



(21) 申请号 202311391547.4

(22) 申请日 2023.10.24

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所

地址 550000 贵州省贵阳市观山湖区林城
西路99号

(72) 发明人 余德顺 滕桂平 唐泽群

(74) 专利代理机构 上海微策知识产权代理事务
所(普通合伙) 31333

专利代理师 吕姿颖

(51) Int. Cl.

C12P 7/6445 (2022.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法及其应用,以超临界CO₂作为溶剂,采用酶解法合成结构脂质,采用35-60℃的反应温度,15-45MPa的反应压力,合成的结构脂质中插入的辛酸、癸酸的脂肪酸(MCFA)插入率高,并且以生物酶为催化剂,合成结构脂质反应效率高,条件温和,专一性强。整体反应条件温和,反应压力和温度控制容易且精度高,无毒无害以及所得产品无任何有机溶剂残留。

1. 一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,其特征在于,包括以下步骤:
S1将油脂,脂肪酸,催化剂加入到超临界CO₂反应装置中;
S2充入CO₂,再排出,重复2-3次,排出空气;
S3设定温度,打开磁力搅拌装置和进气阀,通过CO₂高压泵打入CO₂至实验设定压力,保持设定压力和温度反应一段时间后关闭装置;
S4缓慢排出气体,恢复常压后冷却,进行后处理。
2. 根据权利要求1所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,其特征在于,所述后处理为对产物进行纯化,所述纯化包括以下步骤:
M1对产物进行过滤;
M2滤下物以酚酞为指示剂,滴加碱性溶液,溶液变微红,且不褪色,溶液呈弱碱性;
M3快速水洗至无色中性,pH试纸测试为中性,采用萃取剂萃取;
M4取上层液,蒸发去除萃取剂,即得。
3. 根据权利要求1所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,其特征在于,所述油脂与脂肪酸的摩尔比为1:(2-4)。
4. 根据权利要求1所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,其特征在于,所述脂肪酸选自C₈₋₁₀中碳链脂肪酸、C₆₋₂₄中长链脂肪酸、C₁₄₋₂₄长链脂肪酸中的一种或几种的组合。
5. 根据权利要求4所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,其特征在于,所述C₈₋₁₀中碳链脂肪酸选自辛酸、癸酸、壬酸中的一种或几种的组合。
6. 根据权利要求1所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,其特征在于,所述S3的反应温度为35-60℃,反应压力为15-45MPa。
7. 根据权利要求1所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,其特征在于,所述催化剂为脂肪酶类催化剂,所述催化剂的加入质量为整体体系的5-15%。
8. 根据权利要求1所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,其特征在于,所述S3的反应时间为3-8h。
9. 根据权利要求5所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,其特征在于,所述辛酸在结构脂质中的插入率为30-40%,所述癸酸在结构脂质中的插入率为70-80%。
10. 一种根据权利要求1-9任一项所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法的应用,其特征在于,应用于结构脂质的合成中。

一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法及其应用,涉及A61K,具体涉及医用的配置品领域。

背景技术

[0002] 不同油脂中的甘油三酯和脂肪酸的组成是有差异的,长期食用单一油脂不能满足人体对于脂肪酸的平衡需求,为了研发一种具有天然油脂理化性能,同时热量又低的结构脂质,开发了本申请的技术方案。结构脂质不是各种甘油三酯的简单物理混合,而是经过改性的油脂,如在甘油三酯原骨架上插入脂肪酸,形成新型的油脂。现有的合成结构脂质的方法有化学法和生物酶法,化学法包括酸催化酯化法,碱催化酯化法和酰氯醇解法,需要强酸强碱的反应环境,反应条件不温和,并且转化效率低,副产物多。生物酶法中受到体系介质的影响,有机溶剂容易带来环境污染,微乳和反胶束体系组成较复杂不易控制,离子液体反应条件要求高,因此需要开发一种绿色环保,简单易控的合成方案,促进结构脂质的合成效率。

[0003] 中国发明专利CN202211535954.3公开了一种结构脂质及其制备方法、结构脂肪乳以及结构脂肪乳制剂,将6碳~24碳中长链脂肪酸结构脂质和18碳~22碳多不饱和脂肪酸结构脂质混合,加入脂肪酶,进行酯交换反应,消除了结构脂质中隐形安全指标聚酯。但是反应组成复杂不易控制。中国发明专利CN201510236152.6公开了一种超临界CO₂状态下酯交换法制备低能SLS型结构脂质的方法,采用脂肪酶RMIM催化乙酸乙酯与一级大豆油进行酯交换反应制备低能SLS型结构脂质,实现乙酸乙酯转化率的提高。但是乙酸乙酯的转化率仍然不高仅36.1%,生产效率低。

发明内容

[0004] 为了提高脂肪酸在甘油三酯中的插入率,促进油脂高效率合成,本发明的第一个方面提供了一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,包括以下步骤:

[0005] S1将油脂,脂肪酸,催化剂加入到超临界CO₂反应装置中;

[0006] S2充入CO₂,再排出,重复2-3次,排出空气;

[0007] S3设定温度,打开磁力搅拌装置和进气阀,通过CO₂高压泵打入CO₂至实验设定压力,保持设定压力和温度反应一段时间后关闭装置;

[0008] S4缓慢排出气体,恢复常压后冷却,进行后处理。

[0009] 作为一种优选的实施方式,所述后处理为对产物进行纯化,所述纯化包括以下步骤:

[0010] M1对产物进行过滤;

[0011] M2滤下物以酚酞为指示剂,滴加碱性溶液,溶液变微红,且不褪色,溶液呈弱碱性;

[0012] M3快速水洗至无色中性,pH试纸测试为中性,采用萃取剂萃取;

[0013] M4取上层液,蒸发去除萃取剂,即得。

[0014] 作为一种优选的实施方式,所述碱性溶液为氢氧化钠溶液,溶剂为乙醇水溶液。所述氢氧化钠溶液的浓度为0.3-0.8mol/L。进一步优选,所述氢氧化钠溶液的浓度为0.5mol/L。

[0015] 作为一种优选的实施方式,所述乙醇水溶液中乙醇与水的体积比为(5-10):(1-5)。

[0016] 作为一种优选的实施方式,所述乙醇水溶液中乙醇与水的体积比为(6-8):(2-4)。优选的,所述乙醇水溶液中乙醇与水的体积比为7:3。

[0017] 作为一种优选的实施方式,所述萃取采取的萃取剂为正己烷。

[0018] 作为一种优选的实施方式,所述油脂与脂肪酸的摩尔比为1:(2-4)。

[0019] 作为一种优选的实施方式,所述油脂与脂肪酸的摩尔比为1:(2.5-3.5)。优选的,所述油脂与脂肪酸的摩尔比为1:3。

[0020] 作为一种优选的实施方式,所述油脂为山茶籽油。

[0021] 申请人在实验过程中发现,反应过程为油脂酸解首先生成甘二酯,少量的甘二酯进一步反应生成甘一酯,甘二酯和甘一酯再与脂肪酸反应形成甘三酯,油脂与脂肪酸的摩尔比为1:3时,癸酸,辛酸的插入率最高,超出优选的摩尔比,对癸酸,辛酸的插入率影响不大,但是会增加后处理的成本。

[0022] 作为一种优选的实施方式,所述脂肪酸选自 C_{8-10} 中碳链脂肪酸、 C_{6-24} 中长链脂肪酸、 C_{14-24} 长链脂肪酸中的一种或几种的组合。

[0023] 作为一种优选的实施方式,所述 C_{8-10} 中碳链脂肪酸选自辛酸、癸酸、壬酸中的一种或几种的组合。

[0024] 作为一种优选的实施方式,所述 C_{8-10} 中碳链脂肪酸为辛酸和癸酸的组合。

[0025] 作为一种优选的实施方式,所述S3的反应温度为35-60℃,反应压力为15-45MPa。

[0026] 作为一种优选的实施方式,所述S3的反应温度为40-50℃,反应压力为20-40MPa。

[0027] 作为一种优选的实施方式,所述S3的反应温度为40℃,反应压力为30MPa。

[0028] 申请人在实验过程中发现采用35-60℃的反应时间,体系压力为15-45MPa时以超临界二氧化碳为溶剂合成结构脂质,合成的结构脂质中插入的辛酸、癸酸的脂肪酸(MCFA)插入率高,并且以生物酶为催化剂,合成结构脂质反应效率高,条件温和,专一性强。猜测可能的原因是,甘油三脂的空间位阻较大,采用超临界二氧化碳作为溶剂,密度与植物油脂,癸酸,辛酸接近,辛酸与癸酸在超临界二氧化碳中扩散速度快,因此辛酸和癸酸在超临界二氧化碳中插入的难度下降,降低了在甘油三脂分子链中的插入空间位阻,更容易发生反应,反应速率提升,插入率提高。申请人进一步发现,采用35-60℃的反应时间和15-45MPa的体系压力时,采用的生物酶催化剂催化活力最高,超出优选的条件范围,生物酶的蛋白结构发生变性,反应活性下降。

[0029] 作为一种优选的实施方式,所述催化剂为脂肪酶类催化剂,所述催化剂的加入质量为整体体系的5-15%。

[0030] 作为一种优选的实施方式,所述催化剂为Sn-1,3位置特异性脂肪酶。优选的,所述催化剂为lipozyme TL IM。

[0031] 作为一种优选的实施方式,所述催化剂的加入质量为整体体系的8-13%。优选的,所述催化剂的加入质量为整体体系的11%。

- [0032] 作为一种优选的实施方式,所述S3的反应时间为3-8h。
- [0033] 作为一种优选的实施方式,所述S3的反应时间为4-7h。
- [0034] 作为一种优选的实施方式,所述S3的反应时间为6h。
- [0035] 作为一种优选的实施方式,所述辛酸在结构脂质中的插入率为30-40%,所述癸酸在结构脂质中的插入率为70-80%。
- [0036] 本发明的第二个方面提供了一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法的应用,应用于结构脂质的合成中。
- [0037] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:
- [0038] (1) 本发明所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,采用35-60℃的反应温度,15-45MPa的反应压力,合成的结构脂质中插入的辛酸、癸酸的脂肪酸(MCFA)插入率高,并且以生物酶为催化剂,合成结构脂质反应效率高,条件温和,专一性强。
- [0039] (2) 本发明所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,油脂与脂肪酸采用1:(2-4)的摩尔比,癸酸,辛酸的插入率最高,并且后处理成本相对较低。
- [0040] (3) 本发明所述超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,以超临界CO₂作溶剂,以生物酶做催化剂,反应条件温和,反应压力和温度控制容易且精度高,无毒无害以及所得产品无任何溶剂残留。

附图说明

- [0041] 图1为实施例1制备的结构脂质的产品图;
- [0042] 图2为实施例7制备的结构脂质的产品图。

具体实施方式

- [0043] 实施例1
- [0044] 一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,包括以下步骤:
- [0045] S1将油脂,脂肪酸,催化剂加入到超临界CO₂反应装置中;
- [0046] S2充入CO₂,再排出,重复2-3次,排出空气;
- [0047] S3设定温度,打开磁力搅拌装置和进气阀,通过CO₂高压泵打入CO₂至实验设定压力,保持设定压力和温度反应一段时间后关闭装置;
- [0048] S4缓慢排出气体,恢复常压后冷却,进行后处理。
- [0049] 所述后处理为对产物进行纯化,所述纯化包括以下步骤:
- [0050] M1对产物进行过滤;
- [0051] M2滤下物以酚酞为指示剂,滴加碱性溶液,溶液变微红,且不褪色,溶液呈弱碱性;
- [0052] M3快速水洗至无色中性,pH试纸测试为中性,采用萃取剂萃取;
- [0053] M4取上层液,蒸发去除萃取剂,即得。
- [0054] 所述碱性溶液为氢氧化钠溶液,溶剂为乙醇水溶液。所述氢氧化钠溶液的浓度为0.5mol/L。所述乙醇水溶液中乙醇与水的体积比为7:3。
- [0055] 所述萃取采取的萃取剂为正己烷。
- [0056] 所述油脂与脂肪酸的摩尔比为1:3。
- [0057] 所述油脂为山茶籽油,加入量为10g,所述脂肪酸为辛酸和癸酸的组合。所述辛酸

和癸酸的重量比为1:1。

[0058] 所述S3的反应温度为40℃,反应压力为30MPa。

[0059] 所述催化剂为Sn-1,3位置特异性脂肪酶lipozyme TL IM,催化剂的加入质量为整体体系的11%。

[0060] 所述S3的反应时间为6h。

[0061] 实施例2

[0062] 一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,具体步骤同实施例1,不同点在于所述S3的反应温度为45℃,反应压力为20MPa。催化剂的加入质量为整体体系的8%。反应时间为8h。

[0063] 实施例3

[0064] 一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,具体步骤同实施例1,不同点在于所述S3的反应温度为35℃,反应压力为20MPa。催化剂的加入质量为整体体系的8%。反应时间为4h。

[0065] 实施例4

[0066] 一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,具体步骤同实施例1,不同点在于所述S3的反应温度为45℃,反应压力为20MPa。催化剂的加入质量为整体体系的8%。反应时间为4h。所述油脂与脂肪酸的摩尔比为1:4。

[0067] 实施例5

[0068] 一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,具体步骤同实施例1,不同点在于所述S3的反应温度为45℃,反应压力为20MPa。催化剂的加入质量为整体体系的14%。反应时间为4h。

[0069] 实施例6

[0070] 一种超临界CO₂条件下结构脂质的酶合成方法,具体步骤同实施例1,不同点在于所述S3的反应温度为45℃,反应压力为15MPa。催化剂的加入质量为整体体系的10%。反应时间为4h。

[0071] 实施例7

[0072] 一种结构脂质的合成方法,具体步骤同实施例1,不同点在于所述催化剂为固体超强酸(SO₄²⁻/ZrO₂)催化剂,所述S3的反应温度为140℃,催化剂的加入质量为整体体系的3%。反应时间为4h。

[0073] 性能测试

[0074] 将实施例1-7制备得到的产品参照GB 5009.168-2016标准进行样品甲酯化前处理,采用气相色谱条件进行检测,得到辛酸甲酯和癸酸甲酯的色谱峰面积,然后根据相关得到的标准曲线的回归方程进行计算,回归方程见表1。

[0075] 表1

成分	回归方程	r	线性范围 (mg/mL)
[0076] 辛酸甲酯	$y=7956.30592x-376.09204$	0.9996	0.00724~4.04
癸酸甲酯	$y=5967.0149x+69.99321$	0.99971	0.01703~5.42

[0077] 计算公式如下:

[0078] $W_{\text{辛酸}} = (A+376.09204) / 7956.30592 \times V \times f_1 / m$ $W_{\text{癸酸}} = (A-69.99321) / 5967.0149 \times V \times f_2 / m$ A为辛酸甲酯,癸酸甲酯对应的色谱峰面积,V为溶液总体积mL, f_1 、 f_2 为相应脂肪酸甲酯与对应脂肪酸的摩尔质量比,m为甲酯化样品质量mg。

[0079] 辛酸与癸酸的插入率见表2。

[0080] 表2

[0081]	辛酸插入率/%	癸酸插入率/%
实施例1	33.16	75.3
实施例2	15	32.5
实施例3	10	25
实施例4	15	25
实施例5	15	30
实施例6	12.5	20
实施例7	3.54	7.51

[0082] 实施例1制备得到的结构脂质油体清亮,产品图见图1;实施例7制备的结构脂质油体浑浊。产品图见图2。

[0083] 本申请在温度,压力不合适的条件下,会导致物料的溶解性降低,接触不充分,导致辛酸和癸酸的插入率下降。



图1



图2