(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101490254 B
(45)授权公告日 2011.10.05

(21)申请号 200780026024.2
(22)申请日 2007.05.11
(30)优先权数据
132639/2006 2006.05.11 JP
(85)PCT申请进入国家阶段日
2009.01.09
(86)PCT申请的申请数据
PCT/JP2007/059751 2007.05.11
(87)PCT申请的公布数据
WO2007/132775 JA 2007.11.22
(73)专利权人 日清奥利友集团株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 根岸聪 铃木顺子 山内良枝
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
代理人 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
C12N 9/20(2006.01)
C11C 3/02(2006.01)
C11C 3/10(2006.01)
C12P 7/64(2006.01)
C12R 1/01(2006.01)

(56)对比文件
CN 1441848 A,2003.09.10, 全文.
US 5480787 A,1996.01.02, 全文.
WO 0056869 A2,2000.09.28, 全文.

审查员 刘玉玲

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54)发明名称

脂肪酶活性的恢复方法

(57)摘要

一种脂肪酶活性的恢复方法,其包括:在酯化反应或酯交换反应中使用固定于载体上的嗜热真菌属(Thermomyces)来源的脂肪酶、或含有固定于载体上的嗜热真菌属来源的脂肪酶的平均粒径为1μm以上、不到300μm的粉碎品和助滤剂的脂肪酶粉末组合物后,用三酰甘油清洗。通过该方法,能够有效地使已经降低的脂肪酶活性恢复。

CN 101490254 B

1. 一种脂肪酶活性的恢复方法，其特征在于，在酯化反应或酯交换反应中使用固定于载体上的嗜热真菌属来源的脂肪酶、或含有固定于载体上的嗜热真菌属来源的脂肪酶的平均粒径为 1 μm 以上、不到 300 μm 的粉碎品和助滤剂的脂肪酶粉末组合物后，用三酰甘油清洗。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，三酰甘油在室温下为液态。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，三酰甘油含有中链脂肪酸甘油三酯。

4. 根据权利要求 1 ～ 3 中任一项所述的方法，其中，三酰甘油为用于酯交换的原料油。

5. 根据权利要求 1 ～ 3 中任一项所述的方法，其中，在三酰甘油中搅拌用于酯化反应或酯交换反应后的固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物，使之分散，然后从三酰甘油中分离，由此进行清洗。

6. 根据权利要求 1 ～ 3 中任一项所述的方法，其中，载体为二氧化硅。

7. 根据权利要求 1 ～ 3 中任一项所述的方法，其中，粉碎品的平均粒径为 1 ～ 200 μm。

8. 根据权利要求 1 ～ 3 中任一项所述的方法，其中，助滤剂为纤维素。

9. 根据权利要求 1 ～ 3 中任一项所述的方法，其中，助滤剂为平均粒径 10 ～ 90 μm 的粉状。

10. 一种酯化反应或酯交换反应方法，其特征在于，在酯化反应或酯交换反应中使用固定于载体上的嗜热真菌属来源的脂肪酶、或含有固定于载体上的嗜热真菌属来源的脂肪酶的平均粒径为 1 μm 以上、不到 300 μm 的粉碎品和助滤剂的脂肪酶粉末组合物后，将其从反应系中分离，用三酰甘油清洗而使脂肪酶活性恢复后，使用该固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物进行酯化反应或酯交换反应。

脂肪酶活性的恢复方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使特定的固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物的各种酯化能力和酯交换能力等脂肪酶活性恢复的方法和使用恢复的固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物的酯化反应、油脂的酯交换方法等。

背景技术

[0002] 脂肪酶被广泛使用于脂肪酸等各种羧酸与一元醇或多元醇等醇类的酯化反应、多个羧酸酯间的酯交换反应等中。其中，酯交换反应以动植物油脂类的改质为首，作为各种脂肪酸的酯、糖酯或类固醇的制造方法，是十分重要的技术。若使用作为油脂水解酶的脂肪酶作为这些反应的催化剂，则可以在室温至约 70℃左右的温和条件下进行酯交换反应，与以往的化学反应相比，不仅可抑制副反应并减少能量成本，而且由于作为催化剂的脂肪酶是天然物质，因此安全性高。而且，根据其底物特异性和位置特异性，可以有效生产目标产物。然而，一般而言，在酯交换反应中直接使用脂肪酶粉末，不仅无法充分表现活性，而且要使原本水溶性的脂肪酶均匀地分散于油性原料中十分困难，其回收也困难。因此，以往一般是通过将脂肪酶固定在某些载体例如阴离子交换树脂（专利文献 1）、酚醛型吸附树脂（专利文献 2）、疏水性载体（专利文献 3）、阳离子交换树脂（专利文献 4）、螯合树脂（专利文献 5）等上，再用于酯化或酯交换反应等中。

[0003] 但是，由于一旦将脂肪酶固定在载体上，脂肪酶活性就会降低，因此正逐步开发采用脂肪酶粉末的各种技术。

[0004] 具体而言，提出了在惰性有机溶剂的存在下或非存在下，为了使酯交换反应时分散脂肪酶粉末颗粒的 90％以上保持在 1 ～ 100 μｍ的粒径范围，将脂肪酶粉末分散于含有酯的原料中，进行酯交换反应的方法（专利文献 6）。另外，还提出了采用通过干燥含有磷脂和脂溶性维生素的酶溶液而获得的酶粉末（专利文献 7）。

[0005] 另一方面，由于作为酶的脂肪酶价格昂贵，因此在反应结束后进行回收，再重复使用，在脂肪酶活性降至很低后才废弃。但是，如果可以使降低的脂肪酶活性得以恢复，脂肪酶的使用效率显著提高，从工业的观点看来，期待开发出使脂肪酶活性恢复的有效方法。

[0006] 专利文献 1：日本特开昭 60-98984 号公报

[0007] 专利文献 2：日本特开昭 61-202688 号公报

[0008] 专利文献 3：日本特开平 2-138986 号公报

[0009] 专利文献 4：日本特开平 3-61485 号公报

[0010] 专利文献 5：日本特开平 1-262795 号公报

[0011] 专利文献 6：日本特许第 2668187 号公报

[0012] 专利文献 7：日本特开 2000-106873 号公报

发明内容

[0013] 本发明的目的在于提供一种可以使已经降低的脂肪酶活性恢复的方法。

[0014] 本发明的目的还在于提供一种酯化方法和酯交换方法，其采用具有已经恢复的脂肪酶活性的固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物。

[0015] 本发明是基于以下认识而进行的：对于特定的固定化脂肪酶或同时使用该固定化脂肪酶的粉碎物与助滤剂的脂肪酶粉末组合物，将脂肪酶活性已经降低的酶用三酰甘油清洗，则可以恢复初始的脂肪酶活性。

[0016] 也就是说，本发明提供一种脂肪酶活性的恢复方法，其特征在于，在酯化反应或酯交换反应中使用固定于载体上的嗜热真菌属来源的脂肪酶、或含有固定于载体上的嗜热真菌属来源的脂肪酶的平均粒径为 1μm 以上、不到 300μm 的粉碎品和助滤剂的脂肪酶粉末组合物后，用三酰甘油清洗。

[0017] 本发明还提供了一种酯化反应或酯交换反应方法，其特征在于，在酯化反应或酯交换反应中使用固定于载体上的嗜热真菌属来源的脂肪酶、或含有固定于载体上的嗜热真菌属来源的脂肪酶的平均粒径为 1μm 以上、不到 300μm 的粉碎品和助滤剂的脂肪酶粉末组合物后，将其从反应系中分离，用三酰甘油清洗使脂肪酶活性恢复后，使用该固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物进行酯化反应或酯交换反应。

附图说明

[0018] 图 1 表示使用脂肪酶粉末组合物进行酯交换反应时，酯交换活性随着时间的降低（实施例 1(3)）。

[0019] 图 2 表示通过对酯交换活性已经降低的脂肪酶粉末组合物进行本发明的清洗，酯交换活性恢复（实施例 1(4)）。

[0020] 图 3 表示通过对酯交换活性已经降低的固定化脂肪酶进行本发明的清洗，酯交换活性恢复（实施例 3(3-2)）。

具体实施方式

[0021] 本发明中使用的脂肪酶来源于嗜热真菌属 (Thermomycessp.)，是固定在载体、优选固定在二氧化硅载体上的脂肪酶。本发明中可以直接使用这种脂肪酶，或者使用将该脂肪酶粉碎成平均粒径在 1μm 以上、不到 300μm 的粉碎品。这其中，优选固定在二氧化硅载体上的这种脂肪酶的平均粒径在 300 ～ 1000μm 左右。这种固定化脂肪酶可以从例如 Novozymes A/S 公司作为 Lipozyme TL-IM 购买。

[0022] 在将这种固定化脂肪酶制成粉碎品时，可以采用通常的粉碎机，将其粉碎成平均粒径在 1μm 以上、不到 300μm，优选平均粒径为 1 ～ 200μm，更优选平均粒径为 1 ～ 100μm，尤为优选平均粒径为 20 ～ 100μm。这其中，粉碎机可以例举研钵、剪切摩擦式粉碎机、刀式粉碎机、石磨（研磨微粒化机 MYCOLLOIDER、MASCOLLOIDER）、咖啡研磨机 (coffeemill)、动力磨 (power mill)、钢针研磨机、冲击式粉碎机（锤式粉碎机、球磨机）、辊式粉碎机和气流式粉碎机、均化器、超声波破碎机等。

[0023] 本发明中作为对象的脂肪酶为上述粉碎品时，优选与助滤剂组合使用。作为助滤剂，可以例举硅藻土等无机助滤剂和纤维素等纤维和其粉碎物等有机助滤剂。这其中优选有机助滤剂，尤为优选有机高分子助滤剂，尤其优选纤维素等，作为优选例子，可以例举由 Nippon Paper Chemicals Co.，Ltd 以商品名 KCFlock 出售的产品等。助滤剂也优选为粉

状，优选平均粒径在 10 ～ 90 μ m。

[0024] 上述脂肪酶粉碎品和助滤剂的质量比优选为 1/10 ～ 10/1，尤为优选为 1/7 ～ 2/1。

[0025] 本发明中使用的上述固定化脂肪酶、脂肪酶粉末组合物可以直接在油脂的酯交换反应、酯化反应中使用，可以通过使之与长链脂肪酸甘油三酯和中链脂肪酸甘油三酯相接触，然后提取，从而进行纯化，与此同时可以使脂肪酶活性提高。

[0026] 作为这里使用的长链脂肪酸甘油三酯和中链脂肪酸甘油三酯，优选使用后述的固定化脂肪酶和脂肪酶粉末组合物的清洗项目中所记载的物质。

[0027] 长链脂肪酸甘油三酯和中链脂肪酸甘油三酯优选按 95 ： 5 ～ 50 ： 50 的质量比使用，优选相对于脂肪酶的总质量，接触 2 倍～ 100 倍质量的甘油三酯。

[0028] 作为使用上述固定化脂肪酶、脂肪酶粉末组合物的酯化反应，优选在该固定化脂肪酶、脂肪酶粉末组合物的存在下进行油脂的酯化反应，然后回收固定化脂肪酶、脂肪酶粉末组合物，进行再利用。

[0029] 尤其是，上述脂肪酶粉末组合物由于其脂肪酶活性提高，而且在酯化反应和酯交换反应中易用性（操作性）提高，通过再循环可以在这些反应中使用，因此能够适当用于以工业规模通过油脂的酯交换等进行的油脂的改质。

[0030] 但是，将这种脂肪酶粉末组合物、固定化脂肪酶在酯化反应或酯交换反应中再利用若干次的话，随着使用次数，酯化能力和酯交换能力等脂肪酶活性将下降。

[0031] 本发明以特定条件清洗这种脂肪酶活性已经降低的固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物，脂肪酶活性恢复，而且，就上述脂肪酶粉末组合物而言，可以长期连续利用其提高的脂肪酶活性和易用性（操作性）。

[0032] 本发明中作为对象的固定化脂肪酶、脂肪酶活性已经降低的脂肪酶粉末组合物，可以以相对于初始活性稍有降低者为对象，但从工业的观点看来，优选以活性降低为初始活性（100％）的 70 ～ 50％者为对象。

[0033] 其中，作为用于清洗固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物的三酰甘油，优选在室温下为液态。尤其优选使用用于纯化上述脂肪酶粉末组合物的长链脂肪酸甘油三酯和中链脂肪酸甘油三酯的混合物。

[0034] 作为这里使用的长链脂肪酸甘油三酯，优选构成脂肪酸的碳原子数为 14 ～ 24 的甘油三酯，尤为优选选自于菜籽油、大豆油、葵花油、红花油、玉米油所组成的组中的植物油。

[0035] 作为中链脂肪酸甘油三酯，优选构成脂肪酸的碳原子数为 6 ～ 12 的甘油三酯。这种脂肪酸甘油三酯可以用公知的制法制造，也可以使用市售品。作为市售品，例如由日清奥利友集团株式会社以商品名 ODO 出售。

[0036] 长链脂肪酸甘油三酯和中链脂肪酸甘油三酯优选按 95 ： 5 ～ 50 ： 50 的质量比使用，优选相对于脂肪酶的总质量，接触 2 倍～ 100 倍、更优选 5 ～ 50 倍的质量的甘油三酯。

[0037] 尤其是，作为清洗时使用的三酰甘油，优选为用于进行酯交换的原料油。

[0038] 优选使固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物中的脂肪酶与上述三酰甘油充分接触来进行清洗，具体而言，优选通过以下方式来进行 ：通过在三酰甘油中搅拌用于酯化反应或酯交换反应后的固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物，使之分散，然后从三酰甘油中分离。

[0039] 接触具体而言即搅拌，优选在 10 ～ 45℃、尤为优选在室温下，优选进行 2 小时以上、更优选 10 小时以上、尤为优选 12 小时～ 48 小时。另外，根据要求还可以进行 48 小时以上。

[0040] 用于进行搅拌的搅拌机没有特别限定，但优选叶片式搅拌机、磁力搅拌机、三一搅拌机 (Threeone motor) 等。

[0041] 这样一来，使固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物中的脂肪酶与三酰甘油充分接触后，根据常规方法进行过滤，从三酰甘油中分离固定化脂肪酶或脂肪酶粉末组合物，再次在酯化或酯交换反应中使用。

[0042] 发明的效果

[0043] 根据本发明，对于由于在各种反应中使用而脂肪酶活性降低的脂肪酶，迄今为止都是将其废弃，而通过本发明的方法可以使脂肪酶活性恢复，因此可以延长脂肪酶的使用寿命，可以使采用脂肪酶而制造的制品成本降低，因此本发明从工业的观点来看有很大的优点。

[0044] 接着，通过实施例对本发明进行详细的说明。

[0045] 实施例 1

[0046] (1) 采用 Hosokawa Micron Corporation 生产的钢针研磨机 (Fine impact mill 100 UPZ) 将 1Kg 的 Novozymes A/S 公司生产的 Lipozyme TL-IM(平均粒径 800μm) 以 17600rpm 进行粉碎。用堀场制作所公司生产的粒度分布计 LA-500 测定粉碎的脂肪酶粒径，其平均粒径为 13.8μm。在该粉末中加入 1kg 作为助滤剂的纤维素粉末 (Nippon Paper Chemicals Co.，Ltd：平均粒径 30μm)，制成脂肪酶粉末组合物。

[0047] (2) 对 5g 这样获得的脂肪酶组合物加入 90g 菜籽脱色油和 10g ODO(日清奥利友集团株式会社公司生产：中链脂肪酸甘油三酯)，于室温下搅拌 24 小时后，过滤回收脂肪酶组合物。用下述方法测定该脂肪酶组合物的酯交换活性，在以粉碎前的 Lipozyme TL-IM 的活性为 100 时，其相对活性为 714。

[0048] 脂肪酶活性的测定方法

[0049] 在油酸甘油酯和辛酸甘油酯按 1 ： 1(w) 的比例混合而成的油中添加脂肪酶组合物，然后于 60℃下反应。随时间取样 10μl，用 1.5ml 己烷稀释后，将过滤脂肪酶组合物的溶液作为气相色谱 (GC) 用试样。通过 GC(柱：DB-1ht) 进行分析，用下式求出反应率。GC 条件为：柱温：初始 150℃、升温：15℃ / 分、最终 370℃。

[0050] 反应率 (%) = {C34area/(C24area+C34area)}×100

[0051] 式中，C24 表示辛酸甘油酯，C34 表示辛酸甘油酯的 1 个脂肪酸被油酸取代后的物质，area 为它们的面积。基于各时间的反应率，用分析软件 (origin ver.6.1) 求出反应速度常数 k 值。

[0052] 脂肪酶活性用以 Lipozyme TL-IM 的 k 值作为 100 时的相对活性来表示。

[0053] (3) 在 85g 菜籽脱色油 (日清奥利友集团株式会社公司生产) 和 15g ODO(日清奥利友集团株式会社公司生产) 中添加上述 (2) 获得的脂肪酶组合物 1 质量%，于 60℃搅拌 19 小时进行酯交换反应。求出随时间的酯交换率，确认反应的进行。此外，酯交换反应使用气相色谱分析甘油酯组成，通过计算求出测定试样中的酯交换反应物的比率。

[0054] 反应后过滤回收脂肪酶组合物，将该回收的脂肪酶组合物重复用于酯交换反应

中。重复进行数次反应，通过相对比例确认反应率的变化，并示于图 1 中。

[0055] 根据图 1 所示的结果，可知合计反应时间达到约 82 小时时，脂肪酶组合物的脂肪酶活性降低到约 60％。

[0056] (4) 过滤回收上述 (3) 中相对活性已经降低到约 60％的脂肪酶组合物，在该回收的脂肪酶组合物中，添加 18g 菜籽脱色油（日清奥利友集团株式会社公司生产）和 2g ODO（日清奥利友集团株式会社公司生产），于室温下用磁力搅拌机搅拌 24 小时。通过过滤回收脂肪酶组合物后，再与上述 (3) 同样重复进行酯交换反应。通过相对比例确认反应率的变化，结果示于图 2 中。

[0057] 根据图 2 所示的结果，可知通过对活性已经降低的脂肪酶组合物进行搅拌清洗，脂肪酶活性恢复到当初的 100％，脂肪酶组合物能够再利用若干次。

[0058] 实施例 2

[0059] (2-1) 对于 5g 实施例 1 的 (1) 中获得的脂肪酶组合物添加 90g 菜籽脱色油和 10g ODO（日清奥利友集团株式会社公司生产），于 60℃搅拌 2 小时后，过滤回收脂肪酶组合物。用与实施例 1 同样的方法测定该脂肪酶组合物的酯交换活性，其相对活性为 557。

[0060] (2-2) 在 100g 大豆油和 25g 大豆极度硬化油（横关油脂工业（株）公司生产）中添加上述 (2-1) 中获得的脂肪酶组合物 1.2 质量％，于 70℃下反应 120 小时后，通过过滤回收脂肪酶组合物。与实施例 1 同样对回收的脂肪酶组合物中的一部分测定其脂肪酶活性 (2-2a)。使先前回收的脂肪酶组合物分散于丙酮中，过滤后，再回收其滤渣，分散于 50g 菜籽脱色油：ODO（日清奥利友集团株式会社公司生产）＝ 9 ： 1(w) 的混合油中后，于室温下通过过滤进行清洗、置换，回收脂肪酶组合物。用与实施例 1 同样的方法测定该脂肪酶组合物的酯交换活性 (2-2b)，得到的活性以相对值示于表 1。

[0061] 表 1

[0062]

	单位质量脂肪酶制剂的相对酯交换活性
粉碎前 （TL-IM）	100
(2-1)	557
(2-2a)	11
(2-2b)	200

[0063] 实施例 3

[0064] 在 85g 菜籽脱色油（日清奥利友集团株式会社公司生产）和 15g ODO（日清奥利友集团株式会社公司生产）中添加 5 质量％的 Lipozyme TL-IM（固定化脂肪酶 :Novozymes A/S 公司生产），于 60℃搅拌 19 小时，进行酯交换反应。求出随时间的酯交换率，确认反应的进行。另外，酯交换反应使用气相色谱分析甘油酯组成，通过计算求出测定试样中的酯交换反应物的比率。

[0065] 过滤回收反应后的上述固定化脂肪酶，将该回收的固定化脂肪酶重复用于酯交换反应中。重复进行数次反应，通过相对比例确认反应率的变化，并示于图 3(3-1)。

[0066] 过滤回收相对活性已经降低到 60％左右的上述固定化脂肪酶，在该回收的固定化脂肪酶中添加 18g 菜籽脱色油（日清奥利友集团株式会社公司生产）和 2g ODO（日清奥利友集团株式会社公司生产），于室温下搅拌 24 小时。通过过滤回收固定化脂肪酶后，再重复

进行上述操作 (3-1)，进行酯交换反应。通过相对比例确认反应率随时间的变化，并示于图 3(3-2)。

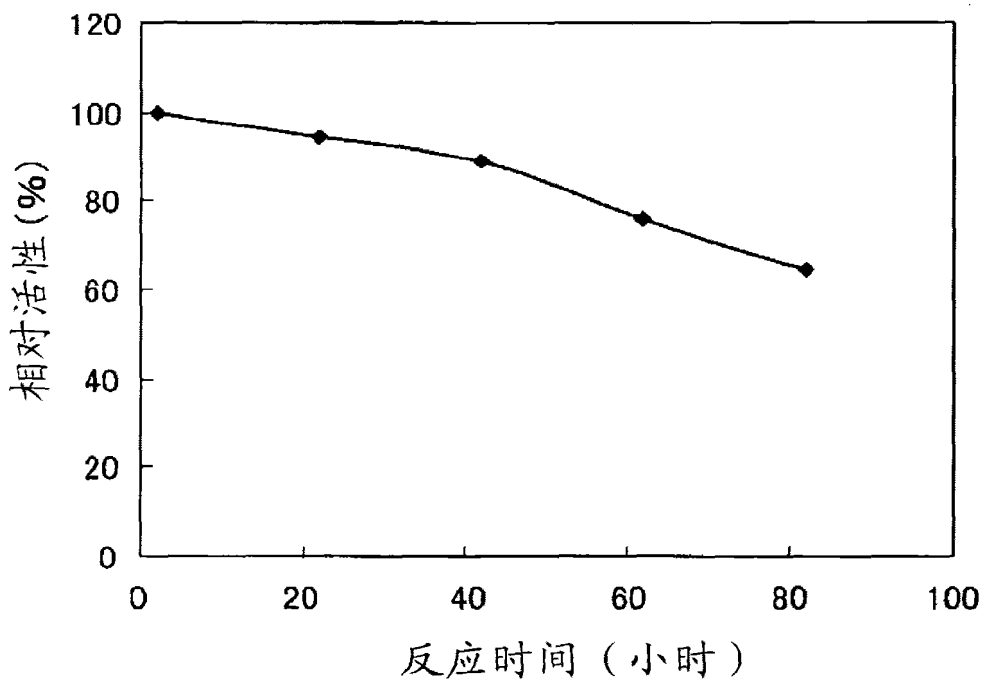

120
100
80
60
40
20
0
相对活性（%）
0
20
40
60
80
100
反应时间（小时）

图 1

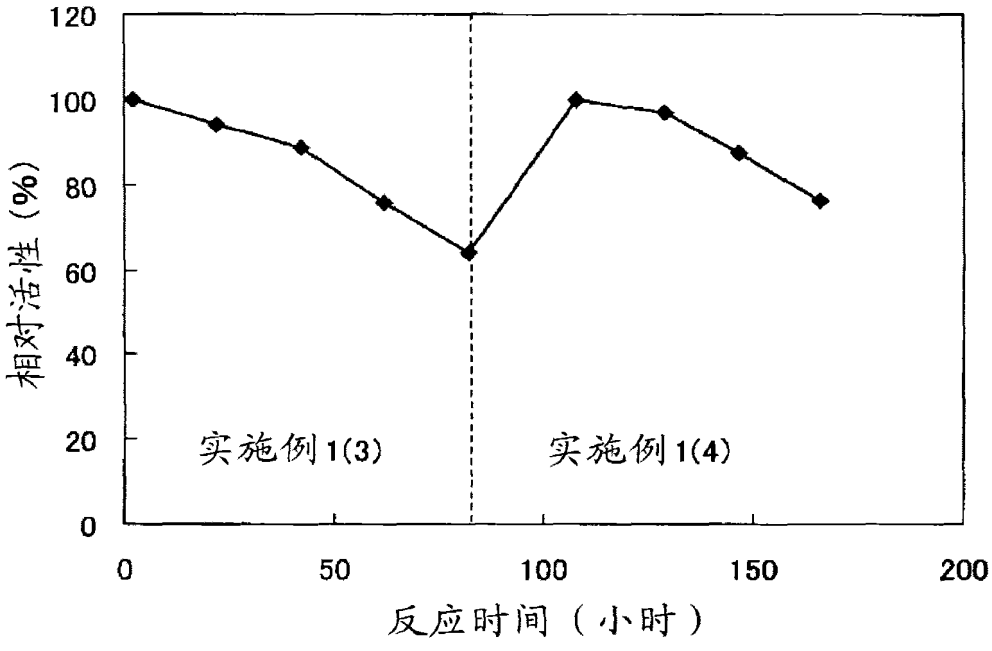

120
100
80
60
40
20
0
相对活性（%）
实施例 1(3)
实施例 1(4)
0
50
100
150
200
反应时间（小时）

图 2

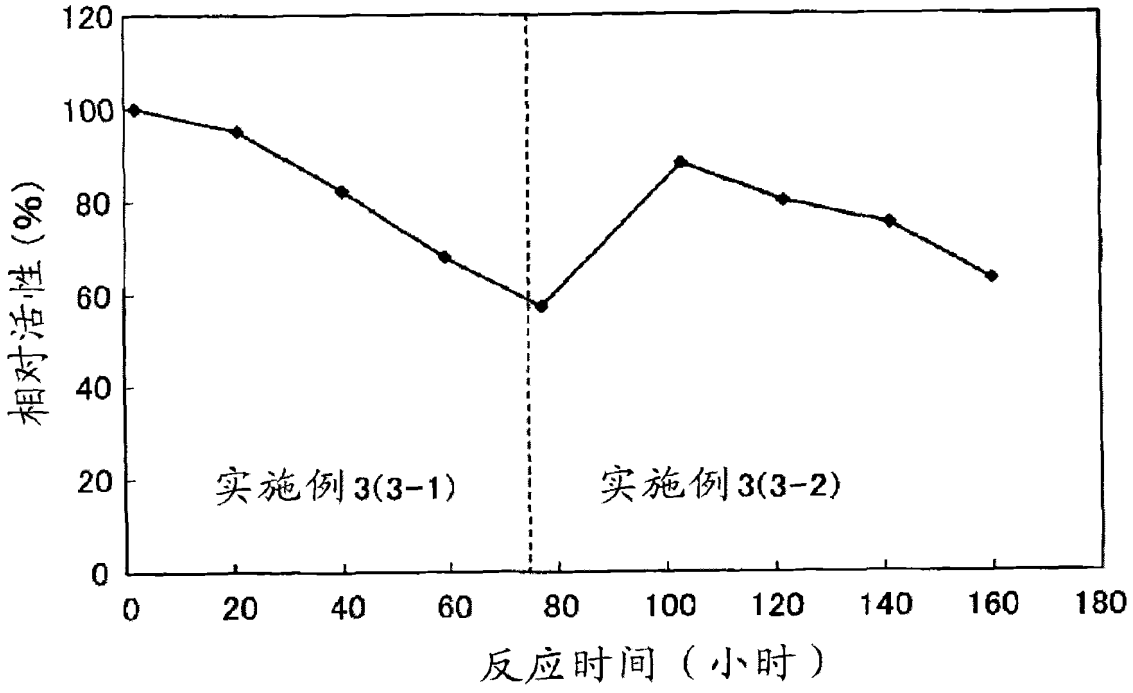

120
100
80
60
40
20
0
相对活性（%）
实施例3(3-1)
实施例3(3-2)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
反应时间（小时）

图 3