

超临界 CO₂ 状态下直接酯化法制备 共轭亚油酸甘油酯

李默馨, 刘 晶, 周晓丹, 高宇薇, 于殿宇*
(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 在超临界 CO₂ 状态下, 采用脂肪酶催化共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)与甘油反应制备共轭亚油酸甘油酯, 分别应用单因素和正交试验考察分子筛添加量、酶用量、反应压力、温度和时间对 CLA 酯化率的影响。结果表明, 最佳工艺条件为分子筛用量 6%、酶用量 4%、反应温度 60℃、反应时间 20h、反应压力 11MPa, 此条件下 CLA 的酯化率可达到 90.98%。这种 CLA 甘油酯的脂肪酸组成中, 9*c*,11*t*-CLA 和 10*t*,12*c*-CLA 的含量分别为 37.79% 和 41.66%。

关键词: 超临界 CO₂; 共轭亚油酸; 甘油酯; CLA 酯化率

Preparation of Conjugated Linoleic Acid Glyceride by Direct Esterification under Supercritical Carbon Dioxide

LI Mo-xin, LIU Jing, ZHOU Xiao-dan, GAO Yu-wei, YU Dian-yu*
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The lipase-catalyzed preparation of conjugated linoleic acid glyceride (CLA) from conjugated linoleic acid and glycerin under supercritical CO₂ was studied. The effects of the quantities of molecular sieve and enzyme addition, pressure, temperature and time on the esterification rate of CLA were investigated. The results showed that the optimal parameters for preparing CLA were as follows: in the attendance of 6% type 3A molecular sieve and 4% Novozym 435 lipase, reaction at 60 °C and 11 MPa for 20 h. Under these conditions, the esterification rate of CLA reached 90.98%. The contents of 9*c*,11*t*-CLA and 10*t*,12*c*-CLA was 37.79% and 41.66%, respectively in the CLA glyceride prepared.

Key words: supercritical CO₂; conjugated linoleic acid (CLA); glyceride; esterification rate of CLA

中图分类号: TS229

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0029-04

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是亚油酸的一组位置和几何异构体的通称, 科学证实 9*c*,11*t*-CLA 和 10*t*,12*c*-CLA 具有抑制肿瘤、抗动脉粥样硬化、降低生物体脂肪等生理活性^[1-2]。天然的共轭亚油酸主要存在于瘤胃动物牛、羊等的乳汁和肉制品中, 但含量很少^[3], 鉴于 CLA 的这些生理功能, 人们一直期望在膳食中含有一定量 CLA 的同时提高其吸收率。但 CLA 以游离酸的形式存在时, 易氧化, 口感不好, 且不易被身体吸收^[4-5], 因此制备 CLA 的甘油酯产品, 具有广阔的应用前景。

CLA 甘油酯产品的获得主要有化学法和酶法两种。传统应用于食品、医药、化工等行业的甘油酯产品主要是采用化学法催化油脂甘油制得的^[6], 但此法存在着

反应温度高、化学污染严重、产物色泽差等缺点; 目前, 国内外多以酶催化法合成, 该法在有机溶剂和无溶剂中反应都取得了较好进展, 但在超临界二氧化碳(SC-CO₂)状态酶法催化合成 CLA 甘油酯尚未见相关报道。SC-CO₂ 状态下酶反应, 是近年来生物工程新开拓的领域^[7]。当 CO₂ 达到临界温度(31.1℃)和压力(7.28MPa)以上时, CO₂ 显示出较大的溶解能力和较高传递特性, 从而可大大降低酶反应过程的传质阻力, 提高酶反应速率^[8]; 另外, SC-CO₂ 无毒、不可燃、化学惰性佳、易与反应物底物分离^[9]。这些优点和特点使其在食品工业上的应用具有广阔的发展前景。本实验以 CLA 和甘油为原料, 对超临界状态下酶法合成 CLA 甘油酯进行研究, 探讨反应压力、温度、时间、底物物质的量比、分

收稿日期: 2010-10-17

基金项目: 国家“863”计划项目(2010AA101503)

作者简介: 李默馨(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工及贮藏工程。E-mail: moxin89152936@163.com

* 通信作者: 于殿宇(1964—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为大豆加工技术。E-mail: dyu2000@yahoo.com.cn

子筛添加量和酶用量对酯化率的影响,为工业生产中有效获得 CLA 甘油酯提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

共轭亚油酸(80%) 青岛澳海有限公司;CLA 标准品 美国 Sigma 公司;Novozym 435 脂肪酶(酶活 1340U/g) 丹麦若维信公司;甲醇(色谱纯)、甘油(分析纯)、正己烷(色谱纯)、氢氧化钾(分析纯)、3A 分子筛 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

SHA-CA 水浴恒温振荡器 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;高压反应釜 江苏太仓市医疗器械厂;7890A 气相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司;高速离心机 北京医药公司;XW-80A 微型旋涡混合仪 上海沪西分析仪器厂;AR2140 电子精密天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 酶促酯化的方法

在反应釜中按 3:1 的物质的量的比加入 CLA 与甘油,同时加入转子和一定量的脂肪酶、分子筛,将反应釜密封后充入少量 CO_2 以置换出反应釜中的空气,同时试漏,确定反应釜密封情况良好后,在加压泵的作用下充入 CO_2 使反应釜内达到一定压力,然后将反应釜置于水浴锅中,调节转速至 100r/min,在一定温度下反应一定时间。

1.3.2 CLA 的测定与分析

取 1.3.1 节中液体产物 3~5 滴,称质量,采用无水硫酸钠过滤除去水分,以体积分数 1% H_2SO_4 -甲醇甲酯化^[10]后溶于正己烷,供气相色谱分析。CLA 的含量通过利用 CLA 标准品绘制的标准曲线算出。

气相色谱分析方法参考 Eulitz 等^[11]的方法。

1.4 CLA 酯化率计算

$$\text{CLA 酯化率} / \% = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100$$

式中: C_0 为反应初始体系中 CLA 的单位含量(g/g);
 C_t 为反应完毕后体系的游离 CLA 的单位含量(g/g)。

1.5 甘油酯的纯化

反应完毕后,取出转子,将反应釜内的物质在高速离心机的作用下离心除去固定化脂肪酶、分子筛和水。取上述物质溶于正己烷中,加入酚酞指示剂,用 0.1mol/L KOH-乙醇滴定,直至出现粉红色。加水洗分层,取上层旋转蒸发除去残存的溶剂^[12],得到共轭亚油酸甘油酯。

2 结果与分析

2.1 反应条件对 CLA 酯化率的影响

2.1.1 分子筛添加量对 CLA 酯化率的影响

分子筛添加量分别为 2%、4%、6%、8% 和 10% (质量分数)时,酶用量 2% (质量分数)、反应压力 8MPa、反应温度 50℃、反应时间 15h,分子筛添加量对 CLA 酯化率的影响见图 1。

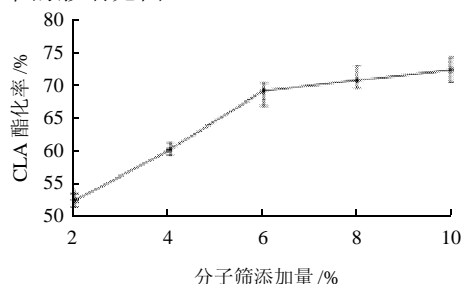


图 1 分子筛添加量对 CLA 酯化率的影响

Fig.1 Effect of type 3A molecular sieve amount on CLA esterification

由图 1 可知,分子筛添加量对 CLA 酯化率的影响较显著。CLA 酯化率随着分子筛添加量的增加而提高,这主要是由于 CLA 与甘油反应的副产物水分子能够及时被分子筛吸收,反应才能够持续向正向进行。当分子筛添加量达到 6% 时,CLA 的酯化率为 69.37%,分子筛用量继续增加时,CLA 酯化率的提高并不显著,反而有下降的趋势。这可能是由于酶反应主要在环绕着酶分子的水层内进行,底物分子必须先进入微水相,才能与酶作用,激发酶的活性^[13],当分子筛添加量过高时,体系中的水分子被分子筛吸收的过多,反而不利于酶反应的进行。因此分子筛添加量为 6% 较为适宜。

2.1.2 酶用量对 CLA 酯化率的影响

酶用量分别取 1%、2%、3%、4% 和 5% 时,分子筛添加量 6%、反应压力 8MPa、反应温度 50℃、反应时间 15h,酶用量对 CLA 酯化率的影响见图 2。

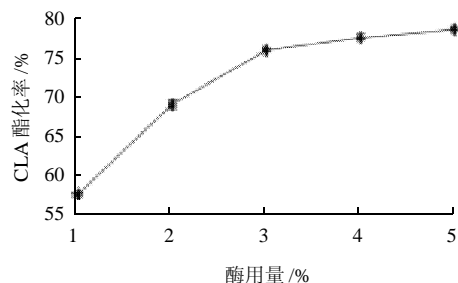


图 2 酶用量对 CLA 酯化率的影响

Fig.2 Effect of Novozym 435 lipase on CLA esterification

在超临界高压下,脂肪酶活力基本不受影响^[14]。随着酶用量的增加 CLA 的酯化率也随之提高,但当酶用量达到 3% 以上时,CLA 酯化率的增加趋势并不明显,这

可能是由于酶用量过高时催化反应速率加快, 分子筛用量相对不足, 不能吸收产生的水分子, 导致反应不能及时向正向进行。同时脂肪酶价格较高, 出于成本考虑, 酶用量选择 3% 最为适宜。

2.1.3 反应压力对 CLA 酯化率的影响

反应压力分别取 8、9、10、11、12MPa 时, 分子筛添加量 6%、酶用量 3%、反应温度 50℃、反应时间 15h, 反应压力对 CLA 酯化率的影响见图 3。

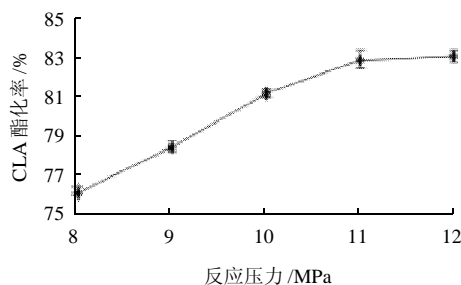


图 3 反应压力对 CLA 酯化率的影响
Fig.3 Effect of pressure on CLA esterification

由图 3 可知, 压力对脂肪酶本身体系影响不大, 主要是它影响了 SC-CO₂ 的性质, 从而影响反应速率及酯化率^[15]。一般随着反应压力的增加, 反应速率加快, 从而可相应缩短反应时间, 当压力达到 11MPa 以上时, CLA 酯化率的提高并不明显, 因此反应压力 11MPa 较为适宜。

2.1.4 反应温度对 CLA 酯化率的影响

反应温度分别取 40、50、60、70、80℃时, 分子筛添加量 6%、酶用量 3%、反应压力 11MPa、反应时间 15h, 反应温度对 CLA 酯化率的影响见图 4。

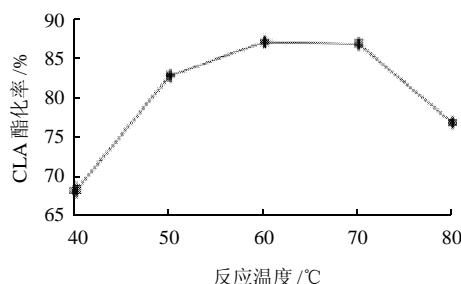


图 4 反应温度对 CLA 酯化率的影响
Fig.4 Effect of temperature on CLA esterification

由图 4 可知, 当温度从 40℃升至 60℃时, CLA 的酯化率随之逐渐上升, 这说明随着温度的升高脂肪酶的催化活性部位逐渐暴露, 发挥出较强的活性。当温度达到 60℃时, 脂肪酶催化活性达到极值, 之后酯化程度开始下降, 这有可能是由于较高温度致使酶部分失活而引起的。可见, Novozym 435 在催化酯化反应的最

佳温度在 60℃左右。

2.1.5 反应时间对 CLA 酯化率的影响

反应时间分别取 5、15、25、35、45h 时, 分子筛添加量 6%、酶用量 3%、反应压力 11MPa、反应温度 60℃, 反应时间对 CLA 酯化率的影响见图 5。

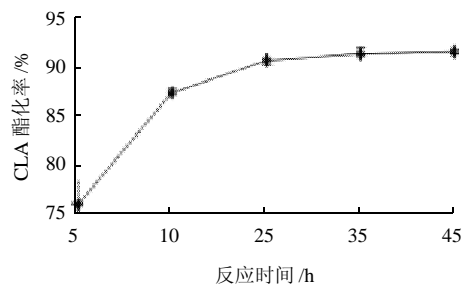


图 5 反应时间对 CLA 酯化率的影响
Fig.5 Effect of reaction time on CLA esterification

催化酯化反应过程中, Novozym 435 通常所需时间较长, 多在 24~48h, 但反应时间过长会直接影响酶的活力和重复利用。由图 5 可知, 随着反应时间的延长, CLA 的酯化率不断提高, 但当反应时间达到 25h 后上升效果并不显著, 这是因为随着反应时间延长, 底物浓度和酶活力开始降低, 反应速度逐渐减小, 酯化率的增长趋于平缓, 体系基本达到平衡。综合考虑反应时间以 25h 为宜。

2.2 最佳工艺参数的确定

表 1 CLA 酯化反应正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	分子筛用量 /%	酶用量 /%	反应温度 /℃	反应时间 /h
1	5	2	55	20
2	6	3	60	25
3	7	4	65	30

表 2 CLA 酯化反应正交试验设计及结果
Table 2 Scheme and experimental result of orthogonal array design

试验号	A	B	C	D	CLA 酯化率 /%
1	1	1	1	1	66.01
2	1	2	2	2	72.32
3	1	3	3	3	75.51
4	2	1	2	3	81.54
5	2	2	3	1	89.78
6	2	3	1	2	84.56
7	3	1	3	2	73.64
8	3	2	1	3	76.81
9	3	3	2	1	87.43
k ₁	71.280	73.730	75.793	81.073	
k ₂	85.293	79.637	80.430	76.840	
k ₃	79.293	82.500	79.643	77.953	
R	14.013	8.770	4.637	4.233	

主次顺序: A > B > C > D

在单因素试验基础上,保持反应压力11MPa,选择分子筛用量、酶用量、反应温度和反应时间设计四因素三水平正交试验(每一组合中安排了3次重复试验),从而优化超临界CO₂状态下酶法合成CLA甘油酯的反应条件。

表3 方差分析结果

Table 3 Variance analysis for CLA esterification

变异来源	SS	df	MS	F值	P值
A	296.5870	2	148.2935	10.26	0.0888
B	120.0003	2	60.0001	4.15	0.1941
C	36.9400	2	18.4700	1.28	0.4389
误差	28.8950	2	14.4475		
总变异	482.4223	8		5.23	0.1691

由表2极差分析结果可知,各因素对CLA酯化率影响的主次顺序为分子筛添加量>酶用量>反应温度>反应时间。由正交试验结果的直观分析可知,最优组合为A₂B₃C₂D₁,即反应条件为分子筛添加量6%、酶用量4%、反应温度60℃、反应时间20h。

由表3方差分析结果可知,A因素在 $\alpha=0.1$ 水平显著,D因素SS值相对较小,可作为误差项,由于没有交互作用,故为加性模型,即A、B与C的好水平组合表现一定好,因而可由直观分析判断有A₂B₃C₂参加的处理表现一定好于其他处理。

由于正交试验中无此组合,因最佳提取工艺不包含在正交试验设计表内,为了进一步验证结论的准确性,进行了验证实验。结果证明此条件下CLA的酯化率可达到90.98%。

2.3 共轭亚油酸的GC分析

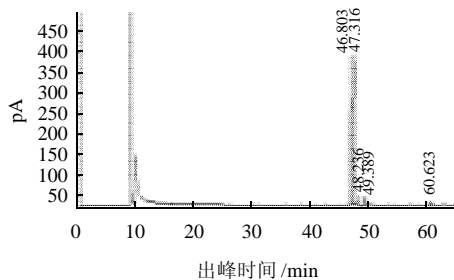


图6 CLA标准品的GC图

Fig.6 GC chromatography of CLA standard

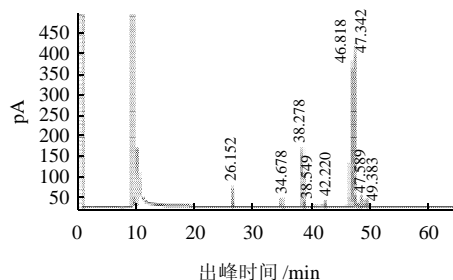


图7 CLA甘油酯的GC图

Fig.7 GC chromatography of CLA glyceride

CLA标准品、CLA甘油酯中脂肪酸组成情况的GC分析结果如图6、7。

由图6可知,在CLA标准品中,具有生理活性的CLA异构体,即9c,11t-CLA和10t,12c-CLA的含量分别为49.34%和48.74%,保留时间分别为46.803min和47.316min。在反应产物的GC图(图7)中,9c,11t-CLA和10t,12c-CLA分别在46.818min和47.342min时出现,含量分别为37.79%和41.66%,即反应产物的脂肪酸组成中,具有生理活性的脂肪酸含量高达79.45%。

3 结论

在超临界CO₂状态下酶法制备CLA甘油酯,通过单因素和正交试验的研究,确定最佳的制备工艺:分子筛添加量6%、酶用量4%、反应温度60℃、反应时间20h、反应压力11MPa,结果表明,此条件下CLA的酯化率可达到90.98%。CLA甘油酯的脂肪酸组成中,9c,11t-CLA和10t,12c-CLA的含量分别为37.79%和41.66%。此方法产生的CLA甘油酯属天然,绿色的结构脂质,能够满足特殊人群对CLA的需求。

参考文献:

- [1] 冯有胜,丁红梅. 共轭亚油酸的结构与性质[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(4): 93-97.
- [2] YAMASAKI M, KISHIHARA K, MANSO K, et al. Dietary conjugated linoleic acid increase immunoglobulin productivity of Sprague-Dawley rat spleen lymphocytes[J]. Bioscience, Biotechnology, Biochemistry, 2000, 64(10): 2159-2164.
- [3] HA Y L, GRIMM N K, PARIZA M W, et al. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in nature and processed cheeses[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1998, 37(1): 75-81.
- [4] LAWSON L D, HUGHES B G. Human absorption of fish oil fatty acid as triacylglycerols, free acid, or ethyl esters[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988, 152(1): 328-335.
- [5] IKEDA I, SASAKI E, YASUNAMI H, et al. Digestion and lymphatic transport of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids given in the form of triacylglycerol, free acid and ethyl ester in rats[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1259(3): 297-304.
- [6] 严梅荣,顾华孝. 共轭亚油酸合成方法的研究进展[J]. 中国油脂, 2003, 28(7): 40-42.
- [7] HAMMOND D A, KAREL M, KLIVANOV A M, et al. Applied biochemistry enzymatic reaction in supercritical gases[J]. Appl Biochem Biotechnol, 1985, 11(5): 393-400.
- [8] 李小港,周辉,何仁. 超临界条件下酯交换反应的研究[C]. 郑州: 中国化学会第九届全国络合催化学术讨论会, 2005.
- [9] 林志勇,裴爱泳. 超临界二氧化碳下酶法酯交换反应研究进展[J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(5): 78-82.
- [10] 寇秀颖,于国萍. 脂肪和脂肪酸甲酯化方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 46-47.
- [11] EULITZ K, YURAWECZ M P, SEHAT N, et al. Preparation, separation and confirmation of the eight geometrical cis/trans conjugated linoleic acid isomers 8, 10-through11, 13-18:2[J]. Lipids, 1999, 34(8): 873-877.
- [12] 张亚刚,吾满江·艾力,文彬,等. 酯交换法合成共轭亚油酸三甘油酯[J]. 精细化工, 2003, 20(6): 358-360.
- [13] 张永学,吾满江·艾力,刘勇. 酶催化合成共轭亚油酸甘油酯的溶剂效应[J]. 分子催化, 2006, 20(5): 438-442.
- [14] 林志勇,裴爱泳,王兴国. 超临界二氧化碳下酶法酯交换反应研究进展[J]. 中国油脂, 1997, 22(2): 26-28.
- [15] 瞿佳政. SCCC₂介质中棕榈酸甘油二酯酶促合成反应的研究[D]. 天津: 天津大学, 2009.