

高酸值米糠油酶法酯化脱酸研究^{*}

吴 聪 曾庆梅 靳 靖 魏春燕 黄博英

(合肥工业大学农产品生物化工教育部工程研究中心, 合肥 230009)

【摘要】 对脂肪酶 Novozym 435 催化高酸值米糠油酯化脱酸进行了研究。利用响应面分析法(RSM)优化脱酸条件。根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理对试验条件进行优化,在分析各因素显著性及其交互作用的基础上,得出米糠油酯化脱酸最佳工艺参数为:酶质量分数 1.1%、甘油添加量 0.42 mg、温度 56.4℃、反应时间 23.2 h。实际测得脱酸后米糠油酸值(KOH)由 56 mg/g 降为 5.04 mg/g,游离脂肪酸酯化率达到 91%,与模型预测值基本相符。

关键词: 米糠油 脂肪酶 Novozym 435 酯化脱酸 响应面分析法

中图分类号: TS224.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2011)06-0156-05

Deacidification of High-acid Rice Bran Oil by Enzymatic Esterification

Wu Cong Zeng Qingmei Jin Jing Wei Chunyan Huang Boying

(Engineering Research Center of Bio-Process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract

Deacidification of high-acid rice bran oil catalyzing by esterification using lipase Novozym 435 were studied. According to response surface method (RSM) and Box-Behnken experimental design, the best conditions of enzymatic esterification were optimized based on the analysis of significant factors and their interactions. The optimum conditions were: enzyme concentration of 1.1%, initial glycerol of 0.42 mg, reaction temperature of 56.4℃, the reaction time of 23.2 h. Under the conditions, rice bran oil acid value (KOH) decreased from 56 mg/g to 5.04 mg/g, the esterification rate of free fatty acid (FFA) reached to 91% and matched the prediction value by model.

Key words Rice bran oil, Lipase, Novozym 435, Deacidification by esterification, Response surface method

引言

米糠油中的脂肪酸组成合理,油酸和亚油酸比例接近于世界卫生组织(WHO)推荐的1:1的比例,而且米糠油中含有丰富的营养物质,如谷维素、角鲨烯、生育三烯酚等,是一种营养合理的食用植物油^[1-3]。米糠中含有非常活泼的脂肪酶,在适当条件下能在短时间内使米糠中所含脂肪水解成甘油和脂肪酸。由于生产条件,特别是米糠和米糠油生产企业间运输和存放时间的限制,生产的米糠毛油酸值很高^[3]。油脂工业中常用的碱炼脱酸和物理脱

酸方法用于高酸值米糠油都存在损耗过高的问题,化学精炼还会造成油脂中谷维素等营养成分的大量损失,此外还将产生大量的有机废水,污染环境。而目前研究较多的化学催化酯化米糠油脱酸则存在操作过程中温度过高的问题^[4-7]。

酶法脱酸是一种新型米糠油脱酸方法。该法利用特定的脂肪酶在一定条件下催化油脂中的游离脂肪酸(FFA)与甘油发生酯化反应,使大部分 FFA 转化成甘油酯,从而降低米糠油中 FFA 的含量。国内外学者就米糠油酶法脱酸的研究发现,该反应不仅可以有效减少油脂中游离脂肪酸的含量,而且就精

收稿日期: 2010-09-14 修回日期: 2010-10-17

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30871739、31071556)、安徽省教育厅重点科研资助项目(KJ2007A099)和安徽省重点攻关项目(07010302117)

作者简介: 吴聪,硕士生,主要从事酶研究, E-mail: wucongdp@163.com

通讯作者: 曾庆梅,教授,博士生导师,主要从事食品科学和生物化工研究, E-mail: zengqingmei-1@163.com

炼特性来说, 优于联合的物理精炼和化学精炼工艺^[8-10]。

Eduardo 等研究了 Novozym 435 催化异槲皮苷和芦丁的酰化反应^[11]。孙素玲等研究了在脂肪酶 Novozym 435 的催化作用下, 游离多不饱和脂肪酸与甘油反应的酯化率可达到 90% 以上^[12]。Afach 等研究了不同碳链长度的脂肪酸在脂肪酶 Novozym 435 的催化作用下与 D-阿洛酮糖生成二酯, 酯化率可达 83% ~ 90%^[13]。本实验以脂肪酶 Novozym 435 为催化剂, 在米糠油中加入甘油催化酯化反应, 考察酯化脱酸的影响因素, 探索催化酯化前后油脂的酸值的变化情况, 以确定米糠油酶法酯化脱酸的最佳工艺参数。

1 材料与方法

1.1 材料

米糠毛油购于安徽淮南, 酸值 (KOH) 56 mg/g, 已进行了脱胶、脱色。Novozym 435 购于诺维信 (中国) 公司。甘油、KOH、乙醚、乙醇等购于国药集团, 均为分析纯。

1.2 主要仪器

气浴恒温振荡器, DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 薄层色谱仪 (TLC), GC-MS。

1.3 米糠油酯化脱酸方法

取 10 g 脱胶、脱色的米糠油和一定量的甘油置于 100 mL 三角瓶中, 混匀并预热至预定温度后, 加入一定量的脂肪酶 Novozym 435 混匀, 加入少量食品干燥剂并加以密封, 在一定的温度下开始酯化脱酸反应, 搅拌速度 200 r/min。定时取样, 测定米糠油的酸值。

1.4 分析计算方法

酸值按 GB/T 5530—2005 方法测定。

理论甘油量计算公式为

$$m = Sm_0M_1 / (3\,000 M_2)$$

式中 S ——脱胶脱色米糠油酸值, mg/g

m_0 ——反应油的质量, g

M_1 ——甘油的摩尔质量, g/mol

M_2 ——KOH 的摩尔质量, g/mol

油样中的甘三酯、甘二酯和单甘酯含量用 TLC 以及气相色谱测定^[14]。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 酶质量分数

在甘油添加量为 0.32 mg (理论添加量)、温度为 50℃、搅拌速度为 200 r/min 条件下, 酶质量分数

为 0.5%、1.0% 和 1.5% 时, 米糠油酸值随时间变化如图 1 所示。

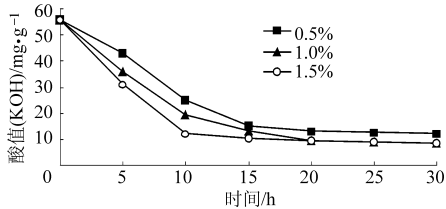


图 1 酶质量分数对脱酸效果的影响

Fig. 1 Effects of different enzyme concentrations on esterification

由图 1 可以看出, 随着酶质量分数的增加, 酯化脱酸的速率加快, 但是当酶的质量分数大于 1.0% 时, 再增加酶的质量分数, 虽然脱酸的反应速率有所增加, 但是脱酸的效果却没有显著提高。所以在后续的试验中, 酶的质量分数取 1.0%。

2.1.2 甘油添加量

在酶质量分数为 1.0%、温度为 50℃、搅拌速度为 200 r/min 条件下, 甘油的添加量为 0、0.16、0.24、0.32、0.48 mg。米糠油的酸值随时间变化如图 2 所示。

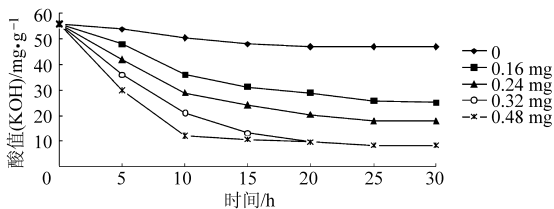


图 2 甘油添加量对脱酸效果的影响

Fig. 2 Effects of different glycerol additions on esterification

由图 2 可以看出, 甘油添加量对脱酸效果的影响非常显著。添加甘油进行反应时油脂的酸值下降较为明显; 而当甘油添加量超过理论添加量时虽然反应的速率有所加快, 但是脱酸的效果并无明显增强。故后续试验选取甘油添加量为 0.32 mg (理论添加量)。

2.1.3 温度

在酶质量分数为 1.0%、甘油添加量为 0.32 mg、搅拌速度为 200 r/min 条件下, 温度为 40℃、50℃ 和 60℃ 时, 米糠油酸值随时间变化如图 3 所示。

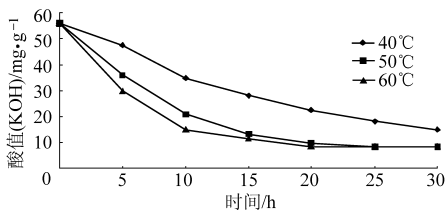


图 3 温度对脱酸效果的影响

Fig. 3 Effects of different reaction temperatures on esterification

由图3可以看出,随着温度的升高,反应速率也在不断增加。但是酶作为一种生物催化剂,温度过高则可能导致酶的变性失活。因此,当反应温度在50~60℃之间时,脱酸效果无明显增强,反应速率只是略有提升。

2.2 响应面分析法优化试验反应条件

2.2.1 试验因素与水平的选取

根据 Box - Benhnken 的中心组合试验设计原理,综合考虑单因素试验分析结果,采用四因素三水平的响应面分析法对反应条件进一步优化。4个因素分别为:酶质量分数、甘油添加量、温度、时间,编码值为 A、B、C、D。试验因素和水平如表1所示。

表 1 响应面试验因素和水平

Tab.1 Factors and levels of response surface method

水平	因素			
	酶质量 分数/%	甘油添 加量/mg	温度 /℃	时间 /h
-1	0.5	0.16	40	10
0	1.0	0.32	50	20
1	1.5	0.48	60	30

2.2.2 响应面试验方案及分析结果

以酶质量分数 A、甘油添加量 B、温度 C、时间 D 为自变量,米糠油的酸值 Y 为响应值。响应面试验方案及结果如表2所示。

通过 SAS 软件,对表2的试验结果进行回归分析,得到优化后的响应值动态参数方程为: $Y=9.60-2.65A-8.85B-8.20C-4.80D+0.60AB+0.15AC+2.40AD-3.15BC+1.80BD+3.30CD+3.48A^2+8.57B^2+7.00C^2+1.75D^2$ 。

回归方程方差分析结果如表3所示。由表3可知,该模型是高度显著($P<0.0001$)。相关系数 R^2 为 95.60%,说明由这4个因素及其二次项构成的模型能够解释 Y 变化的 95.60%。模型的拟合程度良好。

2.2.3 各因素间的交互作用

为了更加直观地反映各因素间的交互作用对米糠油脱酸的影响,采用 Design Expert 7 软件,依据回归方程式来绘制二次回归方程分析图(响应曲面图及其等高线图)。

等高线的形状可反映出交互作用的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则表示其交互作用不显著^[15]。由图4a可以看出,酶质量分数与甘油添加量的交互作用比较显著。当甘油添加量小于 0.32 mg,随着酶质量分数的增加,酸值降低并

表 2 响应面分析结果

Tab.2 Results of response surface analysis

试验序号	A	B	C	D	Y/mg·g ⁻¹
1	0	0	1	-1	15.0
2	0	-1	-1	0	34.8
3	1	0	1	0	8.4
4	1	0	-1	0	28.8
5	-1	0	-1	0	33.0
6	0	1	-1	0	30.0
7	0	0	0	0	9.6
8	1	-1	0	0	30.0
9	0	-1	0	1	25.2
10	0	0	-1	1	15.0
11	0	-1	1	0	25.8
12	0	0	-1	-1	34.8
13	-1	0	0	-1	25.2
14	0	1	0	1	8.4
15	0	-1	0	-1	36.0
16	0	1	0	-1	12.0
17	0	1	1	0	8.4
18	0	0	0	0	9.6
19	0	0	0	0	9.6
20	1	1	0	0	9.6
21	0	0	0	0	9.6
22	1	0	0	-1	12.0
23	-1	1	0	0	12.0
24	0	0	1	1	8.4
25	1	0	0	1	8.4
26	-1	-1	0	0	34.8
27	0	0	0	0	9.6
28	-1	0	1	0	12.0
29	-1	0	0	1	12.0

表 3 方差分析表

Tab.3 Variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P
模型	2 911.91	14	207.99	21.75	<0.000 1
A	84.27	1	84.27	8.81	0.010 2
B	939.87	1	939.87	98.28	<0.000 1
C	806.88	1	806.88	84.37	<0.000 1
D	276.48	1	276.48	28.91	<0.000 1
AB	1.44	1	1.44	0.15	0.703 8
AC	0.09	1	0.09	0.009 41	0.924 1
AD	23.04	1	23.04	2.41	0.142 9
BC	39.69	1	39.69	4.15	0.061 0
BD	12.96	1	12.96	1.36	0.263 8
CD	43.56	1	43.56	4.55	0.051 0
A ²	78.33	1	77.33	8.19	0.012 6
B ²	476.96	1	476.96	49.87	<0.000 1
C ²	317.84	1	317.84	33.23	<0.000 1
D ²	19.86	1	19.86	2.08	0.171 5
失拟项	133.89	14	9.56		
残差	133.89	10	13.39		
净误差	0	4	0		
总离差	3 045.80	28			

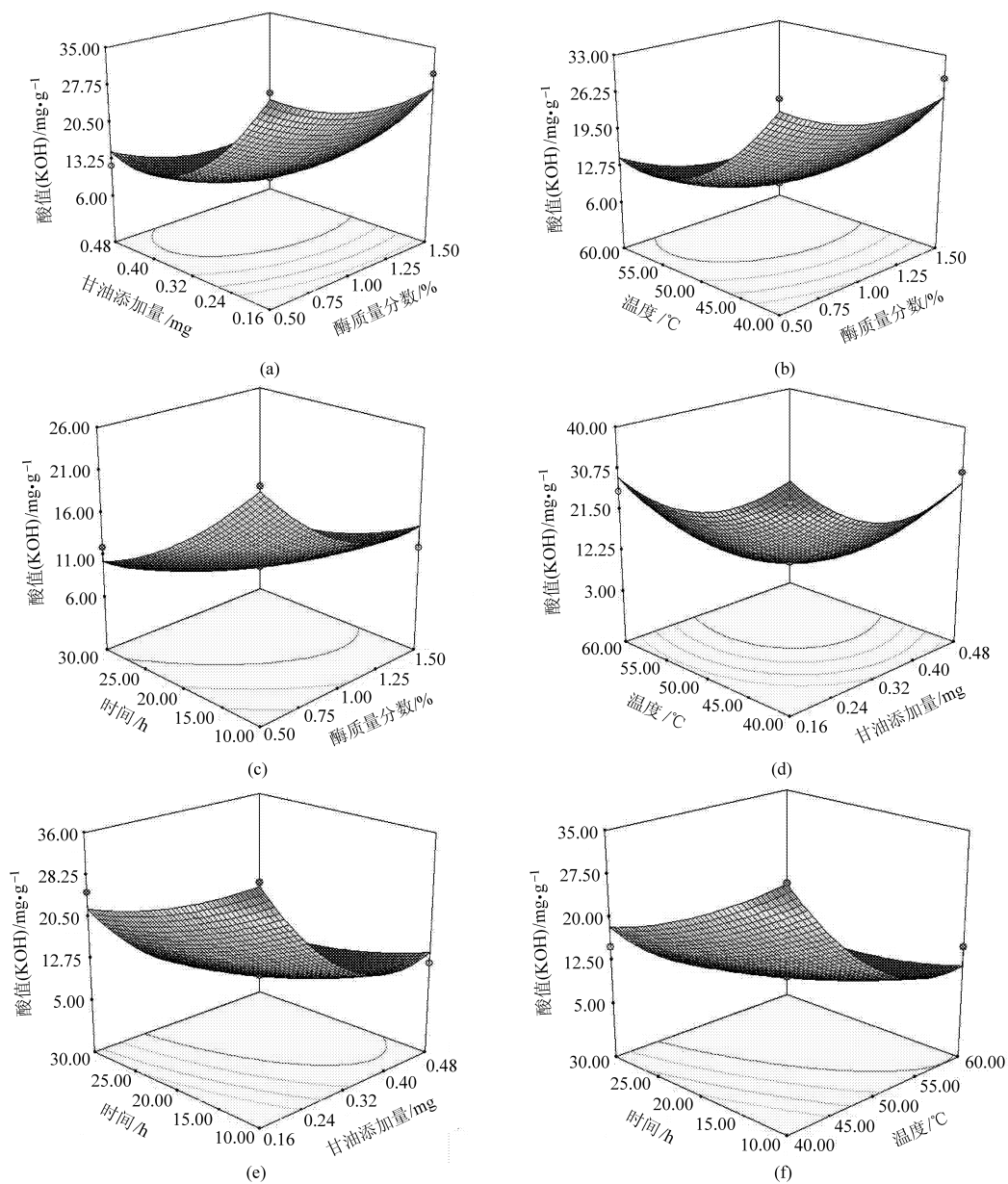


图 4 各因素交互作用响应面图

Fig. 4 Response surface plots of each factors

不明显。当甘油添加量达到 0.40 mg 左右时,随着酶质量分数的增加,酸值明显降低,但是当酶质量分数达到 1.0% 左右时,继续增加酶质量分数,酸值无显著性变化。

由图 4b 可以看出,酶质量分数与温度的交互作用比较显著。当温度达到 55℃ 时,随着酶质量分数的增加,酸值显著下降。但是当酶质量分数达到 1.0% 左右时,再继续增加酶质量分数,酸值则无显著下降。而当温度超过 60℃ 时,酸值反而有升高的趋势,其原因是高温抑制了酶活。

由图 4d 可以看出,甘油添加量与温度之间的交互作用并不显著。虽然酯化反应为吸热反应,提高温度可以使反应向正方向进行,但是反应增加幅度不大。

由图 4c、4e、4f 可以看出,时间与各因素之间的交互作用均比较显著。0 ~ 25 h 内酯化时间的长短与酸值的降低之间关系很明显;25 h 之后,由于催化反应达到动态平衡,酸值不再出现显著性变化。

2.2.4 最佳优化条件的确定

对回归方程求一阶偏导数,当响应值 Y 有最小值时各因素的取值分别为:酶质量分数为 1.1%、甘油添加量为 0.42 mg、温度为 56.4℃、反应时间为 23.2 h。在此最佳工艺条件下,实际测得米糠油的酸值 (KOH) 为 5.04 mg/g,游离脂肪酸酯化率为 91%,与理论预测值基本相符合。

2.2.5 米糠油中混甘油酯成分分析

经油脂成分分析表明,酯化脱酸后米糠油中游离脂肪酸 (FFA) 质量分数明显降低,从 28.2% 降至

2.54%,单甘酯(MG)、甘二酯(DG)、甘三酯(TG)质量分数分别从1.40%、7.05%、58.63%增至2.57%、12.20%、79.25%,说明酶法催化酯化脱酸能够显著地降低游离脂肪酸质量分数,增加甘油酯质量分数。

3 结束语

利用甘油作酯化剂,Novozym 435 作为催化剂对

高酸值米糠油进行酶法酯化脱酸是可行的。由单因素试验和响应曲面优化得到米糠油酶法酯化脱酸的最优工艺参数:酶质量分数为1.1%、甘油添加量为0.42 mg、温度为56.4℃、反应时间为23.2 h。利用酶作为催化剂来催化米糠油的酯化脱酸,不但能有效降低米糠油的酸值,显著提高中性油的含量,提高精炼经济性,而且反应条件温和,不产生废水污染环境。

参 考 文 献

1 Bhattacharyya A C, Bhattacharyya D K. Deacidification of high FFA rice bran oil by reesterification and alkali neutralization[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society,1987,64(1): 128 ~ 131.

2 殷隼. 米糠油的营养保健功能及其生产工艺探讨[J]. 江西食品工业, 2002(3): 17 ~ 21.
Yin Sun. The nutrition and health care function of rice bran oil is presented and its productive technique is discussed [J]. Jiangxi Food Industry, 2002(3): 17 ~ 21. (in Chinese)

3 彭阳生,万光,谢云生,等. 米糠制油生产中酸值升高影响因素的研究[J]. 中国油脂,2006,31(8):10 ~ 13.
Peng Yangsheng,Wan Guang,Xie Yunsheng,et al. Influence factors of high acid value in the preparation of rice bran oil[J]. China Oils and Fats, 2006,31(8):10 ~ 13. (in Chinese)

4 Ayhan Demirbas. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey[J]. Energy Conversion and Management,2003,44(13):2 093 ~ 2 109.

5 侯飞,秦卫国. 用稀碱炼法进行米糠油精炼[J]. 粮食与食品工业,2006,13(2):4 ~ 6.
Hou Fei,Qin Weiguo. Refining of crude rice bran oil by dilute alkali[J]. Cereal and Food Industry,2006,13(2):4 ~ 6. (in Chinese)

6 曾庆梅,韩抒,张冬冬,等. 高酸值米糠油酯化脱酸成生物柴油原料[J]. 农业工程学报,2009,25(8):215 ~ 219.
Zeng Qingmei,Han Shu,Zhang Dongdong,et al. Deacidification of high-acid rice bran oil by esterification for the raw material of biodiesel[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,2009,25(8):215 ~ 219. (in Chinese)

7 李桂华,徐广超,朱书爱. 高酸价米糠油酯化脱酸的研究[J]. 郑州工程学院学报,2002,23(1):36 ~ 38.
Li Guihua,Xu Guangchao,Zhu Shuai. Study of the esterification of FFA in rice bran oil containing high acid value with glycerin[J]. Journal of Zhengzhou Grain College,2002,23(1):36 ~ 38. (in Chinese)

8 Bhattacharyya S, Bhattacharyya D K. Biorefining of high acid rice bran oil[J]. J. Am. Oil. Chem. Soc.,1989,66(12): 1 809 ~ 1 811.

9 Sengupta R, Bhattacharyya D K. Effect of monoglycerides on enzymatic deacidification of rice bran oil[J]. Journal of the Oil Technologists' Association of India,1996,28(6):125 ~ 130.

10 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.
Yang Bo,Yang Jiguo,Wang Yonghua,et al. Enzymatic deacidification of rice bran oil esterification[J]. China Oils and Fats, 2005,30(7):22 ~ 24. (in Chinese)

11 Eduardo B. De Oliveir, Catherine Humeau, Latifa Chebil, et al. A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2009,59(4):96 ~ 105.

12 孙素玲,张干伟,汤坚,等. 酶促酯化合成多不饱和脂肪酸甘油酯[J]. 食品工业科技,2006,27(8):139 ~ 143.
Sun Suling,Zhang Ganwei,Tang Jian,et al. The synthesis of glycerides by enzymatic esterification of polyunsaturated fatty acids with glycerol [J]. Science and Technology of Food Industry,2006,27(8):139 ~ 143. (in Chinese)

13 Afach G, Kawanami Y, Cheetangdee N, et al. Lipase-catalyzed synthesis of D-psicose fatty acid diesters and their emulsification activities [J]. J. Am. Oil. Chem. Soc.,2008,85(8):755 ~ 760.

14 Paquot C. IUPAC standard methods for the analysis of oils,fats and derivatives[M]. Great Britain:Pergammon Press,1979.

15 Muralidhar R V,Chirumamila R R,Marchant R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources[J]. Biochemical Engineering Journal,2001,9(1):17 ~ 23.