酶催化选择性

酶催化反应的重要特征之一是酶的催化选择性。实验过程中，通过检测棕榈酸乙酯在产物中的相对百分含量考察两种脂肪酶的催化选择性。图 4.6 中，曲线 A 表示反应温度 50 °C，反应物摩尔比 3:1，N-lipase 用量 5 wt% 时棕榈酸乙酯含量随反应时间的变化趋势；曲线 B 为反应温度 50 °C，反应物摩尔比 3:1，N-lipase 用量 7 wt% 时产物中棕榈酸乙酯含量随反应时间的变化趋势；曲线 C 为反应温度 35 °C，反应物摩尔比 3:1，L-lipase 用量 5 wt% 时棕榈酸乙酯含量随反应时间的变化趋势。色谱分析结果表明，原料亚麻油所含各种脂肪酸中棕榈酸含量仅为 5.4%，而图 4.6 中给出的各组数据中，棕榈酸乙酯在产物中的含量一直维持在 7.5% 以上。其中以 L-lipase 为催化剂，反应历时 1 h 后，棕榈酸乙酯在产物中的含量高达 12.2%，之后，随反应时间延长棕榈酸乙酯在生成物中比例逐渐下降。上述数据表明，两种脂肪酶催化亚麻油与乙醇的醇解反应时，对底物甘油三酯存在如下选择性：先切断甘油三酯分子结构中短链的脂肪酸与甘油形成的酯键，后切断长链的脂肪酸与甘油形成的酯键；先转化饱和的脂肪酸形成的酯键、后转化不饱和的脂肪酸形成的酯键。脂肪酶的上述催化选择性可能与反应过程中的空间立体结构位阻有关。

由于酶催化亚麻油醇解反应的机理^[11~12]是酶与甘油三酯分子首先形成过渡络合物，该络合物进一步转化为酰基络合物，同时释放出甘油三酯中的醇，之后酰基络合物再受底物乙醇的亲核进攻，生成新的乙酯。亚麻油所含的甘油三酯分子中，脂肪酸主要包括棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸，其中棕榈酸、硬脂酸为饱和脂肪酸，二者的区别在于棕榈酸碳链中含十六个碳原子，硬脂酸碳链中含十八个碳原子。油酸、亚油酸和 α -亚麻酸为不饱和脂肪酸，分别含有 1 到 3 个碳碳双键。由于碳碳双键的存在，不饱和脂肪酸分子呈弯曲状，因此其空间位阻大于饱和脂肪酸，转化

速率慢。对于两个直链脂肪酸，由于棕榈酸分子的碳链较硬脂酸碳链短，故空间位阻小于硬脂酸，因此甘油三酯中的棕榈酸与甘油形成的酯基结构最易受到脂肪酶活性中心的进攻而被切断。即酶催化亚麻油醇解反应时，脂肪酶对形成饱和、短链的脂肪酸乙酯有一定的选择性。

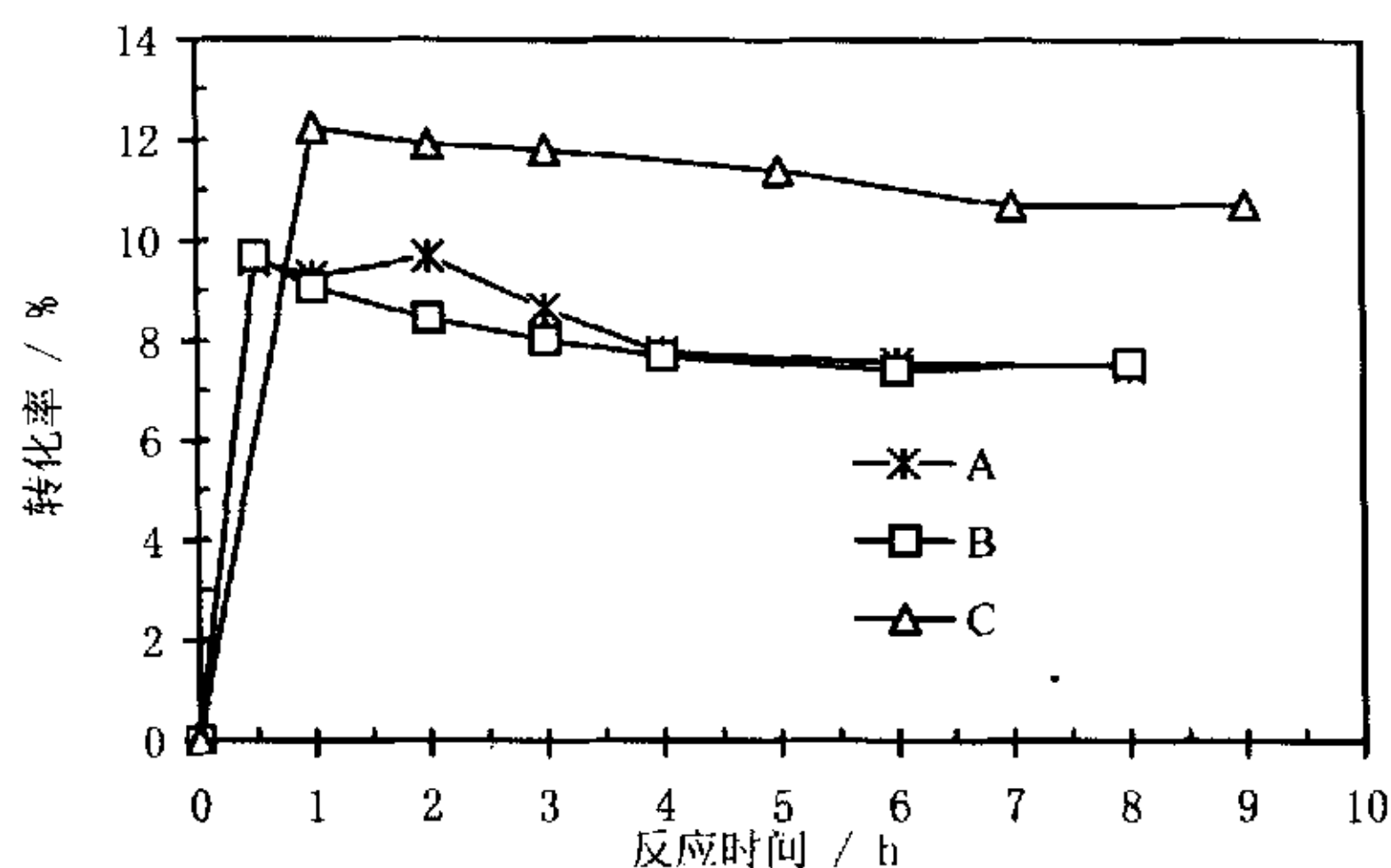


图 4.6 两种脂肪酶催化亚麻油醇解反应选择性

Figure 4.6 The selectivity of lipases in the alcoholysis of linseed and ethanol

4.4 小结

本章研究了常压下酶催化亚麻油与乙醇的醇解反应，考察了反应物摩尔比、反应温度、脂肪酶用量等因素对反应速率及转化率的影响，并对脂肪酶的催化选择性做了初步探讨。结论如下：

- (1) 反应物摩尔比（乙醇:亚麻油）为 3:1 时反应转化率最高。比例低于此值，甘油三酯转化不完全，比例过高时乙醇可能与脂肪酶催化活性位发生络合而抑止酶的催化活性；
- (2) 反应温度为 50 ℃时，N-lipase 催化亚麻油醇解反应转化率最高；
- (3) 实验中脂肪酶用量应不超过 5 wt%，酶用量过高则会产生催化剂团聚；
- (4) 所用的脂肪酶催化亚麻油醇解反应时，优先生成碳链较短的饱和脂肪酸乙酯。

参考文献:

- [1] Espinosa S., Diaz S., Brignole E. A., Thermodynamic modeling and process optimization of supercritical fluid fractionation of fish oil fatty acid ethyl esters, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2002, 41, 1516~1527.
- [2] 李润. 鱼油多烯脂肪酸乙酯生产新工艺. 专利申请号: 95118369.9.
- [3] 张其德, 张鸣. 二十二碳六烯酸乙酯和二十碳五烯酸乙酯的制备和分离工艺. 专利申请号: 99115429.0.
- [4] Mittelbach M., Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Sunflower Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1990, 67: 168~170.
- [5] Linko Y. Y., Lamas M., Huhtala A. Lipase-catalyzed Transesterification of Rapeseed Oil and 2-Ethyl-Hexanol. *Ibid*, 1994, 71: 1411~1414.
- [6] 宋光森, 黄国文, 何尔平. 生物油脂的酶催化水解及其脂肪酸乙酯的浓缩分离. *中国油脂*, 2001, 26 (5): 66~68.
- [7] Boulbaba S. Daniel T. Immobilized Lipase-Catalyzed Ethanolysis Of Sunflower Oil In A Solvent-Free Medium. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1998, 75(6): 691~695.
- [8] Jackson M. A., King J. W. Methanolysis of seed oils in flowing supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, 73: 353~356.
- [9] Richard G. Lipase-catalyzed Esterification of Oleic Acid and Ethanol in a Continuous Packed Bed Reactor Using Supercritical CO₂ as Solvent: Approximation of System kinetics. *J. Chemical Technology and Biotechnology*, 2000, 75: 715~721.
- [10] Helga G., björn S, Lipase-catalyzed Alcoholysis of God Liver Oil in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1995, 72 (1): 399~405.
- [11] Yang B, Kuo S. J., Hariyadi P. Solvent suitability for lipase-mediated acyl-transfer and esterification reactions in microaqueous milieu is related to substrate and product polarities. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 577~563.
- [12] Miller D A, Prausnitz J M, Blanch H W. Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triglycerides in cyclohexane. *Enzyme Microb Technol*, 1991, 13: 98~102.

第五章 脂肪酸乙酯分离研究

5.1 引言

虽然 α -亚麻酸在天然植物油脂(如亚麻油、紫苏油等)中含量较高,且可以与乙醇通过醇解反应很方便地得到易于人体吸收的小分子 α -亚麻酸乙酯化合物。但醇解反应由于受热力学平衡限制,反应进行不完全,因此甘油三酯转化率不高。此外,反应产物中 α -亚麻酸乙酯与其他脂肪酸乙酯混和共存且含量较低^[1]。

研究表明,N-6系列脂肪酸乙酯(亚油酸乙酯等)与N-3系列脂肪酸乙酯(α -亚麻酸乙酯等)在人体竞争利用相同的生物酶系统,从而影响了N-3系列脂肪酸乙酯在人体内的吸收利用。通过对亚麻油醇解产物中脂肪酸乙酯混合物的分离提纯,可以得到高纯度的 α -亚麻酸乙酯,降低N-6系列脂肪酸乙酯的影响,因此是一个非常有意义的工作。由于脂肪酸乙酯混合物和甘油三酯的分子量相差较大,所以,从反应体系中将各种脂肪酸乙酯分离出来比较容易。但产物中各种脂肪酸乙酯的结构、物理性质极为相近,因此分离提纯相对较难。

目前,常用的分离不饱和脂肪酸类化合物的方法有:尿素包合法^[2]、分子蒸馏^[3]、超临界萃取结合尿素包合法^[4]、超临界萃取结合精馏柱精馏法^[5~7]、超临界萃取结合银离子络合吸附法^[8~9]等。本章采用尿素包合法、超临界萃取结合精馏柱精馏法和超临界萃取结合银离子络合吸附法分离提纯 α -亚麻酸乙酯,并对各种方法的分离提纯效果进行了评价。

5.2 分析方法

5.2.1 内标法

由于常规的实验室操作不能很好地分离未反应的原料甘油三酯、生成物脂肪酸乙酯、反应副产物甘油二酯和甘油单酯。另外甘油酯的沸点很高,欲使其完全从色谱柱中流出,往往需要很高的柱温。因此,实验过程中采用内标法定量分析各种脂肪酸乙酯,不检测甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯含量,避免了归一化法的局限性。

内标法的计算公式: $C\% = (W_{is} / W_{spl} \times A_i / A_{is} \times f_i / f_{is}) \times 100$

其中:

$C\%$: 待测组份的百分含量;

A_{is} : 内标组份的峰面积;

W_{is} : 内标组份的重量;

f_i : 待测组份的响应因子;

W_{spl} : 样品重量;

f_{is} : 内标组份的响应因子

A_i : 待测峰的面积;

5.2.2 色谱条件

气相色谱: Shimadzu GC-14B; 色谱柱: $\Phi 2\text{ mm} \times 1\text{ m}$ 石英玻璃填充柱; 担体: 经酸洗、硅烷化处理的 Chromosorb. W. (Chromosorb. W. AW-DMCS), 80~100 目; 固定液: 20% 的二乙二醇丁二酸聚酯 (DEGS); 载气: 高纯氮气, 流量为 30 ml/min; 检测器: 氢火焰离子化检测器 (FID); 柱温: 190 $^{\circ}\text{C}$; 气化室、检测室温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 1 μL ; 内标物: 正十八烷; 数据处理系统: TL9900 色谱数据工作站。

5.3 尿素包合法

尿素包合法是一种常用的分离脂肪酸类化合物的方法, 本文分别以亚麻油、紫苏油与乙醇的醇解反应产物为原料, 初步探讨了尿素包合法分离脂肪酸乙酯工艺。

5.3.1 原料与药品

脂肪酸乙酯混合物 (亚麻油、紫苏油醇解反应制得, 主要成分为脂肪酸乙酯和甘油酯类系列化合物: 甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯); 尿素 (分析纯) 天津市天大化工实验厂 (纯度大于 99.0%); 无水乙醇 (分析纯) 北京精细化学品有限公司 (纯度大于 99.0%); 正己烷 (分析纯) 北京化工厂 (纯度大于 95.0%); 苯 (分析纯) 西安化学试剂厂 (纯度 99.5%); 正十八烷, (化学纯) 西安化学试剂厂 (纯度 99%)。

5.3.2 实验装置

离心机 (上海云楼医用仪器厂生产, 800 型); 精密天平 (北京光学仪器厂制造, DT-100A 型, 精度 0.0001 g); 87-1 型磁力加热搅拌器 (杭州仪表电机厂); 自动控温水浴装置, 控温精度 1 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.3.3 实验操作

取尿素 15 g，加入到盛有 20 g 无水乙醇的 200 ml 蒸馏烧瓶中，混和后置于 60 ℃ 水浴中回流加热直至尿素完全溶解，加入 10 g 醇解反应所得混合物（脂肪酸乙酯含量 78%，尿素、溶剂、混合脂肪酸质量比为 1.5:2:1）。加热回流 60 min 后冷却至室温，置于 -4 ℃ 冰箱中冷藏过夜。次日过滤，滤液中加入适量正己烷，用 10% HCl 酸化至 pH 为 2~3，加入适量水，分离有机相，然后用正己烷多次萃取水相，收集萃取水相所用的正己烷水洗至中性，用无水硫酸钠干燥，抽滤后减压蒸出正己烷，可得不饱和脂肪酸乙酯。

5.3.4 结果与讨论

图 5.1 为紫苏油醇解反应产物经尿素包合法处理后，所得不饱和脂肪酸乙酯样品的色谱分析结果，其中 1, 2, 3 分别表示油酸乙酯、亚油酸乙酯、 α -亚麻酸乙酯的色谱峰。

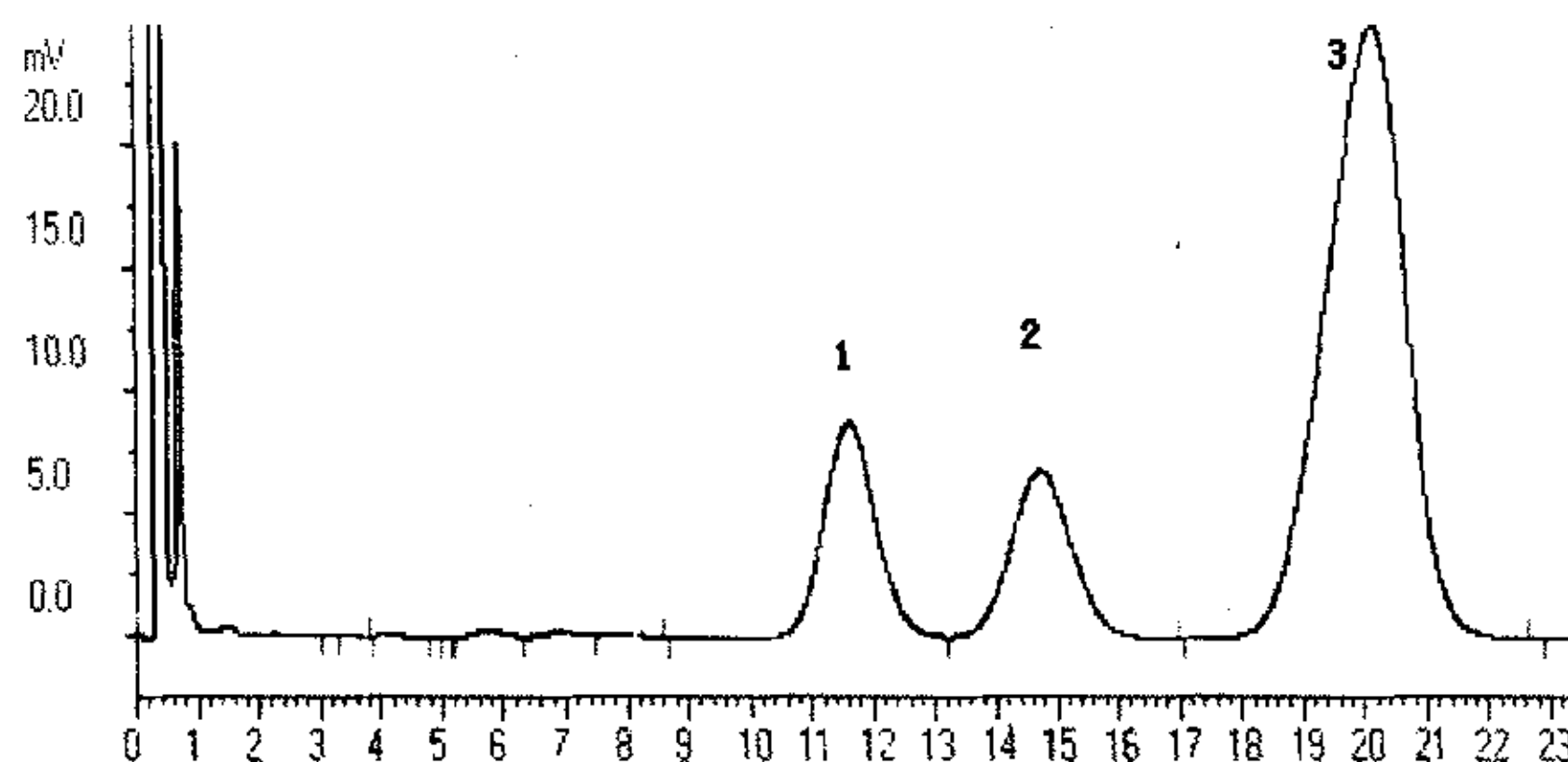


图 5.1 经尿素包合法分离后，紫苏油与乙醇醇解反应产物中各种脂肪酸乙酯含量色谱图

Figure 5.1 Gas chromatographic profile for fatty acid ethyl esters of alcoholysis of perilla oil and ethanol being separated by the urea adduction

表 5.1 为紫苏油甲酯化产物、乙醇醇解产物及醇解产物经尿素包合后所得样品中各种脂肪酸乙酯的相对含量。表 5.2 为亚麻油甲酯化产物、乙醇醇解产物及醇解产物经尿素包合后所得样品中各种脂肪酸乙酯的相对含量。可以看出，与完全甲酯化相比较，醇解产物中的饱和脂肪酸及含有一个碳碳双键的油酸乙酯含量均有不同程度的增加。其可能原因在于醇解反应过程中生物催化剂脂肪酶的催化选择性所致，相关内容在本文第四章中有详细论述。另外，由图 5.1 和表 5.1 可以看出，紫苏油醇解产物经尿

素包合后,两种饱和脂肪酸乙酯(棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯)含量分别由 8.20%和 3.59%降为 0。即尿素包合后所得样品中全部为不饱和脂肪酸乙酯。表 5.2 中两种饱和脂肪酸乙酯含量也表现出相同的变化趋势。同时,表 5.1 和表 5.2 中的数据表明,油酸乙酯也可与尿素形成络合物,因此在尿素包合后样品中其含量有所降低。由于饱和脂肪酸乙酯和部分油酸乙酯被分离出去,因此包合后样品中亚油酸乙酯和 α -亚麻酸乙酯含量均有所提高。其中 α -亚麻酸乙酯提高幅度较为明显。以表 5.2 中数据为例,尿素包合后 α -亚麻酸乙酯由醇解反应产物中的 46.77%提高约十个百分点达 57.72%。

表 5.1 紫苏油完全甲酯化,醇解反应产物及产物经尿素包合后各种脂肪酸乙酯相对含量比较

Table 5.1 Comparison of the fatty acid methyl ester composition of perilla oil, alcoholysis product and sample collect after being separated by urea adduction

脂肪酸乙酯类型	完全酯化	醇解反应产物	尿素包合后样品
C16:0	4.6	8.20	0
C18:0	1.27	3.59	0
C18:1	17.1	19.90	15.80
C18:2	12.9	11.73	14.43
C18:3	63.92	56.57	69.77

上述实验的原理在于:尿素溶解于有机溶剂后,分子间以氢键结合形成六面体结构,并以螺旋状的方式构成包合物的框架,每个框架结构中含有六个尿素分子。尿素六面体框架的自由空间最宽处约 0.6 nm,最窄处约 0.5 nm,而棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯等饱和脂肪酸乙酯直径接近 0.45 nm,因此能够被尿素包合于其六面体结晶框架中,并与尿素通过色散力、静电引力相互作用而变的稳定^[10]。另外,二者之间的作用力随着碳链增长而增大,包合物稳定性也相应增加,易于结晶析出^[11]。对于亚油酸乙酯和 α -亚麻酸乙酯等含有多个碳碳双键的不饱和脂肪酸乙酯,因具有双键而结构稳定,导致分子的任意旋转受限呈弯曲状,分子直径变宽,因此不能完全进入尿素六面体框架中。而且双键越多则越难形成稳定的包合物,所以在上述实验结果中 α -亚麻酸乙酯最难被尿素包合,在样品中浓度最高,达到了一定的富集作用^[12~14]。

综上所述,与不饱和脂肪酸乙酯相比较,饱和脂肪酸乙酯更易与尿素形成稳定的

包合物而从溶液中分离析出；含单一双键的脂肪酸乙酯可能会与尿素形成络合物而析出，但分离效果不明显；含两个或多个双键的脂肪酸乙酯形成的稳定包合物，随双键数目增多包合物稳定性增加。因此尿素包合法可以很好的将其醇解产物中所含的饱和脂肪酸乙酯和不饱和脂肪酸乙酯分离，但难于进一步将诸如亚油酸乙酯、 α -亚麻酸乙酯等双键数相近的不饱和脂肪酸乙酯分开。

表 5.2 亚麻油完全甲酯化，醇解反应及醇解产物经尿素包合后各种脂肪酸乙酯相对含量比较

Table 5.2 Comparison of the fatty acid methyl ester composition of linseed oil, alcoholysis product and sample collect after being separated by urea adduction

脂肪酸乙酯	完全酯化	醇解反应产物	尿素包合后样品
C16:0	5.42	7.26	0.29
C18:0	4.04	4.06	0.53
C18:1	25.14	28.08	23.58
C18:2	16.44	13.82	17.71
C18:3	48.96	46.77	57.72

5.4 超临界二氧化碳萃取结合精馏柱精馏分离法

超临界二氧化碳萃取法是近 20 年来兴起的一种新兴分离技术，该方法利用溶质之间的蒸汽压差及各种溶质对溶剂亲和力的不同，通过对温度和压力的调控，可在较低的温度下有效萃取分离目标物质。由于二氧化碳的临界温度接近室温，萃取过程中不破坏热敏性化合物和活性物质；降压后二氧化碳全部从样品中挥发，产品中无溶剂残留，符合绿色化学要求，因此在分离提纯热不稳定的天然产物和具有生物活性的物质时，超临界二氧化碳萃取是一种非常有效的手段。

但是实验中以常规超临界二氧化碳萃取分离亚麻油与乙醇的醇解产物时效果并不理想。说明简单的超临界萃取在分离含有诸如亚油酸乙酯和 α -亚麻酸乙酯等结构相近的不饱和脂肪酸乙酯化合物方面存在缺陷。邱榕^[15]等采用超临界二氧化碳 (SCCO₂) 萃取与精馏柱精馏法相结合，从鱼油脂肪酸乙酯中分离得到纯度较高的 EPA、DHA 乙酯。该组合方法有效地提高了分离效率，有望成为分离醇解产物的可行路线之一。

5.4.1 原料与药品

脂肪酸乙酯混合物（亚麻油、紫苏油醇解制得，主要成分为脂肪酸乙酯和甘油酯类系列化合物：甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯）；苯（分析纯）西安化学试剂厂（纯度 99.5%）；正十八烷，（化学纯）西安化学试剂厂（纯度 99%）； θ 网环填料，天津大学北洋科技开发公司（ 2.5×2.5 mm，不锈 316L）；二氧化碳（食品级）山西宜虹气体工业有限公司提供，（纯度 99.9%）。

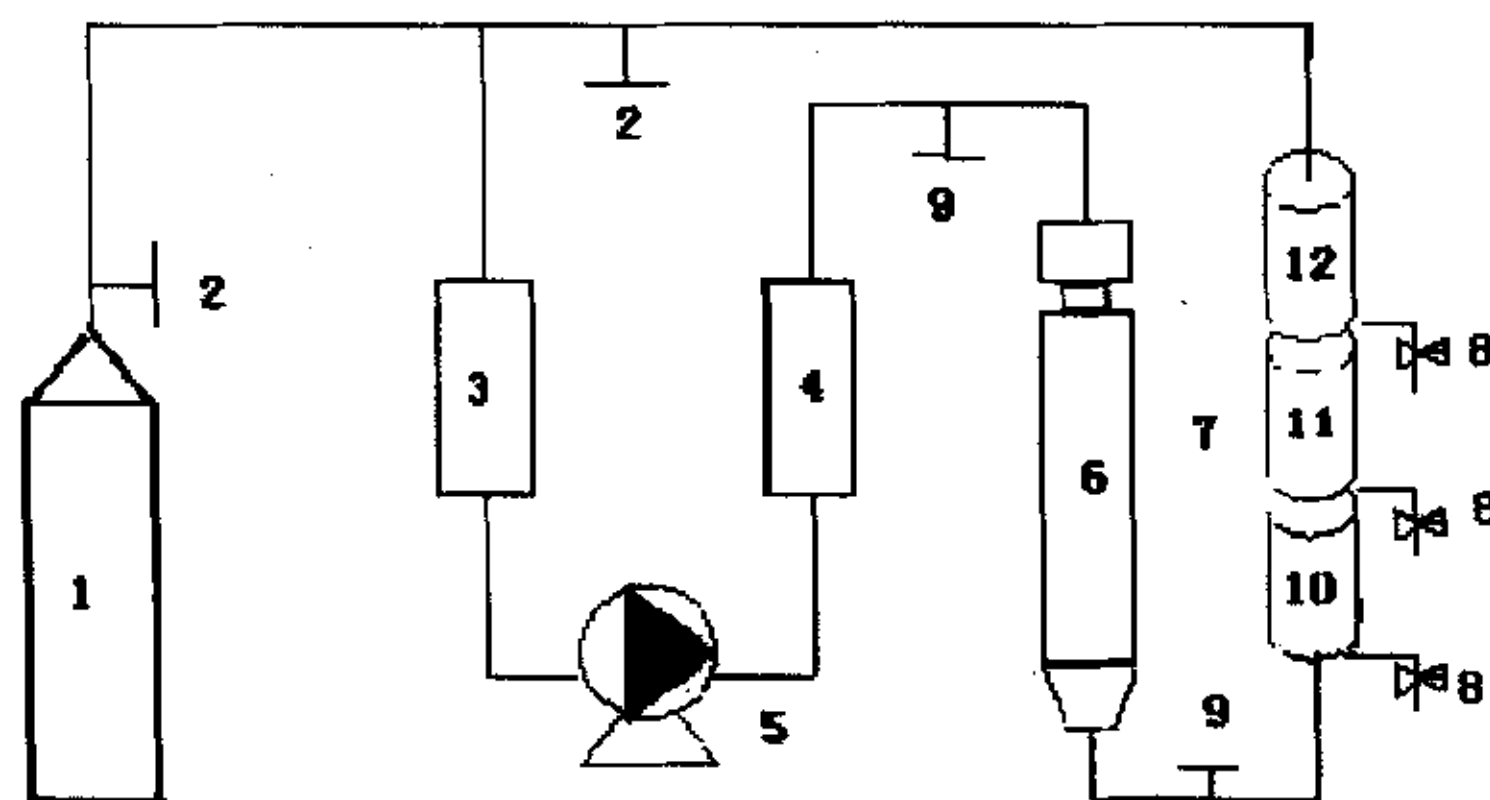


图 5.2 超临界萃取结合精馏柱精馏分离脂肪酸乙酯装置图

1. CO_2 气瓶, 2. 阀, 3. 制冷系统, 4. 预热系统, 5. 高压柱塞泵, 6. 样品池, 7. 三级精馏柱, 8. 取样阀, 9. 微调阀, 10~13. 精馏柱 1~3 级

Figure 5.2 Schematic diagram of the combination of the supercritical CO_2 extraction and distillation experimental apparatus: 1. CO_2 cylinder; 2. Shut-off valve; 3. Cooling system; 4. Preheater; 5. Liquid pump; 6. Feedstock chamber; 7. Separate column; 8. Sample collect valve; 9. Check valve; 10~13. Separate column 1~Separate column 1

5.4.2 实验装置

超临界二氧化碳萃取与精馏柱精馏相结合分离脂肪酸乙酯装置流程如图 5.2 所示，该装置由二氧化碳供给系统、样品池、精馏柱等部分组成。

5.4.3 实验操作

将一定量的醇解反应产物加入到样品池 6 中，调节系统各部分温度到设定值。开

启系统中各相关阀，二氧化碳由钢瓶 1 经制冷系统 3 冷却后由高压柱塞泵 5 加压，通过预热器 4 加热至所需温度后通入样品池 6 中，与其中存放的脂肪酸乙酯混合物充分接触，由于脂肪酸乙酯与其他甘油酯类混合物在超临界二氧化碳介质中的溶解度存在差异，因此可通过调节温度、压力使脂肪酸乙酯优先溶解于二氧化碳而流出样品池。流出的脂肪酸乙酯进入内径为 5 cm 高为 35 cm 的三级精馏柱 7。精馏柱内部填装有不锈钢丝网卷成的 θ 网环填料 (2.5×2.5 mm, 不锈钢 316L); 外部用恒温循环水浴加热，从柱底 (T1) 到柱顶 (T3) 施加有温度梯度，脂肪酸乙酯被分离富集于精馏柱各段层中。由精馏柱顶部流出的超临界二氧化碳流体通过阀 2 后再次循环利用。实验过程中每隔 20 min 取样一次，进行色谱分析。

5.4.4 结果与讨论

表 5.3、表 5.4 为不同实验操作条件下超临界二氧化碳萃取与精馏柱精馏法相结合所得数据。其中，表 5.3 所用原料为紫苏油与乙醇的醇解产物，其脂肪酸乙酯总含量为 39.1%。由表 5.3 中 SC1, SC2 所列数据可以看出，与原料中所含的脂肪酸乙酯总含量相比，两组数据中脂肪酸乙酯总含量均有明显增加，其中 SC1 中增加为 60.87%，而 SC2 中则高达 71.04%。上述结果表明，超临界二氧化碳萃取结合精馏柱精馏法可以将脂肪酸乙酯从未反应的甘油三酯以及副产物甘油单酯、甘油二酯中分离富集。另外，油酸乙酯 (C18:1) 和亚油酸乙酯 (C18:2) 在总脂肪酸乙酯中相对含量与原料中基本相等；而两种饱和脂肪酸乙酯含量降低，以 SC2 为例，棕榈酸乙酯 (C16:0) 含量由 10.67% 降低为 7.3%，而硬脂酸乙酯含量由 8.31% 降低为 3.56%；SC1 和 SC2 所得的样品中 α -亚麻酸乙酯 (C18:3) 含量由原料中 50.21% 提高为 56% 以上。综上所述可知，在表 5.3 的实验操作条件下，超临界二氧化碳萃取结合精馏柱精馏法虽可较好的富集脂肪酸乙酯，却无法进一步分离结构相近的各种脂肪酸乙酯。

为验证上述结论，本文通过改变操作条件和原料种类对超临界萃取结合精馏柱精馏法分离脂肪酸乙酯做了进一步探讨。表 5.4 中以亚麻油与乙醇的醇解产物为原料，其中各种脂肪酸乙酯总含量为 59.4%。由表中数据可以看出，虽然所用原料中脂肪酸乙酯含量较表 5.3 中所用原料高，但超临界二氧化碳萃取结合精馏柱精馏法仍可对其起到一定的分离富集作用，其中 SC2 中脂肪酸乙酯含量由原料中 59.4% 提高为 67.17%，而 SC3 中则高达 76.71%。

表 5.3 超临界萃取结合精馏柱精馏法分离紫苏油醇解反应产物实验结果

Table 5.3 Experiment^a results of separate the fatty acid ester by combination of the supercritical carbon dioxide extraction and rectification

	T (°C)	P (MPa)	Concentration of EE (wt.%) ^e	C16:0 wt.% ^f	C18:0 wt.%	C18:1 wt.%	C18:2 wt.%	C18:3 wt.%
FT ^b			39.1	10.76	8.31	20.1	10.6	50.21
SC1 ^c	45	10	60.87	7.57	4.21	20.4	11.72	56.4
SC2	50	10	71.04	7.3	3.56	19.78	11.88	57.25
SC3	55	10			-d			

a: Condition of Feedstock chamber: 45 °C, 15 MPa; b: FT, Feedstock, fatty acid ester obtained from alcoholysis between perilla oil and ethanol; c: SC1~SC3: Separate column 1~Separate column 3; -d: Below detectable lever; e: The concentration of fatty acid ethyl ester in the feedstock or sample; f: The concentration of C16:0 in the fatty acid ethyl ester.

另外一个值得注意的实验结果是：表 5.3 中 SC3 及表 5.4 中 SC1 均未收集到样品，但上述实验现象的原因可能并不相同，表 5.3 中 SC3 未收集到样品的原因在于：与样品池中的操作条件相比，表 5.3 中 SC2 的温度升高 5 °C，而压力降低 5 MPa。由于压力较低时二氧化碳可表现出超临界流体特有的“温度负效应”（retrograde behavior）^[16]，即：温度升高，超临界二氧化碳溶解能力降低。所以，SC2 的温度较样品池升高 5 °C 后，降低了超临界二氧化碳流体对各种脂肪酸乙酯的溶解作用，导致脂肪酸乙酯析出。另外，与样品池中压力相比，表 5.3 中 SC2 的压力降低 5 MPa，导致超临界二氧化碳流体的密度降低，研究表明，超临界二氧化碳的溶解能力随密度降低而下降，因此压力由 15 MPa 降低为 10 MPa，会对脂肪酸乙酯在超临界二氧化碳的溶解作用产生不利影响^[17]。上述温度和压力的协同作用可能导致溶解于超临界二氧化碳中的脂肪酸乙酯在 SC2 中全部析出而难以进入 SC3，因此 SC3 中未收集到样品。而表 5.4 的 SC1 中未收集到样品的原因可能在于：与样品池中的实验条件：45 °C，12 MPa 相比，SC1 中温度降低为 41 °C，如前所述，由于超临界流体的温度负效应，因此，降温促进了超临界二氧化碳流体对各种脂肪酸乙酯的溶解作用；然而压力由样品池中 12 MPa 降低为 9 MPa 后，由于超临界二氧化碳流体密度降低溶解能力下降，导致其对各种脂肪酸乙酯

的溶解作用产生不利影响。实验中上述两种正反作用可能相互抵消, 即: 45 °C, 12 MPa 和 41 °C, 9 MPa 状态下的超临界二氧化碳对脂肪酸乙酯具有相同的溶解能力。因此从样品池中流出的超临界二氧化碳中携带的脂肪酸乙酯不会在 SC1 中析出。

表 5.4 超临界萃取结合精馏柱精馏法分离亚麻油醇解反应产物实验结果

Table 5.4 Experiment^a results of separate the fatty acid ester by combination of the supercritical carbon dioxide extraction and rectification

	T (°C)	P (MPa)	Concentration of EE (wt.%) ^e	C16:0 wt.% ^f	C18:0 wt.%	C18:1 wt.%	C18:2 wt.%	C18:3 wt.%
FT ^b			59.4	7.29	4.78	28.45	13.15	46.24
SC1 ^c	41	9			-d			
SC2	45	9	67.17	7.96	3.7	25.39	13.2	48.7
SC3	48	9	76.71	14.49	2.67	20.4	12.1	50.4

a: Condition of Feedstock chamber: 45 °C, 12 MPa; b: FT, Feedstock, fatty acid ester obtained from alcoholysis between linseed oil and ethanol; c: SC1~SC3: Separate column 1~Separate column 3; -d: Below detectable lever; e: The concentration of fatty acid ethyl ester in the feedstock or sample; f: The concentration of C16:0 in the fatty acid ethyl ester.

5.5 超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法

亚麻油与乙醇发生醇解反应生产物主要为棕榈酸乙酯、硬脂酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯和 α -亚麻酸乙酯。若按脂肪酸分子中碳链长度分组, 可将上面五种化合物分为两类: 棕榈酸乙酯, 相应脂肪酸中含十六个碳原子; 硬脂酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯和 α -亚麻酸乙酯, 相应脂肪酸中含十八个碳原子。若按分子中不饱和碳碳双键数目加以分组, 又可将上述五种化合物分为如下四类: 棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯, 分子中无碳碳双键; 油酸乙酯, 分子中含一个碳碳双键; 亚油酸乙酯, 分子中含两个碳碳双键; α -亚麻酸乙酯, 分子中含三个碳碳双键。

大量研究表明: 超临界二氧化碳萃取法能较好的以碳原子数为序分离各种脂肪酸乙酯, 却不能分离碳原子数相同而分子中不饱和碳碳双键数目不同的脂肪酸乙酯。银

离子络合法则可通过银离子 (Ag^+) 与不饱和碳碳双键 ($\text{C}=\text{C}$) 作用形成络合物而分离分子中双键数目不同的脂肪酸类化合物。其机理为^[18]: 银的 s 轨道与碳碳双键的 π 成键轨道结合, 形成一个 σ 配位键; 银的 d 轨道与碳碳双键的 π 反键轨道结合, 形成一个 π 配位键, 而且随着分子中双键数目的增加上述络合作用增强, 形成的络合物稳定性相应增加。不含双键的饱和化合物及其衍生物则不与银离子相互作用。因此, 银离子络合法可根据化合物分子中是否含有双键及双键数目的多少来分离脂肪酸及其衍生物。

Tatsuru 等^[19]进行了 AgNO_3 水溶液络合和超临界 CO_2 萃取两步法从沙丁鱼油乙酯中提纯 DHA、EPA 的研究。结果显示, 当 AgNO_3 溶液浓度达到 5 M 时, 含四个以上双键的多价不饱和脂肪酸酯几乎全部分配到水相中, 而其他脂肪酸酯仍留在油相中, 然后用超临界二氧化碳萃取 AgNO_3 水相, 获得了纯度 90% 以上的 DHA。上述研究工作分离效果较好, 但操作较复杂。

本文将银离子负载于多孔载体上, 通过调节超临界二氧化碳的流体性质实现不同脂肪酸乙酯与银离子间的吸附、脱附平衡, 从而将各种饱和度不同的脂肪酸乙酯分离^[9]。同时, 调节超临界二氧化碳流体的温度、压力还可以影响其密度及与密度紧密相关的溶剂特性, 进而影响不同碳链长度的脂肪酸乙酯在超临界二氧化碳中的溶解度, 达到分离不同碳链长度脂肪酸乙酯的目的。通过上述两种方法的有效组合, 分离得到了高纯度的 α -亚麻酸乙酯。

5.5.1 原料与药品

脂肪酸乙酯混合物 (亚麻油、紫苏油醇解制得, 主要成分为脂肪酸乙酯和甘油酯类系列化合物: 甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯); 无水乙醇 (分析纯) 北京精细化学品有限公司 (纯度大于 99.0%); 苯 (分析纯) 西安化学试剂厂 (纯度 99.5%); 正十八烷, (化学纯) 西安化学试剂厂 (纯度 99%); 三氧化二铝, 晶体结构为 γ 型; 硝酸银, (分析纯) 天津市文达希贵金属试剂化工厂 (纯度大于 99.8%); 二氧化碳 (食品级) 山西宜虹气体工业有限公司提供, (纯度 99.9%)。

5.5.2 银离子络合吸附柱制备法^[20]

将 50 g 硝酸银溶解于 500 ml 70 % 的乙醇中配成溶液, 加入 500 g 粒径为 30~80 目

的三氧化二铝颗粒，混和均匀后于室温、避光条件下浸渍 10 h，恒温 45 ℃ 直至溶剂完全挥发，制得负载有硝酸银的三氧化二铝固定相(硝酸银与三氧化二铝质量比为 1:10)，将其置于上下端装有致密铁网的套筒（5 cm i.d. × 30 cm）中。

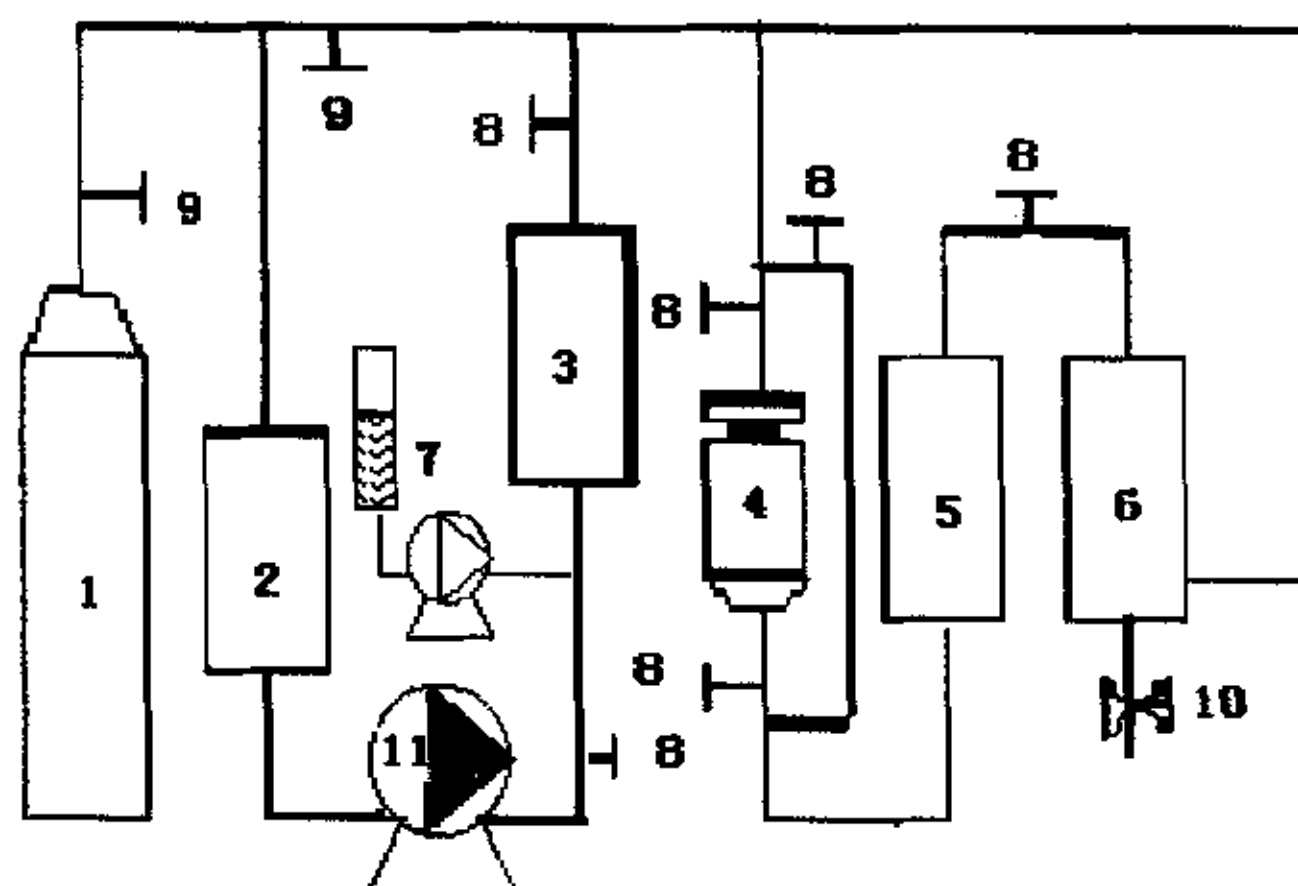


图 5.3 超临界萃取结合银离子络合法分离脂肪酸乙酯装置图

1. CO₂ 气瓶, 2. 制冷系统, 3. 预热系统, 4. 样品池, 5. 银离子络合吸附柱, 6. 分离器, 7. 夹带剂供给系统, 8. 微调阀, 9. 截至阀, 10. 取样阀, 11. 高压柱塞泵

Figure 5.3 Schematic diagram of the integrated supercritical CO₂ extraction with chemical adsorption by silver nitrate supported Al₂O₃ column experimental apparatus: 1.CO₂ cylinder; 2.Cooling system; 3.Preheater; 4.Feedstock chamber, 5.Silver nitrate supported Al₂O₃ column; 6.Sample collect chamber; 7.entrainer provide system; 8.Check valve; 9.Shut-off valve; 10.Sample collect valve; 11.Liquid pump

5.5.3 实验装置图

超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法所用实验装置如图 5.3 所示。该装置由二氧化碳供给系统、夹带剂供给系统、样品池、银离子络合吸附柱等几部分组成。

5.5.4 实验操作

将一定量的醇解产物加入到样品池中，调节系统各部分温度到设定值。启动高压柱塞泵 11，将经制冷系统 2 液化的二氧化碳注入加热系统 3 中。开启系统中各相关阀，调节各部分压力到设定值，使二氧化碳进入样品池 4。根据各种脂肪酸乙酯在超临界二氧化碳介质中的溶解度差异，短链脂肪酸乙酯更易溶于二氧化碳中而最先流出样品

池被分离富集。其他四种含有十八个碳原子的脂肪酸乙酯溶解于超临界二氧化碳后，随气流进入银离子络合吸附柱 5。由于四种十八碳酸乙酯分子中所含碳碳双键数目不同，因此其与银离子形成不同强度的络合物，或不形成络合物。通过调节温度、压力或打入夹带剂乙醇依次分离双键数目不同的脂肪酸乙酯分子。高压二氧化碳经过分离器 6 回到制冷系统 2 后重复使用。实验过程中每隔 20 min 取样一次，进行色谱分析。

5.5.5 结果与讨论

表 5.5 为超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法分离脂肪酸乙酯的实验结果。所用原料为亚麻油与乙醇的醇解产物，脂肪酸乙酯总含量为 73%。五种脂肪酸乙酯在总脂肪酸乙酯中的相对浓度为：棕榈酸乙酯，5.42%；硬脂酸乙酯，4.04%；油酸乙酯，25.14%；亚油酸乙酯，16.44%； α -亚麻酸乙酯，48.96%。

操作时间

由表 5.5 中数据可以看出：在 D1 系列，即实验开始的 20 min 内收集所得的样品中，样品中脂肪酸乙酯总含量为 100%，且全部为棕榈酸乙酯（表中以 C16:0 表示）和硬脂酸乙酯（表中以 C18:0 表示），未检测到其他脂肪酸乙酯及甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯等。另外，棕榈酸乙酯在样品中的相对含量为 72.19%，几乎为硬脂酸乙酯含量的三倍。上述实验数据表明，与不饱和脂肪酸乙酯比较，饱和脂肪酸乙酯更易溶解于超临界二氧化碳中，因此首先被萃取出来，且碳链越短在超临界二氧化碳中的溶解度越高。

D1 系列中收集得到样品 0.16 g，实验中 20 min 到 40 min 内，即 D2 系列收集所得的样品质量为 0.59 g，可见 D1 和 D2 系列中收集到的样品总量较少，但样品中饱和脂肪酸乙酯含量很高，其中 D1 系列的饱和脂肪酸乙酯含量将近百分之百，而 D2 系列中的饱和脂肪酸乙酯含量也占到 88%。

表 5.5 超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法分离脂肪酸乙酯实验结果

Table 5.5 Experiment^a results of separate the fatty acid ester by combination of supercritical carbon dioxide extraction with chemical adsorption by silver nitrate supported Al₂O₃ column

	Amount of sample (g)	Concentration of EE (wt.%) ^d	C16:0 wt.% ^e	C18:0 wt.%	C18:1 wt.%	C18:2 wt.%	C18:3 wt.%
FT ^b		73	5.42	4.04	25.14	16.44	48.96
D1 ^c	0.16	100	72.19	27.81	0	0	0
D2	0.59	100	63.67	24.42	11.91	0	0
D3	3.42	81.7	11.74	11.21	74.21	2.93	0
D4	2.74	75	1.56	0.16	58.56	39.72	0
D5	3.73	66.4	0.62	1.18	25.38	31.5	41.32
D6	3.13	78	0	0	4.52	9.80	85.68
D7	3	40.2	0.38	0	3.9	2.35	93.35
D8	0.54	33.4	1.44	0	1.71	0	96.85
D9	1.33	66.1	1.29	0	1.60	0	97.11
D10	1	66.0	2.96	0	1.94	1.53	93.57

a: The amount of Feedstock was 20 g, and the samples collected in the D1~D10 was 17.95 g, as a result the ratio of collection was 89.75%. And 0.5 g was remained in the sample container; b: Feedstock, fatty acid ester obtained from alcoholysis between linseed oil and ethanol; c: The condition of D1~D4 were, sample container, 9 MPa, 45 °C; Silver nitrate supported Al₂O₃ column, 9 MPa, 45 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C. The condition of D5~D6 were, sample container, 12 MPa, 45 °C; Silver nitrate supported Al₂O₃ column, 12 MPa, 45 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C. In the operation of D7~D8, the sample container was cut off, and the Silver nitrate supported Al₂O₃ column, 20 MPa, 45 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C. In the operation of D9~D10, the sample container were cut off, and the ethanol was added as the entrainer and the rest of the operation condition as given in the D7~D8; d: The concentration of fatty acid ethyl ester in the feedstock or sample; e: The concentration of C16:0 in the fatty acid ethyl ester.

另外, 由公式(1)的计算可以看出, 通过 D1、D2 系列的操作, 原料中已有 49.27% 的饱和脂肪酸乙酯被分离富集。因此, 压力为 9 MPa 时, 超临界二氧化碳可以从脂肪酸乙酯混合物中优先分离饱和脂肪酸乙酯, 并可通过进一步优化体系的温度、压力及萃取时间, 将饱和脂肪酸乙酯和不饱和脂肪酸乙酯分离^[5-6]。

$$\text{recovery (\%)} = \frac{\text{Amount of saturated fatty acid esters in D1 and D2}}{\text{Amount of saturated fatty acid esters in feedstock}} \quad \text{formula (1)}$$

$$= \frac{0.16 \times (72.19\% + 27.18\%) + 0.59 \times (63.67\% + 24.42\%)}{20 \times 73\% \times (5.42\% + 4.04\%)} = 49.27\%$$

综合比较 D1~D3 系列中的实验数据可知, 随操作时间增加, 样品中油酸乙酯 (表中以 C18:1 表示) 含量逐渐增加, 在 D1 系列中含量为 0, D2 系列中含量为 11.91%, 而由 D3 系列收集得到的样品, 其主要成分为油酸乙酯, 含量高达 74.21%。因此可以断定在操作条件为 9 MPa, 45℃ 时, 银离子络合吸附柱对油酸乙酯有一定的弱吸附作用, 但形成的络合物稳定性较差, 故 D1~D3 系列中其含量迅速上升。D1~D3 系列操作对棕榈酸乙酯、硬脂酸乙酯、油酸乙酯的分离作用的另一可能原因在于三种脂肪酸乙酯在超临界二氧化碳中的溶解度差异, 即短链脂肪酸乙酯较长链脂肪酸乙酯易溶于超临界二氧化碳, 饱和脂肪酸较不饱和脂肪酸乙酯易溶于超临界二氧化碳^[21-22]。

综合比较 D1~D4 系列可得如下结果: 随着操作时间的延长, 棕榈酸乙酯、硬脂酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯 (表中以 C18:2 表示) 在样品中依次出现, 且浓度呈规律性变化, 其中棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯含量一直呈下降趋势, 可能与其最易溶解于超临界二氧化碳而在实验开始阶段就迅速达到最高浓度有关; 油酸乙酯呈先升高后降低的趋势; 亚油酸乙酯由 D3 系列中 2.93% 迅速上升为 D4 系列中的 39.72%, 若综合考虑其在 D3~D7 系列中的浓度变化, 同样呈现与油酸乙酯相同的先升高后降低变化规律。另外一个值得注意的实验现象是: 在 D1~D4 系列中一直未检测到 α -亚麻酸乙酯 (表中以 C18:3 表示)。可能的原因有个方面: 第一, 在样品池的操作条件 9 MPa, 45℃ 下, α -亚麻酸乙酯在超临界二氧化碳中的溶解度较小, 因此仍然留在其中; 另外一原因在于, 若该条件下 α -亚麻酸乙酯能少量溶解于超临界二氧化碳中, 则可能与其他脂肪酸乙酯一起进入银离子络合吸附柱而被吸附, 由于在银离子络合吸附柱的操作

条件下 α -亚麻酸乙酯与银离子形成的络合物稳定性较强很难分解,导致 α -亚麻酸乙酯被吸附于银离子络合吸附柱中不能进入分离器中,从而与其他脂肪酸乙酯分离。

压力对分离效果的影响

D5~D6 系列是其他条件不变,样品池和银离子络合吸附柱中二氧化碳压力提高为 12 MPa 后所得的结果。可以看出, D5 系列是所有系列中分离效果最差的一组,色谱分析结果表明, D5 系列收集得到的样品中油酸乙酯含量与原料中相等;亚油酸乙酯纯度由 D4 系列中 39.72%降低为 31.5%; α -亚麻酸乙酯含量由 D4 系列中的 0 上升为 41.32%,略低于其在原料中含量,与其他脂肪酸乙酯的分离效果不佳。此时收集得到的 α -亚麻酸乙酯可能主要来自通过物理吸附作用吸附于三氧化二铝表面及碳链中只有一个或两个双键与银离子络合形成稳定性较差络合物的分子。另外,与 D1~D4 系列比较, D5 系列所得样品中脂肪酸乙酯的总含量降低为 66.4%,其原因可能在于压力升高后,原料中其他轻组分(如饱和脂肪酸单甘酯等)与各种脂肪酸乙酯一起被萃取进入分离器中被富集,导致脂肪酸乙酯在收集到的样品中含量降低。由于这些轻组分含量较少,因此在 D6 系列中脂肪酸乙酯的含量迅速上升为 78%。

D7~D8 系列的实验操作中将银离子络合吸附柱压力调节为 20 MPa,为防止样品池中其他重组分被超临界二氧化碳萃取而影响脂肪酸乙酯分离效果,实验过程中关闭了样品池上下两端的微调阀,将其截断。可以看出,压力为 20 MPa 时,所得样品中 α -亚麻酸乙酯的含量由 D6 系列中的 85.68%进一步升高,达到 90%以上。上述结果表明当超临界二氧化碳压力升高后, α -亚麻酸乙酯与银离子形成的络合物分解加剧,溶解于超临界二氧化碳后流出银离子络合吸附柱。另外, D3~D7 系列中收集得到的样品量一直维持在 3 g 左右,而 D8 中收集得到的样品量明显减少,仅为 0.54 g。通过公式(2)计算可得, D1~D8 系列收集得到的样品中 α -亚麻酸乙酯仅为样品中全部 α -亚麻酸乙酯的 61.76%,即体系中尚有约 40%的 α -亚麻酸乙酯未被分离富集。因此,可以断言银离子络合吸附柱条件为 45 °C、20 MPa 时并不能使 α -亚麻酸乙酯与银离子形成的络合物全部分解。

$$\text{recovery (\%)} = \frac{\text{Amount of ethyl } \alpha\text{-linolenate in D1 to D8}}{\text{Amount of ethyl } \alpha\text{-linolenate in feedstock}} \quad \text{formula (2)}$$

夹带剂对分离效果影响

欲使吸附于银离子络合吸附柱中的 α -亚麻酸乙酯被完全脱附,需进一步提高压力或加入夹带剂^[9]增加二氧化碳的溶解能力。考虑到提高压力会对耐压设备提出更高的要求,同时增加了操作过程的危险性,实验中采用加入夹带剂乙醇的方法提高二氧化碳溶解能力。

表 5.5 中 D9~D10 系列是银离子络合吸附柱温度为 45℃,压力为 20 MPa,夹带剂乙醇流量 3 ml/min 时所得的结果。可以看出,与 D7~D8 系列所得结果相比,加入夹带剂后, α -亚麻酸乙酯含量变化不大,仍维持在 90%以上,但收集得到的样品量明显上升,其中 D9 中得到的样品质量为 1.33 g。另一个有意义的结果是:与 D7~D8 中所得的样品相比,D9~D10 系列收集到的样品中脂肪酸乙酯总含量提高将近一倍,由 D7 系列中的 33.4% 和 D8 系列系列中 40%提高为 66%。其可能原因在于:原料中部分甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯分子中亚油酸、 α -亚麻酸等多价不饱和脂肪酸含量较高,因此可与银离子相互作用而形成络合物。但该类络合物的稳定性较银离子与 α -亚麻酸乙酯形成的络合物稳定性差。因此,当压力为 20 MPa、未加入夹带剂时,在高压二氧化碳的作用下上述甘油酯类与银离子形成的络合物可能大量分解并溶于超临界二氧化碳流出,导致 D7~D8 系列收集得到的样品中脂肪酸乙酯的相对含量降低。而 α -亚麻酸乙酯与银离子形成的络合物稳定性最强,因此需加入夹带剂乙醇增加超临界二氧化碳的极性和溶解能力后才能使其分解^[23]。

表 5.5 实验操作中共加入原料 20 g, D1~D10 系列中收集得到样品 17.95 g,操作结束后样品池中剩余物质量为 0.5 g,样品收率为 89.75%。

初始压力对分离效果的影响

实验过程中,超临界二氧化碳的溶解能力和银离子络合吸附柱的分离选择性是两个相互制约的重要因素。若二氧化碳对脂肪酸乙酯的溶解度不高,则一定时间内的萃取效率偏低,但银离子络合吸附柱对各种脂肪酸的分离效率高。若原料中所有组分在超临界二氧化碳中的溶解度普遍提高,则有可能导致银离子络合吸附柱分离效果不佳。实验操作中的初始压力可调节超临界二氧化碳的溶解度和银离子络合吸附柱分离选择性,并可使二者同时达到较高的水平。

表 5.6 所列实验数据中 E1~E8 系列是初始压力为 10 MPa, 其他实验条件与表 5.5 中 D1~D4 系列相同时所得结果。

表 5.7 中所列实验数据是初始压力 12 MPa, 其他实验条件与表 5.5 中的 D1~D4 系列相同时所得结果。

表 5.6 超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法分离脂肪酸乙酯实验结果

Table 5.6 Experiment^a results of separate the fatty acid ester by combination of supercritical carbon dioxide extraction with chemical adsorption by silver nitrate supported Al_2O_3 column

	Amount of sample (g)	Concentration of EE (wt.%) ^d	C16:0 wt.% ^e	C18:0 wt.%	C18:1 wt.%	C18:2 wt.%	C18:3 wt.%
FT ^b		77	5.42	4.04	25.14	16.44	48.96
E1 ^c	2	93	27.54	6.15	30.45	9.68	26.15
E2	2	80.5	15.00	5.46	34.72	13.67	30.98
E3	2	79.7	9.73	1.34	32.51	15.66	40.75
E4	5.5	93	6.17	4.50	32.14	14.48	42.7
E5	3.5	81.6	4.31	4.38	30.1	14.34	46.90
E6	2.5	85	7.39	4.47	30.13	14.25	43.73
E7	2	56.2	2.87	3.20	25.11	13.26	55.55
E8	1.5	83.4	2.47	3.0	27.26	13.81	53.44
E9	1	76.3	1.87	1.65	19.58	14.14	62.75
E10	1	75.7	1.04	1.15	13.66	13.68	70.45

a: The amount of Feedstock was 70 g, and the samples collected in the E1~E10 was 23 g, as a result the ratio of collection was 39%. And 10 g were remained in the sample container; b: Feedstock, fatty acid ester obtained from alcoholysis between linseed oil and ethanol; c: The condition of E1~E8 were, sample container, 10 MPa, 45 °C; Silver nitrate supported Al_2O_3 column, 10 MPa, 45 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C. The condition of E9~E10 were, sample container, 12 MPa, 45 °C; Silver nitrate supported Al_2O_3 column, 12 MPa, 45 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C; d: The concentration of fatty acid ethyl ester in the feedstock or sample; e: The concentration of C16:0 in the fatty acid ethyl ester.

比较表 5.5、表 5.6、表 5.7 中相关数据,可以看出当温度恒定为 45 °C 时,表 5.5 中 D1~D4 系列(初始压力为 9 MPa)收集得到的样品中一直未检测到 α -亚麻酸乙酯;而当初始压力为 10 MPa 时,E1 系列中 α -亚麻酸乙酯含量为 26.15%,该数据表明,与初始压力 9 MPa 相比,初始压力为 10 MPa 时,超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法对 α -亚麻酸乙酯仍有分离作用,但分离效果已明显降低。初始压力上升为 12 MPa 后,该组合方法对 α -亚麻酸乙酯的分离效果进一步降低,其中 F1 系列中 α -亚麻酸乙酯含量为 32.04%。另外,初始压力为 12 MPa 时,棕榈酸乙酯由 9 MPa 时 D1 系列中的 100%降为 13.38%,低于 10 MPa 时的 27.54%。

表 5.7 超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法分离脂肪酸乙酯实验结果

Table 5.7 Experiment^a results of separate the fatty acid ester by combination of supercritical carbon dioxide extraction with chemical adsorption by silver nitrate supported Al₂O₃ column

	Amount of sample (g)	Concentration of EE (wt.%) ^d	C16:0 wt.% ^e	C18:0 wt.%	C18:1 wt.%	C18:2 wt.%	C18:3 wt.%
FT ^b		77	5.42	4.04	25.14	16.44	48.96
F1 ^c	2	72.6	13.38	5.47	35.11	13.80	32.04
F2	2	79.6	6.45	5.42	33.25	13.83	41.03
F3	2	73.8	3.08	3.18	28.44	15.41	49.87
F4	1	70.1	2.53	1.53	22.92	15.67	57.33
F5	1	77.5	2.70	1.67	17.21	14.46	63.96

a: The amount of Feedstock was 26 g, and the samples collected in the F1~F5 was 8 g, as a result the ratio of collection was 30%. And 8 g were remained in the sample container; b: Feedstock, fatty acid ester obtained from alcoholysis between linseed oil and ethanol; c: The condition of F1~F5 were, sample container, 12 MPa, 45 °C; Silver nitrate supported Al₂O₃ column, 12 MPa, 45 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C; d: The concentration of fatty acid ethyl ester in the feedstock or sample; e: The concentration of C16:0 in the fatty acid ethyl ester.

综上所述,有如下结论:随实验操作初始压力升高,超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法对 α -亚麻酸乙酯的分离效果逐渐降低。其可能原因在于:压力升高后各种脂肪酸乙酯,尤其是多价不饱和脂肪酸乙酯在超临界二氧化碳中的溶解度增加。

另外, 压力升高后, 超临界二氧化碳对 α -亚麻酸乙酯与银离子形成的络合物的分解作用增强, 使得 α -亚麻酸乙酯难以与银离子形成络合物, 故初始压力升高对分离效果产生不利影响。考虑到三组数据中, 9 MPa 时分离效果最好, 另外, 进一步降低压力时萃取效率不高等因素, 本文没有考察更低压力下超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法的分离效果。

另外, 起始压力还会进一步影响其后高压下的分离效果。表 5.5 中 D5~D6 系列是压力由 9 MPa 升高为 12 MPa 后的所得的结果, 其中 α -亚麻酸乙酯含量由 9 MPa 下的 0, 迅速上升为 41.32%, 进而上升为 85.68%。表 5.6 中 E9~E10 系列是压力由 10 MPa 升高为 12 MPa 后的结果, 其中 E10 系列的 α -亚麻酸乙酯含量为 70.45%, 明显低于 D6 系列中的相应含量; 表 5.7 的 α -亚麻酸乙酯的最高含量仅为 63.96%。可见 45℃下, 当实验操作中压力由低到高逐渐变化时分离效果较好, 且起始压力越低分离效果越明显。

产生上述实验结果原因在于: 初始压力较低时, 大量的饱和脂肪酸乙酯和不饱和度低的脂肪酸乙酯溶解于超临界二氧化碳中, 随流体直接通过银离子络合吸附柱进入分离器析出后被分离富集。此时, 较难溶于超临界二氧化碳中的 α -亚麻酸乙酯等多价不饱和脂肪酸仍大量留在样品池中, 少量溶于超临界二氧化碳后被银离子络合吸附柱吸附而不能进入分离器被分离富集。升高压力后, α -亚麻酸乙酯在超临界二氧化碳中的溶解度增加, 其与银离子形成的络合物稳定性降低, 因此随超临界二氧化碳流出而被分离富集, 此时由于大量的饱和脂肪酸乙酯和低不饱和度脂肪酸乙酯在低压阶段已被分离除去, 因此得到的样品中 α -亚麻酸乙酯含量较高。当初始压力过高时, 如前所述, 一方面 α -亚麻酸乙酯在超临界二氧化碳中的溶解度增加, 另一方面高压下超临界二氧化碳对 α -亚麻酸乙酯与银离子形成的络合物的分解作用增强, 因此实验开始阶段即有大量 α -亚麻酸乙酯溶解于超临界二氧化碳中而进入分离器被富集, 降低了饱和脂肪酸乙酯浓度。压力进一步升高后, 由于部分 α -亚麻酸乙酯在相对较低压力阶段已被分离除去, 因此样品中 α -亚麻酸乙酯含量很难进一步提高。

但是实际操作中也注意到, 若起始压力过低, 所有脂肪酸乙酯在超临界二氧化碳中的溶解度均降低, 萃取速度偏低。

为验证上述结论, 本章初步考察了温度为 50℃, 初始压力为 10 MPa、12 MPa 和

15 MPa 时, 初始压力对分离效果的影响, 所得数据列于表 5.8 中。由表中数据可以看出, 50 °C 时所得规律与 45 °C 时基本一致。压力由 10 MPa 升高为 12 MPa 后 α -亚麻酸乙酯含量由 6.91% 升高为 30.90%, 饱和脂肪酸乙酯纯度降低, 分离效果不佳。而当初始压力为 15 MPa 时, J1~J3 系列中各种脂肪酸乙酯含量基与原料中含量基本相等, 说明此时超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法对亚麻油、紫苏油的醇解反应产物已无分离效果。

表 5.8 超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法分离脂肪酸乙酯实验中, 50 °C 时初始压力对分离效果的影响结果

Table 5.8 Results of integrated supercritical carbon dioxide extraction and silver nitrate supported Al_2O_3 column experiments^a

	Time (min)	Concentration of EE (wt.%) ^d	C16:0 wt.% ^e	C18:0 wt.%	C18:1 wt.%	C18:2 wt.%	C18:3 wt.%
FT ^b			5.42	4.04	25.14	16.44	48.96
H1 ^c	30	75.20	25.45	12.00	48.12	7.50	6.91
I1	30	82.56	6.68	5.11	37.45	19.84	30.90
I2	70	79.11	5.37	4.68	33.09	19.55	37.30
I3	100	77.7	9.02	3.88	22.48	12.02	52.59
J1	15	76.0	8.56	5.61	29.96	10.00	45.85
J2	60	75.7	8.38	5.62	29.73	10.21	45.93
J3	120	77.55	8.23	4.71	29.17	10.55	47.16

a: Influence of initial pressure at 50 °C; b: Feedstock, fatty acid ester obtained from alcoholysis between linseed oil and ethanol; c: The condition of H1 were, sample container, 10 MPa, 50 °C; Silver nitrate supported Al_2O_3 column, 9 MPa, 50 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C. The condition of I1~I3 were, sample container, 12 MPa, 50 °C; Silver nitrate supported Al_2O_3 column, 12 MPa, 50 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C. The condition of J1~J3 were, sample container, 15 MPa, 50 °C; Silver nitrate supported Al_2O_3 column, 12 MPa, 50 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C; d: The concentration of fatty acid ethyl ester in the feedstock or sample; e: The concentration of C16:0 in the fatty acid ethyl ester.

温度对分离效果的影响

温度是影响超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法分离效果的另一重要因

素。表 5.6 中 E1~E8 系列是样品池和银离子络合吸附柱的压力为 10 MPa, 温度为 45 °C 时得到的结果; 表 5.8 中 H1 系列是相同压力下, 样品池和银离子络合吸附柱的温度为 50 °C 时所得结果。可以看出, 表 5.6 的 E1 系列中 α -亚麻酸乙酯含量为 26.15%, 而当温度升高为 50 °C 后, H1 系列所得样品中 α -亚麻酸乙酯含量仅为 6.91%。

可见当压力确定为 10 MPa 时, 温度由 45 °C 升高到 50 °C 后, 超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法对 α -亚麻酸乙酯的分离效率显著提高。原因在于在相对较低的压力下, 超临界二氧化碳的“温度负效应”^[16]现象明显, 即温度变化能够明显影响 α -亚麻酸乙酯在超临界二氧化碳中的溶解度, 导致其在 10 MPa、50 °C 条件下的二氧化碳中的溶解度远远低于 10 MPa、45 °C 时的溶解度。因此当温度为 50 °C 时, 实验操作的前 30 min 内, 只有少量的 α -亚麻酸乙酯进入分离器, 大部分仍滞留在样品池中而与其他脂肪酸乙酯分离, 为进一步分离得到高纯度 α -亚麻酸乙酯提供了可能。

为验证上述结论, 实验过程中还在压力为 12 MPa 下考察了温度对分离效果的影响。表 5.7 中 F1~F5 系列是样品池和银离子络合吸附柱的压力为 12 MPa, 温度为 45 °C 时得到的结果; 表 5.9 为样品池和银离子络合吸附柱的压力为 12 MPa, 温度为 50 °C 时得到的结果。可以看出, 表 5.7 的 F1 系列中 α -亚麻酸乙酯含量为 32.04%, 当温度升高为 50 °C 后, G1 系列中 α -亚麻酸乙酯含量降低为 27.88%。所得到的实验规律与压力为 10 MPa 时完全一致, 即升高温度后, 分离效率明显提高。但压力为 12 MPa 时, 相同的温度变化幅度 (5 °C) 下, α -亚麻酸乙酯在样品中的含量变化远低于 10 MPa 时的变化量。可能的原因是压力为 10 MPa 时, 超临界二氧化碳的“温度负效应”现象较压力为 12 MPa 更为显著。

综上所述: 在压力确定的条件下, 一定的范围内, 升高温度后超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法对 α -亚麻酸乙酯的分离效果提高。但是, 实验中观察到, 升高温度后, 所得的样品色泽加深, 可能是多价不饱和脂肪酸乙酯发生了分解或聚合等副反应所致。因此具体操作中应综合考虑多方面因素。

表 5.9 超临界二氧化碳萃取结合银离子络合吸附法分离脂肪酸乙酯实验中, 温度对分离效果的影响结果**Table 5.9** Results of integrated supercritical carbon dioxide extraction and silver nitrate supported Al_2O_3 column experiments^a

	Amount of sample (g)	Concentration of EE (wt.%) ^d	C16:0 wt.% ^e	C18:0 wt.%	C18:1 wt.%	C18:2 wt.%	C18:3 wt.%
FT ^b		76	5.42	4.04	25.14	16.44	48.96
G1 ^c	6.5	77.58	18.96	5.90	36.11	11.14	27.88
G2	7.5	82.23	5.77	4.72	32.56	16.11	40.84
G3	3	77.12	4.97	3.74	26.53	15.63	49.13
G4	4	77.14	4.61	2.27	19.24	13.21	60.66

a: The amount of Feedstock was 50 g, and the samples collected in the G1~G4 was 21 g, as a result the ratio of collection was 42%. And 10g were remained in the sample container; b: Feedstock, fatty acid ester obtained from alcoholysis between linseed oil and ethanol; c: The condition of G1~G4 were, sample container, 12 MPa, 50 °C; Silver nitrate supported Al_2O_3 column, 12 MPa, 50 °C; Separate column, 7.5 MPa, 60 °C; d: The concentration of fatty acid ethyl ester in the feedstock or sample; e: The concentration of C16:0 in the fatty acid ethyl ester.

5.6 小结

脂肪酸及其衍生物混合物的纯化分离是 α -亚麻酸产品开发中关键步骤之一, 研究人员做了大量的基础理论工作, 开发出了许多工艺路线。本章考察了尿素包合法、超临界萃取结合精馏柱精馏法和超临界萃取结合银离子络合吸附法等三种方法分离提纯 α -亚麻酸乙酯的影响因素。得到了一套较好的分离提纯 α -亚麻酸乙酯工艺条件, 并对各种方法分离提纯的效果进行了评价。实验结果表明:

- (1) 尿素包合法可有效分离醇解反应产物中所含的饱和脂肪酸乙酯和不饱和脂肪酸乙酯。经尿素包合后, 紫苏油醇解产物中饱和脂肪酸含量降为 0, 亚麻油醇解产物中饱和脂肪酸也几乎为零。此外, 尿素包合对 α -亚麻酸乙酯也有一定的富集作用, 但效果不明显;

- (2) 超临界萃取结合精馏柱精馏法结果表明:该方法可较好的将各种脂肪酸乙酯从醇解反应所得的混合物中分离,但是在分离结构相近的各种脂肪酸乙酯方面效果较差;
- (3) 超临界萃取结合银离子络合吸附法所得结果表明:该方法是所考察的三种方法中分离效果最好的一种,可将醇解反应产物按碳链长度及不饱和度分离,其中收集得到的以 α -亚麻酸乙酯为主要成分的样品中亚麻酸乙酯含量均在93%以上。

参考文献:

- [1] Helga G., Björn S., Lipased-catalyzed Alcoholysis of God Liver Oil in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1995, 72 (1): 399~405.
- [2] Canas B., Yurawecz M. Ethyl Carbamate Formation During Urea Complexation for Fractionation of Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, 76: 537.
- [3] 张其德, 张鸣. 二十二碳六烯酸乙酯和二十碳五烯酸乙酯的制备和分离工艺. 专利申请号: 99115429.0.
- [4] Arai K., Saito S. Fractionation of Fatty Acids and their Derivatives by Extractive Crystallization using Gas as a Solvent. *World Congress III of Chemical Engineering*, Tokyo, 1986.
- [5] Eisenbach W. Supercritical Fluid Extraction: A Film Demonstration. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 1984, 88: 882~885.
- [6] Nilsson W. B., Gauglitz E., Hudson J. Fractionation of Menhaden Oil Ethyl Esters using Supercritical Fluid CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1988, 65 (1): 109~117.
- [7] Rihaa V., Brunnerb G., Separation of fish oil ethyl esters with supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2000, 17(1): 55~64.
- [8] Yutaka I, Hiyataka H., shota ito. A supercritical carbon dioxide extraction from mixture of triglycerides and higher fatty acid methyl esters using a gas-effusion-type system. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1988, 27: 818~823.
- [9] Sakae H., Yoshio Y., Muneo S. Enrichment of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid ester from esterified fish oil by programmed extraction-elution with supercritical carbon dioxide. *Journal of chromatography*, 1990, 515: 295~303.
- [10] [美]费塞尔 L F, 威廉森 K L. 有机实验. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [11] 顾良英, 合成脂肪酸化学及工艺学 (上册). 北京: 轻工业出版社, 1984.

- [12] 雷启俊, 尿素包合法提取 EPA、DHA 的初步研究. 中国海洋药物, 1989, 3: 30~35.
- [13] 张海满, 刘福祯, 戴玲妹, 尿素包合法纯化 α -亚麻酸工艺研究 (I). 中国油脂, 2000, 26 (2): 41~44.
- [14] 黄惠琴, 鲍时翔, 多价不饱和脂肪酸分离与纯化技术发展. 中国油脂, 1999, 24(2): 32~36.
- [15] 邱榕, 范维澄, 陈钧, 超临界 CO_2 萃取精馏制取高纯度 EPA 乙酯和 DHA 乙酯. 化工学报, 2001, 52 (5): 456~459.
- [16] McHugh M. A., Krukonis V. J. Supercritical Fluid Extraction: Principles & Practice. Butterworth-Heinemann, Boston, 1994, chapter 6.
- [17] Hassan S. G., Habibollah E, Daneshfar A., Solubility of 2-Ethyl-1-hexanol, 2-Ethylhexanoic Acid, and Their Mixtures in Supercritical Carbon Dioxide, J. Chem. Eng. Data, 2003, 48: 236~240.
- [18] Momtchilovaa, Snezhana B., Han Z. Computational probes into the conceptual basis of silver ion chromatography: I. Silver (I) ion complexes of unsaturated fatty acids and esters. Journal of Molecular Structure (Theochem), 2002, 589-590: 239~249.
- [19] Tatsuru S. Supercritical Fluid Extraction of Polyunsaturated Fatty Acid Ethyl Esters from Aqueous Silver Nitrate Solution. Bioseparation, 1993(3): 197~204.
- [20] Morita M., Mihashi S., Itokawa H. Silver Nitrate Impregnation of Preparative Silica Gel Columns for Liquid Chromatography, Anal. Chem., 1983, 55(2): 412~414.
- [21] Frank P. Lucien, Neil R. Foster. Solubilities of solid mixtures in supercritical carbon dioxide: a review. Journal of Supercritical Fluids, 2000, 17: 111~134.
- [22] Liang J. H., An-Yeh. Process conditions for separating fatty acid ester by supercritical CO_2 , J. Am. Oil Chem. Soc., 1991, 68 (9): 687~692.
- [23] RÓnyai E., Simándi B., Tömösközi, S., Deák A., Supercritical fluid extraction of corn germ with carbon dioxide-ethyl alcohol mixture. Journal of Supercritical Fluids, 1998, 14: 75~81.

第六章 总结和展望

6.1 引言

生物酶催化和超临界二氧化碳流体技术分别以其不同于常规酸碱催化剂和常规有机溶剂的特性而日益受到研究人员重视,成为近年来蓬勃发展的“绿色化学”新技术。 α -亚麻酸及其衍生物在人体内具有多种重要生理作用,但人体自身不能合生,必须从外界食物中摄取,属人体必需脂肪酸(Essential Fatty Acids,缩写为EFA)。本文将生物酶催化和超临界二氧化碳流体技术联合应用于 α -亚麻酸类产品的开发研究,为该工艺路线的工业化提供了基础数据和必要的技术准备。

6.2 总结

本文从常压无溶剂体系中酶催化亚麻油水解反应,高压二氧化碳介质中酶催化亚麻油水解反应,常压无溶剂体系中酶催化亚麻油醇解反应,以及脂肪酸乙酯分离等几个方面探讨了 α -亚麻酸产品开发中的工艺条件。所得主要结果如下:

6.2.1 常压无溶剂体系中酶催化亚麻油水解反应

考察了常压无溶剂体系中酶催化亚麻油水解反应,比较了两种脂肪酶的催化活性及高温处理对酶催化活性的影响,结果如下:

(1) L-lipase 为催化剂的亚麻油水解反应,酶的最佳催化活性温度、适宜酶用量、水/亚麻油摩尔比分别为 35 °C、5 wt%和 30:1;

(2) 以 N-lipase 催化的亚麻油水解反应,酶的最佳催化活性温度、适宜酶用量、水/亚麻油摩尔比分别为 67.5 °C、3 wt%和 30:1;

(3) 在相应的最佳实验条件下,无溶剂体系中 L-lipase 和 N-lipase 在催化亚麻油水解反应时具有相近的催化活性,但 L-lipase 催化亚麻油水解反应时的反应温度明显低于 N-lipase 为催化剂的温度;

(4) 常压无水条件下,对于 L-lipase,恒温 45 °C (反应体系中完全失活温度)处理 24 h 后,其催化活性完全丧失;而对于 N-lipase,恒温 80 °C (反应体系中完全失

活温度) 处理 24 h 后, 其催化活性无明显改大。

6.2.2 高压二氧化碳介质中酶催化亚麻油水解反应

考察了高压二氧化碳介质中酶催化亚麻油水解反应的各种影响因素, 并比较了不同条件下得到的结果进行, 发现如下规律:

(1) 超临界二氧化碳介质中, L-lipase 催化亚麻油水解反应的适宜温度、压力、酶用量、水/亚麻油摩尔比分别为 37 °C、7.5 MPa、5 wt% 和 30:1, 添加剂或共溶剂可改变反应速率及转化率;

(2) 超临界二氧化碳介质中, N-lipase 催化亚麻油水解反应的适宜温度、压力、水/亚麻油摩尔比分别为 50 °C、7.5 MPa、30:1;

(3) 高压下两种脂肪酶催化亚麻油水解反应比较表明: 在相应的最佳实验条件下, N-lipase 具有更高的催化活性和更宽的催化活性温度范围;

(4) 两种脂肪酶常压、高压下催化亚麻油水解最佳结果比较表明: 与无溶剂体系中的最大催化活性温度 (35 °C) 相比, 超临界二氧化碳中 L-lipase 的最大催化活性温度升高 2 °C, 为 37 °C, 而 N-lipase 的最大催化活性温度降低 17.5 °C, 为 50 °C;

(5) 经高温、高压处理的 N-lipase 催化活性研究表明: 相对较低二氧化碳压力 (7.5 MPa) 不足以导致 N-lipase 完全失活; N-lipase 失活机理可能与水热条件下的酶分子分解有关。

6.2.3 酶催化醇解反应制备脂肪酸乙酯工艺研究

从反应物摩尔比、反应温度、脂肪酶用量等几个方面考察了常压无溶剂体系中酶催化亚麻油醇解反应, 并初步探讨了脂肪酶的催化选择性, 所得结果如下:

(1) 反应物摩尔比 (乙醇: 亚麻油) 为 3:1 时反应转化率最高。比例低于此值, 甘油三酯转化不完全; 比例过高, 乙醇可能与脂肪酶的催化活性位发生络合而抑止酶的催化活性;

(2) 反应温度为 50 °C 时, N-lipase 活性最大, 亚麻油醇解反应转化率最高;

(3) 为避免催化剂团聚, 脂肪酶用量不宜超过 5 wt%;

(4) 所用脂肪酶催化亚麻油醇解反应时,优先生成碳链较短的饱和脂肪酸乙酯。

6.2.4 脂肪酸乙酯分离

考察了尿素包合法、超临界萃取结合精馏柱精馏法、超临界萃取结合银离子络合吸附法等三种方法分离提纯 α -亚麻酸乙酯过程中的影响因素,实验结果表明:

(1) 尿素包合法对 α -亚麻酸乙酯有一定的富集作用,但其主要优势在于可将醇解反应产物分为饱和脂肪酸乙酯和不饱和脂肪酸乙酯两大类;

(2) 超临界二氧化碳萃取与精馏柱精馏法相结合可较好的将产物从醇解反应所得的混合物体系中分离,但很难分离碳链长度相等双键数目不同的脂肪酸类化合物;

(3) 超临界萃取结合银离子络合吸附法所得结果表明:该法可将醇解反应产物按碳链长度及不饱和度分离,实验中收集得到的以 α -亚麻酸乙酯为主要成分的样品中, α -亚麻酸乙酯含量均在93%以上。

6.3 本论文的主要创新点

本文以生物酶代替常规酸碱催化剂、以超临界二氧化碳代替常用的有机溶剂,研究了亚麻油水解反应、醇解反应及混和脂肪酸乙酯产品分离等 α -亚麻酸产品制备提纯工艺,为工业化开发高附加值 α -亚麻酸产品生产工艺提供了操作参数和技术准备。

6.4 后续工作设想

在本文实验的基础上,为进一步优化 α -亚麻酸类产品的制备提纯工艺,使其尽可能地转化为生产力,作者认为还应在以下几个方面深入研究。

6.4.1 酶催化

与常规酸碱催化剂相比较,生物酶催化剂以其无毒、无污染等优点而广泛应用于食品、保健品及制药等工业。但本文所用的脂肪酶价格过高,增加了工业生产 α -亚麻酸产品的成本。因此后续工作中应考虑脂肪酶的循环使用和寻找更适合实际应用的生物酶。

6.4.2 超临界二氧化碳介质中脂肪酸乙酯溶解度测定

目前,有关脂肪酸类化合物的热力学基本数据,尤其是其在超临界二氧化碳中溶解度数据文献报导较少。因此,后续工作中应考虑测定 α -亚麻酸类产品开发中相关脂肪酸及其衍生物在超临界二氧化碳中的溶解度,为进一步优化 α -亚麻酸乙酯分离提纯工艺提供理论指导。

6.4.3 反应分离一体化

亚麻油水解、醇解反应中所涉及的产物和反应物在超临界二氧化碳的溶解度差别较大。因此可以通过改变二氧化碳的温度和压力,在反应过程中直接将产物分离,实现反应分离一体化,从而打破化学平衡限制、提高产物收率。后继工作中应在完成高压二氧化碳介质中的酶催化亚麻油醇解反应的基础上,考虑反应分离一体化研究工作。

6.4.4 副产物开发利用

亚麻油水解、醇解反应中生成的副产物有甘油、甘油单酯和甘油二酯等。其中甘油广泛应用与化妆品、食品工业等领域,而甘油单酯和甘油二酯则是性能良好的表面活性剂和乳化剂,因此后续工作中应考虑开展综合利用上述副产物的研究。

作者简历

王英雄，男，1976 年生于内蒙古呼和浩特市。1996 年考入内蒙古民族大学化学系，2000 年获理学学士学位；同年 9 月考取中科院山西煤炭化学研究所攻读硕士学位，师从王建国研究员、侯相林研究员，从事酶催化亚麻油水解、醇解反应及产物分离研究工作。

硕士期间论文和专利情况

1. 王英雄, 侯相林, 王国富, 杜俊民, 乔欣刚, 秦张峰, 王建国. 不同脂肪酶催化亚麻油水解反应性能的比较. 中国油脂, 已接收
2. 王英雄, 王国富, 侯相林, 杜俊民, 乔欣刚, 秦张峰, 王建国. 无溶剂体系中脂肪酶催化亚麻油水解反应研究. 日用化学工业, 已接收
3. 王英雄, 侯相林, 王国富, 杜俊民, 乔欣刚, 王建国. 超临界 CO₂ 中脂肪酶催化亚麻油水解反应研究. 第四届全国超临界流体技术学术及应用研讨会论文集, 2002 年 8 月 贵阳
4. 侯相林 王英雄 王国富等 超临界相中反应分离一体化生产 α -亚麻酸乙酯的方法 国家发明专利申请号: 02103040.5
5. 侯相林 王英雄 杜俊民等 一种生产高纯度亚麻酸乙酯的方法 国家发明专利申请号: 03100892.5
6. 侯相林 王国富 王英雄等 超临界反应分离一体化生产 α -亚麻酸的方法 国家发明专利申请号: 02103041.3
7. 侯相林, 杜俊民, 王英雄. 硝酸银吸附柱分离亚麻酸乙酯过程中影响因素的研究. 中国油脂, 已投稿
8. Y.X. Wang, X.L. Hou, J.G. Wang. Integrated of supercritical carbon dioxide extraction with chemical adsorption by silver nitrate supported Al₂O₃ column for the separation of ethyl alpha-linolenate. In preparation

致 谢

在硕士论文工作即将结束之际,作者谨在此表达对所有曾予本文以指导、关心、支持和帮助的老师 and 同学们的诚挚谢意。

本论文是在导师王建国研究员和侯相林研究员的精心指导下完成的。两位老师严谨的治学态度,敏锐的科研思维,独创新颖的研究思路、宽厚豁达的为人品质和乐观向上的人生态度使作者受益匪浅,并将铭记此生。在此作者对两位导师在工作和生活中所给予的指导、鼓励和帮助表示深深的谢意!

感谢 311 组乔欣刚、王国富、杜俊民和刘乃叶老师;603 组朱华青、关春梅、刘雅峰和董梅老师的热情、无私的帮助与支持,他们为工作的顺利开展创造了便利条件并给与了许多具体的指导。

与袁淑萍、孙爱玲、刘建国、胡拖平、刘洁翔、田震、陈树伟、张瑞珍、申文忠、孟祥燕、蒋南、张智志、时炜和乔东升等同门学子的团结合作、愉快相处为作者的工作和生活营造了和谐、融洽的气氛,使作者深受帮助和鼓舞,在此深表感谢!

与马中义、张奉民、王锋、王谋华、李庆丰、龚树文、齐会杰、刘颖、齐永琴、常慧等同学和朋友们的真诚相处令作者感到友情可贵。

感谢研究生部尹钢老师和王娜老师对本人学业的关心和鼓励,他们的育人精神和师者风范令人难忘。感谢 905 组杨继礼老师在气相色谱分析方面给予的指导和帮助。还要感谢科仪厂各位老师及师傅们给予的热情帮助;感谢图书馆、档案室、物资处等部门对本论文的支持。

本论文的成稿离不开作者父母家人和女友乔岩的支持与鼓励,他们的无私奉献是作者得以完成此文的精神支柱。

作者: 王英雄

2003 年 6 月