

偏甘油酯脂肪酶 Lipase G50 的固定化及其 催化高酸值米糠油乙酯化脱酸的研究

陈东升¹, 刘建¹, 刘宁², 李道明²

(1. 中粮工科(西安)国际工程有限公司, 西安 710082; 2. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 西安 710021)

摘要:研究了偏甘油酯脂肪酶 Lipase G50 的固定化及其催化高酸值米糠油乙酯化脱酸效果。结果表明:相比于其他4种树脂, ECR8285 树脂对 Lipase G50 的固定化效果最好, 在载酶量为 40 mg/g 时, 制备得到的固定化 Lipase G50 的酯化活力为 518.66 U/g, 比活力为 15.65 U/mg;最佳的固定化 Lipase G50 催化脱酸工艺条件为无水乙醇与高酸值米糠油中游离脂肪酸物质的量比 2:1、酶加量 40 U/g、反应温度 40 °C、反应时间 6 h, 在最佳条件下高酸值米糠油的酸值(KOH)由 62.14 mg/g 降至 0.12 mg/g;与此同时, 固定化 Lipase G50 在高酸值米糠油脱酸中展现出优异的操作稳定性, 连续使用 10 个批次, 酯化活力为 509.22 U/g, 与初始固定化酶相比, 酯化活力没有显著降低。脱酸米糠油经分子蒸馏后, 其酸值(KOH)为 0.19 mg/g, 过氧化值为 2.16 mmol/kg, 达到了 GB/T 19112—2003 一级米糠油标准。因此, 固定化 Lipase G50 在油脂脱酸领域具有广阔的应用前景。

关键词:偏甘油酯脂肪酶; Lipase G50; 固定化; 高酸值米糠油; 酶法脱酸

中图分类号: Q814.2; TS224.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)07-0015-07

Immobilization of partial glyceride lipase Lipase G50 and its application in deacidification of high acid value rice bran oil

CHEN Dongsheng¹, LIU Jian¹, LIU Ning², LI Daoming²

(1. COFCO ET (Xi'an) International Engineering Co., Ltd., Xi'an 710082, China; 2. College of Food and Biology Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: The immobilization of partial glyceride lipase Lipase G50 and its catalytic deacidification of high acid value rice bran oil were studied. The results showed that compared with the other four resins, resin ECR8285 had the best immobilization effect on Lipase G50. When the enzyme loading amount was 40 mg/g, the esterification activity and the specific activity of immobilized Lipase G50 were 518.66 U/g and 15.65 U/mg, respectively. The optimal deacidification conditions catalyzed by immobilized Lipase G50 were obtained as follows: molar ratio of ethanol to free fatty acid in high acid value rice bran oil 2:1, enzyme dosage 40 U/g, reaction temperature 40 °C and reaction time 6 h. Under the optimal conditions, the acid value of high acid value rice bran oil decreased from 62.14 mgKOH/g to 0.12 mgKOH/g. At the same time, immobilized Lipase G50 showed excellent operational stability in the deacidification of high acid value rice bran oil, with esterification activity of 509.22 U/g after 10 batches of continuous use. The deacidified rice bran oil was purified by molecular distillation, and its acid value and peroxide value were 0.19 mgKOH/g and 2.16 mmol/kg,

respectively, which reached the standard of first-grade rice bran oil in GB/T 19112-2003. So immobilized Lipase G50 has a promising future in the field of oil deacidification.

Key words: partial glyceride lipase; Lipase G50; immobilization; high acid value rice bran oil; enzymatic deacidification

收稿日期: 2021-05-19; 修回日期: 2022-02-23

基金项目: 国家自然科学基金(32001640); 陕西省自然科学研究计划一般项目(面上)(2019JM-333)

作者简介: 陈东升(1990), 男, 工程师, 研究方向为油脂工程 (E-mail) 821432790@qq.com。

通信作者: 李道明, 副教授, 博士 (E-mail) dml@ sust.edu.cn。

偏甘油酯脂肪酶,与传统甘油三酯脂肪酶相比,其仅能作用于甘油单酯和甘油二酯,而不能作用于甘油三酯。偏甘油酯脂肪酶独特的甘油酯底物特异性使其近十年来在油脂改性领域引起了广泛关注。常用的偏甘油酯脂肪酶主要有 PCL (来源于 *Penicillium camembertii*)、SMG1 (来源于 *Malassezia globosa*)、MgMDL2 (来源于 *Malassezia globosa*)、AOL (来源于 *Aspergillus oryzae*) 和 PcMDL (来源于 *Penicillium cyclopium*)^[1]。与其他 4 种偏甘油酯脂肪酶相比,PCL 的最适反应温度最高(40℃),应用范围最广^[1-2],而且其是 5 种常用偏甘油酯脂肪酶中唯一一种商品化脂肪酶(商品化名 Lipase G50)。近年来 Lipase G50 被广泛应用于催化制备或去除偏甘油酯(甘油单酯、甘油二酯或甘油单酯与甘油二酯混合物)^[3-11]和催化植物油环氧化^[12]等。如:Freitas 等^[7]将固定化 Lipase G50 (固定于环氧 SiO₂-PVA 上)应用于催化甘油与脂肪酸酯化制备甘油单酯,发现 Lipase G50 对肉豆蔻酸和棕榈酸具有较高的特异性,反应产物主要为 1-单甘酯,且最终的反应混合物达到了世界卫生组织确定的用作食品乳化剂的要求;徐扬等^[9]将 Lipase G50 应用于催化甘油与脂肪酸酯化制备甘油二酯,在优化的反应条件下,甘油二酯含量达 44.7%;郑平玉^[10]采用 Lipase G50 催化甘油与油茶籽油脂肪酸酯化制备甘油二酯,在优化的反应条件下,产物中甘油二酯含量为 49.9%;徐扬等^[11]将固定化 Lipase G50 应用于催化甘油与脂肪酸酯化制备甘油二酯,固定化 Lipase G50 连续使用 5 个批次后,仍能保持其最初活力的 86.1%。Padhi 等^[8]采用 Lipase G50 催化转酯化去除脂肪酸甲酯中的甘油单酯,可将饱和脂肪酸甘油单酯含量由 2% 降低至 0.14%。除了制备和去除偏甘油酯外,Zhou 等^[12]研究在低共溶溶剂中采用 Lipase G50 催化环氧化制备环氧植物油,结果发现,在低共溶溶剂中,Lipase G50 使环氧植物油的生产变得高效。而目前关于 Lipase G50 在其他油脂改性领域的应用报道较少。

高酸值米糠油通常是指酸值(KOH)大于 20 mg/g 的米糠油。目前常用的脱酸方法主要有化学碱炼脱酸和物理蒸馏脱酸,前者存在中性油和脂类伴随物损失大及产生工业废水等问题^[13],后者存在能耗大及产生脂类风险因子(缩水甘油酯、氯丙醇酯和反式脂肪酸等)的风险^[14-15]。相比于化学碱炼脱酸和物理蒸馏脱酸,采用脂肪酶催化脱除米糠油中的游离脂肪酸具有反应条件温和、中性油和脂类伴随物保留率高及安全环保等优点,近年来成为油脂脱

酸领域的研究热点。目前,应用于油脂脱酸的甘油三酯脂肪酶主要为 Novozym 435、Lipozyme 435、Lipozyme RM IM 及 Lipozyme TL IM 等^[16-20],应用于油脂脱酸的偏甘油酯脂肪酶主要为 SMG1 - F278N^[21-22],但关于 Lipase G50 应用于油脂脱酸的研究还未见报道。

本文研究了 Lipase G50 在高酸值米糠油脱酸中的应用潜力。考虑到游离酶存在稳定性差、回收难等问题,先将 Lipase G50 进行固定化,对固定化的载体和载酶量进行了优化;随后,将固定化 Lipase G50 应用于高酸值米糠油脱酸,对反应条件进行了优化,并评估了固定化 Lipase G50 的操作稳定性;最后,对脱酸米糠油进行了纯化,并对纯化产物的甘油酯组成进行了测定,以期为固定化 Lipase G50 在高酸值米糠油脱酸中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Lipase G50 (*Penicillium camembertii* 游离酶,酶活力 50 000 U/g),日本天野酶制剂集团;高酸值米糠油,已脱胶处理,酸值(KOH)为 62.14 mg/g,过氧化值为 5.58 mmol/kg,实验室制备;三油酸甘油酯(纯度 >99%)、二油酸甘油酯(纯度 >99%)、单油酸甘油酯(纯度 >99%),上海 Sigma - Aldrich 有限公司;脂肪酸乙酯混标 21 组分(C14 ~ C24),美国 Nu - Chek 公司;牛血清蛋白,上海吉至生化科技有限公司;无水乙醇,分析纯;正己烷、异丙醇、甲酸,色谱纯;ECR1030 树脂、ECR8285 树脂,漂莱特(中国)有限公司;DA - 201 树脂、AB - 8 树脂、D380 树脂,南开大学化工厂。

DF - 101S 集热式恒温加热磁力搅拌器;Agilent 7890A 气相色谱仪(配备氢离子化火焰检测器),安捷伦科技有限公司;MD - S80 短程分子蒸馏,广州汉维科技有限公司;H1650 - W 小型离心机;Waters 2695 高效液相色谱仪(配备 Waters 2414 示差检测器),美国 Waters 公司;IR - 35 近红外水分测定仪;DHG - 9070A 电热恒温鼓风干燥箱。

1.2 实验方法

1.2.1 树脂预处理

树脂 ECR1030 和 ECR8285 无需处理(厂家已处理好)。DA - 201、AB - 8、D380 3 种树脂采用 95% 乙醇浸泡赶出树脂中的气泡,再分别采用 5% HCl 和 2% NaOH 浸泡去除树脂孔隙中残留的分子单体,每次处理完成后采用去离子水冲洗树脂,直至冲洗流出液 pH 为中性为止;最后采用 20 mmol/L

pH 5.6 的磷酸盐缓冲液浸泡树脂,定期更换缓冲液,直至缓冲液 pH 不再变化为止。预处理完成后的树脂沥干后放于 4℃ 冰箱储存备用。

1.2.2 Lipase G50 的固定化

准确称取 2 g 预处理后的湿树脂于 500 mL 具塞锥形瓶中,加入 58.84 mL Lipase G50 溶液(Lipase G50 酶粉溶于 20 mmol/L pH 5.6 的磷酸盐缓冲液,蛋白质质量浓度为 1.02 mg/mL),使酶与湿树脂的比例(载酶量)为 30 mg/g,随后加入 58.84 mL 20 mmol/L pH 5.6 的磷酸盐缓冲液(ECR8285 树脂实验时加入 1.5 mol/L pH 5.6 的磷酸盐缓冲液),随后将具塞锥形瓶置于 30℃ 恒温气浴摇床中以 120 r/min 转速振荡 8 h。振荡结束后,过滤,分别收集固定化酶和滤液,收集得到的滤液测定蛋白质质量浓度,收集得到的固定化酶用相同的缓冲液冲洗至流出液测不出蛋白质为止,于真空干燥箱 40℃ 下干燥 8 h,得到固定化 Lipase G50。

1.2.3 蛋白吸附量的测定

采用 Bradford 法测定固定化前后酶溶液的蛋白质质量浓度。每组数据平行测定 3 次。

固定化酶蛋白吸附量(A)按式(1)进行计算。

$$A = \frac{m_1 - m_2}{[m - (m_1 - m_2)] / 1\ 000} \quad (1)$$

式中: m_1 为固定化前 Lipase G50 酶溶液中的蛋白质质量,mg; m_2 为固定化后收集得到的滤液中的蛋白质质量,mg; m 为干燥后固定化酶的质量,g。

1.2.4 固定化 Lipase G50 酯化活力的测定

固定化 Lipase G50 酯化活力的测定参照诺维信标准分析方法进行。于 25 mL 具塞三角瓶中加入 0.46 g 正丙醇、1.54 g 月桂酸,随后加入 6 mL 正庚烷,待月桂酸溶解后加入底物总质量 3% 的蒸馏水,随后在 40℃ 恒温振荡器中预热 5 min,再加入 50 mg 固定化 Lipase G50,酯化反应 10 min 后,立即取样 20 μ L 于 980 μ L 正庚烷中,待气相色谱分析。每组实验重复 3 次。

GC 条件:OV351 色谱柱(60 m \times 0.32 mm \times 0.10 μ m);分流比 40:1;进样量 1 μ L;柱前压 0.137 9 MPa;进样口温度 250℃;FID 检测器温度 280℃;空气流量 450 mL/min,氢气流量 40 mL/min,载气(氮气)流量 25 mL/min;升温程序为 140℃ 保持 2 min,随后以 5℃/min 升至 210℃,保持 15 min。采用面积归一化法进行定量。

固定化 Lipase G50 酯化活力(E_1)按式(2)进行计算。

$$E_1 = I \times E \times \frac{1\ 000\ 000}{t \times m} \quad (2)$$

$$E = n_1 / (n_1 + n_2) \quad (3)$$

式中: I 为月桂酸初始物质的量,mol; E 为月桂酸酯化率; m 为固定化酶质量,g; t 为反应时间,min; n_1 、 n_2 分别为酯化产物中丙基月桂酸酯和月桂酸的量,mol。

固定化脂肪酶比活力(E_2)按式(4)进行计算。

$$E_2 = E_1 / C \quad (4)$$

式中: C 为固定化酶中的蛋白质含量(固定化 Lipase G50 的蛋白吸附量),mg/g。

1.2.5 固定化 Lipase G50 水分含量的测定

采用 IR-35 近红外水分测定仪对固定化 Lipase G50 的水分含量进行测定。测定前,先将仪器预热 15 min,随后称取 250 mg 固定化 Lipase G50 置于托盘上,盖上盖子于 110℃ 下测定至读数稳定,记录固定化 Lipase G50 水分含量。

1.2.6 固定化 Lipase G50 催化高酸值米糠油脱酸

于 2.0 L 反应瓶中加入 100 g 高酸值米糠油,随后加入 400 mL 正己烷和 1/3 所需无水乙醇,在 250 r/min 的转速下混合均匀后,加入一定量固定化 Lipase G50,开始计时,保持转速 250 r/min,在一定温度下进行反应。剩余 2/3 无水乙醇分别在反应 3 h 和 5 h 时等量加入,反应 6 h 后取样 100 μ L,置于 4℃ 冰箱,待 HPLC 分析其组成。

1.2.7 固定化 Lipase G50 的操作稳定性评估

在优化的反应条件下对固定化 Lipase G50 的操作稳定性进行评估,每个反应批次结束后,过滤回收固定化 Lipase G50,采用 10 mL 正己烷冲洗 3 次后,用于下一批次的反应。每次反应结束后通过测定脱酸米糠油的酸值来评价固定化 Lipase G50 的操作稳定性。

1.2.8 HPLC 分析脱酸米糠油的甘油酯组成

将样品溶于 1 mL 流动相中,加入 0.5 g 无水硫酸钠除水,于 10 000 r/min 离心 2 min,取 800 μ L 上清液,进行 HPLC 分析。

HPLC 条件:示差折光检测器(RID);EXL-127-2546U 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm);流动相为正己烷-异丙醇-甲酸(体积比 18:1:0.003),流速 1 mL/min;柱温箱温度 30℃;进样量 10 μ L。

各组分采用标准品定性,外标法定量。

1.2.9 放大实验与脱酸产物分离纯化

在优化的反应条件下进行放大实验。以 2 kg 高酸值米糠油为原料,脱酸反应结束后过滤回收固定化酶,旋转蒸发回收正己烷。

本研究采用乙醇作酰基受体,将各米糠油中的游离脂肪酸转化为脂肪酸乙酯,由于脂肪酸乙酯具有较低沸点,可通过分子蒸馏去除。因此,采用短程分子蒸馏对产物进行分离纯化。分子蒸馏条件:进料温度 60 ℃,进料流量 1.5 g/min,压力 1.38 Pa,蒸发面温度 120 ℃,刮膜速度 280 r/min,冷凝水温度 35 ℃。

1.2.10 米糠油酸值、过氧化值的测定

米糠油酸值的测定参照 GB 5009.229—2016,过氧化值的测定参照 GB 5009.227—2016。

2 结果与讨论

2.1 Lipase G50 的固定化

2.1.1 固定化载体的筛选

固定化过程中酶与载体的结合方式、结合牢固程度、酶的结合导向及载酶量等都直接影响固

定化酶的活力和稳定性^[23]。按 1.2.2 方法采用 5 种树脂对 Lipase G50 进行固定化,测定固定化酶的蛋白吸附量、酯化活力、比活力,考察不同树脂对 Lipase G50 固定化的影响,结果如表 1 所示。由表 1 可知,与其他 4 种树脂相比,ECR8285 树脂对 Lipase G50 进行固定化得到的固定化酶具有最高的蛋白吸附量、酯化活力和比活力,表明 ECR8285 更适宜于 Lipase G50 的固定化。采用其他 4 种树脂对 Lipase G50 进行固定化属于物理吸附法,而采用 ECR8285 对 Lipase G50 固定化属于化学结合法,相比于其他几种载体,ECR8285 对 Lipase G50 进行固定化的过程中,Lipase G50 与 ECR8285 的结合位点及 Lipase G50 固定化后的位置导向更有利于固定化 Lipase G50 活力的展现。因此,本研究选择 ECR8285 树脂对 Lipase G50 进行固定化。

表 1 不同树脂对 Lipase G50 固定化的影响

树脂	树脂类型	蛋白吸附量/(mg/g)	酯化活力/(U/g)	比活力/(U/mg)
ECR1030	甲基丙烯酸酯型大孔吸附树脂	23.69 ± 0.43	244.69 ± 3.45	10.33 ± 0.27
ECR8285	环氧丙烯酸酯树脂	26.12 ± 0.44	443.23 ± 6.43	16.97 ± 0.35
DA-201	苯乙烯型极性大孔吸附树脂	18.12 ± 0.16	168.45 ± 2.01	9.30 ± 0.24
AB-8	苯乙烯型非极性大孔吸附树脂	19.05 ± 0.23	233.13 ± 3.01	12.24 ± 0.31
D380	大孔弱碱性阴离子交换树脂	7.01 ± 0.14	61.03 ± 0.92	8.71 ± 0.25

2.1.2 载酶量对 Lipase G50 固定化的影响

脂肪酶固定化过程中载酶量不仅影响固定化酶的活力、比活力,而且直接影响反应的经济性^[24]。按 1.2.2 方法,采用 ECR8285 树脂对 Lipase G50 进行固定化,改变 Lipase G50 溶液的蛋白质质量浓度,得到不同载酶量的固定化酶,测定固定化酶的蛋白吸附量、酯化活力和比活力,考察载酶量对 Lipase G50 固定化的影响,结果如图 1 所示。

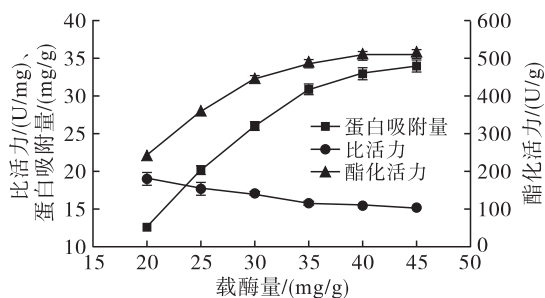


图 1 载酶量对 Lipase G50 固定化的影响

由图 1 可以看出:蛋白吸附量随着载酶量的增加而增加,当载酶量达到 40 mg/g 时,蛋白吸附量达到平衡,表明 ECR8285 对 Lipase G50 的结合达到饱和;固定化 Lipase G50 的酯化活力随着载酶量的增

加而增加,当载酶量达到 35 mg/g 时,增加幅度放缓,这可能是由于随着 ECR8285 上 Lipase G50 结合量的增加,酶分子彼此之间相互影响,从而影响了固定化酶酯化活力的增加;固定化 Lipase G50 的比活力随着载酶量的增加而降低,可能是由于随着蛋白吸附量的增加,酶分子之间相互影响,增加了酶分子与底物分子结合的空间位阻,从而引起固定化酶比活力的下降。综合考虑,选择载酶量为 40 mg/g 制备固定化 Lipase G50。

在上述优化条件下,对 Lipase G50 的固定化实验放大 50 倍,得到的固定化酶蛋白吸附量为 33.14 mg/g,酯化活力为 518.66 U/g,比活力为 15.65 U/mg,水分含量为 1.98%。

2.2 固定化 Lipase G50 催化高酸值米糠油脱酸的单因素实验

2.2.1 无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比对脱酸的影响

在反应温度 35 ℃、酶加量 30 U/g(基于高酸值米糠油的质量,下同)、反应时间 6 h 条件下,研究无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比对固定化 Lipase G50 催化高酸值米糠油脱酸的影响,结果如图 2 所示。

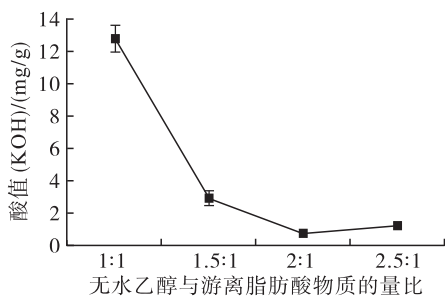


图2 无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比对脱酸的影响

由图2可以看出,当无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比为1:1时,脱酸米糠油的酸值(KOH)最高,达12.74 mg/g。这主要是由于高酸值米糠油中除了含大量的游离脂肪酸(30.68%)外,还含有一定的偏甘油酯(0.25%甘油单酯和9.22%甘油二酯),当采用固定化Lipase G50作催化剂、无水乙醇作酰基受体催化高酸值米糠油脱酸时,无水乙醇除了与游离脂肪酸发生酯化反应外还会与偏甘油酯发生醇解反应,所以当无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比为1:1进行脱酸时,无水乙醇的添加量远不能满足脱酸反应的需要,所以脱酸后米糠油的酸值仍然较高。当无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比为1.5:1时,脱酸米糠油的酸值(KOH)降至2.87 mg/g;进一步增加无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比至2:1时,脱酸米糠油的酸值(KOH)降至0.66 mg/g,然而当无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比增加至2.5:1时,脱酸后米糠油的酸值(KOH)为1.21 mg/g,与2:1时相比略有升高,这可能是由于过高的无水乙醇添加量,影响了固定化Lipase G50的酯化活力,从而降低了固定化Lipase G50的脱酸效果。因此,选择无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比为2:1。

2.2.2 酶加量对脱酸的影响

在无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比2:1、反应温度35℃、反应时间6 h条件下,研究酶加量对固定化Lipase G50催化高酸值米糠油脱酸的影响,结果如图3所示。

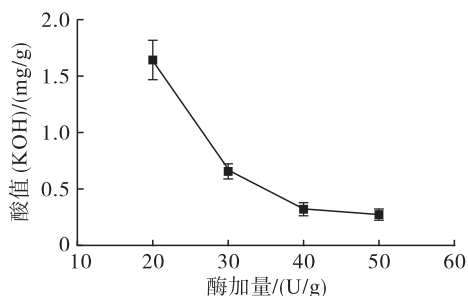


图3 酶加量对脱酸的影响

由图3可知,随着酶加量的增加脱酸效果逐渐变好。当酶加量为40 U/g时,脱酸米糠油的酸值

(KOH)降至0.31 mg/g,尽管酶加量为50 U/g时,脱酸米糠油的酸值(KOH)降至0.27 mg/g,但与酶加量40 U/g相比没有显著差异($p > 0.05$),这可能是由于当酶加量为40 U/g时,酶与底物已基本达到饱和,进一步增加酶加量并不会显著增强脱酸效果。出于经济性的考虑,选择酶加量为40 U/g。

2.2.3 反应温度对脱酸的影响

在无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比2:1、酶加量40 U/g、反应时间6 h条件下,研究反应温度对固定化Lipase G50催化高酸值米糠油脱酸的影响,结果如图4所示。

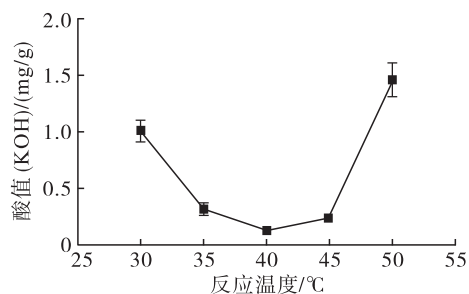


图4 反应温度对脱酸的影响

由图4可知,随反应温度升高,脱酸米糠油的酸值先降低后升高。固定化Lipase G50在反应温度40℃时具有最优的脱酸效果,脱酸米糠油的酸值(KOH)降至0.12 mg/g。反应温度超过40℃后,脱酸米糠油的酸值增加,这可能是由于一方面高温影响了固定化Lipase G50的反应活力(因为游离Lipase G50的最适反应温度为37℃),另一方面,高温加速了反应底物乙醇的挥发,从而使脱酸效果降低。因此,选择反应温度为40℃。

综上,确定固定化Lipase G50催化高酸值米糠油脱酸的最佳反应条件为:无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比2:1,酶加量40 U/g,反应温度40℃,反应时间6 h。

2.3 固定化Lipase G50的操作稳定性

在上述优化的反应条件下,以每个批次结束后脱酸米糠油的酸值为指标,研究固定化Lipase G50的操作稳定性,结果如图5所示。

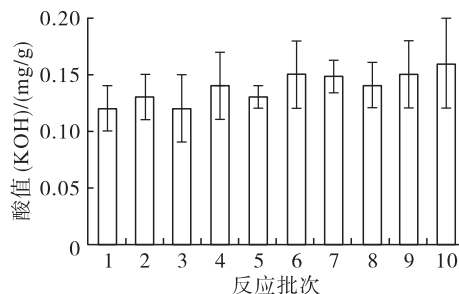


图5 固定化Lipase G50的操作稳定性

由图 5 可知,固定化 Lipase G50 连续使用 10 个批次后,脱酸效果与第一个批次相比没有显著差异 ($p > 0.05$)。进一步对 10 个批次结束后回收得到的固定化 Lipase G50 的酯化活力进行分析发现,固定化 Lipase G50 的酯化活力为 509.22 U/g,与初始制备得到的固定化 Lipase G50 的酯化活力(518.66 U/g)相比没有显著差异,表明固定化 Lipase G50 在催化高酸值米糠油脱酸过程中具有优异的操作稳定性。

2.4 放大实验与产物分离纯化

2 kg 高酸值米糠油经酶法脱酸放大实验、分子蒸馏,得到 1.16 kg 脱酸米糠油和 0.83 kg 脂肪酸乙酯,米糠油精炼得率为 58%。高酸值米糠油、脱酸米糠油及分子蒸馏纯化产物的甘油酯组成如表 2 所示。

表 2 高酸值米糠油、脱酸米糠油及分子蒸馏纯化产物的甘油酯组成 %

甘油酯	高酸值米糠油	脱酸米糠油	分子蒸馏纯化产物
甘油三酯	59.85 ± 1.23	58.39 ± 1.18	97.58 ± 1.01
游离脂肪酸	30.68 ± 0.54	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01
甘油二酯	9.22 ± 0.21	1.39 ± 0.12	2.32 ± 0.26
甘油单酯	0.25 ± 0.02	0	0
脂肪酸乙酯	0	40.16 ± 0.83	0

由表 2 可知,脱酸米糠油的游离脂肪酸含量降至 0.06% (酸值(KOH)为 0.12 mg/g),分子蒸馏纯化产物中游离脂肪酸含量为 0.10%,甘油三酯含量为 97.58%。高酸值米糠油经脱酸、分子蒸馏纯化后,酸值(KOH)由 62.14 mg/g 降至 0.19 mg/g,过氧化值由 5.58 mmol/kg 降至 2.16 mmol/kg,酸值和过氧化值均达到了 GB/T 19112—2003 一级米糠油标准。结果表明固定化 Lipase G50 是催化高酸值米糠油脱酸的有效催化剂,在油脂脱酸领域具有较好的应用前景。

3 结论

本文探究了固定化 Lipase G50 在高酸值米糠油脱酸中的应用潜力。首先筛选了适宜的固定化载体,发现环氧树脂 ECR8285 对 Lipase G50 的固定化效果最好,在载酶量为 40 mg/g 时,制备的固定化 Lipase G50 的酯化活力达到 518.66 U/g。将制备的固定化 Lipase G50 应用于高酸值米糠油脱酸,最佳脱酸工艺条件为:无水乙醇与游离脂肪酸物质的量比 2:1,酶加量 40 U/g,反应温度 40 °C,反应时间 6 h。在最佳脱酸条件下,高酸值米糠的酸值(KOH)由 62.14 mg/g 降至 0.12 mg/g,且在脱酸过程中固定化 Lipase G50 展现出了优异的操作稳定

性,连续使用 10 个批次后,固定化 Lipase G50 的酯化活力为 509.22 U/g,与初始固定化 Lipase G50 相比,酯化活力没有显著降低。分子蒸馏纯化产物的酸值(KOH)为 0.19 mg/g,过氧化值为 2.16 mmol/kg,达到了一级米糠油标准。因此,固定化 Lipase G50 在油脂脱酸领域具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] YUAN D J, WU Z D, WANG Y H. Evolution of the diacylglycerol lipase[J]. Prog Lipid Res, 2016, 64: 85 - 97.
- [2] ISOBE K, NOKIHARA K, YAMAGUCHI S, et al. Crystallization and characterization of monoacylglycerol and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii*[J]. Eur J Biochem, 1992, 203: 233 - 237.
- [3] YAMAGUCHI S, MASE T. High - yield synthesis of monoglyceride by mono - and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii* U - 150 [J]. J Ferment Bioeng, 1991, 72(3): 162 - 167.
- [4] WATANABE Y, SHIMADA Y, YAMAUCHI - SATO Y, et al. Synthesis of MAG of CLA with *Penicillium camembertii* lipase[J]. J Am Oil Chem Soc, 2002, 79(9): 891 - 896.
- [5] WATANABE Y, YAMAUCHI - SATO Y, NAGAO T, et al. Production of monoacylglycerol of conjugated linoleic acid by esterification followed by dehydration at low temperature using *Penicillium camembertii* lipase [J]. J Mol Catal B Enzym, 2004, 27:249 - 254.
- [6] WATANABE Y, YAMAUCHI - SATO Y, NAGAO T, et al. Production of MAG of CLA by esterification with dehydration at ordinary temperature using *Penicillium camembertii* lipase [J]. J Am Oil Chem Soc, 2005, 82(9): 619 - 623.
- [7] FREITAS L, PAULA A V, DOS SANTOS J C, et al. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂ - PVA composite [J]. J Mol Catal B Enzym, 2010, 65:87 - 90.
- [8] PADHI S K, HAAS M, BORNSCHEUER U T. Lipase - catalyzed transesterification to remove saturated MAG from biodiesel[J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2012, 114(8): 875 - 879.
- [9] 徐扬,王卫飞,陈华勇,等. 偏甘油酯脂肪酶 Lipase G50 催化酯化法制备甘油二酯[J]. 中国油脂, 2012, 37(2): 46 - 50.
- [10] 郑平玉. 全酶法制备高纯度甘油二酯的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2014.
- [11] 徐扬,王卫飞,陈华勇,等. 固定化脂肪酶 Lipase G50 催化合成甘油二酯的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9):205 - 208.
- [12] ZHOU P F, WANG X P, ZENG C X, et al. Deep eutectic

- solvents enable more robust chemoenzymatic epoxidation reactions[J]. *Chem Cat Chem*, 2017, 9(6): 934–936.
- [13] ARYUSUK K O, PUENGTHAM J I, LILITCHAN S U, et al. Effects of crude rice bran oil components on alkali – refining loss [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2008, 85: 475–479.
- [14] RACHAPUDI B N. Refining of rice bran oil[J]. *Lipid Technol*, 2006, 18: 275–279.
- [15] JIN J, XIE D, CHEN H Q, et al. Production of rice bran oil with light color and high oryzanol content by multi – stage molecular distillation[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2016, 93(1): 145–153.
- [16] MAKASÇI A, ARISOY K, TELEFONCU A. Deacidification of high acid olive oil by immobilized lipase[J]. *Turk J Chem*, 1996, 20(3): 258–264.
- [17] 杨博,杨继国,王永华,等. 米糠油酶法酯化脱酸的研究[J]. *中国油脂*, 2005, 30(7): 22–24.
- [18] SONG Z H, LIU Y F, JIN Q Z, et al. Lipase – catalyzed preparation of diacylglycerol – enriched oil from high – acid rice bran oil in solvent – free system [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2012, 168(2): 364–374.
- [19] VON DER HAAR D, STÄBLER A, WICHMANN R, et al. Enzymatic esterification of free fatty acids in vegetable oils utilizing different immobilized lipases[J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 37(1): 1–6.
- [20] WANG X S, LU J Y, LIU H, et al. Improved deacidification of high – acid rice bran oil by enzymatic esterification with phytosterol [J]. *Process Biochem*, 2016, 51(10): 1496–1502.
- [21] LI D M, WANG W F, DURRANI R, et al. Simplified enzymatic upgrading of high – acid rice bran oil using ethanol as a novel acyl acceptor[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(35): 6730–6737.
- [22] LI D M, LIU P Z, WANG W F, et al. An innovative deacidification approach for producing partial glycerides – free rice bran oil [J]. *Food Bioprocess Tech*, 2017, 10(6): 1154–1161.
- [23] THANGARAJ B, SOLOMON P R. Immobilization of lipase: a review. Part I: enzyme immobilization [J]. *Chem Biol Eng Rev*, 2019, 6(5): 157–166.
- [24] LI X X, LI D M, WANG W F, et al. Immobilization of SMG1 – F278N lipase onto a novel epoxy resin: characterization and its application in synthesis of partial glycerides[J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2016, 133:154–160.

(上接第14页)

- [10] 刘玉兰,田瑜,王璐阳,等. 不同制油工艺对油莎豆油品质影响的研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(7): 1–5.
- [11] 宋二立,刘玉兰,朱文学,等. 原料品质和制油方法对油莎豆油综合品质的影响[J]. *粮食与油脂*, 2022, 35(3): 99–103, 126.
- [12] 李奕,宋嘉欣,李昊辰,等. 油莎豆油的脱胶和脱酸工艺[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(17): 158–165.
- [13] 程海梅,资双飞,高学兰,等. 离心萃取油莎豆油脱酸的工艺[J]. *食品工业*, 2020, 41(9): 76–80.
- [14] 刘玉兰. 现代植物油料油脂加工技术[M]. 郑州:河南科学技术出版社, 2015.
- [15] 马靖轩,马传国,李利君,等. 酶法催化酯交换制备甘油二酯工艺优化研究[J]. *中国油脂*, 2020, 45(1): 51–55.
- [16] SHI C, CHANG M, LIU R T, et al. *Trans* – free shortenings through the interesterification of rice bran stearin, fully hydrogenated soybean oil and coconut oil [J]. *Int J Food Eng*, 2015, 11(4): 467–477.
- [17] 李园园. 月见草油精炼过程对其营养成分和抗氧化性能影响的研究[D]. 长春:吉林大学, 2020.
- [18] CHEW S C, TAN C P, LONG K, et al. Effect of chemical refining on the quality of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) seed oil[J]. *Ind Crops Prod*, 2016, 89: 59–65.
- [19] GAROUFI A, VORRE S, SOLDATOU A, et al. Plant sterols – enriched diet decreases small, dense LDL – cholesterol levels in children with hypercholesterolemia: a prospective study[J/OL]. *Ital J Pediatr*, 2014, 40(1): 42[2022–01–23]. <https://doi.org/10.1186/1824-7288-40-42>.
- [20] 温宝莉. 紫苏籽油精炼过程对其品质影响的研究[D]. 长春:吉林大学, 2020.
- [21] VERLEYEN T, SOSINSKA U, IOANNIDOU S, et al. Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterols [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2002, 79(10): 947–953.
- [22] WU Y, ZHOU R S, WANG Z G, et al. The effect of refining process on the physicochemical properties and micronutrients of rapeseed oils[J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0212879[2022–01–23]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212879>.
- [23] TASAN M, DEMIRCI M. Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining[J]. *Eur Food Res Technol*, 2005, 220(3/4): 251–254.
- [24] EZEH O, GORDON M H, NIRANJAN K. Enhancing the recovery of tiger nut (*Cyperus esculentus*) oil by mechanical pressing: moisture content, particle size, high pressure and enzymatic pre – treatment effects[J]. *Food Chem*, 2016, 194: 354–361.