

## 酶法拆分制备共轭亚油酸功能单体

刘 峥<sup>1</sup>, 陈华勇<sup>1</sup>, 王永华<sup>2</sup>, 杨 博<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510006; 2. 华南理工大学 食品科学与工程学院, 广州 510640)

**摘要:** 研究利用 Lipase AYS 催化甲醇和共轭亚油酸 (CLA) 进行酯化反应, 以期对共轭亚油酸异构体进行拆分制备共轭亚油酸功能单体。通过考察酯化反应的影响因素, 确定了最优反应条件为: Lipase AYS 加酶量 180 U/g, 反应温度 40 °C, CLA 与甲醇摩尔比 1:1, 缓冲液 pH 6.5。在最优条件下反应 8 h, 总酯化率为 49.5%, 分离产物可以得到甲酯相与脂肪酸相, 甲酯相中 *c9, t11* - CLA 甲酯的拆分效率达到 86.2%, 脂肪酸相中 *t10, c12* - CLA 的拆分效率达到 80.0%, 两者回收率分别为 72.4% 和 54.2%。

**关键词:** 共轭亚油酸; Lipase AYS; 异构体分离; 回收率

中图分类号: TQ641; TQ033

文献标识码: A

文章编号: 1003 - 7969(2018)05 - 0054 - 04

## Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers to get functional monomers

LIU Zheng<sup>1</sup>, CHEN Huayong<sup>1</sup>, WANG Yonghua<sup>2</sup>, YANG Bo<sup>1</sup>

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2. School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The two functional monomers of conjugated linoleic acid (CLA) was fractionated by Lipase AYS - catalyzed esterification of methanol and CLA. The process of esterification was optimized by single factor experiment as follows: Lipase AYS amount 180 U/g, reaction temperature 40 °C, buffer pH 6.5, molar ratio of CLA to methanol 1:1. After reaction for 8 h under the optimal conditions, the total esterification rate was 49.5%. After separation of methyl ester and fatty acid from reaction mixture, the fractionation efficiency of *c9, t11* - CLA in methyl ester phase and *t10, c12* - CLA in fatty acid phase were 86.2% and 80.0%, and the recovery rates of the two monomers were 72.4% and 54.2%, respectively.

**Key words:** conjugated linoleic acid; Lipase AYS; isomer fractionation; recovery rate

共轭亚油酸 (Conjugated linoleic acids, CLA) 是一系列含有共轭双键、具有位置异构和几何异构的十八碳二烯酸的总称。由于其具有降低癌症发生率、抗动脉粥样硬化、改善免疫系统、减少脂肪沉积、降低体脂肪含量等多种生物活性功能, 因此受到广泛的关注<sup>[1-2]</sup>。天然存在的 CLA 主要以 *c9, t11* - CLA 异构体为主<sup>[3]</sup>, 工业上 CLA 主要通过红花籽油

或葵花籽油在丙二醇或乙二醇中通过碱催化异构化得到。此法制备的产品中含有几乎相等量的 *c9, t11* - CLA 和 *t10, c12* - CLA<sup>[4-5]</sup>。研究表明, *c9, t11* - CLA 和 *t10, c12* - CLA 是具有生理活性的主要异构体, 而这两种异构体有不同的生理活性, *c9, t11* - CLA 异构体具有抗癌、促进生长和提高免疫等作用, 而 *t10, c12* - CLA 异构体可调节脂肪代谢<sup>[6-9]</sup>。到目前为止, 国内外研究者还未能完全将各 CLA 异构体与其生物活性一一对应起来。因此, 拆分 CLA 异构体获得单一组分具有重要的意义。

CLA 异构体拆分方法主要有低温结晶、尿素包埋、酶法拆分<sup>[10-11]</sup>等。CLA 各异构体的物理及化学性质相近, 萃取、精馏等常规分离方法难以将其分

收稿日期: 2017 - 08 - 31; 修回日期: 2018 - 01 - 15

基金项目: 广东省科技计划项目 (省应用型研发重大项目) (2015B0202231006)

作者简介: 刘 峥 (1993), 男, 硕士研究生, 主要从事油脂化学方面的研究工作 (E-mail) 467387070@qq.com。

通信作者: 杨 博, 教授 (E-mail) yangbo@scut.edu.cn。

离,而酶法具有选择性高、反应条件温和、副产物少、绿色环保等优点,是拆分CLA异构体的最具潜力的方法。其原理是利用脂肪酶的特异选择性,在催化CLA酯化时,对不同异构体具有不同的催化酯化速度。即在某时刻,一种异构体主要以酯的形式存在,另一种则以脂肪酸的形式存在,进而达到分离的目的。

目前,CLA异构体的酶法拆分已有一些报道,多采用Lipase AY30催化反应,而采用来源于*Candida rugosa*的Lipase AYS拆分的鲜有报道。研究表明,Lipase AYS在手性拆分领域有良好的应用<sup>[12-13]</sup>。因此,本研究采用Lipase AYS催化酯化拆分CLA,探讨醇的类型、底物摩尔比、反应温度、加酶量等对拆分效果的影响,并对产物进行分离回收。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

Lipase AYS酶粉,购于杭州创科生物科技有限公司,经检测其水解酶活为12 000 U/g;共轭亚油酸,购于青岛澳海生物有限公司。

甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、无水硫酸钠、盐酸、氢氧化钾等,均为分析纯;气相色谱仪用正己烷,为色谱纯。

磁力搅拌器,Agilent 7890A型气相色谱仪(配有FID检测器),TDL-408型离心机,OV-351气相毛细管色谱柱。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 CLA的酶法拆分

向50 mL具塞锥形瓶中,加入10 g CLA,一定量的醇类和4 mL脂肪酶溶液(脂肪酶粉溶于不同pH的缓冲液),然后置于一定温度的磁力搅拌器中,300 r/min反应12 h,每隔2 h取样离心分离产物,取上层油样20  $\mu$ L于预先加入无水硫酸钠的EP管内,再加1 mL正己烷,混匀,离心取上清用于气相色谱分析。

#### 1.2.2 总酯化率的测定

酸值测定参照GB/T 9104.3—1988。总酯化率(ER)按照公式(1)计算。

$$ER = (AV_0 - AV_1) / AV_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: $AV_0$ 为原料CLA的酸值(KOH),mg/g; $AV_1$ 为反应一定时间后的酸值(KOH),mg/g。

#### 1.2.3 产物分析及拆分效率计算

色谱条件为:OV-351色谱柱(60 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m);载气流速1~3 mL/min;分流比30:1;进样量1  $\mu$ L;进样口温度250  $^{\circ}$ C,检测器温度300  $^{\circ}$ C;

升温程序为150  $^{\circ}$ C保持2 min,以4  $^{\circ}$ C/min升至230  $^{\circ}$ C,保持15 min。采用面积归一化法计算CLA异构体的相对含量。

拆分效率(E)按照公式(2)计算。

$$E = A_{\text{酯}-c9,t11} / (A_{\text{酯}-c9,t11} + A_{\text{酯}-t10,c12}) \times 100\% \quad (2)$$

式中: $A_{\text{酯}-c9,t11}$ 为气相色谱图中c9,t11-CLA酯部分的峰面积; $A_{\text{酯}-t10,c12}$ 为气相色谱图中t10,c12-CLA酯部分的峰面积。

#### 1.2.4 产物分离及回收率的计算

取10 g反应产物,加入70 mL用30%乙醇配制的0.5 mol/L KOH溶液,振荡,静置5 min,用100 mL正己烷萃取2次,合并上层有机相,旋蒸得到CLA酯;下层水相中的脂肪酸盐加入80 mL 0.5 mol/L的盐酸,静置5 min,再加入100 mL正己烷萃取2次,合并有机相,旋蒸得到CLA。

产物回收率 = 分离提取后得到的特定组分质量 / 原料中特定组分质量  $\times$  100%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酯化反应影响因素的考察

#### 2.1.1 羟基供体对酯化反应的影响

CLA异构体酶法拆分的拆分效率随酯化率的提高而下降<sup>[14-15]</sup>,但较低的酯化率会导致产物的回收率偏低。因此,CLA异构体的酶法拆分需兼顾拆分效率与总酯化率两个指标。

不同醇对CLA的酯化率和拆分效率均有较大影响。因此,本研究选择甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇等对CLA进行拆分。在反应温度为40  $^{\circ}$ C、pH为6.5、加酶量为180 U/g、CLA与醇摩尔比为1:1的条件下,考察不同醇对CLA总酯化率和拆分效率的影响,结果如图1和图2所示。

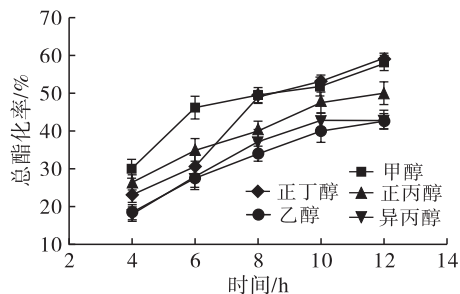


图1 不同醇对总酯化率的影响

由图1可见,在4~8 h 5种醇的酯化率在15%~50%之间,酯化速度大小为甲醇>正丁醇>正丙醇>异丙醇>乙醇。实验现象表明甲醇与油、水的相容性更好,有可能提高底物与酶的接触,加快了反应速度。从图2可以看出,5种醇对CLA异构体均有较好的拆

分效果,8~12 h 拆分效率均在 84%~88% 之间。综合考虑,选择廉价、易回收、酯化速度快的甲醇作为羟基供体,反应 8 h 即可得到较好的拆分效果。

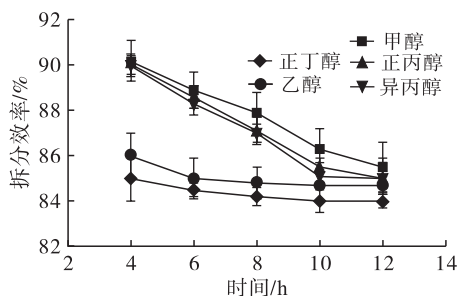


图2 不同醇对 CLA 异构体拆分效率的影响

### 2.1.2 反应温度对酯化反应的影响

温度可影响酶活和底物传热,从而影响酶促反应速度。在 pH 为 6.5、加酶量为 180 U/g、CLA 与甲醇摩尔比为 1:1 的条件下,考察反应温度对总酯化率的影响,结果如图 3 所示。

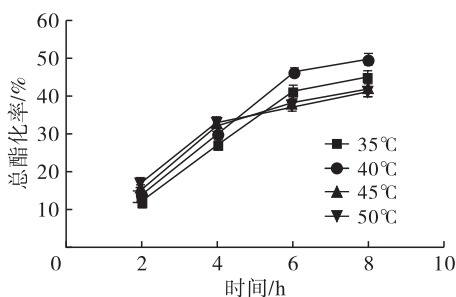


图3 反应温度对总酯化率的影响

由图 3 可见,反应初期,总酯化率均随反应温度的升高而升高;随着反应时间的延长,6 h、40°C 时的总酯化率明显高于其他温度。这可能是因为温度过高,反应时间过长,导致部分酶分子的结构遭到破坏,酶活下降。40°C、反应 8 h 的总酯化率可以达到 49.5%,此时的拆分效率为 87%。因此,确定最优的反应温度为 40°C。

### 2.1.3 加酶量对酯化反应的影响

增加加酶量可提高酯化反应速度,但会增加反应成本。在 pH 为 6.5、反应温度为 40°C、CLA 与甲醇摩尔比为 1:1 的条件下,考察加酶量对总酯化率的影响,结果如图 4 所示。

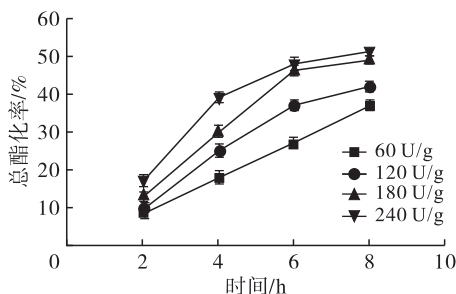


图4 加酶量对总酯化率的影响

由图 4 可见,当加酶量为 180 U/g 时,酯化反应 6 h,总酯化率可达 46%。进一步增加加酶量,总酯化率增加不明显;降低加酶量,反应达到该酯化程度需较长的时间。因此,综合考虑酶催化工艺的经济性,确定最优加酶量为 180 U/g。

### 2.1.4 缓冲液 pH 对酯化反应的影响

酶促反应需要适宜的 pH,强酸强碱的环境下,酶分子不能保持其活性结构,易丧失酶活。在反应温度为 40°C、CLA 与甲醇摩尔比为 1:1、加酶量为 180 U/g 的条件下,考察缓冲液 pH 对总酯化率的影响,结果如图 5 所示。

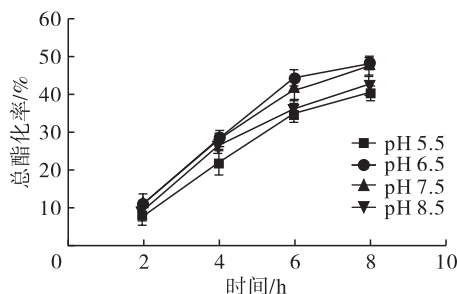


图5 缓冲液 pH 对总酯化率的影响

由图 5 可见,当缓冲液的 pH 为 6.5 和 7.5 时,反应 8 h 具有较好的总酯化率;当 pH 为 5.5 和 8.5 时,反应 8 h 的总酯化率较低。这说明该酶在近中性环境具有更高的催化活力,长时间的弱酸和弱碱可能会使部分酶分子的结构发生破坏,失去催化活性。比较 pH 为 6.5 和 7.5 的结果,确定最优 pH 为 6.5。

### 2.1.5 底物摩尔比对酯化反应的影响

底物摩尔比在一定程度上影响了酯化反应的速度和平衡。在反应温度为 40°C、加酶量为 180 U/g、pH 为 6.5 条件下,考察 CLA 与甲醇摩尔比对总酯化率的影响,结果如图 6 所示。

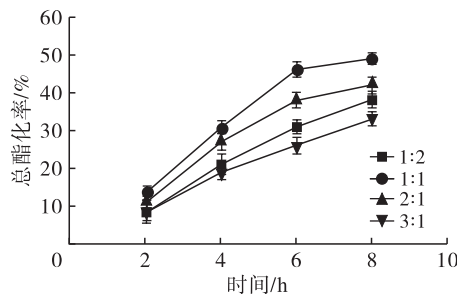


图6 底物摩尔比对总酯化率的影响

由图 6 可见,当底物 CLA 与甲醇摩尔比从 3:1 变化到 1:2 时,相同时间的总酯化率均先增加后降低。说明适当提高甲醇可增加底物浓度,促进酯化反应,但过量的甲醇可能会影响酶的活性,从而抑制酯化反应。因此,确定最优底物摩尔比为 1:1。

## 2.2 反应产物的分离及回收率

在最优条件下,反应8 h终止反应,CLA的总酯化率为49.5%。分离、收集可以得到脂肪酸和甲

酯。产物衍生化后经气相色谱确定组成,并计算拆分效率和回收率,结果如表1所示。

表1 产物组成、拆分效率及回收率

项目	脂肪酸							拆分效率	回收率
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	c9,t11-CLA	t10,c12-CLA	其他		
原料 CLA	3.1	2.7	10.4	1.4	38.7	38.5	5.2	-	-
甲酯	4.0	3.7	9.7	2.5	67.0	10.7	2.4	86.2	72.4
脂肪酸	2.2	3.5	10.3	1.3	16.0	64.1	2.6	80.0 <sup>a</sup>	54.2

注:a.脂肪酸的拆分效率定义为t10,c12-CLA占两种主要脂肪酸的比值。

由表1可知,在Lipase AYS催化CLA和甲醇酯化反应下,计算得到最终产品c9,t11-CLA甲酯和t10,c12-CLA的拆分效率分别为86.2%和80.0%,回收率分别为72.4%和54.2%。

## 3 结论

酶法拆分CLA异构体,获得纯度较高的活性单体具有很好的应用前景。本研究采用来源于*Candida rugosa*的Lipase AYS对CLA异构体拆分,并对产物进行了分离。在考察各个因素的影响后,确定了最优反应条件为:甲醇作为羟基供体,反应温度40℃,Lipase AYS加酶量180 U/g,缓冲液pH 6.5,CLA与甲醇摩尔比1:1。最优条件下反应8 h,CLA的总酯化率可达49.5%,最终产品中c9,t11-CLA甲酯和t10,c12-CLA的拆分效率分别为86.2%和80.0%,回收率分别为72.4%和54.2%。该工艺在兼顾酯化率和拆分效率的情况下,对两个活性单体实现了分离,是一种具有潜在工业应用价值的分离方法。

## 参考文献:

- [1] 刘家仁. 共轭亚油酸的抑癌作用[J]. 国外医学(卫生学分册),2000,27(1):18-22.
- [2] 王光文. 共轭亚油酸:防癌食品[J]. 乳业科学与技术,2001,24(2):15-16.
- [3] 陈忠周,李艳梅,赵刚. 共轭亚油酸的性质及合成[J]. 中国油脂,2000,25(5):41-45.
- [4] BHAITACHARYA A, BANUA J, RAHMANA M, et al. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease[J]. J Nutr Biochem,2006,17:789-810.
- [5] CHIN S F, LIU W, STORKSON J M, et al. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid: a newly recognized class of anticarcinogens[J]. Food Compos Anal, 1992(5):185-197.
- [6] BASSAGANYA-RIERA J, HONTECILLAS R, ZIMMERMAN D R, et al. Long-term influence of lipid nutrition on the induction of CD8 responses to viral or bacterial antigens[J]. Vaccine,2002,20(91/10):1435-1444.
- [7] AZAIN M J, ZHAUSMAN D B, SICK M B, et al. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number[J]. J Nutr, 2000, 130:1548-1554.
- [8] RAHMAN S M, WANG Y M, HAN S Y, et al. Effects of short term administration of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in white and brown adipose tissues of starved/refed Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats[J]. Food Res Int,2001,34(6):515-520.
- [9] PARIZA M W, PARK Y, COOK M E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid[J]. Prog Lipid Res, 2001,40(4):283-298.
- [10] BERDEAUX O, CHRISTIE W W, GUNSTONE F D, et al. Large-scale synthesis of methyl cis-9, trans-11-octadecadienoate from methyl ricinoleate[J]. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74:1011-1015.
- [11] KEPLER C R, TUKER W P, TOVE S B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: IV. Substrate specificity and inhibition of linoleate delta-12-cis, delta-11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens* [J]. J Biol Chem, 1970, 245(14):3612-3620.
- [12] SHINDE S D, YADAY G D. Insight into microwave assisted immobilized *Candida antarctica* lipase B catalyzed kinetic resolution of RS-(±)-ketorolac[J]. Process Biochem,2015,50:230-236.
- [13] ZHOU W J, YAN N, ZHENG G W, et al. Enzymatic resolution of a chiral chlorohydrin precursor for (R)-α-lipoic acid synthesis via lipase catalyzed enantioselective transacylation with vinyl acetate[J]. J Mol Catal B Enzym,2014, 99:102-107.
- [14] WANG Y H, LI X F, LIANG Y X, et al. Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification[J]. J Mol Catal,2007,46:20-25.
- [15] KOBAYASHI T, NAGAO T, WATANABE Y, et al. Enrichment of CLA isomer by selective esterification with L-menthol using *Candida rugosa* lipase[J]. J Am Oil Chem Soc,2006,83:93-98.