

响应面法优化黄秋葵籽油中 亚油酸的共轭转化率

刘芸, 苏平*, 宋思圆

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058)

摘要: 为了提高黄秋葵籽油中亚油酸的共轭转化率, 在单因素实验的基础上, 根据中心组合(Box-Behnken)设计实验, 以共轭亚油酸(CLA)的得率为响应值进行响应面分析, 并建立了相应的回归模型。黄秋葵籽油中亚油酸共轭转化的最佳工艺条件为: 反应时间4 h, 反应温度162 °C, 籽油/KOH为1.9(mL/g), 丙二醇/籽油为2.0(mL/mL), CLA转化率为74.20%, 其中反应温度对转化率影响最大, 反应时间与反应温度的交互作用显著。经验证, 实测值(74.20%)与模型预测值(76.99%)基本一致, 说明响应面法优化黄秋葵籽油中亚油酸的共轭转化工艺可行。

关键词: 共轭亚油酸, 黄秋葵, 单因素, 响应面分析

Optimization of conjugate conversion rate of linoleic acid in okra seed oil by response surface method

LIU Yun, SU Ping*, SONG Si-yuan

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: In order to improve the conjugate conversion rate of linoleic acid in okra seed oil, the Box-Behnken experimental design was performed on the basis of one-factor experiments, and the response surface analysis and corresponding regression model were established with conjugated linoleic acid (CLA) yield as response value. The optimum conditions of conjugate conversion were obtained as follows: reaction time of 4 h, reaction temperature of 162 °C, oil against KOH at ratio of 1.9(mL/g), propylene glycol against oil at ratio of 2.0(mL/mL), and the conversion rate of CLA was 74.20%. Conversion rate was greatly affected by reaction temperature and the interaction of reaction time and temperature was significant. The measured data (74.20%) was almost accorded with the predicted data (76.99%). It demonstrates that the conversion condition parameter optimized by response surface method was credible and feasible.

Key words: conjugated linoleic acid; okra; one-factor experiments; the response surface analysis

中图分类号: TS229

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)24-0273-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.051

黄秋葵又名秋葵、羊角豆、补肾草、洋辣椒等, 属锦葵科秋葵属一年生草本植物^[1], 20世纪90年代初引进中国, 近年来得到广泛种植, 作为一种营养保健蔬菜受到了广大消费者的喜爱^[2]。黄秋葵种子中富含大量不饱和脂肪酸, 其中亚油酸含量达到40%之多, 油脂含量约为23%^[3], 可以成为制备CLA的优质原料。黄秋葵老果中种子产量丰富, 但不乏不成熟、粒小、机械破损不适于栽种的种子, 把这些种子收集起来用于油脂提取, 不但合理利用废弃资源, 还可以增加农产品附加值, 带动黄秋葵产业的发展。

共轭亚油酸是含有顺式或反式共轭双键的十八碳二烯酸, 与亚油酸形成位置和构象上的异构体, 其中c9, t11-CLA和t10, c12-CLA具有生物学功能。

大量人体及动物实验表明, CLA具有多种生理功能, 如降脂、抗氧化、抗癌、促进骨骼健康、提高免疫力、防治糖尿病、抗动脉粥样硬化、增加肌肉等^[4-8], 被誉为“21世纪的新型营养素”。但是, 天然CLA只少量地存在于反刍动物或植物油脂中, 工业化则以富含亚油酸的种子(如红花籽油^[9])为原料通过高温碱法异构来制备CLA。目前, 以黄秋葵种子为原料制备CLA的研究尚未见报道, 溶剂丙二醇无毒性, 使得高温碱法异构变得安全可行。本研究以黄秋葵种子中亚油酸为原料, 通过高温碱法异构制备CLA, 旨在丰富CLA制备的原料来源, 同时实现黄秋葵种子废弃物的综合利用, 为种子的进一步深加工提供理论基础。

收稿日期: 2015-06-12

作者简介: 刘芸(1989-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工, E-mail: liuyun_0908@163.com。

* 通讯作者: 苏平(1962-), 男, 副教授, 研究方向: 果蔬加工, E-mail: 623801545@qq.com。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

黄秋葵植物油(亚油酸含量40.32%) 自制;CLA 甲酯标准品 Sigma公司;高纯氮气、氢氧化钾、丙二 醇、盐酸、正己烷、氯化钠 均为分析纯。

电子天平 上海菁海仪器有限公司;智能数显 多功能油水浴锅 上海贝仑仪器设备有限公司; SHI-III型循环水真空泵、RE-52AA旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;UV-2550紫外可见分光光度计 日本岛津有限公司;Agilent 7890B气相色谱仪 安捷 伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CLA的检测 紫外分光光度法:参考潘群文 等^[10]方法,略有修改。取原油及共轭化产物各0.1 g用 正己烷定容到10 mL容量瓶中,摇匀,移取0.1 mL再 次定容到10 mL,摇匀,移取1 mL定容到10 mL,振荡 摇匀,采用紫外分光光度计,以纯正己烷作参比,在 200~300 nm进行全波段扫描,查看共轭化产物在 231~233 nm间是否有最大吸收峰,如果有最大吸收 峰出现,证明亚油酸已经转变为共轭亚油酸。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 反应时间对共轭转化率的影响 分别取3.0 g 催化剂KOH与12 mL溶剂丙二醇加入圆底烧瓶置于 油浴锅中,接入冷凝管在氮气保护下充分加热溶解, 温度达到170 ℃后加入6 mL黄秋葵植物油,分别反 应1、2、3、4、5 h后,取出冷却至室温加盐酸中和,调 节pH3左右,后用适量正己烷溶解,转移至分液漏斗, 加正己烷萃取3次,合并后用5%食盐水水洗至中性, 收集正己烷相于40 ℃旋转蒸发后氮吹即得含CLA的 产物。

1.2.2.2 反应温度对共轭转化率的影响 分别取3.0 g 催化剂KOH与12 mL溶剂丙二醇加入圆底烧瓶置于 油浴锅中,接入冷凝管在氮气保护下充分加热溶解, 温度分别达到140、150、160、170、180 ℃后加入6 mL 黄秋葵植物油,在相应的温度下反应4 h后,取出冷 却至室温加盐酸中和,调节pH3左右,后用适量正己 烷溶解,转移至分液漏斗,加正己烷萃取3次,合并后 用5%食盐水水洗至中性,收集正己烷相于40 ℃旋转 蒸发后氮吹即得含CLA的产物。

1.2.2.3 黄秋葵籽油/KOH对共轭转化率的影响 分 别取6.0、4.0、3.0、2.4、2.0 g催化剂KOH与12 mL溶剂 丙二醇加入圆底烧瓶置于油浴锅中,接入冷凝管在 氮气保护下充分加热溶解,温度达到170 ℃后分别加 入6 mL黄秋葵植物油,反应4 h后,取出冷却至室温 加盐酸中和,调节pH3左右,后用适量正己烷溶解,转 移至分液漏斗,加正己烷萃取3次,合并后用5%食盐 水水洗至中性,收集正己烷相于40 ℃旋转蒸发后氮 吹即得含CLA的产物。

1.2.2.4 丙二醇/黄秋葵籽油对共轭转化率的影响 取3.0 g催化剂KOH分别与6、9、12、15、18 mL溶剂丙 二醇加入圆底烧瓶置于油浴锅中,接入冷凝管在氮 气保护下充分加热溶解,温度达到170 ℃后分别加入 6 mL黄秋葵植物油,反应4 h后,取出冷却至室温加

盐酸中和,调节pH3左右,后用适量正己烷溶解,转移 至分液漏斗,加正己烷萃取3次,合并后用5%食盐水 水洗至中性,收集正己烷相于40 ℃旋转蒸发后氮吹 即得含CLA的产物。

1.2.3 响应面实验设计方案 由单因素实验可知, 丙二醇与籽油比率从1.5变化到3.0对共轭转化率的 影响较小,可选定其比值为2.0的基础上,以反应时 间、反应温度、籽油/KOH为自变量,共轭转化率为响 应值,通过Design Expert 8.0.6的Box-Behnken实验 设计原理,设计三因素三水平实验。实验因素及水平 见表1。

表1 响应面实验各因素及水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

水平	因素		
	A 反应时间(h)	B 反应温度(℃)	C 籽油/KOH
-1	2	160	1.5
0	3	170	2.0
1	4	180	2.5

1.2.4 CLA含量的测定 气相色谱法:分别配制0.1、 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/mL CLA甲酯标准液,以浓 度为横坐标,峰面积为纵坐标,制作标准曲线,以 样品的峰面积找到对应的浓度,从而转化为CLA的 含量。

1.2.4.1 脂肪酸甲酯化 参照GB/T 17376-2008中的 三氟化硼法(常用方法)制备。

1.2.4.2 色谱柱条件 参考陈丽敏等^[11]方法,适当修 改:DB-23(60 m×0.32 mm×0.25 μm),FID检测器,载 气为高纯氮气,不分流。进样口温度为270 ℃,检测器 温度300 ℃,升温程序:初始温度50 ℃,维持2 min,然 后以10 ℃/min升至180 ℃,保持5 min,再以5 ℃/min 升至230 ℃,保持2 min,进样量为1.0 μL。

1.2.5 共轭转化率的计算

$$\text{转化率}(\%) = \frac{\text{样品中CLA的含量}}{\text{黄秋葵籽油中亚油酸的含量}} \times 100$$

1.2.6 数据处理 采用Microsoft Excel软件对数据进 行整理及绘图,通过Design Expert 8.0.6软件中的 Box-Behnken设计实验并对数据进行模型拟合及方 差分析。

2 结果与分析

2.1 共轭亚油酸的测定

由图1可知,全波段扫描下,黄秋葵籽油仅在 200~210 nm处产生特征吸收峰,初步确定为亚油酸^[12], 但在220~240 nm处无特征吸收峰;而共轭化产物在 220~240 nm处产生特征吸收峰,这与共轭亚油酸在 233 nm处有特征吸收峰^[13]的结论一致,从而说明黄 秋葵籽油中的亚油酸已共轭转化成共轭亚油酸。

2.2 单因素实验对亚油酸共轭转化率的影响

2.2.1 反应时间对共轭转化率的影响 由图2可知, 随着反应时间延长,共轭转化率呈上升的趋势,在4 h 时,转化率达到最大,到5 h时转化率略有下降。这是 因为延长反应时间,各物质充分接触,有利于亚油酸

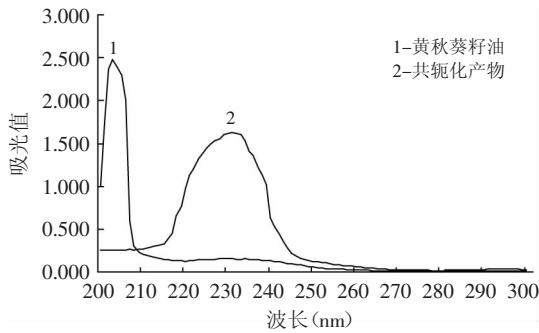


图1 黄秋葵籽油与其共轭化产物的紫外光谱
Fig.1 The UV spectrum of okra seed oil and its conjugated products

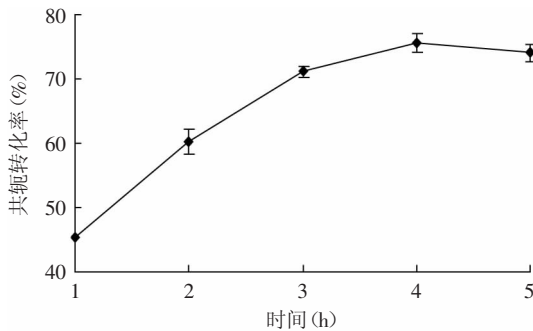


图2 反应时间对共轭转化率的影响

Fig.2 Influence of reaction time on conjugate conversion rate

共轭化,但共轭亚油酸不稳定,长时间的高温反应容易发生降解或其他副反应,使得转化率提高变慢甚至略有下降,故选4 h较适宜。

2.2.2 反应温度对共轭转化率的影响 由图3可知,随着反应温度升高,共轭转化率呈现出上升趋势,但160~180 °C转化率增加幅度减少,主要是因为随反应温度升高,亚油酸容易发生聚合、分解以及环化反应^[1],不利于共轭亚油酸的生成同时导致副产物增多。丙二醇的沸程为186~188 °C,温度过高易引起溶剂的挥发或达到沸程不宜操作,故选170 °C较适宜。

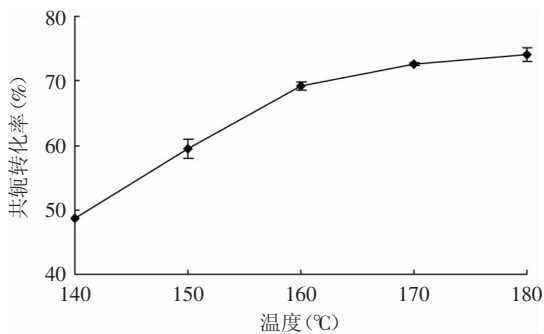


图3 反应温度对共轭转化率的影响

Fig.3 Influence of reaction temperature on conjugate conversion rate

2.2.3 黄秋葵籽油/KOH对共轭转化率的影响 由图4可知,随着籽油与KOH比率的增加,共轭转化率呈先上升后下降的趋势,比率为2.0时转化率达到最大。KOH作为催化剂,用量少时,催化力度不足,皂化

及异构化不充分,使得共轭转化率较低;用量多时,会生成过多的皂化物和泡沫,不利于产物的分离,造成CLA的损失,故选比率为2.0较适宜。

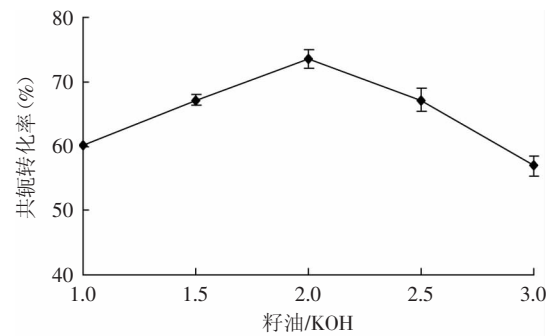


图4 籽油/KOH对共轭转化率的影响

Fig.4 Influence of oil against KOH on conjugate conversion rate

2.2.4 丙二醇/黄秋葵籽油对共轭转化率的影响 由图5可知,随着丙二醇与籽油比率的增加,共轭转化率先上升后下降,比率为2.0时转化率达到最大。丙二醇与籽油比率从2.0增大到3.0时,共轭转化率出现小幅降低。溶剂丙二醇用量过少时,体系粘度大,分子运动阻力较大,阻碍物质间的充分接触,使得转化率较低;用量过多时,催化剂有效浓度降低,分子间的碰撞机会减少,同时造成溶剂浪费,转化率下降,故选比率为2.0较适宜。

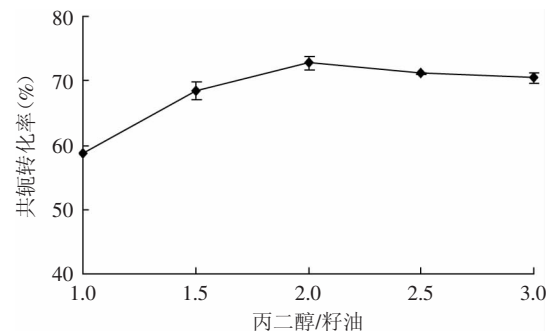


图5 丙二醇/籽油对共轭转化率的影响

Fig.5 Influence of propylene glycol against oil on conjugate conversion rate

2.3 响应面法优化实验方案的结果分析

响应面分析:采用Design Expert 8.0.6统计软件对表2数据进行多元回归模拟,建立了反应时间、反应温度、籽油/KOH对共轭转化率的二元回归方程:
 $Y = 72.44 + 2.40A - 3.19B - 0.17C - 3.00AB - 1.12AC + 2.83BC - 1.67A^2 - 2.33B^2 - 6.81C^2$

模型的方差分析见表3,模型 $p < 0.01$,表明模型指标具有极显著水平;失拟项 $p > 0.05$ 不显著,表明此模型能较好地拟合真实水平。同时, R^2 为91.35%表明此方程与实验结果拟合良好。因此,该模型能够较好地预测黄秋葵籽油中亚油酸的共轭转化率。

通过表3中F值的大小可知所选因素对结果的影响大小: $B > A > C$,即反应温度>反应时间>籽油/KOH,

表2 响应面实验方案的结果

Table 2 Results of response surface experiments

实验号	A	B	C	Y: 共轭转化率 (%)
1	1	1	0	62.51
2	-1	0	-1	60.66
3	0	0	0	70.10
4	0	-1	-1	67.28
5	0	0	0	72.04
6	0	0	0	72.85
7	0	0	0	74.45
8	-1	1	0	66.18
9	-1	0	1	59.97
10	1	0	-1	70.19
11	1	0	1	65.01
12	-1	-1	0	68.36
13	1	-1	0	76.67
14	0	0	0	72.75
15	0	1	-1	57.05
16	0	-1	1	63.89
17	0	1	1	64.97

表3 响应面二次模型方差分析表

Table 3 Variance analysis results of quadratic model

差异源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	446.30	9	49.59	8.22	0.0056	**
A	46.13	1	46.13	7.64	0.0279	*
B	81.22	1	81.22	13.46	0.0080	**
C	0.22	1	0.22	0.037	0.8526	
AB	35.88	1	35.88	5.94	0.0449	*
AC	5.04	1	5.04	0.84	0.3912	
BC	31.98	1	31.98	5.30	0.0548	
A ²	11.80	1	11.80	1.95	0.2048	
B ²	22.94	1	22.94	3.80	0.0922	
C ²	195.07	1	195.07	32.32	0.0007	**
残差	42.25	7	6.04			
失拟项	32.31	3	10.77	4.33	0.0953	
纯差	9.94	4	2.48			
总差	488.55	16				

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

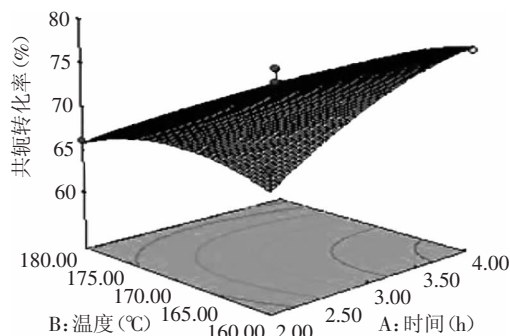


图6 反应时间与温度对共轭转化率影响的曲面图

Fig.6 Response surface of reaction time and temperature on conjugate conversion rate

其中,一次项B极显著,A显著,C不显著;交互项AB显著,AC、BC均不显著;二次项C²极显著,A²、B²均不显著。同时反应时间与反应温度的交互作用显著性通过响应面的曲面图也能够更直观地反映出来,由图6可知,曲面图陡峭,共轭转化率随反应时间的延长增大,而随反应温度的升高先增大后减小,说明反应时间与反应温度对黄秋葵籽油中亚油酸的共轭转化率影响显著。可能的原因是反应时间长且温度高,共轭亚油酸容易发生分解或环化反应,同时体系产生大量泡沫及皂化物,增加分离难度,导致转化率降低。

2.4 共轭转化率的优化及检验

通过模型预测黄秋葵籽油中亚油酸共轭转化的最优条件为:反应时间3.89 h,反应温度161.5 °C,籽油/KOH为1.89 (mL/g),丙二醇/籽油为2.0 (mL/mL),共轭转化率的预测值为76.99%。考虑到实际情况对上述条件进行修正,最终的优化条件为:反应时间4 h,

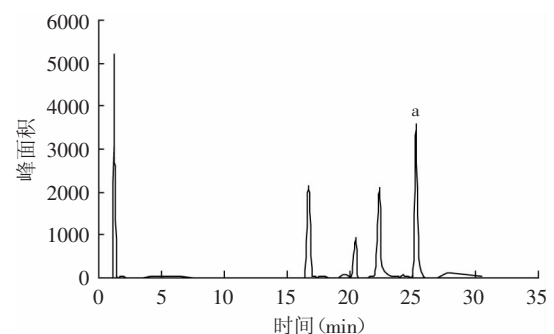


图7 黄秋葵籽油的气相色谱图

Fig.7 The GC spectrum of okra seed oil

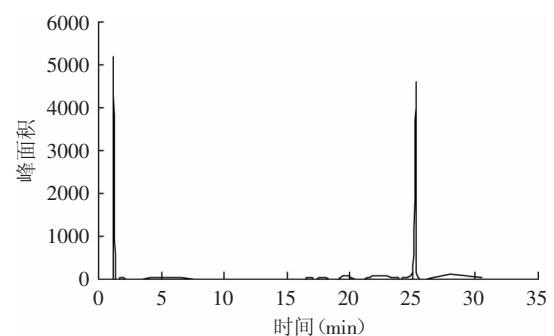


图8 亚油酸标准品的气相色谱图

Fig.8 The GC spectrum of LA reference standard

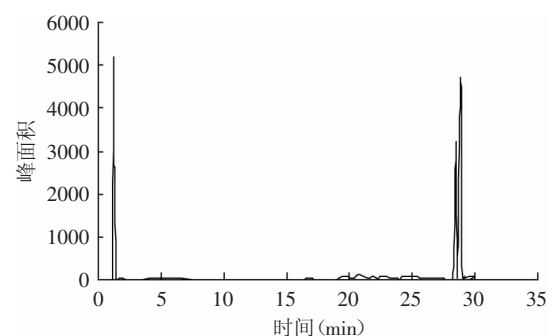


图9 CLA标准品的气相色谱图

Fig.9 The GC spectrum of CLA reference standard

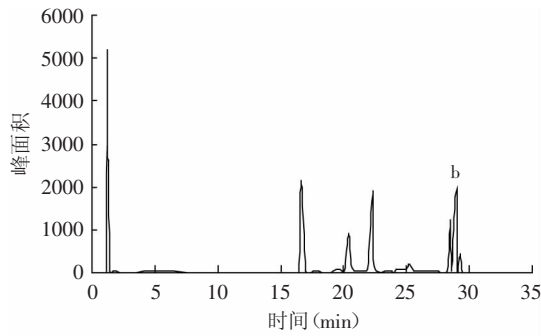


图10 共轭化产物的气相色谱图

Fig.10 The GC spectrum of conjugated products

反应温度162℃, 籽油/KOH为1.9(mL/g), 丙二醇/籽油为2.0(mL/mL), 在此条件下进行三次平行实验验证, 得到平均转化率为74.20%, 与理论预测值较接近, 说明该模型对于评估黄秋葵籽油中亚油酸的共轭转化程度具有一定的可行性。对比图7和图8可知, a为亚油酸, 对比图9和图10可知b为CLA, 对比图7和图10可知共轭化后, 黄秋葵籽油中的绝大部分亚油酸都转化为共轭亚油酸, 其中主要包含两种活性成分c9, t11-CLA和t10, c12-CLA。

3 结论

本实验研究了以低毒性丙二醇为溶剂, 高温碱法制备共轭亚油酸的工艺, 通过单因素实验和响应面分析法优化共轭亚油酸的转化条件, 其中反应温度对转化率影响最大, 籽油/KOH影响最小, 反应时间与反应温度的交互作用显著, 得到最佳工艺: 反应时间4 h, 反应温度162℃, 籽油/KOH为1.9(mL/g), 丙二醇/籽油为2.0(mL/mL), 此条件下通过气相色谱图分析可知CLA的转化率为74.20%, 与模型预测的理论值(76.99%)仅相差2.79%, 说明此模型能够较准确地预测黄秋葵籽油中亚油酸的共轭转化率, 响应面法对共轭转化率的优化分析切实可行。

参考文献

[1] 薛志忠, 刘思雨, 杨雅华. 黄秋葵的应用价值与开发利用研

究进展[J]. 保鲜与加工, 2013, 13(2):58-60.
 [2] 李加兴, 李偲, 吴越, 等. 黄秋葵籽油的提取工艺优化及脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2013, 38(10):5-8.
 [3] Jarret R L, Wang M L, Levy I J. Seed oil and fatty acid content in okra(*Abelmoschus esculentus*) and related species[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2011, 59(8):4019-4024.
 [4] Hur S J, Kim D H, Chun S C, et al. Effects of dietary conjugated linoleic acid and biopolymer encapsulation on lipid metabolism in mice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(4):6848-6862.
 [5] Kim J H, Park H G, Pan J H, et al. Dietary conjugated linoleic acid increases endurance capacity of mice during treadmill exercise[J]. Journal of Medicinal Food, 2010, 13(5):1057-1060.
 [6] Chinnadurai K, Kanwal H K, Tyagi A K, et al. High conjugated linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and antiatherogenic potency in female Wistar rats [J]. Lipids in Health and Disease, 2013, 12(1): 121.
 [7] Kim Y J, Lee K W, Lee H J. Total antioxidant capacity of arginine-conjugated linoleic acid (CLA) complex[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(3):439-444.
 [8] El Roz A, Bard J M, Huvelin J M, et al. The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the trans9,trans11 conjugated linoleic acid isomer on MCF-7 breast cancer cells are associated with LXR activation[J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2013, 88(4):265-272.
 [9] 刘瑞阳, 邢华斌, 杨亦文, 等. 甲醇为溶剂红花籽油碱法异构化合成共轭亚油酸的研究[J]. 中国油脂, 2010(6):29-32.
 [10] 潘群文, 陈美珍, 吴演, 等. 海蓬子籽油制备共轭亚油酸及其组分分析[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(2):42-46.
 [11] 陈丽敏, 郝海燕, 陈杭君, 等. 响应面法优化山核桃亚油酸碱异构化研究[J]. 中国粮油报, 2014, 29(8):74-79.
 [12] 周凌华, 张灏, 郑小平, 等. 共轭亚油酸紫外检测方法的研究[J]. 乳业科学与技术, 2007(5):267-270.
 [13] 熊向峰, 陈朝银, 赵声兰, 等. 天然植物油碱异构化合成共轭亚油酸的研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(4):39-41.

(上接第272页)

率的回归模型, 经检验证明该模型合理可靠, 能较好的预测鳕鱼皮中酸溶性胶原蛋白的原料提取率。由该模型确定的最优工艺条件为乙酸浓度0.47 mol/L, 料液比为1:33, 提取时间为90.2 h。在此条件下, 得到平均胶原蛋白提取率值为37.36%。与理论预测值的相对误差为1.49%。说明应用响应面法对鳕鱼皮胶原蛋白的提取工艺的优化准确可靠, 具有实际可操作性。

参考文献

[1] 戴吉领, 曹明蓉, 何强. 不同条件下胶原的水解特性及应用[J]. 食品科技, 2011, 36(11):131-134.
 [2] NAGAI T, SUZUKI N. Isolation of collagen from fish waste material skin, bone and fins[J]. Food Chemistry, 2000, 68:277-281.
 [3] 陈胜军, 曾名勇, 董士远. 水产胶原蛋白及其活性肽的研究

进展[J]. 水产科学, 2004, 23(6):44-46.
 [4] 刘春娥, 刘峰, 李刚杰, 等. 鳕鱼皮胶原蛋白酶解液的制备及抗氧化研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(34):21328-21344.
 [5] GB 50010.3-2011. 《食品中水分的测定》[S].
 [6] GB 50010.4-2011. 《食品中灰分的测定》[S].
 [7] GB 50010.5-2011. 《食品中蛋白质的测定》[S].
 [8] GB 50010.7-2011. 《食品中脂肪的测定》[S].
 [9] 郭恒斌, 曾庆祝. 分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(10):145-148.
 [10] 日本食品工业学会《食品分析法》编辑委员会. 食品分析方法(下)[M]. 重庆: 四川科学技术出版社, 1992:74-77.
 [11] 林琳. 鱼皮胶原蛋白的制备及胶原蛋白多肽活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
 [12] 史刘辉, 朱松, 姜在祥, 等. 鳕鱼皮活性胶原的提取及酶解动力学研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9):153-157.