

响应面法优化生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化

武文华¹, 关国华¹, 蒋一鸣¹, 宋莲芳², 王 宽², 耿鑫琪²,
邓 军², 徐 伟², 徐道然¹, 童 强¹

(1. 中粮天科生物工程(天津)有限公司, 天津 300457; 2. 中粮生物科技股份有限公司, 安徽 蚌埠 233010)

摘要:为实现脱臭馏出物绿色、清洁、高效甲酯化,达到环保生产的目的,通过单因素实验和响应面实验对生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化反应的工艺条件进行了优化,测定了反应前后维生素 E 含量的变化,并将新工艺应用于实际生产线。结果表明:生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化的最佳反应条件为加水量 1% (以脱臭馏出物质量计)、甲醇用量 11.5% (以脱臭馏出物质量计)、固定化脂肪酶用量 0.3% (以脱臭馏出物质量计)、反应温度 35.6℃,在最佳条件下反应 8 h 脱臭馏出物中游离脂肪酸酯化率达到 92.59%,甘油酯酯化率达到 94.95%;生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化反应过程中维生素 E 损失少,收率达到 93%;与浓硫酸催化甲酯化工艺相比,产品维生素 E (50% 维生素 E) 总收率提高了 3.47 个百分点,植物甾醇总收率提高了 3.26 个百分点。综上,生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化,可以得到较高的酯化率,提高了产品维生素 E 和植物甾醇收率。

关键词:生物酶;脱臭馏出物;甲酯化

中图分类号:TS229;TQ645

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)11-0143-04

Optimization of bioenzyme – catalyzed methyl esterification of deodorized distillates by response surface methodology

WU Wenhua¹, GUAN Guohua¹, JIANG Yiming¹, SONG Lianfang², WANG Kuan²,
GENG Xinqi², DENG Jun², XU Wei², XU Xiaoran¹, TONG Qiang¹

(1. COFCO TECH Bioengineering (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300457, China;
2. COFCO Biotechnology Co., Ltd., Bengbu 233010, Anhui, China)

Abstract: In order to realize the green, clean and efficient methyl esterification of deodorized distillates and achieve the goal of environmental protection, the reaction conditions of the bioenzyme – catalyzed methyl esterification of deodorized distillates were optimized by single – factor experiment and response surface methodology, and the changes of vitamin E content before and after the reaction were measured. In addition, the new process was applied to the actual production line. The results showed that the optimal reaction conditions for the methyl esterification of deodorized distillates catalyzed by bioenzyme were as follows: water dosage 1% (based on the mass of deodorized distillates), methanol dosage 11.5% (based on the mass of deodorized distillates), immobilized lipase dosage 0.3% (based on the mass of deodorized distillates), reaction temperature 35.6℃. Reaction under the optimal conditions for 8 h, the esterification rate of free fatty acid and glycerol ester in the deodorized distillates reached 92.59% and 94.95%, respectively. In the methyl esterification of the bioenzyme – catalyzed deodorized distillates, the loss of vitamin E was low, and its yield reached 93%. The total yield of vitamin E (50% vitamin E) increased by 3.47 percentage points and the total yield of phytosterols increased by 3.26 percentage points compared

with the concentrated sulfuric acid catalyzed methyl esterification process. In conclusion, the bioenzyme – catalyzed methyl esterification of deodorized distillates possesses higher esterification rates and yields of vitamin E and phytosterols.

Key words: bioenzyme; deodorized distillates; methyl esterification

收稿日期:2022-06-09;修回日期:2022-10-13

作者简介:武文华(1977),女,高级工程师,主要从事食品、食品添加剂、保健食品等质量控制、质量管理及研发管理工作(E-mail)wuwenhua@cofco.com。

通信作者:关国华,高级工程师(E-mail)guangh@cofco.com。

脱臭馏出物,是植物油精炼过程的副产物,俗称 DD 油,主要由游离脂肪酸、维生素 E、单甘酯、甘二酯、甘三酯、植物甾醇、植物甾醇酯等组成,是提取维生素 E 和植物甾醇的优质原料^[1-2]。实际工业生产中,常通过酯化反应将脱臭馏出物中的游离脂肪酸和甘油酯转化为低沸点的脂肪酸甲酯,然后利用分子自由程不同分离脂肪酸甲酯与维生素 E,达到浓缩维生素 E 的目的^[3-4]。

脱臭馏出物甲酯化采用的催化剂包括无机酸(特别是浓硫酸)、强碱等^[5],其中:浓硫酸催化副产物比较多,生成的磺基化合物有环境污染的风险,且对反应釜的腐蚀性比较大;强碱会破坏维生素 E,降低维生素 E 的收率。生物酶法甲酯化具有绿色、清洁、环保等优点,其催化的酯化反应可在较低温度下进行,避免高温对维生素 E 的破坏,同时生物酶可以重复利用^[6],能耗低,副产物少^[7-8]。

与浓硫酸催化工艺相比,采用固定化脂肪酶对脱臭馏出物进行甲酯化,可减少废水,同时,对现有浓硫酸或强碱催化工艺进行改造,无需大面积更换生产设备,是低成本转换工艺的有利研究方向。本文对脂肪酶催化脱臭馏出物甲酯化工艺条件进行了优化,以期在实际生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

脱臭馏出物,酸值(KOH) 103 mg/g,水分含量 0.16%,维生素 E 含量 5.64%,植物甾醇含量 5.81%,来源于中粮佳悦(天津)有限公司;固定化脂肪酶,标称活力 100 LCLU - SL/g,来源于丹麦 Novozymes 公司;甲醇,水分含量小于或等于 0.1%,来源于内蒙古东华能源有限责任公司。

1.1.2 仪器与设备

DFY-5L/25 低温恒温反应浴,巩义市予华仪器有限责任公司;XREM-60S 悬臂式电动搅拌器(四氟搅拌桨),金坛市西城新瑞仪器厂;TD5002 电子天平(0.01 g),天津天马衡基仪器有限公司;Agilent 1260 高效液相色谱,美国安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脱臭馏出物的甲酯化

预实验发现:固定化脂肪酶添加量很小,在一定范围内其添加量对酯化率影响不大,因此设定固定化脂肪酶添加量为 0.3% (以脱臭馏出物质量计);脱臭馏出物中需加入 1% 的水(以脱臭馏出物质量计),为固定化脂肪酶提供水油反应界面。取 300 g

脱臭馏出物,置于 1 000 mL 平底三口烧瓶内,加入 1% 的水,于恒温水浴中搅拌 15 min,等物料温度达到水浴温度后,加入 0.3% 固定化脂肪酶(以脱臭馏出物质量计)和一定量的甲醇,开始酯化反应,反应 8 h 后对产物进行水洗得到酯化液。

1.2.2 酯化率的测定

参照 GB 5009.229—2016 测定脱臭馏出物和酯化液的酸值。委托欧陆检测技术服务(上海)有限公司检测脱臭馏出物和酯化液的甘油酯含量。分别按公式(1)和公式(2)计算游离脂肪酸和甘油酯的酯化率。

$$Y_1 = (V_0 - V_1) / V_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$Y_2 = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: Y_1 、 Y_2 分别为游离脂肪酸和甘油酯的酯化率; V_0 、 V_1 分别为脱臭馏出物和酯化液的酸值(KOH),mg/g; C_0 、 C_1 分别为脱臭馏出物和酯化液中甘油酯含量。

1.2.3 基本指标测定

维生素 E 含量,参照 ISO 9936:2006 测定;植物甾醇含量,参照 GB/T 25223—2010 测定;水分含量,参照 GB 5009.3—2016 测定。

2 结果与讨论

2.1 脱臭馏出物甲酯化单因素实验

2.1.1 甲醇用量的影响

脂肪酶一般在 30~60℃ 时活性较高,但低温有利于酯化反应的进行^[9],因此在反应温度 35℃ 的条件下,考察甲醇用量(以脱臭馏出物质量计)对游离脂肪酸酯化率的影响,结果如图 1 所示。

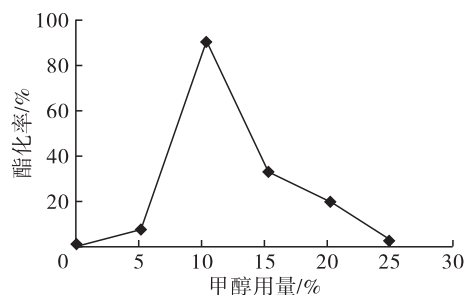


图 1 甲醇用量对酯化率的影响

由图 1 可知,随着甲醇用量的提高,酯化率先升高后降低。甲醇用量过大,反应体系中甲醇浓度过高,对酶活性的抑制作用较明显,导致酯化率下降。

2.1.2 反应温度的影响

在甲醇用量 10% 的条件下,考察反应温度对游离脂肪酸酯化率的影响,结果如图 2 所示。

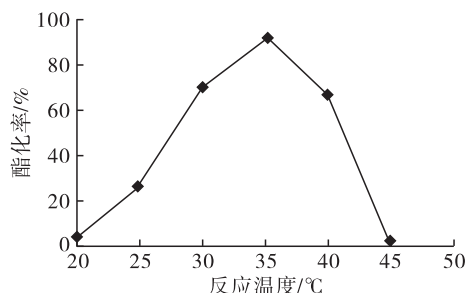


图2 反应温度对酯化率的影响

由图2可知,随着反应温度的升高,酯化率先升高后降低。脂肪酶有最适反应温度,温度过高,脂肪酶失活,酯化率下降。

2.2 脱臭馏出物甲酯化响应面实验

2.2.1 响应面实验设计及分析

在单因素实验的基础上,以游离脂肪酸酯化率(Y)为响应值,以甲醇用量(A)和反应温度(B)为自变量,利用 Design Expert 10 设计响应面实验^[10],响应面实验因素与水平见表1,响应面实验设计与结果见表2。

表1 响应面实验因素与水平

水平	甲醇用量/%	反应温度/°C
-1.41	0	25
-1	2.91	27.9
0	10	35
1	17.09	42.1
1.41	20	45

表2 响应面实验设计与结果

实验号	A	B	Y/%
1	-1	-1	7.69
2	1	-1	27.47
3	-1	1	2.36
4	1	1	10.76
5	-1.41	0	0
6	1.41	0	17.49
7	0	-1.41	25.63
8	0	1.41	5.61
9	0	0	91.68
10	0	0	92.12
11	0	0	91.31

对表2中的数据进行回归分析,得到拟合回归方程: $Y = 91.70 + 6.61A - 6.29B - 2.85AB - 41.51A^2 - 38.08B^2$ 。

对回归方程进行方差分析,结果见表3。由表3可知:模型显著,失拟项不显著,说明模型是稳定可靠的;甲醇用量和反应温度对酯化率的影响显著,两个因素的交互作用及二次项影响均显著。

表3 方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	14 562.94	5	2 912.59	2 152.5	<0.000 1	*
A	349.99	1	349.99	258.65	<0.000 1	*
B	316.93	1	316.93	234.22	<0.000 1	*
AB	32.38	1	32.38	23.90	0.004 5	*
A ²	9 729.97	1	9 729.97	7 190.76	<0.000 1	*
B ²	8 185.31	1	8 185.31	6 049.21	<0.000 1	*
残差	6.77	5	1.35			
失拟项	6.44	3	2.15	13.05	0.072	
绝对误差	0.33	2	0.16			
总误差	14 569.7	10				

注: *表示差异显著

2.2.2 最优条件的确定及验证

利用软件的优化功能,得到甲酯化最优条件为甲醇用量 11.50%、反应温度 35.56 °C,此时酯化率预测值为 93.91%。在以上优化条件(甲醇用量 11.5%,反应温度 35.6 °C)下进行3次重复验证实验,得到游离脂肪酸平均酯化率为 92.59%,与预测值仅相差 1.32 百分点,说明该模型能很好地应用于生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化工艺的预测及评

价。同时,检测样品中甘油酯的含量,得甘油酯平均酯化率为 94.95%。说明生物酶可以高效催化脱臭馏出物中游离脂肪酸和甘油酯甲酯化。

2.3 反应过程中维生素 E、植物甾醇含量的变化

使用同一批脱臭馏出物原料,在最佳条件下重复进行5组甲酯化实验,测定原料和酯化液的水分、维生素 E、植物甾醇含量(取平均值),结果见表4。

表4 酯化前后水分、维生素 E、植物甾醇含量的变化 %

项目	水分	维生素 E	植物甾醇
原料	0.16	5.64	5.81
酯化液	0.44	5.27	5.87

实验发现,反应过程中物料没有出现乳化现象,易于分水,表4水分指标也验证了这一点。由表4还可知,酯化液中的植物甾醇含量较脱臭馏出物有一定增加,而维生素 E 含量有一定减少,经计算维生素 E 收率达到 93%,在可接受范围内。

2.4 生产线应用效果

将固定化脂肪酶催化脱臭馏出物甲酯化工艺在实际生产线上进行了应用,与浓硫酸催化甲酯化工艺相比,新工艺中产品维生素 E(50% 维生素 E)总收率提高了 3.47 百分点,植物甾醇总收率提高了 3.26 百分点。

3 结论

对生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化的工艺条件进行了研究,通过单因素实验和响应面实验获得生物酶法催化脱臭馏出物甲酯化反应的最佳工艺条件,并将其应用于实际生产线。结果表明:最佳的生物酶法催化甲酯化反应条件为加水量 1% (以脱臭馏出物质量计)、固定化脂肪酶用量 0.3% (以脱臭馏出物质量计)、甲醇用量 11.5% (以脱臭馏出物质量计)、反应温度 35.6 °C,在此条件可以在确保维生

素 E 损失较少的前提下使游离脂肪酸和甘油酯甲酯化;与浓硫酸催化甲酯化工艺相比,维生素 E 和植物甾醇总收率均得到了提高。

参考文献:

- [1] 徐世民,李娟,丁辉,等.大豆油脱臭馏出物固体酸催化的甲酯化研究[J].粮油加工,2006(12):50-52.
- [2] 刘军海,李燕.植物油脱臭馏出物生物活性成分提取与纯化技术研究进展[J].粮食与油脂,2010(2):1-7.
- [3] 周秀秀,辛嘉英,陈林林,等.大豆油脱臭馏出物的酶法甲酯化[J].农产品加工,2010(8):53-55.
- [4] 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):99-102.
- [5] 胡小泓,刘文涛,刘昌伟,等.从大豆油脱臭馏出物中制备维生素 E 的工艺研究[J].中国油脂,2002,27(2):78-80.
- [6] 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,2007.
- [7] 张开平,惠明,田青,等.微生物脂肪酶的应用领域及研究进展[J].河南工业大学学报,2012,33(1):90-94.
- [8] 刘虹蕾,缪铭,江波,等.微生物脂肪酶的研究与应用[J].食品工业科技,2015,40(9):70-76.
- [9] 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.
- [10] 曹玉平,宋佳,武文华,等.响应面法优化维生素 E 提取工艺[J].粮食与饲料工业,2019,6:34-37.
- [51] 刘燕琳,石峰,尹玲,等.利用海洋微藻发酵生产二十二碳六烯酸的研究[J].药学进展,2005,29(12):544-549.
- [52] 司华静,彭晓芳,马金余.高含量 DHA 食用油的应用可行性研究[J].中国食品添加剂,2011(3):86-90.
- [53] 曹维.DHA 藻油在食用油中的应用研究[D].武汉:武汉轻工大学,2015.
- [54] 徐娜.氧化稳定型 DHA 藻油新产品的研发[D].南昌:南昌大学,2021.
- [55] 付冬文.Pickering 型和传统剂型 DHA 藻油乳液体系的构建及产品开发[D].南昌:南昌大学,2020.
- [56] 张程超.DHA 藻油双层纳米乳液的制备及应用[D].江苏无锡:江南大学,2021.

(上接第 120 页)