

Enzymatisk degumming af vegetabiliske olier

Novozymes har i en årrække haft en phospholipase ekstraheret fra svinekirtler, Lecitase 10L, til brug i bl.a. degumming af vegetabilisk olie. En nyudviklet mikrobiel phospholipase, Lecitase Novo, har en række forbedrede egenskaber til olie-degumming, hvilket har givet en mere simpel og robust degumming-proces med forbedret økonomi

Af Kim Clausen, kcl@novozymes.com og Per Munk Nielsen, pmn@novozymes.com, Novozymes A/S

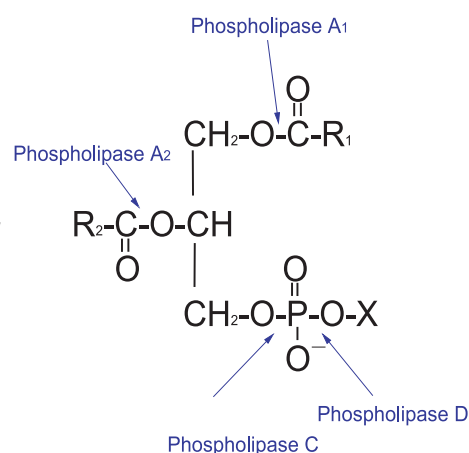
Formålet med at raffinere vegetabiliske olier er at fjerne uønskede indholdsstoffer, der har en negativ indflydelse på kvalitet og holdbarhed. Der er to raffineringsmetoder – benævnt henholdsvis kemisk og fysisk raffinering (henviser til måden hvorpå fedtsyre fjernes). Den mest almindelige raffineringsmetode til vegetabiliske olier er *kemisk raffinering*, hvor fedtsyrerne fjernes ved behandling med et overskud af NaOH. Et andet væsentligt indholdsstof, phospholipid¹ reduceres indholdsmæssigt til et niveau typisk mindre end 250 ppm (ca. 10 ppm målt som fosfor), som er et acceptabelt niveau inden næste trin. Efterfølgende bliver olien bleget² og deodoriseret. Ved *fysisk raffinering* starter man ofte med et vand-degumming trin³ fulgt af syre-degumming for at bringe phospholipidniveauet ≤ 250 ppm, neutralisering, blegning, damp-stripning for at fjerne fedtsyrer (heraf betegnelsen fysisk raffinering) og deodorisering.

Det er vigtigt at reducere indholdet af phospholipid mest muligt inden blegetrinnet, idet forbruget af blegejord øges uacceptabelt ved et øget phospholipidindhold. Et af problemerne med phospholipider er, at de ikke umiddelbart lader sig samle i vandfasen. Forbehandlingstrinnet skal hydratisere phospholipiderne, hvorefter de kan fjernes ved centrifugering.

Tabel 1. Sammenligning af phospholipaser fra svinepancreas (Lecitase 10L) og fra Fusarium oxysporum (Lecitase Novo) i olie-degumming-anvendelsen.

Karakteristika	Lecitase Novo	Lecitase 10L
Kilde	Microbiel (<i>F. oxysporum</i>)	Svinepancreas
Specifitet	A1	A2
Ca(2+)-afhængighed	Nej	Ja
Temp. (opt.)	45 °C	65 °C
pH (opt.)	5,0-5,5 (0,05% citronsyre + 1,5 eq. NaOH)	5,5-6 (0,1% citronsyre + 2,0 eq. NaOH)
Enzymdosis	~200 LEU/kg oil	~500 LEU/kg oil
Enzymrecykling	Nej	Ja
Fungerer ved lavt vandindhold	Ja	Nej

Figur 1. Phospholipases virkemåde. En generaliseret afbildning af et phospholipid, hvor X = OH, cholin, ethanolamin, inositol, osv. De forskellige angrebssteder for hydrolytisk spaltning ved diverse phospholipasetyper A1, A2, C og D er angivet med pile.



I den kemiske raffinering anvendes stærk base, og i den fysiske raffinering behandles olien med syre (citronsyre eller phosphorsyre).

Enzymprocessen – kendt under navnet EnzyMax-processen, som er udviklet og patenteret af Lurgi (et tysk ingeniørfirma) sammen med Röhm [1-3] – er et konkurrencedygtigt alternativ til syrebehandlingen i den fysiske raffinering. Ved den enzymatiske metode hydrolyseres phospholipiderne i olien af phospholipase til de korresponderende lyso-phospholipider, som er hydratiserbare eller endog vandopløselige og dermed kan centrifugeres fra.

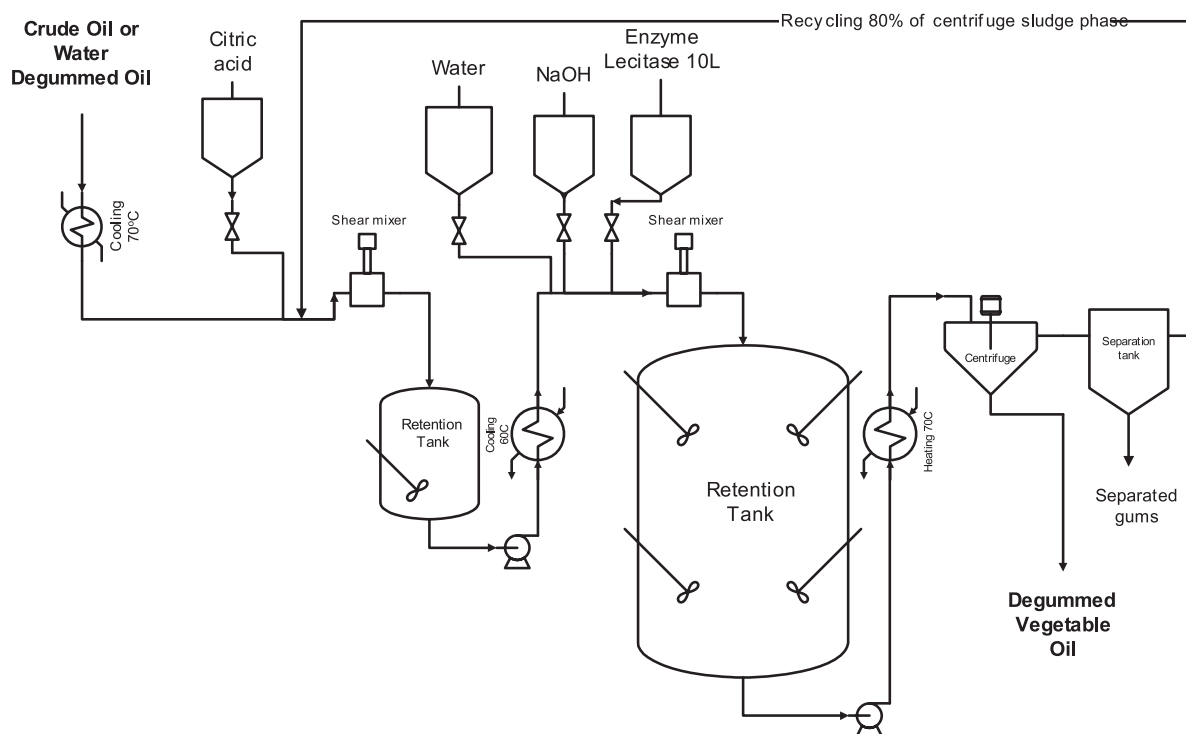
Phospholipaser udgør en klasse af hydrolytiske enzymer, som kan hydrolysere esterbindinger i phospholipider. I figur 1 er vist en generel struktur af et phospholipid, hvor –OX kan udgøres af hydroxyl eller mere komplekse strukturer som cholin, ethanolamin, serin, inositol osv. Hoved-phospholipasetyperne udgøres af phospholipase type A1, A2, C, og D med deres respektive angrebssteder som vist på figuren. I forbindelse med olie-degumming er hovedsageligt phospholipaser af type A1 og A2 relevante. Anvendelse af phospholipaser til andre formål end olie-degumming er beskrevet i nylige oversigtsartikler [4,5].

¹ Andre benævnelser for phospholipid er phosphatid eller lecithin. På engelsk benyttes benævnelsen gum – heraf betegnelsen degumming, som på dansk også kaldes aflecithinering.

² Blegning er en adsorptionsproces som udføres vha. blegejord (bentonit).

³ Også betegnet vanddrøring – behandling med varmt vand.

⁴ pH-måling i olie er som bekendt en vanskelig operation, men pH kan måles i den vandige slamfase, som skilles fra olien ved centrifugering. pH 5,5 er optimum for Lecitase 10L til olie-degumming; men til hydrolyse af phospholipid i vandigt medie er pH-optimum ca. 8,5.



Figur 2. Enzymatisk degumming-proces ved brug af Lecitase 10L.

Lecitase 10L (phospholipase type A2, ekstraheret fra svinebugspytkirtel)

Fra omkring 1995, hvor den industrielle anvendelse af phospholipase til olie-degumming startede hos Cereol/Mannheim i Tyskland, til 2000 var Lecitase 10L (produceret af Novo Nordisk nu Novozymes) det eneste enzym, som blev anvendt industrielt i EnzyMax-processen. Som vist i figur 2 bliver rå- eller vand-degummed olie blandet med citronsyre ved 70-75°C, der tilsættes NaOH for at indstille pH til ca. 5,5⁴, hvorefter blandingen afkøles til 60°C. Lecitase 10L (ca. 50 ppm) tilsættes og blandes i olien ved high-shear mixing. Efter en holdetid på 5-6 timer med mekanisk omrøring ved 60°C og pH 5,5 bliver olie/vand-emulsionen, der forlader reaktoren opvarmet til ca. 70°C for at muliggøre separation af olie og vandig slamfase ved centrifugering. Oliefasen sendes videre til det næste raffineringstrin, blegning, som vist i figur 2. Den vandige slamfase separeres i en tung fase og en vandfase. Den tunge fase benyttes til foder, og 80% af vandfasen, der indeholder citratbuffer og aktivt enzym, bliver recyklet i EnzyMax-processen. På den måde udgør vandforbruget omkring 1,5% i forhold til olieproduktionen. Enzymet ender til sidst i foder efter en ristningsproces som totalt denaturerer enzymet. De to oliemøller i henholdsvis Tyskland og Tjekkiet, som har benyttet Lecitase 10L til enzymatisk degumming, har været tilfredse med processen, men har imidlertid også udtrykt ønske om at få en phospholipase, der virker ved lavere pH, omkring pH 4,5-5, hvor risikoen for at få calciumcitratudfældninger i centrifugerne er mindre. Desuden er der ingen tvivl om, at recyklingen af slamfase har voldt en del besvær.

Screening efter mikrobiel phospholipase

Af flere forskellige grunde fandt Novozymes det ønskeligt at kunne tilbyde en ny phospholipase af mikrobiel oprindelse:

1. Produktionskapaciteten af Lecitase 10L er begrænset, idet enzymet ekstraheres fra svinebugspytkirtel.
2. Der er fra olieindustrien udtrykt ønske om at få en phospholipase med mere sur pH-optimum end Lecitase 10L

3. Lecitase 10L er naturligvis ikke kosher, mens et mikrobielt baseret phospholipaseprodukt vil gøre det muligt at producere et kosherprodukt

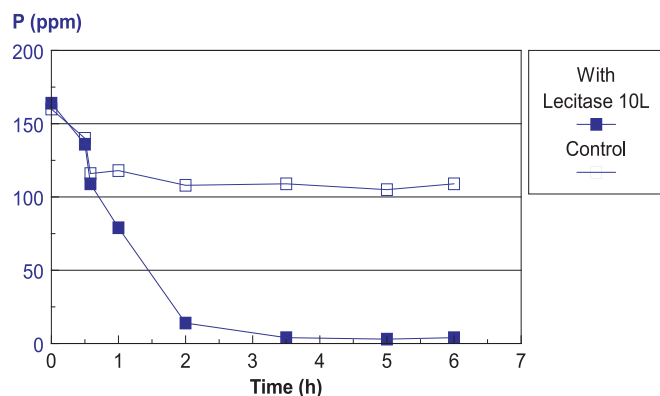
På den baggrund blev der etableret et program i Novozymes med henblik på at udvikle en mikrobiel phospholipase beregnet først og fremmest til olie-degumming-anvendelsen. Andre firmaers bestræbelser på at udvikle en mikrobiel phospholipase til anvendelse bl.a. i olie-degumming har ikke været succesfuld [6,7].

Der blev konstrueret en laboratorieopstilling til enzymatisk olie-degumming. Systemet bestod af en termostateret 1 l stålreaktor forsynet med stålåg, propel (600 rpm), bafler, termoføler, tilbagesvaler (4°C) monteret i låget, en udgangs-studs i bunden forbundet med silikoneslange til en Silverson in-line high-shear mixer med returstrøm til en indgangs-studs i låget. Den eneste forbindelse fra reaktor/mixer-systemet til atmosfæren var via tilbagesvaleren, så der ikke kunne foregå afdampning af vand med ændret vandindhold til følge. Til degumming-forsøg blev der anvendt ca. 0.6 l olie (typisk vand-degummed rapsolie leveret fra produktionslinien på Aarhus Oliefabrik med et phospholipidindhold svarende til ca. 200 ppm phosphor), hvortil der blev tilsat 0.1% w/w citronsyre, NaOH (0-3 ækvivalenter på molbasis i forhold til citronsyre) (efter 30 min) og phospholipase (efter yderligere 5 min). Vandindholdet blev varieret mellem 0,3 og 5% w/w i forhold til olien. Som standard blev der benyttet en reaktionstid på 5,5 timer med high-shear mixing. Der blev taget prøver til phosphoranalyse og pH-måling til tiderne 0, 1, 2, 3,5, 5 og 6 timer. For en mere detaljeret gennemgang af udstyr og metoder henvises til [8].

Effekten af Lecitase 10L i et olie-degumming-forsøg med rapsolie fra Aarhus Oliefabrik er vist i figur 3 (side 26). I enzymforsøget aftager phosphorindholdet i olien i løbet af ca. 3,5 timer til < 10 ppm i modsætning til kontrollen (uden enzym), hvor phosphorindholdet forbliver ved ca. 110 ppm.

Lecitase Novo (mikrobiel, fra *Fusarium oxysporum*)

Et eksempel på en ny mikrobiel phospholipase, som blev



Figur 3. Rest phosphorindhold i oliefasen som funktion af tiden i olie-degumming-eksperimenter med og uden enzym tilsat (vand-degummed rapsolie fra Aarhus Oliefabrik; citronsyre tilsat til $t = 0$, NaOH tilsat til 30 min., Lecitase 10L til 35 min.).

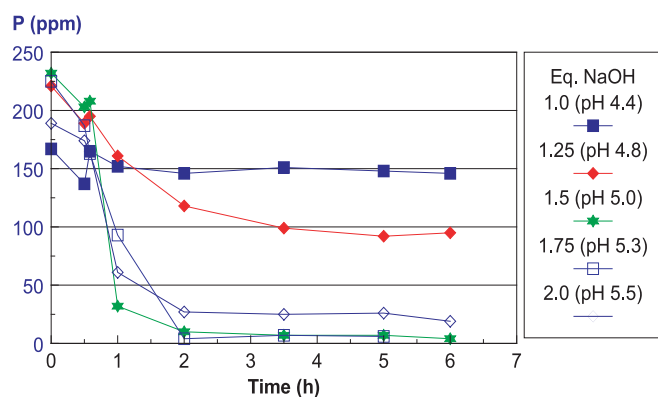
fundet i screeningsprogrammet, er en phospholipase fra svampen *Fusarium oxysporum*. Phospholipasen har fået det kommercielle navn Lecitase Novo.

Der blev udført et parameter-optimeringsstudie med hensyn til pH, temperatur, enzymdosis, og vandindhold.

I figur 4 er som et eksempel vist resultaterne fra pH-optimeringsstudiet udført med vand-degummed rapsolie ved 5% vand, 45°C, 0,1% citronsyre. Som det ses, virker phospholipasen optimalt ved 1,5-1,75 ækvivalenter NaOH, mens den har en temmelig stejl pH-profil til den sure side forstået på den måde, at der opnås sub-optimal degumming ved $\text{pH} \leq 4.8$. Temperaturprofilen viser, at Lecitase Novo virker fint i temperaturintervallet 30-45°C med optimum ved 40-45°C, men performance falder skarpt ved eller over 50°C. En DSC-kurve viser to endothermale overgange ved pH 5 – den første overgang ved 40,5°C og en anden overgang ved 59°C. Fra dosis/respons-optimeringsprogrammet konkluderes, at en enzymdosis på ca. 200 LEU/kg er optimal til den aktuelle rapsolie. Overraskende viste det sig, at vandindholdet kunne sænkes fra de normale 5% til ca. 0,3% uden nævneværdigt tab i degumming-performance, figur 5.

Sammenligning af Lecitase 10L og Lecitase Novo

De væsentlige enzymkarakteristika for de to phospholipaser, Lecitase 10L og Lecitase Novo, er vist i tabel 1. De to enzymer er forskellige på næsten alle punkter: specificiteterne er



Figur 4. Rest phosphorindhold i oliefasen som funktion af tiden i olie-degumming-eksperimenter med variation af pH fra 4,4-5,5 (vand-degummed rapsolie fra Aarhus Oliefabrik; vandindhold 5,0%, temperatur i alle eksperimenter 40°C, og enzymdosis 650 LEU/kg olie).

henholdsvis A2 og A1 (ifølge litteraturen [4]) vil 1-lysophospholipider dannet ved PLA1 undergå hurtig acyl-transfer, hvilket giver den mere stabile 2-lysophospholipid, så begge typer phospholipase vil give 2-lysophospholipid som produkt). Lecitase Novo afhænger i modsætning til Lecitase 10L ikke af calciumioner. Temperaturoptimum er lavere for Lecitase Novo. pH-optimum er lavere, perfekt afpasset til olie-degumming.

»Tør enzymatisk degumming«

På grund af Lecitase Novo's lavere termostabilitet kan enzymet ikke recykles i EnzyMax-processen, hvor en opvarmning til 65-75°C er nødvendig inden centrifugeringen, men det har i virkeligheden mindre betydning fordi Lecitase Novo virker til olie-degumming ved meget lavt vandindhold – som beskrevet ovenfor – og som det siden hen har vist sig ved væsentligt lavere citronsyreindhold, hvilket dermed gør recykling (for at spare vand og kemikalier) overflødig. Da det desuden er billigere at fremstille phospholipase ved fermentering end ved ekstraktion, sælges Lecitase Novo til ca. 1/5 af prisen for Lecitase 10L på aktivitetsbasis. Ved at sænke vandindholdet i den enzymatiske olie-degumming-proces fra de nuværende 5% til 1-2%, vil det være muligt for oliemøllerne at undgå recykling af den ofte problematiske slamfase, vandforbruget kan reduceres, og olieudbyttet kan på grund af det lavere vandindhold øges. Et procesdiagram for »tør enzymatisk degumming« ved brug af Lecitase Novo er vist i figur 6.

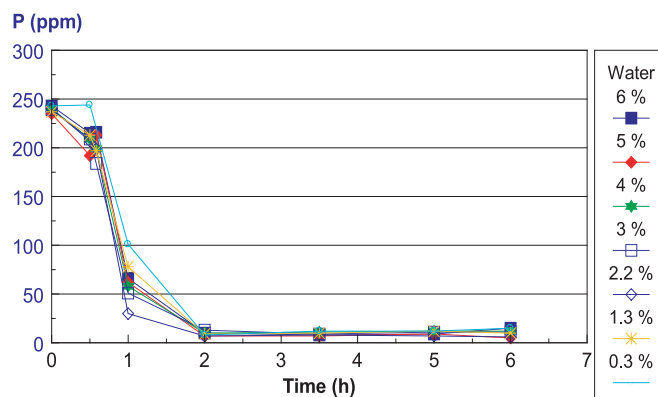
Fordele ved at benytte Lecitase Novo til »tør enzymatisk degumming« kan opgøres som følger:

- 1) økonomiske fordele: mindre vandforbrug, mindre spildevand, lavere pris til slamtørring, mindre kemikalieforbrug, forøget olieudbytte,
- 2) procesfordele: ingen problematisk slamrecykling, ingen citratudfældning i centrifugen, virker med både rå og vand-degummed olie, robust og stabil proces, og
- 3) kvalitetsfordele: phosphorniveau altid < 10 ppm, jern < 0.5 ppm efter degumming-trinnet, kosherprodukt.

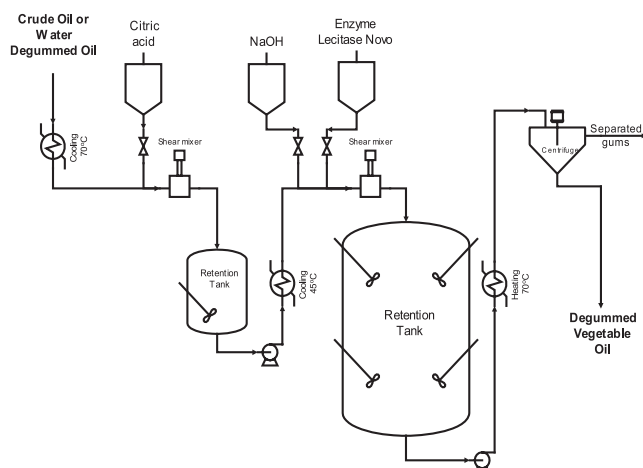
De variable omkostninger er så lave, at nødvendige investeringer til installation af processen har en meget kort tilbagebetalingstid.

Konklusion

Udgangspunktet for udvikling af processen har været raffinering af rapsolie, som generelt indeholder et relativt højt indhold af phospholipider. Det har siden vist sig, at også producenter af



Figur 5. Rest phosphorindhold i oliefasen som funktion af tiden i olie-degumming-eksperimenter med variation i vandindholdet fra 0,3-6% (vand-degummed rapsolie fra Aarhus Oliefabrik; temperatur i alle eksperimenter 40°C, pH 5,0, og enzymdosis 650 LEU/kg olie).



Figur 6. »Tør enzymatisk degumming«-proces ved brug af Lecitase Novo.

andre typer af olier finder processen rentabel. Således bliver der i dag også raffineret sojaolie og solsikkeolie ved brug af enzymatisk degumming. Den totale mængde vegetabilsk olie som produceres pr. år er ca. 85 millioner tons. Heraf udgør sojaolie, rapsolie og solsikkeolie henholdsvis 28%, 15% og 11% - tilsammen 54% af verdensproduktionen. Det er denne mængde, der er tilgængelig for den nye degumming-proces. Man må imidlertid være opmærksom på, at olieindustrien er relativ konservativ og ikke skifter proces i utide. I mange tilfælde vil der være tale om først at få overbevist en mølle om at skifte proces fra den traditionelle kemiske raffinering til fysisk raffinering og dernæst til at vælge enzymatisk degumming frem for de kemiske alternativer, der trods alt også findes.

Den enzymatiske degumming-metode benyttes i dag i industriel skala bl.a. hos Cereol/Mannheim/Tyskland til rapsolie (ca. 500 tons pr. dag), sojaolie og solsikkeolie.

Den enzymatiske degumming-proces har vist sig rentabel i industriel skala. Udviklingen i priser på energi, kemikalier, vand og spildevand bærer alle i samme retning af en stadig forbedring i rentabiliteten på enzymprocessen sammenlignet med den kemiske proces. Derfor forventes den enzymatiske proces at vinde indpas i et stadigt stigende antal procesanlæg over hele verden.

Referencer

1. Dahlke, K. and M. Eichelsbacher. EnzyMax and ALCON – Lurgi's route to physical refining. In: Emerging Technologies, Current Practices, Quality Control, Technology Transfer, and Environmental Issues. Eds. S.S. Koseoglu, K.C. Rhee, R.F. Wilson, AOCS Press, Champaign IL (USA) 1998, pp. 53-59.
2. Dahlke, K., H. Buchold, E.-W. Münch and B. Paulitz. First experiences with enzymatic oil refining. *INFORM 6* (1995)1284-1291.
3. Buchold, H. Enzymatische Phosphatidentfernung aus Pflanzenölen. *Fat.Sci.Technol.* 95 (1993) 300-304.
4. Ulbrich-Hofmann, R. Phospholipases used in lipid transformations. In: *Enzymes in Lipid Modification*. Ed. U.T. Bornscheuer, Wiley-VCH, Weinheim (Germany) 2000, pp. 219-262.
5. Grunwald, P. Preparation and application of immobilized phospholipases. In: *Enzymes in Lipid Modification*. Ed. U.T. Bornscheuer, Wiley-VCH, Weinheim (Germany) 2000, pp. 263-291.
6. Winter, B.H., K. Titze, and W. Marschner. Application of phospholipases in the edible oil industry. *Fett/Lipid* 100 (1998) 152-156.
7. Feng, Y., Y.-G. Joh, K. Ishikawa, H. Ishida, S. Ando, T. Yamagaki, H. Nakanishi, S. Cao, I. Matsui, and Y. Kosugi. Thermophilic phospholipase A2 in the cytosolic fraction from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 77 (2000) 1147-1152.
8. Clausen, K. Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. *Eur.J.Lipid Sci.Technol.* 103 (2000) 333-340.

Danish Biotechnology Conference VIII

May 23 - 24, 2002
Munkebjerg, Vejle, Denmark

Functional Genomics

Genome Sequencing and Bioinformatics

- Dr. R. Overbeek, Integrated Genomics, USA
- Professor S. Brunak, DTU, DK

Applied Genomics

- Professor Gunna Christiansen, Århus University, DK
- Assistant Professor Kaare Lehmann Nielsen, Ålborg University, DK
- Dr. H. de Winde, DSM, The Netherlands

Structural Genomics: From Gene to Protein Structure

- Professor Sine Larsen, University of Copenhagen, DK
- Professor Flemming Poulsen, University of Copenhagen, DK
- Dr. Julian Gough, Structural Studies Division, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK

Analysing the "Omics" of Structural Genomics

- Professor and director of DABIC P. Roepstorff, SDU, DK
- Dr. Steen Knudsen, DTU, DK
- Dr. Peter Mose Larsen, SDU, DK
- Dr. Ole Jensen, SDU, DK

Moving Towards Systems Biology

- Professor Steven Oliver, Manchester University, UK
- Professor Jens Nielsen, DTU, DK

A poster session covering all aspects of biotechnology and a commercial exhibition is included.

Organisers:

Danish Biotechnology Forum in collaboration with
The Danish Biotechnology Instrument Center

Danish Biotechnology Forum

Tel.: +45 9635 8470 Fax: +45 9814 1808
E-mail: ab@bio.auc.dk
http://www.bio.auc.dk