

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.03.008

徐春晖, 王瑶, 杜俊民. 固定化脂肪酶 TLIM 催化制备低芥酸文冠果甘油酯[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(3): 75-80.

XU C H, WANG Y, DU J M. Preparation of low erucic acid glycerol from *Xanthoceras sorbifolia Bunge* by immobilized lipase TLIM[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(3): 75-80.

# 固定化脂肪酶 TLIM 催化制备 低芥酸文冠果甘油酯

徐春晖, 王瑶, 杜俊民✉

(山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619)

**摘要:** 以固定化脂肪酶 TLIM 作为催化剂, 以文冠果油为原料进行水解反应制备低芥酸文冠果甘油酯。通过单因素实验考察了酶添加量、反应时间、反应温度、水油摩尔比对水解反应的影响, 并采用正交实验对酶水解反应条件进行了优化。结果表明: 固定化脂肪酶 TLIM 催化制备低芥酸文冠果甘油酯的最佳反应条件为酶添加量(质量分数)5%、反应温度 45 °C、反应时间 5 h、水油摩尔比 30 : 1, 在该条件下文冠果甘油酯中的芥酸含量达到 4.86%。证明了文冠果油的芥酸分布在甘油三酯 1,3 位上, 神经酸含量保持在 1%左右。

**关键词:** 文冠果油; 芥酸; 正交实验; 脂肪酶; 神经酸

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2022)03-0075-06

## Preparation of Low Erucic Acid Glycerol from *Xanthoceras sorbifolia Bunge* by Immobilized Lipase TLIM

XU Chun-hui, WANG Yao, DU Jun-min✉

(College of pharmaceutical and food engineering, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China)

**Abstract:** Lipase TLIM was used as catalyst to prepare low erucic acid glyceride from *Xanthoceras sorbifolia Bunge* oil. The effects of enzyme addition amount, reaction time, reaction temperature and water/oil molar ratio on hydrolysis reaction were investigated by single factor test, and the hydrolysis reaction conditions were optimized by orthogonal test. The results showed that the optimal reaction conditions for the preparation of low erucic acid triglyceride from *Xanthoceras sorbifolia Bunge* catalyzed by immobilized lipase TLIM were as follows: enzyme dosage of 5%, reaction temperature of 45 °C, reaction time of 5 h, water/oil ratio of 30 : 1. Under these conditions, the content of erucic acid in *Xanthoceras sorbifolia Bunge* triglyceride reached 4.86%. It was proved that erucic acid of *Xanthoceras sorbifolia Bunge* oil was distributed in position 1 and 3 of triglyceride, and the content of nervonic acid was kept at about 1%.

**Key words:** *Xanthoceras sorbifolia Bunge* oil; erucic acid; orthogonal experiment; lipase; nervonic acid

收稿日期: 2021-12-15

基金项目: 山西中医药大学校级培育项目(2020PY-ZH-05)

Supported by: School-level Cultivation Project of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (No. 2020PY-ZH-05)

作者简介: 徐春晖, 女, 1997 年出生, 在读硕士生, 研究方向为中药新产品开发与应用。E-mail: xu1094276192@163.com.

通讯作者: 杜俊民, 男, 1968 年出生, 博士, 教授, 研究方向为天然产物萃取与分离。E-mail: dujmtcm@163.com.

随着全球人口老龄化,与年龄有关的神经退行性疾病越来越普遍,阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是老年人群中最常见的痴呆症<sup>[1]</sup>。最近的统计数据显示,全世界约有 5 000 万人患有阿尔茨海默症或其他类型的痴呆症,影响着全球超过 3 500 万人,年轻人也可能患 AD。患病后会导 致海马区以及大脑皮层大量淀粉样斑块沉积、神经原纤维缠结和特定脑区选择性神经元和突触丢失<sup>[2]</sup>。研究证明,神经酸能够恢复神经末梢活性,促进神经细胞生长和发育,能够明显治疗和预防阿尔茨海默病<sup>[3-4]</sup>。文冠果(*Xanthoceras sorbifolia Bunge*),别名文冠木、文官果、土木瓜、木瓜、温旦革子,为无患子科(Sapindaceae)文冠果属植物文冠果的木材或枝叶,是自然界富含神经酸的植物资源<sup>[5]</sup>。文冠果油占种子仁的 55%~65%,其中含有大约 95%的甘油三酯,具有预防和治疗高血压、血管硬化等心血管病的作用。张东等<sup>[6]</sup>检测到文冠果油芥酸含量为 8.41%,动物试验表明大量摄入含芥酸的油脂,心脏会是主要的中毒器官,可致心肌纤维化引起心肌病变,引起动物增重迟缓,发育不良。可能会对通过文冠果油摄取神经酸的心脏病消费者不利,同时限制了文冠果油的应用。尽管还未有确切报道表明其对人体的有害作用,但为保障人群健康,更应该加以重视文冠果油的质量,并采取行动<sup>[7]</sup>。联合国粮农组织及世界卫生组织已规定油脂中的芥酸含量应低于 5%。

目前人们主要通过基因育种培育低芥酸植物,达到降低芥酸的目的,这种方法耗费时间长,操作要求高,不利于工业化生产,市场上还没有出现低芥酸文冠果植物。相关文献研究表明,海甘蓝和高芥酸甘蓝型油菜油中的长碳链的芥酸主要位于甘油三酯的 Sn-1、Sn-3 位,而 Sn-2 位芥酸含量较低<sup>[8]</sup>。本实验选用了 Sn-1,3 位置专一性脂肪酶 TLIM<sup>[9]</sup>与文冠果油进行反应,脂肪酶 TLIM 可把甘油骨架的 Sn-1,3 位脂肪酸水解为游离脂肪酸。酶催化法具有催化效率高、反应条件温和、副反应较少、产品质量好和收率高等优点,文冠果油的酶解脱除芥酸工艺的研究还未见报道。

本文以文冠果油为原料,以芥酸含量为评价

指标,采用脂肪酶 TLIM 对酶解工艺条件进行优化,为降低文冠果油中的芥酸含量提高一些参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

文冠果油实验室自行榨取。

甲醇钠溶液(0.1 mol/L)、乙酸溶液(10% 体积分数)、硫酸甲醇溶液(0.1 mol/L)、正己烷、石油醚、无水乙醇、氢氧化钾、酚酞:市售分析纯;固定化脂肪酶 Lipozyme TLIM:北京 高瑞森科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

7890A 气相色谱仪:美国 Agilent 公司;800-1 离心机:惠智仪诚(北京)科技发展有限公司;85-2B 数显恒温磁力搅拌器:苏州威尔实验用品有限公司。

### 1.3 实验方 法

精确称量文冠果油,加入不同量的固定化脂肪酶 TLIM 和水,混匀,移入广口瓶中。不同温度条件下,反应一段时间,取出油样,使用离心机离心,取上层清液将甲酯化,利用气相色谱检测文冠果甘油酯的芥酸含量。

#### 1.3.1 酸价的测定

水解前后的样品其酸价用冷溶剂法测定。精确称取约文冠果油 5 g,溶解在 50 mL 石油醚和 95%乙醇(体积比为 1:1)的混合溶液中,滴加 0.15 mL 的酚酞指示剂(10 g/L, 10 g 酚酞溶解在 1 L 95%的乙醇溶液中),用 0.1 mol/L(实际浓度为 0.098 mol/L)的氢氧化钾乙醇标准溶液准确中和滴定。三份试样平行滴定,一份空白对照,取滴定所用氢氧化钾标准液的平均值,结果按以下公式计算。

$$S = \frac{56.1 \cdot V \cdot C}{m}$$

式中:m—称取油样的质量,mg;V—滴定所用氢氧化钾溶液的体积,mL;C—氢氧化钾溶液的实际物质的量浓度,mol/L;56.1—氢氧化钾的摩尔质量。

#### 1.3.2 不同甲酯化方法对比

取 5  $\mu$ L 文冠果油或最佳条件酶解后产物放置于 2 支试管中,分别加入 5 滴硫酸甲醇溶液,制

备成高酸价油脂甲酯化样品(酸价大于3.0);加入甲醇钠溶液(0.1 mol/L)制备成低酸价甲酯化样品(酸价小于3.0)。摇匀,室温反应30 min,加入5滴乙酸溶液(10%体积分数),摇匀终止反应,加入5~10滴正己烷,摇匀,静置15 min。

### 1.3.3 TLIM 酶添加量对芥酸含量的影响

取10 g文冠果油,加入质量分数分别为1%、3%、5%、7%、9% TLIM 酶,根据水油摩尔比为40:1加入水,在50℃下,反应0.5 h。

### 1.3.4 温度对芥酸含量的影响

取10 g文冠果油,加入质量分数7% TLIM 酶,根据水油摩尔比为40:1加入水,分别在40、45、50、55、60℃下,反应0.5 h。

### 1.3.5 反应时间芥酸含量的影响

取10 g文冠果油,根据水油摩尔比为40:1加入水,加入质量分数7% TLIM 酶,在45℃下分别反应2、3、4、5、6 h。

### 1.3.6 水油摩尔比对芥酸含量的影响

取10 g文冠果油,加入质量分数7% TLIM 酶,水油摩尔比分别控制为10:1、20:1、30:1、40:1、50:1,在45℃下,反应5 h。

### 1.3.7 正交实验

根据 TLIM 脂肪酶酶解条件的单因素测定结果,对酶添加量(A)、反应温度(B)、反应时间(C)、水油摩尔比(D)4个因素分别展开3个水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,具体因素及水平见表1。

表1 正交实验因素水平表

Table 1 The factors and levels of orthogonal experiment				
水平	因素			
	A 酶添加量/%	B 反应温度/℃	C 反应时间/h	D 水油摩尔比
1	5	40	4	20:1
2	7	45	5	30:1
3	9	50	6	40:1

### 1.3.8 气相色谱测定芥酸含量的色谱条件

色谱柱:30.0 m×320 μm 毛细管,膜厚0.25 μm,流速1 mL/min。柱箱:初始温度为180℃,平衡1 min,以20℃/min的速率保持4 min、运行4 min,以10℃/min的速率保持8 min、运行15 min;检测器:加热器250℃。采用面积归一化法定量。

## 1.4 数据分析

每个实验组设三个平行实验,数据采用Origin2018进行处理,正交设计助手专业版V3.1破解绿色版对数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 水解前后酸价的比较

根据图1文冠果油的酸价从1.12 mgKOH/g升高到126.06 mgKOH/g。

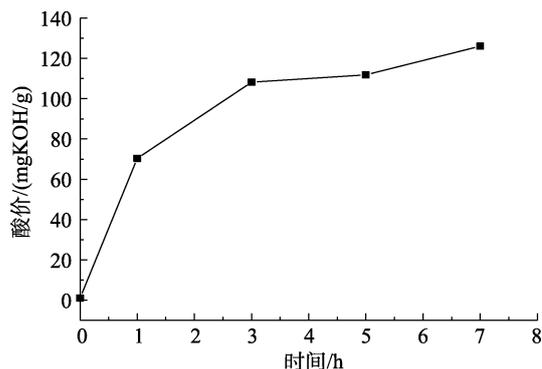


图1 文冠果油水解反应酸价的变化

Fig.1 Changes of acid value in the hydrolysis reaction of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge oil

### 2.2 不同甲酯化方法对比

混合物中的甘油三酯、甘油二酯、单甘酯都是沸点较高的油脂类物质,不容易气化,要分析脂肪酸组成和含量,需要预先进行衍生化,衍生化后的产物沸点变低,容易气化<sup>[10]</sup>。本实验采用酸法和碱法两种不同的甲酯化方法,对文冠果油进行衍生化。

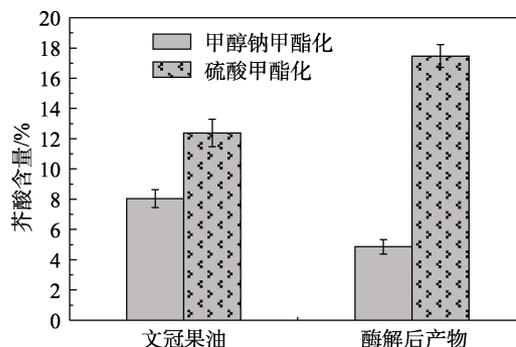


图2 两种甲酯化方法比较

Fig.2 Comparison of two methyl esterification methods

根据张浩对两种甲酯化方法进行对比的结果,碱法更适合甘油三酯的衍生化(酸价大于3.0),而酸法为游离脂肪酸的衍生化的最佳方法<sup>[11]</sup>。

从图 2 可以看出脂肪酶水解文冠果油后甘油三酯中的芥酸含量降低, 游离脂肪酸中的芥酸含量升高, 文冠果油的酸价从 1.12 mgKOH/g 升高到 126.06 mgKOH/g, 说明以甘油三酯为主的文冠果油转变为以游离酸形式为主, 脂肪酸存在形式发生转变, 同时检测到游离酸中芥酸含量由水解前 12.31% 增加到水解后的 17.51%, 可以初步断定芥酸从甘油三酯上水解下来, 变为游离芥酸。由于产品的最终形式为甘油三酯成分为主, 所以本实验均采用碱法甲酯化, 进行衍生化。

### 2.3 不同 TLIM 酶添加量对芥酸含量的影响

在水解的过程中起着催化作用的 TLIM 酶具有位置专一性, 能特异性水解甘油三酯 Sn-1,3 位上的脂肪酸, 本实验研究了不同 TLIM 酶添加量对酶解文冠果油芥酸含量的影响, 结果见图 3。

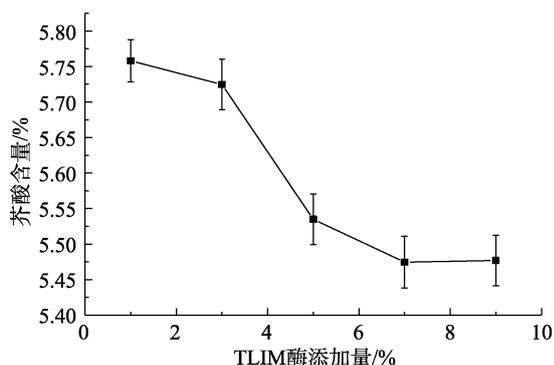


图 3 TLIM 酶添加量对芥酸含量的影响  
Fig.3 Effect of TLIM enzyme addition on erucic acid content

图 3 显示, 芥酸含量随着加酶量的增加先缓慢降低, 在 TLIM 酶质量分数为 7% 时达到最低后稳定。分析原因可能是酶主要催化剂的作用, 酶添加量较低时, 脂肪酶水解程度不够, 当 TLIM 酶质量分数为 7% 时, 酶与文冠果油的接触已经达到饱和状态, 催化反应趋于稳定。因此, 最佳 TLIM 酶添加量是质量分数为 7%。

### 2.4 不同酶解温度对芥酸含量的影响

在酶催化的过程中, 温度的变化不仅对酶的活性有很大的影响, 还会致使反应的热力学、动力学过程产生有很大的变化。实验研究了不同温度对酶解文冠果油芥酸含量的影响, 结果见图 4。

图 4 显示, 芥酸含量呈现先下降后增加的趋势。酶解温度低于 45 °C 时, 随着酶解温度的增

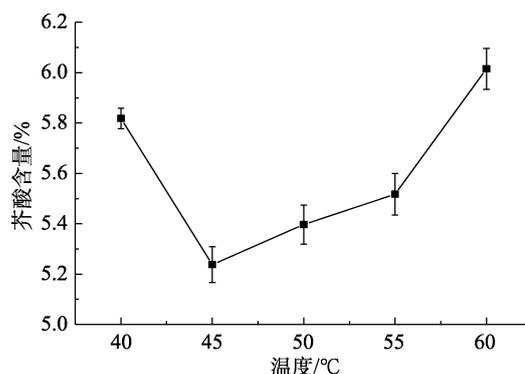


图 4 酶解温度对芥酸含量的影响  
Fig.4 Effect of enzymolysis temperature on erucic acid content

加, 芥酸含量不断下降, 45 °C 时芥酸含量达到最小, 当温度超过 45 °C 芥酸含量逐渐上升。原因可能是 Sn-2 位羟基与酶形成过度中间态所需的活化能要远高于 Sn-1(3) 位羟基, 先增加是由于温度升高加快了反应速率, 后减少便是因为酶的选择性降低, 反应速率会逐渐降低, 芥酸含量逐渐升高。综上考虑, 最佳酶解温度为 45 °C。

### 2.5 不同酶解时间对芥酸含量的影响

在催化反应的过程中, 反应时间与芥酸含量密切相关。本实验考察了不同反应时间对酶解文冠果油芥酸含量的影响, 结果见图 5。

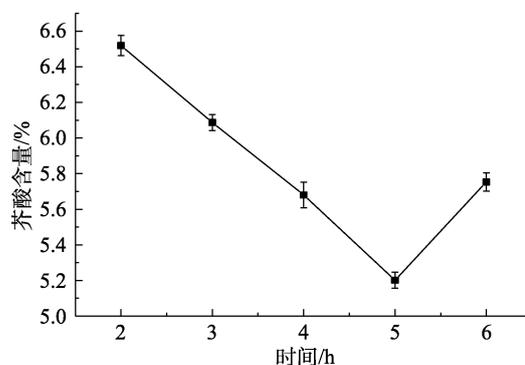


图 5 酶解时间对芥酸含量的影响  
Fig.5 Effect of enzymatic hydrolysis time on erucic acid content

图 5 显示, 随着酶解时间的增大芥酸含量逐渐升高, 5 h 时达到最小值, 随后逐渐升高。分析原因可能是脂肪酶的水解反应和酯化反应为可逆反应<sup>[12]</sup>, 随着酶解时间的增加, 被水解下来的游离芥酸逐渐升高, 与甘油、甘油一酯、甘油二酯发生酯化反应导致文冠果油甘油三酯上结合的芥酸含量略上升, 反应平衡被打破, 建立起新的平

衡。因此, 酶解反应时间 5 h 为最佳。

## 2.6 不同水油摩尔比对芥酸含量的影响

本实验考察了不同水油摩尔比对酶解文冠果油芥酸含量的影响, 结果见图 6。

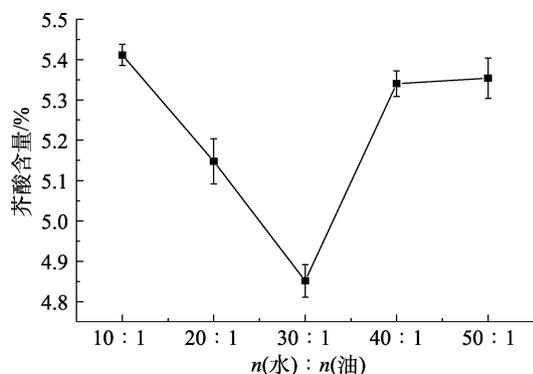


图 6 水油摩尔比对芥酸含量的影响

Fig.6 Effects of molar ratio of water to oil on erucic acid content

由图 6 可知, 随着水油摩尔比的增加芥酸含量逐渐降低后又升高至平稳, 分析原因可能是脂肪酶的活性中心部位被一个  $\alpha$  螺旋的“盖子”结构所覆盖, 当脂肪酶作用于油水反应界面时, 脂肪酶分子的构像发生变化<sup>[13]</sup>。 $\alpha$  螺旋的“盖子”打开, 催化中心与底物接触, 发生催化反应。当水油摩尔比较低时, 文冠果油与 TLIM 脂肪酶的接触少, 大多数脂肪酶的活性中心没暴露出来导致反应速率低; 随着水油摩尔比的增加, TLIM 脂肪酶与文冠果油可以充分接触, 脂肪酶活性中心充分暴露, 水解速率就会加快, 酶解程度升高, 但位置选择性会变差。综上考虑, 最佳水油摩尔比为 30:1。

## 2.7 正交实验结果

根据单因素实验结果, 对酶添加量 ( $A$ )、反应温度 ( $B$ )、反应时间 ( $C$ )、水油摩尔比 ( $D$ ) 4 个因素进行正交实验, 结果见表 2。

由表 2 可知,  $R_A > R_B > R_D > R_C$  可得出酶添加量是影响酶水解法降低芥酸含量的最主因素, 各因素对酶水解法降低芥酸含量的影响从强到弱依次是: 酶添加量 > 反应温度 > 水油摩尔比 > 反应时间。以芥酸含量为考察指标, 综合分析四个因素及三组水平得到最优条件应为  $A_1B_2C_2D_3$ : 酶添加量为 (质量分数) 5%、反应温度 45 °C、反应时间 5 h、水油摩尔比为 30:1, 得到芥酸含量最低 4.86%。

表 2 正交实验直观表  $L_9(3^4)$

Table 2 Intuitive Table of orthogonal experiment  $L_9(3^4)$

实验编号	因素				芥酸含量/%
	A 酶添加量/%	B 反应温度/°C	C 反应时间/h	D 水油摩尔比	
1	1	1	1	1	6.61
2	1	2	2	2	4.89
3	1	3	3	3	4.90
4	2	1	3	2	6.88
5	2	2	1	3	6.92
6	2	3	2	1	6.22
7	3	1	2	3	6.23
8	3	2	3	1	4.94
9	3	3	1	2	6.45
$K_1$	5.02	6.57	5.83	6.66	
$K_2$	6.67	5.14	5.73	5.43	
$K_3$	5.78	5.75	5.91	5.37	
$R$	1.66	1.44	0.19	1.29	

## 2.8 文冠果油酶解后脂肪酸组成

由表 3 可知, 文冠果油的主要脂肪酸为棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、二十碳烯酸、芥酸、神经酸。图 7 为文冠果油酶解前后气相色谱对比图, A 为文冠果油色谱图, B 为最优条件下酶解产物色谱图。在固定化脂肪酶 TLIM 的催化水解下甘油三酯上芥酸含量从酶解前的 8.04% 降低酶解后到了 4.86%, 且神经酸含量保持着 1% 左右 (酶解后为 0.98%)。确定甘油三酯 1,3 位上的芥酸水解为游离芥酸, 导致酸价升高, 脱除游离酸后可得到低芥酸文冠果油, 具体脱酸工艺实验室正在研究中。

表 3 酶解前后文冠果油组成成分

Table 3 Components of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge oil before and after enzymatic hydrolysis %

编号	脂肪酸	酶解前相对含量	酶解后相对含量
1	棕榈酸	2.30	4.96
2	硬脂酸	6.37	1.87
3	油酸	35.14	33.46
4	亚油酸	46.2	52.98
5	二十碳烯酸	0.43	0.68
6	芥酸	8.04	4.86
7	神经酸	1.50	0.98

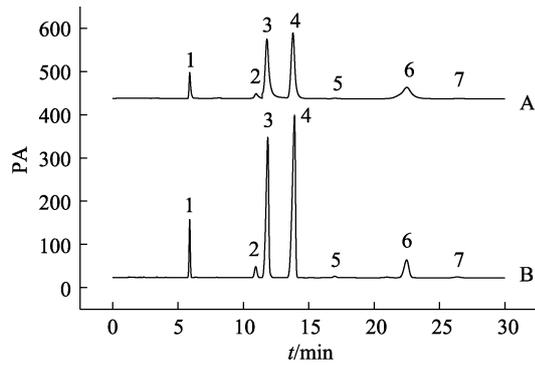


图 7 文冠果油及其水解产物的气相色谱图

Fig.7 Gas chromatogram of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge oil and its hydrolysates

### 3 结论

利用脂肪酶对文冠果油中芥酸进行水解,在酶添加量为(质量分数)5%、反应温度 45 °C、反应时间 5 h、水油摩尔比为 30 : 1 的优化工艺条件下,文冠果油甘油三酯上芥酸含量从酶解前的 8.04%降低酶解后到了 4.86%,芥酸含量降低了一半,达到了联合国粮农组织及世界卫生组织的规定,同时神经酸的含量保持在 1%左右,后期通过脱除游离酸可得到合格的低芥酸文冠果油。实验初步证明了芥酸分布在文冠果油的 Sn-1, 3 位,固定化脂肪酶 TLIM 能定向水解文冠果油的芥酸,实验结果也为低芥酸文冠果油的开发和工艺路线制定提供了可靠的支持。

### 参考文献:

- [1] LI W, LU Q L, LI X, et al. Anti-Alzheimer's disease activity of secondary metabolites from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge[J]. Food & function, 2020, 11(3): 2067-2079.
- [2] 米日妮萨·凯才尔, 闫楚涵, 郭慧芳, 等. 阿尔茨海默病的发病机制及相关研究进展[J]. 解剖学研究, 2021, 43(3): 276-281. MIJENISA K, YAN C H, GUO H F, et al. The pathogenesis and related research progress of Alzheimer's disease[J]. Anatomy Research, 2021, 43(3): 276-281.
- [3] HE X, LI D Z, TIAN B. Diversity in seed oil content and fatty acid composition in *Acer* species with potential as sources of nervonic acid[J]. Plant Diversity, 2021, 43(1): 86-92.
- [4] 刘速速, 周庆礼, 孙华, 等. 神经酸的功能及提纯工艺研究进展[J]. 中国油脂, 2019, 44(10): 142-146. LIU S S, ZHOU Q L, SUN H, et al. Advance in function and purification technology of nervonic acid[J]. China Oils And Fats, 2019, 44(10): 142-146.
- [5] 孔维宝, 梁俊玉, 马正学, 等. 文冠果油的研究进展[J]. 中国油脂, 2011, 36(11): 67-72. KONG W B, LIANG J Y, MA Z X, et al. Research advance of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge oil[J]. China Oils And Fats, 2011, 36(11): 67-72.
- [6] 张东, 薛雅琳, 段章群. 文冠果油脂肪酸、甘油三酯组成及其相关性分析研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(2): 26-29. ZHANG D, XUE Y L, DUAN Z Q. Study on the composition and correlation of fatty acid and triglyceride of *Xanthocera xanthocera* oil[J]. China Oils And Fats, 2017, 42(2): 26-29.
- [7] KNUTSEN H K, ALEXANDER J, et al. Erucic acid in feed and food[J]. EFSA Journal, 2016, 14(11): e04593.
- [8] 杜卓霖, 郭亮, 鲁少平. 甘蓝型油菜籽油 12 种子中含芥酸甘油三酯的空间分布[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(2): 338-345. DU Z L, GUO L, LU S P. Distribution of triacylglycerol containing erucic acid in seed of *Brassica napus* cv Wanyou 12[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2021, 43(2): 338-345.
- [9] 韦伟, 冯凤琴. sn-1,3 位专一性脂肪酶在食品中的应用[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(2): 122-128. WEI W, FENG F Q. Application of sn-1,3 specific lipase in food[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2012, 27(2): 122-128.
- [10] 王云超, 董华, 高健. 油脂中脂肪酸分析前处理酯交换法的研究[J]. 现代食品, 2021(10): 196-198. WANG Y C, DONG H, GAO J. Study of fatty acid analysis in oils and fats by pretreatment ester exchange method[J]. Modern Food, 2021(10): 196-198.
- [11] 张浩. 萝卜籽油的开发及应用[D]. 北京: 北京化工大学, 2016. ZHANG H. The development and application of radish seed oil[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2016.
- [12] 曹茜, 王丹, 袁永俊. 脂肪酶位置选择性及其应用在功能性结构甘油三酯合成中的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(11): 295-301. CAO Q, WANG D, YUAN Y J. Advances in lipase regioselectivity and its applications in synthesis of functional structured triacylglycerols[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(11): 295-301.
- [13] 李晓如. 脂肪酶在油水界面的构型变化及催化机理应用[D]. 太原: 山西大学, 2020. LI X R. Lipase configuration changes at the oil-water interface and application of its catalytic mechanism[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020.