

# 超临界CO<sub>2</sub>酶解富集多不饱和脂肪酸研究进展

周雪华<sup>1</sup>, 刘星佐<sup>2</sup>

<sup>1</sup>浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华

<sup>2</sup>成都锦城学院土木与环境工程学院, 四川 成都

收稿日期: 2023年2月13日; 录用日期: 2023年3月18日; 发布日期: 2023年3月29日

## 摘要

超临界CO<sub>2</sub>脂肪酶酯交换反应是一种新型、绿色、高效的方法, 在富集浓缩DHA、EPA等多不饱和脂肪酸方面具有很好的发展前景。本文对目前多不饱和脂肪酸的生产现状、传统酶法及以超临界CO<sub>2</sub>流体为介质的非水相脂肪酶法在多不饱和脂肪酸方面的应用进行综述, 通过对比传统工艺并结合国内外最新研究进展, 探讨超临界CO<sub>2</sub>脂肪酶酯交换反应在分离富集不饱和脂肪酸中的优势与应用前景, 为相关研究提供依据。

## 关键词

超临界CO<sub>2</sub>, 非水相酶解, PUFAs

# Research Progress on Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids by Enzymolysis under Supercritical Carbon Dioxide

Xuehua Zhou<sup>1</sup>, Xingzuo Liu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

<sup>2</sup>School of Civil and Environmental Engineering, Chengdu Jincheng College, Chengdu Sichuan

Received: Feb. 13<sup>th</sup>, 2023; accepted: Mar. 18<sup>th</sup>, 2023; published: Mar. 29<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

Supercritical CO<sub>2</sub> lipase transesterification is a new, green and efficient method, which has a good development prospect in the enrichment and enrichment of DHA, EPA and other polyunsaturated fatty acids. In this paper, the current production status of polyunsaturated fatty acids and the application of traditional enzyme and non-aqueous lipase method using supercritical CO<sub>2</sub> fluid as

medium in polyunsaturated fatty acids were reviewed. By comparing the traditional separation process and combining with the latest research progress at home and abroad, to explore the advantages and application prospects of supercritical CO<sub>2</sub> lipase transesterification in separation and enrichment of unsaturated fatty acids, and to provide basis for related research.

## Keywords

Supercritical CO<sub>2</sub>, Non-Aqueous Enzymatic Hydrolysis, PUFAs

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 多不饱和脂肪酸功能、来源及其提取工艺概况

多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs), 是指含有 2 个或 2 个以上不饱和双键结构且碳链长度为 18-22 个碳原子的脂肪酸, 根据甲基末端第一个双键的位置, 可以分为 n-3 和 n-6PUFAs。n-6PUFAs 如亚油酸(linoleic acid, LA)、花生四烯酸(arachidonic acid, ARA)来源丰富, 通过饮食的提供足以满足身体需求, 而 n-3 PUFAs 却无法通过饮食满足。常见的 n-3 PUFAs 如二十碳五烯酸(EPA, C20:5 ω-3)和二十二碳六烯酸(DHA, C22:6 ω-3)是有关人体营养与健康的重要生物活性物质, 对治疗癌症[1]、心血管疾病[2]、生长发育[3]和风湿性关节炎[4]也有一定的作用。随着人们健康意识的增强, 近十年对 n-3PUFAs 的需求在逐年增加。在欧洲, 大约 20%的成年人使用 n-3 PUFAs 补充剂[5]; 在美国, 近年来富含 n-3 PUFAs 的保健品一直引领着保健品市场[6]。高品质的 n-3 PUFAs 的价格也水涨船高。图 1 展示了 n-3 PUFAs 产品附加值随其品质增加的价格变化情况。

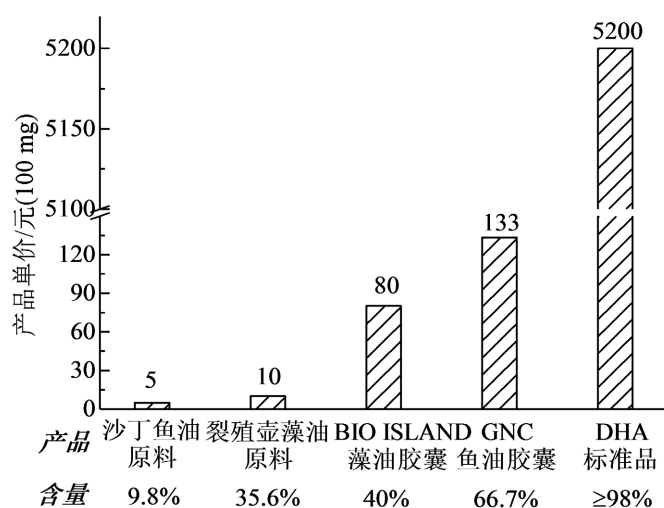


Figure 1. n-3 Price changes of PUFAs products

图 1. n-3 PUFAs 产品价格变化情况

n-3 PUFAs 通常以三种形式存在: 甘油酯、乙酯和游离脂肪酸(FFA), 目前, 美国食品药品监督管理局批准治疗各种疾病的 n-3 PUFAs 均以游离脂肪酸或乙酯形式生产[7]。市场上销售的游离脂肪酸或乙酯形式

的 n-3 PUFAs 浓缩物存在氧化稳定性低、不稳定[8]等问题, 常见的脂肪酸乙酯(FAEE)形式的 n-3 PUFAs 生物利用度不高, 人体中只有 21%的 DHA 以乙酯的形式被吸收。甘油酯形式的 n-3 PUFAs 具有更高的氧化稳定性和生物利用度, 57%的 DHA 以甘油三酯形式被人体吸收, 吸收率可达乙酯型的 300% [9]。生产更为稳定的甘油酯型 n-3 PUFAs 具有广泛的前景。

EPA 和 DHA 主要存在于鱼类、藻类、植物以及转基因植物[10]中。鱼类是人类最先发现、最早用于富集浓缩 PUFAs 的原料。目前 90%的 DHA 来源于鱼类, 然而过度捕捞和市场高需求, 全球鱼类资源正处于极度匮乏的状态。此外, 一些鱼还含有大量的有毒重金属, 如铜或汞, 甚至还含有有机污染物, 如多氯联苯或二恶英[11], 这些成分对人体健康产生危害。为了海洋资源的可持续发展, 也为了获取更为安全的 DHA, 因此需要寻找品质更佳、更为安全的 n-3 PUFAs 资源替代品。在海洋资源中, 与鱼相比, 微藻具有较高的生长率、较高的生产密度和较低的土地利用率, 被认为是最有前途的 n-3 PUFAs 的替代来源之一, 具有广泛的应用前景[12]。利用微藻生产高质量 DHA 具有潜在的市场前景, 也符合绿色可持续发展的绿色生产理念。

传统富集浓缩 DHA 的方法有尿素包合法、低温结晶法、银离子络合法等, 这些方法都使用一些化学试剂、存在一定的安全隐患。由表 1 可知上述方法属于能源密集型, 效率低, 对环境、资源都有一定的不利影响。因此需要寻找一种绿色、环保、高效的富集多不饱和脂肪酸的方法。

**Table 1.** Comparison of advantages and disadvantages of traditional enrichment and concentration methods for DHA  
**表 1.** 传统富集浓缩 DHA 方法优缺点对比

富集方法	富集原理	优点	缺点
尿素包合法	多不饱和脂肪酸由于双键多, 使长碳链弯曲, 具有一定的空间构型, 故难以被尿素分子包含	操作简单, 设备投资少, 所用试剂便宜	消耗大量溶剂, 存在溶剂回收、环境污染等问题, 不能将 EPA 和 DHA 分离
低温结晶法	不同脂肪酸在低温有机溶剂中的溶解度不同	设备简单, 操作方便安全, 有效成分不易变性	溶剂消耗大, 有溶剂残留, 收率低
银离子络合法	银离子可与不饱和脂肪酸中的双键形成极性络合物, 且双键的数目不同, 络合作用也不同	操作简单, 条件温和, 周期短, 收率高	硝酸银昂贵, 回收困难, 生产成本低
脂肪酶法	部分脂肪酶具有独特的底物选择性	富集效率高、条件温和、能耗低	油脂类物质黏性大、底物溶解度不高, 需要共溶剂, 涉及多相, 反应反应结束后底物与产物不易分离

## 2. 脂肪酶法制备多不饱和脂肪酸

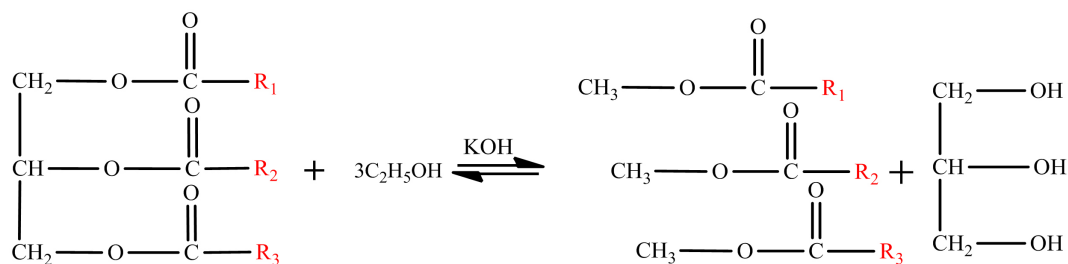
传统的酯交换法富集 PUFAs 通常使用酸性或碱性催化剂, 这可能导致选择性低和不良副反应。此外, 这一过程中的高温可能会导致鱼油的氧化变质。因此需要更为温和的富集 PUFAs 的方法。

酶催化反应作为一种更绿色、更专一的化学催化剂替代物出现, 用于加工 n-3 PUFA。由于脂肪酶对底物的位置选择性, 因此特别适合结构脂质的生产。脂肪酶在温和的条件下操作, 可避免油脂的氧化[13]。除此之外, 脂肪酶催化效率更高, 降低了生产过程中能量损耗, 更适合用于大规模食品加工生产中[14]。

传统上认为水是生物催化剂应用的唯一合适介质, 但对于油脂这种非极性有机物在水中的溶解度不高, 这导致在水中酶会因为动力学或热力学限制而无法进行新反应, 其次在水解过程中很难控制水溶液

的 pH 值, 使脂肪酶无法处于最适 pH, 其稳定性和活性会受影响。在脂肪酶富集浓缩不饱和脂肪酸的过程中, 水分含量大会导致其反应方向向水解方向进行, 导致其甘油酯型 n-3 PUFAs 含量降低。为了得到含量更高的甘油酯型 n-3 PUFAs, 应采取其他更合适的方式。脂肪酶非水相酶解反应可以解决以上问题。

脂肪酶酯交换反应采用有机试剂, 如甲醇、乙醇等, 无需控制反应过程中的 pH。在脂肪酶酯交换反应中, 藻油或鱼油中的 DHA 和 EPA 由于位阻效应, 脂肪酶无法靠近甘油酯其酯化位点, 只能将单不饱和脂肪酸、饱和脂肪酸等小分子酯化生成脂肪酸乙酯/甲酯, DHA 和 EPA 留在甘油酯骨架上, 达到富集浓缩 PUFAs 的效果, 脂肪酸乙酯/甲酯可作为生物燃料。图 2 是脂肪酶酯交换反应化学方程式。



**Figure 2.** The ester exchange reaction of triglyceride and methanol produces fatty acid methyl ester (R1, R2, R3 are alkyl chains)

**图 2.** 甘油三酯与甲醇的酯交换反应生成脂肪酸甲酯(R1、R2、R3 为烷基链)

常规的脂肪酶酯交换反应虽然使用了乙醇等有机试剂可帮助油脂溶解, 但藻油和鱼油的黏性大, 溶解在乙醇等有机试剂的油脂含量并不多, 酯交换效率会明显下降, 需要添加叔丁醇等助溶剂帮助其溶解。因此脂肪酶酯交换反应会涉及多相介质[15], 不易将产物、底物分离, 因此需要一种新型、易分离介质来取代助溶剂。

### 3. 超临界 CO<sub>2</sub> 脂肪酶非水相介质酶解富集 PUFAs

#### 3.1. 超临界 CO<sub>2</sub> 脂肪酶酶解概述

以二氧化碳为溶剂的超临界流体是最有希望取代常规脂肪酶酯交换反应的绿色介质。二氧化碳是一种无毒、不易燃的“绿色”溶剂, 适用于食品工业, 相对于其他溶剂, 它的特点是在温和条件下有一个临界点(Tc = 30°C, Pc = 7.38 MPa)。提取过程中的低温和无氧保存了生物活性化合物, 使该技术适用于热敏成分, 如多不饱和脂肪酸[16], 此外使用 SC-CO<sub>2</sub> 不仅可以改善了反应物的混溶性和反应介质的传质性能, 而且不需要复杂的溶剂去除操作, 降低了生产成本[17]。

超临界 CO<sub>2</sub> 中使用酶作为生物催化剂已在文献中得到广泛研究。自 1985 年 Hammond 等[18]研究者首次提出超临界流体可以作为酶催化的反应介质后, 超临界 CO<sub>2</sub> 中的酶催化反应备受国内外科研工作者的关注。20 世纪 90 年代初以来, 超临界流体中的酶促反应已经得到证实。超临界流体中的酶反应经常显示出比在经典条件下进行的反应速率更高[19]。不少研究结果证实多种酶在超临界 CO<sub>2</sub> 介质中可以发挥作用, 且其催化活性能够保持稳定, 如胰蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶、淀粉酶、果胶酶等。许多酶在超临界 CO<sub>2</sub> 中其构象没有发生改变。其中, 脂肪酶因其在食品加工和油脂化工中的广泛应用而成为当前超临界 CO<sub>2</sub> 中酶催化反应的研究热点, 尤其是以脂肪酶催化的酯合成、酯交换、氧化反应等取得了较大的研究进展[20]。

近年来, 有人针对超临界二氧化碳脂肪酶酯交换反应进行了研究。Lin 等人[21]提出在超临界 CO<sub>2</sub> 介质中进行脂肪酶酯交换反应。他们在超临界 CO<sub>2</sub> 介质(5 小时、323 K 和 10.34 bar)中, 通过与固定化 1,3-

特异性脂肪酶(Lipozyme IM-60)的酶促酯交换反应, 实现鱼油的 n-3 PUFAs 富集。他们证实, 在超临界条件下, 酶促酯交换反应比在常规溶剂下高 40%, 可以达到从鱼油获得高质量 n-3 PUFA 的目的。

### 3.2. 超临界 CO<sub>2</sub> 脂肪酶非水相酶解用于富集多不饱和脂肪酸

近年来, 关于超临界 CO<sub>2</sub> 脂肪酶酯交换反应富集 PUFAs 研究百花齐放, 已经有大量实验证明超临界 CO<sub>2</sub> 脂肪酶酯交换反应富集 PUFAs 具有广泛应用前景。首先使用超临界 CO<sub>2</sub> 作为反应介质可以最大限度地减少脂质氧化, 使得在超临界 CO<sub>2</sub> 中获得的反应产物的酸度和总氧化值(TOTOX)较低[22]。

Solaesa 等人[23]通过测定精制沙丁鱼油及其混合物在 SC-CO<sub>2</sub> 介质中酶促酯交换反应 7 h 后在不同温度(40°C~90°C)下的 peroxide value (PV)和 anisidine value (AV), 发现 PV 随着反应温度的升高而降低, 在此研究测定的最高温度(80°C~90°C)下获得的值约为 3 meq O<sub>2</sub>/kg, 甚至低于最初的精制沙丁鱼油的 PV 和 AV 值(最初的精制沙丁鱼油的 PV 和 AV 分别为 4.8 ± 0.1 meq O<sub>2</sub>/kg 和 23.0 ± 0.1 O<sub>2</sub>/kg)。其次超临界 CO<sub>2</sub> 较高的扩散率(higher diffusivity)、较低的粘度(lower viscosity)和表面张力(surface tension)是减少相间传输限制的原因, 可提高酶的反应速率和酯化率[24]。Santos 等人[25]在 SC-CO<sub>2</sub> 中使用 Lipozyme 435 脂肪酶对橄榄油进行酶促酯交换反应发现, 在 SC-CO<sub>2</sub> 中酯化率比在正己烷介质中高 67%。Rathore 和 Madras [15]以棕榈油、花生油等食用油和胭脂树、麻疯树等非食用油为原料, 在超临界 CO<sub>2</sub> 存在下用 Novozym-435 脂肪酶进行酶促酯交换反应。10min 内转化率很高(>80%), 40 min 内几乎完全转化; Ramos [26]用白地霉脂肪酶(lipase of *Geotrichum candidum*)以油酸(OA)与甲醇(MeOH)为底物在超临界介质(SC-CO<sub>2</sub>)反应, 当油酸: 甲醇摩尔比为 1:3、酶活 2.5 U/g、温度 30°C、压力 30 MPa、反应时间 1h 时, 反应产率提高了 3 倍, 达到 37.73%。因此超临界 CO<sub>2</sub> 脂肪酶酶解富集 PUFAs 具有广泛的前景。

### 3.3. 超临界 CO<sub>2</sub> 脂肪酶非水相酶解应用的前景及挑战

不同于常压下脂肪酶非水相酯交换反应, 超临界 CO<sub>2</sub> 脂肪酶非水相酶解环境还面临着压力、反应温度、超临界 CO<sub>2</sub> 的低水分含量等因素对脂肪酶非水相酶解反应效率、脂肪酶残余活性及脂肪酶酶结构的影响, 因此在后续的研究中着重探究超临界 CO<sub>2</sub> 条件下产物的得率及效率、脂肪酶残余酶活及结构变化和产物的理化性质。

## 4. 前景展望

随着人们对环境友好型绿色富集浓缩多不饱和脂肪酸方法的日益关注, 超临界 CO<sub>2</sub> 非水相酯交换反应法作为一项绿色、环保、高效的富集浓缩多不饱和脂肪酸技术, 因其对环境友好、产物易分离等特点受到越来越多科研工作者的青睐。但脂肪酶在超临界 CO<sub>2</sub> 中最适条件与常规环境不同, 需要探究其富集浓缩多不饱和脂肪酸最适条件及在超临界 CO<sub>2</sub> 中的脂肪酶活性及结构变化, 以得到最佳富集效果。

## 参考文献

- [1] Aglago, E.K., Huybrechts, I., Murphy, N., *et al.* (2020) Consumption of Fish and Long-Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Is Associated with Reduced Risk of Colorectal Cancer in a Large European Cohort. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **18**, 654-666. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.06.031>
- [2] Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. and Appel, L.J. (2002) Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation*, **106**, 2747-2757. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000038493.65177.94>
- [3] Simopoulos, A.P. (1991) Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease and in Growth and Development. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **54**, 438-463. <https://doi.org/10.1093/ajcn/54.3.438>
- [4] Calder, P.C. (2012) Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *Journal of Nutrition*, **142**, 592S-599S. <https://doi.org/10.3945/jn.111.155259>

- [5] Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delisi, R., *et al.* (2017) Enhancing and Improving the Extraction of Omega-3 from Fish Oil. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, **5**, 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.03.001>
- [6] Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., *et al.* (2010) Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Concentrates: A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **11**, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.006>
- [7] Avallone, L., Shaikh, A., Hassan, A., *et al.* (2016) Prescription Omega-3 Fatty Acid Products: Considerations for Patients with Diabetes Mellitus. *Diabetes Metabolic Syndrome & Obesity Targets & Therapy*, **9**, 109-118. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S97036>
- [8] Bórquez, R.M., Koller, W.D., Wolf, W., *et al.* (1997) A Rapid Method to Determine the Oxidation Kinetics of n-3 Fatty Acids in Fish Oil. *LWT—Food Science and Technology*, **30**, 502-507. <https://doi.org/10.1006/food.1996.0216>
- [9] Lawson, L.D. and Hughes, B.G. (1988) Human Absorption of Fish Oil Fatty Acids as Triacylglycerols, Free Acids, or Ethyl Esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **152**, 328-335. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80718-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80718-6)
- [10] Khan, W.A., Hu, C.M., Khan, N., *et al.* (2017) Bioengineered Plants Can Be a Useful Source of Omega-3 Fatty Acids. *BioMed Research International*, **2017**, Article ID: 7348919. <https://doi.org/10.1155/2017/7348919>
- [11] Domingo, J.L. (2007) Omega-3 Fatty Acids and the Benefits of Fish Consumption: Is All That Glitters Gold? *Environment International*, **33**, 993-998. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.05.001>
- [12] Castejón, N. and Senorans, F.J. (2020) Enzymatic Modification to Produce Health-Promoting Lipids from Fish Oil, Algae and Other New Omega-3 Sources: A Review. *New Biotechnology*, **57**, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.02.006>
- [13] Bucio, S.L., Solaesa, Á.G., Sanz, M.T., *et al.* (2015) Kinetic Study for the Ethanolysis of Fish Oil Catalyzed by Lipozyme(®) 435 in Different Reaction Media. *Journal of Oleo Science*, **64**, 431-441. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14263>
- [14] Goswami, D. (2017) Lipase Catalyzed Modification of Mustard Oil: A Review. *Current Biochemical Engineering*, **4**, 99-108. <https://doi.org/10.2174/2212711904666170606110242>
- [15] Rathore, V. and Madras, G. (2007) Synthesis of Biodiesel from Edible and Non-Edible Oils in Supercritical Alcohols and Enzymatic Synthesis in Supercritical Carbon Dioxide. *Fuel*, **86**, 2650-2659. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.03.014>
- [16] Semenoglou, I., Eliasson, L., Uddstl, R., *et al.* (2021) Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Oil from Arctic Charr Side Streams from Filleting Processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **71**, Article ID: 102712. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102712>
- [17] Lisboa, P., Rodrigues, A.R., Martín, J.L., *et al.* (2014) Economic Analysis of a Plant for Biodiesel Production from Waste Cooking Oil via Enzymatic Transesterification Using Supercritical Carbon Dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, **85**, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.10.018>
- [18] Hammond, D.A., Karel, M., Klivanov, A.M., *et al.* (1985) Enzymatic Reactions in Supercritical Gases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **11**, 393-400. <https://doi.org/10.1007/BF02798672>
- [19] Weber, A., Catchpole, O. and Eltringham, W. (2008) Supercritical Fluid Assisted, Integrated Process for the Synthesis and Separation of Different Lipid Derivatives. *Journal of Separation Science*, **31**, 1346-1351. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800082>
- [20] Knez, Z. (2018) Enzymatic Reactions in Subcritical and Supercritical Fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, **134**, 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.023>
- [21] Lin, T.J., Chen, S.W. and Chang, A.C. (2006) Enrichment of n-3 PUFA Contents on Triglycerides of Fish Oil by Lipase-Catalyzed Trans-Esterification under Supercritical Conditions. *Biochemical Engineering Journal*, **29**, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.02.035>
- [22] Melgosa, R., Sanz, M.T., Ángela, G., *et al.* (2017) Supercritical Carbon Dioxide as Solvent in the Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Fish Oil: Kinetic Study. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, **17**, 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2016.11.011>
- [23] Solaesa, A.G., Sanz, M.T., Melgosa, R., *et al.* (2017) Substrates Emulsification Process to Improve Lipase-Catalyzed Sardine Oil Glycerolysis in Different Systems. Evaluation of Lipid Oxidation of the Reaction Products. *Food Research International*, **100**, 572-578. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.048>
- [24] Laudani, C.G., Habulin, M., Knez, Z., *et al.* (2007) Lipase-Catalyzed Long Chain Fatty Ester Synthesis in Dense Carbon Dioxide: Kinetics and Thermodynamics. *The Journal of Supercritical Fluids*, **41**, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.08.011>
- [25] Santos, P.D., Rezende, C.A. and Martínez, J. (2016) Activity of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and Its Performance on the Esterification of Oleic Acid in Supercritical Carbon Dioxide. *The Journal of*

*Supercritical Fluids*, **107**, 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.08.011>

- [26] Ramos, P.R., Kamimura, E.S., Pires, N., *et al.* (2021) Esterification Reaction in SC-CO<sub>2</sub> Catalyzed by Lipase Produced with Corn Steep Liquor and Minas Frescal Cheese Whey. *Bioresource Technology Reports*, **14**, Article ID: 100670. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100670>