

桐油酶水解制备桐酸的工艺研究

唐克华¹, 成江², 张小勇³, 任春明³, 刘梁³

(1. 吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南张家界 427000; 2. 中国林业科学院林产化学工业研究所, 南京 210042; 3. 中粮工科(西安)国际工程有限公司, 西安 710082)

摘要:为探索利用桐油酶水解制备桐酸的合理工艺, 采用单因素实验考察了水解温度、水添加量和酶添加量对桐油水解率的影响, 在此基础上以桐油水解率和 α -桐酸保留率为指标, 运用响应面法对桐油酶水解工艺条件进行优化。结果表明: 桐油酶水解制备桐酸的最佳工艺条件为水解温度45℃、水添加量22%、酶添加量0.5%, 在此条件下桐油水解率为90.15%, α -桐酸保留率为98.26%。

关键词:桐油; α -桐酸; 酶水解; 响应面法

中图分类号: TS201.4; TS225.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)01-0085-04

Preparation of eleostearic acid by enzymatic hydrolysis of tung oil

TANG Kehua¹, CHENG Jiang², ZHANG Xiaoyong³, REN Chunming³, LIU Liang³

(1. Key Laboratory of Human Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, Hunan, China; 2. Institute of Chemical Industry of Forest Products, Chinese Academy of Forestry, Nanjing 210042, China; 3. COFCO ET (Xi'an) International Engineering Co., Ltd., Xi'an 710082, China)

Abstract: In order to explore the reasonable process for preparing eleostearic acid by enzymatic hydrolysis of tung oil, the effects of hydrolysis temperature, amount of water and amount of enzyme on hydrolysis rate of tung oil were studied by single factor experiment. Then with hydrolysis rate of tung oil and α -eleostearic acid retention rate as indexes, the enzymatic hydrolysis conditions of tung oil were optimized using response surface methodology. The results showed that the optimal process parameters for preparing eleostearic acid by enzymatic hydrolysis of tung oil were obtained as follows: hydrolysis temperature 45℃, amount of water 22% and amount of enzyme 0.5%. Under these conditions, the hydrolysis rate of tung oil was 90.15% and the α -eleostearic acid retention rate was 98.26%.

Key words: tung oil; α -eleostearic acid; enzymatic hydrolysis; response surface methodology

共轭亚麻酸(Conjugated linolenic acid, CLNA)是共轭十八碳三烯酸的一组位置和几何异构体, 主要以甘油酯的形式天然存在于植物种子油中^[1]。近年来, 大量研究表明共轭亚麻酸具有抗癌^[2-3]、减肥^[4]和增强机体免疫力^[5]等多种生理功能, 从而使其在化学、食品和医药领域受到广泛的关注。 α -

桐酸(α -eleostearic acid, α -ESA)是CLNA的一种异构体, 主要存在于桐油和苦瓜籽油中。不同产地桐油中, α -桐酸占其全部脂肪酸的70%~84%^[6-7]。Tsuzuki等^[8]研究发现, 富含 α -桐酸的脂肪酸对移植了人类结肠癌细胞株DLD-1的裸小鼠的结肠癌细胞生长有显著的抑制作用, 且抑制作用强于共轭亚油酸。陈红州等^[9]研究发现, α -桐酸对人子宫内膜癌细胞RL95-2的增殖能力有明显的降低作用, 且能够诱导RL95-2细胞的凋亡。因此, 利用桐油制备高纯 α -桐酸, 可为桐油的应用领域向医药、营养功能食品延伸提供条件。

目前, 油脂脂肪酸的生产技术主要有常压催化

收稿日期: 2020-05-07; 修回日期: 2020-08-25

基金项目: 湖南省教育厅科技计划项目(17A174)

作者简介: 唐克华(1965), 男, 教授, 硕士, 研究方向为植物提取与中药材产业开发(E-mail)923613505@qq.com。

通信作者: 刘梁, 硕士(E-mail)766088184@qq.com。

水解法、皂化法、高压水解法以及酶水解法^[10]。常压催化水解法适用于高度不饱和油脂的水解,至今依旧在小范围使用^[11]。皂化法生产成本较高,且产率低,废水污染严重,现已基本被淘汰^[12]。高压水解法设备要求高,投资较大^[13]。酶水解具有设备简单、耗能低、绿色环保以及反应条件温和等优势^[14-15]。因此,研究桐油酶水解制备高纯 α -桐酸工艺,对提升桐油资源的原料附加值和拓展应用领域,促进桐油产业提质增效及可持续发展具有重要意义。本研究利用酶水解桐油制备桐酸,以桐油水解率和 α -桐酸保留率为指标,在单因素实验的基础上采用响应面法优化工艺条件,以期酶水解法制备桐酸的工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

桐油(α -桐酸含量 82 g/100 g,酸值(KOH)3.1 mg/g,皂化值(KOH)192 mg/g),吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室提供。水解酶 Eversa@Transform 2.0(100 LCLU-SL/g),诺维信公司;甲醇(色谱级)、盐酸(分析纯)、氢氧化钾(分析纯)、正庚烷(色谱级)、硫酸氢钠(分析纯)等,天津科密欧试剂有限公司; α -桐酸标准品,由国家标准品网提供。

AUY220 分析天平,沈阳龙腾电子有限公司;PLUS2010 气相色谱仪,岛津。

1.2 实验方法

1.2.1 桐油酶水解制备桐酸

将桐油与一定量的水加入反应釜中,添加水解酶,密封,开启搅拌,密封恒温反应 20 h,随后 90 °C 加热 15 min 对酶灭活终止反应,旋转蒸发去除水分。以桐油水解率和 α -桐酸保留率为指标,探究桐油酶水解的最佳工艺。

1.2.2 桐油水解率的测定

按 GB 5009.229—2016 测定酸值;按 GB/T 5534—2008 测定皂化值。桐油水解率(X)按下式计算。

$$X = \frac{AV_0 - AV}{SV - AV} \times 100\% \quad (1)$$

式中: AV_0 为水解后产物的酸值(KOH),mg/g; AV 为原料的酸值(KOH),mg/g; SV 为原料的皂化值(KOH),mg/g。

1.2.3 α -桐酸保留率的测定

按 GB 5009.168—2016 中外标法测定 α -桐酸的含量。 α -桐酸保留率(Y)按下式计算。

$$Y = C_2 / C_1 \times 100\% \quad (2)$$

式中: C_1 为桐油中 α -桐酸的含量,g/100 g。

C_2 为桐油水解后产物中 α -桐酸的含量,g/100 g。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 水解温度对桐油水解率的影响

在水添加量 20%,酶添加量 0.5%,水解温度分别为 35、40、45、50、55 °C 条件下,考察水解温度对桐油水解率的影响,结果见图 1。

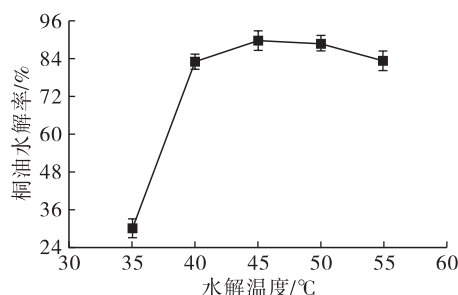


图 1 水解温度对桐油水解率的影响

由图 1 可知,随着水解温度升高,桐油水解率逐渐增加,当水解温度达到 45 °C 时,水解率达最高,为 89.67%。因此,水解温度应维持在 45 °C 左右较为适宜。

2.1.2 水添加量对桐油水解率的影响

在酶添加量 0.5%,水解温度 45 °C,水添加量分别为 5%、10%、15%、20%、25% 条件下,考察水添加量对桐油水解率的影响,结果见图 2。

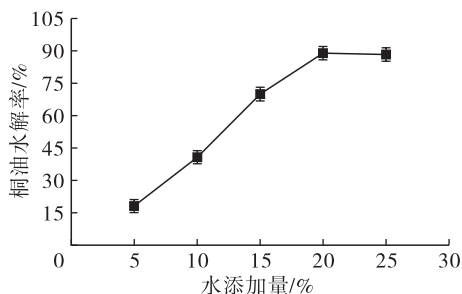


图 2 水添加量对桐油水解率的影响

由图 2 可知,随着水添加量的增加,桐油水解率逐渐增加,并在水添加量为 20% 时水解率达到最高,为 88.86%。随后,继续增加水添加量,桐油水解率无明显变化。因此,水添加量应为 20% 较适宜。

2.1.3 酶添加量对桐油水解率的影响

在水添加量 20%,水解温度 45 °C,酶添加量分别为 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6% 条件下,考察酶添加量对桐油水解率的影响,结果见图 3。

由图 3 可知,当酶添加量从 0.2% 增加到 0.5% 时,桐油水解率呈逐渐增加趋势。在酶添加量为 0.5% 时,桐油水解率为 88.73%,随后继续增加酶

添加量,桐油水解率无明显变化。因此,酶添加量控制在0.5%左右最佳。

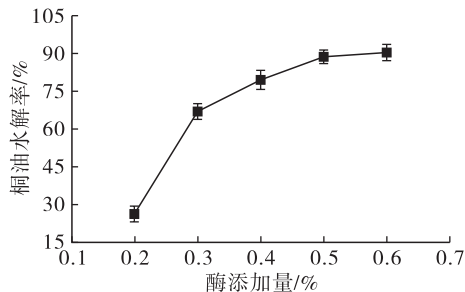


图3 酶添加量对桐油水解率的影响

2.2 响应面实验

2.2.1 响应面实验设计及结果

在单因素实验结果的基础上,运用 Box - Behnken 模型,以水解温度、水添加量和酶添加量为自变量,以桐油水解率和 α -桐酸保留率为响应值,优化桐油酶水解制备桐酸的工艺条件。响应面实验因素和水平见表1,响应面实验设计及结果见表2。

表1 响应面实验因素和水平

水平	A 水解温度/°C	B 水添加量/%	C 酶添加量/%
1	40	15	0.4
0	45	20	0.5
-1	50	25	0.6

表2 响应面实验设计及结果

实验号	A	B	C	桐油水解率/%	α -桐酸保留率/%
1	0	1	1	80.97	98.27
2	0	0	0	89.11	99.26
3	0	0	0	88.89	99.37
4	1	-1	0	52.87	96.21
5	0	0	0	89.97	99.18
6	0	-1	-1	46.15	96.03
7	0	-1	1	51.34	96.35
8	0	1	-1	70.18	97.08
9	1	0	1	82.06	98.22
10	0	0	0	88.90	99.62
11	-1	1	0	80.82	98.71
12	1	1	0	80.33	98.49
13	0	0	0	86.15	99.48
14	-1	0	1	82.13	98.20
15	-1	-1	0	45.15	96.15
16	1	0	-1	78.82	97.15
17	-1	0	-1	76.56	97.52

利用 Design - Expert8.0 统计软件对表2中数据进行二次多项回归拟合,获得桐油水解率(Y_1)与

α -桐酸保留率(Y_2)对水解温度、水添加量、酶添加量3个自变量的多元回归方程模型分别为: $Y_1 = 88.60 + 1.18A + 14.60B + 3.10C - 2.05AB - 0.58AC + 1.40BC - 3.04A^2 - 20.77B^2 - 5.67C^2$;
 $Y_2 = 99.38 - 0.064A + 0.98B + 0.41C - 0.070AB + 0.097AC + 0.22BC - 0.58A^2 - 1.42B^2 - 1.03C^2$ 。

2.2.2 方差分析与因素影响显著性检验

对桐油水解率回归方程进行方差分析和显著性检验,结果见表3。

表3 桐油水解率回归方程的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	11.09	1	11.09	2.67	0.146 5
B	1 704.99	1	1 704.99	409.78	<0.000 1 **
C	76.82	1	76.82	18.46	0.003 6 **
AB	16.85	1	16.85	4.05	0.084 1
AC	1.36	1	1.36	0.33	0.585 8
BC	7.84	1	7.84	1.88	0.212 2
A ²	38.90	1	38.90	9.35	0.018 4 *
B ²	1 816.74	1	1 816.74	436.64	<0.000 1 **
C ²	135.46	1	135.46	32.56	0.000 7 **
模型	3 915.03	9	435.00	104.55	<0.000 1 **
残差	29.12	7	4.16		
失拟项	20.81	3	6.94	3.34	0.137 4
纯误差	8.31	4	2.08		
总离差	3 944.15	16			

注:* 差异显著($P < 0.05$); ** 差异极显著($P < 0.01$)。下同。

由表3可知,模型 $P < 0.01$,说明本实验拟合的二次多项回归方程模型的差异极显著。失拟项 P 为 0.137 4,失拟不显著。调整相关系数(R_{Adj}^2)为 0.992 6,说明该模型能够解释 99.26% 的响应值变化。因此,该方程模型的拟合度较好,可以用于桐油酶水解制备桐酸的水解率分析预测。对回归方程模型进行系数显著性检验,得到 B 、 C 和 B^2 、 C^2 影响极显著, A^2 影响显著,说明水添加量和酶添加量对水解率有极显著影响,3 个因素对桐油水解率的影响能力大小依次为 $B > C > A$ 。

对 α -桐酸保留率回归方程进行方差及显著性检验,结果见表4。

由表4可知,模型的 $P < 0.01$,反映实验拟合的二次多项回归模型方程的差异极显著。失拟项 P 为 0.079 4,失拟不显著。调整相关系数(R_{Adj}^2)为 0.977 7,说明该模型能够解释 97.77% 的响应值变化。因此,该模型拟合度较好,可供 α -桐酸保留率的分析和预测。一次项 B 、 C 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 呈极显著影响,说明水添加量、酶添加量对 α -桐酸保

留率影响极显著,3个因素对 α -桐酸保留率的影响能力大小依次为 $B > C > A$ 。

表4 α -桐酸保留率回归方程的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	0.03	1	0.03	0.40	0.547 8
B	7.62	1	7.62	93.49	<0.000 1 **
C	1.33	1	1.33	16.29	0.005 0 **
AB	0.02	1	0.02	0.24	0.639 0
AC	0.04	1	0.04	0.47	0.516 7
BC	0.19	1	0.19	2.32	0.171 5
A ²	1.40	1	1.40	17.13	0.004 4 **
B ²	8.44	1	8.44	103.51	<0.000 1 **
C ²	4.50	1	4.50	55.14	0.000 1 **
模型	25.01	9	2.78	34.07	<0.000 1 **
残差	0.57	7	0.08		
失拟项	0.45	3	0.15	4.90	0.079 4
纯误差	0.12	4	0.03		
总离差	25.58	16			

通过回归方程模型的方差分析,得出桐油水解率和 α -桐酸保留率同时达到的最佳预测值分别为91.67%和99.61%时,其水解条件为水解温度44.71℃、水添加量21.82%、酶添加量0.46%。考虑实际操作条件调控便利,将该水解工艺条件修正为水解温度45℃、水添加量22%、酶添加量0.5%,然后进行验证实验,得到的桐油水解率为90.15%、 α -桐酸保留率为98.26%,该结果与理论计算预测值分别仅相差1.52、1.35个百分点,说明该回归方程模型的预测性较好,据其优化的工艺参数可靠。

3 结论

本文利用桐油酶水解制备桐酸,并在单因素实验的基础上利用响应面法对酶水解工艺进行了优化。结果表明,以同时达到最佳的桐油水解率和 α -桐酸保留率为目标,桐油酶水解的最佳工艺条件为水解温度45℃、水添加量22%、酶添加量0.5%。在最佳工艺条件下,桐油水解率可达90.15%, α -桐酸保留率为98.26%。

参考文献:

[1] 孙翔宇,高贵田,赵金梅,等. α -桐酸的研究进展[J]. 中国油脂, 2012, 32(10):52-56.
 [2] SUZUKI R, NOGUCHI R, OTA T, et al. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells[J]. Lipids, 2001, 36(5):477-482.
 [3] IGARASHI M, MIYAZAWA T. Preparation and

fractionation of conjugated trienes from α -linolenic acid and their growth inhibitory effects on human tumor cells and fibroblasts[J]. Lipids, 2001, 40(1):109-113.

- [4] ARAO K, WANG Y M, INOUE N, et al. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats[J/OL]. Lipids Health Dis, 2004, 3(1):24 [2020-05-07]. <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511x-3-24#citeas>.
- [5] YAMASAKI M, KITAGAWA T, KOYANAGI N, et al. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice[J]. Nutrition, 2006, 22:54-59.
- [6] 郑国灿,王晶,刘毅,等. 桐油脂肪酸组分GC-MS分析及产地特征研究[J]. 中国林副特产, 2014(6):14-16.
- [7] MOSIEWICKI M A, CASADO U. Polyurethanes from tung oil: polymer characterization and composites [J/OL]. Polym Eng Sci, 2009, 49(4):685-692 [2020-05-07]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pen.21300>.
- [8] TSUZUKI T, KAWAKAMI Y. Tumor angiogenesis suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. Carcinogenesis, 2008, 29(4):797-806.
- [9] 陈红州,王际辉,王晗,等. α -桐酸对子宫内腺癌细胞RL95-2凋亡的影响[R]. Bali Island, Indonesia: 2011 International Symposium on Biomedicine and Engineering, 2011.
- [10] 刘春媚. 油脂水解生产脂肪酸工艺选择[J]. 广东化工, 2014, 41(6):105-106.
- [11] 张世敏,查国君,张无敌,等. 废弃油脂常压水解制备混合脂肪酸的研究[J]. 现代农业科技, 2008(14):298,300.
- [12] 宋玉卿,刘春雷,于殿宇,等. 酶法催化大豆油脚脂肪酸制备生物柴油的研究[J]. 食品工业, 2008(4):68-71.
- [13] 范子昌. 油脂高压连续水解工艺[J]. 山东化工, 2013, 42(2):111-112.
- [14] 常致成. 酶催化油脂水解技术新进展及发展趋势[J]. 表面活性剂工业, 2000(3):5-10.
- [15] 臧佳辰,陶莎,薛璟怡,等. 火麻油脂酶水解条件的优化研究[J]. 中国油脂, 2013, 38(7):56-59.