



赵泽鑫,周灵,韩美玲,等. 结构脂质的酶法合成及应用酶工程提高其合成效果的研究进展[J]. 轻工学报, 2024,39(1):1-11.
ZHAO Z X,ZHOU L,HAN M L,et al. Research progress in enzymatic synthesis of structured lipids and improvement of the synthetic effect by enzyme engineering[J]. Journal of Light Industry,2024,39(1):1-11.
DOI:10.12187/2024.01.001

结构脂质的酶法合成及应用酶工程提高其合成效果的研究进展

赵泽鑫,周灵,韩美玲,许源,蔡俊

湖北工业大学 生物工程与食品学院/发酵工程教育部重点实验室/工业发酵湖北省协同创新中心/工业微生物湖北省重点实验室,湖北 武汉 430068

摘要: 基于利用脂肪酶对天然油脂进行改性生成结构脂质 (Structured Lipids, SLs) 可赋予油脂额外的健康属性,有效提高产品附加值,对近期报道的各类 SLs 酶法合成及通过酶工程技术(结构设计和固定化)提升合成效果的研究进行综述,认为,使用 *sn*-1,3 位置专一性脂肪酶可精准合成 SLs,利用分段变温反应、超临界流体反应、真空反应、超声波辅助等途径可有效抑制酰基转移,从而提高产物得率;脂肪酶的结构设计可提高其催化效率、稳定性和底物专一性,使 SLs 的合成效率和得率有所提升;固定化脂肪酶技术也能提高脂肪酶的反应活性和稳定性,增强其重复利用性,降低 SLs 酶法合成的成本。未来应针对不同 SLs 的结构特点,通过结构设计获得高活性、高稳定性和专一性的酶分子,结合新型固定化技术创制高性能酶制剂,以期为高效、精准的 SLs 酶法合成工艺的创新发展提供参考。

关键词: 结构脂质;脂肪酶;酶法合成;酶工程;结构设计;固定化

中图分类号: TS221 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2024)01-0001-11

0 引言

结构脂质 (Structured Lipids, SLs) 是通过化学法或酶法重构天然油脂甘油骨架上脂肪酸组成和 (或) 分布而获得的具有特定分子结构的功能性油脂,除具有供能作用外,还具有抑制脂肪积累、降低血清胆固醇和血脂水平、提高免疫力等生理功能^[1]。在烹饪或食品加工过程中,使用 SLs 代替传统膳食油脂既不会改变食品原有口感和风味,同时

还能预防和改善因过量摄入油脂而引发的慢性疾病^[2]。因此,SLs 的推广使用符合“全面推进健康中国建设”重大决策部署的要求^[3]。SLs 天然存在于生物体中,但因其含量较低且难以与理化性质接近的油脂成分分离,故必须通过人工合成才能大量获得^[4]。然而,人工合成 SLs 时需要甘油酯骨架进行选择修饰,导致无专一性的化学合成法难以满足高品质 SLs 产品制备的需求^[5]。

酶法合成具有专一性强、催化效率高、环境友好

收稿日期:2023-08-26;修回日期:2023-10-12;出版日期:2024-02-15

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(32302019);湖北省教育厅科技攻关计划青年人才项目(Q20266407)

作者简介:赵泽鑫(1991—),男,湖南省郴州市人,湖北工业大学讲师,博士,主要研究方向为酶工程、生物转化。E-mail:zx_zhao@hbut.edu.cn

通信作者:蔡俊(1968—),男,湖北省孝感市人,湖北工业大学教授,博士,主要研究方向为发酵过程优化与放大、生物可再生资源的微生物转化。E-mail:hgdcailun@hbut.edu.cn

等优势,符合绿色工业发展的趋势,更适合 SLs 这类具有特定化学结构的物质的制备^[6]。脂肪酶(Lipase, EC 3. 1. 1. 3)是一种存在于动植物和微生物中的生物催化剂,除在水相体系中具有脂解活性外,还能在非水相体系中催化酯合成、转酯化、醇解、酸解等反应,被广泛应用于油脂改性^[7-9]。尽管已有研究^[10]表明,天然脂肪酶能用于合成 SLs,但其存在稳定性较差、活力较低、反应周期较长、与反应体系兼容性较差(底/产物抑制、pH 适用范围窄、传质受阻)等问题,限制了其工业化应用。因此,通过酶工程技术强化酶分子的性能,提高其催化效率、稳定性、重复利用性等是推进酶法合成 SLs 工业化实践的关键。本文拟系统综述 SLs 的酶法合成及包括结构设计和固定化在内的酶工程技术在酶法合成 SLs 中的应用现状,以期为进一步拓展酶工程技术在 SLs 合成中的应用研究提供思路和参考。

1 SLs 的酶法合成

目前,备受业界关注的 SLs 主要有人乳脂替代品(Human Milk Fat Substitutes, HMFS)、中-长-中(Medium-Long-Medium, MLM)型甘油三酯(Triacylglycerol, TAG)、甘油二酯(Diacylglycerol, DAG)、结构磷脂(Structured Phospholipids, SPLs)等^[11-12]。有研究^[13]发现,只有对甘油骨架特定位置脂肪酸进行专一性修饰才能得到 SLs,按照位置专一性可将脂肪酶分为无位置专一性脂肪酶和 *sn*-1,3 位置专一性脂肪酶,而 *sn*-2 位置专一性脂肪酶尚未被发现。因此,使用 *sn*-1,3 位置专一性脂肪酶对甘油酯进行修饰是目前最常用的 SLs 酶法合成途径之一^[12]。

1.1 HMFS

HMFS 是一种模拟人乳脂脂肪酸组成及其位置分布的 TAG 混合物,其主要结构特征为甘油骨架 *sn*-2 位结合的脂肪酸是饱和脂肪酸(如棕榈酸)而 *sn*-1,3 位结合的脂肪酸是不饱和脂肪酸(如油酸、亚油酸等),因具有促进脂肪酸吸收、缓解便秘等功效,已被用于婴幼儿配方奶粉及特医食品中^[14-15]。目前,常用于合成 HMFS 的商品化 *sn*-1,3 位置专一性脂肪酶有 Lipozyme RM IM、Lipozyme TL IM 和 Novozyme 435^[16-19]。如肖乾焯等^[20]研究发现,脂肪

酶 Lipozyme RM IM 可催化酸解三棕榈酸甘油酯合成 HMFS,且产物中 *sn*-2 位棕榈酸含量高达 94.51%,*sn*-1,3 位油酸含量约为 70%。再如熊志琴等^[21]采用两步法,即先利用脂肪酶 Novozyme 435 通过酸解反应制备 *sn*-2 位富含棕榈酸的 TAG,再使用脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化 TAG 与鱼油酯交换合成 HMFS,目标产物的纯度可达 95%,其中多不饱和脂肪酸含量为 23%,而 *sn*-2 位棕榈酸的相对含量达 66.92%。此外,通过基因挖掘得到来源于 *Aspergillus oryzae*、*Rhizomucor miehei*、*Candida parapsilosis*、猪胰脏等的脂肪酶也表现出较好的 HFMS 合成效果^[22-24],其中来源于 *R. miehei* 的脂肪酶,在转化三棕榈酰甘油酯合成 OPO 结构脂时,产物 *sn*-2 位棕榈酸含量高达 93%,极具应用前景^[23]。

1.2 MLM 型 TAG

MLM 型 TAG 的甘油骨架 *sn*-1,3 位置为中链脂肪酸(C_6-C_{12}),而 *sn*-2 位置为长链脂肪酸($C_{12}-C_{24}$),热值低,具有控制肥胖、改善脂肪吸收不良及其他代谢紊乱等功能^[25]。B. H. Jennings 等^[26]研究发现,辛酸-油酸-辛酸 MLM 型 TAG 可用于替代传统膳食油脂进行食物烹饪,且不影响食品原有口感和风味。MLM 型 TAG 与 HMFS 的合成原理类似,也分为酸解法、酯化法和两步法。其中,酸解法因原料来源广泛且产物易与游离脂肪酸分离而应用较广,但该方法脂肪酸插入的准确率偏低^[27-29]。H. B. Jadhav 等^[30]利用超声辐射辅助脂肪酶 Novozyme 435 催化亚麻籽油和癸酸酸解合成 MLM 型 TAG 的产率高达 96%,与无辅助体系相比提升了 4 倍以上,为高效、精确合成 MLM 型 TAG 提供了思路。此外,两步法也能提高脂肪酸插入的准确率,如 R. Morales-Medina 等^[31]先使用脂肪酶 Novozyme 435 催化甘油和辛酸酯化生成 DAG,再在己烷的参与下,与从鱼油中提取的长链脂肪酸反应生成 MLM 型 TAG,与一步酯化法相比,该方法使 SLs 合成准确率提升了 72%。

1.3 DAG

DAG 是由羟基替代 TAG 中的一个酰基所形成的,天然存在于植物油中,但含量非常低,且不易与 TAG 分离^[32]。高纯度(>40%)的 DAG 具有降低血

清胆固醇和血脂水平、控制体重增长、调节血糖等生理功能,是备受青睐的传统膳食油脂替代品^[33-35]。DAG的酶法合成包括部分水解、甘油解、酯交换和酯化4种反应模式。其中,部分水解以TAG为底物,DAG的得率和纯度均较低,还需进一步分离纯化^[36];酯交换以单甘酯(MAG)为底物,原料成本过高,不适合大规模生产^[37];而甘油解合成的DAG纯度通常为50%~85%,工艺相对简单^[38]。B. L. A. P. Devi等^[34]在减压条件下使用脂肪酶Lipozyme RM IM催化葵花籽油和米糠油进行甘油解合成DAG的产率为84%。*sn*-1,3位置专一性脂肪酶能催化甘油和脂肪酸直接酯化合成DAG,产物(主要为1,3-DAG)得率达85%以上^[39]。如X. Meng等^[40]采用固定化脂肪酶M(*Mucor javanicus* lipase)催化系列脂肪酸与甘油发生酯化反应,产物中DAG的纯度和产率均大于90%。由此可见,甘油解和酯化是较具潜力的高纯度DAG合成方式。

HMFS型TAG、MLM型TAG、*sn*-1,3 DAG等SLs都具有对称结构,其酶法合成过程中会伴随酰基转移,从而打乱甘油骨架上脂肪酸的位置分布。抑制酰基转移是进一步提高此类SLs精准合成的关键。T. Yang等^[41]通过变动反应温度抑制三棕榈酸解反应过程中酰基转移的发生来减少副产物的生成,与恒温反应相比,该方法的酰基转移率降低了61%;I. H. Kim等^[42]尝试在超临界CO₂的环境中进行玉米油和辛酸的酸解反应来合成MLM型TAG,此方法使产物中 β 位辛酸从无溶剂体系中的18.0 mol%下降至9.4 mol%,有效减少了副产物的含量;N. J. Zhong等^[43]在真空驱动空气/氮气鼓泡反应器中进行脂肪酸与甘油的酯化反应来合成1,3-DAG,该体系能提高传质并加快水分去除速度,有效抑制酰基转移,推动反应向酯化方向进行,提高产物得率。此外,超声波辅助反应可增强传质,提高底物与脂肪酶接触的几率,从而加强催化效果,缩短反应时间,在提高反应效率的同时减少酰基转移发生,最终提高SLs产率^[30,44-45]。因此,分段变温反应、超临界流体反应、真空反应、超声波辅助等都能通过抑制酰基转移来提高此类SLs的酶法合成效果。

使用*sn*-1,3位置专一性脂肪酶合成上述SLs,

一般需要对甘油骨架外侧两个位置进行修饰才能得到目标产物,在这个过程中容易积累单一位置修饰的副产物,从而导致产物纯度不高。如能筛选挖掘获得高活性 β 位置专一性脂肪酶,则可对TAG甘油骨架唯一的*sn*-2位置进行专一性修饰,减少反应步骤,有效缓解副产物积累,高效、准确地生成TAG型SLs。

1.4 SPLs

磷酸甘油酯是细胞膜的主要组成成分,其结构以3-磷酸甘油为骨架,其中*sn*-1,2位置连接脂肪酸,而磷酸基团与其他小分子酯化相连。SPLs是通过修饰天然磷脂甘油骨架上*sn*-1,2位的脂肪酸或与磷酸基团连接的酰基获得的,包括磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰醇胺、磷脂酰甘油等,具有调节机体新陈代谢和辅助机体修复生物膜损伤的功效^[46-47],其作为乳化剂、稳定剂和抗氧化剂已被广泛应用于食品、制药、化妆品等行业^[46]。因涉及与磷酸连接基团的置换,SPLs的酶法合成除了能使用对甘油骨架*sn*-1,2位进行修饰的脂肪酶和磷脂酶B外,还可使用磷脂酶C和D^[48-51]。M. Okulus等^[52]利用脂肪酶Novozyme 435催化磷脂酰胆碱和3-甲氧基肉桂酸进行酯交换合成SPLs,产率可达48%;张芹等^[53]和廖妙飞等^[54]以卵磷脂为底物、磷脂酶D为催化剂,合成了磷脂酰丝氨酸,产物得率均超过85%。目前,有关利用磷脂酶B合成SPLs的研究较少,其主要原因是大多数磷脂酶B的结构信息和催化机制尚不清楚,阻碍了磷脂酶B在SPLs生产中的应用^[55]。而磷脂酶C介导的反应易形成甘油酯副产物,因此也不适合SPLs的合成^[47]。

1.5 其他SLs

除上述SLs外,MAG、酚类结构脂、糖酯、神经酰胺酯、类可可脂、长-中-长(Long-Medium-Long, LML)型TAG等也可通过酶法合成^[40]。Z. X. Huang等^[56]以棕榈中间馏分和硬脂酸共混物为底物,使用脂肪酶Lipozyme RM IM发生酯交换反应合成类可可脂,产品中脂肪酸的组成与天然可可脂一致,产率超过92%;W. S. Lian等^[57]采用*Thermomyces lanuginosus*脂肪酶固定化形式催化三辛酸甘油酯和亚油酸乙酯的转酯化反应合成LML型TAG,产物中中长

链结构脂含量达 85.24 mol%, 其中 LML 型 TAG 占 97.00 mol%。随着研究的不断深入, 功能性 SLs 的种类还会继续增加, 只有不断丰富生物酶工具, 完善相应的合成工艺, 才能满足各类 SLs 精准合成的需求。

2 脂肪酶结构设计对 SLs 合成效果的影响

脂肪酶的生化性质对其催化 SLs 合成具有重要影响, 通过结构设计可强化脂肪酶的性能, 提升酶法合成 SLs 的效果。J. H. Zhang 等^[58]设计了 *R. miehei* 脂肪酶的突变体 Asp256Ile/His257Leu, 其酯化活力提高了 2.37 倍, 催化三棕榈酸甘油酯及棕榈油与油酸酯交换的速率分别提高了 1.82 倍和 1.65 倍; L. L. Li 等^[59]对 *Malassezia globose* 脂肪酶进行定点突变, 构建了含有 5 个突变位点和 1 个额外二硫键的突变体, 其热稳定性显著提高, 催化油酸和甘油进行酯化反应合成 DAG, 产率提高了 9.1%; J. M. Woo 等^[60]设计了 *C. antarctica* 脂肪酶 B 的突变体 A282E/I285F, 其对正壬酸的选择性提高了 2 倍, 更有利于合成含中链 1-MAG。截至 2023 年 8 月, 已有 4712 个脂肪酶晶体结构被解析, 其空间结构(具有 α/β 水解酶折叠形式, 多数分为催化核心区 and 盖子区)和催化元件(空间上高度保守的 Ser-His-Asp 催化三联体和氧负离子洞)的特征也得到了揭示^[61], 这为其结构与功能关系的解析及基于结构信息的设计打下了坚实的基础。

2.1 催化效率

提升脂肪酶催化效率的策略主要有以下 3 种: 1) 增强脂肪酶与底物间的相互作用; 2) 降低反应的活化能; 3) 加快反应产物的释放。如在 *Bacillus thermocatenuatus* 脂肪酶的盖子区域, 利用疏水残基取代亲水残基得到的突变体 Y225F/S232A 与底物间的疏水相互作用增强, 其活性增强了约 35%^[62]。因此, 根据底物结合构象对脂肪酶结构进行设计, 可进一步强化底物与脂肪酶的相互作用, 提高脂肪酶活力。通过设计脂肪酶活性中心附近残基来调节酶与底物活性基团的距离, 可起到调控反应活化能的作用, 进而影响反应效率。*Pyrobaculum calidifontis* 脂肪酶在催化过水解反应时, 底物 H_2O_2 会与 Y21

和 H144 形成氢键, 若分别将 Y21 和 H144 突变为无极性但位阻接近的苯丙氨酸和色氨酸后, 底物 H_2O_2 与脂肪酶的联系减弱, 亲核进攻酰酶复合物中间产物的距离变长, 反应能垒提高, 催化效率大幅降低^[63]。*Geobacillus sp.* 12AMOR1 甘油单酯脂肪酶催化单月桂酸酯水解时, 产物脂肪酸与其释放路径中的 L128、L142 等多个残基存在疏水相互作用, 阻碍了其从催化活性中心释放, 而作用力减弱的突变体 L128A 和 L142A 的活力显著提高^[64], 这表明加速底物的释放也能有效提高脂肪酶的催化效率。此外, 脂肪酶催化活性区的构象稳定性、界面吸附能力等因素也可影响脂肪酶的催化活性^[62, 65], 对这些因素的调控也是提高脂肪酶活性的可行思路。

2.2 稳定性

在反应过程中, 脂肪酶因空间结构发生变性而失活。通过增加脂肪酶内部的相互作用, 稳定柔性较大的局部结构(主要分布在 N 末端、C 末端、盖子等区域), 在热力学上提高蛋白质变性的难度, 是增强脂肪酶稳定性的主要策略。在脂肪酶中引入具有较高键能的共价键能有效提高其结构稳定性。如通过蛋白质结构分析、晶体结构 B 因子分析、分子模拟等方法确定脂肪酶柔性较大的局部结构, 以定点突变的方式引入二硫键, 可使脂肪酶的稳定性大幅提升^[66-70]。此外, 增强高柔性区域之内或之间残基的非共价键(如氢键、盐桥、 $\pi-\pi$ 堆积相互作用等)也能有效增强脂肪酶的稳定性。如在 *Yarrowia lipolytica* 脂肪酶 Lip2 中, 利用脯氨酸替换位于高柔性区 G207—K221 的 V213, 通过形成更多的分子内氢键稳定蛋白质的整体构象, 使突变体 V213P 比野生型在 50 °C 下的半衰期延长了约 70%^[71]; 在 *Stenotrophomonas maltophilia* 脂肪酶高灵活区域, 以在 G165 与 F36 之间引入盐桥的方式模拟氢键网络, 所构建突变体 G165 D/F36R 的最适温度从 35 °C 增加至 90 °C^[72]; 在 *G. stearothermophilus* 脂肪酶 T6 的 L350 与 H359 之间引入 $\pi-\pi$ 堆积相互作用, 所得突变体 L360F 的稳定性为野生型的 81.2 倍^[73]。

2.3 底物专一性

2.3.1 脂肪酸专一性

对于具有特定脂肪酸组成的 SLs, 与脂肪酶相适应的脂肪酸专一性是决定 SLs

能否精准合成的关键因素之一。目前,脂肪酶中脂肪酸专一性的强化主要是通过重塑底物口袋几何外形以适配底物的结合构象来实现,如 *C. antarctica* 脂肪酶 A (CALA) 的突变体 T221 H、I301 H 等,可使其酰基结合通道的某一区域变狭窄,只能让构象笔直的反式脂肪酸和饱和脂肪酸进入,而形态弯折的顺式脂肪酸不能进入,从而使 CALA 对部分氢化植物油中的反式脂肪酸和饱和脂肪酸的专一性显著提升^[74]; 而将 *Burkholderia cepacia* KWI-56 脂肪酶酰基结合通道入口扩宽的突变体 F119A/L167 M,可提高其对长链底物的专一性^[75]。此外,增强脂肪酶与底物之间的相互作用,从而提高底物结合的稳定性,也可实现脂肪酸专一性的改造。C. C. Yen 等^[76]对 *C. rugosa* LIP2 底物结合位点上的残基 G450 进行特异性饱和和诱变,所得突变体 G450A 与底物之间的疏水相互作用得到增强,对短链甘油三酯的催化活性比野生型增强了 5 倍; 在 CALA 酰基结合通道末端设计突变体 G237 L/V/Y, 缩短通道的长度,可提高脂肪酶结合长链脂肪酸的难度,并使其对中链脂肪酸的催化活性增强^[77]。由此可见,依据底物结合模式,在脂肪酶底物结合口袋构建突变体,是强化其对脂肪酸专一性的有效策略。

2.3.2 位置专一性 脂肪酶的位置专一性是决定 SLs 精准合成的另一关键因素。因尚未获得 *sn*-2 位置专一性脂肪酶,目前 SLs 的合成主要是通过 *sn*-1,3 位置专一性酶对天然油脂 *sn*-1,3 位脂肪酸进行修饰来实现的^[78]。脂肪酶的位置专一性可通过结构设计来调控。Z. X. Zhao 等^[79]通过晶体结构解析、分子建模和诱变实验构建了 *Streptomyces* sp. W007 脂肪酶 MAS1 的突变体 G40E、N45Y、H108W、T237Y 等,这些突变体底物结合口袋中 TAG 非活性羰基结合位点的空间位阻均有所增加,促使非特异性 MAS1 转变为 *sn*-1,3 位置专一性脂肪酶。Y. Z. Cai 等^[80]对 *Penicillium expansum* 脂肪酶的 C 末端无序结构进行同源替换和定点突变,所构建的突变体 loopAO 和 M234F 使底物结合口袋中的结合空间显著缩小,使得催化三辛酸甘油酯水解的产物中 1,2-二辛酸甘油酯和 1,3-二辛酸甘油酯的物质的量比值从 1.01 分别增加至 25.57 和 8.57,表现出明显的

sn-1,3 位置专一性。这些研究成果为脂肪酶位置专一性的调控提供了坚实的理论基础,但探索 *sn*-2 位置专一性脂肪酶的调控策略依然是该领域的重大挑战。

3 脂肪酶固定化对 SLs 合成效果的影响

在 SLs 的酶法合成中,游离脂肪酶易变性失活且不易回收,致使酶法合成 SLs 成本高昂。固定化是指通过特定的物理或化学方法将脂肪酶限制于特定区域内的方法,可提高脂肪酶的活性和稳定性,有效增强其可重复利用性,降低成本^[81-83]。目前,脂肪酶的固定化方法主要包括物理吸附、包埋、共价结合和交联这 4 种基本方法。

3.1 物理吸附固定化

物理吸附固定化是指通过氢键、离子键、疏水作用力、范德华力等非共价相互作用将脂肪酶与载体进行结合的方法^[84-85]。目前,固定脂肪酶的载体有极性/非极性吸附树脂、硅藻土等材料,且此类固定化脂肪酶(如树脂 NKA-9 吸附脂肪酶 CALA、树脂 Amberlite XAD1180 吸附脂肪酶 MAS1-H108A 和硅藻土吸附 *R. oryzae* 脂肪酶)已成功应用于 DAG(产率 64.37%)、富含 *n*-3 PUFA 的 TAG(甘油解反应和酯化反应产物的产率分别达到 92.07% 和 76.13%)、MLM 型 TAG(*sn*-2 位插入率高达 41.53%)等 SLs 的合成^[86-88]。但由于脂肪酶与载体的相互作用力较弱,导致物理吸附固定化中的催化过程易发生解吸附^[89]。在已有研究^[86,90]中,物理吸附固定的脂肪酶经历 10 次循环利用后,难以保持 50% 以上的初始酶活力。基于此,物理吸附与包埋联用法被提出,该方法利用包埋材料对脂肪酶的固定作用进一步加强载体对脂肪酶的固定能力。X. Y. Cai 等^[91]将 *C. antarctic* 脂肪酶 B (CALB) 包埋在沸石咪唑骨架上,通过物理吸附与大孔树脂键合,所得固定化酶重复利用 10 次后仍保留了 84.2% 的初始酶活力。物理吸附的载体成本低、固定工艺简单、条件温和,与包埋联用可有效增强载体对脂肪酶的固定能力,降低解吸附发生的概率。

3.2 包埋固定化

包埋固定化是将脂肪酶限制在载体材料所形成

的网格中,从而实现固定脂肪酶的方法,该方法对脂肪酶的天然结构基本无影响^[92]。E. Akil 等^[93]使用壳聚糖-海藻酸盐珠包埋 *Yarrowia lipolytica* 脂肪酶,固定化效率达 96.8%,可用于催化 MLM 型 TAG 的合成。包埋对脂肪酶的固定化效率较高,但过小的网格孔径会影响底物与脂肪酶的接触,影响催化效率。W. Y. Chen 等^[94]将 CALB 包埋在鸟嘌呤核苷酸和金属离子构建的配位中,但由于底物传质受阻,在催化甘油解反应时表现出较低的酶活力。通过调节网格孔径降低传质阻力是提升包埋固定的脂肪酶催化效率的有效方法,M. M. Li 等^[95]采用 2,5-二(丁烯氧基)对苯二甲酰肼制备共价有机骨架,并用于包埋过氧化氢酶,发现优化网格孔径可有效改善传质能力,提高固定化脂肪酶的催化效率。

3.3 共价结合固定化

共价结合是指通过载体材料表面官能团(如氨基、羧基、羟基、羟甲基等)与脂肪酶基团(如赖氨酸的 ϵ -氨基、半胱氨酸的硫醇基团、天冬氨酸和谷氨酸的羧基等)形成的共价键将脂肪酶固定于载体上的方法^[96-98]。由于共价键的键能较强,共价结合固定的脂肪酶不易脱落,有利于重复利用过程中脂肪酶的保留^[98]。X. X. Li 等^[99]在催化甘油和油酸的酯化反应研究中发现,与游离酶相比,使用树脂 ECR8285 共价结合 *Malassezia globosa* 脂肪酶表现出更好的热稳定性和更高的酯化率(DAG 和 MAG 产率均为 79%),固定化酶经历 6 次循环重复利用后,仍可保持 99% 的初始酶活力。但共价结合的反应条件剧烈,易导致脂肪酶蛋白的高级结构发生变化,从而使脂肪酶活性发生变化,反应效率降低^[100]。T. Bavaro 等^[101]研究发现,分别使用 EC-HFA 和 EC-EP(产自 Resindion Srl 公司)共价结合 *Pseudomonas cepacian* 脂肪酶,酶活回收率分别约为 7.1% 和 1.9%。在固定脂肪酶时,通过界面活化的方式将脂肪酶的盖子结构打开,以此共价结合固定的脂肪酶其活力更高。J. F. Zhao 等^[102]使用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷和戊二醛对纳米 Fe_3O_4 进行改性,并以蔗糖酯-11 为表面活性剂进行界面活化,将 *R. oryzae* 脂肪酶固定在载体上,在该固定化脂肪酶催化的酯化反应中,1, 3-DAG 的产率达到 76%,酯化

活性约为游离脂肪酶的 1.5 倍。

3.4 交联固定化

交联固定化(也称为无载体交联)是指以双官能或多官能化合物为交联剂交联脂肪酶,建立稳定的化学键,从而形成稳定性较强的无载体大颗粒脂肪酶的方法^[97]。但酶分子的堆叠导致被包埋部分难以与底物接触,固定化的酶活性回收率较低^[97]。因此,该方法一般作为其他脂肪酶固定化方法的辅助手段,以进一步提高固定化酶的稳定性。W. L. Xie 等^[103]采用交联-共价固定法,以戊二醛为交联剂交联 *C. rugosa* 脂肪酶,随后共价结合于 3-氨基丙基功能化的磁性核壳纳米复合材料上以合成固定化脂肪酶,并用其催化以猪油和大豆油混合物为底物的酯化反应,产物中不同种类 TAG 的含量均发生变化,循环利用 4 次后,催化活性没有明显损失,可重复利用性明显优于未交联固定化酶。

4 结论与展望

本文梳理了酶法合成 SLs 技术的研究进展,综述了各类 SLs 的酶法合成方法,以及如何通过酶工程技术提升产物得率,指出了脂肪酶催化活性、稳定性和底物专一性是决定 SLs 酶法合成效果的关键因素,通过对脂肪酶结构的设计可实现上述性能的提高,增强 SLs 的合成效率和精准性,同时脂肪酶的固定化也能提升其稳定性和可重复利用性,有效降低 SLs 酶法合成的成本。在酶促反应过程中,自发的酰基转移作用是 SLs 产率进一步提高的重要原因,通过分段变温反应、超临界流体反应、真空反应、超声波辅助等途径可抑制酰基转移,在 SLs 酶法合成中具有较大的应用潜力。对于结构磷脂,除脂肪酶外,还可使用磷脂酶 B、C 和 D 对天然磷脂进行修饰合成 SLs。只有不断丰富生物酶工具,完善相应的合成工艺,才能满足更多类型 SLs 的酶法合成需要。脂肪酶的结构设计是创制高性能 SLs 合成使用酶制剂的基础,增强脂肪酶与底物间的相互作用、降低反应的活化能及加快反应产物的释放是提高脂肪酶反应活性的常用策略,而增加脂肪酶内部的相互作用、稳定柔性较大的局部结构及在热力学上提高蛋白质的变性难度,则可用于脂肪酶稳定性的提升,重塑脂

肪酶底物的结合口袋,使其更适应于特定 SLs 合成的需要,这也是脂肪酶设计领域关注的重点。脂肪酶的固定化包括物理吸附、包埋、共价结合和交联 4 种方法,选择合适的固定化载体和方法可有效延长脂肪酶的使用周期,增强其可重复利用性。未来 SLs 酶法合成领域将聚焦高活性、鲁棒性和底物专一性酶制剂的创制,完善 SLs 酶法合成反应体系,开发相应的工业化生产设备,以期 SLs 酶法合成技术和工艺的发展提供研究基础。

参考文献:

- [1] ZAM W. Structured lipids: Methods of production, commercial products and nutraceutical characteristics [J]. *Progress in Nutrition*, 2015, 17(3): 198–213.
- [2] 李亚,时杰,黄凤洪. 酶催化法制备新型结构脂质研究进展[J]. *生物产业技术*, 2019(4): 42–47.
- [3] 中国共产党中央委员会,中华人民共和国国务院. “健康中国 2030”规划纲要[EB/OL]. (2016–10–25) [2023–06–25]. https://www.gov.cn/zhengce/2016-10/25/content_5124174.htm.
- [4] GUO Y L, CAI Z X, XIE Y P, et al. Synthesis, physicochemical properties, and health aspects of structured lipids: A review [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(2): 759–800.
- [5] ARAB-TEHRANY E, JACQUOT M, GAIANI C, et al. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, 25(1): 24–33.
- [6] KIM J, CHUNG M Y, CHOI H D, et al. Enzymatic synthesis of structured monogalactosyl diacylglycerols enriched in pinolenic acid [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(30): 8079–8085.
- [7] HE Y J, QIU C Y, GUO Z, et al. Production of new human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis of microalgae oils from *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 238: 129–138.
- [8] MA G J, DAI L M, LIU D H, et al. Lipase-mediated selective methanolysis of fish oil for biodiesel production and polyunsaturated fatty acid enrichment [J]. *Energy & Fuels*, 2018, 32(7): 7630–7635.
- [9] CAO X, MANGAS-SÁNCHEZ J, FENG F Q, et al. Acyl migration in enzymatic interesterification of triacylglycerols: Effects of lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizopus oryzae*, support material, and water activity [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2016, 118(10): 1579–1587.
- [10] 万思迪. 疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶热稳定性和催化功能的理性设计研究[D]. 昆明: 云南师范大学, 2022.
- [11] KIM B H, AKOH C C. Recent research trends on the enzymatic synthesis of structured lipids [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(8): C1713–C1724.
- [12] ZHOU J, LEE Y Y, MAO Y L, et al. Future of structured lipids: Enzymatic synthesis and their new applications in food systems [J]. *Foods*, 2022, 11(16): 2400.
- [13] ROGALSKA E, CUDREY C, FERRATO F, et al. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases [J]. *Chirality*, 1993, 5(1): 24–30.
- [14] WEI W, JIN Q Z, WANG X G. Human milk fat substitutes: Past achievements and current trends [J]. *Progress in Lipid Research*, 2019, 74: 69–86.
- [15] LIU Z Q, DAI L M, LIU D H, et al. Progress and perspectives of enzymatic preparation of human milk fat substitutes [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 118.
- [16] HASIBUAN H A. The synthesis of *sn*-2 palmitate as human milk fat substitute from palm oil fractions by enzymatic interesterification: A review [J]. *Journal of Oil Palm Research*, 2022, 34(4): 608–621.
- [17] 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.
- [18] XIONG Z Q, PAN L J, JIANG S T, et al. Optimization of two-step lipase-catalyzed synthesis of human milk fat substitutes by response surface methodology and fatty acid composition analysis [J]. *Food Science*, 2017, 38(2): 248–254.
- [19] AGAPAY R C, JU Y H, TRAN-NGUYEN P L, et al. Process evaluation of solvent-free lipase-catalyzed esterification schemes in the synthesis of structured triglycerides from oleic and palmitic acids [J]. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 2021, 16(2): e2606.
- [20] 肖乾煌,徐雨茜,熊华,等. 溶剂和水分活度对 OPO 结构脂合成中酰基迁移的影响 [J]. *中国油脂*, 2020, 45(3): 62–67.
- [21] 熊志琴,潘丽军,姜绍通,等. 响应面试验优化两步酶法合成母乳脂替代品工艺及脂肪酸组成分析 [J]. *食品科学*, 2017, 38(2): 248–254.
- [22] LI Y, LI C, FENG F Q, et al. Synthesis of medium and long-chain triacylglycerols by enzymatic acidolysis of algal oil and lauric acid [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 136(1): 110309.
- [23] GHIDE M K, LI K, WANG J H, et al. Effective production of human milk fat substitutes rich in 1, 3-dioleoyl-2-palmitoyl glycerol (OPO) via a new strategy [J]. *Food Biophysics*, 2022, 17(4): 495–507.
- [24] TECELÃO C, PERRIER V, DUBREUCQ E, et al. Production of human milk fat substitutes by interesterification of

- tripalmitin with ethyl oleate catalyzed by *Candida parapsi-* lipase/acyltransferase [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2019, 96(7): 777-787.
- [25] UTAMA Q D, SITANGGANG A B, ADAWIYAH D R, et al. Lipase-catalyzed interesterification for the synthesis of medium-long-medium (MLM) structured lipids: A review[J]. Food Technology and Biotechnology, 2019, 57(3): 305-318.
- [26] JENNINGS B H, SHEWFELT R L, AKOH C C. Food applications of a rice bran oil structured lipid in fried sweet potato chips and an energy bar [J]. Journal of Food Quality, 2010, 33(6): 679-692.
- [27] 王博, 鞠兴荣, 周润松, 等. 大豆油和月桂酸制备 MLM 型结构脂质工艺优化及其性质分析[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 249-254.
- [28] CABALLERO E, SOTO C, OLIVARES A, et al. Potential use of avocado oil on structured lipids MLM-type production catalysed by commercial immobilised lipases [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107749.
- [29] 王强, 贺雅非, 李贵节, 等. 脂肪酶催化玉米胚芽油与辛酸制备 MLM 型结构脂质[J]. 中国食品学报, 2017, 17(1): 77-83.
- [30] JADHAV H B, GOGATE P, ANNAPURE U. Process intensification of acidolysis reaction catalysed by enzymes for synthesis of designer lipids using sonication [J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 428: 131374.
- [31] MORALES-MEDINA R, MUNIO M, GUADIX A, et al. Development of an up-grading process to produce MLM structured lipids from sardine discards [J]. Food Chemistry, 2017, 228: 634-642.
- [32] LEE Y Y, TANG T K, PHUAH E T, et al. Production, safety, health effects and applications of diacylglycerol functional oil in food systems: A review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 60(15): 2509-2525.
- [33] ANDO Y, SAITO S, YAMANAKA N, et al. Alpha linolenic acid-enriched diacylglycerol consumption enhances dietary fat oxidation in healthy subjects: A randomized double-blind controlled trial[J]. Journal of Oleo Science, 2017, 66(2): 181-185.
- [34] DEVI B L A P, GANGADHAR K N, PRASAD R B N, et al. Nutritionally enriched 1, 3-diacylglycerol-rich oil: Low calorie fat with hypolipidemic effects in rats[J]. Food Chemistry, 2018, 248: 210-216.
- [35] KIM H, CHOE J H, CHOI J H, et al. Medium-chain enriched diacylglycerol (MCE-DAG) oil decreases body fat mass in mice by increasing lipolysis and thermogenesis in adipose tissue[J]. Lipids, 2017, 52(8): 665-673.
- [36] 杨馨怡. 1,3-甘油二酯的酶法制备及其功效评价研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [37] LEE Y Y, TANG T K, PHUAH E T, et al. Production, safety, health effects and applications of diacylglycerol functional oil in food systems: A review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(15): 2509-2525.
- [38] WANG Z T, DAI L M, LIU D H, et al. Kinetics and mechanism of solvent influence on the lipase-catalyzed 1, 3-diolein synthesis[J]. ACS Omega, 2020, 5(38): 24708-24716.
- [39] 连伟帅. 甘油二酯, LML 型结构脂的酶法制备与应用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [40] MENG X, XU G, ZHOU Q L, et al. Highly efficient solvent-free synthesis of 1,3-diacylglycerols by lipase immobilised on nano-sized magnetite particles[J]. Food Chemistry, 2014, 143: 319-324.
- [41] YANG T, FRUEKILDE M B, XU X. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming [J]. Food Chemistry, 2005, 92(1): 101-107.
- [42] KIM I H, KO S N, LEE S M, et al. Production of structured lipids by lipase-catalyzed acidolysis in supercritical carbon dioxide: Effect on acyl migration [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2004, 81: 537-541.
- [43] ZHONG N J, GUI Z Y, XU L, et al. Solvent-free enzymatic synthesis of 1,3-diacylglycerols by direct esterification of glycerol with saturated fatty acids [J]. Lipids in Health and Disease, 2013, 12: 65.
- [44] LIU S L, DONG X Y, WEI F, et al. Ultrasonic pretreatment in lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with high 1, 3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol content [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 23: 100-108.
- [45] ZHANG H P, ZHENG M M, SHI J, et al. Enzymatic preparation of "functional oil" rich in feruloylated structured lipids with solvent-free ultrasound pretreatment [J]. Food Chemistry, 2018, 248: 272-278.
- [46] 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.
- [47] LI Y H, DAI L M, LIU D H, et al. Progress & prospect of enzyme-mediated structured phospholipids preparation [J]. Catalysts, 2022, 12(7): 795.
- [48] RYCHLICKA M, NIEZGODA N, GLISZCZYŃSKA A. Lipase-catalyzed acidolysis of egg-yolk phosphatidylcholine with *Citronellic acid*. new insight into synthesis of isoprenoid-phospholipids [J]. Molecules, 2018, 23(2): 314.
- [49] LIANG S H, LIU Y M, MENG Y N, et al. Two-stage enzymatic hydrolysis of soybean concentrated phospholipid to prepare glycerylphosphorylcholine: Optimized by response surface methodology [J]. Journal of Oleo Science, 2021, 70(2): 237-245.
- [50] 李珍珍, 许飞跃, 韩玉谦, 等. 超临界 CO₂ 体系中磷脂

- 酶 A2 催化合成高 DHA 含量 DHA-PC 的研究[J]. 食品工业科技,2017,38(18):85-89.
- [51] 肖志刚,杨国强,杨庆余,等. 酶法合成亚麻酸磷脂的结构特性及抗氧化性[J]. 食品科学,2020,41(22):57-63.
- [52] OKULUS M, RYCHLICKA M, GLISZCZYŃSKA A. Enzymatic production of biologically active 3-methoxycinnamoylated lysophosphatidylcholine via regioselective lipase-catalyzed acidolysis [J]. Foods,2021,11(1):7.
- [53] 张芹,孙兆敏,徐杰,等. 酶法合成富含二十二碳六烯酸的磷脂酰丝氨酸[J]. 中国食品学报,2016,16(3):81-87.
- [54] 廖妙飞,付万冬,孙继鹏,等. 富含 ω -3 多不饱和脂肪酸的磷脂酰丝氨酸制备工艺研究[J]. 渔业研究,2022,44(6):599-605.
- [55] DURRANI R. 一种来源于马尔尼菲菌 GD-0079 的耐热磷脂酶 B:生化特性和结构动力学研究[D]. 广州:华南理工大学,2020.
- [56] HUANG Z X, GUO Z W, 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]. Food Chemistry, 2021,343:128407.
- [57] LIAN W S, WANG W F, TAN C P, et al. Immobilized *Talaromyces thermophilus* lipase as an efficient catalyst for the production of LML-type structured lipids[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 42(2):321-329.
- [58] ZHANG J H, JIANG Y Y, LIN Y, et al. Structure-guided modification of *Rhizomucor miehei* lipase for production of structured lipids[J]. PLoS One,2013,8(7):e67892.
- [59] LI L L, WANG Y H, CUI R G, et al. Engineering the thermostability of the mono-and diacylglycerol lipase SMG1 for the synthesis of diacylglycerols [J]. Foods, 2022, 11(24):4069.
- [60] WOO J M, KANG Y S, LEE S M, et al. Substrate-binding site engineering of *Candida antarctica* lipase B to improve selectivity for synthesis of 1-monoacyl-sn-glycerols [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2022,27(2):234-243.
- [61] SCHRAG J D, LI Y, WU S, et al. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum* [J]. Nature, 1991,351(6329):761-764.
- [62] TANG T, YUAN C L, HWANG H T, et al. Engineering surface hydrophobicity improves activity of *Bacillus thermocatenuatus* lipase 2 enzyme [J]. Biotechnology Journal, 2015,10(11):1762-1769.
- [63] 赵泽鑫. 基于结构信息和生物计算的 MAS1 和 PCL 脂肪酶分子改造研究[D]. 广州:华南理工大学,2020.
- [64] LAN D M, LI S, TANG W, et al. Glycerol is released from a new path in MGL lipase catalytic process[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2021,62(9):2248-2256.
- [65] WANG W G, DASETTY S, SARUPRIA S, et al. Rational engineering of low temperature activity in thermoalkalophilic *Geobacillus thermocatenuatus* lipase[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021,174:108093.
- [66] HAMDAN S H, MAIANGWA J, NEZHAD N G, et al. Knotting terminal ends of mutant T1 lipase with disulfide bond improved structure rigidity and stability [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(5/6):1673-1686.
- [67] HAN Z L, HAN S Y, ZHENG S P, et al. Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 85:117-126.
- [68] LI L L, WU W K, DENG Z X, et al. Improved thermostability of lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* through disulfide bond design for preparation of medium-long-medium structured lipids [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022,166:113786.
- [69] TAMBUNAN U S F, RANDY A, PARIKESIT A A. Design of *Candida antarctica* lipase B thermostability improvement by introducing extra disulfide bond into the enzyme [J]. OnLine Journal of Biological Sciences, 2014,14(2):108-118.
- [70] YU X W, TAN N J, XIAO R, et al. Engineering a disulfide bond in the lid hinge region of *Rhizopus chinensis* lipase: Increased thermostability and altered acyl chain length specificity[J]. PLoS One, 2012,7(10):e46388.
- [71] ZHANG H T, SANG J C, ZHANG Y, et al. Rational design of a *Yarrowia lipolytica* derived lipase for improved thermostability [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019,137:1190-1198.
- [72] WU J P, LI M, ZHOU Y, et al. Introducing a salt bridge into the lipase of *Stenotrophomonas maltophilia* results in a very large increase in thermal stability [J]. Biotechnology Letters, 2015,37(2):403-407.
- [73] GIHAZ S, KANTEEV M, PAZY Y, et al. Filling the void: Introducing aromatic interactions into solvent tunnels to enhance lipase stability in methanol [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018,84(23):e02143-18.
- [74] BRUNDIEK H B, EVITT A S, KOURIST R, et al. Creation of a lipase highly selective for trans fatty acids by protein engineering [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012,51(2):412-414.
- [75] YANG J H, KOGA Y C, NAKANO H, et al. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through *in vitro* combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site[J]. Protein Engineering, 2002,15(2):147-152.

- [76] YEN C C, MALMIS C C, LEE G C, et al. Site-specific saturation mutagenesis on residues 132 and 450 of *Candida rugosa* LIP2 enhances catalytic efficiency and alters substrate specificity in various chain lengths of triglycerides and esters[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(20): 10899–10905.
- [77] BRUNDIEK H, PADHI S K, KOURIST R, et al. Altering the scissile fatty acid binding site of *Candida antarctica* lipase A by protein engineering for the selective hydrolysis of medium chain fatty acids[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, 114(10): 1148–1153.
- [78] 曹茜, 王丹, 袁永俊. 脂肪酶位置选择性及其应用在功能性结构甘油三酯合成中的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(11): 295–301.
- [79] ZHAO Z X, CHEN S Y, XU L, et al. Structural basis for the regioselectivity of a lipase from *Streptomyces sp.* W007[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5822.
- [80] CAI Y Z, BAI Q Y, YANG L F, et al. Substitution and mutation of the C-terminal loop domain of *Penicillium expansum* lipase significantly changed its regioselectivity and activity[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 179: 108313.
- [81] JEGANNATHAN K R, ABANG S, PONCELET D, et al. Production of biodiesel using immobilized lipase: A critical review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2008, 28(4): 253–264.
- [82] REMONATTO D, MIOTTI JR R H, MONTI R, et al. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 114: 1–20.
- [83] GAO S L, WANG Y J, WANG W W, et al. Enhancing performance of lipase immobilized on methyl-modified silica aerogels at the adsorption and catalysis processes: Effect of cosolvents[J]. *Journal of Molecular Catalysis B (Enzymatic)*, 2010, 62(3/4): 218–224.
- [84] ALMEIDA L C, BARBOSA A S, FRICKS A T, et al. Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 61: 124–129.
- [85] HOANG HIEP N, AND MOONIL K. An overview of techniques in enzyme immobilization[J]. *Applied Science and Convergence Technology*, 2017, 26(6): 157–163.
- [86] HE L H, ZHENG J W, FENG S T, et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase A onto macroporous resin NKA-9: Esterification and glycerolysis performance study[J]. *Journal of Oleo Science*, 2022, 71(9): 1337–1348.
- [87] PACHECO B J S, DOMINGUES O, REINA M P, et al. Improved the synthesis of dietary triglycerides by using lipase supported on clay carriers[J]. *Biotechnology Journal*, 2022, 17(4): 2100491.
- [88] WANG X M, ZHAO X X, QIN X L, et al. Properties of immobilized MAS1-H108A lipase and its application in the efficient synthesis of *n*-3 PUFA-rich triacylglycerols[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(3): 575–584.
- [89] ZHANG B H, WENG Y Q, XU H, et al. Enzyme immobilization for biodiesel production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 61–70.
- [90] WANG W F, XU Y, QIN X L, et al. Immobilization of lipase SMG1 and its application in synthesis of partial glycerides[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014, 116(8): 1063–1069.
- [91] CAI X Y, ZHANG M J, WEI W, et al. The immobilization of *Candida antarctica* lipase B by ZIF-8 encapsulation and macroporous resin adsorption: Preparation and characterizations[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(2): 269–276.
- [92] ABDULMALEK S A, YAN Y J. Recent developments of lipase immobilization technology and application of immobilized lipase mixtures for biodiesel production[J]. *Biofuels Bioprod Biorefining*, 2022, 16(4): 1062–1094.
- [93] AKIL E, PEREIRA A D, EL-BACHA T, et al. Efficient production of bioactive structured lipids by fast acidolysis catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase, free and immobilized in chitosan-alginate beads, in solvent-free medium[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 910–918.
- [94] CHEN W Y, XU L, ZHONG N J. Encapsulation of CALB by nucleotide/metal ions coordination nanoparticles: Highly selective catalysis of esterification while poor performance in glycerolysis reaction[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 102(5): 1812–1822.
- [95] LI M M, QIAO S, ZHENG Y L, et al. Fabricating covalent organic framework capsules with commodious microenvironment for enzymes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(14): 6675–6681.
- [96] CAVALCANTE F T T, CAVALCANTE A L G, DE SOUSA I G, et al. Current status and future perspectives of supports and protocols for enzyme immobilization[J]. *Catalysts*, 2021, 11(10): 1222.
- [97] MOHAMAD N R, MARZUKI N H C, BUANG N A, et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29(2): 205–220.
- [98] ISMAIL A R, BAEK K H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 1624–1639.
- [99] LI X X, LI D M, WANG W F, et al. Immobilization of SMG1-F278N lipase onto a novel epoxy resin: Character-

- ization and its application in synthesis of partial glycerides [J]. *Journal of Molecular Catalysis B(Enzymatic)*, 2016, 133:154-160.
- [100] GONCALVES D, SILVA A G, GUIDINI C Z. Lipases: Sources, immobilization methods, and industrial applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(18):7399-7423.
- [101] BAVARO T, BENUCCI I, PEDRALI A, et al. Lipase-mediated hydrolysis of hempseed oil in a packed-bed reactor and in-line purification of PUFA as mono- and diacylglycerols [J]. *Food Bioprod Process*, 2020, 123: 345-353.
- [102] ZHAO J F, LIN J P, YANG L R, et al. Enhanced performance of *Rhizopus oryzae* lipase by reasonable immobilization on magnetic nanoparticles and its application in synthesis 1,3-diacylglycerol [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 188(3):677-689.
- [103] XIE W L, ZANG X Z. Immobilized lipase on core-shell structured Fe_3O_4 -MCM-41 nanocomposites as a magnetically recyclable biocatalyst for interesterification of soybean oil and lard [J]. *Food Chemistry*, 2016, 194:1283-1292.

Research progress in enzymatic synthesis of structured lipids and improvement of the synthetic effect by enzyme engineering

ZHAO Zexin, ZHOU Ling, HAN Meiling, XU Yuan, CAI Jun

School of Bioengineering and Food science/Key Laboratory of Fermentation Engineering/Hubei Collaborative Innovation Center of Industrial Fermentation/Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China

Abstract: The utilization of lipase in synthesis structured lipids (SLs) from natural oils confers additional health properties and effectively enhances their value-added potential. This paper provided a comprehensive review of recent studies on the enzymatic preparation of SLs, summarizing the advancements in structural design and immobilized enzyme engineering technology to improve the efficiency of their synthesis by enzymatic approaches. The *sn*-1,3 regiospecific lipase enabled the precise synthesis of SLs, while employing stepwise variable temperature reactions, supercritical fluid reactions, vacuum reactions, and ultrasonic-assisted methods could inhibit the acyl migration effects and further enhance product yield. Furthermore, structural design could enhance the catalytic efficiency, stability, and substrate specificity of lipases to elevate the efficiency and yield in enzymatic synthesis of SLs. Immobilized enzyme technology could enhance enzyme reactivity and stability while reducing the costs of enzymatic synthesis of SLs. In the future, the high-performance enzymes should be developed by combining structural modification and novel immobilization technology on the basis of the clearer understanding of their structure-function characteristics. These insights would contribute to innovation and advancement in efficient and precise enzymatic synthesis processes for SLs.

Key words: structured lipids; lipase; enzymatic synthesis; enzyme engineering; structure design; immobilization

[责任编辑:杨晓娟]