

大豆油脱臭馏出物酶法甲酯化工艺研究

甘欢华¹, 刘钟栋¹, 吴 凯², 李 华¹, 魏国华²

(1. 河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001; 2. 宜春大海龟生命科学有限公司, 江西 宜春 336000)

摘要: Eversa Transform 2.0 脂肪酶价格低、催化活性好, 具有微量高效的优点。以 Eversa Transform 2.0 脂肪酶为催化剂, 对大豆油脱臭馏出物进行酶法甲酯化工艺研究。通过单因素试验研究了醇酸摩尔比、酶用量、反应温度、反应时间对酯化率的影响, 并进行正交试验, 对酶法甲酯化工艺进行优化。在最佳工艺条件下, 通过放大试验对试验结果进行验证, 并采用薄层色谱法对甘油三酯的转化进行分析。结果表明: Eversa Transform 2.0 脂肪酶催化大豆油脱臭馏出物甲酯化反应的最佳工艺条件为醇酸摩尔比(甲醇与游离脂肪酸摩尔比)2:1、酶用量 0.3% (相对于大豆油脱臭馏出物的质量)、反应温度 35℃、反应时间 6 h, 在此条件下酯化率达到 95% 以上, 且甘油三酯基本反应完全。

关键词: 大豆油脱臭馏出物; 脂肪酶; 甲酯化; 酸价

中图分类号: TS229; TQ644

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2020)07-0078-05

Enzymatic methyl esterification of soybean oil deodorized distillate

GAN Huanhua¹, LIU Zhongdong¹, WU Kai², LI Hua¹, WEI Guohua²

(1. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. Yichun Big Turtle Life Science Co., Ltd., Yichun 336000, Jiangxi, China)

Abstract: The Eversa Transform 2.0 lipase is cheap and the catalytic activity is good, so it has the advantage of micro-high efficiency. The enzymatic methyl esterification process of soybean oil deodorized distillate was studied with Eversa Transform 2.0 lipase as catalyst. The effects of molar ratio of alcohol to acid, enzyme dosage, reaction temperature and reaction time on esterification rate were studied by single factor experiment. The orthogonal experiment was carried out to optimize the enzymatic methyl esterification process. Under the optimal process conditions, the test results were verified by amplification test, and the conversion of triglyceride was analyzed by thin layer chromatography. The results showed that the optimal conditions for the methyl esterification reaction of soybean oil deodorized distillate catalyzed by Eversa Transform 2.0 lipase were obtained as follows: molar ratio of methanol to free fatty acid 2:1, enzyme dosage 0.3% (relative to the mass of soybean oil deodorized distillate), reaction temperature 35℃, reaction time 6 h. Under these conditions, the esterification rate reached above 95%, and the triglyceride was almost completely reacted.

Key words: soybean oil deodorized distillate; lipase; methyl esterification; acid value

大豆油脱臭馏出物是油脂精炼脱臭环节产生的副产物, 主要由游离脂肪酸、生育酚、植物甾醇、角鲨烯、甘油酯及烃类等物质组成^[1-2]。随着人们生活水平的提高及油脂精炼技术的进步, 我国油脂行业

生产规模不断壮大, 油脂脱臭馏出物产量也在不断增加, 所以加强对油脂脱臭馏出物的综合利用研究变得尤为重要^[3-6]。

大豆油脱臭馏出物的综合利用主要是提取其中的生育酚、植物甾醇和角鲨烯^[7-9]。由于脱臭馏出物中含有大量的游离脂肪酸和部分甘油酯, 两者性质与生育酚相似, 不易分离, 需要进行甲酯化处理, 使游离脂肪酸或甘油酯与甲醇发生酯化反应或酯交

收稿日期: 2019-09-11; 修回日期: 2020-03-03

作者简介: 甘欢华(1995), 男, 在读硕士, 研究方向为油脂脱臭馏出物综合利用(E-mail) 1944261576@qq.com。

通信作者: 李 华, 讲师(E-mail) lixian78101@163.com。

换反应,这样既降低了脂肪酸和甘油酯的沸点,使生育酚更容易分离,又能降低体系黏度,通过降温将植物甾醇从酯化液中分离出来,可进一步提高生育酚的纯度^[10-13]。

目前,传统油脂脱臭馏出物甲酯化工艺一般采用浓硫酸、氢氧化钠、酶等作为催化剂,但均存在一定的缺点^[14]。如浓硫酸会对设备产生腐蚀,污水处理难度大,不利于环境保护;强碱催化剂在水存在的情况下容易与原料发生皂化反应,不利于生物活性成分的分离提取^[15-17];Novozyme 435、Lipozyme TL IM等脂肪酶作催化剂成本较高,无法实现工业化生产^[18]。

Eversa Transform 2.0 脂肪酶具有反应时间短、酶活高、价格低等优点,可以实现工业化生产。本研究以大豆油脱臭馏出物为原料,Eversa Transform 2.0 脂肪酶^[19]作为催化剂,以反应前后酸价的变化为考察指标,对甲酯化工艺进行研究,并采用薄层色谱法对甘油三酯的转化进行分析,以期为大豆油脱臭馏出物的酶法甲酯化工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆油脱臭馏出物(酸价(KOH)138.83 mg/g),中国储备粮管理集团有限公司;Eversa Transform 2.0 脂肪酶(产品特性见表1),诺维信中国技术有限公司;甘油三酯、V_E、甲酯、甲醇、乙醇、氢氧化钾等均为分析纯。

硅胶板;HX1001 电子天平;FA2004B 电子天平;GS12-2 型电子恒速搅拌器;R201D 型恒温水浴锅。

表1 Eversa Transform 2.0 脂肪酶产品特性

标称活力	颜色	物理状态	气味
100 LCLU-SL/g	琥珀色	液体	轻微的发酸气味

1.2 试验方法

1.2.1 大豆油脱臭馏出物酶法甲酯化反应

称取100 g大豆油脱臭馏出物于250 mL三口烧瓶中,水浴加热至反应温度,加入一定量的Eversa Transform 2.0 脂肪酶,加入一定量的甲醇,控制搅拌速率为200 r/min,反应一定时间。由于甲醇对Eversa Transform 2.0 脂肪酶有一定的破坏作用,所以甲醇需要缓慢滴加,防止过量的甲醇使酶产生中毒而降低反应效率。反应完全后,将酯化液静置分层,取上层清液测定酸价。

1.2.2 酸价的测定和酯化率的计算

按GB/T 5530—2005测定酸价。

酯化率 = (反应前样品的酸价 - 反应后样品的酸价) / 反应前样品的酸价 × 100%

1.2.3 薄层色谱法分析甘油三酯的转化^[20]

将样品(包括A.甘油三酯标样;B.甲酯标样;C. V_E标样;D.大豆油脱臭馏出物;E.添加10%甘油三酯的大豆油脱臭馏出物;F.以添加甘油三酯的大豆油脱臭馏出物为原料经酯化反应得到的样品)用正己烷溶解,配成120 mg/mL的溶液。展开剂正己烷-乙醚-乙酸(体积比85:15:1),硅胶板预处理后进行点样,在展开剂中展开,展开结束后,放入烘箱烘干,再放入充满碘蒸气的容器中显色,出现黄色斑点,计算R_f值进行定性。根据酯化前后斑点的大小变化,直观测定甘油三酯含量的变化。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 反应时间对大豆油脱臭馏出物酯化率的影响

在反应温度40℃、醇酸摩尔比(甲醇与游离脂肪酸摩尔比,下同)3:1、酶用量0.3%(相对于大豆油脱臭馏出物的质量,下同)条件下,分别考察反应时间2、4、6、8、10 h对酯化率的影响,结果如图1所示。

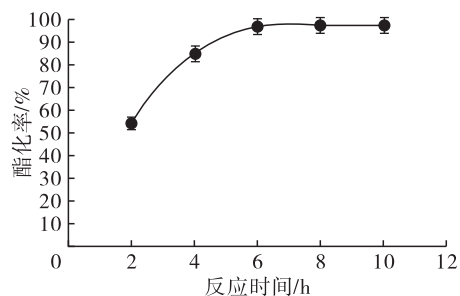


图1 反应时间对酯化率的影响

由图1可知:大豆油脱臭馏出物在Eversa Transform 2.0 脂肪酶的催化下,与甲醇反应生成脂肪酸甲酯,在前4 h反应较快;反应6 h时,酯化率基本达到最大值,之后反应趋于平衡状态。这是由于酯化反应是可逆反应,在反应前一段时间,反应物较多,反应向正反应方向进行,反应速率较快,随着反应体系中水量的增加,正反应方向受到抑制,反应速率下降,最终达到平衡状态。考虑到工业化能源的消耗,选取反应时间6 h为宜。

2.1.2 酶用量对大豆油脱臭馏出物酯化率的影响

在反应温度40℃、醇酸摩尔比3:1、反应时间6 h条件下,分别考察酶用量0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%对酯化率的影响,结果如图2所示。

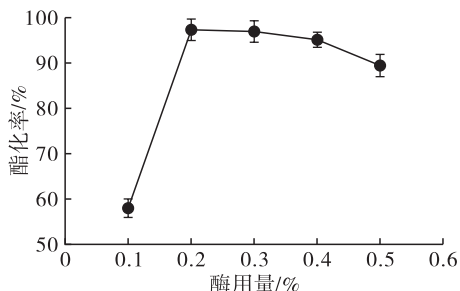


图2 酶用量对酯化率的影响

酶在反应中起催化作用,能加快反应速率,促进反应的进行,但不直接参与反应。由图2可知,随着酶用量增加,酯化率先升高后下降,在酶用量为0.2%时,酯化率达到最大值。酯化率下降是由于此反应为可逆反应,酶用量增加,正逆反应速率加快,反应体系中生成的水越多,反应向逆反应方向进行。所以,选取酶用量0.2%为宜。

2.1.3 反应温度对大豆油脱臭馏出物酯化率的影响

在醇酸摩尔比3:1、反应时间6 h、酶用量0.2%的条件下,分别考察反应温度30、35、40、45、50℃对酯化率的影响,结果如图3所示。

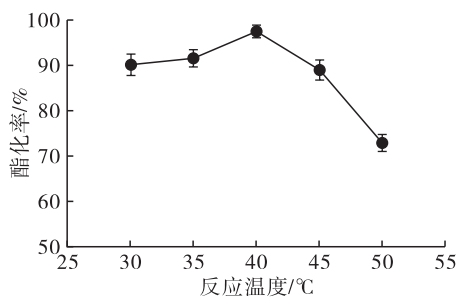


图3 反应温度对酯化率的影响

反应温度既能影响酶的催化活性,又能影响其稳定性。由图3可知,随着反应温度的升高,酯化率先升高后下降,在40℃时,酯化率达到最大值。温度升高,酶的催化活性增大,酯化率升高,超过40℃时,酯化率下降较快,可能是因为温度偏高,对酶产生了一定的破坏作用。所以,选取反应温度40℃为宜。

2.1.4 醇酸摩尔比对大豆油脱臭馏出物酯化率的影响

在反应时间6 h、酶用量0.2%、反应温度40℃的条件下,分别考察醇酸摩尔比1:1、2:1、3:1、4:1、5:1对酯化率的影响,结果如图4所示。

由图4可知,大豆油脱臭馏出物的酯化率随着醇酸摩尔比的增大先升高后快速下降,在醇酸摩尔比为3:1时,酯化率达到最大值。这是由于在 Eversa Transform 2.0 脂肪酶不会因甲醇中毒的前提下,甲醇浓度的升高使反应向正反应方向进行,大豆油脱臭馏出物的酯化率呈现上升的趋势;当甲醇浓度过

高时,甲醇会对 Eversa Transform 2.0 脂肪酶产生破坏作用,使其催化活性降低甚至失去活性,导致大豆油脱臭馏出物的酯化率快速下降。综合考虑,选取醇酸摩尔比3:1为宜。

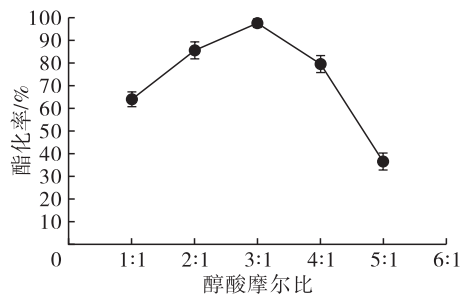


图4 醇酸摩尔比对酯化率的影响

2.2 正交试验

根据单因素试验结果可知,反应时间、酶用量、反应温度、醇酸摩尔比这4个因素都会对大豆油脱臭馏出物的酯化率产生一定的影响。为了优化反应条件,选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行正交试验,正交试验因素水平如表2所示,正交试验方案及结果如表3所示,方差分析如表4所示。

由表3和表4可知:酶用量和反应时间对酯化率有极显著性影响,反应温度对酯化率有显著性影响,醇酸摩尔比对酯化率影响不显著;各因素对酯化率影响的主次顺序为 $B > D > C > A$,最佳反应条件为 $A_1B_3C_1D_2$,即醇酸摩尔比2:1、酶用量0.3%、反应温度35℃、反应时间6 h。

表2 正交试验因素水平

水平	A 醇酸摩尔比	B 酶用量/%	C 反应温度/°C	D 反应时间/h
1	2:1	0.1	35	4
2	3:1	0.2	40	6
3	4:1	0.3	45	8

表3 正交试验方案及结果

试验号	A	B	C	D	酯化率/%
1	1	1	1	1	51.21
2	1	2	2	2	84.27
3	1	3	3	3	93.11
4	2	1	2	3	52.75
5	2	2	3	1	75.13
6	2	3	1	2	96.30
7	3	1	3	2	54.53
8	3	2	1	3	84.44
9	3	3	2	1	88.70
k_1	76.20	52.83	77.32	71.68	
k_2	74.73	81.28	75.24	78.37	
k_3	75.89	92.70	74.26	76.77	
R	1.47	39.87	3.06	6.69	

表4 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F	F 临界值	显著性
A	1.800	2	1.505	4.26	
B	1 264.718	2	1 057.275	4.26	**
C	7.330	2	6.128	4.26	*
D	36.587	2	30.586	4.26	**
误差	5.383	9			
总和	1 315.818	17			

2.3 验证试验

为了使试验结果更具说服力,本研究通过改变反应物的质量(相对于初始试验质量的4、8、12倍),进行放大试验,结果如图5所示。

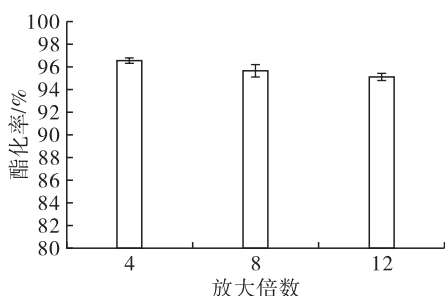
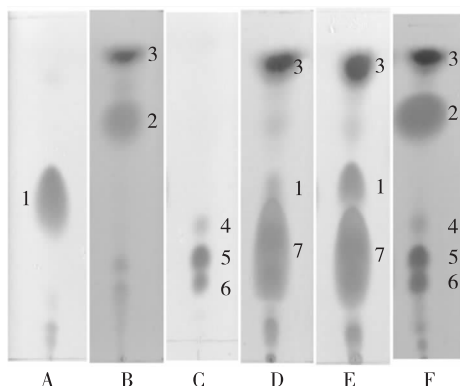


图5 最佳工艺条件下的放大试验结果

由图5可知,在原试验的基础上,进行重复放大试验(放大4、8、12倍),在最佳工艺条件下,大豆油脱臭馏出物的酯化率都能达到95%以上,说明本研究所得到的结果是真实可靠的。

2.4 甲酯化工艺中甘油三酯的转化

在最佳工艺条件下,通过薄层色谱法测定甲酯化反应前后大豆油脱臭馏出物中甘油三酯的含量变化,进一步考察 Eversa Transform 2.0 脂肪酶的催化性能,结果如图6所示。



注:A. 甘油三酯标样;B. 甲酯标样;C. V_E 标样;D. 大豆油脱臭馏出物;E. 添加10%甘油三酯的大豆油脱臭馏出物;F. 以添加甘油三酯的大豆油脱臭馏出物为原料经甲酯化反应后得到的样品;1. 甘油三酯;2. 甲酯;3. 脂肪烃类物质;4. α -生育酚;5. $(\beta + \gamma)$ -生育酚;6. δ -生育酚;7. 脂肪酸和 V_E 混合物。

图6 薄层色谱分析图

由图6可知,大豆油脱臭馏出物中主要含有脂肪烃类物质、脂肪酸和 V_E ,甘油三酯含量较少。为了更好地体现脂肪酶的催化性能,向脱臭馏出物中添加10%的甘油三酯标样,通过甲酯化反应后,样品F的色谱图中出现较大的甲酯斑点,说明酯化反应生成脂肪酸甲酯,甘油三酯的斑点基本消失,进而可以直观地认为甘油三酯反应完全,说明 Eversa Transform 2.0 脂肪酶具有催化甘油三酯发生酯交换反应的作用。

2.5 酶法甲酯化工艺工业化实践分析

针对该工艺实现工业化的问题,本文结合工厂实际做出以下分析:就目前而言,在工业化生产中,大豆油脱臭馏出物甲酯化工艺一般采用浓硫酸法,以酯化1t大豆油脱臭馏出物为例,需要30~40kg的浓硫酸作为催化剂,醇酸摩尔比为10:1,甲醇消耗量大,反应结束后的处理,会产生2t的污水,污水处理成本是240元,工艺安全隐患大,并且浓硫酸会腐蚀设备,缩短设备的使用寿命,进而提高生产成本;而酶法酯化,1t原料需要消耗3kg Eversa Transform 2.0 脂肪酶,催化剂成本是360元,醇酸摩尔比为2:1,甲醇消耗量小,也不会产生污水。两种工艺生产成本相差不大,在一定的条件下,工厂完全可以承受酶法酯化的生产成本。所以,该工艺具有一定工业化实践价值。

3 结论

本试验以大豆油脱臭馏出物为原料,以 Eversa Transform 2.0 脂肪酶为催化剂,进行酶法甲酯化工艺研究,通过单因素试验和正交试验,得出最佳工艺条件为醇酸摩尔比(甲醇与游离脂肪酸摩尔比)2:1、酶用量0.3%(相对于大豆油脱臭馏出物的质量)、反应温度35℃、反应时间6h;在最佳工艺条件的基础上,进行重复放大试验,酯化率达到95%以上,且甘油三酯基本转化完全,说明该试验方案真实可行。本工艺具有效率高、时间短、酶成本低等特点,在工业化生产上,不产生污水,对环境保护起到促进作用,是一种可持续发展的工艺。

参考文献:

- [1] 吴海艳. 棉籽油脱臭馏出物中提取维生素E和植物甾醇[D]. 天津:天津大学,2010.
- [2] 琚裕杰. 大豆油脱臭馏出物中生物活性成分综合提取工艺研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2015.
- [3] 郭文波,田童童,童军茂,等. 新疆棉籽油脱臭馏出物酶法甲酯化工艺研究[J]. 中国酿造,2015,34(2): 109-113.

(下转第92页)

- oil as an edible oil: a review of the published literature [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(1): 9–21.
- [2] WATANABE T, SUGIURA M, SATO M, et al. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor [J]. *Process Biochem*, 2005, 40: 637–643.
- [3] FLICKINGER B D, MATSUO N. Nutritional characteristics of DAG oil [J]. *Lipids*, 2003, 38(2): 129–132.
- [4] MIKLOS R, ZHANG H, LAMETSCH R, et al. Physicochemical properties of lard-based diacylglycerols in blends with lard [J]. *Food Chem*, 2013, 138(1): 608–614.
- [5] MENG X, ZOU D, SHI Z, et al. Dietary diacylglycerol prevents high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and abdominal adipose tissue [J]. *Lipids*, 2004, 39(1): 37–41.
- [6] YANAI H, YOSHIDA H, TOMONO Y, et al. Effects of diacylglycerol on glucose, lipid metabolism, and plasma serotonin levels in lean Japanese [J]. *Obesity*, 2012, 16(1): 47–51.
- [7] TANG T K, BEH B K, ALITHEEN N B M, et al. Suppression of visceral adipose tissue by palm kernel and soy-canola diacylglycerol in C57BL/6N mice [J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2013, 115(11): 1266–1273.
- [8] RUBY M A, MASSART J, HUNERDOSSE D M, et al. Human carboxylesterase 2 reverses obesity-induced diacylglycerol accumulation and glucose intolerance [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(3): 636–646.
- [9] 祝雨筱. 1,2-甘油二酯的酶法合成 [D]. 江苏无锡: 江南大学, 2017.
- [10] EOM T K, KONG C S, BYUN H G, et al. Lipase catalytic synthesis of diacylglycerol from tuna oil and its anti-obesity effect in C57BL/6J mice [J]. *Process Biochem*, 2010, 45(5): 738–743.
- [11] LO S K, TAN C P, LONG K, et al. Diacylglycerol oil—properties, processes and products: a review [J]. *Food Bioprocess Tech*, 2008, 1(3): 223–233.
- [12] KATSURAGI Y, YASUKAWA T, MATSUO N, et al. Diacylglycerol oil [M]. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- [13] 贺可琳, 王宝维, 葛文华, 等. 鸭油甘油二酯对脱脂奶粉的稳定性研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2016(8): 153–161.
- [14] ABEDI E, SAHARI M A. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties [J]. *Food Sci Nutr*, 2014, 2(5): 443–463.
- [15] MORI T A. *Omega-3 fatty acids and hypertension in humans* [J]. *Clin Exp Pharmacol Phys*, 2010, 33(9): 842–846.
- [16] 金青哲. 功能性脂质 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013.
- [17] 王志耕, 洪莹, 梅林, 等. 1,3-甘油二酯猪脂的制备方法: CN201510391380.0 [P]. 2015-07-07.
- [18] 曾瑞琪, 张明政, 张甫生, 等. 高酯果胶对酸化大豆蛋白凝胶流变及质构特性的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(1): 113–120.
- [19] 胡圣飞, 李慧, 胡伟, 等. 触变性研究进展及应用综述 [J]. *湖北工业大学学报*, 2012, 27(2): 57–60.
- (上接第 81 页)
- [4] 张馨钰. 棉籽油脱臭馏出物中植物甾醇的转化提取研究 [D]. 天津: 天津大学, 2016.
- [5] 叶虔臻. 山茶油脱臭馏出物中角鲨烯分离纯化及对细胞糖代谢作用初探 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [6] 代志凯, 李祥清, 马金萍, 等. 大豆油脱臭馏出物中同时提取角鲨烯、生育酚和植物甾醇的工艺研究 [J]. *粮油食品科技*, 2018, 26(2): 21–24.
- [7] 陈璐. 大豆脱臭馏出物中角鲨烯的提取研究 [D]. 江苏无锡: 江南大学, 2015.
- [8] 张莉华, 许新德, 邵斌, 等. 油脂加工副产物——脱臭馏出物的综合利用 [J]. *中国食品添加剂*, 2015(1): 157–164.
- [9] 陈璐, 曹栋, 丁敏, 等. 大豆油脱臭馏出物中角鲨烯提取工艺研究 [J]. *中国油脂*, 2014, 39(9): 67–70.
- [10] 林文, 丁朝中, 陈乐清, 等. 大豆油脱臭馏出物甲酯化工艺研究 [J]. *化工时刊*, 2013, 27(8): 1–4.
- [11] 朱振南. 菜籽油脱臭馏出物的维生素 E 和甾醇提取及共轭亚油酸甾醇酯的制备 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [12] 林利忠, 林亲录, 梁盈. 植物油脱臭馏出物中生物活性成分提取方法研究进展 [J]. *食品与机械*, 2012, 28(6): 256–259, 271.
- [13] YAN F, YANG H J, LI J X, et al. Optimization of phytosterols recovery from soybean oil deodorizer distillate [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2012, 89(7): 1363–1370.
- [14] 唐年初. 豆油脱臭馏出物酶法甲酯化纯化 V_E 的研究 [D]. 江苏无锡: 江南大学, 2008.
- [15] 马磊, 杨天奎, 夏萍, 等. 固体酸催化大豆油脱臭馏出物甲酯化工艺研究 [J]. *中国油脂*, 2015, 40(3): 66–69.
- [16] 周文武. 大豆油脱臭馏出物中天然 V_E 提纯的酶法预处理 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.
- [17] TORRES C F, TORRELO G, SEORANS F J, et al. A two steps enzymatic procedure to obtain sterol esters, tocopherols and fatty acid ethyl esters from soybean oil deodorizer distillate [J]. *Process Biochem*, 2007, 42(9): 1335–1341.
- [18] 谷克仁, 王秀华. 脱臭馏出物提取 V_E 的酶预处理 [J]. *中国油脂*, 2006, 31(2): 41–43.
- [19] FRAGA F C, VALÉRIO A, DE OLIVEIRA V A, et al. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: enzymatic activity and structural conformation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 122: 653–658.
- [20] 张翼, 郭永红, 胡志雄, 等. 生育酚的薄层色谱快速定性分析 [J]. *粮食与食品工业*, 2017, 24(5): 9–12.