

# 高产大豆异黄酮糖苷转化酶乳酸菌的筛选及其发酵条件的优化

翟清燕,赵龙玉,赵凤春,杨正友\*

(山东农业大学生命科学学院微生物系,农业微生物重点实验室,山东泰安 271018)

**摘要:**采用高效液相色谱法测定发酵豆乳中游离型大豆异黄酮含量,以此为指标,从传统发酵食品分离筛选的100株乳酸菌中,选出一株发酵后游离型大豆异黄酮产量最高的作为生产功能性发酵豆乳的发酵菌株。经生理生化及遗传学特性鉴定该菌株为植物乳杆菌。并通过单因素和响应面优化实验对影响游离型大豆异黄酮产量的3个发酵因素,即发酵时间、发酵温度、接种量,进行优化,得出最佳发酵条件为:发酵温度45℃、发酵时间17h、接种量5%,在此条件下游离型异黄酮的产量为132.814 $\mu$ g/mL。

**关键词:**发酵豆乳,游离型大豆异黄酮,植物乳杆菌,发酵优化

## Isolation and identification of high-yield soy isoflavone glycosidase of lactic acid bacteria and optimization of fermentation conditions

ZHAI Qing-yan, ZHAO Long-yu, ZHAO Feng-chun, YANG Zheng-you\*

(Department of Microbiology, College of Life Science, Key Laboratory for Agriculture Microbiology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** For production of functional fermented soymilk, one strain was selected from one hundred lactic acid bacteria isolates based on their capacities to hydrolyze isoflavone glucosides to aglycones by high performance liquid chromatography (HPLC). Based on the biochemistry and genetic characteristics analysis, the strain was classified as *Lactobacillus plantarum*. Fermentation conditions including fermentation time, temperature and inoculum amount were optimized by one-factor-at-a-time and response surface methodology (RSM). The optimum fermentation condition as follows: fermentation for 17h at 45℃ with inoculation amount of 5%, while the soy isoflavone aglycones production was 132.814 $\mu$ g/mL.

**Key words:** fermented soymilk; soy isoflavone aglycones; *Lactobacillus plantarum*; fermentation optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)12-0162-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.12.026

大豆是一种营养丰富的植物蛋白资源,富含人体必需的氨基酸和脂肪酸,以及人体生理代谢过程中所需的多种生物活性物质,如大豆异黄酮(Iso)、低聚糖、降压肽、 $\gamma$ -氨基丁酸等。其中大豆异黄酮是大豆在生长过程中形成的一种次生代谢产物,含量约为0.1%~0.5%<sup>[1]</sup>,由于其结构与动物雌激素相似,素有植物雌激素的美称,而且具有类似雌激素的生理功能,如抗肿瘤、缓解更年期症状、降血压、降血脂和心血管疾病发病率等<sup>[2-3]</sup>。

目前已研究的大豆异黄酮共有12种,包括3种游离型苷元结构(大豆苷元,染料木素,大豆黄素,占2%~3%)和9种结合型糖苷结构(占97%~98%)<sup>[4]</sup>。

研究表明,大豆异黄酮苷元型的生物活性比其相应糖苷要高,能够直接被小肠上皮细胞吸收,是人体可以利用的有效形式,但90%以上的大豆异黄酮均以糖苷形式存在,因此,天然大豆及其产品中大豆异黄酮的生物活性一般比较低。

近年来,国内外研究发现 $\beta$ -葡萄糖苷酶能够将大豆异黄酮结构中的 $\beta$ -O-糖苷键水解使糖苷型异黄酮转化为苷元形式,从而提高大豆制品中异黄酮的生物有效性。 $\beta$ -葡萄糖苷酶广泛存在于植物以及一些酵母、霉菌和细菌体内,一些研究发现乳酸菌中普遍含有 $\beta$ -葡萄糖苷酶,而且乳酸菌作为人体的肠道益生菌可以直接添加到食品中,经过发酵 $\beta$ -葡萄糖苷酶将异黄酮糖苷结构水解,转化成的苷元形式可以直接被小肠吸收,有效促进异黄酮生物功能的发挥<sup>[5]</sup>。本研究力图筛选高产大豆异黄酮糖苷转化酶的益生菌来发酵豆乳,提高游离型大豆异黄酮的产量,结合大豆和乳酸菌的双重保健作用,研制出一种风味和营养兼具的功能性发酵豆乳。

收稿日期: 2014-01-14 \* 通讯联系人

作者简介: 翟清燕(1989-),女,硕士研究生,研究方向:食品微生物。

基金项目: 国家自然科学基金(30972050,31271873);山东省自然科学基金(ZR2010CM015)。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

大豆 市售;乳酸菌100株 保存于山东农业大 学生命科学院;大豆苷(Daidzin)、大豆苷元 (Daidzein)、染料木苷(Genistin)、染料木素(Genistein) 标准品 购于Aladdin公司;甲醇、冰乙酸 色谱纯; 水 去离子水。

高效液相色谱系统 美国Agilent公司;COSMOSIL 5C18-AR-II (150mm×4.6mm) 日本Nacalai Tesque 公司;超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司;旋 转蒸发仪 德国Heidolph公司;高速冷冻离心机 Effendorf公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 发酵豆乳的制备<sup>[6]</sup> 大豆(无霉烂、变质)→清洗浸泡→磨浆→过滤→煮浆→分装→杀菌(95℃,15min)→冷却 (42℃)→接种→培养。

1.2.2 高产糖苷转化酶乳酸菌的筛选

1.2.2.1 大豆异黄酮的提取<sup>[7]</sup> 发酵豆乳1mL与25mL 100%甲醇混合均匀,并置于超声波中于50℃萃取 40min,待超声波萃取结束后离心(8000r/min,30min), 取上清液用旋转蒸发仪进行浓缩后,将剩余液体转 移到离心管中用甲醇定容至5mL,过0.22μm微孔滤 膜,将滤液进高效液相色谱系统测定不同菌株发酵 后游离型大豆异黄酮的含量,由此来确定最佳发酵 菌株。

1.2.2.2 高效液相色谱条件 采用C<sub>18</sub>色谱柱(150mm× 4.6mm,4.5nm);流动相:水相(0.1%冰醋酸):有机相 甲醇(0.1%冰醋酸)(5.5:4.5);紫外检测波长:260nm; 流速:1mL/min;进样量:20μL;柱温:室温。

1.2.2.3 大豆异黄酮标准品标准曲线的绘制 根据 上述色谱条件,将大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料 木素四种标准品分别配制成0.001、0.005、0.01、0.03、 0.1mg/mL 5个浓度梯度,以标准液浓度为X轴,峰面 积为Y轴绘制标准曲线,得出大豆苷的回归方程为:  $y=10^7x-15334, R^2=0.9992$ ;大豆苷元的回归方程为:  $y=5 \times 10^7x-20013, R^2=0.999$ ;染料木苷的回归方程为:  $y=10^7x+5105, R^2=0.9993$ ;染料木素的回归方程为:  $y=6 \times 10^7x-25716, R^2=0.999$ 。

1.2.3 菌株鉴定

1.2.3.1 形态学和生理生化鉴定 根据《伯杰细菌 鉴定手册》对筛选菌株进行形态学和生理生化特征 鉴定<sup>[8]</sup>。

1.2.3.2 遗传学鉴定<sup>[9-10]</sup> 16S rDNA序列扩增和分 析:采用CTAB法提取DNA作为PCR扩增的模板,PCR 产物经切胶纯化后与pMD18-T载体连接,将载体转 化到E·coli JM109感受态细胞中,经蓝白斑筛选提取 重组质粒,酶切验证后进行测序。将测得序列提交 到GenBank中进行序列对比,并用MEGA 3.1软件以 Neighbor Join法绘制系统发育树。

1.2.4 单因素实验<sup>[11]</sup>

1.2.4.1 发酵温度对大豆异黄酮含量的影响 取活 化好的菌液按2%(v/v)的接种量接入灭菌豆乳中,分 别置于27、32、37、42、47℃的温度条件下培养8h,分

析不同温度对大豆异黄酮含量的影响。

1.2.4.2 发酵时间对大豆异黄酮的影响 取活化好 的菌液按2%(v/v)的接种量接入灭菌豆乳中,置于 37℃条件下分别发酵0、4、8、12、16、20、24h,观察不 同发酵时间对大豆异黄酮含量的影响。

1.2.4.3 接种量对大豆异黄酮的影响 取活化好的 菌液按1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%(v/v)的接种量 接入灭菌豆乳中,置于37℃条件下发酵8h,观察不同 接种量对发酵豆乳中大豆异黄酮含量的影响。

1.2.5 Box-Behnken响应面法实验设计<sup>[12]</sup> 根据单 因素实验结果,每个自变量选取低、中、高3个实验水 平分别以第1、0、1进行编码(见表1),利用Design Expert 8.05软件对实验数据进行回归分析,得到多元 二次回归方程,分析各因素的主效应和交互效应,从 而确定最佳发酵条件。

该模型的多元二次回归方程可以表达为:

$$Y=A_0+\sum A_iX_i+\sum A_{ii}X_{i2}+\sum A_{ij}X_iX_j \quad \text{式(1)}$$

其中Y为响应值(游离型大豆异黄酮总量),A<sub>0</sub>, A<sub>i</sub>, A<sub>ii</sub>, A<sub>ij</sub>为方程系数,X<sub>i</sub>, X<sub>j</sub>(i≠j)为自变量编码值。

表1 实验因素水平及编码

Table 1 The coded and uncoded values of variables in Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
A 发酵温度(℃)	37	42	47
B 发酵时间(h)	12	16	20
C 接种量(%)	4	5	6

1.2.6 数据处理 本文测定的数据均为3个重复的 平均值,使用SPSS 17.0软件进行数据分析,Excle进 行数据作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产糖苷转化酶乳酸菌的筛选

将不同菌株按一定比例接入豆乳中,测定发酵 后各样品中大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素 的含量,筛选出一株发酵后游离型大豆异黄酮(即 大豆苷元和染料木素)总量最高的作为发酵菌株,并 以原豆浆中各成分的含量作为对照(见表2),可知 该菌株发酵后豆乳中游离型大豆异黄酮的总量大约 是未发酵的8倍。大豆异黄酮标准品液相色谱图见 图1,原豆浆液相色谱图见图2,发酵后的液相色谱图 见图3。

表2 原豆乳和发酵豆乳中大豆异黄酮的浓度(μg/mL)

Table 2 Concentration of soy isoflavone of soybean milk and fermented soymilk (μg/mL)

发酵豆浆类型	大豆苷	大豆苷元	染料木苷	染料木素
原豆乳	51.553	4.008	68.652	4.837
发酵豆乳	22.236	33.335	31.806	39.342

### 2.2 菌株鉴定

2.2.1 细菌形态学和生理生化鉴定<sup>[13]</sup> 通过对不同

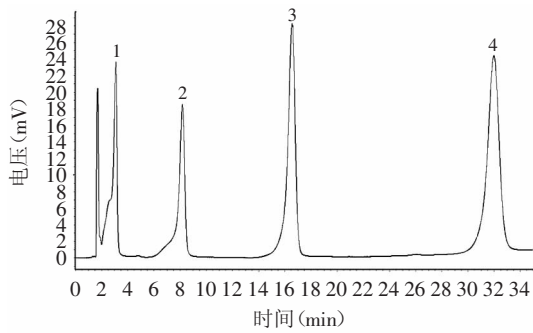


图1 大豆异黄酮标准品高效液相色谱图

Fig.1 The chromatogram of HPLC of soy isoflavone standard  
注:1:大豆苷;2:染料木苷;3:大豆苷元;4:染料木素。

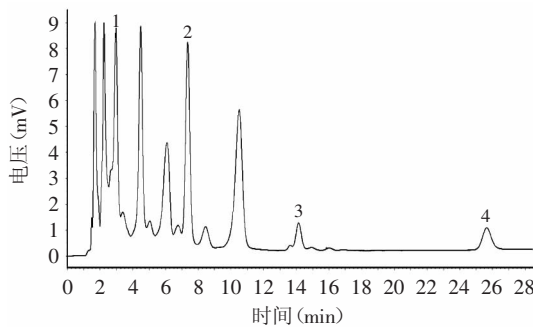


图2 原豆乳高效液相色谱图

Fig.2 The chromatogram of soybean milk

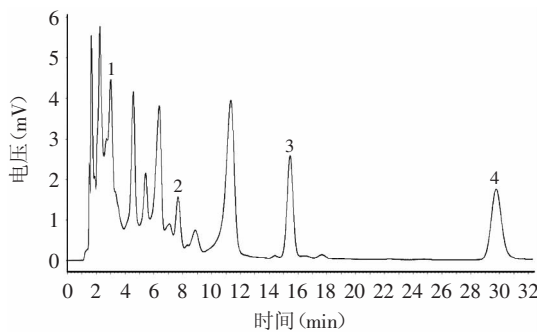


图3 发酵豆乳高效液相色谱图

Fig.3 The chromatogram of fermented soybean milk

发酵豆乳中游离型大豆异黄酮含量的测定,获得一株高产大豆异黄酮糖苷转化酶乳酸菌,将其命名为LP4。通过显微镜观察鉴定LP4为革兰氏阳性杆菌,无芽孢,无荚膜,菌落形态特征为圆形,表面光滑,呈乳白色,不透明,生理生化鉴定结果见表3。

2.2.2 16S rDNA基因序列及遗传学分析<sup>[4]</sup> 测序得知菌株LP4的16S rDNA基因序列含有1438bp,其GenBank登录号为KF192886。将LP4菌株的16S rDNA基因序列与GenBank中的序列进行比对,发现与

*Lactobacillus*属成员具有较高的序列相似性,用Neighbor Joining方法构建的系统发育树(图4)表明其与*Lactobacillus plantarum*种亲缘关系密切,序列相似性达到了99%。因此,根据菌株LP4的形态特征和16S rDNA基因序列以及系统发育学分析,将菌株LP4初步鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

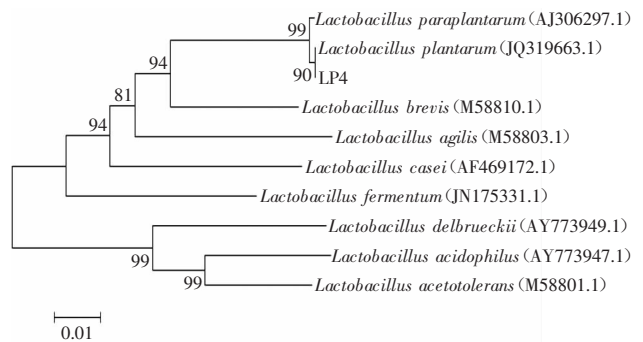


图4 菌株LP4及相关细菌16S rDNA基因序列系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain LP4 and related strains

### 2.3 游离型大豆异黄酮发酵条件的优化

#### 2.3.1 单因素实验

2.3.1.1 发酵温度对大豆异黄酮含量的影响 由图5可知,游离型大豆异黄酮(大豆苷元和染料木素)的含量随着温度的升高逐渐增大,相反,糖苷型大豆异黄酮(大豆苷和染料木苷)的含量随之减少。当温度为42℃时游离型大豆异黄酮总量达到最大,温度继续升高,游离型大豆异黄酮的含量反而降低。这可能由于过高的温度已不适宜菌体的生长,β-葡萄糖苷酶的活性下降,糖苷型结构不能再转化为游离型结构。

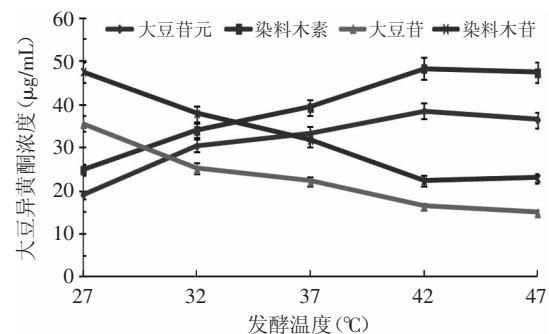


图5 发酵温度对大豆异黄酮含量的影响

Fig.5 Effect of fermented temperature on soy isoflavone yield

2.3.1.2 发酵时间对大豆异黄酮含量的影响 由图6可知,随着发酵时间的延长糖苷型大豆异黄酮(大豆

表3 LP4菌株的生理生化鉴定结果

Table 3 Physiology biochemistry experiments of *Lactobacillus plantarum* 4

生理生化实验	过氧化氢酶实验	柠檬酸盐实验	硝酸盐还原实验	甲基红实验	吲哚实验	V-P实验	精氨酸产氨实验	产H <sub>2</sub> S实验	明胶水解实验	淀粉水解实验	糖发酵实验	氧的利用
结果	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	产酸不产气	兼性厌氧

注:+,呈阳性;-:呈阴性。



苷和染料木苷)不断水解转化为游离型大豆异黄酮,在发酵初期,游离型大豆异黄酮的增加量较为显著,12h以后增长开始变缓,产生这种现象的原因推测是发酵后期菌株进入生长衰退期,发酵活力有所下降, $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性也因此降低。

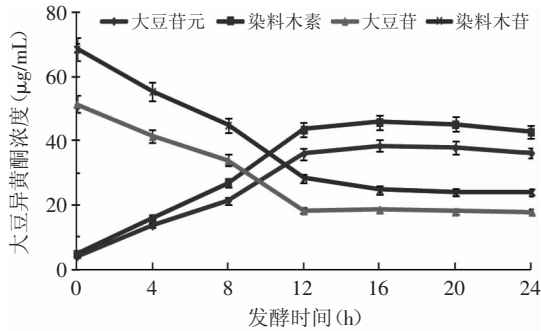


图6 发酵时间对大豆异黄酮含量的影响

Fig.6 Effect of fermented time on soy isoflavone yield

2.3.1.3 接种量对大豆异黄酮含量的影响 由图7可知,当接种量较小时,豆乳中游离型大豆异黄酮的含量随着接种量的增加而升高,而接入的菌液过多时,游离型大豆异黄酮的量反而降低,这可能是由于接种量过高,菌体在生长代谢过程中产生大量的乳酸等酸性物质,在低pH环境下会影响糖苷型结构转化为游离型结构,而且强酸环境还可能会造成游离型结构的水解,因此,确定4%~6%为适宜的接种范围。

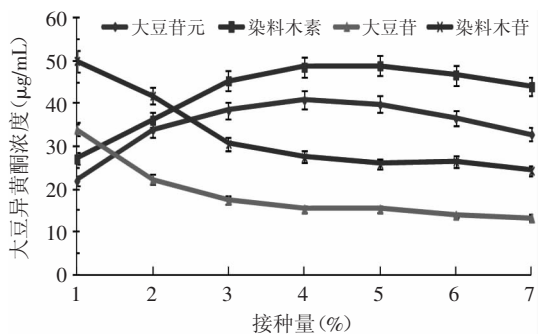


图7 接种量对大豆异黄酮含量的影响

Fig.7 Effect of inoculation amount on soy isoflavone yield

## 2.4 响应面法优化最佳发酵条件

2.4.1 实验设计及结果 根据单因素实验结果,采用Box-Behnken设计,以发酵温度(A)、发酵时间(B)、接种量(C)为自变量,游离型大豆异黄酮总量(Y)为响应值,进行响应面分析,实验结果见表4,回归方程方差分析表见表5。

利用Design Expert软件对表4中游离型大豆异黄酮总量的实验数据进行多元回归拟合,获得游离型大豆异黄酮总量对编码自变量发酵时间、发酵温度、接种量的二次多项回归方程:

$$Y=132.08+3.96A+3.43B+2.00C-1.24AB-0.15AC+0.76BC-3.20A^2-5.20B^2-5.79C^2 \quad \text{式(2)}$$

模型方程回归方差分析显著性结果表明,该模型回归显著( $p < 0.0001$ ),失拟项不显著( $p = 0.9256$ ),

表4 Box-Behnken实验结果

Table 4 Results of Box-Behnken design

实验号	A	B	C	游离型大豆异黄酮(µg/mL)	
				实验值	预测值
1	-1	-1	0	114.96	115.055
2	1	-1	0	125.24	125.46
3	-1	1	0	124.61	124.39
4	1	1	0	129.92	129.825
5	-1	0	-1	117.19	116.995
6	1	0	-1	125.53	125.21
7	-1	0	1	120.96	121.28
8	1	0	1	128.71	128.905
9	0	-1	-1	116.33	116.43
10	0	1	-1	121.35	121.765
11	0	-1	1	119.32	118.905
12	0	1	1	127.37	127.27
13	0	0	0	130.17	132.078
14	0	0	0	132.03	132.078
15	0	0	0	133.79	132.078
16	0	0	0	132.54	132.078
17	0	0	0	131.86	132.078

表5 回归方程方差分析表

Table 5 ANOVA for the evaluation of the quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值
模型	589.90	9	65.54	60.41	<0.0001**
A	125.45	1	125.45	115.63	<0.0001**
B	93.85	1	93.85	86.50	<0.0001**
C	31.84	1	31.84	29.35	0.0010**
AB	6.18	1	6.18	5.69	0.0485*
AC	0.087	1	0.087	0.080	0.7852
BC	2.30	1	2.30	2.12	0.1891
A <sup>2</sup>	42.99	1	42.99	39.62	0.0004**
B <sup>2</sup>	113.86	1	113.86	104.95	<0.0001**
C <sup>2</sup>	140.92	1	140.92	129.89	<0.0001**
残差	7.59	7	1.08	-	-
失拟性	0.76	3	0.25	0.15	0.9256
纯误差	6.83	4	1.71	-	-
总差	597.49	16	-	-	-

注:\*, $p < 0.05$ ; \*\*, $p < 0.01$ 。

并且该模型的 $R^2=0.9873$ ,  $R^2_{adj}=0.9709$ ,说明回归方程的拟合程度良好,可靠性高,自变量和响应值之间的线性关系高度显著,可以用于游离型大豆异黄酮含量的理论预测。

由Box-Behnken优化实验得到游离型大豆异黄酮最佳发酵条件为:发酵温度44.81℃、发酵时间17.10h、接种量5.18%,在此条件下,游离型大豆异黄酮总量理论值可达133.845µg/mL。

2.4.2 响应面分析 根据回归分析结果作出相应的3D图,如图8所示,当接种量为固定为5%的条件下,发酵温度为45℃,发酵时间为16h左右时,游离型大豆异黄酮的含量达到最大值,且发酵温度与发酵时

间的交互作用达到了显著水平。根据Yang等<sup>[15]</sup>对Pseudomonas ZD-8菌株中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定发现45℃时其活性可以保持稳定,当温度达到50℃时,活性降低到原来的44%,与本研究所得结论基本一致。由图9可知,当发酵时间固定在16h的条件下,发酵温度与接种量对游离型大豆异黄酮的影响均很显著,选择一个适合乳酸菌生长的温度及提高接种量可增加游离型大豆异黄酮的产量。同时,结合图10和表5可以看出当发酵温度固定在42℃时,接种量与发酵时间对游离型大豆异黄酮产量的影响显著,且发酵时间影响的显著性要大于接种量。微生物发酵可以发挥 $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用,使异黄酮糖苷型结构向生物活性更高的游离型结构转化,而随着发酵时

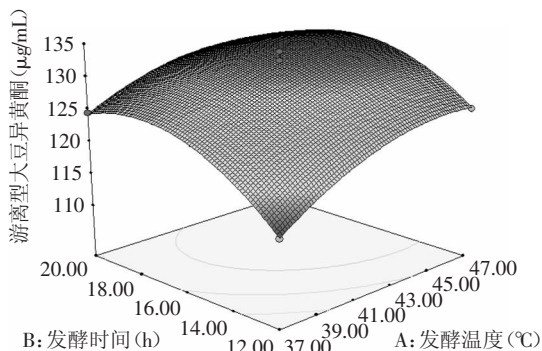


图8 发酵温度与发酵时间对游离型大豆异黄酮总量的影响

Fig.8 3D ional plot of soy isoflavone aglycones at different fermentation time and temperature

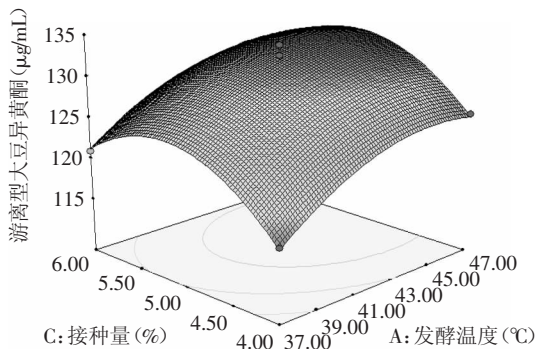


图9 接种量与发酵温度对游离型大豆异黄酮总量的影响

Fig.9 3D ional plot of soy isoflavone aglycones at different inoculation amount and fermentation temperature

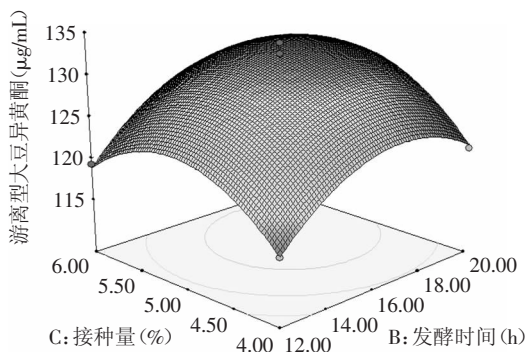


图10 接种量与发酵时间对游离型大豆异黄酮总量的影响

Fig.10 3D ional plot of soy isoflavone aglycones at different inoculation amount and fermentation time

间的延长,微生物的生长速率减慢, $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性也随之下降。

2.4.3 模型的验证 考虑到操作的方便性,将最佳条件调整为:发酵温度45℃,发酵时间17h,接种量5%,在此条件下,测得的游离型大豆异黄酮总量为132.814 $\mu\text{g/mL}$ ,稍低于预测值133.649 $\mu\text{g/mL}$ ,模型预测值与实测值较为吻合,说明该模型可以较好的反映游离型大豆异黄酮的最佳发酵条件。

### 3 结论

本研究通过HPLC法测定发酵豆乳中游离型大豆异黄酮含量,从中筛选出一株高产大豆异黄酮糖苷转化酶菌株作为生产功能性发酵豆乳的发酵菌株,经生理生化及遗传学特性鉴定其为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。以游离型大豆异黄酮含量为指标,在单因素实验的基础上采用3因素3水平的响应面分析法,得出最佳发酵条件为:发酵温度45℃、发酵时间17h、接种量5%,在此条件下游离大豆异黄酮的含量可达到132.814 $\mu\text{g/mL}$ 。本研究结果显示利用该菌株发酵豆乳具备明显的开发潜力和优势,大大提高了大豆制品中异黄酮的生物有效性,为今后发酵豆制品的研发提供了必要的理论依据和技术支持。

### 参考文献

- [1] 刘肖南,马艳莉,韭泽悟,等. 高效液相色谱法测定六种大豆异黄酮及雌马酚的含量[J]. 中国食物与营养,2012,18(9):58-61.
- [2] 范红艳,顾饶胜,王艳春,等. 大豆异黄酮抗衰老作用研究[J]. 中草药,2010,41(9):2054-2057.
- [3] Messina M, Erdman J, Setchell K D R. Introduction to and perspectives from the fifth international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease[J]. The Journal of Nutrition,2004,134:1205-1206.
- [4] Jiyeon Chun, Jong Sang Kim, Jeong Hwan Kim, et al. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of Streptococcus infantarius 12 and Weissella sp. 4[J]. Food Chemistry,2008,109:278-284.
- [5] Otieno D O, Ashton JF, Shah N P. Isoflavone phytoestrogen degradation in fermented soymilk with selected  $\beta$ -glucosidase producing Lacidophilus strains during storage at different temperatures[J]. International Journal of Food Microbiology,2007,115(1):79-88.
- [6] 马成杰,杜绍平,华宝珍. 植物乳杆菌ST-III在豆乳中的发酵特性及发酵豆乳的贮藏稳定性[J]. 食品科学,2013,34(5):151-155.
- [7] 宋冰,王丕武,张秀艳,等. 大豆异黄酮提取工艺的优化[J]. 大豆科学,2008,27(2):343-346.
- [8] 布坎南·O·R·E,吉本斯·N·F. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第八版. 中国科学院微生物研究所译. 北京:科学出版社,1984.
- [9] 陈海英,林健荣,宋家清,等. CP7菌株的抗菌活性及菌种鉴定[J]. 中国生物防治,2007,23(增刊):16-21.
- [10] 于国萍,孟完全. 乳酸菌发酵法水解大豆异黄酮[J]. 食品科学,2009,30(17):217-220.

(下转第171页)

下所得到的重相中DHA含量,最终产品中DHA的含量仅比六级分子蒸馏低0.66%。

六级和三级分子蒸馏最终高DHA乙酯的得率分别增加到30.96%和33.12%。在多级分子蒸馏的升温过程中,轻相组分中的DHA含量随蒸馏温度的升高而增加,六级分子蒸馏所得轻相组分中DHA的含量依次为0%、2.61%、23.94%、39.95%、59.99%和73.37%,而三级分子蒸馏所得轻相组分中DHA的含量依次为7.10%、19.14%和47.84%,在多级分子蒸馏过程中,将高DHA含量的轻相组分回流继续进行蒸馏,可进一步提高产品的得率,如将六级分子蒸馏中第四级轻相与第一级的进料混合,将第五级轻相与第二级的进料混合,将第六级轻相与第三级进料混合,可将六级分子蒸馏的产品得率由30.96%提高至36.45%。

### 3 结论

利用脂肪酶催化乙酯化反应将含40%以上DHA的裂殖壶菌总脂转化为乙酯,并借助分子蒸馏手段制备得到DHA含量高于80%的乙酯产品。采用固定化脂肪酶为催化剂可将裂殖壶菌总脂转化为乙酯,相对于化学法,该法具有条件温和、不产生废弃物和产物易于分离纯化等优点。在所得较优反应条件下(反应温度40℃,反应时间24h,底物质量比10:2, Lipozyme 435添加量为油脂质量的6%),固定化脂肪酶的操作稳定性良好,反应20批次裂殖壶菌总脂酯化率未出现明显降低。分子蒸馏可有效地富集酶促乙酯化所得乙酯中的DHA,而多级分子蒸馏和将较高DHA含量的轻相组分回流继续进行蒸馏,可提高高DHA含量产品的得率。

### 参考文献

- [1] 朱丽娜,张志国,张敏,等. DHA的生理功能及其在食品中的稳定性[J]. 中国乳品工业,2009(2):45-48.
- [2] 付红岩,马莺. 微生物发酵生产EPA和DHA的研究进展[J]. 粮食加工,2004(1):48-51.
- [3] 李体海,刘睦超,李敬生. 泔水油经2次酯化处理制备生物柴油[J]. 江苏大学学报:自然科学版,2011(4):478-481.
- [4] 李为民,章文峰,邹国英. 菜籽油油脚制备生物柴油[J]. 江苏石油化工学院学报,2003(1):7-10.
- [5] 施建平. 猪油醇解工艺的研究[J]. 山东化工,2000(2):18-20.
- [6] 王秀文,李干佐,张玉萍,等. 椰子油脂和甲醇在微乳液体系统中醇解反应的研究[J]. 日用化学工业,1992(3):1-5.

- [7] 肖海霞,刘大晨,李安东. 异丁醇醇解植物油的研究[J]. 沈阳化工学院学报,2006(4):276-279.
- [8] Mittelbach M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1990, 67(3): 168-170.
- [9] 陈新,里伟,杜伟,等. 生物酶法制备生物柴油研究现状及展望[J]. 现代化工,2007(8):23-25.
- [10] 王昌梅,张无敌,陈玉保,等. 脂肪酶法制备生物柴油的研究现状及展望[J]. 石油化工,2011(8):907-911.
- [11] 郑青荷. 生物酶法制备生物柴油研究综述[J]. 江西林业科技,2012(1):59-61.
- [12] 刘书成,章超桦,洪鹏志. 酶法制备n-3多不饱和脂肪酸甘油酯的研究进展[J]. 海洋水产研究,2005(5):98-103.
- [13] 唐青涛,余若黔,宗敏华,等. 脂肪酶富集DHA和EPA的研究进展[J]. 华西药学杂志,2001(4):289-292.
- [14] 李巧玲,张朝珍. 分子蒸馏技术及在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂,2004(4):94-97.
- [15] 王丽华,丁红军,李尔春,等. 分子蒸馏技术及其在食品工业中的应用[J]. 包装与食品机械,2007(2):50-53.
- [16] 张秋霞,陈计峦,江英. 分子蒸馏及其在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发,2007(5):154-157.
- [17] 孙兆敏. 酶法制备n-3多不饱和脂肪酸甘油三酯的工艺[D]. 青岛:中国海洋大学,2010.
- [18] Du W, Xu Y, Liu D, *et al.* Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2004(3): 125-129.
- [19] Iso M, Chen B, Eguchi M, *et al.* Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2001(1): 53-58.
- [20] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2002(3): 133-142.
- [21] Soumanou M M, Bornscheuer U T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003(1): 97-103.
- [22] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 17(3): 133-142.

(上接第166页)

- [11] 杨志岩,尹树花,白明,等. 油松花粉中总黄酮提取的响应面优化[J]. 现代食品科技,2008,24(3):253-256.
- [12] 都立辉,刘芳. 16S rRNA基因在细菌菌种鉴定中的应用[J]. 乳业科学与技术,2007(5):207-209.
- [13] 刘佩,周倩,沈生荣,等. 产共轭亚油酸植物乳杆菌的筛选、鉴定与诱变[J]. 食品科学,2010,31(9):135-139.
- [14] Xia Chen, Xiaohua Du, Weihong Wang. Isolation and

- identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional fermented milk of Tibet in China[J]. International Journal of Dairy Technology, 2010, 63(3): 437-444.
- [15] Yang L, Ning Z S, Shi C Z, *et al.* Purification and characterization of an isoflavone conjugates hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase from endophytic bacterium[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(7): 1940-1944.