

脂肪酶催化醇解制备富含 n-3 PUFAs 的甘油酯

江 聪, 陈 焯, 金文华, 王小三*
(江南大学食品学院 江苏无锡 214122)

摘要 n-3 PUFAs 具有多种生理活性。以鱼油为原料,采用脂肪酶催化醇解法对其中的 n-3 PUFAs 进行富集,得到富含 n-3 PUFAs 的甘油酯。结果表明:来自米曲霉的脂肪酶 Eversa Transform 2.0(ET 2.0)对 n-3 PUFAs 表现出良好的醇解特异性。通过单因素实验确定最佳工艺条件为:甲醇体积分数 40%, $m_{\text{甲醇}}:m_{\text{鱼油}}=1.6:1$,温度 35 °C,脂肪酶添加量 4%,反应时间 2 h。在此条件下,鱼油甘油酯中 n-3 PUFAs 的含量从 39.88%上升至 67.87%,EPA 和 DHA 的含量从 36.61%上升至 65.22%,n-3 PUFAs 的得率为 56.33%。脂肪酶在最佳反应条件下对不同底物的富集效果是:金枪鱼油甘油酯中 n-3 PUFAs 的含量从 38.81%上升到 61.35%,藻油甘油酯中 n-3 PUFAs 的含量从 45.96%上升到 64.09%。上述方法获得的富含 n-3 PUFAs 甘油酯在食品和制药行业有很大的应用潜力。

关键词 富含 n-3 PUFAs 的甘油酯; 鱼油; n-3 多不饱和脂肪酸; 脂肪酶; 醇解

文章编号 1009-7848(2023)05-0193-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.020

n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFAs)作为一类功能性脂肪酸,对人体健康具有重要的作用。流行病学研究和临床试验表明食用鱼类和海产品对维护和促进人类健康存在有益影响^[1]。这些影响主要归因于鱼类和海产品中丰富的 n-3 PUFAs,特别是二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)。研究发现,n-3 PUFAs 能够辅助炎症修复,促进婴幼儿中枢神经功能的正常发育^[2-3]。每天摄入适量 n-3 PUFAs,还可以降低心血管疾病的发病率和相关死亡的发生率^[4-5]。美国心脏协会建议冠心病患者每天摄入 1 g EPA 和 DHA^[6]。

n-3 PUFAs 主要是来源于鱼油和藻油等天然油脂,然而,天然油脂中 n-3 PUFAs 含量较低^[7]。市场上 PUFAs 含量 60%以上的产品中,n-3 PUFAs 多以游离脂肪酸和乙酯形式存在,而甘油酯作为 n-3 PUFAs 的天然存在形式,在消化吸收和脂质稳定性方面优于另外两种,也更易被消费者接受^[8]。目前甘油酯型鱼油产品中,n-3 PUFAs 含量普遍不高。随着人们健康意识的增加,对 n-3 PUFAs 产品有了更高要求。开发高浓度的 n-3 PUFAs 甘油酯型产品具有重要意义。

目前制备富含 n-3 PUFAs 的结构脂质,采用的方法主要有物理法、化学法和脂肪酶催化法^[9]。以鱼油为原料,通过物理、化学方法较难将甘油酯上 n-3 PUFAs 的含量大幅提高,而脂肪酶催化的选择性水解或醇解法可以得到高浓度的 PUFA 甘油酯,然而酶法水解和酶法醇解法均受脂肪酶催化效率的限制。因此,筛选一种对 n-3 PUFAs 具有特异性的脂肪酶,使得甘油酯上 PUFA 的含量得到较大提高。本试验以鱼油为原料,在醇解条件下筛选脂肪酶,分析反应条件对 n-3 PUFAs 含量和得率的影响,探究最佳反应条件。同时,以金枪鱼油和藻油为原料,考察脂肪酶在最佳反应条件下对不同底物的富集效果。

1 材料与amp;方法

1.1 材料及主要试剂

OMAX 1812 鱼油(鱼油)、精炼金枪鱼油和 DHA 藻油,挪亚圣诺(Novosana,江苏太仓)生物科技有限公司;脂肪酶[Eversa Transform 2.0,来源米曲霉(*Aspergillus oryzae*),活力 ≥ 0.10 LCLU-SL/mg],诺维信(Novozyme)北京生物有限公司;脂肪酶 PS “Amano”SD【来源洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*),活力 31.80 U/mg],脂肪酶 AK “Amano”【来源洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*),活力 20 U/mg],天野(Amano,上海)酶制剂公司;脂肪酸甲酯标准品(37 种脂肪酸

收稿日期: 2022-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972035)

第一作者: 江聪,女,硕士

通信作者: 王小三 E-mail: xiaosanw@jiangnan.edu.cn

甲酯混标),Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司;无水甲醇、无水硫酸钠、氢氧化钾、乙醚、异丙醇等(均为分析纯级),上海国药试剂公司;正己烷、异丙醇、甲酸(色谱纯级),百灵威科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Agilent 7820A 气相色谱仪,安捷伦科技有限公司;Waters 1525 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;夹层酶反应器,上海申迪玻璃仪器有限公司;多联磁力搅拌器,上海尚普仪器设备有限公司;DC 系列低温恒温槽,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;WHY-2 数显恒温振荡器,上海梅香仪器有限公司;5810 高速离心机,德国 EPPENDORF 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酶法醇解鱼油

1.3.1.1 脂肪酶的筛选 以甘油酯中 n-3 PUFAs 含量和得率为指标,考察 3 种商业化脂肪酶——Eversa Transform 2.0 (ET 2.0)、PS “Amano”SD (PS)和 AK “Amano”(AK)对 n-3 PUFAs 富集效果的影响。反应条件:在 20 mL 夹层酶反应器中加入 2.0 g 鱼油,1.6 g 乙醇和 2.4 g 蒸馏水(醇溶液体积分数 40%,醇油质量比 0.8:1),加酶量 4%(基于油质量),控制反应温度 35 °C,在转速 350 r/min 条件下反应 6 h。

1.3.1.2 酰基受体的筛选 以甘油酯中 n-3 PUFAs 含量和得率为指标,考察对不同酰基受体对 n-3 PUFAs 富集的影响。反应条件:醇油质量比 0.8:1,醇溶液体积分数 40%,加酶量 4%(基于油质量),反应温度 35 °C,转速 350 r/min,反应时间 6 h。

1.3.1.3 单因素实验

1) 在醇油质量比 0.8:1、加酶量 4%、酶解温度 35 °C、酶解时间 6 h 的条件下,考察醇溶液体积分数(20%,40%,60%,80%,100%)对 n-3 PUFAs 含量和得率的影响。

2) 在醇溶液体积分数 40%、加酶量 4%、酶解温度 35 °C、酶解时间 6 h 条件下,考察醇、油质量比(0.4:1,0.8:1,1.6:1,3.2:1,4.8:1)对 n-3 PUFAs 含量和得率的影响。

3) 在醇溶液体积分数 40%、醇、油质量比 1.6:1、酶解温度 35 °C、酶解时间 6 h 条件下,考察

加酶量(1%,2%,4%,6%,8%)对 n-3 PUFAs 含量和得率的影响。

4) 在醇溶液体积分数 40%、醇、油质量比 1.6:1、加酶量 4%、酶解时间 6 h 条件下,考察加酶解温度(25,35,45,55 °C)对 n-3 PUFAs 含量和得率的影响。

5) 在醇溶液体积分数 40%、醇、油质量比 1.6:1、加酶量 4%、酶解温度 35 °C 条件下,考察加酶解时间(1,2,4,6,8,10 h)对 n-3 PUFAs 含量和得率的影响。

1.3.1.4 最适条件醇解金枪鱼油和藻油 以金枪鱼油和藻油为原料,考察在醇溶液体积分数 40%、醇油质量比 1.6:1、加酶量 4%、酶解温度 35 °C、酶解时间 2 h 条件下 n-3 PUFAs 的富集情况。

1.3.2 甘油酯的分离 醇解产物中含有甘三酯(Triacylglycerols, TAGs)、甘二酯(Diacylglycerols, DAGs)、单甘酯(Monoacylglycerols, MAGs)、脂肪酸酯(Fatty acid esters, FAEs)和少量(Free fatty acids, FFAs),采用 TLC 薄层色谱分离纯化得到甘油酯^[9]。

将 20 mg 醇解产物与 150 μL 乙醚混合,然后点在干燥的硅胶板(厚度 2 mm, 10 cm×20 cm)上,将其放入展开槽,倒入 80 mL 展开剂。展开剂为体积比 80:20:1 的正己烷,乙醚和乙酸。在展开槽中平衡 40 min,取出硅胶板置于碘蒸气染色缸内显色处理,随后将相应的 TAGs、DAGs 和 MAGs 条带刮下,置于 50 mL 离心管中,添加乙醚提取甘油酯,吹干溶剂后对分离的甘油酯进行脂肪酸组成测定。

1.3.3 脂肪酸组成的测定 采用配有氢火焰离子检测器的气相色谱仪(GC-FID)对分离出的甘油酯进行脂肪酸组成测定。样品处理方法:称取 50 mg 样品溶于 2 mL 色谱级正己烷中,加入 1 mL 2 mol/L 氢氧化钾甲醇溶液。漩涡振荡器振荡 3 min,吸入上层有机相,加入无水硫酸钠,振荡 3 min,8 000 r/min 离心 5 min,过 0.22 μm 有机膜。气相分析条件参考高亮等^[10]的方法。

1.3.4 脂质组成的测定 采用配有视差检测器的 RID-HPLC 检测醇解产物中的脂质组成。称取 20 mg 醇解产物,加入 1 mL 流动相溶解,经 0.22 μm 有机滤膜过滤后用 HPLC-RID 分析产物中的

TAG、DAG、MAG 和 FAME。液相色谱检测条件参考程昕祎^[12]的方法。

1.3.5 n-3 PUFAs 得率的计算

$$\text{n-3 PUFAs 得率}(\%) = \frac{m_p \times \omega_p}{m_R \times \omega_R} \times 100$$

式中, m_R ——鱼油醇解前甘油酯的质量(g); m_p ——鱼油醇解后甘油酯的质量(g); ω_R ——鱼油醇解前甘油酯中 n-3 PUFAs 的含量(%); ω_p ——鱼油醇解后甘油酯中 n-3 PUFAs 的含量(%)。

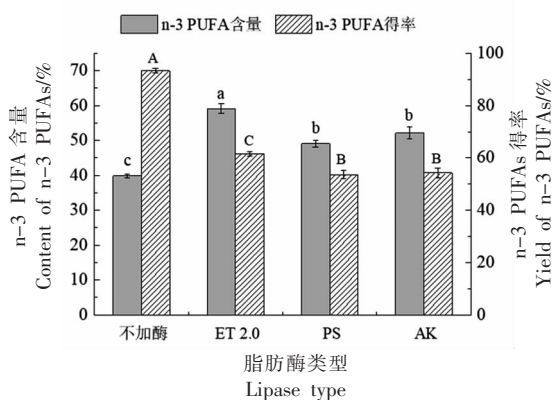
1.4 数据分析

所有试验至少重复两次以上, 数据均以平均值 \pm 标准偏差表示。用 Origin 2018 软件制图, IBM SPSS Statistics 软件进行单因素方差 (ANOVA) 分析, Tukey 检验分析比较数据间的显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 脂肪酶种类对 n-3 PUFAs 富集的影响

如图 1 所示, 在脂肪酶 ET 2.0 的催化下, 鱼油的 n-3 PUFAs 总含量由 39.88% 增到 59.09%, 显著高于对照组和另外两种酶的 ($P < 0.05$), 含量与原油相比提高了 0.48 倍; 其次是脂肪酶 AK 和 PS, n-3 PUFAs 总含量分别为 52.11% 和 49.07%, 两者之间无显著差异 ($P > 0.05$)。Jennings 等^[13]研究了脂肪酶催化法富集 n-3 PUFAs 的原理, 发现脂肪酶 IM60 具有脂肪酸选择性, 原因可能是 EPA,



注: 不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。

图 1 脂肪酶对的 n-3 PUFAs 含量和得率的影响

Fig.1 Effects of lipase type on the content and yield of n-3 PUFAs in glyceride

DHA 等 PUFA 分子中含有多个碳碳双键, 特殊的全顺式构型导致空间位阻相比于其它脂肪酸大, 在脂肪酶催化反应中, n-3 PUFAs 的反应速率更慢。

从 n-3 PUFAs 得率来看, 对照组得率最高, 在没有脂肪酶的情况下醇解反应难以发生, n-3 PUFAs 几乎无损失。脂肪酶 ET 2.0 的得率最高 (61.56%), 显著高于另外两种酶 ($P < 0.05$), 脂肪酶 PS 和 AK 的得率无显著差异。综合考虑 n-3 PUFAs 的含量和 n-3 PUFAs 甘油酯的得率, 脂肪酶 ET 2.0 是最合适的脂肪酶, 可作为后续优化试验的催化剂。

2.2 酰基受体对 n-3 PUFAs 富集的影响

上述研究表明, 脂肪酶 ET 2.0 在催化鱼油发生乙醇解反应, 选择性地富集 n-3 PUFAs 方面具有良好的性能。此外, 不同的酰基受体影响脂肪酶的催化性能^[14]。分别在不添加醇 (水作为酰基受体), 添加甲醇、乙醇及异丙醇的条件下进行脂肪酶催化反应, 结果如图 2 所示。

首先, 从 n-3 PUFAs 含量来看, 以甲醇作为醇解酰基受体时, n-3 PUFAs 含量最高, 从原料鱼油的 39.88% 提到 62.92%, 其次是乙醇和异丙醇, n-3 PUFA 含量分别为 59.05% 和 50.41%; 富集效果最差的是不添加醇 (42.14%), 说明在醇解反应体系中脂肪酶的选择性增强。一些研究者研究了有机溶剂的理化性质对酶选择性的影响, 他们发现只有溶剂的极性与酶的活性和选择性有明显的

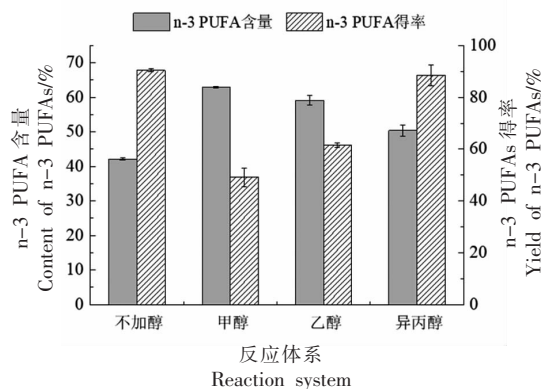


图 2 酰基受体对的 n-3 PUFAs 含量和得率影响

Fig.2 Effects of acyl acceptors on the content and yield of n-3 PUFAs in glyceride

相关性^[15-16],甲醇反应体系的极性才较高,提高了脂肪酶的选择性^[17]。其次,从 n-3 PUFAs 得率来看,水作为酰基受体时得率最高,为 90.37%,添加甲醇时得率最低,与乙醇相比没有显著性差异。脂肪酶活性中心的空间构象呈隧道状^[18]。当酰基受体的空间位阻越大时,与酶活性中心的结合越难,甲醇碳链短、分子质量小,空间位阻相对而言也越小,反应速率较快。当反应时间过长时,过多的 n-3 PUFAs 被醇解下来,导致 n-3 PUFAs 得率降低。脂肪酶 ET 2.0 是诺维信生物公司开发的,被用于生物柴油领域^[19]。选择甲醇作为酰基受体,副产物脂肪酸甲酯(Fatty acid methyl esters, FAMES)可回收作为生物柴油。综合考虑 n-3 PUFAs 的含量和得率,选择甲醇用于后续优化试验。在该体系中,鱼油甘油酯中 n-3 PUFAs 含量从 39.88% 增到 62.92%, n-3 PUFAs 甘油酯的得率为 49.12%。

2.3 单因素实验结果

2.3.1 甲醇浓度对 n-3 PUFAs 富集效果的影响
大多数脂肪酶的活性中心被一个 α 螺旋的“盖子”结构所覆盖^[20],使脂肪酶以不活泼的形式存在。当脂肪酶吸附在油-水界面,发生界面活化时,盖子打开,暴露活性中心,脂肪酶成为活泼形式,因此反应体系中含水量是影响脂肪酶催化的一个重要因素^[21]。

图 3a 显示不同体积分数的甲醇对 n-3 PUFAs 甘油酯富集的影响。从甘油酯中 n-3 PUFAs 含量看,甲醇体积分数为 40% 时, n-3 PUFAs 含量最高,由原料鱼油的 39.88% 提到 62.92%,显著高于其它体积分数下的试验组;体积分数为 60% 的试验组次之, n-3 PUFAs 含量为 58.38%;体积分数为 20% 和 60% 的试验组无显著差异,分别为 50.28% 和 48.96%;体积分数为 100% 的试验组效果最差, n-3 PUFAs 含量分别为 41.97%。甲醇为反应底物,浓度过低导致反应速率降低;浓度过高,甲醇剥夺脂肪酶表面的必需水,导致酶活力下降^[22],同时体系油-水界面难以形成,酶无法正常发挥催化活性。

从 n-3 PUFAs 得率来看,体积分数 40% 的得率最低,为 49.12%;其次是体积分数 60%、80% 和 20% 的试验组,得率分别为 64.05%、75.38% 和

84.34%。体积分数 40% 的得率和体积分数 60% 试验组的得率没有显著性差异。体积分数为 100% 的试验组得率最高,为 90.37%。如上文分析,浓度过低或过高都会导致脂肪酶催化能力降低,越少的脂肪酸从甘油酯上脱落,获得的得率较高。综合考虑 n-3 PUFAs 的含量和 n-3 PUFAs 甘油酯的得率,认为体积分数 40% 为优化试验适合的醇体积分数。

2.3.2 醇油质量比对 n-3 PUFAs 富集的影响
考察了醇油质量比对甘油酯中 n-3 PUFAs 得率和含量的影响。从图 3b 可以看出,当醇油比从 0.4:1 增到 1.6:1 时, n-3 PUFAs 含量从 55.89% 显著增至 66.05%。当醇油比进一步增加时, n-3 PUFAs 含量并没有随之增加,反而略有下降,醇油比 3.2:1 和 4.8:1 对应的 n-3 PUFAs 含量分别是 64.07% 和 63.90%,与醇油比 1.6:1 的试验组无显著差异。从 n-3 PUFAs 的得率来看,醇油比为 0.4:1 的试验组得率最高,为 67.31%,其余 4 组醇油比试验组的得率无显著差异。在本反应体系中,甘油酯与甲醇和水在脂肪酶的催化下同时发生醇解和水解反应,水解产生的 FFA 会与甲醇直接反应生成 FAMES。传统上,通常选择较高的甲醇用量来推动反应向产物形成方向发展,然而,过量的甲醇会影响酶的稳定性,导致酶的不可逆变性^[23]。经综合考虑 n-3 PUFAs 的含量、得率,选择 1.6:1 为最优醇油质量比。在该条件下,鱼油甘油酯中 n-3 PUFAs 含量从 39.88% 增到 66.05%, n-3 PUFAs 甘油酯得率为 52.01%。

2.3.3 脂肪酶添加量对 n-3 PUFAs 富集的影响
当脂肪酶添加量较低时,反应体系中酶活性位点较少,导致催化速率降低,当脂肪酶添加量过高时,反应体系中酶活性位点饱和,不仅甘油酯中 n-3 PUFAs 含量提高不明显,而且在一定程度上增加了反应成本^[24]。图 3c 考察了酶添加量对 n-3 PUFAs 富集的影响。从 n-3 PUFAs 含量来看,当脂肪酶添加量从 1% 升到 4% 时, n-3 PUFAs 含量从 58.17% 显著增到 66.05%,酶添加量继续升高, n-3 PUFAs 含量并无显著提高,说明 4% 的酶添加量为底物提供了足够的催化位点。从 n-3 PUFAs 得率来看,得率与脂肪酶添加量存在负相关的关系,随着脂肪酶添加量从 1% 增至 8%, n-3

PUFAs 得率从 75.57% 降至 50.76%。过多的脂肪酶用量在一定程度上促进了 n-3 PUFAs 与酶催化部位的结合, 导致过多的 n-3 PUFAs 被醇解下来, 说明脂肪酶用量并非越多越好。从 n-3 PUFAs 的含量和得率考虑, 脂肪酶添加量 4% 最为适合。

2.3.4 温度对 n-3 PUFAs 富集的影响 反应温度是影响酶催化反应速度与酶活力稳定性的重要因素^[25]。如图 3d 所示, 从甘油酯中的 n-3 PUFAs 含量来看, 随着温度从 25 °C 升到 35 °C 时, n-3 PUFAs 含量从 60.58% 显著升到 66.05%; 而当温

度升到 45 °C 时, n-3 PUFAs 含量显著降至 60.58%; 当温度继续升到 55 °C 时, n-3 PUFAs 含量降至 59.13%。n-3 PUFAs 的得率随温度的升高没有发生显著性变化, 35 °C 时得率为 52.01%。n-3 PUFAs 含量和得率共同说明 35 °C 是脂肪酶 ET 2.0 的最适温度, 低于该温度脂肪酶不能很好地发挥催化活性, 而高于该温度可能导致脂肪酶的部分失活。综合考虑 n-3 PUFAs 含量和得率, 选择 35 °C 为最适温度进行优化试验。在该条件下, 鱼油甘油酯中 n-3 PUFAs 含量从 39.88% 增到 66.05%,

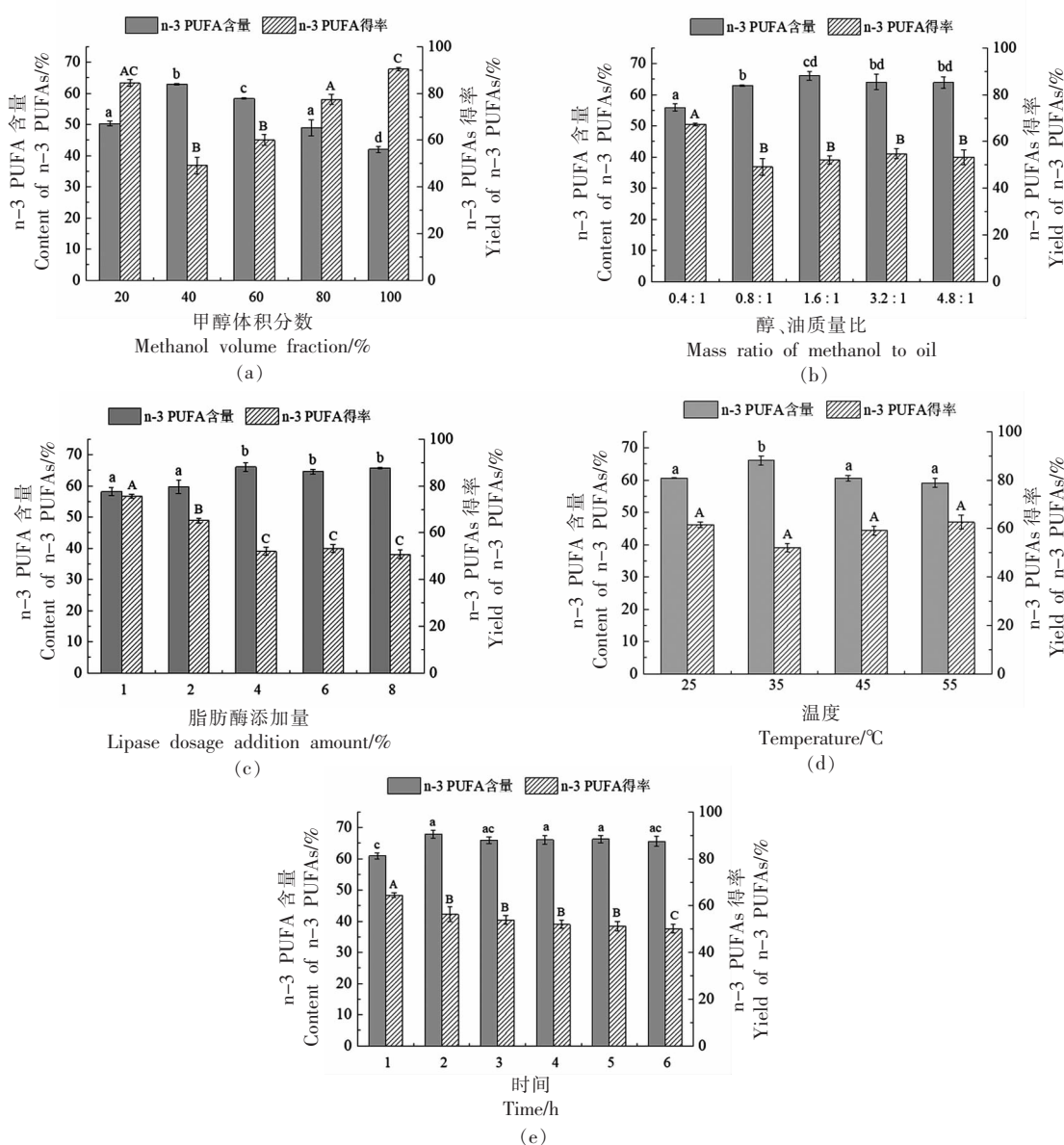


图 3 醇解条件对 n-3 PUFAs 含量和得率的影响

Fig.3 Effects of reaction condition of enzymatic alcoholysis on the content and yield of n-3 PUFAs in glyceride

n-3 PUFAs 得率为 52.01%。

2.3.5 时间对 n-3 PUFAs 富集的影响 完成上述试验后,在甲醇溶液体积分数 40%,甲醇油质量比 1.6:1,温度 35 ℃,脂肪酶添加量 4%的条件下绘制 n-3 PUFAs 含量和得率随时间变化的曲线。如图 3e 所示,随着反应时间的延长,n-3 PUFAs 含量逐渐增加,2 h 时达到最大值 67.87%。反应时间继续延长,n-3 PUFAs 含量没有继续增加,反而略有下降,这表明 2 h 时,反应达到平衡状态,继续延长反应时间并不能提高 n-3 PUFAs 含量。从 n-3 PUFAs 得率来看,得率与反应时间呈现负相关,从 1 h 到 10 h,得率从 64.49%降到 49.22%。这表明随着反应时间的延长,甘油酯上越来越多的 n-3 PUFAs 参与醇解反应,因而得率逐渐降低。综合考虑 n-3 PUFAs 含量和得率,选择 2 h 为最合适反应时间。在该条件下,鱼油甘油酯中 n-3 PUFAs 含量从 39.88% 增到 67.87%,n-3 PUFAs 甘油酯得率为 56.33%。

2.4 其它种类油脂 n-3 PUFAs 甘油酯的富集

为了验证脂肪酶 ET 2.0 在最佳反应条件下的底物适应性,考察了金枪鱼油和藻油的 n-3 PUFAs 富集情况。鱼油、金枪鱼油和藻油醇解前、后的脂质组成见表 1,醇解前、后甘油酯中各脂肪酸的组成、总 n-3 PUFAs 含量以及 n-3 PUFAs 得率见表 2。

由表 1 可知,3 种原料油在反应前主要含有 98% 以上的 TAGs,鱼油和甲醇发生醇解反应后,醇解产物中主要含有 15.14% TAGs,66.05% FAMEs 和 16.28% DAGs,金枪鱼和甲醇发生醇解反应后,醇解产物中主要含有 10.29% TAGs,61.45% FAMEs 和 27.57% DAGs。当藻油和甲醇

发生醇解反应后,醇解产物中 TAGs,FAMEs 和 DAGs 含量分别为 23.44%,53.43%和 19.13%。由此可见,在脂肪酶 ET 2.0 的催化下,3 种原料油发生醇解反应,主要生成 FAMEs 和 DAGs,其中 FAMEs 含量较高。

由表 2 可知,3 种原料油在反应前,甘油酯中 n-3 PUFAs 含量在 40% 左右。在脂肪酶的催化下,n-3 PUFAs 含量上升到 60% 以上。鱼油发生醇解反应后,甘油酯中,SFAs 从 30.28% 降到 17.85%,MUFAs 从 25.69% 降到 9.96%,n-3 PUFAs 从 39.88% 上升到 67.87%,提高了 0.70 倍,n-3 PUFAs 得率为 56.33%。金枪鱼油发生醇解反应后,甘油酯中,SFAs 从 31.93% 降到 15.28%,MUFAs 从 22.65% 降到 7.50%,n-3 PUFAs 从 38.81% 上升到 61.35%,提高了 0.58 倍,n-3 PUFAs 得率为 57.51%。藻油发生醇解反应后,甘油酯中 SFAs 从 22.54% 降到 6.50%,MUFAs 从 4.06% 降到 0.93%,n-3 PUFAs 从 45.96% 上升到 64.09%,提高了 0.39 倍,n-3 PUFAs 得率为 61.41%。3 种油脂在最佳反应条件下醇解得到高于原料油 1.3 倍以上的 n-3 PUFAs 含量,其中以鱼油和金枪鱼油富集效果最好,3 种油脂醇解后的 n-3 PUFAs 得率都在 55% 以上,其中以藻油和金枪鱼油的得率最高,分别是 61.41% 和 57.51%。综合分析 3 种油脂的 n-3 PUFAs 含量和得率,说明脂肪酶 ET 2.0 在最佳反应条件下具有良好的富集能力,对底物适应性强。

3 结论

以 1812 鱼油为原料,酶法醇解制备富含 n-3 PUFAs 甘油酯。结果表明,来自米曲霉的脂肪酶

表 1 鱼油和藻油醇解前、后的脂质组分 (%)

Table 1 The lipase composition (%) of fish oil and algal oil before and after selective alcoholysis

脂质组分	1812 鱼油		金枪鱼油		藻油	
	原油	醇解后	原油	醇解后	原油	醇解后
TAGs	98.95 ± 0.18	15.14 ± 0.18	98.24 ± 0.17	10.29 ± 0.19	98.30 ± 0.52	23.44 ± 0.35
FAMEs	-	66.05 ± 0.46	-	61.45 ± 0.45	-	53.43 ± 0.42
FFAs	-	1.36 ± 0.18	-	2.21 ± 0.36	-	3.03 ± 0.62
DAGs	0.61 ± 0.13	16.28 ± 0.33	1.04 ± 0.22	27.57 ± 0.39	1.45 ± 0.28	19.13 ± 0.29
MAGs	-	1.03 ± 0.13	-	1.49 ± 0.51	-	1.01 ± 0.27

注:表中数据以平均值±标准偏差表示,“-”表示未检出,下同。

表 2 鱼油和藻油醇解前、后甘油酯的脂肪酸组成 (%)

Table 2 The fatty acid composition (%) of fish oil and algal oil before and after selective alcoholysis

脂肪酸	1812 鱼油(甘油酯)		金枪鱼油(甘油酯)		藻油(甘油酯)	
	原油	醇解后	原油	醇解后	原油	醇解后
C14:0	6.92 ± 0.06	3.92 ± 0.43	3.94 ± 0.31	2.46 ± 0.12	1.36 ± 0.18	0.27 ± 0.04
C15:0	0.60 ± 0.00	0.36 ± 0.03	1.10 ± 0.06	0.55 ± 0.05	-	0.08 ± 0.01
C16:0	17.99 ± 0.03	10.86 ± 0.76	20.23 ± 0.81	9.65 ± 0.12	19.14 ± 0.89	5.12 ± 0.54
C16:1	10.11 ± 0.08	4.31 ± 0.54	5.15 ± 0.21	2.05 ± 0.35	0.43 ± 0.04	0.16 ± 0.02
C17:1	0.62 ± 0.01	0.96 ± 0.47	0.25 ± 0.07	0.12 ± 0.01	-	-
C18:0	3.94 ± 0.02	2.21 ± 0.36	6.01 ± 0.33	2.41 ± 0.02	2.04 ± 0.07	0.88 ± 0.25
C18:1	13.05 ± 0.08	4.10 ± 0.19	15.71 ± 0.71	4.94 ± 0.12	3.63 ± 0.16	0.74 ± 0.06
C18:2	1.65 ± 0.06	0.92 ± 0.09	1.46 ± 0.51	0.62 ± 0.02	7.66 ± 0.16	0.97 ± 0.04
C18:3 n-6	0.30 ± 0.02	0.54 ± 0.06	0.39 ± 0.17	0.34 ± 0.42	0.44 ± 0.16	0.15 ± 0.01
C18:3 n-3	0.71 ± 0.01	0.31 ± 0.05	0.45 ± 0.26	0.16 ± 0.03	-	0.09 ± 0.01
C20:0	0.62 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.37 ± 0.41	0.12 ± 0.01	-	0.09 ± 0.01
C20:1	1.91 ± 0.41	0.60 ± 0.03	1.54 ± 0.15	0.39 ± 0.07	-	0.03 ± 0.01
C20:2 n-6	0.29 ± 0.00	0.37 ± 0.06	0.33 ± 0.32	0.20 ± 0.04	-	-
C20:3 n-6	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.05	0.28 ± 0.24	0.17 ± 0.06	-	0.50 ± 0.01
C20:3 n-3	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.18 ± 0.33	0.06 ± 0.02	-	0.25 ± 0.05
C20:4 n-6	1.35 ± 0.01	1.01 ± 0.37	1.97 ± 0.42	1.53 ± 0.01	0.76 ± 0.18	0.06 ± 0.01
C20:5 n-3	21.97 ± 0.18	21.52 ± 0.45	7.69 ± 0.99	4.42 ± 0.25	0.88 ± 0.16	0.47 ± 0.01
C22:0	0.22 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.29 ± 0.52	0.12 ± 0.01	-	0.09 ± 0.02
C22:5 n-6	0.36 ± 0.04	1.29 ± 0.28	2.19 ± 0.01	5.03 ± 0.04	1.55 ± 0.28	19.64 ± 0.06
C22:5 n-3	2.47 ± 0.03	2.27 ± 0.81	1.36 ± 0.02	0.76 ± 0.10	-	0.13 ± 0.03
C22:6 n-3	14.64 ± 0.13	43.70 ± 1.75	29.13 ± 0.41	55.96 ± 1.36	44.65 ± 0.52	63.35 ± 1.01
SFAs	30.28 ± 0.12	17.85 ± 0.81	31.93 ± 0.84	15.28 ± 0.32	22.54 ± 0.64	6.50 ± 0.86
MUFAs	25.69 ± 0.40	9.96 ± 0.26	22.65 ± 0.70	7.50 ± 0.39	4.06 ± 0.11	0.93 ± 0.09
n-3 PUFAs	39.88 ± 0.35	67.87 ± 1.33	38.81 ± 0.81	61.35 ± 1.27	45.96 ± 0.20	64.09 ± 0.97
n-3 PUFAs 得率	-	56.33 ± 2.53	-	57.51 ± 1.22	-	61.41 ± 0.55

注:饱和脂肪酸(Saturated fatty acids, SFAs),单不饱和脂肪酸(Monounsaturated fatty acids, MUFAs)。

Eversa Transform 2.0(ET 2.0)在选择性富集 n-3 PUFAs 方面具有良好的性能,在甲醇溶液体积分数 40%,甲醇油质量比 1.6:1,温度 35 °C,脂肪酶添加量 4%,反应时间 2 h 的条件下,甘油酯中 n-3 PUFAs 的含量从最初的 39.88%增到 67.87%,n-3 PUFAs 的得率 56.33%。为验证得到的最佳反应条件对含 n-3 PUFAs 的其它原料油的适用性,在上述条件下,对金枪鱼油和藻油进行醇解富集,结果发现,金枪鱼油中 n-3 PUFAs 含量由 38.81%提高到 61.35%,增加 0.58 倍,藻油中 n-3 PUFAs 含量由 45.96%上升到 64.09%,增加 0.39 倍。由此可见,该醇解反应条件对于不同脂肪酸组成的油脂

都适用。为了获得富含 n-3 PUFAs 的甘油酯,后续可以通过分子蒸馏、溶剂提取等方法去除 FAMES,同时,脂肪酶 CAL-A 的可重复利用性也需研究。综上所述,脂肪酶催化甲醇分解含有 n-3 PUFAs 油以获得富含 n-3 PUFAs 的甘油酯的方法在食品和制药行业有很大的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] FUKUNAGA K, HOSOMI R, FUKAO M, et al. Hypolipidemic effects of phospholipids (PL) containing n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) are not

- dependent on esterification of n-3 PUFA to PL[J]. *Lipids*, 2016, 51(3): 279-289.
- [2] FISCHER S. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans[J]. *Advances in Lipid Research*, 1992, 23(1): 169-198.
- [3] KURATKO C N, BARRETT E C, NELSON E B, et al. The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: A review[J]. *Nutrients*, 2013, 5(7): 2777-2810.
- [4] MANERBA A, VIZZARDI E, METRA M, et al. n-3 PUFA and cardiovascular disease prevention[J]. *Future Cardiology*, 2010, 6(3): 343-350.
- [5] LAVIE C J, MILANI R V, MEHRA M R, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009, 54(7): 585-594.
- [6] KRIS-ETHERTON P M, HARRIS W S, APPEL L J, et al. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 2002, 106(21): 2747-2757.
- [7] JIN J, JIN Q Z, 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.
- [8] 马永钧, 杨博. 海洋鱼油深加工技术研究进展[J]. *中国油脂*, 2011, 36(4): 1-6.
MA Y J, YANG B. Research advance in deep processing technologies of marine fish oil[J]. *China Oils and Fats*, 2011, 36(4): 1-6.
- [9] 刘芳. 酶法催化制备富含 EPA 和 DHA 甘油三酯研究[D]. 广州: 暨南大学, 2016.
LIU F. Preparation in EPA and DHA-enriched triglycerides by enzymatic approaches[D]. Guangzhou: Jinan University, 2016.
- [10] 陈芳, 叶玉兰, 熊华, 等. 酶法催化制备酥油基母乳脂肪替代脂[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 74-85.
CHEN F, YE Y L, XIONG H, et al. Preparation of butter-based breast milk fat substitute by enzymatic catalysis[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(9): 74-85.
- [11] 高亮, 余旭伟, 邹凤, 等. 酶法合成 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯结构脂的研究[J]. *中国油脂*, 2020, 45(8): 66-70.
GAO L, YU X W, ZOU F, et al. Enzymatic synthesis of structured lipids rich in 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleylglycerol[J]. *China Oils and Fats*, 2020, 45(8): 66-70.
- [12] 程昕祎. 高相似性母乳替代脂的制备及评价[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
CHENG X Y. Preparation and evaluation of high similarity human milk fat substitutes. [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [13] JENNINGS B H, AKOH C C. Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1999, 76(10): 1133-1137.
- [14] SAWITREE M, PONGRUMPA S, MUENDUEN P. Influences of operating conditions on biocatalytic activity and reusability of Novozym 435 for esterification of free fatty acids with short-chain alcohols: A case study of palm fatty acid distillate[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2015, 23(11): 1851-1856.
- [15] DUAN Z Q, DU W, LIU D H. The solvent influence on the positional selectivity of Novozym 435 during 1,3-diolein synthesis by esterification[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(7): 2568-2571.
- [16] KUMAR S S, ARORA N, BHATNAGAR R, et al. Kinetic modulation of *Trichosporon asahii* MSR 54 lipase in presence of organic solvents: Altered fatty acid specificity and reversal of enantio selectivity during hydrolytic reactions[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 59(1/2/3): 41-46.
- [17] 祝雨筱, 王盈盈, 金青哲, 等. 酶法合成 1,2-甘油二酯的工艺研究[J]. *中国油脂*, 2017, 42(1): 56-59.
ZHU Y X, WANG Y Y, JIN Q Z, et al. Enzymatic synthesis of 1,2-diacylglyceride[J]. *China Oils and Fats*, 2017, 42(1): 56-59.
- [18] 张玮玮, 杨慧霞. 基于界面活化的脂肪酶固定化方法研究进展[J]. *化学研究与应用*, 2017, 29(12): 1785-1790.
ZHANG W W, YANG H X. Research progress on interfacial activation-based lipase immobilization[J]. *Chemical Research and Application*, 2017, 29(12): 1785-1790.
- [19] CHANG M Y, CHAN E S, SONG C P. Biodiesel production catalysed by low-cost liquid enzyme Eversa® Transform 2.0: Effect of free fatty acid content

- on lipase methanol tolerance and kinetic model[J]. Fuel, 2021, 283: 119266.
- [20] 曹茜, 冯凤琴. 微生物脂肪酶的研究进展及其在食品中的应用[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 136-143.
- CAO X, FENG F Q. Review of microbial lipases and their applications in food[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(10): 136-143.
- [21] 陈必强. 脂肪酶固定化及其在化学品合成中的应用[D]. 北京: 北京化工大学, 2008.
- CHEN B Q. Lipase immobilization and its application in the synthesis of chemicals[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2008.
- [22] 张宏迪, 辛嘉英, 孙立瑞, 等. 非水相脂肪酶催化氟比洛芬维 C 酯的合成及条件优化[J]. 分子催化, 2019, 33(4): 323-330.
- ZHANG H D, XIN J L, SUN L R, et al. Lipase-catalyzed synthesis of flurbiprofen VC ester[J]. Journal of Molecular Catalysis (China), 2019, 33(4): 323-330.
- [23] 张颖. 菜籽油脱臭馏出物酶法酯交换制备脂肪酸甲酯[J]. 中国油脂, 2020, 45(10): 84-86, 114.
- ZHANG Y. Preparation of fatty acid methyl ester by enzymatic transesterification using rapeseed oil deodorized distillate[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(10): 84-86, 114.
- [24] 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, 2017, 66(1): 218-227.
- [25] 潘志杰, 陈小娥, 王卫飞, 等. 脂肪酶催化鱼油醇解富集 EPA 和 DHA 的研究[J]. 农业机械, 2012(3): 40-43.
- PAN Z J, CHEN X E, WANG W F, et al. Concentration of EPA and DHA by lipase-catalyzed fish oil ethanolysis[J]. Farm Machinery, 2012(3): 40-43.

Preparation of Glycerides Rich in n-3 PUFAs by Lipase-catalyzed Alcoholysis

Jiang Cong, Chen Ye, Jin Wenhua, Wang Xiaosan*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu)

Abstract n-3 PUFAs have various physiological activities, but their contents in natural oils are usually low. This study investigated the preparation of glycerides rich in n-3 PUFAs by Eversa Transform 2.0 (ET 2.0)-catalyzed alcoholysis of fish oil. The results showed that the ET 2.0 from *Aspergillus oryzae* could effectively identify n-3 PUFAs during alcoholysis. Saturated fatty acids and monounsaturated fatty acids were released from fish oil by ET 2.0-catalyzed alcoholysis, causing the production of n-3 PUFA-enriched glycerides. Under optimal conditions (1.6:1 of mass ratio of methanol to algal oil, 40% methanol aqueous solution, 4% ET 2.0 dosage, 35 °C, 2 h), the n-3 PUFA content in glyceride increased from the initial 39.88% to 67.87%, the content of EPA and DHA increased from 36.61% to 65.22%, and the yield of n-3 PUFAs was 56.33%. When tuna oil and algal oil were used as substrate, the content of n-3 PUFAs in tuna oil glycerides increased from 38.81% to 61.35%, and the content of n-3 PUFAs in algae oil glycerides increased from 45.96% rose to 64.09%. The n-3 PUFAs-enriched glycerides obtained by the above method have great application potential in the food and pharmaceutical industries.

Keywords glycerides rich in n-3 PUFAs; fish oil; n-3 polyunsaturated fatty acids; lipase; alcoholysis