

## 共轭亚油酸异构化技术研究进展

# Studies on Isomerization Technology of Conjugated Linoleic Acid

卢安根

LU An-gen

(广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

(Guangxi Research Center for Analysis and Tests, Nanning, Guangxi, 530022, China)

**摘要:**介绍共轭亚油酸(CLA)异构化技术的研究进展,评述异构CLA的碱性催化法、金属催化法和生物酶异构法。认为金属催化法效率高、成本低、经济环保,将成为今后工业化生产CLA的主要方法之一。构建高活性LA异构酶的基因工程菌是实现生物酶异构法产业化的重要前提。

**关键词:**共轭亚油酸 异构化 碱催化 金属催化 生物酶异构 基因工程菌

中图分类号:TS645.6 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2006)S0-0487-04

**Abstract:** The progress of isomerization technology of conjugated linoleic acid (CLA) was introduced. The methods of alkaline catalysis, metal catalysis and bio-enzymes isomerization were discussed respectively. The results showed that metal catalysis was typical of high efficiency, low cost and low contamination. Constructing gene engineering strains which produce high activity LA isomerase was an important presupposition for realizing industrialization with bio-enzymes methods.

**Key words:** conjugated linoleic acid (CLA), isomerization technology, alkaline catalysis, metal catalysis, bio-enzymes isomerization, gene engineering strains

共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, 缩写为CLA)是由亚油酸(Linoleic acid, 缩写为LA)衍生的共轭多烯的几何异构体和位置异构体的总称。这些异构体中主要是9c11t、9t11c、10t12t和10t12c-CLA。其中9c11t-CLA称为天然CLA,植物中不存在<sup>[1]</sup>。CLA具有抑制皮肤癌、胃癌、乳腺癌和结肠癌作用,同时在抗突变、提高免疫力、防止动脉硬化、减肥、抗糖尿病和促进骨骼形成等方面也具有多种重要的生理功能<sup>[2]</sup>。目前,对CLA的异构化技术主要有化学异构化法、生物酶异构化法。本文概述这些方法及最新研究进展。

## 1 化学异构化法

目前,共轭亚油酸的化学异构化法主要采用碱性催化、羟基脂肪酸脱水、金属催化等方法。

### 1.1 碱性催化法

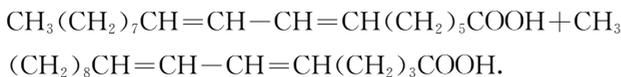
该法的主要反应机理是使含有LA的油脂在高温和碱性及碱性溶液条件下(包括碱的醇溶液和水溶液)皂化和水解,生成LA盐,LA盐在高温和碱的催化下将LA的C<sub>11</sub>上脱去1个质子,形成碳负离子,转化为CLA盐,经过酸化处理、有机溶剂萃取等步骤即可制得CLA。该法可以形成不同的共轭化产物<sup>[3]</sup>。

碱性催化法制备CLA的原料主要有:LA、富含LA的天然植物油。前者的价格比较高使得生产应用受到限制,但是在制备高纯度的CLA产品中有很好的前景。目前广泛使用的是含LA为50%以上的天然植物油,比如,玉米油、大豆油、棉籽油、红花籽油、葵花籽油,其中后两者用得最多。高油含量的天然盐生植物油逐渐成为人们研究开发CLA新原料<sup>[4]</sup>。碱性催化法生产CLA的溶剂也是多样,近年的研究主要集中在二元醇、多元醇上,其中最常用的是乙二醇<sup>[2]</sup>。

虽然碱性催化法是目前工业生产上应用最广泛的 CLA 制备技术,但是由于该工艺环境污染较大,副产物多,所得产品中 9c11t,10t12c-CLA 含量低,而且两者不易分离,使得该法的应用越来越受到限制<sup>[5]</sup>。

## 1.2 金属(合金)催化法

金属(合金)催化法的作用机理主要是在一定的温度和催化剂作用下,不另外提供 H<sub>2</sub>,而充入氮气作保护,抑制了 LA 的氢化加成反应,使其发生共轭化反应,生成 CLA,所以该法也称为氢化催化共轭法<sup>[6]</sup>。CLA 有多种异构体,以 9c11t,10t12c-CLA 这两种含量最多并且最具生理活性的异构体<sup>[3]</sup>为例,其化学反应式为:



该反应的催化剂主要有 3 种形式:单元体金属催化剂、复合体金属催化剂和金属有机化合物(配合物)。那些用于不饱和脂肪酸氢化反应的金属氢化催化剂基本都可以在 LA 共轭化反应中使用,因为只要控制不额外提供 H<sub>2</sub> 和其它催化反应条件就可以使不饱和脂肪酸双键发生异构化。较早采用的是金属有机化合物。1985 年,Basu 等<sup>[7]</sup>首先报道铈或铈阳离子配合物可以将红花籽油等油脂或非共轭脂肪酸在有机溶剂和氮气的保护下加热反应,催化异构生成共轭脂肪酸。常见金属化合物催化剂主要是羰基铬、二茂铁、Ru<sub>3</sub>(CO)<sub>12</sub>、钷化物等<sup>[2]</sup>,这类催化剂的特点是活性高,选择性好,用量少,反应温度和压力低,可以重复使用<sup>[8]</sup>,这些化合物需要在甲酸或相似酸等辅助剂(溶剂)存在时才能很好地发挥作用。Sleeter R T<sup>[9]</sup>研究使用甲酸、乙酸、苯乙酸、盐酸等有机酸或甲醇、乙醇、异丙醇等低级醇可以增强钨离子有机化合物的催化能力,其中以甲酸的催化效果最好,醇比酸的差。这类催化剂的缺点是使用贵重金属,生产成本低,而且金属羰基化合物容易有残留,使产品具有毒性<sup>[5]</sup>。所以,这类催化剂在食品行业少用,在工业生产油漆等非食品行业用得较多。

单元体金属催化剂一般有镍、铜、钼、钯、铂、钷等,其中镍作为催化剂是最早也是目前用得最多的。自从 1902 年 Norman 以镍为催化剂进行油脂氢化试验取得成功以来,单一镍作为催化剂在油脂氢化反应中广泛使用<sup>[10]</sup>。翁新楚等<sup>[6]</sup>以研碎的金属镍为

氢化催化剂,以含 75%LA 的红花籽油为原料,在氮气保护下,搅拌,升温反应,制取 CLA,镍用量为油重的 1.5%。工业上的镍催化剂通常将镍负载到硅藻土等多孔载体上,是为了增加反应面积。镍在工业催化剂中的含量一般是 20%~25%,硅藻土占 10%~15%,其余为油脂保护层<sup>[8]</sup>。金属铜作为催化剂的选择性比镍好,但活性较低,而且铜是油脂氧化的助氧剂,不利于油脂的稳定。镍基催化剂活性高,选择性差,这就促使单元体金属催化剂向多元体催化剂发展的重要原因。钯、铂等催化剂由于价格贵重,实际应用较少。

复合体金属催化剂的种类比较多,常见的复合体催化剂有镍-铜,铜-铬,镍-铝,镍-银(10:1)等。目前最典型的复合体金属催化剂是镍:铜(1:1)催化剂,在我国油脂氢化行业中较为常用,其特点是活化温度低,选择性好,原料价格便宜,容易回收再生,对 LA 的异构化为 CLA 的选择性好。冯清茂<sup>[11]</sup>报道以 Ni/Cu 合金为制备催化剂,月苋草油为原料,在高压反应釜中制备 CLA,取得较好的效果。有时也用到三元以上的多元体催化剂,这里不作详细介绍。

金属氢化催化剂的制备多采用煅烧法、浸渍法、沉淀法及化学混合法<sup>[8]</sup>。近年研究沉淀法较多。祝洪杰等<sup>[12]</sup>使用沉淀法制备含抗皂化性能的负载型镍催化剂,催化活性和抗酸中毒性优于美国催化剂 USA-40。邢英站<sup>[13]</sup>、胡涛<sup>[14]</sup>分别报道以活性炭、硅藻土、分子筛等惰性物质为载体通过沉淀法制作镍铜合金催化剂。

目前,我国对金属催化剂用于 LA 异构化为 CLA 的工业化应用研究还是比较少。由于使用金属元素氢化催化剂生产 CLA 具有反应温度低,效率高,操作简单,尤其是反应后无需大量的产物纯化工序,节约生产成本,无污染,经济环保等优点,所以这种技术在 CLA 生产上的应用前景非常广阔,它将是今后我国生产 CLA 的重要方法。

## 1.3 羟基脂肪酸脱水法

羟基脂肪酸脱水是合成 CLA 的重要途径。该法制得 9c11t-CLA 异构体可高达 97%产品,但是总得反应产率较低,而且反应中也会生成其他双键位置得共轭异构体,从而影响其广泛应用<sup>[5]</sup>。

## 2 生物酶异构化法

除了化学合成法外,CLA 也可以通过生物合成。主要由微生物异构合成。生物酶异构化法反应

条件温和,异构体组成较单一,与天然食物中得的 CLA 组成相似,其主要异构体是 9c11t-CLA<sup>[15]</sup>。因此对其研究比较重视。

### 2.1 生物酶异构化法的机理

反刍动物体内 CLA 是通过微生物将其生活环境中的 LA 等底物通过生物氢化完成的,CLA 是生物氢化的中间产物,其一部分扩散出瘤胃进入乳脂和体脂中,此外,由于乳腺组织和脂肪组织中含有  $\Delta^9$ -脱氢酶,能将生物氢化过程中的另外一部分中间产物 11t-18:1 转化成 9c11t-CLA<sup>[16]</sup>。在动物体外,人们通过发酵培养微生物来合成 CLA。也就是利用微生物体内的生物酶来催化合成的,如 *Lactobacillus*、*Clostridium*、*Butyrivibrio*、*Eubacterium* 等属的微生物具有 9c11t-LA 异构酶, *Propionibacterium* 微生物具有 12c10t-LA 异构酶<sup>[17]</sup>。

### 2.2 生物酶异构化法的菌种

很多微生物都可以作为生产 CLA 的菌种。已经研究发现在主要集中在瘤胃菌、乳酸菌、丙酸菌等,详见表 1。

表 1 产生 CLA 的菌种

菌种类型	菌种名称	文献
瘤胃菌	溶纤丁酸弧菌 ( <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> )	[18]
	埃氏巨型球菌 ( <i>Megasphaera elsdenii</i> )	[19]
	嗜酸乳杆菌 ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> )	[20,21]
乳酸菌	路氏乳杆菌 ( <i>L. reuteri</i> )	[22]
	乳酸乳球菌 ( <i>L. lactis</i> )	[23]
	发酵乳杆菌 ( <i>L. fermentum</i> )	[23]
	植物乳杆菌 ( <i>L. plantarum</i> )	[24,30]
	德氏亚乳杆菌 ( <i>L. debrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> )	[25,26]
	嗜热链球菌 ( <i>Streptococcus lactis thermophilus</i> )	[25]
	双歧杆菌 ( <i>Bifidobacterium</i> )	[27]
干酪乳杆菌 ( <i>Lactobacillus casei</i> )	[28]	
丙酸菌	费氏丙酸杆菌 ( <i>Propionibacterium freudenreichii</i> )	[29]

生物酶异构化法的关键是菌体细胞中 LA 异构酶活性以及发酵条件的优化。研究开发便宜、容易培养和可以食用的产 LA 异构酶的微生物是实现 CLA 工业化生产的前提。所以,筛选、改良高活性的产生 LA 异构化酶的微生物菌株以及优化发酵条件是当前生物酶异构化法生产 CLA 的重要内容和研究热点。张中义等<sup>[30]</sup>从酸菜汁中筛选出 1 株 CLA 生成能力较强的乳酸菌,经鉴定为植物乳杆菌,发酵液中的 CLA 生成量达 267.5 $\mu$ g/ml。刘晓华等<sup>[31]</sup>筛选到共轭亚油酸高产菌株——乳杆菌 L<sub>1</sub> (*Lactobacillus* sp.), 在 MRS 培养基中,底物 LA 最佳浓度是 0.1% (V/V),最适培养时间 42h。周凌

华等<sup>[32]</sup>从传统泡菜和生牛乳中筛选出 1 株乳酸菌 ZS2058 能生物合成共轭亚油酸,经 API 系统鉴定为植物乳杆菌,该菌株在 MRS 培养基中将质量分数 11.6% 的亚油酸 (1.024mg/ml) 转化为共轭亚油酸,经气相色谱分析证实 9c11t-CLA 占 75.9%, 10t12c-CLA 占 24.1%。周艳<sup>[33]</sup>、曹健<sup>[34]</sup>等报道分别以嗜酸乳杆菌为出发菌株,用紫外线、亚硝基胍单独和复合处理,获得 CLA 高产菌株。

### 2.3 生物酶异构化的基因工程学

对 LA 异构酶的基因工程学分析和改造是实现生物高效异构化的重要途径。目前,已经知道部分菌体异构化酶的氨基酸序列,如 *L. reuteri* LA 异构酶的全部氨基酸序列 (CAC25041) 和 NDA 序列 (序列号为 AX062045)<sup>[35]</sup>,相关 LA 异构酶基因的克隆仅在植物中有报道。1999 年,Edgar 等<sup>[36]</sup>从 *Momordica charantia* 和 *Impatiens balsamina* 中克隆到 2 个酶基因 MomoFadX (AF182521) 和 ImpFadX (AF182520),这 2 个酶能分别将 LA 及 C<sub>12</sub> 的双键转变为 11E 和 13E 的 2 个双键。2001 年,Xiao 等<sup>[37]</sup>从 *Calendula officinalis* 中克隆到酶基因 CoFac2,此酶能将 LA 的 C<sub>9</sub> 上的双键变为 2 个共轭双键,得到产物 t-8-t-10 CLA,这是目前唯一已经克隆的能合成的 CLA 的 LA 异构酶基因。

目前,由于现已筛选出的普通微生物细胞中 LA 异构酶的产量和活性都比较低,使得 CLA 的产率低,所以生物酶异构法还不能应用于工业生产。随着基因工程学的发展,能产生高活性 LA 异构酶的基因工程菌株将会出现,生物酶异构法生产 CLA 的工业化才能变为现实。

## 3 结束语

综上所述,共轭亚油酸的化学异构化法和生物酶异构化法都有各自特点,其中金属催化法由于效率高、成本低、经济环保,随着对金属催化法应用研究的深入,它将成为今后工业化生产 CLA 的主要方法之一。生物酶异构化法的催化专一性强,但是产率较低,构建高活性 LA 异构酶的基因工程菌是实现生物酶异构法产业化的重要条件。

### 参考文献:

- [1] 邓泽元,余迎利,John K G Kramer. GC 和 HPLC 对共轭亚油酸的测定[J]. 中国油脂, 2005, 30(3): 36-39.
- [2] 张英锋,李长江,包富山. 共轭亚油酸的结构、生理功能及来源[J]. 化学教育, 2005, 10: 6-9.
- [3] 张亚刚,吾满江,艾力,等. 共轭亚油酸几何异构体的形

- 成机制[J]. 新疆大学学报(自然科学版), 2003, 20(4): 386-389.
- [4] 刘春奎. 共轭亚油酸的生产方法[P]. 中国专利: CN1289785, 2001-03.
- [5] 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.
- [6] 翁新楚, 吴候, 李坤. 共轭亚油酸的制造方法[P]. 中国专利: CN1415718, 2003-05.
- [7] BASU A, BHADURI S. Process for the manufacture of conjugated polyenoic fatty compounds [P]. EP: 0160544, 1985-11.
- [8] 李全宏. 植物油脂制品安全生产与品质控制[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 121-125.
- [9] SLEETER R T. Method of conjugating double bonds in drying oils[P]. US: 5719301, 1998-02.
- [10] COENEN J W E. Hydrogenation of oils and fats[M]. Indian: J Oil Technol Assoc, 1969: 16-18.
- [11] 冯清茂, 李伟, 吴岩, 等. 月苋草油制备共轭亚油酸的研究[J]. 化学工程师, 2005, 118(7): 58-59.
- [12] 祝洪杰, 郭清华, 贺红军, 等. 不饱和脂肪酸氢化催化剂的研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2003, 16(3): 190-194.
- [13] 邢英站, 李秋小, 李运玲, 等. 催化加氢制备氢化蓖麻油的研究[J]. 日用化学工业, 2004, 34(1): 25-27.
- [14] 胡涛, 周伟, 金叶玲, 等. 镍基催化剂在食用油脂氢化中性能研究[J]. 粮食与油脂, 2005(4): 22-24.
- [15] 刘晓华, 曹郁生, 陈燕. 微生物生产共轭亚油酸的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(9): 69-72.
- [16] BAUMAN D E, BAUMGARD L H, CORL B A, et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants[C]. Proceedings of the American Society of Animal Science, 1999.
- [17] 熊向峰, 陈朝银, 赵声兰. 亚油酸异构酶及其性质[J]. 工业微生物, 2002, 32(4): 51-58.
- [18] KERLER C R, TOVE S B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acid: III. Purification and properties of a linoleate  $\Delta^{12}$ -cis,  $\Delta^{11}$ -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1967, 242(24): 5686-5692.
- [19] KIM Y J, LIU R H, RYCHLIK J L, et al. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92: 976-982.
- [20] LIN T Y, LIN C N, LEE C H. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid[J]. Food Chemistry, 1999, 67: 1-5.
- [21] OGAWA J, MATSUMURA K, KISHINO S, et al. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12 octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by lactobacillus acidophilus [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(3): 1246-1252.
- [22] PARIZA M W, YANG X Y. Method of producing conjugated fatty acids[P]. 专利号: 6060304, 公开日: 2000-05. United States Patent: 6,060,304.
- [23] KIM Y J, LIU R H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(5): 1731-1736.
- [24] KISHINO S, OGAWA J, OMURA Y, et al. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic bacteria[J]. J AOCS, 2002, 79(2): 159-163.
- [25] LIN T, Y HUANG T H, CHENG T S J. Conjugated linoleic acid production by immobilized cells of lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus and lactobacillus acidophilus[J]. Food Chem, 2005, 92(1): 23-28.
- [26] 于国萍, 寇秀颖. 产共轭亚油酸乳酸菌的选育及培养基的确定[J]. 食品工业科技, 2005(5): 60-62.
- [27] DEOK-KUN OH, GEUN-HWA HONG, YUJIN LEE, et al. Production of conjugated linoleic acid by isolated bifidobacterium strains [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2003, 19: 907-912.
- [28] 邵群, 边际, 马丽, 等. 乳酸菌发酵产生共轭亚油酸条件的研究[J]. 山东师范大学报(自然科学版), 2001, 16(4): 443-446.
- [29] JIANG J, BJOROK L, FONDEN R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 85: 95-102.
- [30] 张中义, 胡锦涛, 刘萍, 等. 产共轭亚油酸乳酸菌的筛选及产物分析[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(3): 5-8.
- [31] 刘晓华, 曹郁生, 陈燕. 产共轭亚油酸乳酸菌的筛选及生产条件的研究[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(B11): 3-5.
- [32] 周凌华, 张灏, 陈卫, 等. 生物合成共轭亚油酸菌种筛选与鉴定[J]. 无锡轻工大学学报: 食品与生物技术, 2004, 23(5): 53-57.
- [33] 周艳, 张兰威. 共轭亚油酸高产菌株选育及其发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(6): 28-31.
- [34] 曹健, 魏明, 曾实, 等. 一株嗜酸乳杆菌突变株转化亚油酸为共轭亚油酸条件的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(9): 76-79.
- [35] 张浩, 曹健, 常共宇, 等. 亚油酸异构酶研究进展[J]. 中国油脂, 2004, 29(10): 38-42.
- [36] EDGAR B, CAHOON T J. Biosynthetic origin of conjugated double bonds: production of components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos [J]. PNAS, 1999, 96(22): 12935-12941.
- [37] XIAO QIU, DARWIN W REED. Identification and analysis agent from calendula officinalis encoding a fatty acid conjugase [J]. Plant Physical, 2001, 25(125): 847-855.