

类可可脂的制备方法研究进展

杨航¹, 岳珂¹, 秘英静¹, 张林尚^{1,2}, 陈小军³, 毕艳兰^{1,2}

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001; 2. 中原食品实验室, 河南 漯河 462300;

3. 河南启亿粮油工程技术有限公司, 郑州 450001)

摘要:类可可脂(CBE)是一类重要的糖果用脂,可以经过物理复配或者酶法酯交换获得。近年来,微生物发酵法制备CBE成为新的研究热点,各种微生物产脂策略正在被应用,以提高CBE的产量,例如化学诱变或基因工程等。旨在为CBE的生产提供参考,从原料油来源、制备方法研究现状两个方面分别综述了CBE的传统制备方法(物理复配和酶法酯交换)和新方法(微生物发酵)的研究及应用情况。微生物发酵法更符合绿色、健康、低碳的发展需求,能够为CBE的制备提供一种新思路,也有利于推进CBE的产业化应用,具有潜在发展优势。

关键词:类可可脂;原料油;产油微生物;发酵法

中图分类号:TS225.6;TS246.5 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)04-0052-07

Advances in the preparation of cocoa butter equivalent

YANG Hang¹, YUE Ke¹, BI Yingjing¹, ZHANG Linshang^{1,2},
CHEN Xiaojun³, BI Yanlan^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2. Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 462300, Henan, China; 3. Henan Qiyi Grain and Oil Engineering Technology Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Cocoa butter equivalent (CBE) is an important lipid intended for confectionery, which can be obtained by physical compounding or enzymatic transesterification. In recent years, microbial fermentation method for the preparation of CBE has become a new research hotspot, and various microbial lipid production strategies have been applied to improve the yield of CBE, such as chemical mutagenesis or genetic engineering. In order to provide reference for the production of CBE, the research and application of traditional CBE preparation method (physical compounding and enzymatic transesterification) and new method (microbial fermentation) were summarized from the two aspects of raw oil source and research status of preparation method. Microbial fermentation method is more in line with the needs of green, healthy and low-carbon development, which can provide a new idea for the preparation of CBE, but also be conducive to promoting the industrial application of CBE, and has potential development advantages.

Key words: cocoa butter equivalent; raw oil; oleaginous microorganisms; fermentation method

可可脂(CB)是从可可豆中提取出来的天然植物油脂,可作为巧克力及糖果的主要成分^[1-2]。受环境气候、种植面积和病虫害的影响,全球可可豆目

前年均采集量仅为500万t,可可脂原材料的供应远不能达到市场的增量需求^[3],造成了大量成品巧克力的市场缺口。另外,我国绝大部分地区不适合可可脂类植物生长,用于生产的CB主要依赖进口。因此,这就迫切需要寻找具有与CB脂肪酸特征相似的替代品。类可可脂(CBE)被称为人造的CB,其甘油三酯组成和同质多晶现象与天然CB十分相似,已被广泛探索用于替代CB。

CBE的传统制备方法是以植物油为原料经过

收稿日期:2023-05-21;修回日期:2023-12-10

基金项目:河南省高等学校重点科研项目计划(23A550002)

作者简介:杨航(1996),男,硕士研究生,研究方向为油脂化学(E-mail) yanghang20212021@126.com。

通信作者:毕艳兰,教授(E-mail) bylzy@126.com。

物理复配或酶法酯交换制备的,但原料油易受地域、气候、产量及价格等的限制。近年来,微生物发酵法成为制备 CBE 新的研究热点,相较于传统制备方法,其以植物油为原料有一定的区别性优势,如不依赖于耕地和环境气候,能够高效转化农业废弃可再生资源(比如生物质纤维素等原材料)等。本文从原料油来源、制备方法研究现状两个方面分别综述了 CBE 的传统制备方法和新方法(微生物发酵法)的研究及应用情况,以期 CBE

的生产提供参考。

1 CBE 传统制备方法

1.1 原料油

常见的制备 CBE 的原料油包括乳木果油(Shea butter, SB)、婆罗双树脂(Sal fat, SF)、雾冰草脂(Illipe butter, IB)、烛果油(Kokum kernel fat, KKF)、芒果仁油(Mango kernel fat, MKF)及棕榈硬脂(PMF)^[4],其主要脂肪酸组成及甘三酯组成如表 1 所示^[4-9]。CB 的物理化学特性见表 2。

表 1 不同 CBE 原料油的脂肪酸组成及甘三酯组成

原料油	脂肪酸组成/%			甘三酯组成/%		
	棕榈酸	硬脂酸	油酸	POP	POS	SOS
乳木果油	3.0~4.0	46.0~47.0	42.0~43.0	0~3.0	6.0~7.0	21.0~42.0
婆罗双树脂	5.0	44.0	40.0	5.0	11.0~16.0	36.0~42.0
雾冰草脂	20.0~21.0	40.2~41.0	35.3~36.0	9.9~13.1	40.4~43.2	35.0~40.6
烛果油	8.0~8.9	43.0~44.2	40.8~41.0	0.1~0.2	4.6~6.0	72.8~78.0
芒果仁油	3.0~18.0	24.0~57.0	34.0~56.0	0.6~2.0	9.0~16.0	20.0~59.0
棕榈硬脂	44.5~45.0	5.5~6.0	36.2~37.0	50.7~51.0	5.8~6.0	0.3~0.4

注:POP. 1,3-二棕榈酸-2-油酸甘油三酯;POS. 1-棕榈酸-2-油酸-3-硬脂酸甘油三酯;SOS. 1,3-二硬脂酸-2-油酸甘油三酯。下同

表 2 CB 的物理化学特性

项目	指标
理化性质 ^[10-13]	
碘值(I)/(g/100 g)	31.0~39.0
酸值(KOH)/(mg/g)	0.4~2.2
滑动熔点/°C	25.0~35.0
脂肪酸组成/% ^[10,14-16]	
棕榈酸	24.0~33.0
硬脂酸	33.0~41.0
油酸	26.0~37.0
亚油酸	1.0~4.0
甘三酯组成/% ^[11-14,17]	
POO	1.0~6.0
POP	13.0~22.0
POS	34.0~46.0
SOS	23.0~29.0
SOO	1.0~10.0

注:POO. 1-棕榈酸-2,3-二油酸甘油三酯;SOO. 1-硬脂酸-2,3-二油酸甘油三酯

由表 1 可知,6 种原料油中,乳木果油、婆罗双树脂、烛果油和芒果仁油是 SOS 型甘三酯最常见的来源,其中:乳木果油的硬脂酸和油酸含量分别为 46.0%~47.0% 和 42.0%~43.0%,SOS 含量在 21.0%~42.0% 之间;婆罗双树脂的硬脂酸和油酸含量分别为 44.0% 和 40.0%,SOS 含量在 36.0%~42.0% 之间;烛果油的硬脂酸和油酸含量均较高,分别在 43.0%~44.2% 和 40.8%~41.0%,SOS 含量

在 72.8%~78.0% 之间;芒果仁油的硬脂酸和油酸含量分别为 24.0%~57.0% 和 34.0%~56.0%,SOS 含量在 20.0%~59.0% 之间。芒果仁油通过分提可以生产出富含 SOS 的油脂,对于配制高熔点 CBE 效果甚佳。而对于雾冰草脂来说,其脂肪酸组成和甘三酯结构更接近于 CB(见表 2),其棕榈酸、硬脂酸和油酸含量分别为 20.0%~21.0%、40.2%~41.0% 和 35.3%~36.0%,POP、POS 和 SOS 含量分别在 9.9%~13.1%、40.4%~43.2% 和 35.0%~40.6% 之间,可不经分提直接用于制备 CBE。与乳木果油、婆罗双树脂、烛果油和芒果仁油不同,棕榈硬脂富含 POP,其含量为 50.7%~51.0%,可与对 POP 有需求的脂肪复配,制备与商业 CB 相似度高的 CBE^[4-5]。

1.2 制备方法

以植物油为原料制备 CBE 的方法有物理复配和酶法酯交换两种。物理复配法可以通过两种及以上油脂复配得到 CBE,如棕榈硬脂与其他植物油,如婆罗双树脂、乳木果硬脂、芒果仁油等经过复配得到 CBE^[6,18-20],该方法简单,使用方便,部分油脂经过分提后可直接添加到 CB 中,但是原料油的价格、产量受天气等影响波动较大。酶法酯交换是利用酶促酯交换反应改变原料中甘油酯的组成,从而制备 CBE。目前,酶法酯交换制备 CBE 主要是利

用具有 Sn-1,3 位定向催化特性的脂肪酶催化 Sn-2 位富含油酸且 Sn-1,3 位富含棕榈酸或硬脂酸酰基供体的原料油进行酯交换反应,从而获得目的产物。如棕榈硬脂富含棕榈酸和 POP 型甘油三酯,其与硬脂酸、菜籽油和雾冰草脂以不同比例混合后进行酶促酯交换得到的混合油脂的甘三酯组成与 CB 相似^[6,21-22],制备的 CBE 既不会产生共晶效应,

同时含有 $\omega-3$ 和 $\omega-6$ 多不饱和脂肪酸。另外,酶法酯交换可以利用廉价原料制备 CBE,但是存在产生副产物等缺点。

物理复配和酶法酯交换法制备 CBE 的部分研究见表 3。应用两种方法制备的 CBE 产品逐渐被开发,部分产品专利见表 4。

表 3 物理复配和酶法酯交换法制备 CBE 的部分研究

制备方法	原料油	制备工艺	应用	参考文献
物理复配	MKF、PMF	MKF 与 PMF 以 10 种不同的比例进行物理复配,所得 10 个样品的 POP、POS 和 SOS 含量分别在 11.0% ~ 38.8%、15.4% ~ 16.2% 和 22.1% ~ 36.9% 之间,与商业 CB 相似	得到的 CBE 可作为绿色优质 CB 替代品来生产使用	[23]
	HOHS、PMF	将 PMF 与 HOHS 按 1:4 的比例混合得到混合油脂,其 POP、POS 和 SOS 的含量分别为 20.8%、34.4% 和 36.9%	制备的 CBE 建议用于化合物涂层和巧克力制造	[24]
	PMF、SS	PMF 和 SS 通过物理复配得到的 4 种最佳混合比例分别为 5:95、10:90、20:80 和 30:70,其甘三酯组成与 CB 相似	4 种混合物可与 CB 混合,用于制造巧克力,同时不会导致物理性能的显著变化	[25]
酶法酯交换	IB、PMF	IB 与 PMF 以 10:3 的比例混合,通过酶法酯交换生产的混合油脂中,POP、POS 和 SOS 的含量分别为 19.1%、42.7% 和 29.9%,与 CB 的甘三酯组成相似	得到的混合油脂适合作为 CBE 使用	[6]
	PMF、SA	PMF 与 SA 通过酶法酯交换生产的混合油脂中,POP、POS 和 SOS 的含量分别为 19.52%、49.53% 和 28.46%。与 PMF 相比,混合油脂的甘三酯组成更类似于 CB	在不产生共晶效应的情况下以不同比例生产 CBE	[22]
	PMF、CO	将 PMF 液化、均质,与 CO 按照 3:1 的比例混合,再通过酶促酯交换制备混合油脂,混合油脂的 POP、POS 和 SOS 含量分别为 30.33%、17.53% 和 3.26%。	用制备的混合油脂生产高营养的 CBE,其中含有 $\omega-3$ 和 $\omega-6$ 多不饱和脂肪酸,可作为 CBA	[21]

注:HOHS. 高油酸高硬脂酸葵花籽油;SS. 乳木果硬脂;SA. 硬脂酸;CO. 菜籽油;CBA. 可可脂替代品

表 4 物理复配和酶法酯交换法制备 CBE 的相关专利的进展

制备方法	专利号	反应底物	制备工艺	产物分析	参考文献
物理复配	CN105831370B	MKF、PMF	将 MKF 和 PMF 按 7:3 的比例混合,再与甲基戊烷按 1:6 的比例混合,混合物经过二级分提	可富集富含对称型甘三酯的 CBE 的组分,POP、POS 和 SOS 总含量达到 72%,可实现与 CB 的互配相容	[26]
	CN105831370B	IB、棕榈油	将 IB 和棕榈油按 8:2 混合,再与正己烷按 8:1 混合,混合物经过二级分提	可富集富含对称型甘三酯的 CBE 的组分,POP、POS 和 SOS 总含量达到 66%,与 CB 有良好的相容性	[26]
酶法酯交换	CN105936922B	棕榈油、硬脂酸	将 33℃ 棕榈油和硬脂酸按照 1:2.2 混合,加入解脂耶氏酵母游离脂肪酶作催化剂进行酶法酯交换,同时添加适量抗氧化剂,反应后得到 CBE	制备的 CBE 中 POP、POS 和 SOS 的含量分别为 13.3%、50.3% 和 32.2%,与 CB 类似	[27]
	CN106035922B	PMF、硬脂酸甲酯	将 28℃ PMF 与硬脂酸甲酯按照 1:1 的比例混合,加入 Sn-1,3 位特异性脂肪酶作催化剂进行酶法酯交换,反应后得到 CBE	连续化制备的 CBE 的甘三酯组成与 CB 类似	[28]

2 CBE 新制备方法——微生物发酵法

2.1 产油微生物

除了各种传统的脂质来源(植物和动物),许多微生物菌株,包括真菌、藻类、细菌等,可以产生不同

的脂质^[29]。产油酵母是积累脂质效果显著的一类微生物,部分重要的产油酵母及其生物量和油脂含量如表5所示。

表5 重要的产油酵母及其生物量和油脂含量

酵母	菌株	生物量/(g/L)	油脂含量/%	参考文献
丝孢酵母属	皮状丝孢酵母(<i>Tichosporon cutaneum</i>)	2.75	39.8	[30]
	发酵性丝孢酵母(<i>Tichosporon fermentans</i>)	28.6	43.9	[31]
	真皮毛孢子酵母(<i>Tichosporon dermatis</i>)	7.4	13.5	[32]
	丝孢酵母(<i>Tichosporon coremiiforme</i>)	5.8	19.1	[33]
红酵母属	粘红酵母(<i>Rhodotorula glutinis</i>)	6.9	38.3	[34]
	圆红冬孢酵母(<i>Rhodospiridium toruloides</i>)	10.7	59.0	[35]
其他高产酵母	斯达油脂酵母(<i>Lipomyces starkeyi</i>)	9.5	68.0	[36]
	解脂耶氏酵母(<i>Yarrowia lipolytica</i>)	7.78	45.5	[37]
	浅白隐球酵母(<i>Cryptococcus albidus</i>)	26.4	55.1	[38]
	弯曲隐球酵母(<i>Cryptococcus curvatus</i>)	26.1	30.0	[39]

2.2 制备方法

目前已报道的利用微生物生产 CBE 的方法包

括培养基组分优化^[40-46]、诱变选育^[47-49]及基因改造^[50-53],详细的情况见表6。

表6 一些重要的菌种在不同培养方法下产 CBE 的研究

制备方法	菌种	培养条件	菌油分析	参考文献
培养基组分优化	解脂耶氏酵母(<i>Yarrowia lipolytica</i>)	羊脂为碳源,酒石酸铵和酵母提取物为氮源,温度 30℃,pH 6.0,C/N 值 60	菌体油脂含量达到 33.1%,菌体脂肪酸组成与 CB 相似,其中棕榈酸、硬脂酸和油酸含量分别为 24.6%、31.34%、34.29%	[40]
	解脂耶氏酵母(<i>Yarrowia lipolytica</i>)	甘油为碳源,酒石酸铵和酵母提取物为氮源,温度 30℃,pH 6.0,培养时间 3 d	菌体油脂含量达到 19.7%,菌体脂肪酸组成与 CB 相似,其中棕榈酸、硬脂酸和油酸含量分别为 23%、32%、33%	[41]
	土生假丝酵母(<i>Candida humicola</i>)	接种量 3.0 mL,温度 26℃,pH 5.5,C/N 值 60,培养时间 4 d,蛋白胨为氮源,蔗糖为碳源	在编号为 2 和 10 的样品中,菌体油脂含量分别为 12.47% 和 13.80%,且菌体的脂肪酸组成与 CB 相似	[44]
诱变选育	弯曲顶孢酵母(<i>Apiotrichum curvatum</i>)	从经过诱变剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)诱变处理后的突变体菌株(Ufa)中,分离出可在无饱和脂肪酸的情况下生长的逆转体,对其进行培养	与野生型菌(饱和脂肪酸含量 44%)相比,菌体中油脂产量达到 0.35 g/g,逆转体脂质中的饱和脂肪酸含量 27%~86%,其棕榈酸、硬脂酸和油酸含量分别为 30%、27%、29%,与 CB 相似	[47]
	弯曲顶孢酵母(<i>Apiotrichum curvatum</i>)	将经过诱变剂 MNNG 诱变或紫外线照射处理的 <i>A. curvatus</i> 进行培养	菌油中硬脂酸含量从 10%~15% 提高到 43%	[48]
	弯曲顶孢酵母(<i>Apiotrichum curvatum</i>)	使用经过诱变剂 MNNG 诱变的 <i>A. curvatus</i> 的突变体(Ufa),在葡萄糖为碳源,酵母提取物为氮源的条件下进行培养,培养时间 3 d,pH 7	菌体脂肪酸组成与 CB 相似,饱和脂肪酸含量为 60%~64%,棕榈酸、硬脂酸和油酸含量分别为 22%、36%、24%	[49]

续表 6

制备方法	菌种	培养条件	菌油分析	参考文献
基因改造	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	将可基因 <i>GPAT</i> 、 <i>LPAT</i> 和 <i>DGAT</i> 在菌株中表达	菌体油脂产量达到 12 mg/g 左右,相较于野生菌株而言,POP、POS 和 SOS 含量提高	[51]
	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	培养过程中,在菌体内表达乙酰辅酶 A 羧化酶 <i>ACC1</i> 、 <i>Elo1</i> 和 <i>Ole1</i>	菌体油脂产量达到 50 mg/g 左右,相较于野生菌株,CBE 产量提高了 5.8 倍	[52]
	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	筛选出油料作物产生 SOS 的 <i>GPAT</i> 、 <i>LPAT</i> 和 <i>DGAT</i> 编码的高效基因,在酿酒酵母中表达	通过表达高效基因,显著提高了 CBE 的产量	[53]

采用培养基组分优化方法时,碳源的选择与菌油的脂肪酸含量相关,如在解脂耶氏酵母发酵提取菌油的研究中,以羊脂为碳源时,菌体中油脂含量达到 33.1%,其棕榈酸和油酸的含量要略高于用甘油作碳源时的,但是以甘油为碳源时菌油的硬脂酸含量要略高于以羊脂为碳源时的^[40-41]。

采用诱变选育方法时,通过诱变剂 MNNG 诱变或紫外线照射处理的 *A. curvatum* 与野生菌株相比,菌体中油脂产量、硬脂酸和棕榈酸的含量提高^[47-49]。通过基因工程改造菌株也卓有成效,所产油脂的成分接近于 CB,如:*S. cerevisiae* 通过体内表达乙酰辅酶 A 羧化酶 *ACC1*、*Elo1* 和 *Ole1*,CBE 产量显著提高,比野生菌株提高了 5.8 倍;甘油-3-磷酸酰基转移酶(*GPAT*)、溶血磷脂酸酰基转移酶(*LPAT*)和二酰甘油酰基转移酶(*DGAT*)是 CBE/SOS 生产中的关键酶,植物 SOS 生物合成基因的鉴定及其在酿酒酵母中的表达可以促进 SOS 的产生^[50-51,53]。

藻类脂肪也有相应的研究,FDA 批准了一种来自藻类的富含 SOS 的油脂为 GRAS 产品[GRAS Notice (GRN) No. 673],该藻为 *Prototheca moriformis* S7737,其藻油中含有超过 55% 的硬脂酸,SOS 含量达 75% 以上,可用于制备 CBE。Ghazani 等^[54]对比了新型高 SOS 含量的两种藻油(ABA 和 ABB)及乳木果油硬脂的组成,结果发现,两种藻油添加 5% 的量子巧克力中可作为 CB 改良剂,与 PMF 调配作为 CBE。目前已有通过微生物发酵法制备 CBE 产品的专利,如专利 CN104673848A 公开了一种羊油和硬脂酸甲酯为碳源,酵母提取物和酒石酸铵为氮源,通过解脂耶氏酵母培养,得到与 CB 脂肪酸组成相似的 CBE 产品^[55]。该专利对微生物发酵生产 CBE 领域有指导性作用。

综上,在微生物发酵领域,已从多个方面对产油微生物发酵生产 CBE 进行了研究,并取得了阶段性的成果。随着微生物调控策略的不断成熟,微生物

油脂可以向多个方向不断延伸,包括 CBE、多不饱和脂肪酸油脂和生物表面活性剂等。

3 结束语

CBE 是 CB 的理想替代品,物理复配和酶法酯交换为 CBE 生产的常见方法。微生物发酵法作为 CBE 生产的一种新技术,其不依赖于耕地和环境气候,能够高效转化农业废弃可再生资源(比如生物质纤维素等原材料),所得产物在细胞内合成,产物组成与 CB 接近,产物提取工艺简单,更符合绿色、健康、低碳的发展需求,能够为 CBE 的制备提供一种新思路,也有利于推进 CBE 的产业化应用,是一种具有潜力的 CBE 生产方法。

参考文献:

- [1] STEINBERG F M, BEARDEN M M, KEEN C L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health[J]. *J Am Diet Assoc*, 2003, 103(2): 215-223.
- [2] BOOTELLO M A, HARTEL R W, LEVIN M, et al. Studies of isothermal crystallisation kinetics of sunflower hard stearin-based confectionery fats[J]. *Food Chem*, 2013, 139(1/2/3/4): 184-195.
- [3] 徐鹏. 纪念王义翘教授:解脂耶氏酵母替代植物油脂的技术瓶颈及展望[J]. *合成生物学*, 2021, 2(4): 509-527.
- [4] 池永清, 徐学兵, 毕艳兰, 等. 制备类可可脂原料用油的研究进展[J]. *中国油脂*, 2017, 42(5): 48-53.
- [5] 金俊, PEMBE W M, 郑立友, 等. 5 种亟待开发的类可可脂木本油料脂肪[J]. *中国油脂*, 2017, 42(4): 1-7.
- [6] BAHARI A, AKOH C C. Synthesis of a cocoa butter equivalent by enzymatic interesterification of Illipe butter and palm midfraction[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2018, 95(5): 547-555.
- [7] 周沁颖, 金俊, 王颖琪, 等. 炆果油的组成特征及其对巧克力抗霜性影响的研究[J/OL]. *中国油脂*: 1-10 [2023-05-21]. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.230007>.
- [8] 张传光, 罗婷, 袁新华, 等. 云南引种乳木果现状及乳木果油脂脂肪酸组成分析[J]. *中国油脂*, 2019, 44(4):

- 102–104, 111.
- [9] 李健, 徐斌, 王宏平. 糖果及巧克力专用油脂制备探讨[J]. 粮食与油脂, 2004, 17(9): 44–46.
- [10] SONWAI S, KAPHUEAKNGAM P, FLOOD A. Blending of mango kernel fat and palm oil mid – fraction to obtain cocoa butter equivalent[J]. J Food Sci Technol, 2014, 51(10): 2357–2369.
- [11] JIN J, WARDA P, QI C, et al. Mango kernel fat based chocolate fat with heat resistant triacylglycerols: Production via blending using mango kernel fat mid – fraction and palm mid – fractions produced in different fractionation paths [J]. RSC Adv, 2016, 6(110): 108981–108988.
- [12] JIN J, AKOH C C, JIN Q, et al. Preparation of mango kernel fat stearin – based hard chocolate fats via physical blending and enzymatic interesterification [J]. LWT – Food Sci Technol, 2018, 97: 308–316.
- [13] JIN J, ZHENG L, MWINYI PEMBE W, et al. Production of Sn – 1, 3 – distearoyl – 2 – oleoyl – glycerol – rich fats from mango kernel fat by selective fractionation using 2 – methylpentane based isohexane[J]. Food Chem, 2017, 234: 46–54.
- [14] GUNSTONE F D. Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses [M]. Iowa: Wiley – Blackwell, 2011.
- [15] KADIVAR S, DE CLERCQ N, MOKBUL M, et al. Influence of enzymatically produced sunflower oil based cocoa butter equivalents on the phase behavior of cocoa butter and quality of dark chocolate[J]. LWT – Food Sci Technol, 2016, 66: 48–55.
- [16] MOHD HASSIM N A. Blended palm fractions as confectionery fats: A preliminary study [J/OL]. J Oil Palm Res, 2020(1): 101 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.21894/jopr.2020.0101>.
- [17] LIPP M, ANKLAM E. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate: Part A. Compositional data[J]. Food Chem, 1998, 62(1): 73–97.
- [18] LIPP M, SIMONEAU C, ULBERTH F, et al. Composition of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalents[J]. J Food Compos Anal, 2001, 14(4): 399–408.
- [19] BISWAS N, CHEOW Y L, TAN C P, et al. Physicochemical properties of enzymatically produced palm – oil – based cocoa butter substitute (CBS) with cocoa butter mixture [J/OL]. Eur J Lipid Sci Technol, 2018, 120(3): 205 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700205>.
- [20] WATANABE S, YOSHIKAWA S, SATO K. Formation and properties of dark chocolate prepared using fat mixtures of cocoa butter and symmetric/asymmetric stearic – oleic mixed – acid triacylglycerols: Impact of molecular compound crystals [J/OL]. Food Chem, 2021, 339: 127808 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127808>.
- [21] MUTIA R, ABANG ZAIDEL D N, MUHAMAD I I. Synthesis of cocoa butter equivalent from formulated hard palm oil mid – fraction and canola oil blends [J]. Adv Mater Res, 2015, 1113: 453–458.
- [22] HUANG Z, GUO Z, XIE D, et al. *Rhizomucor miehei* lipase – catalysed synthesis of cocoa butter equivalent from palm mid – fraction and stearic acid: Characteristics and feasibility as cocoa butter alternative [J/OL]. Food Chem, 2021, 343: 128407 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128407>.
- [23] JAHURUL M H A, ZAIDUL I S M, NORULAINI N A N, et al. Characterization of crystallization and melting profiles of blends of mango seed fat and palm oil mid – fraction as cocoa butter replacers using differential scanning calorimetry and pulse nuclear magnetic resonance [J]. Food Res Int, 2014, 55: 103–109.
- [24] BOOTELLO M A, CHONG P S, MÁÑEZ Á, et al. Characterization of sunflower stearin – based confectionary fats in bulk and in compound coatings [J]. J Am Oil Chem Soc, 2018, 95(9): 1139–1150.
- [25] KANG K K, JEON H, KIM I H, et al. Cocoa butter equivalents prepared by blending fractionated palm stearin and shea stearin [J]. Food Sci Biotechnol, 2013, 22(2): 347–352.
- [26] 金青哲, 金俊, 王兴国. 一种制备类可可脂的方法: CN105831370B [P]. 2019 – 09 – 13.
- [27] 邓利, 刘墨砚, 聂开立, 等. 一种利用 33 °C 棕榈油酶促酯交换制备类可可脂的方法: CN105936922B [P]. 2020 – 03 – 17.
- [28] 翁新楚, 王胜杰, 卓之阳. 一种连续化制备类可可脂的方法: CN106035922B [P]. 2020 – 01 – 17.
- [29] JONES A D, BOUNDY – MILLS K L, BARLA G F, et al. Microbial lipid alternatives to plant lipids [J]. Meth Mol Biol, 2019, 1995: 1–32.
- [30] CHEN X, LI Z, ZHANG X, et al. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 159(3): 591–604.
- [31] HUANG C, LI Y Y, LIU L P, et al. Kinetics and mechanism analysis on microbial oil production by *Trichosporon fermentans* in rice straw hydrolysate [J]. Ind Eng Chem Res, 2014, 53(49): 19034–19043.
- [32] PENG W F, HUANG C, CHEN X F, et al. Microbial conversion of wastewater from butanol fermentation to microbial oil by oleaginous yeast *Trichosporon dermatis*

- [J]. *Renew Energ*, 2013, 55: 31 – 34.
- [33] CHEN X F, HUANG C, XIONG L, et al. Oil production on wastewaters after butanol fermentation by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme* [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 118: 594 – 597.
- [34] GONG G, WU B, LIU L, et al. Enhanced biomass and lipid production by light exposure with mixed culture of *Rhodotorula glutinis* and *Chlorella vulgaris* using acetate as sole carbon source [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2022, 364: 128139 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128139>.
- [35] YE Z, SUN T, HAO H, et al. Optimising nutrients in the culture medium of *Rhodospiridium toruloides* enhances lipids production [J/OL]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 149 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01313-6>.
- [36] ANGERBAUER C, SIEBENHOFER M, MITTELBACH M, et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production [J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(8): 3051 – 3056.
- [37] KUTTIRAJA M, DHOUBA A, TYAGI R D. Harnessing the effect of pH on lipid production in batch cultures of *Yarrowia lipolytica* SKY7 [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, 184(4): 1332 – 1346.
- [38] FEI Q, CHANG H N, SHANG L, et al. Exploring low – cost carbon sources for microbial lipids production by fed – batch cultivation of *Cryptococcus albidus* [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2011, 16(3): 482 – 487.
- [39] DIAMANTOPOULOU P, STOFOROS N G, XENOPOULOS E, et al. Lipid production by *Cryptococcus curvatus* growing on commercial xylose and subsequent valorization of fermentation waste – waters for the production of edible and medicinal mushrooms [J/OL]. *Biochem Eng J*, 2020, 162: 107706 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107706>.
- [40] XIONG D, ZHANG H, XIE Y, et al. Conversion of mutton fat to cocoa butter equivalent by increasing the unsaturated fatty acids at the Sn – 2 position of triacylglycerol through fermentation by *Yarrowia lipolytica* [J]. *Am J Biochem Biotechnol*, 2015, 11(2): 57 – 65.
- [41] ZHAO L, LI B, XIONG D, et al. Cocoa – butter – equivalent production from *Yarrowia lipolytica* by optimization of fermentation technology [J]. *Am J Biochem Biotechnol*, 2016, 12(4): 196 – 205.
- [42] 董欣荣, 曹健, 雷银平, 等. 卷枝毛霉 3.2208 条件优化产类可可脂的研究 [J]. *食品科学*, 2002, 23(10): 45 – 50.
- [43] 董欣荣, 曹健, 赵斌. 几种真菌油脂的分析 [J]. *郑州工程学院学报*, 2002, 23(2): 44 – 48.
- [44] 曹健, 董欣荣, 曾实, 等. 土生假丝酵母条件优化产类可可脂的研究 [J]. *中国油脂*, 2001, 26(2): 32 – 35.
- [45] 董欣荣, 曹健, 赵斌. 土生假丝酵母类可可脂的分析及性质研究 [J]. *中国粮油学报*, 2003, 18(3): 81 – 84.
- [46] WANG G Y, ZHANG Y, CHI Z, et al. Role of pyruvate carboxylase in accumulation of intracellular lipid of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA – DC 50109 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(4): 1637 – 1645.
- [47] YKEMA A, VERBREE E C, VERWOERT I I G S, et al. Lipid production of revertants of Ufa mutants from the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, 33(2): 176 – 182.
- [48] SMIT H, YKEMA A, VERBREE E, et al. Production of cocoa butter equivalents by yeast mutants [M] // KYLE D J, RATLEDGE C. *Industrial applications of single cell oils*. New York: AOCS Publishing, 1992.
- [49] YKEMA A, VERBREE E C, NIJKAMP H J J, et al. Isolation and characterization of fatty acid auxotrophs from the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 32(1): 76 – 84.
- [50] WEI Y, GOSSING M, BERGENHOLM D, et al. Increasing cocoa butter – like lipid production of *Saccharomyces cerevisiae* by expression of selected cocoa genes [J/OL]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 34 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0333-1>.
- [51] WEI Y, BERGENHOLM D, GOSSING M, et al. Expression of cocoa genes in *Saccharomyces cerevisiae* improves cocoa butter production [J/OL]. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 11 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0866-2>.
- [52] BERGENHOLM D, GOSSING M, WEI Y, et al. Modulation of saturation and chain length of fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae* for production of cocoa butter – like lipids [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(4): 932 – 942.
- [53] WANG M, WEI Y, JI B, et al. Advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for cocoa butter equivalent production [J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 594081 [2023 – 05 – 21]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.594081>.
- [54] GHAZANI S M, ZOU L, RAKITSKY W G, et al. Algal butter, a novel cocoa butter equivalent: Chemical composition, physical properties, and functionality in chocolate [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2018, 95(10): 1239 – 1251.
- [55] 宋元达, 熊丹, 唐年初, 等. 一种以羊油为原料制备类可可脂的生物转化法: CN104673848A [P]. 2015 – 06 – 03.