

路雪纯, 辛嘉英, 张帅, 等. 脂肪酶固定化及其在食品领域中应用的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 423-431. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080096

LU Xuechun, XIN Jiaying, ZHANG Shuai, et al. Research Progress of Lipase Immobilization and Its Application in Food Field[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 423-431. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080096

· 专题综述 ·

脂肪酶固定化及其在食品领域中应用的研究进展

路雪纯¹, 辛嘉英^{1,2,*}, 张帅¹, 王艳¹, 夏春谷²

(1. 哈尔滨商业大学, 食品科学与工程重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150028;

2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃兰州 730000)

摘要: 脂肪酶作为一种绿色的生物催化剂广泛应用在食品等工业领域, 但是其结构极易被破坏且在环境中稳定性较差, 固定化脂肪酶是提高其稳定性和重复利用率的关键技术。近年来新型材料的不断出现, 为脂肪酶的固定化带来了契机。由于脂肪酶是作用于油水界面的特殊酶, 固定化材料的物理和化学性能会直接改变固定化酶的催化特性, 提高酶活力、选择性和稳定性等。本文综述了近年来固定化脂肪酶的材料和方法, 及其在食品加工领域中的应用, 并展望了固定化脂肪酶的发展前景。

关键词: 脂肪酶, 固定化, 新型材料

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)17-0423-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020080096



本文网刊:

Research Progress of Lipase Immobilization and Its Application in Food Field

LU Xuechun¹, XIN Jiaying^{1,2,*}, ZHANG Shuai¹, WANG Yan¹, XIA Chungu²

(1. Key Laboratory of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China;

2. State Key Laboratory of Carbonyl Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: As a green biocatalyst, lipase is widely used in food and other industrial fields. However, lipase structure is easily to be destroyed and which results in the poor stability. The immobilization of lipase is the key technology to improve the stability and reutilization rate of lipase. The continuous emergence of new materials in recent years has brought opportunities for the immobilization of lipases. Since lipase is a special enzyme that acts on the oil-water interface, the physical and chemical properties of the immobilized material will directly change the catalytic properties of the immobilized enzyme and improve the enzyme activity, selectivity and stability. This article reviews the materials and methods for immobilizing lipase in recent years, and their applications in the field of food processing, and looks forward to the development prospects of immobilized lipase.

Key words: lipase; immobilization; new materials

酶是一类具有高效性、专一性等特点的生物催化剂。酶可以在生物体内和体外进行生物转化, 且具

有优良的立体选择性、区域选择性以及化学选择性。脂肪酶作为一种绿色的生物催化剂广泛应用在

收稿日期: 2020-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21573055); 中央支持地方高校改革发展资金人才培养支持计划项目 (高水平人才) (304017); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2020C063); 哈尔滨商业大学研究生创新科研项目 (重点项目) (YJSCX2020-634HSD)。

作者简介: 路雪纯 (1994-), 女, 博士研究生, 研究方向: 生物催化, E-mail: luxuechunown@163.com。

* 通信作者: 辛嘉英 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化, E-mail: xinjiayingvip@163.com。

化工、食品、医药、能源、环境等领域^[1-2]。游离脂肪酶在应用过程中存在稳定性差、分离成本高、反应结束时难以从反应混合物中回收等问题,但这些问题可通过固定化技术来克服。脂肪酶的固定化,指在保留其催化活性的条件下将脂肪酶固定在一定的空间内。固定化后不仅具有游离脂肪酶的高效性、专一性,还可以重复利用从而降低成本^[3]。此外脂肪酶经固定化后极易与底物、产物分开,还具有稳定性高、使用寿命长、可实现连续操作等特点。固定化可以增加脂肪酶在不溶性疏水有机介质中的分散度,提高对底物的选择性,避免亲水性蛋白颗粒的聚集^[4]。

近年来固定化脂肪酶的研究主要集中在固定化材料的选择、固定化载体的设计等方面。在固定化材料的选择方面,主要倾向于热稳定性和化学稳定性较好、与酶的结合能力强且抗生物降解性良好的材料。在载体的设计方面,主要研究了载体丰富的官能团、稳定酶的构象和丰富的结合位点等。因此,选择固定化脂肪酶的方法、材料及载体的设计等方面对脂肪酶应用于食品领域也具有重要意义^[5]。固定化脂肪酶因其优良的性能在食品领域中被广泛的用于油脂改性、酯类等香料合成、食品抗氧化剂及乳制品加工等方面^[6],脂肪酶的固定化研究已成为重要发展方向。本文主要综述了近年来固定化脂肪酶的材料和方法,以及对固定化脂肪酶在食品加工领域中的应用进行阐述,为研究固定化脂肪酶在食品工业中的应用提供了一定的参考。

1 脂肪酶简介

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是一种甘油三酯水解酶,广泛存在于动物、植物和微生物中。它的基本功能是催化甘油三酯水解成脂肪酸和甘油、单甘酯或甘二酯。此外,脂肪酶还可以催化酯化、酯交换、酸解、醇解等反应^[7-9],可以作为一种工业用酶广泛地参与到各个行业的生产活动中。

脂肪酶被广泛应用于食品加工领域中,在食品行业中可用于促进油脂水解、改善食品风味等。脂肪酶作为绿色环保的催化剂具有很多优良特性,是一种具有高效性、高选择性、催化条件温和以及酶活较高等特点的生物催化剂。此外,1,3-专一性脂肪酶可以用在特殊脂肪酸、单甘酯的合成及分解,对于食品领域的研究发展有着非常重要意义^[10]。

2 脂肪酶固定化方法

Manecke 是最早将高分子作为载体来固定化酶的研究者之一^[11]。此后,随着生物催化技术的发展,学者们越来越关注脂肪酶固定化的研究。虽然固定化酶的方法有上百种,但是没有一种固定化技术适用于每一种酶,所以固定化方法应该在保证酶活力损失减少及稳定性增强的前提下,根据酶的特征和应用目的来选择^[12]。

根据酶与载体不同的结合方式,传统的固定化方法主要分为吸附法、包埋法、交联法和共价结合

法。这些方法在使用过程中不易改变酶的空间结构,因而能更好地保持酶的活性,提高酶的稳定性。随着固定化技术的不断发展,还出现了疏水定向法、多酶固定法、亲合法、辐照法等多种新型的固定化方法。不同的固定化酶方法及其分类如图1所示^[13]。

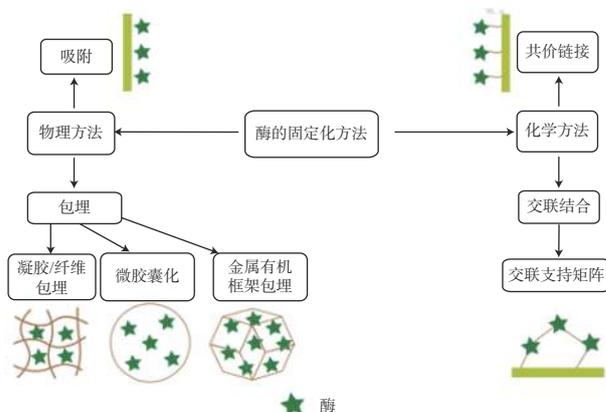


图1 酶固定化方法分类^[13]

Fig.1 Classification of enzyme immobilization methods^[13]

2.1 脂肪酶吸附法固定化

吸附法是最简单、最早的固定化方法,反应条件温和,通常分为离子交换吸附和物理吸附。物理吸附是通过静电作用力将酶固定在颗粒上,是反应过程的关键。Sagiroglu等^[14]在硅藻土上通过物理吸附法固定脂肪酶,经过五次重复使用后,固定脂肪酶活力仍保留在20%左右。刘媛媛等^[15]将硅藻土改性作为载体,采用吸附法来固定化脂肪酶。硅藻土在40℃下保存2h后可降低酶活力损失且增加重复利用率。Zhao等^[16]利用磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{MOF}$ (金属骨架有机材料)纳米微球吸附脂肪酶,所得的固定化脂肪酶很快就有了较高的催化活性(图2)。黄静等^[17]将改性后的蛭石作为载体,采用吸附-包埋法来固定脂肪酶。结果表明,固定化脂肪酶的酶活力回收率较高可达82.77%,固定化脂肪酶的重复使用稳定性较好。

2.2 脂肪酶包埋法固定化

在包埋法中,酶包合发生在聚合物网络中。聚合物网络可以保留酶,但底物和产物可以通过。载体作为传质的屏障,具有重要的反应动力学意义。有几种主要的包埋方法,例如大分子与多价阳离子(例如海藻酸盐)的电致凝胶包埋法、温度诱导的凝胶(例如琼脂糖、明胶)包埋法、通过化学/光化学的有机聚合反应(例如聚丙烯酰胺)包埋法等^[18]。Shi等^[19]通过共沉淀法制备得到纳米尺寸的花状蛋白- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 复合物,然后在其表面组装鱼精蛋白和二氧化硅,最后得到花状鱼精蛋白/二氧化硅杂化微囊固定化脂肪酶(图3),具有较好的pH、温度和贮存稳定性。Okada等^[20]将壳聚糖、海藻酸盐、 CaCl_2 进行复合作为载体,然后将脂肪酶包埋其中,制得的产物稳定性较好。Zou等^[21]以介孔二氧化硅为载体,RTIL为硅烷偶联剂,制备了介孔二氧化硅吸附型猪胰脂肪酶

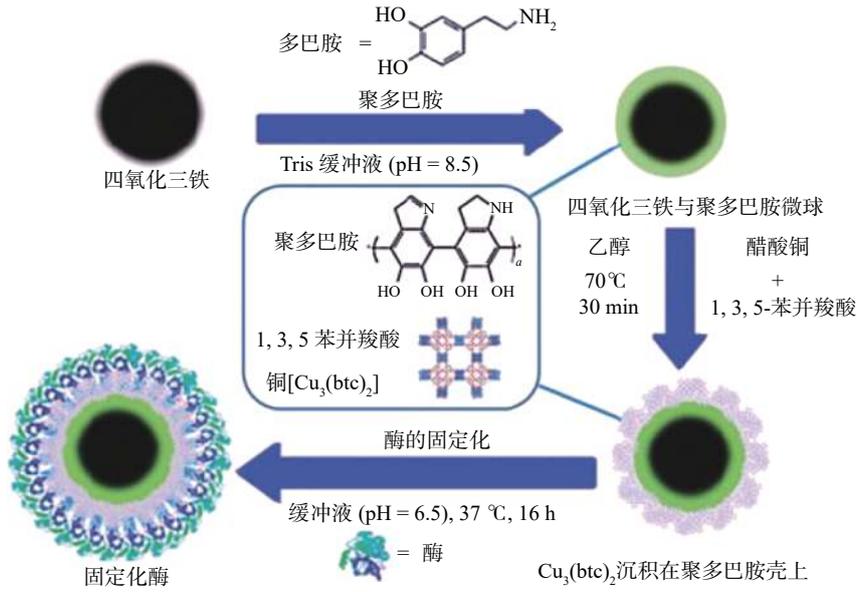


图 2 Fe₃O₄@MOF 固定化脂肪酶示意图^[16]

Fig.2 Schematic diagram of Fe₃O₄@MOF immobilized lipase^[16]

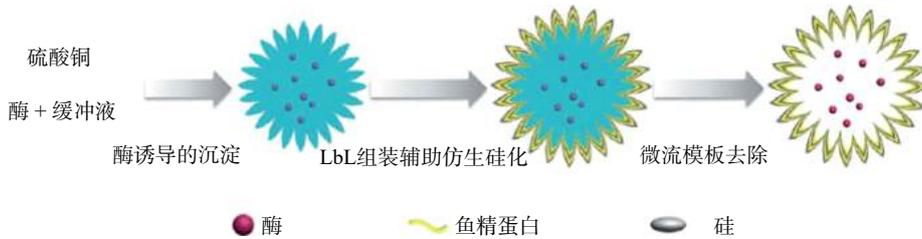


图 3 鱼精蛋白/二氧化硅复合微胶囊固定化酶原理图^[19]

Fig.3 Schematic diagram of immobilized enzyme in protamine/silica composite microcapsule^[19]

(PPL), 然后用海藻酸钠凝胶微球包埋固定化酶。结果发现固定化脂肪酶的稳定性较高, 活性保持在 92% 以上。

2.3 脂肪酶交联法固定化

交联法是指在酶分子之间用多功能试剂进行化学交联, 进而形成交联的网络结构, 酶分子既是催化主体又是载体。交联法通常与其它方法同时存在, 辅助其他固定化方法来固定化酶^[22]。在这种固定化酶的方法中, 酶分子与载体通过化学键连接形成三维结构。Mateo 等^[23]用戊二醛将吸附到介孔材料上的脂肪酶交联, 成功地改进了交联法, 形成的交联酶可以阻止孔道内酶分子的减少(图 4)。林海蛟等^[24]以大孔吸附树脂为载体, 采用甘油醚为交联剂来固定化海洋脂肪酶, 结果发现固定化酶具有良好的温度稳定性、操作稳定性和储存稳定性。连续操作 5 次后酶活力仍保持 57.38%。王慧玲等^[25]采用交联吸附法以戊二醛为交联剂来固定化青霉脂肪酶, 结果显示酯化酶活为 22895 U/g, 且回收率高达 67.57%, 表明该固定化酶酯化能力远高于游离状态的酶。

2.4 脂肪酶共价固定法固定化

在共价结合中, 酶的固定化方法是酶上的官能团与载体之间形成共价键。脂肪酶分子表面一般含有特殊基团, 如精氨酸或赖氨酸的氨基(-NH₂)、谷氨

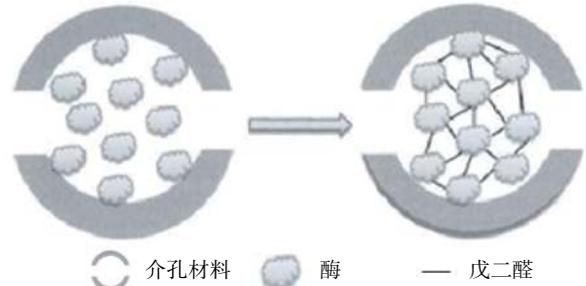


图 4 固定在介孔材料孔隙中的交联酶示意图^[23]

Fig.4 Schematic diagram of crosslinking enzymes fixed in the pores of mesoporous materials^[23]

酸或天冬氨酸的羧基(-COOH)、苏氨酸或丝氨酸的羟基(-OH)和半胱氨酸的巯基(-SH)。Liu 等^[26]将 Fe₃O₄ 纳米粒子采用乳化法交联, 然后对磁性粒子功能化来共价固定化脂肪酶, 结果显示固定化酶具有较好的稳定性和催化活性。Gloria 等^[27]通过共价吸附法将三种不同的脂肪酶固定在疏水载体辛基-琼脂糖上, 结果表明脂肪酶的选择性和活性都有所增加, 固定化脂肪酶性能略有改变。

每种酶固定化方法都各有其优缺点。一般来说, 一种酶可以通过多种方式固定, 但没有一种方法可以普遍适用于酶的固定, 往往需要结合多种方法, 来使酶的活性和稳定性提高。

3 脂肪酶的固定化材料

固定化酶的性能主要由固定化方法和固定化材料所决定。然而,固定化酶稳定性的提高往往是以酶活性降低为代价的。设计高效的固定化酶系统面临的主要挑战是同时获得高的酶活力保留率以及增强酶的稳定性和可重用性,这是一项复杂的任务,因为涉及的变量很多,可用的方法和材料也很多。载体是酶固定化过程中的关键因素,它为脂肪酶提供了优良的生物相容性、稳定的理化性质和丰富的结合位点。在食品加工中,固定化载体对脂肪酶的活性、稳定性和选择性有重要的影响。优良的载体材料具有丰富的官能团、良好的机械强度、较高的热稳定性和化学稳定性、高的酶结合能力和抗生物降解性,并能保持良好的酶活性、稳定性和可操作性等。目前,在食品加工领域,优良载体材料可提高脂肪酶的活性、稳定性和重复利用率,已成为固定化脂肪酶研究的热点之一^[28]。

3.1 无机载体材料

无机载体材料是指可以直接从自然界中获得的无机材料或可以通过简单的无机材料固定酶或细胞的载体^[5]。氧化铝、活性炭、介孔氧化硅和硅藻土等都是常见的无机材料,它们具有原料易得、价格低廉、不易分解且对微生物无毒等特点。介孔材料比表面积较高且孔结构有序,将酶固定化的方法主要有吸附法、共价结合法和交联法。在食品加工领域中,许多学者利用有机高分子对无机载体进行修饰,研究其与脂肪酶的结合^[12]。

Jin 等^[29]合成了三种不同烃链长度(丙基、辛基和十八基)的烷基功能化介孔二氧化硅,采用吸附法来固定化脂肪酶 r27RCL。结果表明,固定化脂肪酶 r27RCL 的十八烷基功能化介孔二氧化硅生物催化活性较高,且重复使用 5 次没有明显的活性损失。曹婕等^[30]为了提高脂肪酶的催化性能,采用包埋法将酶负载在不同比例的壳聚糖/膨润土载体上,研究表明脂肪酶负载量最高 92.1% 时,复合载体的质量比为 10%,在反应五批次后,酶活仍保持在 68.2%,具有较好的酶稳定性。李笑迎等^[31]采用环氧树脂聚合物为模板制备 SiO_2 材料,通过吸附法来固定化脂肪酶,结果表明酶活及储存稳定性得到明显提高。Mohadese 等^[32]通过共价结合法固定化脂肪酶,对二氧化硅进行了修饰,增加了脂肪酶的稳定性和活性。

3.2 有机载体材料

有机载体材料是指能够直接以天然有机物为载体材料或通过某些化学反应进行固定化和制备的一类载体材料,持水性较好而且有灵活的选择性,可以满足不同的要求。有机合成高分子化合物、天然多糖和农副产品废弃物都是比较常用的载体材料。在食品加工过程中,经过有机载体固定的脂肪酶,可作为食品反应的催化剂用于加工食品。

Shi 等^[33]通过交联法与仿生矿化结合制备复合

微球来固定化脂肪酶(图 5)。结果表明,与游离酶相比,固定化酶保留了约 85% 的催化活性,稳定性和重复使用性较高。Hyun 等^[34]用纤维素纳米晶(CNCS)来固定假丝酵母脂肪酶,结果显示,其活性和稳定性均高于游离酶。Nadia 等^[35]以聚氨酯泡沫塑料(PU)为载体,采用固定化方法固定南极假丝酵母 B(Calb)脂肪酶。结果表明,脂肪酶衍生物活性提高了 535% 且稳定性较好,催化合成的丙酸香叶酯和油酸乙酯的转化率分别在 97% 和 83% 左右,可作为食品工业反应的催化剂。徐珊等^[36]采用包埋交联法固定化脂肪酶,以羧甲基纤维素钠和海藻酸钠复合作为载体。实验表明,酶活较高且耐热性较好,不易脱落。卢佳伟等^[37]采用交联法将脂肪酶固定在聚丙烯腈(PAN)中空膜中,并且把海藻酸钠加入到其中。结果表明,重复使用 15 次后酶活仍为 58.77%,耐温性和耐酸性与游离酶相比都较高。虞凤慧等^[38]通过包埋法用复合载体来固定化毕赤酵母高温碱性脂肪酶,考察不同因素对固定化酶的影响。结果表明,最优条件下酶活率高达 99.5%。

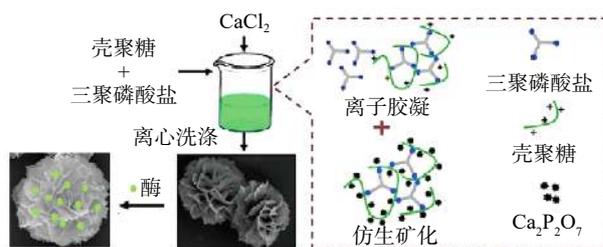


图5 花状壳聚糖/焦磷酸钙杂化及酶的固定化示意图^[33]

Fig.5 Schematic diagram of flower-like chitosan/calcium pyrophosphate hybridization and enzyme immobilization^[33]

3.3 复合载体材料

随着研究的发展,脂肪酶固定化材料性能单一的缺陷限制了固定化技术的发展。渐渐出现了两种或两种以上性能优异的复合材料,这种复合材料成为了酶固定材料的新方向^[28]。复合材料在适当的微环境中提高了机械性能,如强度、弹性、可塑性和化学键。它不仅具有有机材料的柔韧性和良好的可成型性,还具有强度高、热稳定性好、耐化学性好等无机材料的优点。

Cheng 等^[39]将皱褶假丝酵母脂肪酶(CRL)固定在大孔二氧化硅上,用聚多巴胺(PDA)进行了改性。结果表明,PDA/MMS 复合材料为提高直接固定化酶的催化活性提供了一种简单、经济有效的途径。CRL-PDA/MMS 的活力回收率为 201%,固定化脂肪酶的活性和稳定性都显著提高。白文静等^[40]通过原位聚合将二氧化硅大孔材料(PDA/ SiO_2)作为载体来固定脂肪酶(PFL),实验表明得到的固定化酶比游离酶有更好的热稳定性、操作稳定性和储存稳定性且具有良好的亲和性。黄孟云等^[41]将磁性纳米复合

材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MIL-100}(\text{Fe})$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{P}(\text{GMA-DVB-MAA})$ 通过碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺活化, 将脂肪酶固定到复合材料上。结果表明, 固定化脂肪酶的热稳定性和操作稳定性良好, 重复使用五次后, 生物柴油转化率较高。刘磊磊等^[42] 制备了三种新的磁性复合载体来固定化脂肪酶。研究结果表明, 固定化酶的稳定性和抗污染性有显著提升, 实现了脂肪酶的快速分离回收和重复使用。韩秀丽等^[43] 将脂肪酶固定在径为 40~60 μm 的磁性壳聚糖微球上, 实验显示该方法可以用于固定化脂肪酶, 并且实际载酶量为 64.4 mg/g。Liang 等^[44] 将脂肪酶固定在金属有机框架复合材料上, 发现金属-有机骨架壳中受保护的脲酶和辣根过氧化物酶分别煮沸后仍保留生物活性, 这种结果为生物大分子的开发提供了新的可能性。

3.4 纳米载体材料

随着纳米技术的进步, 各种纳米结构材料由于具有超高的比表面积, 作为酶固定化载体受到了人们的关注。相比于传统材料在载酶量和单位体积的酶活性方面具有显著的提高^[45]。纳米结构材料的优点之一是能够在纳米尺度上控制尺寸, 如纳米孔中的孔径、纳米纤维或纳米管的厚度以及纳米颗粒的尺寸^[46] (图 6)。各种纳米材料通常提供较大的比表面积、体积比和较低的传质阻力, 这使得其能够更好地与酶相互作用, 提高效率的同时增强了酶的长期储存和回收稳定性^[47]。常见纳米材料包括: 氧化石墨烯、碳纳米管和纳米纤维、纳米颗粒、纳米花等。纳米颗粒由于其最小的扩散限制、最大的单位质量表面积和高载酶量而被认为是酶固定化的理想载体。

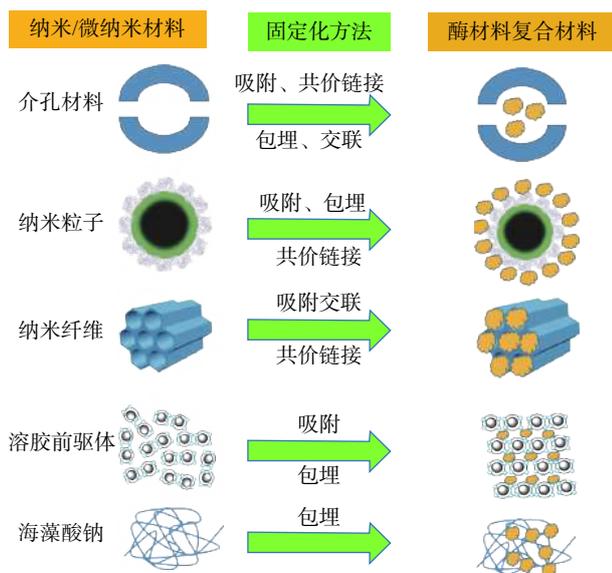


图 6 利用各种纳米/微米材料进行酶固定化^[46]

Fig.6 Enzyme immobilization using various nano/micron materials^[46]

Liu 等^[48] 采用静电纺丝技术制备纳米纤维膜来共价固定脂肪酶。纳米纤维载体的高孔隙率和互连性使它们具有低的传质障碍, 有利于酶的构象稳定,

促进脂肪酶的活力和稳定性的提高。Li 等^[49] 在月桂酸和十二烷醇的酯化过程中, 利用 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 与碳纳米管复合成花状结构来固定化脂肪酶, 循环使用 8 次酶活仍较高。因为花状结构可以提高载体的比表面积, 而且碳纳米管有利于降低传质阻力, 提高酶负荷, 并具有广阔的工业应用前景。Zheng 等^[50] 在磁性多壁碳纳米管上固定假丝酵母脂肪酶(CLL), 结果表明, 与游离酶相比, 固定化脂肪酶具有更好的热稳定性、生物催化活性, 并且更易于回收利用。Işık 等^[51] 以电纺纳米纤维为载体, 将聚乙烯醇(PVA)/ Zn^{2+} 聚合物包埋在杂化纤维中, 通过吸附和交联的方法将脂肪酶固定在纳米纤维上。结果显示, 纳米纤维提高了脂肪酶的热稳定性、pH 稳定性和可重用性。在重复使用 14 次后, 活性仍保持在 90% 以上。

4 固定化脂肪酶在食品中的应用

4.1 合成芳香化合物

带有水果香味的短链酯作为芳香剂在食品工业中广受欢迎, 这些芳香化合物可通过化学合成或从天然来源获得^[52]。风味化合物通常是短链脂肪酸和醇类, 如类似菠萝或苹果口味的丁酸甲酯、丁酸丁酯、异丁酸异戊酯、类似菠萝或草莓口味的丁酸乙酯、类似香蕉口味的乙酸异戊酯/丁酸异戊酯。固定化脂肪酶在温和的条件下催化合成天然香料, 而且其比化学合成更安全可靠, 从而在芳香化合物的合成方面表现出广泛的应用前景^[53]。

Garlapati 等^[54] 研究了固定化米根霉 NRRL3562 脂肪酶在无溶剂条件下催化酯化合成丁酸甲酯和乙酸辛酯。考察了醇摩尔比、反应时间、温度等不同的酯化反应参数对摩尔转化率(%)的影响。结果表明, 固定化酶对丁酸甲酯和乙酸辛酯的相对活性保持在 95% 以上, 分别达到 5 次和 6 次, 脂肪酶活性较高。Ghangui 等^[55] 用非商品化的模拟葡萄球菌固定化脂肪酶在纯底物条件下催化乙酸和异戊醇的酯化反应合成乙酸异戊酯(香蕉味), 考察了脂肪酶用量、乙酸与异戊醇的摩尔比等反应参数对反应的影响。结果表明, 乙酸和异戊醇在 8 h 内转化率可达 64%。固定化酶制剂经 4 次循环使用后, 固定化酶活性未见明显下降, 固定化酶稳定性和活性都较高。Matte 等^[56] 将羊毛热霉菌脂肪酶(TLL)固定在天然和改性的 Immobead 150 上, 通过使用乙二胺进行多点共价连接来合成丁酸丁酯和丁酸异戊酯。结果表明, 天然 Immobead 150(EMULTI)上的多点共价固定化脂肪酶在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下的半衰期为 5.32 h, 比其 TLL 溶液的稳定性高约 30 倍, 在丙酮、正己烷和异辛烷中表现出很高的稳定性。酯化反应在 24 h 内酯化率可达 60% 以上, 在所有固定化方法中, EMULTI 的热稳定性、溶剂稳定性和离子液体稳定性都表现最好。

4.2 油脂改性加工

固定化脂肪酶在油脂工业中有着广阔的应用前景。主要用于油脂加工, 油脂改性在食品加工过程中

是非常关键的环节。固定化脂肪酶优于游离酶,因为固定化可以提高酶的稳定性和活性。在固定化形式中,酶可以重复使用。固定化方法大多采用非共价相互作用^[53]。天然油脂由于支链较长、脂肪酸的饱和度不同的弊端,导致稳定性较差,利用脂肪酶的位置特异性和脂肪酸特异性^[57],可以作为生物催化剂对油脂进行改性。经过脂肪酶改性的油脂,具有更高的营养价值、稳定性和品质,在食品加工领域具有较大的市场潜力。

Paula 等^[58]将商业非区域选择性假丝酵母脂肪酶(Novozym 435)和 1,3-区域选择性米根霉脂肪酶固定在有机无机聚硅氧烷-聚乙烯醇杂化基质中,作为反应器的生物催化剂,通过酶促酯交换反应来调整乳脂的物理性质,获得了适合工业生产的健康的酯交换脂肪混合物。Tecelão 等^[59]在 60 °C 的无溶剂介质中,将三棕榈素与油酸或 ω -3 多不饱和脂肪酸在酶催化酸解条件下合成人乳脂肪(HMFs),对 4 种固定化脂肪酶 Lipozyme RMIM、*Theromyces Lanuginosa* 脂肪酶、Lipozyme TL IM 和 Novozym 435 进行了测试,结果表明,生物催化剂的活性和操作稳定性取决于所使用的酰基供体。

4.3 提高食品添加剂脂溶性

在食品工业中异抗坏血酸被作为抗氧化剂广泛应用,但是由于其亲水性较高,很难应用在脂类食品中。利用固定化脂肪酶催化抗坏血酸转化为抗坏血酸酯类物质,可以有效提高产物的亲脂性,能更好地应用于脂类食品中。

Santibáñez 等^[60]采用不同载体固定化斯氏假单胞菌脂肪酶 TL,在有机介质中以棕榈酸和抗坏血酸为原料,酶法酯化合成抗坏血酸棕榈酸酯,与商业 Novozym 435 脂肪酶进行了性能比较。结果表明,假单胞菌脂肪酶 TL 在 55 °C 时转化率达 57%,高于商业 Novozym 435 脂肪酶在 70 °C 的底物转化率。Sun 等^[61]通过固定化脂肪酶将异抗坏血酸转化为 D-异抗坏血酸棕榈酸酯,改善了异抗坏血酸在有机介质中的油溶性,且转化率较高,产率高达 95.32%。汤鲁宏等^[62]将庚烷和叔戊醇等多种反应媒体和数种脂肪酶对 L-抗坏血酸棕榈酸酯合成反应的影响进行了研究,结果表明,叔丁醇适用于酯合成反应,且 Novozym 435 脂肪酶具有良好的催化活性。

4.4 合成食品乳化剂糖酯

糖酯是一种非离子表面活性剂,其亲水基团为糖基,疏水基团为脂肪酸,同时具有两亲性。可以用脂肪酶在单一的酶促反应步骤中合成,其基础是尽可能使用可更新、廉价且容易获得的原料,糖酯类食品乳化剂因其可被生物降解,对环境无毒无害,被广泛应用于食品工业中^[57]。

Zaidan 等^[63]通过共价键和物理吸附将脂肪酶交联到纳米反应器(即 NER-CRL),将皱纹假丝酵母(CRL)脂肪酶固定化在氨基活化的云母上,来催化合

成乳糖酯。结果表明,NER-CRL 和 Amino-CRL 具有较高的操作稳定性,半衰期分别超过 13 和 10 次,比活力比游离酶分别提高了 2.4 和 2.6 倍。Adnani 等^[64]模拟木糖醇和硬脂酸的脂肪催化酯化反应,将 Novozym 435(大孔树脂固定化南极假丝酵母脂肪酶)在正己烷中催化合成木糖醇脂肪酸酯。结果表明,脂肪酸酯实际收率为 96.10%。Kapoor 等^[65]以南极假丝酵母脂肪酶 B(CALB)的交联酶聚集体(CLEAS)为原料,在低水条件下催化甘油与棕榈酸的酯化反应。结果表明,反应 24 h,转化率可达 90.3%,其中单甘酯和双甘酯的产率分别为 87% 和 3.3%。

4.5 合成类可可脂

可可脂的熔点为 37 °C,具有入口即化的熔融特性,含有棕榈酸和硬脂酸,是食品工业中加工巧克力的重要原料。但是天然可可脂的产量较低且价格较为昂贵,因此固定化脂肪酶被用来催化油脂间酯交换生产可可脂替代品,在食品工业中应用较为广泛。

Dutt 等^[66]用从土壤中分离到的芽孢杆菌 RK-3 菌株来生产 1,3-区域特异性脂肪酶,以棕榈油和硬脂酸甲酯为原料进行酯交换反应。结果表明,最终产物与 CB 类似,且在 24 h 内的转化率为 83.17%。龚欣等^[67]研究了利用固定化脂肪酶 Lipozyme TLIM 催化制备低热量乌柏类可可脂,发现在温度为 65 °C、 A_w 为 0.06、催化时间 15.5 h 时,交换率最高为 34.9%,产物的 SI 值为 0.55,熔点为 37 °C,研究表明可以利用乌柏脂制备低热量的类可可脂。胡芳等^[68]用脂肪酶 Lipozyme TLIM 来催化酯交换反应合成类可可脂,结果类可可脂得率高达 85.586%,高级结构分析表明产物中甘油三酯的组成和结构与天然可可脂类似。

5 结论与展望

将脂肪酶固定化来进行生物催化已经成为热点研究方向,近年来,脂肪酶的固定化技术在迅速发展,固定化方法也在不断地完善,新型的高性能材料和新方法不断被发现。固定化技术可以使酶的稳定性和可重复利用率提高,克服了游离酶不易回收且不易与底物分离等缺陷,纯化程序更方便、操作成本相对较低,有利于食品加工的工业化生产。随着对脂肪酶研究的不断深入,脂肪酶固定化方面的研究将会有新的突破。利用固定化技术提高脂肪酶的稳定性、酶活力、选择性以及重复利用率等性能可以使脂肪酶更好地应用于食品加工领域,前景十分广阔。

参考文献

- [1] Schoemaker, Mink, Wubbolts. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis[J]. *Science*, 2003, 299(5613): 1694-1967.
- [2] Koeller, Wong. Enzymes for chemical synthesis[J]. *Nature*, 2001, 409: 232-240.
- [3] Kasche V. Mechanism and yields in enzyme catalyzed equilibrium and kinetically controlled synthesis of p-lactam

- antibiotics, peptides and other condensation products[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 1986, 8(1): 4-16.
- [4] 隋颖, 张立平. 吸附法固定化脂肪酶研究进展[J]. *山东化工*, 2013, 42(10): 46-47. [Sui Y, Zhang L P. The research advance of adsorption-based lipase immobilization[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2013, 42(10): 46-47.]
- [5] 王诗路, 赵国明, 刘辉, 等. 固定化脂肪酶催化合成癸二酸二(2-乙基己基)酯[J]. *化学反应工程与工艺*, 2012, 28(4): 330-334. [Wang S L, Zhao G H, Liu H, et al. Synthesis of bis (2-ethylhexyl) sebacate catalyzed by immobilized lipase[J]. *Chemical Reaction Engineering and Process*, 2012, 28(4): 330-334.]
- [6] 李阳, 韦伟, 曹茜, 等. 脂肪酶固定化新材料[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(7): 122-128. [Li Y, Wei W, Cao Q, et al. New material immobilized by lipase[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2014, 29(7): 122-128.]
- [7] Cao S L, Huang Y M, Li X H, et al. Preparation and characterization of immobilized from *Pseudomonas cepacia* onto magneti cellulose nanocrystals[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 1-12.
- [8] Salihu, Alamm. Solvent tolerant lipases: A review[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 50(1): 86-96.
- [9] 夏高辉. 磁性金属-生物分子框架材料固定化黑曲霉脂肪酶及其应用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017. [Xia G H. Study on the immobilization of *Aspergillus niger* lipase onto magnetic metal-biomolecule-frameworks (BioMOFs) and its application[D]. Guangzhou: Guangzhou South China University of Technology, 2017.]
- [10] 王智, 冯雁, 等. 微量水对有机溶剂中酶催化的影响与控制方法[J]. *自然科学进展*, 2002, 12: 130-133. [Wang Z, Feng Y. Effect of trace water on enzyme catalysis in organic solvents and its control method[J]. *Progress in Natural Science*, 2002, 12: 130-133.]
- [11] Manecke, Singer. Uber einige chemische umsetzungen am polyaminostyrol[J]. *Makromolekulare Chemie*, 1960, 37: 119-142.
- [12] 侯晨. 磁性酚类仿生粘附复合材料的制备及固定化脂肪酶研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016. [Hou C. Preparation of magnetic phenolic biomimetic adhesive composite materials for lipase immobilization[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016.]
- [13] Liu J, Ma R T, Shi Y P. Recent advances on support materials for lipase immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods-A review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1101: 9-22.
- [14] Sagioglu, Ozcan, H M. Production of ricinoleic acid from castor oil by immobilised lipases[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 39(2): 170-182.
- [15] 刘媛媛, 郑永杰, 田景芝. 改性硅藻土对脂肪酶固定化研究[J]. *化学工程师*, 2014, 28(3): 14-17. [Liu Y Y, Zheng Y J, Tian J Z. Study on modified diatomite for lipase immobilization[J]. *Chemical Engineer*, 2014, 28(3): 14-17.]
- [16] Zhao M, Zhang X M, Hui D C. Rational synthesis of novel recyclable Fe₃O₄@MOF nanocomposites for enzymatic digestion[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(38): 8116-8119.
- [17] 黄静, 梁密. 改性蛭石吸附-包埋法固定化脂肪酶的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(14): 103-107. [Huang J, Liang M. Lipase immobilization by modified vermiculite adsorption-embedding method[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(14): 103-107.]
- [18] Shuler L M, Kargi F. *Bioprocess engineering basic concepts*[M]. NJ, Prentice Hall, 2002: 57-104.
- [19] Shi J, Zhang S H, Wang X L, et al. Preparation and enzymatic application of flower-like hybrid microcapsules through a biomimetic mineralization approach[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(27): 4289-4296.
- [20] Okada T, Mprissey M T. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by immobilized *Candida rugosalipase*[J]. *Food Science*, 2008, 73(3): 146-150.
- [21] Zou B, Chu Y H, Xia J J, et al. Immobilization of lipase by ionic liquid-modified mesoporous SiO₂ adsorption and calcium alginate-embedding method[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017.
- [22] 王宇. 酶固定化技术的研究进展[J]. *基层医学论坛*, 2013, 17(23): 3105, 3109. [Wang Y. Research progress of enzyme immobilization technology[J]. *The Medical Forum*, 2013, 17(23): 3105, 3109.]
- [23] Mateo C, Palomo J M, Langen L M, et al. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 86(3): 273-276.
- [24] 林海蛟, 张继福, 张云, 等. 基于大孔吸附树脂先交联后吸附法固定化脂肪酶[J]. *广西师范大学学报*, 2020, 38(4): 101-108. [Lin H J, Zhang J F, Zhang Y, et al. Immobilization of lipase by crosslinking and then adsorption method using macroporous adsorbent resin[J]. *Journal of Guangxi Normal University(Natural Science Edition)*, 2020, 38(4): 101-108.]
- [25] 王慧玲, 赵燕, 李建科. 戊二醛交联法固定扩展青霉脂肪酶的研究[J]. *食品科技*, 2012(6): 27-31. [Wang H L, Zhao Y, Li J K. The activity of *Penicillium expansum* lipase immobilized by cross-linking with glutaraldehyde[J]. *Food Science and Technology*, 2012(6): 27-31.]
- [26] Liu X, Chen X, Li X, et al. Preparation of superparamagnetic sodium alginate nanoparticles for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, 14(3): 763-769.
- [27] Gloria F L, Betancor I, Carrascosa, et al. Modulation of the selectivity of immobilized lipases by chemical and physical modifications: Release of omega-3 fatty acids from fish oil[J]. *American Oil Chemistry Society*, 2012, 89: 97-102.
- [28] 栗俊田. 脂肪酶固定化载体材料研究进展[J]. *广东化工*, 2017, 44(22): 90-93. [Li J T. Research progress of the carrier for immobilization lipase[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2017, 44(22): 90-93.]
- [29] Jin W B, Xu Y, Yu X. Improved catalytic performance of lipase under non-aqueous conditions by entrapment into alkyl-functionalized mesoporous silica[J]. *New Journal of Chemistry*, 2018, 43(1): 364-370.
- [30] 曹婕, 董华平. 壳聚糖/膨润土固定化脂肪酶水解橄榄油的研究[J]. *绍兴文理学院学报(自然科学)*, 2016, 2: 77-81.
- [31] 李笑迎, 白文静, 陶凯, 等. 大孔/介孔多级孔 SiO₂ 的制备及

- 其在固定化脂肪酶中的应用[J]. *材料导报*, 2018, 32(10): 1695–1700, 1715. [Li X Y, Bai W J, Tao K, et al. Preparation of hierarchical macroporous/mesoporous silica and its application in lipase immobilization[J]. *Materials Reports*, 2018, 32(10): 1695–1700, 1715.]
- [32] Mohadese, Maryam, H Zohreh, et al. Preparation of highly reusable biocatalysts by immobilization of lipases on epox-functionalized silica for production of biodiesel from canola oil[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 101: 23–31.
- [33] Shi J F, Wang X L, Zhang L, et al. Facile one-pot preparation of chitosan/calcium pyrophosphate hybrid microflowers[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(16): 14522–14532.
- [34] Hyun J K, Saerom P, Sung H K, et al. Biocompatible cellulose nanocrystals as supports to immobilize lipase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 122: 170–178.
- [35] Nadia L, Ilizandra A F, Cindy V, et al. In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 124: 52–61.
- [36] 徐珊, 李任强, 张继福, 等. 乙二醇缩水甘油醚交联海藻酸钠-羧甲基纤维素钠固定化脂肪酶[J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 33(12): 77–83. [Xu S, Li R Q, Zhang J F, et al. Ethylene glycol diglycidyl ether cross-linked with sodium alginate-carboxymethyl cellulose to immobilize lipase[J]. *China Biotechnology*, 2017, 33(12): 77–83.]
- [37] 卢家伟, 李由然, 石贵阳. 聚乙烯亚胺改性聚丙烯腈中空膜固定脂肪酶[J]. *分子催化*, 2018, 32(1): 79–89. [Lu J W, Li Y R, Shi G Y. The modification of polyacrylonitrile hollow membrane by polyethyleneimine to immobilize lipase[J]. *Journal of Molecular Catalysis(China)*, 2018, 32(1): 79–89.]
- [38] 虞凤慧, 马韵升, 刘圣鹏, 等. 海藻酸钠与羧甲基纤维素钠固定化高温碱性脂肪酶[J]. *中国酿造*, 2015, 5: 78–81. [Yu F H, Ma Y S, Liu S P, et al. Immobilization of high-temperature alkaline lipase by sodium alginate and carboxymethyl cellulose sodium[J]. *China Brewing*, 2015, 5: 78–81.]
- [39] Cheng W J, Li Y, Li X Y, et al. Preparation and characterization of PDA/SiO₂ nanofilm constructed macroporous monolith and its application in lipase immobilization[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2019: 104.
- [40] 白文静, 李云曹, 大丽, 等. PDA/SiO₂ 大孔复合材料固定化荧光假单胞菌脂肪酶[J]. *无机化学学报*, 2016, 11: 1973–1980. [Bai W J, Li Y C, Da L, et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on PDA/SiO₂ macroporous composite[J]. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 2016, 11: 1973–1980.]
- [41] 黄孟云. 磁性纳米复合材料固定化脂肪酶的制备及其催化大豆油酯交换[D]. 郑州: 河南工业大学, 2018. [Huang M Y. Preparation of immobilized lipase on the magnetic nanocomposites and its catalytic performance of transesterification of soybean oil[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2018.]
- [42] 刘磊磊. 磁性 Fe₃O₄/PS 基纳米材料的制备及其固定脂肪酶研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2017. [Liu L L. Study on preparation of magnetic Fe₃O₄/PS based nanoparticles and their application in lipase immobilization[D]. Wuhu: Anhui University of Technology, 2017.]
- [43] 韩秀丽, 谷鹏举, 方书起, 等. Fe₃O₄ 磁性壳聚糖微球固定化脂肪酶研究[J]. *郑州大学学报*, 2018, 39(4): 30–34. [Han X L, Gu P J, Fang S Q, et al. Study on immobilization of lipase with Fe₃O₄ magnetic chitosan microspheres[J]. *Journal of Zhengzhou University(Engineering Science)*, 2018, 39(4): 30–34.]
- [44] Liang K, Riccò R, Doherty C, et al. Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7240.
- [45] Jungbae Kim, Jay W Grate, Ping Wang. Nanostructures for enzyme stabilization[J]. *Chemical Engineering Science*, 2005, 61(3): 1017–1026.
- [46] Taek Hwang, Man Bock. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2013, 13(1): 49–61.
- [47] Kim J B, Grate J W, Wang P. Nanobiocatalysis and its potential applications[J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26: 639–646.
- [48] Liu X H, Fang Y C, Yang X. Electrospun epoxy-based nanofibrous membrane containing biocompatible feather polypeptide for highly stable and active covalent immobilization of lipase[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 166: 277–285.
- [49] Li K, Wang J, Yao J H, et al. Carbon nanotube-lipase hybrid nanoflowers with enhanced enzyme activity and enantioselectivity[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018: 281.
- [50] Zheng M, Wang S, Xiang X, et al. Facile preparation of magnetic carbon nanotubes-immobilized lipase for highly efficient synthesis of 1, 3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich human milk fat substitutes[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228(1): 476–483.
- [51] Işık Ceyhan, Gökmen Arabacı, Yasemin İspirli Doğaç, et al. Synthesis and characterization of electrospun PVA/Zn²⁺ metal composite nanofibers for lipase immobilization with effective thermal, pH stabilities and reusability[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2019: 99.
- [52] Jovana Trbojević, Dušan Veličković, Aleksandra Dimitrijević, et al. Design of biocompatible immobilized *Candida rugosa* lipase with potential application in food industry[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(12): 4281–4287.
- [53] Yushkova Ekaterina, Nazarova Elena, Matyuhina Anna, et al. Application of immobilized enzymes in food industry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(42): 11553–11567.
- [54] Garlapati Vijay, Banerjee Rintu. Solvent-free synthesis of flavour esters through immobilized lipase mediated transesterification[J]. *Enzyme Research*, 2013, 2013: 367410.
- [55] Ghamgui Hanen, Maha Karra-Chaâbouni. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 38(6): 788–794.
- [56] Matte C R, Bussamara R, Dupont J, et al. Immobilization of thermo-mycetes lanuginosus lipase by different techniques on immovead 150 support: Characterization and applications[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2014, 172(5): 2507–2520.
- [57] 魏雪, 孙丽超, 李淑英, 等. 脂肪酶的固定化及其在食品领域的应用[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(11): 59–64. [Wei X, Sun L C, Li S Y, et al. Immobilization of lipase and its application in

- food industry[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(11): 59–64.]
- [58] Paula Ariela V, Gisele F M Nunes, Osrio Natlia, et al. Continuous enzymatic interesterification of milkfat with soybean oil produces a highly spreadable product rich in polyunsaturated fatty acids[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015, 117(5): 608–619.
- [59] Tecelão Carla, Joana Silva, Eric Dubreucq, et al. Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 65(1): 122–127.
- [60] Santibáñez, Luciana, Wilson, et al. Synthesis of ascorbyl palmitate with immobilized lipase from *Pseudomonas stutzeri*[J]. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2014, 91(3): 405–410.
- [61] Sun Wenjing, Zhao Hongxia, Cui Fengjie, et al. D-isoascorbyl palmitate: Lipase-catalyzed synthesis, structural characterization and process optimization using response surface methodology[J]. *Chemistry Central Journal*, 2013, 7(1): 114.
- [62] 汤鲁宏, 张浩. 催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的反应媒体和脂肪酶[J]. *无锡轻工大学学报*, 2000, 19(2): 157–159. [Tang L H, Zhang H. Selection of suitable reaction media and lipase: Synthesize of L ascorbyl palmitate catalyzed by lipase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2000, 19(2): 157–159.]
- [63] Zaidan, Mohd Basyaruddin, Abdul Rahman, et al. Biocatalytic production of lactose ester catalysed by mica-based immobilised lipase[J]. *Food Chemistry*, 2012, 131(1): 199–205.
- [64] Adnani Atena, Mahiran Basri, Emilia Abdul Malek, et al. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of xylitol ester by taguchi robust design method[J]. *Industrial Crops & Products*, 2009, 31(2): 350–356.
- [65] Kapoor M, Gupta M N. Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(3): 503–508.
- [66] Dutt K, Gupta P, Rawat I, et al. Production of 1, 3 regiospecific lipase from *Bacillus* sp. RK-3: Its potential to synthesize cocoa butter substitute[J]. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2011: 41–48.
- [67] 龚欣, 谭志强, 郑建仙. Lipozyme TLIM 脂肪酶催化制备低热量乌柏类可可脂工艺的研究[J]. *食品工业*, 2014, 35(1): 48–50. [Gong X, Tan Z Q, Zheng J X. Preparation technology of low-calorie Chinese tallow cocoa butter equivalent catalyzed by lipozyme TLIM lipase[J]. *The Food Industry*, 2014, 35(1): 48–50.]
- [68] 胡芳, 韦富香, 王志成, 等. 基于响应面的酶法酯交换制备乌柏脂油类可可脂[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(3): 94–97. [Hu F, Wei F X, Wang Z C, et al. Enzymatic preparation of cocoa butter equivalent (tCBE) from Chinese tallow oil using response surface methodology (RSM)[J]. *Food Research and Development*, 2010, 31(3): 94–97.]