

文章编号 :1009-038X(2001)06-0555-05

# 胆固醇氧化酶转化蛋黄胆固醇工艺的优化

吕陈峰, 王龙刚, 杨胜利, 王武

(江南大学 生物工程学院; 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

**摘要:**研究了用响应面分析法(RSM)优化酶法转化蛋黄胆固醇的工艺,发现胆固醇氧化酶(COD)添加量及蛋黄粉的稀释率是影响蛋黄胆固醇转化率最重要的因素.在模拟优化的条件下:反应时间为 14.15 h,蛋黄粉稀释率为 3.54, COD 为 5.39 U/g 时,胆固醇转化率达 85.61%.对氧化产物进行分析发现:仅有单一产物胆甾烯酮,该产物具有降血脂、减肥等功效.

**关键词:**胆固醇氧化酶; 蛋黄胆固醇; 响应面分析

中图分类号: Q 554.9

文献标识码: A

## Optimization of Enzymatic Bioconversion of Yolk Cholesterol

LU Chen-feng, WANG Long-gang, YANG Sheng-li, WANG Wu

(School of Biotechnology; The Key Laboratory of Industry Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** An efficient enzymatic process for reducing yolk using Response Surface Methodology (RSM) was developed in this paper. In which COD concentration and dilution rate were found to be the most important factors influencing cholesterol conversion. Under the optimum operational conditions: incubation time of 14.15 h, water/solid ratio of 3.54 and COD concentration of 5.39 U/g, about 85.61% yolk cholesterol was reduced. After TLC analysis of the converted product, cholestenone was the only steroid like compound remaining, which was a potential anti-obesity and anti-hyperlipemia medicine.

**Key words:** cholesterol oxidase; yolk cholesterol; response surface methodology

过多的摄入胆固醇容易引起心血管疾病,近年来出现了许多降低食品特别是蛋黄胆固醇的研究. Elkin 等对产蛋期的母鸡喂养他汀类的胆固醇合成酶(HMG-CoA 还原酶)抑制剂,获得 19%~38%的胆固醇去除率<sup>[1,2]</sup>; Al-Ankari-A 等用醋酸铜及硫酸铜,去除了 14%~20%的蛋黄胆固醇<sup>[3]</sup>; Borges 等人用丙酮萃取蛋黄粉中的胆固醇,并优化了该工艺,并且证明处理后的蛋黄乳化效果仍然不

错<sup>[4]</sup>; 而用  $\beta$ -环糊精脱除蛋黄胆固醇更是得到了大量的研究,胆固醇去除率能达到 90%以上<sup>[5-7]</sup>,但是环糊精在许多国家不是合法的食品添加剂,必须要用酶分解掉残余的环糊精,且该法成本较高;超临界萃取蛋黄胆固醇是一种有效的方法<sup>[8]</sup>,但是该方法投资太大,不适合我国的国情;而酶法转化蛋黄胆固醇有两条路线:一是用胆固醇还原酶将胆固醇还原为不被人体肠道吸收的代谢物——粪甾

收稿日期 2001-06-11; 修订日期 2001-10-09.

基金项目 国家轻工科技发展计划项目(G03-13)资助课题.

作者简介 吕陈峰(1978-),男,江苏无锡人,生物化学工程硕士研究生.

醇<sup>[9]</sup>;二是用 COD 将胆固醇转化为胆甾-4-烯-3-酮<sup>[10,11]</sup>,该产物有降血脂、减肥的功效<sup>[12,13]</sup>,是名贵中药蛤蟆油的主要成分之一<sup>[14]</sup>,COD 法不仅能经济有效的转化胆固醇,其产物更作为一种功能性保健品留在产品中,其应用前景十分广阔。

以前的试验研究了 COD 转化蛋黄胆固醇的最适温度、pH 及金属离子的影响。本试验进一步考察了蛋黄粉的稀释率、COD 用量和反应时间这 3 个因素对胆固醇转化的交互影响,并用响应面分析法优化了 COD 转化蛋黄胆固醇工艺的三因素三水平中心组合设计。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 胆固醇氧化酶** 由本实验室保藏菌种 *Brevibacterium sp.* DGC-007 产生;磷脂酶 C:SIGMA 公司产品。

**1.1.2 培养基** 每升含有胆固醇 1.5 g,葡萄糖 20 g,酵母膏 7.5 g,氯化钠 1 g,醋酸铵 2 g,磷酸氢二钾 0.2 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 g,氯化钙 0.1 g, pH 7.5。

### 1.1.3 试剂

溶液 A 4-氨基-安替比林 1 mmol/L,苯酚 6 mmol/L,磷酸钾缓冲液(pH 7.5) 25 mmol/L,叠氮钠 0.02%,辣根过氧化物酶 7 000 U/L。

溶液 B 胆固醇在异丙醇溶液中的质量浓度为 0.826 g/dL,其中含体积分数 4.26% 的 Triton X-100。

**1.1.4 主要原料** 蛋黄粉 浙江长兴艾格生物有限公司提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌种培养及 COD 粗酶液的制备** 取出 4℃ 保存的菌种,活化,划线分离后,取单菌落直接稀释,加入 4% 的氯化钠,装入 250 mL 三角瓶,35℃,200 r/min 摇床反应 12 h,取离心后的无细胞提取液即为粗酶液。

**1.2.2 试验设计** 根据 Box 和 Hunter 的中心组合设计原理<sup>[15]</sup>,以蛋黄胆固醇转化率为响应值,以影响转化率的蛋黄粉稀释率、COD 的用量、反应时间为自变量,设计了三因素三水平的中心组合设计,回归模型为  $Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j$ ,  $A_0$ 、 $A_i$ 、 $A_{ii}$  和  $A_{ij}$  分别是截距及回归常数,  $X_i$ 、 $X_j$  是变化后的自变量,用 SAS 软件(SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.)<sup>万方数据</sup> 统计数据并描述响应面。因素和试验

水平选取如表 1。

表 1 因素与水平取值表

Tab. 1 Variables and levels for central composite design used to optimize enzymatic modification of yolk cholesterol

因素	编码	因素取值		
		-1	0	1
COD 添加量(U/g)	$X_1$	1	3	5
$W_{水}:W_{蛋黄粉}$	$X_2$	3	5	7
反应时间(h)	$X_3$	9	12	15

**1.2.3 COD 处理方法** 取 10 g 蛋黄粉,根据试验加入相应活性单位的 COD 粗酶液后,根据不同稀释率用 0.05 mol/L pH 7.5 磷酸缓冲液装入有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,于 37℃、200 r/min 振荡培养 36 h 后,将发酵液于 4℃、7 000 r/min 离心 10 min 后取上清液作为粗酶液。

**1.2.4 粗酶液中胆固醇氧化酶活力的测定** 取溶液 A 3 mL,溶液 B 150  $\mu$ L,于试管中,37℃ 保温 3 min,加入 50  $\mu$ L 发酵上清液,反应 5 min,沸水浴 3 min,冷却后,用 1 cm 比色皿,在 500 nm 处测吸光度;1 U 定义为 1 min 内转化胆固醇生成 1  $\mu$ mol  $H_2O_2$  的酶量。

### 1.2.5 蛋黄中胆固醇及胆甾烯酮测定方法

参考 Rong<sup>[16]</sup> 等的 HPLC 方法。取 1 mL 反应混合液,用 5 mL 的 200 g/L 的 KOH 甲醇溶液 70℃ 皂化 15 min,取 1 mL 皂化液用 5 mL 石油醚 60~90℃ 萃取后,60℃ 水浴,氮气吹干,用 1 mL 异丙醇溶解。在波长 208 nm 和 241 nm 分别检测胆固醇和胆甾烯酮。

HPLC 分析条件为:色谱柱为 HP ZORBAX C-18(4.6 cm  $\times$  25 cm),流动相  $V_{乙腈}:V_{异丙醇} = 4:1$ ,流速为 1 mL/min,检测波长为 208 nm,进样量为 10  $\mu$ L。

**1.2.6 胆固醇氧化物的薄板层析测定** 按照 Aihar<sup>[11]</sup> 的薄层层析方法

**1.2.7 蛋黄中一般成分的分析** 按照 AOAC 进行测定<sup>[18]</sup>。

**1.2.8 统计分析** 试验重复 2 次,获得 COD 产量的均值用软件程序 SAS 分析。

## 2 结果与讨论

在以前的试验中探讨了 COD 转化蛋黄胆固醇的最适反应温度、pH 以及一些反应促进剂,而真正要使该方法具有商业价值,还需进一步优化工艺,

以期能经济的生产低胆固醇蛋黄粉. COD 的使用量、蛋黄的稀释率都与生产成本密切相关,而控制合理的反应时间,即能保证一定的胆固醇转化率,又不能使反应时间过长,以减少细菌的侵染机会和降低生产能耗.

2.1 COD 转化蛋黄胆固醇工艺的优化

近年来,响应面分析被广泛应用于各种工艺的优化,能以较少的实验次数有效地找出工艺的最佳参数并分析诸因素的交互影响. 根据表 1 的设计,作者做了 15 次试验,12 次析因试验和 3 个检验误差的零点试验,其结果见表 2. 并对该结果用多项回归得到一个二次回归方程. 经过方差分析,  $F$  检验 0.01 水平显著,  $R > R_{0.01}$ , 失拟项很小(见表 3), 都说明回归模型拟合情况良好, 回归方程代表性较好, 能准确的预测实际情况, 只有小于 1% 的变化无法用回归模型解释. 从表 3 还可以看出, 一次项、二次项和交互项的  $F$  值都较大, 说明诸因素对 COD 产量的影响是复杂的交互作用而不是简单的线性关系.

表 2 响应面分析结果

Tab.2 The 3 × 3 factorial central composite designs and response values used to optimize enzymatic modification of yolk cholesterol

编号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	蛋黄胆固醇转化率/%
1	-1	-1	0	52.66
2	-1	0	-1	49.70
3	-1	0	1	57.32
4	-1	1	0	58.34
5	0	-1	-1	64.91
6	0	-1	1	71.12
7	0	1	-1	64.37
8	0	1	1	73.48
9	1	-1	0	82.15
10	1	0	-1	74.41
11	1	0	1	83.94
12	1	1	0	77.11
13	0	0	0	75.54
14	0	0	0	74.39
15	0	0	0	73.91

在用  $T$  检验分析回归系数的  $T$  时,  $T$  值越大说明该因素越重要, 而 COD 用量( $X_1$ )的  $T$  值最

大, 说明其对胆固醇转化率影响最大(见表 4), 这也说明了蛋黄胆固醇与 COD 的接触仍是影响胆固醇转化的重要因素, 这点同以前的研究一致. 这点从相应的等高线图(见图 1、图 2、图 3)也可以直观的看出, 转化率随着时间和 COD 用量增加的方向增加, 但是用增加 COD 浓度和反应时间来换取转化率的增加会使成本和细菌侵染机会急剧增加, 因而不明智的. 由图 2、3 可见, 最大转化率位于稀释率的中心点附近, 预示着在工业生产上只需要较小的稀释率就可以得到产品, 节省了干燥能耗及其它相关生产成本.

表 3 回归方差分析

Tab.3 Analysis of variance for the regression model of cholesterol conversion obtained from the experimental results

方差来源	自由度	平方和	$F$ 值
一次项	3	1 372.3	720.6 <sup>a</sup>
二次项	3	131.96	69.29 <sup>a</sup>
交互项	3	31.74	16.67 <sup>a</sup>
总回归	9	1 536.02	268.9 <sup>a</sup>
失拟项	3	1.771	0.841
误差	2	1.403	
$R^2$		0.9979	
变异系数		1.1566	

注 <sup>a</sup> 表示在 0.01 水平显著

表 4 回归系数取值

Tab.4 Regression coefficients of a full second-order polynomial model for cholesterol conversion

系数	胆固醇转化率/%	$T$
$A_0$	74.61	-6.746 <sup>a</sup>
$A_1$	12.45	14.11 <sup>a</sup>
$A_2$	0.3075	5.484 <sup>a</sup>
$A_3$	4.059	8.627 <sup>a</sup>
$A_{11}$	-4.588	-11.065 <sup>a</sup>
$A_{22}$	-2.680	-6.727 <sup>a</sup>
$A_{33}$	-2.46	-5.934 <sup>a</sup>
$A_{12}$	0.4775	1.199
$A_{13}$	0.7250	1.820
$A_{23}$	3.683	-8.882 <sup>a</sup>

注 <sup>a</sup> 表示在 0.01 水平显著

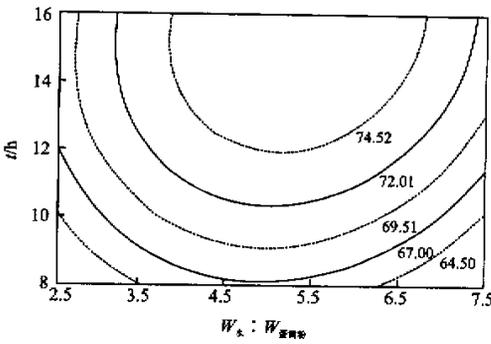


图1 稀释率-时间等高线图(COD用量为3 U/g)  
Fig.1 Effect of water/solid ratio and incubation time (h) on cholesterol conversion at COD/solid ratio of 5:1

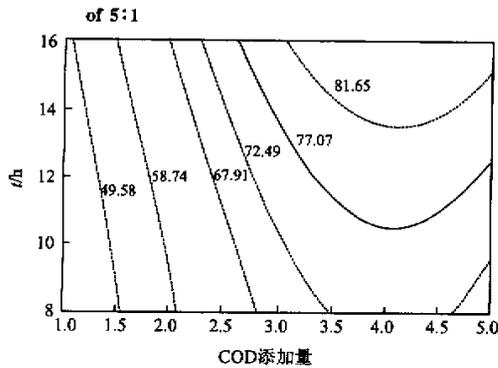


图2 COD添加量-时间等高线图(稀释率为5倍)  
Fig.2 Effect of COD/solid ratio and incubation time on cholesterol conversion at water/solid ratio of 5:1

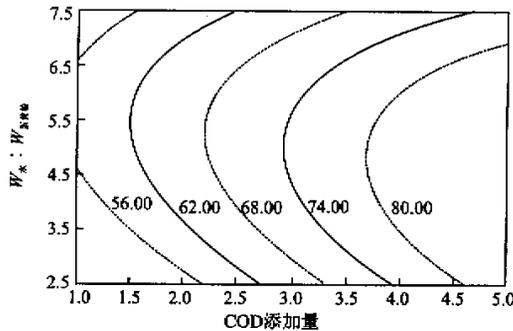


图3 COD添加量-稀释率等高线图(时间为12 h)  
Fig.3 Effect of COD/solid ratio and water/solid ratio on cholesterol conversion at incubation time of 12 h

2.2 酶法转化蛋黄胆固醇最优参数的预测

规范分析(Canonical Analysis)是一种能求出响应面的拐点并判断它是最大值点、最小值点还是马鞍形点的数学手段<sup>[6]</sup>,用规范分析分析试验结果,发现求出的拐点为最大值点,预期最优条件为:反应时间为14.15 h,蛋黄粉稀释率3.54%,COD用量5.39 U/g,转化率为85.61%。为了验证该条件,

用上述条件进行了试验,试验结果见图4.12 h后酶转化反应基本完成,经14.15 h后,胆固醇转化率达85.61%,与回归方程拟合度达到90%左右,一致性较好。

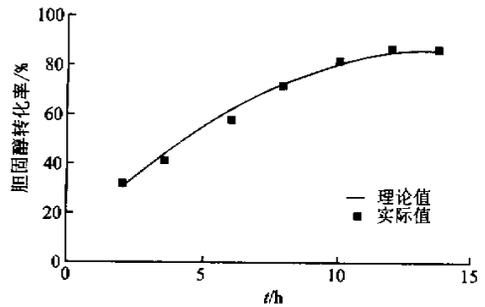


图4 优化条件下反应时间曲线  
Fig.4 Time course of yolk cholesterol conversion under optimum condition

2.3 胆固醇氧化产物的鉴定

经薄板层析测定氧化产物,发现只有单一产物胆甾-4-烯-3-酮(简称胆甾烯酮),与以前用该酶氧化游离胆固醇结果一致<sup>[17]</sup>.HPLC图谱也支持这一结论(见图5)。但是转化后得到的胆甾烯酮只占胆固醇总转化的40%左右(数据略),可能是部分胆甾烯酮继续降解成为非固醇类化合物<sup>[11]</sup>。

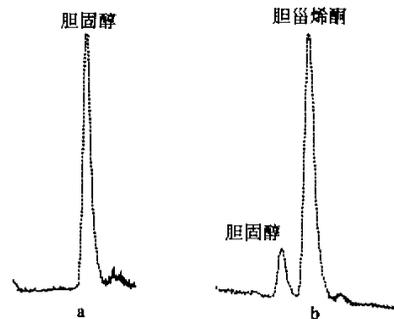


图5 未处理蛋黄胆固醇样品(a)和COD处理后蛋黄胆固醇样品(b)HPLC图  
Fig.5 HPLC diagram of untreated(a) and enzyme treated(b) yolks

2.4 酶反应前后蛋黄中主要成分比较

由表5可见,蛋黄中一般成分在酶处理前后变化不大,但脂类降低3.54%。胆固醇氧化酶仅将胆固醇氧化为胆甾-4-烯-3-酮,也就是说,在以胆固醇氧化酶降低蛋黄中胆固醇的反应中,只有胆固醇转化为胆甾-4-烯-3-酮,其它成分没有变化,而胆甾-4-烯-3-酮又具有降低血脂的功能。以此方法可以生产低胆固醇且具有保健功能的蛋黄制品,具有潜在较大的经济效益。

表 5 蛋黄粉在酶处理前后一般成分的变化

Tab.5 General composition of untreated and enzyme treated yolks %

成分	未经酶处理	COD 处理
粗蛋白	30.6 ± 0.60	28.35 ± 0.80
脂类	67.98 ± 1.70	64.44 ± 0.90
胆固醇	2.34 ± 0.24	0.32 ± 0.09
灰分	2.07 ± 0.05	2.50 ± 0.07

### 3 结 论

COD 法转化蛋黄胆固醇除了能有效降低胆固

醇含量,还积极的将胆固醇转化为具有降血脂、减肥等保健功能的胆甾烯酮,经过分析影响 COD 法转化蛋黄胆固醇的 3 个关键因素:COD 用量、稀释率和反应时间,发现 COD 用量是影响胆固醇转化率最重要的因素,而该工艺对稀释率要求不高,使其更具有实际生产意义.进而用 RSM 优化了该工艺,在模拟优化的条件下:反应时间为 14.15 h,蛋黄粉稀释率 3.54%,COD 用量 5.39 U/g,用上述条件进行了试验,胆固醇转化率达 85.61%.而留在产品中的胆甾烯酮具有降血脂减肥等功能,增加了产品的附加值.

### 参考文献:

- [1] ELKIN R G, ZHIHONG Y, YUAN Z, *et al.* Select 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors vary in their ability to reduce egg yolk cholesterol levels in laying hens through alteration of hepatic cholesterol biosynthesis and plasma VLDL composition[J]. **Journal of Nutrition**, 1999, 129(5):1010~1019.
- [2] MORI A V, MENDONCA C X, SANTOS C, *et al.* Effect of dietary lipid-lowering drugs upon plasma lipids and egg yolk cholesterol levels of laying hen[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1999, 47(11):4731~4735.
- [3] AL ANKARI A, NAJIB H, A HOZAB A. Yolk and serum cholesterol and production traits, as affected by incorporating a supraoptimal amount of copper in the diet of the leghorn hen[J]. **British Poultry Science**, 1998, 39(3):393~397.
- [4] MARTUCCI E T, BORGES S V. Extraction of cholesterol from dehydrated egg yolk with acetone: determination of the practical phase equilibrium and simulation of the extraction process[J]. **Journal of Food Engineering**, 1997, 32(4):365~373.
- [5] MANOHAR B, BASAPPA C, RAO D N, *et al.* Response surface studies on cholesterol reduction in egg yolk using beta-cyclodextrin[J]. **Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, 1998, 206(3):189~192.
- [6] CULLY J, VOLBRECHT H R. Process for the removal of cholesterol from egg yolk[P]. 美国专利:USP 5292546, 1994-03-08.
- [7] SMITH D M, AWAD A C, BENNINK M R. Cholesterol reduction in liquid egg yolk using  $\beta$ -CD[J]. **Journal of Food Science**, 1995, 60(4):691~694.
- [8] BRINGE N A, HOWARD D B, CLARK D R. Low fat low cholesterol egg yolk[C]. **IFT Annual Meeting**, 1995.
- [9] BEITZ, DONALD C, YOUNG, *et al.* Method of converting cholesterol in food to coprostano[P]. 美国专利:USP 4921718, 1990-05-01.
- [10] CHRISTODOULOU S, TRAN V H, TREWHELL M, *et al.* Enzymatic degradation of egg yolk cholesterol[J]. **Journal of Food Protection**, 1994, 57(10):908~912.
- [11] AIHARA H, WATANABE K, NAKAMURA R. Degradation of cholesterol in egg yolk by *Rhodococcus equi* No. 2[J]. **Journal of Food Science**, 1988, 53(2):659~660.
- [12] SUZUKI KUNIO (Wako JP). Anti-obesity agent 4-Cholesten-3-one[P]. USP 5610152, 1995-1-11.
- [13] KASHIMA MINORU, KINOSHITA TOSHA, INAOKA ASUNORI, *et al.* Cholestanones for Treatment of Liver Diseases[P]. 日本专利:JP 07 69898, 1995-03-14.
- [14] 赵文英. 蛤蟆油化学成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(1):24~29.
- [15] BOX G E, BEHNKEN D W. Some new three level design for the study of quantitative variables[J]. **Technometrics**, 1960, 2:456~476.
- [16] RONG Z Z, LONG L, TAO L, *et al.* An improved method of cholesterol determination in egg yolk by HPLC[J]. **Journal of Food Biochemistry**, 1999, 23(3):351~361.
- [17] 韩振芳. 胆固醇氧化酶的发酵研究[J]. 无锡轻工大学学报, 1998, 18(2):18~22.
- [18] AOAC. Eggs and egg products, 16 edition[M]. Washington D C:Association of Official Analytical Chemists, 1996.

(责任编辑 杨萌 朱明)