

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYUŽITÍ MEANDROVÉHO MIKROREAKTORU KE STUDIU ENZYMOVĚ KATALYZOVANÉ GLYCEROLÝZY

MAGDALENA DRHOVÁ, STANISLAV ŠABATA,
JAN SÝKORA, JIŘÍ HETFLEJŠ, JIŘÍ KŘIŠTÁL
a GABRIELA KUNCOVÁ

Ústav chemických procesů AV ČR v.v.i., Rozvojová 135,
165 02 Praha 6

Kuncova@icpf.cas.cz, Kristal.Jiri@UCHP.cz

Došlo 27.6.13, přepracováno 17.7.13, přijato 11.10.13.

Klíčová slova: enzymová glycerolýza, průtočný meandrový a kolonový reaktor, míchaný vsádkový reaktor, Novozym 435, transesterifikace, sojový olej

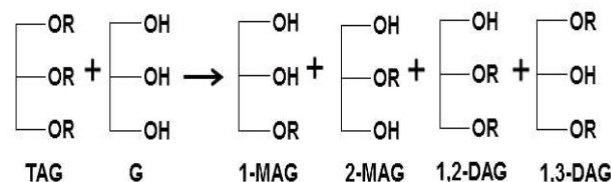
Úvod

Enzymová katalýza je předmětem trvalého vědeckého i technického zájmu, jehož výsledky jsou shrnuty v řadě monografií (viz např. cit.^{1–8}). Pozornost je vedle vývoje nových technologií věnována i průmyslovým procesům, v nichž by záměna dosud používaných chemických katalyzátorů za enzymové vedla k podstatnému zmírnění reakčních podmínek a tím nižší energetické náročnosti doprovázené vyšší čistotou produktu.

Příkladem může být intenzivní výzkum transesterifikace rostlinných olejů nižšími alkoholy katalyzované lipasami jako alternativy chemické výroby methylesterů mastných kyselin využívaných jako biopaliva. Vývoj v této oblasti v posledním desetiletí je i předmětem přehledných referátů^{9–11}.

Další průmyslově aplikovanou transformací rostlinných olejů je jejich transesterifikace glycerolem (glycerolýza) za tvorby produktů vhodných¹² jako emulgátory a aditiva v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Podstatné snížení reakční teploty (dosud až z 250 °C v chemickém procesu katalyzovaném alkalickými hydroxidy) na 40–70 °C v případě lipas jako katalyzátorů¹³ by snadněji zajistilo požadavky kladené na kvalitu a složení produktu daných direktivou Evropského parlamentu¹⁴. Reakce rostlinných olejů (triacylglycerolů, TAG) s glycerolem (G) obecně poskytuje regioisomerní mono- a diacylglyceroly (1- a 2-MAG a 1- a 2-DAG), doprovázené tvorbou jistého množství volných

mastných kyselin (VMK) způsobené jejich hydrolyzou vodou obvykle přítomnou v reakční směsi:



K přípravě MAG a DAG byla použita řada rostlinných olejů: slunečnicový^{15–20}, olivový^{21,22}, řepkový^{23–25}, sojový^{26–30} a tuňákový olej^{31,32}, palmolein³³, trioleylglycerol³⁴ a olej obohacený o konjugovanou linolovou kyselinu^{35,36}.

Ve výše uvedených případech byla glycerolýza provedena v míchaném vsádkovém reaktoru či průtočném kolonovém reaktoru s pevným ložem katalyzátoru. Vhodným nástrojem při studiu enzymově katalyzovaných reakcí jsou také mikroreaktory. Díky velkému poměru povrchu k objemu mají velmi dobrý přestup tepla a hmoty, což snižuje koncentrační a teplotní gradienty v reakční směsi a tedy zvyšuje homogenitu reakční směsi ve srovnání s klasickými průtočnými i vsádkovými reaktory. Možnost přesného řízení reakčních podmínek dovoluje bezpečně provádět na kontrolu náročné nebezpečné reakce. Odpadají i problémy spojené se zvětšováním měřítka, neboť v případě mikroreaktorů nezávisí optimalizované podmínky na objemu procesu a zvětšení měřítka se dosahuje jen zvýšením jejich počtu^{37,38}. Zřejmou výhodou je i podstatně nižší spotřeba drahých enzymů, zřetelná zejména při vývoji nových typů katalyzátorů spojených s rozsáhlou řadou experimentů. V oblasti biokatalýzy byly mikroreaktory využity při studiu několika organických reakcí (např. epoxidací olefinů³⁹, polymerizací ϵ -kaprolaktamu⁴⁰, či syntéze aminofenoxazin-3-onu⁴¹, katalyzovaných imobilizovanými lipasami. Nadějně výsledky byly podnětem k jejich ověření i v případě výše uvedené transesterifikační reakce.

Pro tyto účely byl proto zvolen kontinuální meandrový mikroreaktor s pevným ložem katalyzátoru a výsledky porovnány s průběhem glycerolýzy v kolonovém a vsádkovém reaktoru. Cílem bylo zároveň i doplnit poznatky získané s těmito reaktory v předchozí práci³⁰. Z těchto důvodů byla jako modelová reakce vybrána glycerolýza sojového oleje katalyzovaná komerční imobilizovanou lipasou *Candida Antarctica B* (Novozym 435) a k zajištění mísitelnosti obou reakčních složek byl použit *tert*-butanol¹⁹.

Experimentální část

Chemikálie

Rostlinné oleje (lněný, řepkový, sojový a slunečnicový), glycerol (p.a. > 99%, 0,39 mg H₂O/g, Penta, s.r.o., Praha), *tert*-butanol (*t*-BuOH, 99,5 %, 3,1 mg H₂O/g, Roanal, Budapešť) a hexan (pro HPLC, > 98,5 %, Aldrich CZ) byly použity bez další úpravy. Novozym 435 (Aldrich CZ, imobilizovaná lipasa z *Candida antarctica* B, objemová hustota 430 kg m⁻³, průměr porézních sférických částic 300–900 μm, specifický povrch 80–150 m² g⁻¹, průměr pórů 140–170·10⁻¹⁰ m (cit.³⁷).

Analytické metody

HPLC

Analýza byla provedena způsobem podrobně popsaným v předchozí práci³⁰ a poskytla složení lipidové fáze (TAG, MAG a DAG v hm.%). Koncentrace VMK byla stanovena acidobazickou titrací vzorku rozpuštěného ve směsi aceton-ethanol (1:1) 0,05 M-NaOH na fenolftalein.

Gel permeační chromatografie spojená s NMR (GPC-NMR)

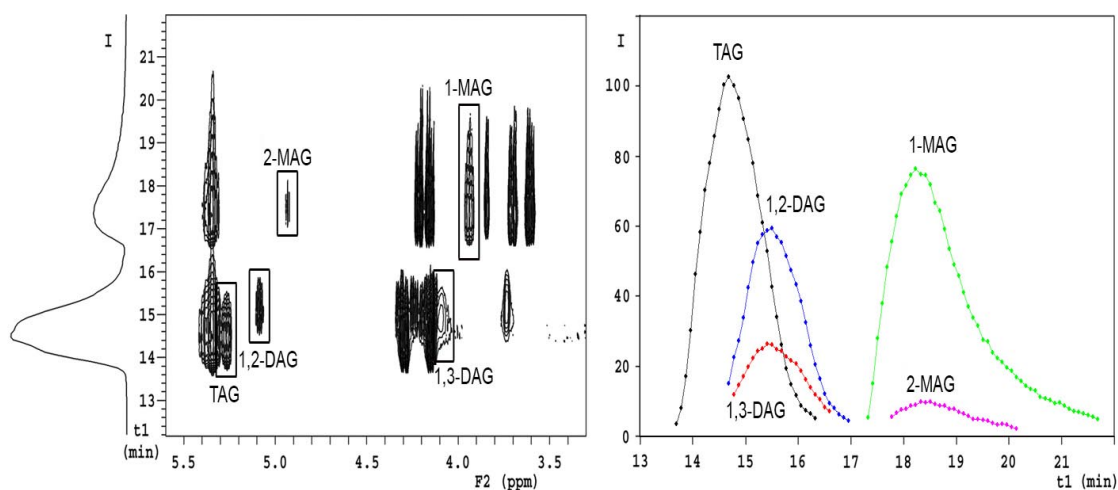
Analýzy byly provedeny na HPLC přístroji Varian ProStar 230 vybaveném GPC kolonou (PL gel, 5 μm částice, velikost pórů 30 nm). Vzorek (~ 80 mg) byl rozpuštěn ve 0,6 ml CDCl₃ a 30 μl podrobena separaci za použití čistého CDCl₃ (LC-NMR grade, Euriso-top, Francie, průtok 0,5 ml min⁻¹), separace byla výhradně monitorována pomocí on-flow ¹H NMR detekce (Varian INOVA 500 MHz spektrometr vybavený průtočnou trojrezonanční HCN sondou s průtokovou mikrokyvetou o aktivním objemu 60 μl). Frekvence ¹H měření byla 499,9 MHz. Pro všechny experimenty byl použit standardní LC-NMR soft-

ware vnmrC 6.1. Všechny separace a NMR detekce byly prováděny při okolní teplotě 22 °C. ¹H NMR spektra z průtočného modu byla získána použitím pulsní sekvence WET, která slouží k vícenásobnému potlačení signálů rozpouštědel. Nastavení potlačení frekvence zbytkového CHCl₃ (δ = 7,26 ppm) a H₂O (δ = 1,57 ppm) bylo nastaveno před vlastním měřením a udržováno neměnné během celého sběru dat. Takto byla získána sada 128 ¹H NMR spekter. Akviziční doba jednoho spektra byla 1 s a pokrývala oblast 10 kHz, 90° RF pulz byl dlouhý 3,4 μs, na každé spektrum byly použity 4 akumulací pulzy. Relaxační prodleva byla nastavena na 0 s. Data byla doplněna nulami na 262k, první 3 body FID byly nahrazeny zpětnou lineární predikcí (32 LP koeficientů), zbytkový signál vody a chloroformu po potlačení byl následně odstraněn digitálním odečtem dané frekvence před vlastní Fourierovou transformací; pro přesnou integraci byla na každé spektrum použita korekce pozadí. Žádné další zpracování dat nebylo provedeno. Typické spektrum produktů glycerolýzy je na obr. 1.

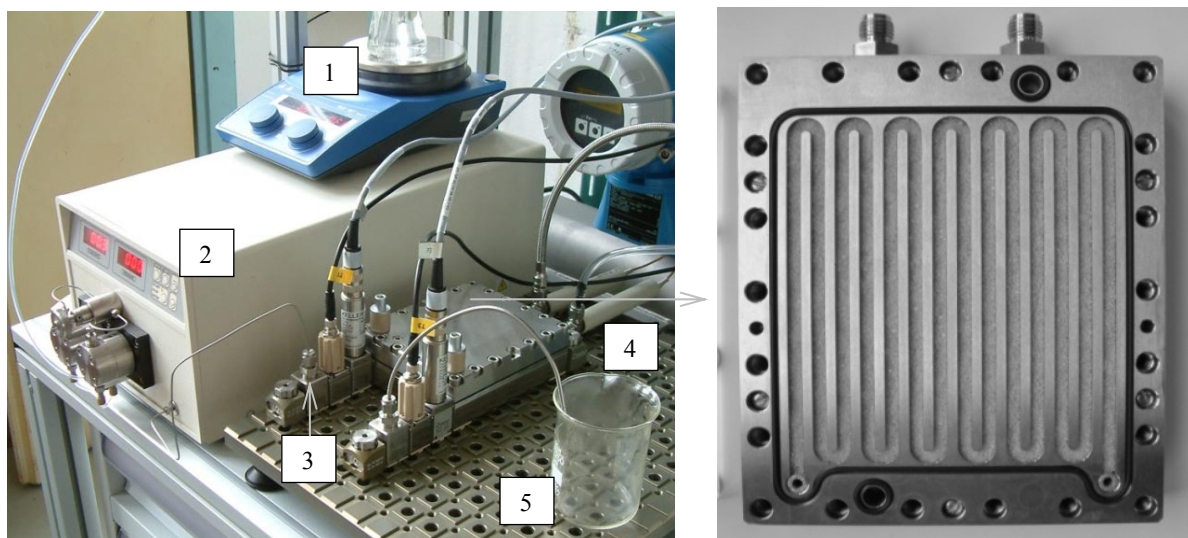
Kontinuální glycerolýza

Meandrový mikroreaktor (MMR)

Byl použit Micro Fixed Bed Meander Reactor (MMR), Ehrfeld s vnitřním objemem 24,5 ml (prázdný reaktor bez náplně), příčným průřezem kanálku 4 × 4 mm a délkou 1530 mm. Na vstupu a výstupu z mikrokanálku jsou umístěny kovové frity zabraňující pohybu náplně. Ve vstupním a výstupním otvoru reaktoru byla umístěna dvě tepelná čidla (PT100) měřící teplotu reakční směsi těsně před vstupem/výstupem do/z náplňového lože. Pro lepší výměnu tepla je kanálek s náplní obklopen integrovaným tepelným výměníkem, který je napájen a termostatován vodní lázní. Malý průřez reakčního kanálku spolu s integrovaným tepelným výměníkem zaručují velmi dobré řízení reakční teploty v celém objemu náplně. Geometric-



Obr. 1. ¹H NMR spektrum produktů glycerolýzy. *I* intenzita NMR signálu, *F2* chemický posun v ppm, *t1* eluční čas v min.



Obr. 2. Meandrový mikoreaktor (MMR) s náplní Novozym 435, (1) míchaná reakční směs, (2) pumpa, (3) vstup do reaktoru, (4) MMR, (5) nádoba na jímání produktů

Tabulka I
Srovnání meandrového mikoreaktoru s kolonovým reaktorem

Charakteristika	Meandrový mikoreaktor	Kolonový reaktor
Průřez	čtverec	kruh
Délka strany/průměr, mm	4	30
Délka náplně, mm	1530	127
Objem náplně, cm ³	24,5	89,7
Zadrž kapaliny, cm ³	11,5	42,2
Náplň Novozym [®] 435), g	4,62	17
Průtoky, cm ³ min ⁻¹	0,2–1,2	2,5–30
Tlaková ztráta ^a , ΔP [kPa]	9,1–54,4	3,9–48,9
Reynoldsovo číslo ^a , Re	0,004–0,026	0,001–0,015
Sherwoodovo číslo ^a , Sh	4,6–8,4	3,78–6,34
Střední celková rychlost ^b , mol _s kg _{kat} ⁻¹ h ⁻¹	2,5	2,1

^a Vypočteno pro mol. poměr G:S = 2:1, 25 obj.% *t*-BuOH, 42 °C: $\rho = 882 \text{ kg m}^{-3}$, $\mu = 25,2 \text{ mPa}$. ^b $r = -\Delta x / \Delta(W/F)$ pro podmínky v obr. 4 (MMR) a obr. 6A (kolonový reaktor) a pro konverzi oleje $x = 0,85$

ké uspořádání a schéma zařízení je na obr. 2, charakteristické údaje jsou pak v tab. I. MMR byl zabudován do experimentální aparatury platformy Ehrfeld.

Směs rostlinného oleje, glycerolu a *t*-BuOH ve 250 ml temperovaném a promíchávaném zásobníku byla čerpána pístovým HPLC čerpadlem Alfa100 do MMR (průtok 0,2–1,2 ml min⁻¹). Ve zvolené fázi glycerolýzy byly vždy odebrány 4 vzorky (objem 0,3 ml), z nichž dva byly analyzovány HPLC a dva určeny ke stanovení VMK acidobazickou titrací. Získané údaje byly zprůměrnovány. Pro ověření reprodukovatelnosti byly provedeny experimenty se stejným složením reakční směsi

s odstupem jednoho týdne, které prokázaly velmi dobrou shodu výsledků (směrodatná odchylka nepřesahovala 1,4 hm.%) a tím i stabilní aktivitu katalyzátoru v rámci všech provedených měření.

Průtočný kolonový reaktor s pevným ložem katalyzátoru

Glycerolýza byla provedena také v reaktoru použitém v předchozí práci³⁰. Jeho charakteristika je uvedena v tab. I. Směs oleje, glycerolu a *t*-BuOH byla dávkována peristaltickou pumpou (průtok 1–30 ml min⁻¹) ze zásobníku opatřeného magnetickým míchadlem (400 otáček za minutu) do spodní části reaktoru s temperačním pláštěm

(vnitřní průměr 30 mm a délka 150 mm), náplní Novozym 435 a obsah byl udržován na reakční teplotě 48 °C cirkulací vody z termostatu. Při každé změně reakčních podmínek (složení reakční směsi a teplotě) byl první vzorek odebrán až po průchodu reakční směsi odpovídající třem objemům lože katalyzátoru. Poté byly reakční produkty z výstupu kolony vedeny do sběrné nádoby po dobu 8 hodin k zajištění reprezentativního vzorku pro analýzu obsahu acylglycerolů HPLC a VMK acidobazickou titrací. Před každým dalším experimentem byl reaktor propláchnut 100 ml *t*-BuOH a stejným objemem hexanu.

Zpracování dat

Hydrodynamické podmínky v obou reaktorech byly vyhodnoceny stanovením Reynoldsova čísla Re (vztah viz seznam symbolů), tlakové ztráty ΔP podle Ergunovy rovnice (1):

$$\frac{\Delta P}{L} = 150 \frac{(1 - \varepsilon_b)^2}{\varepsilon_b^3} \frac{\mu}{d_p^2} u_s + 1,75 \frac{(1 - \varepsilon_b)}{\varepsilon_b^3} \frac{\rho_f}{d_p} u_s^2 \quad (1)$$

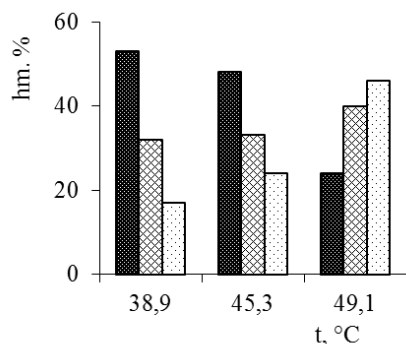
a Sherwoodova čísla Sh (viz seznam symbolů).

Výsledky získané při glycerolýze za různých rychlostí dávkování byly vztaženy k prostorovému času $\tau = W/(v \rho_{kat})$, [min] jako jednotnému parametru, kde W je navážka suchého katalyzátoru (Novozym 435), ρ_{kat} je jeho objemová hustota (450 kg m^{-3}) a v je rychlost dávkování reakční směsi [$\text{m}^3 \text{ min}^{-1}$]. Pro srovnání glycerolýz v meandrovém a kolonovém reaktoru byla zvolena hodnota W/F [kg h kmol^{-1}], kde W je hmotnost katalyzátoru (kg) a F molární množství dávkovaného substrátu (kmol h^{-1}).

Arrheniova aktivační energie ΔE (J mol^{-1}) byla vypočtena pro glycerolýzu v MMR z rychlostních konstant k_1 , k_2 při dvou různých teplotách (obr. 3A) získaných ze středních celkových rychlostí r ($\text{kmol s kg}_{kat}^{-1} \text{ h}^{-1}$):

$$r = -\Delta x / \Delta(W/F) = k_T \cdot c_S^n \cdot c_G^m \quad (2)$$

$$\Delta E = R \ln(k_2/k_1) / [(1/T_2) - (1/T_1)] \quad (3)$$



A

Glycerolýza ve vsádkovém reaktoru

Směs sojového oleje (20 g, 23,2 mmol), glycerolu (8,4 g, 91,4 mmol), *t*-BuOH (38 g) a katalyzátoru (2 g Novozym 435, 7 hm.% na olej a glycerol) byla míchána magnetickým míchadlem (1,5 cm teflonové míchadlo, 750 ot/min) ve 100ml skleněné baňce s plochým dnem a vyhřívána na teplotu 48 °C kontrolovanou regulátorem IK TC3 ve spojení s Pt teploměrem, umístěným v reakční směsi. Ve zvolených časových intervalech byly ze směsi odebrány vzorky (0,1 g), přidány k CDCl_3 (1 ml) a ihned analyzovány metodou GPC-NMR.

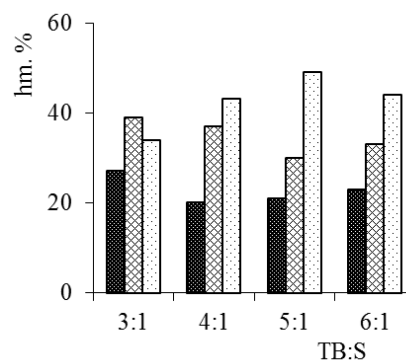
Výsledky a diskuse

Glycerolýza v meandrovém mikroreaktoru

S cílem zvolit vhodné podmínky glycerolýzy z hlediska tvorby parciálních acylglycerolů (DAG a MAG) byl posouzen vliv následujících reakčních parametrů: teploty, mol. poměru glycerolu k substrátu (G:S) a koncentrace *t*-BuOH. Vliv teploty na rychlost reakce a složení produktu pro stechiometrický poměr G:S (2:1) je na obr. 3A. Kromě více jak dvojnásobně vyšší konverze TAG vede zvýšení teploty k postupnému, až dvojnásobnému nárůstu podílu MAG, zatímco u DAG je toto zvýšení jen třetinové (z 32 na 40 hm.%).

Ve shodě s publikovanými údaji²¹ použití substechio-metrických poměrů preferuje tvorbu DAG (tab. II), přičemž snížení mol. poměru G:S na 1:1 vede k téměř 1,5násobnému zvýšení výtěžku DAG a jeho poměru k MAG (3:1, tab. II).

Glycerolýza rostlinných olejů zaměřená na získání směsi s vyšším obsahem DAG byla s použitím Novozym 435 a *t*-BuOH dosud popsána jen v jediné práci²¹. Bylo zjištěno, že reakce olivového oleje v mol. poměrech G:S = 0,8:1 resp. 0,5:1,5 poskytují při 55 °C v míchaném vsádkovém reaktoru (10 hm.% katalyzátoru, *t*-BuOH 1:1 v/v



B

Obr. 3. Závislost složení produktu glycerolýzy sojového oleje (hm.%) na A) průměrné teplotě reakční směsi ($\Delta E = 32,57 \text{ kJ mol}^{-1}$) a B) mol. poměru *t*-BuOH k oleji (BT:S) při 48 °C. Novozym 435, G:S = 2:1, $v = 0,3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. TAG (black), DAG (cross-hatched), MAG (dotted)

Tabulka II

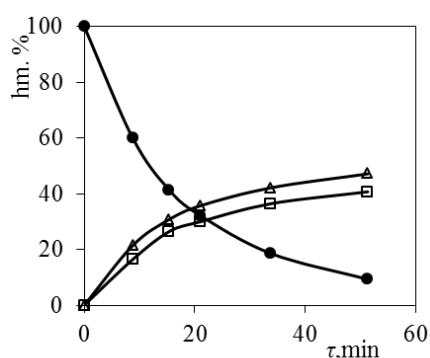
Vliv mol. poměru G:S na složení produktu glycerolýzy (hm.%) katalyzované Novozym 435 v *t*-BuOH (23 obj.%), $\tau = 33$ min, 48 °C

Acylglycerol	G : S		
	1 : 1	1,35 : 1	2 : 1
TAG	33	28	18
DAG	50	38	36
MAG	17	34	40

k oleji) produkt obsahující 33 hm.% TAG, 50 hm.% DAG a 17 hm.% MAG resp. 38 hm.% TAG, 50 hm.% DAG a 12 hm.% MAG. Uvedené výtěžky jsou tak blízké hodnotám nalezeným pro sojový olej v této práci.

Výše uvedené výsledky byly získány za přidavku *t*-BuOH jako inertního rozpouštědla²¹. Ten zvyšuje rozpustnost hydrofilního glycerolu v hydrofobní olejové fázi (viz např. cit.^{16,18,21,34}), snižuje tak viskozitu reakční směsi a usnadňuje interakci reaktantů s imobilizovaným enzymem. Jak je zřejmé z obr. 3B, má postupné zvýšení mol. poměru *t*-BuOH k oleji (TB:S) do hodnoty 5:1 (odpovídajícího změně v mol. koncentraci sojového oleje z 0,62 mol l⁻¹ na 0,55 mol l⁻¹ a přidavku *t*-butanolu z 21 na 30 obj.%) za uvedených podmínek výraznější vliv na složení produktu (viz vzrůstající podíl MAG) než na deacylaci TAG. Další zvýšení objemu rozpouštědla vede již jen k malým změnám (max. 10 rel.% u jednotlivých acylglycerolů).

Z těchto důvodů byla k posouzení časového průběhu glycerolýzy zvolena reakční směs obsahující glycerol a sojový olej v mol. poměru 2:1 a 25 obj.% *t*-BuOH a rychlost dávkování měněna v rozmezí 0,2–1,2 cm³ min⁻¹. Výsledky jsou v závislosti na reakční době τ vyneseny na obr. 4. Dokládají, že vysoký stupeň glycerolýzy TAG lze dosáhnout v relativně krátké době, přičemž mírná převaha MAG zjištěná výše pro $\tau = 33$ min (obr. 3B) se udržuje v celém průběhu reakce.



Obr. 4. Glycerolýza sojového oleje v MMR – vliv reakční doby τ (min). Novozym 435, G:S = 2:1, 25 obj.% *t*-BuOH, $v = 0,2$ – $1,2$ cm³ min⁻¹, 48 °C. TAG (●), DAG (□), MAG (Δ)

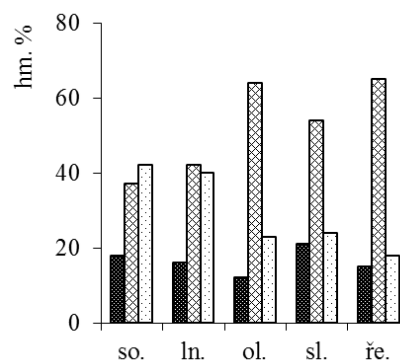
Stojí za zmínku, že výsledná směs by svým složením vyhovovala podmínkám kladeným na surovinu pro přípravu emulgátorů pro potraviny dosud připravovanou průmyslovou chemickou glycerolýzou¹³ (směs DAG a MAG obsahující nejméně 30 % MAG a méně než 8 % TAG).

Vzhledem k tomuto příznivému výsledku bylo zajímavé provést glycerolýzu několika dalších rostlinných olejů. Stojí za zmínku, že podobná studie nebyla ani pro odlišné podmínky (jiné mol. poměry, konc. organického rozpouštědla, teploty, exp. zařízení) dosud jak pro Novozym 435, tak i další imobilizované enzymy uveřejněna. Údaje v obr. 5 předběžně naznačují, že pro získání směsí s vysokým podílem DAG byly z testovaných olejů vhodné olivový, slunečnicový a řepkový olej.

Glycerolýza v kolonovém reaktoru

Průběh glycerolýzy sojového oleje za podmínek použitých při glycerolýze v MMR (obr. 4) je znázorněn na obr. 6A. Výsledkem je opět směs parciálně acylovaných glycerolů (MAG > DAG), doprovázených poněkud vyšší tvorbou VMK (3 hm.% ve srovnání s 1,3 hm.% v MMR), jejichž obsah se prakticky nemění v průběhu reakce. Již zvýšený poměr glycerolu k oleji 3:1 umožňuje zvýšit selektivitu reakce ve smyslu tvorby MAG (obr. 6B). Jak je zřejmé z údajů v tab. III, další zvýšení tohoto poměru na 4:1 již nevede k významnému zvýšení obsahu MAG. Velmi podobné výtěžky MAG lze za těchto podmínek získat i při glycerolýze dalších rostlinných olejů. Z aplikačního hlediska je zajímavé, že shodné výsledky lze docílit i se sníženým objemem rozpouštědla (viz pozn.^a v tab. III). Navíc se za uvedeného mol. poměru stírají rozdíly v reaktivitě jednotlivých olejů a složení lipidové fáze pozorované při glycerolýze se stechiometrickým poměrem glycerolu k oleji (2:1) uvedené na obr. 5.

Obsahy MAG, DAG a TAG při mol. poměru 4:1 se navíc kvalitativně shodují s rovnovážnými hodnotami uvedenými v literatuře^{16,38} pro mol. poměr 4,5:1 : 70 % (80,75 mol.%) MAG, 27 % (17,92 mol.%), DAG 3 % (1,33 mol.%) TAG.



Obr. 5. Složení produktu glycerolýzy rostlinných olejů (hm.%) v MMR. Podmínky viz obr. 4, $\tau = 33$ min. TAG (■), DAG (▨), MAG (▤). Oleje: sojový (so.), lněný (ln.), olivový (ol.), slunečnicový (sl.), řepkový (ře.)

Tabulka III

Složení frakce glyceridů (hm.%) při kontinuální glycerolýze rostlinných olejů v *t*-BuOH (40 obj.%) v kolonovém reaktoru (Novozym 435, G:S = 4:1, 48 °C, τ = 45 min)

Olej	MAG ^a	DAG	TAG	VMK
Lněný	71,2	27,4	1,4	3,8
Olivový ^b	70,2	28,7	1,1	4,5
Řepkový	70,6	28,0	1,4	3,2
Sojový	69,8	29,1	1,1	3,0
Slunečnicový	71,3	27,4	1,1	3,4

^a Průměr 2–4 měření. Shodné složení dosaženo i při použití 28 obj.% rozpouštědla (odchyly nepřesáhly 3 rel.%).

^b Převzato z cit.²⁰: 73 % MAG a 25 % DAG pro glycerolýzu při mol. poměru G:S = 5 (200 mm kolona průměru 21 mm plněná 8 g Novozym 435, 52,7 hm.% *terc*-pentanolu, 40 °C, τ = 40 min)

Glycerolýza v míchaném vsádkovém reaktoru

Výše uvedený průběh glycerolýzy byl porovnán také s průběhem v míchaném vsádkovém reaktoru, který je často používaným způsobem provedení této reakce. Vzhledem k nedostatku publikovaných dat týkajících se změn v relativním zastoupení isomerních monoacyl- a diacylglycerolů byla pozornost věnována i této otázce. Z obr. 7A je zřejmé, že za podmínek uvedených v tab. III glycerolýza sojového oleje poskytuje výtěžky MAG (75 %) i DAG (25 %) srovnatelné s hodnotami dosaženými v kolonovém reaktoru (69,8 % MAG a 29,1 % DAG) a blízké rovnovážnému složení (viz diskusi výše). Z hlediska regioisomerního složení (obráz. 7B) určeného GPC-NMR metodou popsanou v exp. části obsahuje frak-

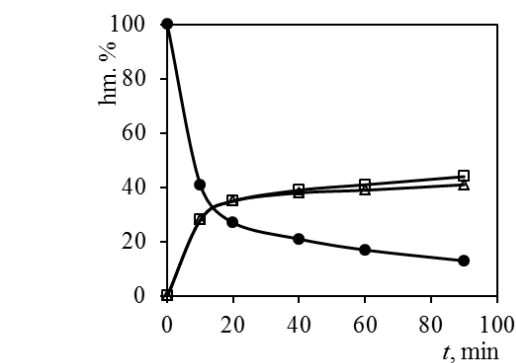
ce MAG 81,7 % 1- a 18,3 % 2-MAG a frakce DAG 56,8 % 1,3- a 43,2 % 1,2-DAG v polovičních mol. poměrech (1-/2-MAG = 4,45 a 1,3-/1,2-DAG = 1,3), než které byly vypočteny na základě termodynamických dat (9:1 resp. 2:1, cit.^{39,40}).

Podobné složení (výtěžek 71,5 hm.% MAG a 28,5 hm.% DAG) olejové fáze bylo nalezeno^{15,16} i při glycerolýze slunečnicového oleje (15 hm.% Novozym 435 na olej, G:O = 4,5:1, 60 obj.% *t*-BuOH, 40 °C, reakční čas 2 h).

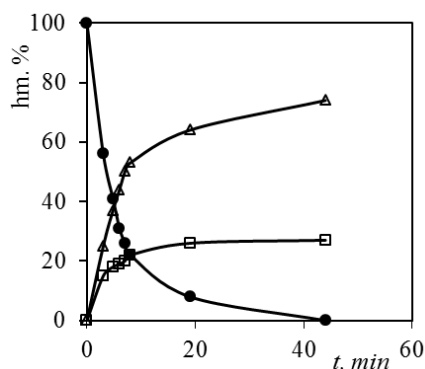
Porovnání glycerolýzy v meandrovém a kolonovém reaktoru

Před vlastním porovnáním obou experimentálních uspořádání je třeba uvést, že podmínky použitého komerčního mikroreaktoru nebyly pro zkoumanou reakci nijak optimalizovány. Charakteristika MMR a náplňové kolony je uvedena v tab. I. Údaje ukazují, že z hlediska hydrodynamického chování vykazují oba reaktory některé společné rysy: nízká Reynoldsova čísla svědčí o tom, že oba reaktory pracovaly v režimu laminárního toku a při nízkých rychlostech dávkování reakční směsi nezbytných pro získání produktu s vysokým obsahem parciálních acylglycerolů (tj. hodnotách při spodní hranici uvedených rozmezí). V obou případech reaktory pracovaly se stejnou tlakovou ztrátou. Hodnoty Sherwoodova čísla vypočtené z rovnice pro tok reakční směsi kolem částice katalyzátoru se výrazně liší od hodnoty charakteristické pro přirozenou konvekci (difúzi, $Sh = 2$) jako dominantní mechanismus přenosu hmoty a naznačují tak podstatnou úlohu nucené konvekce.

Průběh glycerolýzy v závislosti na zatížení katalyzátoru (obráz. 8) má v obou případech podobný trend. V oblasti nízkého zatížení (vysokých konverzí TAG) je složení lipidové fáze pro danou hodnotu W_i/F téměř shodné. To ukazuje, že v této prakticky významné oblasti se MMR a kolonový reaktor chovají stejně.

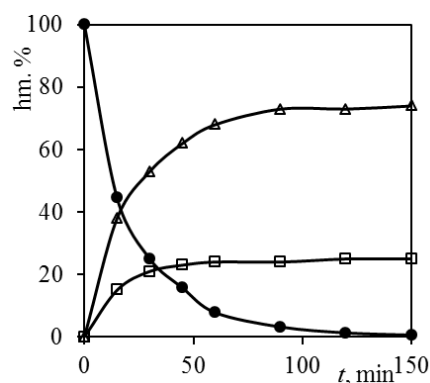


A

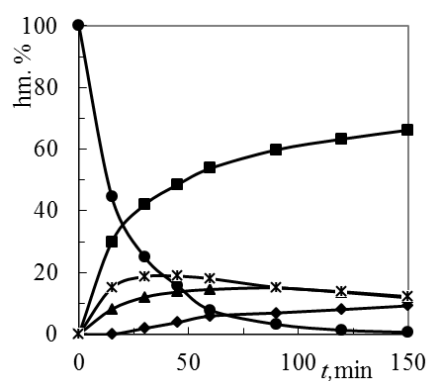


B

Obr. 6. Glycerolýza sojového oleje v průtočném kolonovém reaktoru. Novozym 435, 25 obj.% *t*-BuOH, 48 °C, A – G:S = 2:1, B – G:S = 3:1. TAG (●), DAG (□), MAG (Δ)

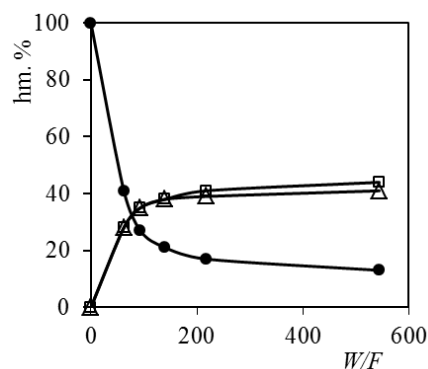


A

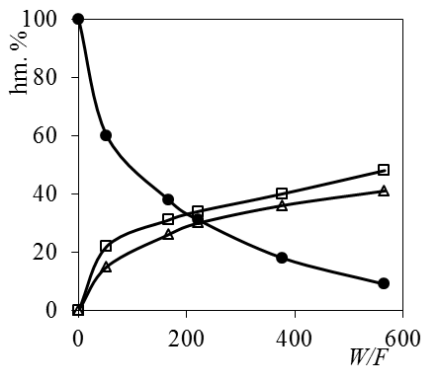


B

Obr. 7. Průběh glycerolýzy sojového oleje ve vsádkovém reaktoru. G:S = 4,5:1,7 hm.% Novozym 435, 40 obj.% *t*-BuOH. A – TAG (●), DAG (□), MAG (Δ). B – TAG (●), 1,2-DAG (×), 1,3-DAG (◆), 1-MAG (■), 2-MAG (▲)



A



B

Obr. 8. Závislost složení produktu glycerolýzy sojového oleje (G:S = 2:1) na W/F ($\text{kg}_{\text{kat}} \text{h kmol}_S^{-1}$). A – kolonový reaktor, B – MMR. TAG (●), DAG (□), MAG (Δ)

Závěr

Výsledky získané v této práci při transesterifikaci několika rostlinných olejů katalyzované komerčním Novozym 435 jako příkladem imobilizovaného enzymového katalyzátoru svědčí o tom, že meandrový mikroreaktor je vhodným nástrojem při studiu těchto reakcí. Ve srovnání s dosud téměř výhradně používanými metodami má výhodu v tom, že oproti kontinuálnímu kolonovému reaktoru s pevným ložem katalyzátoru dosahuje za srovnatelných reakčních podmínek prakticky shodných hodnot s několikanásobně nižším množstvím katalyzátoru, ve srovnání se vsádkovým reaktorem i za podstatně kratší reakční dobu. Tyto okolnosti upřednostňují jeho využití zejména při vývoji a testování aktivity nových typů imobilizovaných katalyzátorů se zvýšenými nároky na spotřebu relativně drahých výchozích enzymů.

Tato práce vznikla z finanční podpory GA AV ČR, projekt IAAX08240901.

Seznam symbolů

c_G	počáteční koncentrace glycerol, mol dm^{-3}
c_S	počáteční koncentrace oleje, mol dm^{-3}
d_p	průměrná velikost částic katalyzátoru, m
ε_b	$[(w-w_{\text{kat}})/w]$,
D	difuzní koeficient, $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
ΔE	Arrheniova aktivační energie, J mol^{-1}
F	průtok substrátu, kmol h^{-1}
k_1	rychlostní konstanta glycerolýzy při teplotě T_1 , $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$
k_2	rychlostní konstanta glycerolýzy při teplotě T_2 , $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$
L	délka reaktoru, m
μ	dynamická viskozita reakční směsi, $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$

ΔP	tlaková ztráta, kPa, rovnice (1)
r	celková střední rychlost reakce, $\text{mol s kg}_{\text{kat}}^{-1} \text{ h}^{-1}$
R	plynová konstanta $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
ρ	hustota reakční směsi, kg m^{-3}
ρ_{kat}	objemová hustota katalyzátoru, kg m^{-3}
Re	Reynoldsovo číslo, $[(\rho v_0 d_p)/\mu]$
Sc	Schmidtovo číslo, $[\mu/(\rho D)]$
Sh	Sherwoodovo číslo, $[2,0 + 0,6 (Re)^{0,5} (Sc)^{1/3}]$
τ	prostorový reakční čas, $[W/(v \rho_{\text{kat}})]$, min
u_s	objemová rychlost/průřez reaktoru, m s^{-1}
v	průtok reakční směsi, $\text{m}^3 \text{ min}^{-1}$
v_0	vstupní rychlost reakční směsi, m s^{-1}
w	objem reaktoru, m^3
w_{kat}	objem lože katalyzátoru, m^3
W	hmotnost lože katalyzátoru, kg
x	molární zlomek zreagovaného oleje

LITERATURA

- Silverman R. B.: *Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. Academic Press (Elsevier), Waltham 2002.
- Drauz K.: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Sv. 2. Wiley, New York 2012.
- Gotor V., Alfonso I., García-Urdiales E.: *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. Wiley, New York 2008.
- Illanes A.: *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer, Berlin 2008.
- Buchholz K., Kasche V., Bornscheur U.T.: *Biocatalysts and Enzyme Technology*. J. Wiley, New York 2012.
- Cao L.: *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. Wiley, New York 2006.
- Liese A., Seelbach K., Andrey C.: *Industrial Bio-transformations*. Wiley, New York 2006.
- Patel R. N.: *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. Taylor & Francis, Boca Rayton 2010.
- Meher L.C., Vidya Sagar D., Naik S. N.: *Renewable Sustain. Energy Rev.* 2006, 248.
- Fjerbaek L., Christensen K. V., Norddahl B.: *Biotech. Bioeng.* 102, 5 (2009).
- Ghaly A. E., Dave D., Brooks M.S., Budge S.: *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 6, 54 (2010).
- European Food Emulsifier Manufacturers Assoc.: *EFEMA Index of Food Emulsifiers*, 4. vyd., EFEMA Brusel, únor 2013. <http://www.emulsifiers.org>. Staženo 10.5.2013.
- Watanabe Y., Shimada Y., v knize: *Biocatalysis and Agriculture Biotechnology* (Hou C.T., Shaw J.-F., ed.), kap. 13. CRC Press, Boca Raton 2009.
- EU Parlament and Council Directive: No. 95/2EC on *Food Additives Other Than Colours and Sweeteners*. Staženo 10.5.2013 z <http://europa.eu.int/eurlex/en/consleg/pdf>
- Yang T., Rebsdorf M., Engelrud U., Xu X.: *J. Food Lipids* 12, 299 (2005).
- Yang T., Rebsdorf M., Engelrud U., Xu X.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 1475 (2005).
- Damstrup M.L., Jensen T., Sparsø F.V., Kiil S.Z., Jensen A.D., Xu X.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82, 559 (2005).
- Damstrup M. L., Abildskov J., Kiil S. Z., Jensen A. D., Sparsø F. V., Xu X.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 7113 (2006).
- Damstrup M. L., Jensen T., Sparsø F. V., Kiil S. Z., Jensen A. D., Xu X.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 27 (2006).
- Damstrup M. L., Kiil S. Z., Jensen A. D., Sparsø F. V., Xu X.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 7786 (2007).
- Kruger R. L., Valerio A., Balen M., Ninow J. L., Oliveira J. V., Oliveira D., Corazza M. L.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 921 (2010).
- Ferreira-Dias S., Correia A. C., Baptista F. O., da Fonseca M. M. R.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11, 699 (2001).
- Elfman-Börjesson I., Härröd M.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 701 (1999).
- Weber N., Mukherjee K. D.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 5347 (2004).
- Barrough N., Plombo G., Goli T., Baréa B., Pina M., Lago R., Villeneuve P.: *J. Food Lipids* 15, 13 (2008).
- Noureddini H., Harmeier S. E.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1359 (1998).
- Fregolente P. B. L., Fregolente L. V., Pinto G. M. F., Batistella B. C., Wolf-Maciel M. R., Filho R. M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 146, 165 (2008).
- Zhong N., Xu X., Cheong L., Bing L., Hu S., Zhao X.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 783 (2009).
- Wang W., Li T., Ning Z., Wang Y., Yang B., Yang X.: *Enzyme Microb. Technol.* 49, 192 (2011).
- Hetflejš J., Šabata S., Sýkora J., Kuncová G., Vlček T.: *Chem. Listy* 105, 684 (2011).
- Pawongrat R., Xu X., H-Kittikun A.: *Food Chem.* 104, 2512 (2007).
- Pawongrat R., Xu X., H-Kittikun A.: *J. Sci. Food Agric.* 88, 256 (2008).
- Kittikun A., Kaewthong W.: *Enzyme Microb. Technol.* 35, 218 (2004).
- Rendón X., López-Munguia P., Castillo E.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 1061 (2007).
- Kristensen J. B., Xu X., Mu H.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82, 329 (2005).
- Kristensen J. B., Xu X., Mu H.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 7059 (2005).
- Smallcombe S. H., Patt S. L., Keifer P. A.: *J. Magn. Reson., Ser. A* 117, 295 (1995).
- Xu X., v knize: *Enzymes in Lipid Modification* (U. Bornscheuer, ed.). Wiley-VCH, Weinheim 2000.
- Fureby A. M., Virto C., Adlecreutz P., Mattiasson B.: *Biocatal. Biotransform.* 14, 89 (1996).
- Laszlo J. A., Compton D. L., Vermillin K. E.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85, 307 (2008).

M. Drhová, S. Šabata, J. Sýkora, J. Hetflejš, J. Křišťál, and G. Kuncová (*Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **The Use of Fixed Bed Meander Microreactor in Enzymatic Glycerolysis Study**

Transesterification of soybean oil (O) with glycerol (G), catalysed by Novozym 435, was studied in *tert*-butyl alcohol as solvent. The effects of reaction temperature (40–50 °C), solvent concentration (20–35 vol.%),

G/O molar ratio (1:1 – 2:1), and residence time (min) on the oil phase composition (tri- (TAG), di- (DG) and monoacylglycerol) were evaluated. DAG formation was preferred at lower temperatures, lower G/S mole ratios, and at higher solvent concentrations. The data for G/S = 2:1 agreed well with those obtained in a continuous fixed-bed column reactor. Glycerolyses of olive, sunflower, rapeseed, and linseed oils are also reported. Higher reaction rates of continuous processes compared with batch glycerolysis were observed.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ Fakulta logistiky a krizového řízení

pořádá
vědeckou odbornou konferenci
k 100. výročí použití chemických zbraní
na téma

HISTORIE A SOUČASNOST CHEMICKÝCH ZBRANÍ



20. a 21. květen 2015
UHERSKÉ HRADIŠTĚ

další informace budou
k dispozici na webové stránce
fakulty
www.utb.cz/flkr