

分子蒸馏和脂肪酶催化水解菜籽油脱臭馏出物浓缩维生素 E 的优化研究

邵平¹, 姜绍通^{1,2}, 潘丽军^{1,2}

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009;
2. 教育部农产品生物化工重点实验室, 安徽合肥 230069)

摘要:采用分子蒸馏耦合脂肪酶催化水解菜籽油脱臭馏出物,并用碱中和、水洗萃取以浓缩维生素 E。着重考察了脂肪酶活力,添加的水量和反应时间对水解效果的影响。通过正交实验获得较好的水解工艺条件:添加的水量/水解原料比 15 mL/15 g,脂肪酶活/水解原料 105 U/g,反应时间 5 h,反应温度 37℃,经后续处理后维生素 E 纯度达到 17.3%,回收率 85%。固定化酶可以重复利用多次。

关键词:脱臭馏出物;分子蒸馏;脂肪酶;维生素 E

中图分类号:TQ466.5

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2006)S1-0245-03

Molecular distillation and enzymatic hydrolysis for concentrating vitamin E from rapeseed oil deodorizer distillate

SHAO Ping¹, JIANG Shao-tong^{1,2}, PAN Li-jun^{1,2}

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. Key Laboratory of Agricultural Production Biochemistry of the Ministry of Education, Hefei 230069, China)

Abstract: The molecular distillation and enzymatic hydrolysis were used for concentration of vitamin E from rapeseed oil deodorizer distillate. Free fatty acids liberated were neutralized using alkali and the salts formed then washed off. Factors affecting the degree of hydrolysis were studied to reach better recovery of vitamin E by orthogonal experiment. The results indicated that the content and recovery of vitamin E were 17.3% and 85% respectively when water/material is 15:15 mL/g with 105 U/g of lipase activity, and reacting for 5 h at a temperature of 37℃. And the immobilized lipase can be used for many times in hydrolysis.

Key words: deodorizer distillate; molecular distillation; lipase; vitamin E

菜籽油脱臭馏出物(RODD)是菜籽油在脱臭过程中所得到各馏分的混合物,主要含有大量脂肪酸、生育酚(维生素 E)、甾醇及甾醇酯、甘油酯及其他组分等^[1],其中天然维生素 E 具有抗自由基、抗衰老、提高人体及动物的体能免疫功能等许多重要的生理功能,对人体无毒副作用,其长期使用的安全性远高于合成维生素 E^[1-3]。我国是油菜籽的主产国,产量 1 100 万 t/a,而菜籽可得到含维生素 E 3%~7% 的脱臭馏出物。目前关于脱臭馏出物中维生素 E 的分离工艺的研究报道较多,主要集中于分子蒸馏、尿素包合、超临界萃取等方法^[1,4-5]。与其他方法相比,多次分子蒸馏可以得到纯度较高的维生素 E,但存在原料酯化条件要求较高、工艺步骤繁琐、回收率低等缺点,而且在化学催化酯化过程中,存在酯化

率低,高温环境易使维生素 E 氧化和环境污染严重等缺点。近年来酶催化水解油脂正以其高效、专一、反应条件温和等优点逐渐成为当今研究热点之一^[6-7],而在脱臭馏出物中利用脂肪酶水解性质浓缩维生素 E 方面国内外还鲜有报道。笔者采用分子蒸馏耦合脂肪酶水解技术从菜籽油脱臭馏出物中浓缩维生素 E。

1 实验部分

1.1 主要原料及仪器

菜籽油脱臭馏出物,安徽丰大油脂厂; α , γ , δ -tocopherol, 纯度 99%, sigma 公司;脂肪酶 *Candida rugosa*, 15 U/mg(1 U 定义为 37℃, pH 7.5, 1 min 水解产生 1 μ mol 脂肪酸所消耗的酶量), 美国 Sigma 公

收稿日期:2005-12-02

基金项目:安徽省自然科学基金(03041302)和合肥工业大学创新基金(XS05020)

作者简介:邵平(1980-),男,博士生;姜绍通(1954-),男,教授,博士生导师,主要从事农产品生物化工方面研究,通讯联系人,0551-2901504,jiangshaotong@yahoo.com.cn。

司;甲醇,色谱纯,上海化学试剂厂;丙酮、乙醇,分析纯,上海试一化学试剂有限公司;橄榄油,化学纯,上海化学试剂厂。

高效液相色谱(HPLC)系统(Waters公司),Waters 二极管阵列检测器 2996,Atlantics C18 反相柱(4.6 mm × 15 cm, 5 μm),Empower 处理软件。分离装置为 Pope2[#] 刮膜式分子蒸馏设备(美国 Pope 公司)。数显恒温水浴锅 HH-2 为国华电器有限公司生产。

1.2 分析方法

维生素 E 的高效液相色谱分析条件为流动相为 V(甲醇):V(水) = 96:4, 流速 1 mL/min, 柱温 30℃。维生素 E 最大吸收波长 292 nm。酸价(AV)测定根据 GB/T5530—1998;自由脂肪酸(FFA)测定根据酸价转化,脂肪酸相对分子量以油酸为准;皂化价(SV)测定根据 GB/T5534—1995。脂肪酶活测定采用橄榄油乳化法测定脂肪酶活^[8]。

1.3 样品处理

1.3.1 脱臭馏出物中甾醇结晶

将丙酮、甲醇溶液(体积比 4:1)加入菜籽油脱臭馏出物中,置于 50℃ 恒温水浴中,搅拌溶解,在 8℃ 下结晶 4 h 后抽滤洗涤滤饼 2 次,再在 -5℃ 下结晶 20 h 后再次抽滤,洗涤滤饼 2 次^[9]。将滤液旋转蒸发所得油相物称为去除甾醇的脱臭馏出物(SRRODD)。

1.3.2 分子蒸馏处理样品

以 SRRODD 为原料,从进料器经计量后进入分子蒸馏装置,在进料温度 50℃、蒸发面温度 90℃、系统压力 5.3 Pa、刮膜转速 150 r/min、进料速度 120 mL/h 的条件下进行第一次分离精制。将残余液重新加入进料器,在进料温度 80℃、蒸发面温度 240℃、系统压力 1.5 Pa、刮板转速 150 r/min、进料速度 120 mL/h 的条件下进行第 2 次分离精制,以去除甾醇酯和部分三甘酯、色素等大分子量物质,得到的馏出液为维生素 E、甘油酯和脂肪酸混合油相(RODD Tocopherol/Glyceride/FFA, RODDTGF)。在试验中刮膜器的转动可以确保蒸发面上液膜的均匀性,同时使液膜表面不断更新。采用液氮作为深冷剂,可以提高真空系统的工作效率,延长真空泵的使用寿命。

1.3.3 脂肪酶催化水解

将 100 mg 脂肪酶溶解于 2 mL pH = 8 的磷酸盐缓冲液中,加入 1 g 硅藻土载体,并在室温下搅拌 1 h,真空冷冻干燥产品,即得固定化酶。将上述蒸馏所得的 RODDTGF 与水按一定比例混合,水浴加

热到所需温度,快速加入定量脂肪酶,同时搅拌计时。为保证反应温度的恒定,每次取样少量而迅速。所需样品经离心分离,冷冻干燥,取油层测其酸价、FFA 和维生素 E 的含量。考察脂肪酶活力,反应时间和反应温度对水解效果的影响,并计算水解率 $H(\%) = (A_{hr} - A_{RODDTGF}) / (S_{RODDTGF} - A_{RODDTGF}) \times 100$, 式中 A_{hr} 为水解后样品的酸价, $A_{RODDTGF}$ 为 RODDTGF 的酸价, $S_{RODDTGF}$ 为 RODDTGF 的皂化价。将上述水解样品水洗,冷冻干燥,用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液中和 FFA,正己烷萃取干燥即得维生素 E 浓缩物。

2 结果与分析

2.1 分子蒸馏处理样品

由表 1 中可以看出,SRRODD 经过 2 次分子蒸馏,其中维生素 E 损失较少,一些低分子量物质和甾醇酯、色素等被去除。

表 1 分子蒸馏处理后脱臭馏出物中的脂肪酸和维生素 E 含量变化

步骤	质量/ g	酸价/ mg·g ⁻¹	FFA 质量 分数/%	维生素 E		
				纯度/ %	质量/ g	回收 率/%
RODD	150	106	52.18	3.23	4.84	100
SRRODD	130	107	53.71	3.66	4.76	98
第一次蒸馏						
馏出液	18	< 10	< 5.30	ND	ND	ND
残余液	110	115	60.95	4.15	4.57	94
第二次蒸馏						
馏出液 (RODDTGF)	95	123	65.19	4.74	4.50	93
残余液	13	< 3	< 1.59	< 0.1	< 0.108	2.2

注:ND(not detected)代表含量少,难以检测;第二次分子蒸馏所得的馏出液即为 RODDTGF;RODDTGF 的皂化价为 148。

2.2 RODDTGF 的酶水解

2.2.1 脂肪酶水解因素考察

添加水量、脂肪酶量和反应时间对水解效果的影响,见表 2。随着添加水量的增加,水解率先增加后降低,在 15 mL 水时,水解率达到最大值 68.4%。当水量较小时,随着水量的增加,水解反应向右移动,当水量较大时,酶活力下降,使酶的催化水解能力降低。而随着反应体系中脂肪酶活力的增加,水解催化能力增强,水解率逐渐上升,但当 105 U/g 时,体系酸价稍有下降,估计是在合适的酶浓度范围内,脂肪酶的活性构象正逐步展开,催化活性部位正逐渐暴露。之后酶浓度进一步增加,脂肪酶之间存

表2 脂肪酶水解的单因素考察

指标	单因素考察												
	V(水):m(RODDTGF) ^① /mL·(15 g) ⁻¹					酶活:m(RODDTGF) ^② /U·g ⁻¹				反应时间 ^③ /h			
	1	5	15	20	25	15	45	75	105	1	3	5	7
水解率/%	4.00	66.2	68.4	30.4	8.0	4.8	68.4	76.8	54.3	25.8	50.6	67.4	77.2

注:①表示 15 g RODDTGF, 45 U/g 酶量, 反应温度 37℃, 反应时间 5 h 时, 添加的水量对水解效果的影响;②表示 15 g RODDTG, 反应温度 37℃, 15 mL 水, 反应时间 5 h 时, 脂肪酶活对水解效果的影响;③表示 15 g RODDTGF, 反应温度 37℃, 15 mL 水, 脂肪酶活 45 U/g 时, 反应时间对水解效果的影响。

在竞争, 抑制了其催化能力。另外, 随着反应时间的增加, 水解反应平衡向右移动, 当到一定时间时, 水解率趋近于定值。

2.2.2 脂肪酶水解工艺优化

为了得到 RODDTGF 水解的最佳工艺条件, 采用正交试验的方法。根据上述的 3 个因素分别选取 3 个水平, 参考有关文献, 结果指出在反应过程中, 除反应时间外, 其余因素对维生素 E 影响不大, 可以不予考虑。就水解率而言, RODDTGF 水解的影响因素依次为: 反应时间 > 水/RODDTGF > 酶量/RODDTGF, 其优化条件为 V(水):m(RODDTGF) 15 mL/15 g、酶活:m(RODDTGF) 为 105 U/g、反应时间 7 h。但在实验中发现, 当反应时间为 7 h 时, 由于时间过长, 维生素 E 损失较大, 并且对后续的固定化酶反应不利, 易使酶失活, 故本实验中选为 5 h。

2.2.3 固定化酶的循环利用

由于脂肪酶相对较贵, 为了降低成本, 将固定化酶技术运用于 RODDTG 的水解反应中。在上述得到的优化条件下进行 RODDTG 的水解反应, 反应结束后倾出反应液, 而留下固定化脂肪酶, 供下一循环利用。结果显示, 固定化脂肪酶循环利用 4 次, 所得产品的水解率从 75% 降至 20%, 实验中发现, 该固定化酶在重复使用过程中, 存在较为严重的失活现象, 其活性中心不能与反应底物有效接触, 其稳定性不够理想, 有待于进一步研究以提高其稳定性。而液体脂肪酶则能更好地于反应底物接触, 起到更好的催化效果。

2.3 碱中和浓缩维生素 E

根据上述分子蒸馏和脂肪酶水解操作条件, 运用 0.5 mol/L 的 NaOH 中和水解产生的 FFA, 正己烷萃取干燥即得维生素 E 浓缩物, HPLC 测定显示纯度达到 17.3%, 回收率达到 85%。

3 结语

菜籽油脱臭馏出物经过 2 次分子蒸馏, 脂肪酶

水解和碱中和技术, 得到了纯度为 17.3% 的维生素 E, 是脱臭馏出物中维生素 E 含量的 5 倍左右, 回收率达到 85%。第 1 次分子蒸馏工艺条件为: 进料温度 50℃, 蒸发面温度 90℃, 系统压力 5.3 Pa, 刮膜转速为 150 r/min, 进料速度 120 mL/h。第 2 次分子蒸馏工艺条件为: 进料温度 80℃, 蒸发面温度 240℃, 系统压力 1.5 Pa, 刮板转速 150 r/min, 进料速度 120 mL/h。实验室得出的脂肪酶水解工艺条件为: V(水):m(RODDTGF) 为 15 mL:15 g、酶活:m(RODDTGF) 为 105 U/g、反应时间 5 h、反应温度 37℃。

参考文献

- [1] 樊明涛, 吴守一, 马海乐. 尿素包接法预浓缩 α -维生素 E 的试验研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(2): 106-109.
- [2] Watanabe Y, Nagao T, Hirota Y. Purification of tocopherols and phytosterols by in situ enzymatic reaction[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2004, 81(4): 339-345.
- [3] Ramamurthi S, McCurdy A R. Enzymatic pretreatment of deodorizer distillate for concentration of sterols and tocopherols[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1993, 70(3): 287-295.
- [4] Wang Hongtao, Goto M, Sasaki M, et al. Separation of α -tocopherol and squalene by pressure swing adsorption in supercritical carbon dioxide[J]. Industrial and Engineering Chemistry Research, 2004, 43(11): 2753-2758.
- [5] Buczenko G M, de Oliveira J, von Meien O. Extraction of tocopherols from the deodorized distillate of soybean oil with liquefied petroleum gas[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2003, 105(11): 668-671.
- [6] Chu B S, Quek S Y, Baharin B S. Factors affecting pre-concentration of tocopherols and tocotrienols from palm fatty acid distillate by lipase-catalysed hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2002, 79: 55-59.
- [7] 吴虹, 宗敏华, 娄文勇. 无溶剂系统中固定化脂肪酶催化废油脂转酯生产生物柴油[J]. 催化学报, 2004, 25(11): 903-908.
- [8] 李建武, 陈丽蓉, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2004.
- [9] 张新宇. 菜籽油脱臭馏出物中 V_E 琥珀酸酯的合成研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2004. ■