

## 《生物智造与大健康》专栏

[编者按]随着大健康领域的发展,以全方位多途径开发食物资源的需求逐渐增加,践行“大食物观”,为“国之大者”保驾护航,要主动向耕地草原森林海洋、向植物动物微生物要热量、要蛋白。同时,随着“健康中国2030”战略的稳步推进,人们对健康的关注与日俱增,大健康产业已呈蓬勃发展态势。合成生物学将有望催生下一次生物技术革命。采用合成生物学技术,特别是通过医药食品微生物基因组设计与组装、组分合成途径设计与构建等,可将可再生原料转化为重要医药食品组分、功能性食品添加剂和营养化学品。

本刊本期推出《生物智造与大健康》专栏。该专栏的4篇文章涉及“脂肪生物合成酶应用”“淀粉生物合成酶设计”“纳米技术创新”“食品安全风险与减控”等方面,在一定程度上反映了本领域所关心的关键科学技术问题和前沿进展。

### 本期专栏负责人简介:

王建辉,留日博士后,长沙理工大学教授,博士研究生导师,湖南省杰出青年基金项目获得者,湖南省科技人才托举工程中青年学者,湖南佳元禄味型创新创业团队带头人,湖湘青年英才,“湘西”特聘专家,长沙市科技创新创业领军人才,长沙市“313”计划人才。兼任中国食品科学技术学会青年委员会委员、湖南省食品科学技术学会副秘书长、湖南省湘味餐调智造与质量安全工程技术研究中心主任。主要研究方向为预制湘菜与水生资源食品加工。主持有国家自然科学基金、湖南省杰出青年科学基金、湖南省重点领域研发计划项目等国家级和省部级项目20余项。获湖南省科学技术进步奖一等奖、湖南省青年科技奖、中国市场技术协会金桥奖优秀项目奖各1项,已获国家发明专利授权42项,其中以第一发明人获授权25项,发表科研论文100余篇,培育国家农业产业化龙头企业2家、湖南省农业产业化龙头企业3家、高新技术企业8家。相关科研成果已在省内外企业推广应用,经济社会效益显著。

DOI:10.19951/j.cnki.1672-9331.2022.04.009

文章编号:1672-9331(2022)04-0085-14

引用格式:胡阳,李婉婷,毛相朝.脂肪酶在鱼油加工中应用的研究进展[J].长沙理工大学学报(自然科学版),2022,19(4):85-98.

Citation: HU Yang, LI Wanting, MAO Xiangzhao. Advances in the application of lipase in fish oil processing[J]. Journal of Changsha University of Science & Technology (Natural Science), 2022, 19(4): 85-98.

# 脂肪酶在鱼油加工中应用的研究进展

胡阳,李婉婷,毛相朝

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**富含 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3PUFA)的功能性脂质因其在大脑功能和视力发展等方面具有特殊的营养和生理功效,被广泛应用在食品和药品等领域。鱼油是 $\omega$ -3PUFA的主要来源。脂肪酶因其具有高催化活性及催化特异选择性而被广泛应用于选择性制备不同结构的功能脂质,改善天然脂质的结构及提供特殊的生理活性。本文综述了酶催化技术在鱼油加工过程中应用的研究进展,分析了酶法制备 $\omega$ -3PUFA 乙酯、 $\omega$ -3PUFA-2-单酰甘油、富含 $\omega$ -3PUFA的特定结构三酰甘油和磷脂的优越性,讨论了酶催化酯化、酯交换和水解反应在生产各种富含 $\omega$ -3PUFA的功能性脂质过程中的溶剂组成和反应条件等主要影响因素。最后,总结了酶催化技术在用鱼油加工制备功能性脂质过程中存在的主要挑战,并提出进一步研究的重点方向。

**关键词:**酶催化技术;脂肪酶;鱼油; $\omega$ -3多不饱和脂肪酸;功能性脂质

中图分类号: S986.1

文献标志码: A

收稿日期:2022-10-16;修回日期:2022-11-30;接受日期:2022-12-05

基金项目:山东省泰山青年学者项目(tsqn201812020)

通信作者:毛相朝(1981—)(ORCID:0000-0002-6315-1338),男,教授,主要从事海洋食品酶学方面的研究。

E-mail: xzhmao@ouc.edu.cn

投稿网址: <http://cslgxbzk.csust.edu.cn/cslgdxxbzk/home>

## 0 引言

随着人们健康管理意识的提高,近些年对补充营养品的需求呈指数增加,其中,对 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)的需求尤为显著。 $\omega$ -3PUFA是末端双键出现在甲基端第三号碳(n-3)上的多不饱和脂肪酸,具有减少炎症、缓解抑郁症、预防心血管疾病和阿尔茨海默病及降低患糖尿病和部分癌症风险的功效<sup>[1-2]</sup>。此外, $\omega$ -3PUFA对孕妇健康及婴儿的神经和视觉发育也很重要<sup>[3]</sup>。 $\alpha$ -亚麻酸(18:3, n-3,  $\alpha$ -linolenic acid, ALA)、二十碳五烯酸(20:5, n-3, eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳五烯酸(22:5, n-3, docosapentaenoic, DPA)和二十二碳六烯酸(22:6, n-3, docosahexaenoic acid, DHA)是 $\omega$ -3PUFA中对人类健康最具积极作用的4种脂肪酸,其化学结构如图1所示。ALA可通过食用植物种子和植物油摄入,EPA和DHA则需通过人体代谢由ALA转化合成,但其转化速率较低。因此,世界卫生组织等国际权威机构推荐将EPA和DHA作为外源性功能食品补充剂,成年人适宜的摄入量为250~500 mg/d,孕妇及哺乳期妇女适宜的摄入量为300 mg/d<sup>[4-5]</sup>。

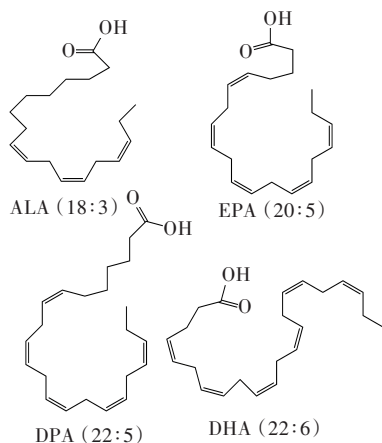


图1 ALA、EPA、DPA、DHA化学结构示意图。

Fig. 1 Schematic diagram of the chemical structures of ALA, EPA, DPA and DHA

鱼油是一种传统水产品加工过程中的副产物,通常被制成鱼粉用作鱼饲料。随着 $\omega$ -3PUFA营养健康价值的挖掘,鱼油现已成为天然长链 $\omega$ -3PUFA尤其是EPA和DHA的主要来源,是一种极具营养价值的工业产品<sup>[6]</sup>。由于鱼的种类不

同,EPA和DHA在鱼总脂质中的含量也不同,其质量分数通常为5%~26%。然而,由于饮食习惯、远离海洋的地理位置及经济限制等,大多数人不能通过食用鱼肉摄入足够的 $\omega$ -3PUFA。另外,单纯依靠食用鱼摄入足够的 $\omega$ -3PUFA易导致胆固醇、饱和脂肪酸和一些污染物的过量摄入,这可能会引起其他健康隐患<sup>[7-8]</sup>。因此,学者们基于海洋鱼类的加工副产物——鱼油等开发出了浓缩、精炼的海洋 $\omega$ -3PUFA营养补充剂。

对海洋鱼类进行提取、分离、精炼之后可以得到含 $\omega$ -3PUFA的三酰甘油(triacylglycerol, TAG),TAG中EPA和DHA的质量分数大约分别为18%和12%<sup>[9]</sup>。为了满足医药和营养产业的需求,通过分子蒸馏、尿素络合、超临界流体萃取和酶富集等方法对鱼油进行加工,可以进一步将 $\omega$ -3PUFA浓缩富集,使其质量分数提高到50%~90%<sup>[10]</sup>。在这个过程中,TAG中的部分或全部脂肪酸从甘油骨架上脱离,以游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)、脂肪酸酯或酰基甘油的形式富集。当前,工业化富集 $\omega$ -3PUFA最常用的方法是分子蒸馏。首先,TAG和乙醇在温度为80~90℃下反应生成脂肪酸乙酯(fatty acid ethyl ester, FAEE),随后,在温度为140~160℃下真空蒸馏得到不同沸点的脂肪酸酯。但是,分子蒸馏过程存在一些问题,如需要较高的温度、额外的能量消耗,并可能伴随着高温引起的 $\omega$ -3PUFA氧化、聚合和降解,以及难以分离EPA、DHA和其他分子结构相似的物质等<sup>[11]</sup>。超临界流体萃取法虽然可以避免 $\omega$ -3PUFA氧化、聚合和降解等现象的发生,但存在设备复杂昂贵、高压操作及高能耗等问题<sup>[12]</sup>,难以工业化应用。近年来,鱼油的酶法改性技术迅速发展,已经成为制备富含 $\omega$ -3PUFA产品的重要方法之一。与其他方法相比,酶法改性技术具有反应条件(环境温度和大气压力)温和、底物特异性强及转化效率高等优点,是一种“绿色加工”的方法<sup>[13]</sup>。脂肪酶(lipase)是一类可以催化水解、醇解、转酯、酯化和酸解等酯类反应的酶,在食品加工、化学和医药等领域中应用广泛<sup>[14]</sup>。不同的脂肪酶展现出不同区域和脂肪酸的选择性,这一特性可以用于制备特定结构的功能性酯类、生产新型脂质、制备富含 $\omega$ -3PUFA的功能性食品等,使其在食品产业中备受关注。此

外,脂肪酶固定化技术可以进一步改善脂肪酶的催化活性、稳定性和可操作性,赋予其重复使用性,使得脂肪酶制剂在大规模制备富含 $\omega$ -3PUFA的特定结构脂质方面成为可能<sup>[15]</sup>。

目前,市面上富含 $\omega$ -3PUFA的产品大多以FAEE的形式存在。然而,研究表明相较于FAEE,以磷脂(phospholipid, PL)或TAG形式存在的 $\omega$ -3PUFA甘油酯的消化效率更高<sup>[16-17]</sup>。脂肪酶能够高效催化合成制备特定结构的三酰甘油(structured triacylglycerol, STAG),如 $\omega$ -3PUFA占据甘油骨架立体特异性编号(stereospecific numbering, *sn*)特定位置的TAG、仅在甘油骨架*sn*-2位置存在 $\omega$ -3PUFA的2-单酰甘油(2-monoacylglycerol, 2-MAG)和甘油骨架所有位置均结合 $\omega$ -3PUFA的TAG。磷脂酶能够催化 $\omega$ -3PUFA取代磷脂酰胆碱甘油骨架*sn*-1和*sn*-2位基团的反应,制备富含 $\omega$ -3PUFA的特定结构PL,进一步提升大脑等部位对 $\omega$ -3PUFA的利用率<sup>[18]</sup>。相较于其他方法,基于酶催化反应的生物催化技术已经成为生产富含 $\omega$ -3PUFA的TAG及在特定位置含 $\omega$ -3PUFA的STAG和PL的有效方法。因此,本文综述了目前酶催化技术在鱼油加工中应用的研究进展,阐明了用脂肪酶等将鱼油转化为FAEE、2-MAG、STAG和PL等具有特定健康促进作用的脂类衍生物的生物转化过程,重点评述了酶催化技术在特定结构酯类合成过程中的角色。最后,探讨了酶催化技术在当前鱼油加工应用中所面临的关键挑战、未来应用前景和发展方向。

## 1 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸乙酯的合成

脂肪酸乙酯(FAEE)是最为常见的商品化 $\omega$ -3PUFA产品,也是合成其他特定结构脂质的中间体<sup>[19-20]</sup>。脂肪酶能够以乙醇作为酰基受体将在鱼油中提取的TAG转化为 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸乙酯( $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid ethyl ester,  $\omega$ -3PUFA-EE)。图2为酶催化TAG醇解反应制备 $\omega$ -3PUFA-EE的示意图,在这个过程中,TAG依次被醇解为二酰甘油(diacylglycerol, DAG)、MAG及甘油,同时释放FAEE。YOON等<sup>[21]</sup>利用普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)的脂肪酶(lipase K80)催化

鲱鱼油进行醇解反应,在水的质量分数为20%的体系中可以转化合成质量分数为82%的 $\omega$ -3PUFA-EE。水含量是影响酶催化制备 $\omega$ -3PUFA-EE的重要因素之一。在不含水的体系中,游离脂肪酶K80仅能催化转化少量的 $\omega$ -3PUFA-EE。当脂肪酶K80被固定在疏水性树脂颗粒上时,所形成的固定化脂肪酶K80(ImmK80)则能够直接在水的体系中,通过一步添加乙醇,反应转化合成质量分数高达86%的 $\omega$ -3PUFA-EE<sup>[22]</sup>。固定化过程可以改善脂肪酶的稳定性和催化性能,提高脂肪酶对乙醇的耐受性,简化脂肪酶转化过程,提高其转化效率。此外,分批补加乙醇,控制体系中乙醇浓度能有效避免乙醇引起酶的不可逆失活,这是提高酶催化转化效率的有效方式<sup>[23]</sup>。

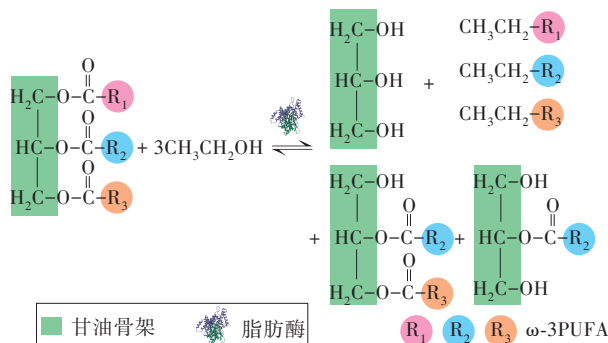


图2 酶催化TAG醇解反应制备 $\omega$ -3PUFA-EE的示意图

Fig.2 Schematic illustrating the enzymatic transesterification reaction of a triglyceride with ethanol as acyl acceptor (ethanolysis) to produce  $\omega$ -3PUFA-EE

除了上述的一步醇解过程,脂肪酶催化TAG转化为FAEE的反应也可以分两步进行,即先催化TAG水解得到FFA,FFA和乙醇在脂肪酶的作用下酯化生成相应的FAEE。AGUILERA-OVIEDO等<sup>[24]</sup>对比了采用商品化固定化脂肪酶Novozym 435一步醇解和两步催化安康鱼肝油两种方法制备 $\omega$ -3PUFA-EE的效果,发现Novozym 435一步醇解鱼油制备 $\omega$ -3PUFA-EE的产率为63%;相同的酶,采用先水解再酯化两步催化的方法可将 $\omega$ -3PUFA-EE的产率提高到85%。利用不同来源脂肪酶对底物选择性不同的特性,两步催化法可以制备富含特定脂肪酸的 $\omega$ -3PUFA-EE。如YAN等<sup>[25]</sup>先用脂肪酶NS81006醇解鱼油,将TAG中大部分脂肪酸转化为FAEE,超过80%的DHA以甘油酯的形式保留下来;分离之后,再利用



Novozym 435 把剩余的脂肪酸甘油酯(主要成分为DHA甘油酯)催化转化为FAEE,从而使二十二碳六烯酸乙酯(docosahexaenoic acid ethyl esters, DHA-EE)的最终转化率达到80%~100%。相较于一步醇解,两步酶催化醇解方法可以将乙酯中 $\omega$ -3PUFA的质量分数从34%提高至41%。类似的,CASAS-GODOY等<sup>[26]</sup>采用解脂耶氏酵母(*Yarrowialipolytica*)中的脂肪酶(YLL2)、疏棉状嗜热丝孢菌(*Thermomyceslanuginosus*)中的脂肪酶(YLL)、皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)中的脂肪酶(CRL1、CRL3和CRL4)水解 $\omega$ -3PUFA-EE,相较于CRL1、CRL3和CRL4,YLL和YLL2对DHA表现出更好的鉴别能力。用YLL2处理FAEE混合物纯化,可以得到最高质量分数分别为90%和77%的 $\omega$ -3PUFA-EE和DHA-EE。

脂肪酶的固定化不仅可以提高脂肪酶的稳定性,增强其对乙醇的耐受性及降低其使用成本,还能通过载体的性质改变脂肪酶催化的选择性。MORENO-PÉREZ等<sup>[27]</sup>选取了阴离子载体(Duolite A568)和两种疏水载体(Lewatit VPOC1600、Sepabeads C18),分别通过离子吸附和物理吸附固定化南极洲假丝酵母脂肪酶B(*Candida antarctica* lipase B, CALB)、棉毛嗜热丝孢菌脂肪酶(*Thermomyces lanuginose* lipase, TLL)和米黑根毛霉脂肪酶(*Rhizomucor miehei* lipase, RML),用于催化沙丁鱼油醇解。相较于阴离子载体,疏水载体固定化脂肪酶表现出更好的稳定性、催化活性和选择性。基于疏水载体Sepabeads C18的固定化脂肪酶对EPA和DHA表现出良好的选择性,在最终形成的乙酯混合物中,EPA-EE与DHA-EE的比值高达29.0。此外,固定化脂肪酶载体的改性能进一步改善固定化脂肪酶的性能。如采用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰聚氨酯纳米载体可以改善固定化TLL对pH和温度的耐受性及对底物的选择性<sup>[28]</sup>。采用PEG 6000修饰聚氨酯,可以使载体固定化的脂肪酶在28℃下催化沙丁鱼油醇解,得到的EPA-EE与DHA-EE的比值高达31.8。类似的,采用聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)修饰载体能够为固定化脂肪酶提供一个相对疏水的环境,从而引起脂肪酶的超活化行为,在稳定酶构象的同时提升脂肪酶的活性<sup>[29]</sup>。采用质量分数

为20%的PEI进行修饰即可引起脂肪酶的超活化,使EPA-EE或DHA-EE的产量提升至少4倍,EPA-EE与DHA-EE的比值可达到45.8。固定化酶易分离且具有一定机械强度的特性使其可以构建填充床生物反应器。KUO等<sup>[30]</sup>以商品化固定化酶Novozym 435作为催化剂建立了超声辅助的填充床生物反应器,当反应液流速为1.0 mL/min、DHA和EPA浓度共为100 mmol/L时,实现了99%的转化率。

利用脂肪酶催化醇解反应制备 $\omega$ -3PUFA-EE所使用的溶剂也是影响催化效率的一个主要因素。除了常用的环己烷和叔戊醇等有机溶剂,构建绿色替代溶剂和无溶剂的催化体系是酶法制备 $\omega$ -3PUFA-EE的一个重要发展方向。如MORENO-PÉREZ等<sup>[31]</sup>构建了无溶剂反应体系催化沙丁鱼油的醇解,避免了有机溶剂的使用。另一个思路则是利用超临界CO<sub>2</sub>等绿色替代溶剂。超临界CO<sub>2</sub>流体能够加速反应物间的传质过程,从而加快反应速度。此外,通过合理的试验设计,基于超临界CO<sub>2</sub>流体的催化体系可以避免高浓度乙醇对脂肪酶催化活性的抑制,最终使FAEE的转化率达到86%<sup>[32]</sup>。

## 2 富含 $\omega$ -3PUFA的2-单酰甘油的合成

根据脂肪酸的立体特异位置,单酰甘油(monoacylglycerol, MAG)可以分为1-单酰甘油、3-单酰甘油(脂肪酸占据甘油骨架外侧碳)和2-单酰甘油(脂肪酸占据甘油骨架中间碳),其结构如图3<sup>[33]</sup>所示。脂肪酸在MAG甘油骨架上的位置显著影响人体吸收消化脂肪酸的过程。在天然鱼油中, $\omega$ -3PUFA大多分布在甘油骨架sn-2位<sup>[34]</sup>。2-MAG更易形成胶束,不和钙、镁等矿物质皂化的特性使得2-MAG相较于1-MAG、3-MAG更易被吸收<sup>[35]</sup>。因此,富含 $\omega$ -3PUFA的2-MAG往往表现出极高的营养和医用价值,在食品和营养行业中备受关注。如2-MAG的参与可调节痛觉、炎症、食欲及脂质代谢的内源性大麻素的合成和降解<sup>[36]</sup>。富含 $\omega$ -3PUFA的2-MAG具有潜在的健康益处,可以预防高血压,改善免疫系统,以及治疗冠心病和癌症等<sup>[37-38]</sup>。基于以上优点,富含 $\omega$ -3PUFA的2-MAG在功能食品和药品领域具有广阔的应用前景。

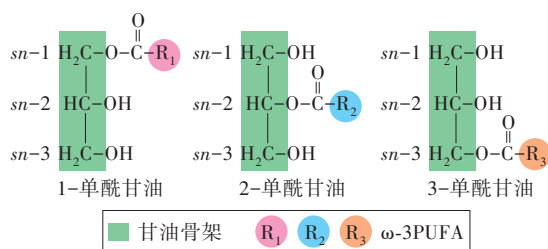


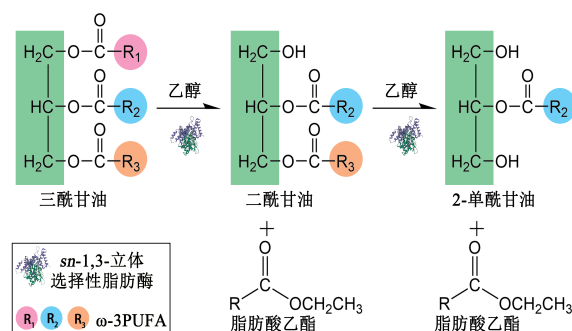
图3 不同单酰甘油结构示意图

Fig. 3 Structural illustration of different monoglycerides

利用脂肪酶催化转酯反应制备含 $\omega$ -3PUFA的2-MAG是一种高效、经济及环境友好的方法。转酯反应是指催化剂催化酯类上的脂肪酸被醇、酸或其他形式的酯置换,形成新的酯和新的醇、酸或酯的反应(酯+醇、酸或其他酯 $\rightarrow$ 新酯+新醇、新酸或新酯)。例如,乙醇作为酰基供体置换鱼油甘油骨架上的脂肪酸的反应是一种典型的转酯反应,也被称为TAG的乙醇解反应。具有 $sn$ -1,3-立体选择性的脂肪酶能够直接催化TAG醇解,制备含 $\omega$ -3PUFA的2-MAG(见图4)。在具有 $sn$ -1,3-立体选择性的CALB催化沙丁鱼油所生成的产物中,2-MAG的含量是1-MAG的5.6倍<sup>[39]</sup>。MUÑO等<sup>[40]</sup>对比了具有 $sn$ -1,3-选择性催化活性的固定化脂肪酶D(来源于*Rhizopus oryzae*,固定在Accurel MP1000上)和Novozym 435催化鱼肝油和金枪鱼油醇解制备2-MAG的效果。结果显示:固定化脂肪酶D催化生成2-MAG的产率高于Novozym 435的产率。在脂肪酶D的催化体系中,由于脂肪酶D的底物选择性,2-MAG的产量在达到平衡后保持恒定,而在Novozym 435催化体系中,2-MAG的产量先增高,然后随着时间的延长逐渐下降。商品化脂肪酶Lipozyme 435(固定化CALB)也表现出 $sn$ -1,3-特异催化活性。在最优的条件下(乙醇与油的质量比为3:1,Lipozyme 435的质量分数为8%)催化2 h后,得到2-MAG的质量占比达27%的产品,采用乙腈或正己烷为溶剂经过进一步的低温结晶可将 $\omega$ -3PUFA在2-MAG中的质量分数分别提高到81.13%和74.29%<sup>[41]</sup>。

除了利用乙醇等一元醇作为酰基受体,甘油等多元醇也被用于甘油解TAG制备富含 $\omega$ -3PUFA的2-MAG。甘油作为底物可以避免其他醇酯(如乙醇酯)的形成,降低后续2-MAG分离纯化的难度。SOLAESAÁ等<sup>[42]</sup>以甘油作为酰基供体制备2-MAG,当沙丁鱼油与甘油摩尔比增加到3:1时,

Lipozyme 435催化鱼油水解产物中2-MAG的质量分数高达67%。在经过两步分子蒸馏之后,最终产品中2-MAG的纯度可进一步提高至91%。此外,脂肪酶也可催化 $\omega$ -3PUFA-EE进行甘油解,将 $\omega$ -3PUFA-EE转化为更易吸收的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸-2-单酰甘油( $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid - 2 - monoacylglycerol,  $\omega$ -3PUFA-2-MAG)。如Novozym 435可以将 $\omega$ -3PUFA-EE骨架上的 $\omega$ -3PUFA转移到甘油骨架中,得到EPA和DHA质量分数分别为5.5%和74.6%的2-MAG混合物<sup>[43]</sup>。不同的脂肪酶催化DHA-EE甘油解的活性不同,固定化CALB,在37℃下需4 h才能转化合成质量分数为90%的二十二碳六烯酸单酰甘油(docosahexaenoic acid-monoacylglycerol, DHA-MAG),而在相同的温度下,固定化RML仅需15 min即可转化合成质量分数为98%的DHA-MAG<sup>[44]</sup>。

图4  $sn$ -1,3-立体选择性脂肪酶催化TAG醇解制备2-MAG示意图Fig. 4 Schematic illustrating the enzymatic ethanolysis reaction of a triglyceride to synthesize 2-monoglyceride using a  $sn$ -1,3-regioselective lipase

在脂肪酶催化醇解制备2-MAG的过程中,酰基在甘油骨架上不可控地从一个位置转移到另外一个位置可能导致1-MAG的生成。酰基转移现象有利于提高TAG的醇解程度,但同时也会引起产品纯度的降低。目前还没有方法可以完全抑制酰基转移的发生,但优化酶催化反应条件可以有效降低酰基转移反应速率。其中,温度是影响酰基转移反应速率的重要参数之一。相较于持续较高温度的处理方法,脂肪酶在高温催化一段时间后,将体系温度维持在较低水平的处理方法能够显著抑制酰基转移的发生<sup>[45]</sup>。另外,反应溶剂的极性也是影响酰基转移反应速率的一个重要参数。非极性溶剂的使用往往使脂肪酶催化TAG醇解中的酰基转移过程以较快的速度进行<sup>[46]</sup>。因此,乙醇

作为TAG醇解反应中的酰基受体,近年来被用作反应介质以构建无溶剂催化体系,抑制非必要酰基转移反应的发生<sup>[47-48]</sup>。相较于其他溶剂,超临界CO<sub>2</sub>作为反应溶剂则可以提高脂肪酶醇解鱼油合成MAG的速率<sup>[49]</sup>。

在反应体系中,水含量是影响脂肪酶催化效率的重要因素之一。水分子可以和脂肪酶上部分基团的羧基和巯基结合,引起脂肪酶构象的改变,从而影响其催化性能<sup>[50]</sup>。在水含量适宜时,脂肪酶中芳香族氨基酸残基的翻动能够使亲脂性底物更容易达到催化活性位点,从而加速 $\omega$ -3PUFA和醇类的进一步反应<sup>[51]</sup>。LIU等<sup>[52]</sup>将解脂耶氏酵母脂肪酶(*Yarrowialipolytica* lipase, LIP2)固定化在氨基化SiO<sub>2</sub>-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>壳核粒子上,构建了反胶束催化体系。反胶束催化体系的形成使水相中LIP2的活性中心朝向有机疏水相,引起LIP2的界面现象。因此,在反胶束催化体系中,固定化LIP2的催化活性可提升至382%。值得注意的是,在制备2-MAG的催化体系中,水含量过高可能会导致酯类水解的副反应,从而使产品中的 $\omega$ -3PUFA以FFA的形式存在,降低了2-MAG的回收率。PAWONGRAT等<sup>[53]</sup>发现在脂肪酶AK催化金枪鱼油甘油解制备2-MAG的体系中,当水的质量分数为4%时,产物中2-MAG的产率为24.6%,2-MAG中 $\omega$ -3PUFA(主要为EPA和DHA)的质量分数高达56.0%。进一步研究发现,当在催化体系中不加水且把固定化脂肪酶AK进行不同程度的脱水处理时,固定化脂肪酶AK催化金枪鱼油甘油解的活性随着剩余水含量的减少而降低<sup>[54]</sup>。因此,水含量也是脂肪酶催化鱼油制备2-MAG的重要因素,适当的水含量有利于提高酶的活性,提高产物中2-MAG的含量。

### 3 结构三酰甘油的合成

结构三酰甘油(structured triacylglycerol, STAG)通常是指甘油骨架上不同位置分布有特定脂肪酸的TAG<sup>[55]</sup>。脂肪酸在TAG甘油骨架所处位置的不同使其具有不同的生理功效和吸收性能。如短链脂肪酸(< C<sub>8</sub>)和中链脂肪酸(C<sub>8</sub>~C<sub>12</sub>)体积小、溶解度大,可以直接通过门静脉运输,因此中

短链脂肪酸占据甘油骨架外侧位置的TAG表现出更好的吸收利用率<sup>[56]</sup>。STAG的生物合成对于广泛开发功能性脂质具有重要意义。脂肪酶相较于其他化学催化剂,在修饰合成STAG的过程中具有许多优点,如避免使用极端pH和温度,防止天然全顺式脂肪酸中双键的迁移等<sup>[57]</sup>。

STAG的定向合成可以生产 $\omega$ -3PUFA含量更高的STAG,获得更为优质的TAG产品,如纯度和产量更高的 $\omega$ -3PUFA产品(见图5)。通过一定的合成途径,脂肪酶可以催化合成DHA占据甘油骨架所有sn位置的STAG,从而最大限度地富集产品中的DHA。MORENO-PEREZ等<sup>[19]</sup>利用固定化脂肪酶催化FAEE和甘油酯转酯反应富集DHA,这是一个复杂的酶催化过程,受到脂肪酶的种类、载体的性质和温度的影响。当CALB固定化在疏水性载体C18-Sepabeads上时,DHA三酰甘油酯(docosahexaenoyl triacylglycerol)的产率可达80%以上。ZHANG等<sup>[34]</sup>构建了两步反应酶法制备富含EPA和DHA的STAG。第一步,将商品化脂肪酶AY“Amano”400SD用于选择性水解鱼油中的饱和脂肪酸,鱼油中EPA和DHA的质量分数从19.30%和13.09%分别提升至25.95%和22.06%;第二步,将用Novozym 435催化第一步得到的产物和源自鱼油的、富含EPA和DHA的FAEE进行转酯反应,产物中多不饱和脂肪酸TAG的质量分数可达97.62%,进一步富集EPA和DHA。此外,在第二步中,其他来源的 $\omega$ -3PUFA也可以用于制备STAG,从而降低整体生产成本,提高产品品质。类似的,两步法也被用于制备高价值的STAG<sup>[58]</sup>。固定化脂肪酶填充床反应器的使用可以进一步提高两步法酶催化的效率<sup>[59]</sup>。

酶催化技术的发展促进了针对人体健康和婴儿吸收设计功能性产品的开发,如具有特殊结构、功能的STAG,特别是含有EPA和DHA的STAG<sup>[60]</sup>。 $\omega$ -3PUFA占据甘油骨架sn-1或(和)sn-3位、饱和中链脂肪酸占据sn-2位的STAG(见图5),由于其和人乳TAG结构功能类似而备受关注。LIU等<sup>[61]</sup>利用商品化脂肪酶,即Novozym 435和Lipozyme RM IM,通过两步催化合成了 $\omega$ -3PUFA占据甘油sn-1或(和)sn-3位、棕榈酸占据sn-2位的STAG,最终产品中棕榈酸、DHA和DPA的质量分



数分别为51.60%、30.10%和5.30%。这种STAG可以提供人乳中的主要脂肪酸(棕榈酸),同时提供幼儿发育所需的DPA、DHA等重要脂肪酸,可以作为功能性成分用于配制商业婴儿配方奶粉。利用TLL催化棕榈酸和鱼油进行内酯化反应,最终获得EPA、DHA和花生四烯酸占据 $sn$ -1或(和) $sn$ -3位、 $sn$ -2位棕榈酸质量分数高达75.98%的STAG<sup>[62]</sup>。固定化脂肪酶Lipozyme RM IM具有立体选择性及中长链脂肪酸底物选择性,在合成STAG的过程中表现出优异的催化活性。在最优的条件下(Lipozyme RM IM的质量分数为7.00%,TAG与油酸摩尔比为1:3,温度为65℃),利用Lipozyme RM IM在无溶剂反应体系中催化TAG和油酸酸解,可以将TAG  $sn$ -1和 $sn$ -3位中多不饱和脂肪酸的总质量分数从70.20%提高到90.90%,将油酸的质量分数从24.49%降低至6.95%<sup>[63]</sup>。Lipozyme RM IM的稳定性使该固定化脂肪酶在使用16次后仍无活性损失。酶法制备甘油 $sn$ -1和 $sn$ -3位富含 $\omega$ -3PUFA、 $sn$ -2位含有中长链脂肪酸的STAG已在功能食品领域表现出良好的应用潜力。

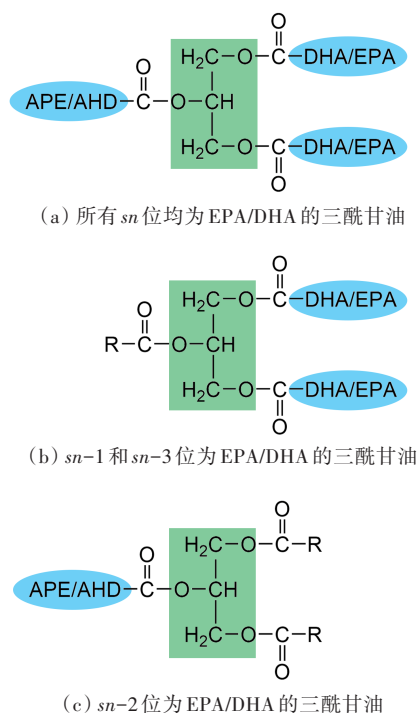


图5 不同特定结构三酰甘油的结构示意图

Fig. 5 Schematic representation of the structure of triacylglycerol with different specific structures

在天然鱼油TAG中, $\omega$ -3PUFA通常占据甘油 $sn$ -2位置。酶催化制备中短链脂肪酸占据甘油

$sn$ -1或(和) $sn$ -3位、 $\omega$ -3PUFA占据甘油 $sn$ -2位的STAG是提高TAG吸收率的有效途径。如SCHMID等<sup>[64]</sup>利用具有 $sn$ -1,3-区域选择性的脂肪酶首先催化鱼油中TAG水解,制备2-棕榈酸单甘油酯(2-monopalmitin, 2-MP),随后催化2-MP和油酸酯化,形成1,3-油酰-2-棕榈酰甘油酯。HAMAM等<sup>[65]</sup>则利用连续填充塔固定化Lipozyme IM催化鱼油和癸酸高效制备STAG。值得注意的是,脂肪酸存在的形式是酶催化制备STAG的重要影响因素。对于用海洋源含 $\omega$ -3PUFA的TAG(EPA和DHA的总质量分数高达60%)制备STAG的酶催化反应,以游离 $\omega$ -3PUFA和 $\omega$ -3PUFA-EE作为酰基供体时,合成STAG的酶催化反应速率并没有显著差异。然而,以游离 $\omega$ -3PUFA作为酰基供体时,体系中酰基迁移速率是以 $\omega$ -3PUFA-EE为酰基供体时的5倍,因此使用游离 $\omega$ -3PUFA作为酰基供体导致产品中目标特定STAG的含量较低<sup>[66]</sup>。近期研究结果表明,在利用Lipozyme 435和Lipozyme RM IM催化制备STAG的过程中,以 $\omega$ -3PUFA-EE作为酰基供体制备STAG的速率更高<sup>[67]</sup>。因此, $\omega$ -3PUFA-EE可能更适宜作为底物用以制备STAG。

类似于2-MAG酶的催化制备过程,酰基迁移是影响目标特定STAG产率的重要因素。影响酰基迁移过程的因素有许多,脂肪酶的种类是影响因素之一。 $sn$ -1,3-选择性较低的脂肪酶催化制备STAG时往往需要更长的反应时间,从而导致酰基迁移<sup>[68]</sup>。对于固定化脂肪酶催化制备STAG的过程而言,载体的表面性质能够促进酰基迁移。研究表明,当固定化酶载体为亲水性载体时,固定化酶载体往往会为酶提供酸性或者碱性的微环境,从而促进脂肪酶催化制备STAG过程中酰基的转移<sup>[69]</sup>。酰基转移过程是一个热力学过程,在实际反应中很难完全停止。将酶催化反应的温度控制在一个相对较低的水平可以有效抑制酰基转移<sup>[45]</sup>。另外,在酶催化体系中,酶添加量和水含量也是影响酰基转移的重要因素。CHENB等<sup>[66]</sup>发现水的质量分数为3.0%,酶的质量分数为6.0%时,制备STAG时的酰基转移率最低,约为2.6%。

## 4 磷脂的合成

磷脂(PL)是一种具有两亲特性的极性酯类,

通常由亲脂性脂肪酸和亲水性磷酸组成<sup>[70]</sup>,这种两亲特性使PL在水中的溶解度更高,通常表现出更高的代谢效率和营养价值<sup>[71]</sup>。PL是细胞膜的重要组成部分,最新研究表明,PL不仅为细胞膜提供结构支撑,还在代谢过程中起到信号化合物的作用<sup>[72]</sup>。此外,基于PL构建的脂质体是递送药物的理想载体,PL已经在食品、日化和医药等领域中获得广泛应用,且特定结构PL已经成为当前的热点研究对象<sup>[73-74]</sup>。

海洋 $\omega$ -3磷脂( $\omega$ -3PL)因其EPA和DHA含量较高,是当前PL的主要来源,对大脑健康有着重要作用,大多从南极磷虾等海洋生物中提取获得<sup>[75]</sup>。然而,不同极性基团和脂肪酸组成的磷脂通常展现出不同的健康促进效率<sup>[76]</sup>。特异性酶催化水解、转酯和转磷脂酰等反应是制备 $\omega$ -3PUFA占据甘油骨架 $sn$ -1或(和) $sn$ -2位的特定结构PL,并改善其理化和营养性质的有效方法<sup>[77-78]</sup>。根据酶作用位点的不同,常用于制备特定结构PL的酶主要包括特异性1,3-脂肪酶、磷脂酶A1(phospholipase A1, PLA1)、磷脂酶A2(phospholipase A2, PLA2)和磷脂酶D(phospholipase D, PLD)<sup>[79]</sup>。图6为相应脂肪酶和磷脂酶催化磷脂作用位点示意图。

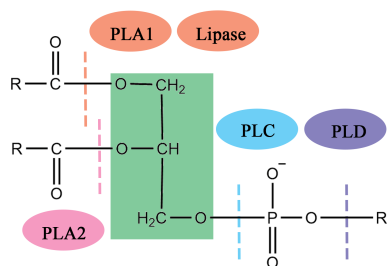


图6 脂肪酶、磷脂酶A1、磷脂酶A2、磷脂酶C和磷脂酶D催化位点示意图

Fig. 6 Schematic representation of catalytic sites of lipase, phospholipase A1 (PLA1), phospholipase A2 (PLA2), phospholipase C (PLC) and phospholipase D (PLD)

PLA1和特异性1,3-脂肪酶能够催化PL甘油骨架 $sn$ -1位脂肪酸的转酯和水解过程,从而制备出 $sn$ -1位特定组成的特定结构PL。MARSOU等<sup>[80]</sup>利用固定化RML催化大豆卵磷脂和EPA-EE、DHA-EE的转酯反应,将EPA和DHA整合在PL上,在优化后的条件下,固定化RML催化反应24 h后,合成PL中EPA和DHA的整合率高达45.7%。PL极性头部增强其水溶性,同时也使PL

与脂肪酶的亲和性降低,从而影响脂肪酶催化特定结构PL的转化速率。如RML在催化EPA、DHA与磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)酸解反应时表现出不同的催化活性,RML转化PC时活性最高,其后依次为PI、PE和PS<sup>[81]</sup>。PLA1被用于在无溶剂体系中催化PC与DHA-EE和EPA-EE混合物进行转酯反应,制备富含DHA和EPA的特定结构PC,在55℃下反应24 h后,DHA和EPA的最大整合率达到30.7%<sup>[82]</sup>。ZHAO等<sup>[83]</sup>进一步优化了水含量、温度和酶用量等参数,将固定化PLA1催化PC与DHA和EPA反应,使制备富含 $\omega$ -3PUFA的特定结构PC的产率提高到57.4%。新型纳米载体(如SiO<sub>2</sub>/阳离子聚合物纳米复合物)的使用能够有效提高PLA1的固定化载量和活性,从而进一步提高富含DHA和EPA的特定结构PC的产量,同时降低副产物的产量<sup>[84]</sup>。尽管固定化PLA1表现出对环境改变的耐受性和重复使用性,但因固定化PLA1的微环境与游离PLA1的不同,故水含量对其催化反应的影响较为显著。降低固定化PLA1催化的水解反应,同时提高酶催化转酯反应的活性,目前仍然是一个挑战。

除了 $sn$ -1,3-特异性的脂肪酶,能够特异性识别甘油 $sn$ -2位脂肪酸并催化其转酯的脂肪酶鲜有报道<sup>[85]</sup>。猪胰腺PLA2是制备 $sn$ -2位为 $\omega$ -3PUFA的特定结构PL最常用的酶<sup>[86]</sup>。然而,猪胰腺PLA2在Ca<sup>2+</sup>存在且水活度大于0.2时才有催化活性。在催化过程中,甲酰胺可以作为PLA2的活化剂,以改善PLA2催化制备富含DHA的结构PL的活性<sup>[87]</sup>。值得注意的是,为了避免后续水解反应的发生,需要将甲酰胺在合成反应的初始阶段从体系中分离出来,从而提高结构PL的产率。此外,将猪胰腺PLA2基因导入工程菌株中,利用微生物表达PLA2进行1-酰基-2-DHA-PS的合成,可以解决动物器官来源猪胰腺PLA2的安全、质量和成本等方面的问题,在大规模应用中具有极好的应用前景<sup>[88]</sup>。

亲水头部基团不同的磷脂往往表现出不同的生理功能。PS含有一个丝氨酸亲水头部基团和两条疏水脂肪酸链,是细胞膜中重要的功能组分,对大脑神经系统和视网膜功能的正常发挥至关重要



要,在功能性食品和医药应用中具有较高价值<sup>[89-90]</sup>。PLD可以催化磷脂酰基转移反应,使PC的亲水胆碱基团转换为糖基、萜烯基和乙胺醇基等衍生物,合成新型PL<sup>[91-92]</sup>。例如,SONG等<sup>[93]</sup>利用PLD催化制备磷脂酰葡萄糖,通过优化有机溶剂、水含量、底物比例、pH和温度等因素,提高了磷脂酰葡萄糖产率。在最优条件下,经过PLD催化反应1.5 h后,磷脂酰葡萄糖的产率达到95%以上。MAO等<sup>[94]</sup>克隆并表达了用新型PLD<sub>2</sub>催化DHA-PC,并将其转化为DHA-PS,转化率接近100%。

## 5 结论与展望

在过去的数十年中,随着蓝色经济的发展和 $\omega$ -3PUFA产品需求的增加,海洋来源的副产物被开发,用来制备富含DHA和EPA的产品,预计在不久的将来会成为功能食品发展的新趋势。鱼油是富含EPA和DHA等的 $\omega$ -3PUFA的主要来源,鱼油的改性加工是获得具有营养价值、生物活性得到改善的结构脂类的主要手段。目前,以FFA和乙酯形式存在的 $\omega$ -3PUFA产品可以通过物理和化学方法制备,但其稳定性差,生物利用率低,并非人体理想的 $\omega$ -3PUFA补充剂。随着对酶作用机制了解的日益深入,海洋来源酶挖掘和异源表达的发展,以及提高反应效率、制备特定结构功能性脂质需求的不断增加,基于脂肪酶和磷脂酶的酶加工技术逐渐成为 $\omega$ -3PUFA甘油酯等结构性脂质制备的重要方法。如前文所述,酶催化的酯化、转酯和水解等反应已被应用于选择性制备富含 $\omega$ -3PUFA的FAEE、2-MAG、STAG和PL等更稳定、更具生物可利用性的功能性脂质产品。

然而,利用酶法制备功能性脂质的技术仍处于发展的早中期阶段,酶制剂的价格仍然较为昂贵,催化过程仍需高温、有机溶剂等不利于生产营养产物的条件。发掘具有优越催化活性、选择性的酶制剂,开发新型反应体系,优化合理反应工艺仍是实现特定结构 $\omega$ -3PUFA脂质生物合成的主要努力方向。首先,结合海洋微生物资源,进一步开发新型脂肪酶和磷脂酶,解析其结构和催化机制,通过蛋白质工程、定向进化等先进生物技术改善酶的催化活性、稳定性和选择性,是丰富可用于功能性脂质加工工具酶的重要途径。其次,深入探

索固定化酶技术,开发金属有机框架、石墨烯和纳米粒子等新型固定化载体,研究定向固定、多酶级联、自组装等固定化酶策略,稳定酶的结构,改善酶对底物的选择性及对环境变化的耐受性,赋予酶重复使用性,降低酶法加工的操作成本,从而实现海洋 $\omega$ -3PUFA脂质的大规模、持续制备。最后,探索现有商用酶的最佳反应体系,构建适合不同脂肪酶、磷脂酶的非溶剂体系,建立Pickering乳液等多相催化体系,开发离子液体、超临界流体等新型反应溶剂,筛选适合金属离子等的酶激活剂,从而提高反应效率,降低设备成本,实现功能性脂质的高效合成。

随着生物学、化学、物理学、材料科学、计算机科学及工程学等交叉学科的协作发展,基于高效、高选择性脂肪酶的酶加工技术逐渐成为合成高价值功能脂类的重要方法。这种绿色、高效、可持续的功能性海洋 $\omega$ -3PUFA脂质加工技术将是高质量食品 and 人类健康领域的重要发展方向,将在不久的将来成为 $\omega$ -3PUFA产品生产的普遍方法。

## [参考文献]

- [1] DYALL S C, BALAS L, BAZAN N G, et al. Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions[J]. *Progress in Lipid Research*, 2022, 86: 101165. DOI: 10.1016/j.plipres.2022.101165.
- [2] YANG B, TSENG P T, HU X, et al. Comparative efficacy of omega-3 polyunsaturated fatty acids on major cardiovascular events: a network meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Progress in Lipid Research*, 2022, 88: 101196. DOI: 10.1016/j.plipres.2022.101196.
- [3] CALDER P C. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future[J]. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 2018, 77(1): 52-72. DOI: 10.1017/S0029665117003950.
- [4] ZHANG T T, XU J, WANG Y M, et al. Health benefits of dietary marine DHA/EPA-enriched glycerophospholipids[J]. *Progress in Lipid Research*, 2019, 75: 100997. DOI: 10.1016/j.plipres.2019.100997.
- [5] JAKHWAL P, BISWAS J K, TIWARI A, et al. Genetic and non-genetic tailoring of microalgae for the enhanced production of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA): a review[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126250. DOI: 10.

- 1016/j.biortech.2021.126250.
- [6] VALENZUELA A, SANHUEZA C J, DE LA BARRA DF. Fish oil: yesterday an industrial waste, today a product of high nutritional value[J]. *Revista Chilena de Nutrición*, 2012, 39: 201–209. DOI: 10.4067/S0717-75182012000200009.
- [7] DOMINGO J L. Nutrients and chemical pollutants in fish and shellfish. Balancing health benefits and risks of regular fish consumption[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(6): 979–988. DOI: 10.1080/10408398.2012.742985.
- [8] SHAHIDI F, WANASUNDARA U N. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1998, 9(6): 230–240. DOI: 10.1016/S0924-2244(98)00044-2.
- [9] KRALOVEC J A, ZHANG S C, ZHANG W, et al. A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources[J]. *Food Chemistry*, 2012, 131(2): 639–644. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.08.085.
- [10] BONILLA-MÉNDEZ J R, HOYOS-CONCHA J L. Methods of extraction refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids[J]. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 2018, 19: 645–668. DOI: 10.21930/rcta.vol19\_num2\_art:684.
- [11] ALFIO V G, MANZO C, MICILLO R. From fish waste to value: an overview of the sustainable recovery of omega-3 for food supplements[J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 1002. DOI: 10.3390/molecules26041002.
- [12] IVANOV K, BLUMBERG D. Extraction of fish oil using green extraction methods: a short review[J]. *Energy Procedia*, 2017, 128: 477–483. DOI: 10.1016/j.egypro.2017.09.033.
- [13] CASTEJÓN N, SEÑORÁNS F J. Enzymatic modification to produce health-promoting lipids from fish oil, algae and other new omega-3 sources: a review[J]. *New Biotechnology*, 2020, 57: 45–54. DOI: 10.1016/j.nbt.2020.02.006.
- [14] BORNSCHEUER U T. Enzymes in lipid modification[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2018, 9(1): 85–103. DOI: 10.1146/annurev-food-030117-012336.
- [15] LIU Y, DAVE D. Recent progress on immobilization technology in enzymatic conversion of marine by-products to concentrated omega-3 fatty acids[J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(3): 1049–1066. DOI: 10.1039/D1GC03127A.
- [16] DYERBERG J, MADSEN P, MØLLER J M, et al. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2010, 83(3): 137–141. DOI: 10.1016/j.plefa.2010.06.007.
- [17] BURRI L, HOEM N, BANNI S, et al. Marine omega-3 phospholipids: metabolism and biological activities[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(11): 15401–15419. DOI: 10.3390/ijms131115401.
- [18] LAGARDE M, HACHEM M, BERNOUD-HUBAC N, et al. Biological properties of a DHA-containing structured phospholipid (AceDoPC) to target the brain[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2015, 92: 63–65. DOI: 10.1016/j.plefa.2014.01.005.
- [19] MORENO-PÉREZ S, LUNA P, SEÑORÁNS F J, et al. Enzymatic synthesis of triacylglycerols of docosahexaenoic acid: transesterification of its ethyl esters with glycerol[J]. *Food Chemistry*, 2015, 187: 225–229. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.095.
- [20] CASTEJÓN N, MORENO-PÉREZ S, ABREU S E, et al. Synthesis of omega-3 ethyl esters from chia oil catalyzed by polyethylene glycol-modified lipases with improved stability[J]. *Food Chemistry*, 2019, 271: 433–439. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.07.215.
- [21] YOON S A, HAN J Y, KIM H K. Production of biodiesel using immobilized lipase from *proteus vulgaris*[J]. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 2011, 39(3): 238–244. DOI: 10.1007/s11746-005-1076-3.
- [22] KIM S J, KIM H K. Production of omega-3 fatty acid ethyl esters from menhaden oil using *proteus vulgaris* lipase-mediated one-step transesterification and urea complexation[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 179(2): 347–360. DOI: 10.1007/s12010-016-1998-7.
- [23] DENG L, XU X B, HARALDSSON G G, et al. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: a critical evaluation of lipases and alcohols[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2005, 82(5): 341–347. DOI: 10.1007/s11746-005-1076-3.
- [24] AGUILERA-OVIEDO J, YARA-VARÓN E, TORRES M, et al. Sustainable synthesis of omega-3 fatty acid ethyl esters from monkfish liver oil[J]. *Catalysts*, 2021, 11(1): 100. DOI: 10.3390/catal11010100.
- [25] YAN X, ZHAO X B, MA G J, et al. Enzymatic ethanolysis of fish oil for selective concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) with flexible production of corresponding glycerides and ethyl esters[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2018, 93(8): 2399–2405. DOI: 10.1002/jctb.5588.
- [26] CASAS-GODOY L, MEUNCHAN M, COT M, et al. *Yarrowia lipolytica* lipase lip2: an efficient enzyme for the production of concentrates of docosahexaenoic acid ethyl ester[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 180: 30–36. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.018.
- [27] MORENO-PÉREZ S, GUIBAN J M, FERNÁNDEZ-LORENTE G. Selective ethanolysis of fish oil catalyzed

- by immobilized lipases[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2014, 91(1): 63–69. DOI: 10.1007/s11746-013-2348-3.
- [28] CIPOLATTI E P, MORENO-PÉREZ S, SOUZA L T D A, et al. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 122: 163–169. DOI:10.1016/j.molcatb.2015.09.006.
- [29] CIPOLATTI E P, VALÉRIO A, NINOW J L, et al. Stabilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* by crosslinking in PEGylated polyurethane particles by polymerization: application on fish oil ethanolysis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2016, 112: 54–60. DOI: 10.1016/j.bej.2016.04.006.
- [30] KUO C H, TSAI M L, WANG H M D, et al. Continuous production of DHA and EPA ethyl esters via lipase-catalyzed transesterification in an ultrasonic packed-bed bioreactor[J]. Catalysts, 2022, 12(4): 404. DOI: 10.3390/catal12040404.
- [31] MORENO-PEREZ S, TURATI D F M, BORGES J P, et al. Critical role of different immobilized biocatalysts of a given lipase in the selective ethanolysis of sardine oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(1): 117–122. DOI:10.1021/acs.jafc.6b05243.
- [32] MELGOSA R, SANZ M T, SOLAESA Á G, et al. Supercritical carbon dioxide as solvent in the lipase-catalyzed ethanolysis of fish oil: kinetic study[J]. Journal of CO<sub>2</sub> Utilization, 2017, 17: 170–179. DOI: 10.1016/j.jcou.2016.11.011.
- [33] ZHANG H J, ZHAO H, ZHANG Y W, et al. Characterization of positional distribution of fatty acids and triacylglycerol molecular compositions of marine fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids[J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 3529682. DOI:10.1155/2018/3529682.
- [34] ZHANG Z, LIU F, MA X, et al. Two-stage enzymatic preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) enriched fish oil triacylglycerols[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(1): 218–227. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04101.
- [35] PETIT V, SANDOZ L, GARCIA-RODENAS C L. Importance of the regiospecific distribution of long-chain saturated fatty acids on gut comfort, fat and calcium absorption in infants[J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2017, 121: 40–51. DOI:10.1016/j.plefa.2017.05.007.
- [36] ISHIHARA T, YOSHIDA M, ARITA M. Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis[J]. International Immunology, 2019, 31(9): 559–567. DOI:10.1093/intimm/dxz001.
- [37] DAS A, WATSON J, CARNEVALE L, et al. Omega-3 endocannabinoid-epoxides are novel anti-inflammatory and anti-pain lipid metabolites (Fs15-01-19)[J]. Current Developments in Nutrition, 2019, 3(S1): nzz031. FS15-01-19. DOI:10.1093/cdn/nzz031.FS15-01-19.
- [38] JIN J, JIN Q, WANG X G, et al. High *sn*-2 docosahexaenoic acid lipids for brain benefits, and their enzymatic syntheses: a review[J]. Engineering, 2020, 6(4): 424–431. DOI:10.1016/j.eng.2020.02.009.
- [39] HE Y J, LI J B, KODALI S, et al. Liquid lipases for enzymatic concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via ethanolysis: catalytic specificity and parameterization[J]. Bioresource Technology, 2017, 224: 445–456. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.087.
- [40] MUÑO M D M, ROBLES A, ESTEBAN L, et al. Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(7): 723–730. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.03.002.
- [41] ZHANG Y, WANG X S, XIE D, et al. Synthesis and concentration of 2-monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids[J]. Food Chemistry, 2018, 250: 60–66. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.01.027.
- [42] SOLAESAÁ G, SANZ M T, FALKEBORG M, et al. Production and concentration of monoacylglycerols rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids by enzymatic glycerolysis and molecular distillation[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 960–967. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.06.061.
- [43] WANG W F, LI T, NING Z X, et al. A process for the synthesis of PUFA-enriched triglycerides from high-acid crude fish oil[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 109(3): 366–371. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2011.11.020.
- [44] MORENO-PEREZ S, LUNA P, SEÑORANS J, et al. Enzymatic transesterification in a solvent-free system: synthesis of *sn*-2 docosahexaenoyl monoacylglycerol[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2018, 36(3): 265–270. DOI:10.1080/10242422.2017.1319823.
- [45] YANG T K, FRUEKILDE M B, XU X B. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming[J]. Food Chemistry, 2005, 92(1): 101–107. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.07.007.
- [46] LI W, DU W, LI Q, et al. Dependence on the properties of organic solvent: study on acyl migration kinetics of partial glycerides[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15): 5737–5742. DOI:10.1016/j.biortech.2010.03.018.
- [47] SÁNCHEZ D A, TONETTO G M, FERREIRA M L. An



- insight on acyl migration in solvent-free ethanolysis of model triglycerides using Novozym 435[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 220: 92–99. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.01.001.
- [48] PACHECO C, CRAPISTE G H, CARRÍN M E. Study of acyl migration during enzymatic interesterification of liquid and fully hydrogenated soybean oil[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 122: 117–124. DOI:10.1016/j.molcatb.2015.08.023.
- [49] MELGOSA R, SANZ M T, BENITO-ROMÁN Ó, et al. Supercritical CO<sub>2</sub> assisted synthesis and concentration of monoacylglycerides rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids[J]. Journal of CO<sub>2</sub> Utilization, 2019, 31: 65–74. DOI:10.1016/j.jcou.2019.02.015.
- [50] WIKMARK Y, ENGELMARK CASSIMJEE K, LIHAMMAR R, et al. Removing the active-site flap in lipase a from *Candida antarctica* produces a functional enzyme without interfacial activation[J]. ChemBioChem, 2016, 17(2): 141–145. DOI:10.1002/cbic.201500471.
- [51] WIDMANN M, JUHL P B, PLEISS J. Structural classification by the lipase engineering database: a case study of candida antarctica lipase A[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 123. DOI:10.1186/1471-2164-11-123.
- [52] LIU T, ZHAO Y D, WANG X F, et al. A novel oriented immobilized lipase on magnetic nanoparticles in reverse micelles system and its application in the enrichment of polyunsaturated fatty acids[J]. Bioresource Technology, 2013, 132: 99–102. DOI:10.1016/j.biortech.2012.12.191.
- [53] PAWONGRAT R, XU X B, H-KITTIKUN A. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK[J]. Food Chemistry, 2007, 104(1): 251–258. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.11.036.
- [54] PAWONGRAT R, XU X B, H-KITTIKUN A. Physico-enzymatic production of monoacylglycerols enriched with very-long-chain polyunsaturated fatty acids[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88(2): 256–262. DOI:10.1002/jsfa.3081.
- [55] LOPES P A, PESTANA J M, COELHO D, et al. From natural triacylglycerols to novel structured lipids containing *n*-3 long-chain polyunsaturated fatty acids [M]//Patel V B. The Molecular Nutrition of Fats. Pittsburgh: Academic Press, 2019: 225–235. DOI: 10.1016/B978-0-12-811297-7.00017-2.
- [56] WANG T Y, LIU M, PORTINCASA P, et al. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption[J]. European Journal of Clinical Investigation, 2013, 43(11): 1203–1223. DOI:10.1111/eci.12161.
- [57] RUBIO-RODRÍGUEZ Z N, BELTRÁN S, JAIME I, et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(1): 1–12. DOI:10.1016/j.ifset.2009.10.006.
- [58] WANG X S, WANG X H, WANG W, et al. Synthesis of docosapentaenoic acid-enriched diacylglycerols by enzymatic glycerolysis of *schizochytrium* sp. oil[J]. Bioresource Technology, 2018, 262: 278–283. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.04.061.
- [59] LEE E J, LEE M W, NO D S, et al. Preparation of high purity docosahexaenoic acid from microalgae oil in a packed bed reactor via two-step lipase-catalysed esterification[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 21: 330–337. DOI:10.1016/j.jff.2015.12.020.
- [60] ŞAHİN-YEŞİLÇUBUK N, AKOHC C. Biotechnological and novel approaches for designing structured lipids intended for infant nutrition[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2017, 94(8): 1005–1034. DOI: 10.1007/s11746-017-3013-z.
- [61] LIU Y J, GUO Y L, SUN Z M, et al. Production of structured triacylglycerols containing palmitic acids at *sn*-2 position and docosahexaenoic acids at *sn*-1, 3 positions[J]. Journal of Oleo Science, 2015, 64(11): 1227–1234. DOI:10.5650/jos.ess15172.
- [62] GHOSH M, SENGUPTA A, BHATTACHARYYA D K, et al. Preparation of human milk fat analogue by enzymatic interesterification reaction using palm stearin and fish oil[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 53(4): 2017–2024. DOI:10.1007/s13197-016-2180-5.
- [63] WANG J, WANG X D, ZHAO X Y, et al. From microalgae oil to produce novel structured triacylglycerols enriched with unsaturated fatty acids[J]. Bioresource Technology, 2015, 184: 405–414. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.09.133.
- [64] SCHMID U, BORNSCHEUER U T, SOUMANOU M M, et al. Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1998, 75(11): 1527–1531. DOI:10.1007/s11746-998-0089-5.
- [65] HAMAM F, BUDGE S M. Structured and specialty lipids in continuous packed column reactors: comparison of production using one and two enzyme beds[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2010, 87(4): 385–394. DOI:10.1007/s11746-009-1515-z.
- [66] CHEN B Q, ZHANG H, CHEONG L Z, et al. Enzymatic production of aba-type structured lipids containing omega-3 and medium-chain fatty acids: effects of different acyl donors on the acyl migration rate[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(2): 541–547. DOI:10.1007/s11947-009-0322-8.
- [67] WILLETT S A, AKOHC C. Application of taguchi method in the enzymatic modification of menhaden oil to incorporate capric acid[J]. Journal of the American

- Oil Chemists' Society, 2018, 95(3): 299–311. DOI: 10.1002/aocs.12043.
- [68] ZHANG Z, LEE W J, XIE X D, et al. Enzymatic interesterification of palm stearin and palm olein blend catalyzed by *sn*-1, 3-specific lipase: interesterification degree, acylmigration, and physical properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(32): 9056–9066. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c06297.
- [69] KRISTENSEN J B, XU X B, MU H L. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2005, 82(5): 329–334. DOI: 10.1007/s11746-005-1074-5.
- [70] SCHNEIDER M. Phospholipids for functional food[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2001, 103(2): 98–101. DOI: 10.1002/1438-9312(200102)103:23.0.CO;2-G.
- [71] RAMPRASATH V R, EYAL I, ZCHUT S, et al. Enhanced increase of omega-3 index in healthy individuals with response to 4-week n-3 fatty acid supplementation from krill oil versus fish oil[J]. Lipids in Health and Disease, 2013, 12(1): 178. DOI: 10.1186/1476-511X-12-178.
- [72] KIDDP M. Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids[J]. Alternative Medicine Review, 2007, 12(3): 207–227. PMID: 18072818.
- [73] LI J, WANG X L, ZHANG T, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems[J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 10(2): 81–98. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.09.004.
- [74] VAN HOOGEVEST P, WENDEL A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2014, 116(9): 1088–1107. DOI: 10.1002/ejlt.201400219.
- [75] AHMED M K, AHMED F, TIAN H, et al. Marine omega-3 (n-3) phospholipids: a comprehensive review of their properties, sources, bioavailability, and relation to brain health[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(1): 64–123. DOI: 10.1111/1541-4337.12510.
- [76] ZHANG L Y, SHI H H, WANG C C, et al. Targeted lipidomics reveal the effects of different phospholipids on the phospholipid profiles of hepatic mitochondria and endoplasmic reticulum in high-fat/high-fructose-diet-induced nonalcoholic fatty liver disease mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(11): 3529–3540. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c07538.
- [77] HAMA S, OGINO C, KONDO A. Enzymatic synthesis and modification of structured phospholipids: recent advances in enzyme preparation and biocatalytic processes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(19): 7879–7891. DOI: 10.1007/s00253-015-6845-1.
- [78] ANG X, CHEN H, XIANG J Q, et al. Preparation and functionality of lipase-catalysed structured phospholipid: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 88: 373–383. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.04.005.
- [79] ZHANG H Y, SECUNDO F, SUN J N, et al. Advances in enzyme biocatalysis for the preparation of functional lipids[J]. Biotechnology Advances, 2022, 61: 108036. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108036.
- [80] MARSAOUI N, NAGHMOUCHI K, BAAH J, et al. Incorporation of ethyl esters of EPA and DHA in soybean lecithin using *rhizomucormiehei* lipase: effect of additives and solvent-free conditions[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(3): 938–946. DOI: 10.1007/s12010-015-1621-3.
- [81] ESTIASIH T, MARIANTY R, AHMADI K. Characteristics and emulsifying properties of structured phospholipids from palm pressed fiber and omega-3 fatty acid concentrates from by-products of fish processing by enzymatic acidolysis[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(10): 3689–3700. DOI: 10.1007/s13197-020-04827-2.
- [82] LI X, CHEN J F, YANG B, et al. Production of structured phosphatidylcholine with high content of DHA/EPA by immobilized phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed transesterification[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(9): 15244–15258. DOI: 10.3390/ijms150915244.
- [83] ZHAO T T, KIM B H, GARCIA H S, et al. Immobilized phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed modification of phosphatidylcholine with n-3 polyunsaturated fatty acid [J]. Food Chemistry, 2014, 157: 132–140. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.024.
- [84] WU J Q, WANG D L, XU X M, et al. Efficient synthesis of DHA/EPA-rich phosphatidylcholine by inhibition of hydrolysis reaction using immobilized phospholipase A<sub>1</sub> on macroporous SiO<sub>2</sub>/cationic polymer nano-composited support[J]. Molecular Catalysis, 2021, 499: 111278. DOI: 10.1016/j.mcat.2020.111278.
- [85] WEI W, SUN C, WANG X S, et al. Lipase-catalyzed synthesis of *sn*-2 palmitate: a review[J]. Engineering, 2020, 6(4): 406–414. DOI: 10.1016/j.eng.2020.02.008.
- [86] MURAKAMI M, TAKETOMI Y, MIKI Y, et al. Recent progress in phospholipase A<sub>2</sub> research: from cells to animals to humans[J]. Progress in Lipid Research, 2011, 50(2): 152–192. DOI: 10.1016/j.plipres.2010.12.001.
- [87] AWANO S, MIYAMOTO K, HOSOKAWA M, et al. Production of docosahexaenoic acid bounded

- phospholipids via phospholipase A<sub>2</sub> mediated bioconversion[J]. Fisheries Science, 2006, 72(4): 909–911. DOI: 10.1111/j.1444-2906.2006.01236.x.
- [88] LIU Y H, HUANG L, LI M J, et al. Characterization of the recombinant porcine pancreas phospholipase A<sub>2</sub> expressed in *Pichia pastoris* GS115 and its application to synthesis of 2-DHA-PS[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(10): 1472–1478. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.06.023.
- [89] XU N, SHANBHAG A G, LI B, et al. Impact of phospholipid-tocopherol combinations and enzyme-modified lecithin on the oxidative stability of bulk oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(28): 7954–7960. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b02520.
- [90] FARINE L, JELK J, CHOI J Y, et al. Phosphatidylserine synthase 2 and phosphatidylserine decarboxylase are essential for aminophospholipid synthesis in *Trypanosoma brucei*[J]. Molecular Microbiology, 2017, 104(3): 412–427. DOI: 10.1111/mmi.13637.
- [91] ZHANG H Y, CHU W Q, SUN J N, et al. Combining cell surface display and DNA-shuffling technology for directed evolution of *Streptomyces* phospholipase D and synthesis of phosphatidylserine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(47): 13119–13126. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b05394.
- [92] ZHANG Z X, CHEN M, XU W, et al. Microbial phospholipase D: identification, modification and application[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 96: 145–156. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.12.020.
- [93] SONG S, CHEONG L Z, GUO Z, et al. Phospholipase D (PLD) catalyzed synthesis of phosphatidyl-glucose in biphasic reaction system[J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 373–379. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.020.
- [94] MAO X Z, LIU Q Q, QIU Y Q, et al. Identification of a novel phospholipase D with high transphosphatidylase activity and its application in synthesis of phosphatidylserine and DHA-phosphatidylserine[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 249: 51–58. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.03.029.

## Advances in the application of lipase in fish oil processing

HU Yang, LI Wanting, MAO Xiangzhao

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Functional lipids rich in  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids ( $\omega$ -3PUFA) are widely used in food and medicine because of their special nutritional and physiological effects in brain function and vision development. Fish oil is the main source of  $\omega$ -3PUFA. Lipases have been used as unique enzymatic tools to selectively prepare functional lipids, improve the structure of natural lipids and provide specific bioactivities, due to their efficient catalysis and selectivity. In this review, recent research progress on lipase catalysis used for fish oil processing was presented and discussed, analyzing the superiority of enzymatic catalysis in the production of health-promoting lipids enriched in  $\omega$ -3PUFA in the formation of ethyl esters, 2-monoacylglycerols, structured triglycerides and structured phospholipids. The main factors, e.g., solvent composition and reaction conditions, on the esterification, transesterification and hydrolysis reactions catalyzed by lipase was also discussed in the production of  $\omega$ -3PUFA-rich lipids. Finally, the main challenges in the application of enzymatic catalysis technique in the production of functional lipids from fish oil were summarized, and the crucial directions for future research in this field was proposed.

**Key words:** enzymatic catalytic technique; lipase; fish oil; omega-3 polyunsaturated fatty acid; functional lipid

**Manuscript received:** 2022-10-16; **revised:** 2022-11-30; **accepted:** 2022-12-05

**Foundation item:** Project (tsqn201812020) supported by Taishan Young Scholar of Shandong Province

**Corresponding author:** MAO Xiangzhao (1981—) (ORCID: 0000-0002-6315-1338), male, professor, research interest: enzymology of marine food. E-mail: xzhmao@ouc.edu.cn

(责任编辑: 刘平; 校对: 石月珍; 英文编辑: 文李)