

微藻油脂酸值的测定

姜君鹏^{1,2}, 姚长洪¹, 刘 娇^{1,2}, 孟迎迎³, 薛 松^{1*}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所海洋生物工程研究组, 辽宁 大连 116023;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 大连理工大学环境与生命科学学院, 辽宁 大连 116022)

摘要: 微藻油脂酸值是评价微藻油脂原料的重要指标之一, 对评估微藻藻粉品质以及进行微藻生物柴油的炼制具有重要参考价值。采用滴定法向微藻油脂溶液中加入饱和氯化钠溶液使溶液分层, 用标准氢氧化钾乙醇溶液进行滴定, 通过判断水层的颜色变化确定滴定终点, 可快速准确测定深色微藻油脂的酸值。通过测定标准品混合物的酸值验证该方法的准确性。通过该方法比较了不同处理方式得到微藻藻粉样品的酸值, 对藻粉品质进行了快速的评估, 为考察不同处理方式对藻粉品质的影响提供了基础数据。

关键词: 微藻; 油脂; 滴定; 酸值; 脂肪酶

中图分类号: TK01

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2017)07-0196-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2017.07.047

Determination for acid value of microalgal oil

JIANG Jun-peng^{1,2}, YAO Chang-hong¹, LIU Jiao^{1,2}, MENG Ying-ying³, XUE Song^{1*}

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116022, China)

Abstract: The acid value of microalgal oil is one of the important indexes for evaluating microalgae oil raw material, which also plays important role in evaluating the quality of microalgal powder and in refining of the microalgal biodiesel. The method for measuring quickly and accurately acid value of microalgal oil with a dark color includes steps of titrating saturated NaCl solution into the microalgal oil solution to make it form different layers, then titrating the mixture with standard ethanol solution of KOH, and distinguishing the change in color in the water layer to find the end point of titration. This method is verified by comparing the theoretical acid value of the standard mixture. This method is used to detect the acid value of microalgae powder sample acquired by different processing modes and to make a quick evaluation on the quality of microalgae powder, which supplies basic data for checking the effects of different processing modes on the quality of microalgae powder.

Key words: microalgae; oil; titrate; acid value; lipase

化石燃料的大量使用使得人们面临着严峻的能源危机和环境污染问题, 人们迫切需要寻找可再生资源来替代化石燃料。微藻是湖泊、海洋等水体初级生产力的主要来源, 具有光合效率高, 生长繁殖快, 培养不占耕地等优点^[1-2], 因此, 微藻是生产生物质柴油的潜在原料^[3-4]。当前微藻生物柴油已成为我国甚至全世界潜在的能源研究热点^[5]。但是微藻中存在的脂肪酶会水解微藻中的脂类生成游离脂肪酸^[6-7], 导致微藻油脂酸值升高, 影响微藻生物物质的品质, 进而影响微藻生物物质的下游炼制工艺, 如转酯化方法的选择。同时由于藻油成分比较复杂, 藻油中含有的除游离脂肪酸外的其他酸性成分也能与氢氧化钾反应, 其值也体现在酸值中。不同的微藻培养方式、微藻生物物质的储藏条件和储藏时间等

均对酸值产生影响。同时, 微藻还广泛应用于食品与保健品领域^[8], 我国保健食品审批实行行政许可制度, 在审批中, 对油脂较高的样品, 如富含植物油产品、植物油为稀释剂的软胶囊等产品需要进行酸值检测^[9]。目前国家标准中有对粮油谷物及制品(GB/T 601—2002)、动植物油脂(GB/T 5530—2005)、变压器油、汽轮机油(GB/T 28552—2012)、工业硬脂酸(GB/T 9104.3—1988)等油脂酸值测定的相应标准, 尚无微藻油脂酸值的测定标准。动植物油脂酸值测定采用的电位滴定的方法是依据电位突跃来指示终点^[10], 要求测定仪器精密, 同时价格昂贵也不利于产业化应用。

针对微藻油脂颜色较深且油脂成分复杂, 不能像常规酸碱滴定通过指示剂来指示终点这一特点,

收稿日期: 2017-01-19

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2014AA022004)

作者简介: 姜君鹏(1990-), 男, 硕士生, 研究方向为微藻生物质能源技术, jiangjunpeng@dicp.ac.cn; 薛松(1972-), 女, 博士, 研究员, 研究方向为海洋微藻、海洋微生物、结构生物学及现代生物化工技术, 通讯联系人, 0411-84379069, xuesong@dicp.ac.cn。

确定了适合微藻油脂酸值测定的方法。通过对标准品混合物进行滴定验证了该方法的准确性。进而利用此方法对不同处理方式得到的微藻样品的酸值进行测定,确定了微藻中脂肪酶对微藻酸值的影响。

1 实验方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验材料

新鲜微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.);室温存放2年的微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.);新鲜湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhangjiangensis*);室温存放2年的湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhangjiangensis*);室温存放3年的亚心形四片藻(*Tetraselmis subcordiformis*)和室温存放3年的角毛藻(*Chaetoceros* sp.)藻粉。不同处理方式的微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)藻粉:-80℃冷冻24 h后冻干的藻粉;-80℃冷冻24 h后室温融化后再冻干的藻粉;液氮直接冷冻后冻干的藻粉;室温放置24 h后冻干的藻粉;80℃烘箱干燥24 h后的藻粉。

氢氧化钾、酚酞、邻苯二甲酸氢钾、无水乙醇、乙醚、氯仿、甲醇、氯化钠、硬脂酸、冰乙酸,均为分析纯;正己烷,色谱纯。

1.1.2 实验仪器

分析天平:感量为0.0001 g;超声清洗仪:功率为1000 W;离心机;冷冻干燥机;氮气吹扫装置;烘箱;50 mL离心管;带塞的磨口锥形瓶;磁力搅拌器;3 mL碱式离心管;最小刻度为0.01 mL;梅特勒-托利多G20自动电位滴定仪,配有DGi-115SC电极。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配制

(1) 指示剂配制

酚酞指示剂:10 mg/mL,用95%的乙醇溶解。

(2) 氢氧化钾标准溶液配制与标定

按照化学试剂标准滴定溶液的制备要求进行氢氧化钾标准溶液的配制与标定^[11]。

0.01 mol/L 氢氧化钾标准溶液的配制:称取0.14 g 氢氧化钾固体,用95%乙醇溶液溶解定容至250 mL。

氢氧化钾标准溶液的标定:用邻苯二甲酸氢钾对配制好的0.01 mol/L的氢氧化钾标准溶液进行标定,标定后的浓度为0.009 85 mol/L。

1.2.2 微藻油脂提取

称取0.5~0.6 g 微藻藻粉,加入10 mL 体积比为2:1的氯仿甲醇混合溶液,超声清洗仪辅助萃取

10 min,于离心机上4 000 r/min 离心5 min,收集上层溶液于离心管中;重复以上提取操作3次,合并提取液,用氮气装置吹扫,待溶剂挥发至小于0.5 mL后转移至烘箱中,60℃烘干16 h^[12]。

1.2.3 酸值的测定方法

(1)称取微藻油脂样品10~15 mg于磨口锥形瓶中,加入40 mL 体积比为2:1的乙醚、乙醇混合溶液,用磁力搅拌器搅拌溶解30 min,盖上塞子。每份油脂样品制备4瓶。

(2)向微藻油脂溶液中加入30 mL 饱和氯化钠溶液至分层^[13],加入4~5滴酚酞指示剂,用3 mL 碱式滴定管以不低于1 mL/s的速度滴入氢氧化钾标准溶液至下层水溶液变成深粉红色,记录此时所消耗的氢氧化钾标准溶液的体积,作为滴定参考体积(V_1)。

(3)向另一份微藻油脂溶液中加入30 mL 饱和食盐水氯化钠溶液至分层,加入4~5滴酚酞指示剂,用3 mL 碱式滴定管以不低于1 mL/s的速度滴入80%滴定参考体积(V_1)的氢氧化钾标准溶液,再逐滴滴定至溶液变成浅粉红色且30 s内不褪色,记录此时所消耗的氢氧化钾标准溶液总体积(V_2)。重复此步骤继续滴定剩余2瓶油脂样品。

(4)以40 mL 体积比为2:1的乙醚、乙醇混合溶液代替微藻油脂溶液,按照上述方法进行滴定,记录空白样品所消耗的氢氧化钾标准溶液总体积(V_0)。按此重复2次。

(5)样品酸值按动植物油脂酸值和酸度测定方法进行计算^[14]。

1.2.4 标准品混合物的自动电位滴定方法

(1)将滴定剂加入到滴定瓶中,操纵自动电位滴定仪自动清洗滴定管。

(2)根据操作说明书建立空白样品测定方法,滴定模式采用等体积滴定,根据滴定突跃来确定滴定终点,并编写酸值计算公式。

(3)同理,建立样品测定的方法,滴定模式、滴定终点和计算方法同空白滴定。

(4)分别按滴定法配制好空白滴定液与标准品混合物样品溶液,加入到自动电位滴定仪的滴定杯中,操作电位滴定仪进行滴定。

(5)利用自动电位滴定仪自动确定滴定终点,并计算出样品酸值。

(6)采用上述方法分别将空白样品与标准品混合物样品重复滴定2次。

2 结果与分析

2.1 滴定方法的验证

为了验证 1.2.3 所述滴定方法的准确性,采用此方法滴定标准品混合物,标准品混合物根据其分子质量换算后的理论酸值为 211.4 mg/g,测定结果为 210.3 mg/g;两者的相对标准偏差为 0.52%,没有显著性差异。故采用此方法能够准确确定油脂酸值。同时采用电位滴定法对标准品混合物的酸值进行测定,测定值为 266.6 mg/g,与其标准值偏差较大。这主要与滴定终点的选择有关。滴定法是根据酚酞指示剂变色来指标终点,滴定终点的 pH 大约为 8.2,而电位滴定选取的滴定终点 pH 大约在 10 左右^[15],所以造成了两者在测定结果上差别。电位滴定操作比较烦琐,测定 1 个样品大约需要 8 min,而采用手动酸碱滴定测定 1 个样品只需 1 min,因此,采用手动酸碱滴定法测定酸值具有操作简便快速,测定准确,结果重现性好等优点。

手动与自动电位滴定法测定的酸值与标准品标准酸值比较见表 1。

表 1 手动与自动电位滴定法测定的酸值与标准品标准酸值比较

样品名称	酸值/(mg·g ⁻¹)	相对标准偏差
手动滴定测得酸值	210.3	1.86
自动电位滴定仪测得酸值	266.6	0.031
标准品酸值 ^①	211.4	0.0007

注:①标准品混合物经气相色谱确定各成分含量 $[m(\text{豆蔻酸}):m(\text{软脂酸}):m(\text{硬脂酸})=1:61:38]$ 后,根据分子质量换算得到的酸值。

2.2 手动酸碱滴定法测定新旧微藻油脂酸值

由于藻油中含有各种色素,导致样品颜色较深,无法准确确定滴定终点,造成滴定结果不准确。本方法中加入了中性饱和氯化钠溶液使得样品溶液分层^[13],当深色油脂中的酸性成分被中和后,多余的 KOH 会迅速进入到饱和氯化钠溶液层中进行显色,确定滴定终点。但是由于酚酞在乙醚-乙醇相中的溶解度相比食盐水相中的溶解度更大一些,故其更容易溶解于乙醚-乙醇相中。按照常规滴定方法,需要边滴边搅拌,在搅拌的过程中乙醚-乙醇相与食盐水相混合,酚酞更易溶解在乙醚-乙醇相中,而有机相中混有深色油脂无法准确确定终点;食盐水层中溶解酚酞的量很少,所以很难确定终点。基于此,采用了快速滴定,先快速加入过量的 KOH 获得显色明显的滴定量,作为样品的预滴定体积,根据

样品预滴定体积确定准确的滴定终点,得到样品的酸值。采用此方法对新鲜与存放 2 年的湛江等鞭金藻、新鲜与存放 2 年的微拟球藻、存放 3 年的亚心形四片藻、存放 3 年的角毛藻油脂酸值进行测定,结果如表 2 所示。6 个样品的酸值依次为(61.6±7.9)、(133.4±3.2)、(35.4±3.8)、(68.6±1.0)、(116.0±1.6)、(143.8±1.3)mg/g,相对标准偏差(RSD)均小于 10%,表明其测量具有较高的稳定性。测定结果表明,不同种类、不同存放时间的微藻油脂的酸值差别很大,表明不同微藻中脂肪酶活性和作用条件不同,产生的游离脂肪酸的量不同。与新鲜金藻相比,存放 2 年的湛江等鞭金藻的酸值由 61.6 mg/g 增加到 133.4 mg/g;与新鲜的微拟球藻相比,存放 2 年的微拟球藻的酸值由 35.4 mg/g 增加到 68.6 mg/g。说明在藻粉的存放过程中,微藻中的脂肪酶依然发挥作用,产生游离脂肪酸,使油脂酸值增大。

表 2 不同微藻酸值测定

样品名称	酸值/(mg·g ⁻¹)
新鲜湛江等鞭金藻	61.6±7.9
存放 2 年的湛江等鞭金藻	133.4±3.2
新鲜的微拟球藻	35.4±3.8
存放 2 年的微拟球藻	68.8±1
存放 3 年的亚心形四片藻	116±1.6
存放 3 年的角毛藻	143.8±1.3

2.3 收获后处理方式对微藻酸值的影响

游离脂肪酸对细胞具有毒性,因此正常细胞中游离脂肪酸的浓度很低,一般只有 400~900 μmol/L^[16]。新鲜藻收获后的处理方式对微藻酸值也有较大影响,如表 3 所示。由表 3 中可以看出,液氮迅速冷冻后冻干的 3 号样品酸值最低,仅为 31 mg/g,表明此方法能最好地维持藻细胞收获时的状态。经过 -80℃ 冷冻处理后立即冻干的 1 号样品酸值上升到 38 mg/g,表明脂肪酶在 -80℃ 冷冻过程中仍然能发挥作用。这是由于 -80℃ 冷冻过程中温度缓慢下降,导致脂肪酶在一定时间内仍然具有活性。经过 -80℃ 冷冻处理再经过室温化冻后冻干的 2 号样品酸值进一步上升至 48 mg/g,与直接在室温放置 24 h 的 4 号样品相当,表明 -80℃ 冷冻处理对脂肪酶的活性没有影响,因此化冻不利于微藻生物品质的保持。此外,80℃ 直接烘干的 5 号样品与 -80℃ 冷冻处理后立即冻干的 1 号样品酸值相当,而小于室温处理的 2 号和 4 号样品,表明微藻在加热过程中脂肪酶仍然发挥作用,当温度升高到一定水平后导致酶失活,从而减少了游离脂肪酸的释放。由此可见,为了最大限度保持微藻原有的状态,避免

生物质品质下降,应采取“速冻-冻干”的处理模式,并且在操作过程中避免室温化冻。利用手动酸碱滴定法快速测定新旧微藻生物质和不同收获后处理方式的微藻酸值,对鲜藻的处理和藻粉的保存具有重要的指导意义。

表3 不同处理方式获得的微藻样品酸值的测定

样品名称	酸值/(mg·g ⁻¹)
-80℃冷冻24 h后冻干样品	38.7±1.7
-80℃冷冻24 h后室温融化后再冻干样品	47.3±2.6
液氮直接冷冻后冻干样品	31.5±1.3
室温放置24 h后冻干样品	46.5±0.9
烘干样品	39.9±0.8

3 结论

(1)利用手动酸碱滴定法向微藻油脂溶液中加入饱和氯化钠溶液使溶液分层,通过判断水层的颜色变化确定滴定终点,可准确测定深色微藻油脂的酸值,具有操作简便快速,测定准确,结果重现性好,分析测试成本低等优点,将在微藻生物质的培养、收获、储存和相关制品的制备过程中控制游离脂肪酸的生成,提高微藻制品的品质方面提供可靠保障。

(2)微藻生物质收获后为了最大限度保持微藻原有的状态,避免生物质品质下降,应该采取“速冻-冻干”的处理模式,并且在操作过程中避免室温化冻。

参考文献

[1] 蒋礼玲,张亚杰,李潇萍,等.微藻培养模式研究进展[J].可再

生能源,2010,(1):56-62.

[2] 郑洪立,张齐,马小琛,等.产生物柴油微藻培养研究进展[J].中国生物工程杂志,2009,(3):110-116.

[3] 李华,王伟波,刘永定,等.微藻生物柴油发展与产油微藻资源利用[J].可再生能源,2011,(4):84-89.

[4] 宋东辉,侯李君,施定基.生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用[J].生物工程学报,2008,(3):341-348.

[5] 郝宗娣,杨勋,时杰,等.微藻生物柴油的研究进展[J].上海海洋大学学报,2013,(2):282-288.

[6] 高贵.扩展青霉脂肪酶的固定化及油脂水解产物成分分析[D].吉林:吉林大学,2004.

[7] 亓小宇.脂肪酶产生菌的筛选及其在生产生物柴油中的应用[D].济南:山东大学,2006.

[8] Busi M V, et al. Starch metabolism in green algae [J]. Starch-Starke, 2014, 66(1/2):28-40.

[9] 华永有.保健食品中酸价测定方法的探讨[J].海峡药学,2014,(3):81-82.

[10] 薛斌,曹文明,包杰,等.自动电位滴定法测定米糠油酸值的研究[J].中国油脂,2014,11:83-87.

[11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 601—2002,化学试剂标准滴定溶液的制备[S].北京:中国标准出版社,2002-10-15.

[12] Zhu M, Zhou P P, Yu L J. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids [J]. Bioresource Technology, 2002, 84(1):93-95.

[13] 邢立民.深色油脂酸值测定新方法的研究[J].内蒙古科技与经济,2008,8(162):80-81.

[14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 5530—2005,动植物油脂酸值和酸度测定[S].北京:中国标准出版社,2006-04-29.

[15] 杨士钊,郝敬团,胡建强,等.中和滴定和电位滴定测定润滑油酸值的比较[J].合成润滑材料,2012,(3):6-8.

[16] 伍树芝.游离脂肪酸升高相关因素分析[J].中国医药指南,2006,(6):68-69. ■

我科学家一步法制备石墨烯/黑磷烯超级电容器

近日,中国科学院大连化学物理研究所二维材料与能源器件研究组研究员吴忠帅团队与中国科学院金属研究所研究员任文才团队合作,通过掩膜版协助一步过滤法制备出具有叠层结构的二维黑磷烯与石墨烯复合微电极。该电极可直接转移到柔性基底作为平面超级电容器,在离子液体中显示出优异的能量密度和良好的机械柔韧性。相关研究成果发表在《美国化学会-纳米》。

平面超级电容器由于其具有厚度薄、体积小、功率密度高、循环寿命长等优点被认为是集成电子器件中重要的微电源储能器件而备受关注。然而,以往制备平面化微型电容器的制备工艺复杂,通常需要采用光刻蚀、等离子体刻蚀等较为苛刻的技术手段,因此,发展出一种简单、高效制备

高性能平面型微型化超级电容器的方法十分必要。

最近,该研究团队利用高导电的石墨烯纳米片和高容量的黑磷烯纳米片为电极材料,在平行交叉模板协助下,通过简单的一步过滤法构筑出具有叠层结构的、高导电石墨烯/黑磷烯图案化的复合微电极,将该电极应用于平面型超级电容器,在离子液体中表现出较高工作电压(3 V)和能量密度(11.6 mWh/cm³)。

此外,在高度弯曲状态下,该平面超级电容器仍能保持良好的性能。这种器件加工策略不仅简单易行,而且在器件制备过程中无需加入常规的金属集流体、内部互联或接触体,可构筑模块化器件,进而获得高的容量和输出电压。(中化新网)