

重组米根霉脂肪酶的酶学性质及其催化水解鳀鱼油富集 DHA 的研究

朱东奇¹, 李道明¹, 王卫飞², 杨 博³, 王永华¹

(1. 华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东 广州 510640; 2. 华南理工大学 化学与化工学院, 广东 广州 510640; 3. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510006)

摘 要:米根霉脂肪酶(*Rhizopus oryzae* lipase)是一种具有广泛用途的工业化脂肪酶,对重组米根霉脂肪酶(rProROL)的酶学性质进行考察,发现其水解甘油三酯时具有明显的 sn-1,3 位置专一性;催化二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)酯化时其活力分别为催化油酸酯化活力的 37.42% 和 8%。鳀鱼油是天然 EPA/DHA 主要来源之一,在鳀鱼油中 DHA 含量为 12.1%。¹³C 核磁共振波谱分析表明,鳀鱼油中 DHA 主要分布在甘油酯的 sn-2 位,利用重组米根霉脂肪酶(rProROL)催化鳀鱼油部分水解富集其中的 DHA 时,得到的 1,2-甘油二酯中 DHA 的含量可以达到 19.7%,甘油单酯中 DHA 的含量可以达到 25.2%,DHA 的回收率为 65.6%。表明 rProROL 脂肪酶具有水解鳀鱼油富集 DHA 的应用潜能。

关键词:重组米根霉脂肪酶;水解;鳀鱼油;DHA

中图分类号:TQ 925⁺.6 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2016)06-0021-05

Enzymatic properties of recombinant *rhizopus oryzae* lipase and its application in concentration of DHA by hydrolysis of anchovy oil

ZHU Dong - qi¹, LI Dao - ming¹, WANG Wei - fei², YANG Bo³, WANG Yong - hua¹

(1. College of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou Guangdong 510640; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou Guangdong 510640; 3. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou Guangdong 510006)

Abstract: *Rhizopus oryzae* lipase is one of the widely used industrial lipase. The enzymatic properties of recombinant *rhizopus oryzae* lipase were evaluated and it displayed strong 1,3 regiospecificity in hydrolyzing triglyceride; meanwhile, it showed 37.42% and 8.0% relative activity towards eicosapentaenoic acid(EPA) and docosahexenoic acid(DHA) compared with oleic acid in esterification reaction. Anchovy oil is one of the main sources of natural EPA / DHA and it contains 12.1% DHA. The result of ¹³C nuclear magnetic resonance spectrum showed that DHA in anchovy oil was preferentially located at sn-2 position of the glyceride. Based on above, recombinant *rhizopus oryzae* lipase was employed to hydrolyze anchovy oil to concentrate DHA, and the contents of DHA in produced 1,2-diacylglycerol and monoacylglycerol reached to 19.7% and 25.2% accompanying with a recovery yield of 65.6%. The results demonstrated that recombinant *rhizopus oryzae* lipase was a prospective lipase which could be used in enrichment of DHA by hydrolysis of anchovy oil.

Key words: recombinant *rhizopus oryzae* lipase; hydrolysis; anchovy oil; docosahexaenoic acid(DHA)

米根霉(*Rhizopus oryzae*)脂肪酶广泛应用于食

品和油脂加工领域,野生型的 *Rhizopus oryzae* 脂肪酶由三段组成:一段由 26 个氨基酸组成的信号肽序列,一段由 97 个氨基酸组成的前肽序列和一段由 269 个氨基酸组成的成熟肽序列。前肽序列处于信号肽序列和成熟肽序列之间,前肽序列非常重要,能

收稿日期:2016-03-23

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2014AA093601);
广东省产学研项目(2013B090200015)

作者简介:朱东奇,1990 年出生,男,硕士研究生。

通讯作者:王永华,1973 年出生,女,教授。

辅助成熟肽序列蛋白的折叠和酶的分泌,同时前肽序列能增强酶的活性和热稳定性;信号肽序列会影响成熟肽序列蛋白的折叠。野生型米根霉脂肪酶因其表达量少、酶活低等缺点限制了其在食品和油脂化工领域的应用。因此,国内外学者在米根霉脂肪酶基因克隆及在不同微生物中表达等方面做了大量的研究以获得高产量和高活力的重组米根霉脂肪酶^[1-2]。重组米根霉脂肪酶在催化醇解反应制备生物柴油中显示较好的稳定性^[3],并可用于制备中链结构脂、人乳脂、甘油二酯等具有特殊功能的酯类物质^[4]。然而,目前对于重组米根霉脂肪酶在催化油脂水解、富集 DHA 方面的报道较少。本研究使用的脂肪酶是将天然的米根霉脂肪酶信号肽序列去除,在前序列肽羧基端添加由 28 个氨基酸组成的先导序列后,得到的重组米根霉脂肪酶(rProROL),其表达量和催化油脂水解的活力大大提高。

鲛鱼是一种重要的海洋经济鱼类,其年产量约为海洋鱼类总渔获物的 20%,是年捕捞量排在前 10 位的海洋鱼类之一。在中国、俄罗斯、南非、智利、秘鲁等地均有分布。秘鲁鲛鱼是世界上最大渔业资源,每年捕量达到 500~1 000 万 t,占秘鲁总起捕量的 80%。鲛鱼中油脂含量高(湿基含油量约为 5%~8%),鲛鱼油富含二十碳五烯酸(EPA,C20:5)和二十二碳六烯酸(DHA,C22:6),是深海鱼油保健食品加工的重要原材料。天然鲛鱼油中的 DHA 含量一般在 4.3%~18.4% 的范围内,以其为原料进行深加工时可以通过物理化学法或生物法对 DHA 进行分离纯化。常用的工艺为将天然鱼油乙酯化,然后通过分子蒸馏和尿素饱和等方法将乙酯型的 DHA、EPA 纯化到一定浓度^[5]。此外,根据天然鱼油中脂肪酸分布特点及脂肪酶的选择性,可以通过酶促水解或醇解的方式获得甘油酯型的高 EPA、DHA 产物,所得甘油酯产品中一般以甘油二酯和单甘油酯为主,甘油三酯含量较少^[6-7]。

本文以含有一个来自米根霉的先导序列的重组米根霉脂肪酶(rProROL)为研究对象,考察其催化油脂水解时的位置专一性和催化脂肪酸酯化时脂肪酸特异性。利用超导核磁共振(600 M)对 DHA 在鲛鱼油甘油酯中的位置分布进行分析;根据 DHA 在甘油酯中的分布特点,以重组米根霉脂肪酶(rProROL)为催化剂,催化鲛鱼油限制性水解富集 DHA。为酶法富集海洋鱼油中 DHA 提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

鲛鱼油:舟山新诺佳生物工程有限公司提供。

rProROL[*Rhizopus oryzae* 脂肪酶前肽基因序列与成熟肽基因序列(ProROL)在重组 *Pichia pastoris* 中表达],实验室自制^[4]。氘代氯仿,核磁级,购于 Sigma-Aldrich(中国)有限公司。37 种脂肪酸甲酯混合标准品(CAS no. 113 47885-U)、甘油二酯(15%的 1,2-甘油二酯和 85%的 1,3-甘油二酯,CAS no. 25637-84-7)、甘油三酯(CAS no. 122-32-7)、甘油单酯(CAS no. 113 47885-U)及三油酸甘油酯标准品:购于 Sigma-Aldrich(中国)有限公司。正己烷、异丙醇、甲酸均为色谱纯。石油醚、三氟化硼-乙醚、乙酸、甲醇、氢氧化钠、氢氧化钾均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

Waters 2695 型高效液相色谱仪(配备 Waters 2414 型示差检测器):美国 Waters 公司;气相色谱仪:安捷伦 7890A;超导核磁共振谱仪:德国 Bruker 公司;BS201S Sartorius 精密天平:赛多利斯(上海)贸易有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器:巩义市予华仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 rProROL 的位置选择性分析

称取 1.00 g 三油酸甘油酯于 25 mL 的锥形瓶中,加入 0.2 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7),添加 30 U/g 的 rProROL(相对于油的质量),置于恒温磁力搅拌器(40℃,200 r/min)中反应 10 min。每分钟取样于 -20℃ 冰箱保存。反应结束后,取 1 mL 反应混合物于 10 000×g 下离心 5 min,取上层油相 0.02 mL 于 2 mL EP 管中,加入 0.5 g 的无水硫酸钠,1 mL 的流动相(正己烷:异丙醇:甲酸=15:1:0.003,体积比),于 10 000×g 离心 1 min,取 0.8 mL 上层有机相进行高效液相色谱分析水解产物中甘油酯和脂肪酸的组成,通过对比标准样品的保留时间确定酶促三油酸甘油酯水解反应中各组分的出峰位置。

1.3.2 rProROL 的脂肪酸特异性分析

将 33.49 mmol 的甘油与 16.74 mmol 的等摩尔脂肪酸加入 25 mL 的具塞锥形瓶中,并加入 50 mg 的 rProROL 和 370 μL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7),于 40℃ 下反应 10 min。反应结束后,离心,取一定量的上层油样(准确记录质量)加入到含 25 mL 异丙醇的 100 mL 锥形瓶中,然后加入两滴 1% 的酚酞溶液,再用 KOH 滴定,记录消耗的 KOH 体积;剩余油相转入分液漏斗中,加入 4 mL 30% KOH-乙醇溶液,混匀,再加入 10 mL 正己烷萃取,去掉下层,倒出上层于 25 mL 的圆底烧瓶中,将正己烷于

30 ℃旋蒸除掉后,对得到的甘油酯混合物进行甲酯化,气相色谱检测脂肪酸甲酯的组成,每种脂肪酸的转换程度计算为^[8]:

$$C_n = \frac{AV_0 - AV_t}{AV_0} \times F_n \quad (1)$$

其中, AV_0 和 AV_t 分别为 0 时间和 t 时间的酸价, F_n 为酰基甘油中各脂肪酸的摩尔百分比。

通过不同脂肪酸结合到甘油的程度来计算脂肪酸的竞争因子(α),从竞争因子(α)的大小即可评价 rProROL 的脂肪酸特异性,竞争因子(α)其倒数($1/\alpha$)称为底物专一性常数(kcat/Km),用于评价脂肪酶的脂肪酸特异性。将 Rangheard 等^[9]提出的反应底物的竞争因子用于描述脂肪酶的脂肪酸特异性。 α 的计算公式为:

$$\alpha = \frac{\log(A_0/A_t)}{\log(B_0/B_t)} \quad (2)$$

式中, A_0 和 B_0 分别代表底物 A 和底物 B 在 0 时间的浓度, A_t 和 B_t 分别代表底物 A 和底物 B 在 t 时间的浓度。在本研究中,通过测定酯化反应产物中脂肪酸组成来间接反映 rProROL 的脂肪酸特异性,在公式(1)的基础上,酯化反应体系中脂肪酸的竞争因子可表示为:

$$\alpha = \frac{\log(1 - C_{ref})}{\log(1 - C_n)} \quad (3)$$

式中, C_{ref} 和 C_n 分别表示参照脂肪酸和待考察脂肪酸结合到甘油上的结合率。

1.3.3 鳕鱼油中 DHA 位置分析

利用超导核磁共振对鳕鱼油中 DHA 在甘油酯中的位置分布进行分析,参考文献^[10]中分析鱼油中脂肪酸组成及位置分布的检测方法,将 200 mg 的鳕鱼油溶于 600 μ L 的 $CDCl_3$,然后转移到核磁管中,利用¹³C 核磁共振波谱(NMR)进行检测。

1.3.4 rProROL 催化鳕鱼油水解

将 10 g 鳕鱼油与 10 g 磷酸盐缓冲液(pH 7)加入到 50 mL 的具塞锥形瓶中,置于恒温磁力搅拌器中并预热到反应温度(40 ℃),添加 30 U/g 底物油的 rProROL,每隔一段时间取样分析反应混合物的组成。

1.3.5 水解产物组成分析

利用高效液相色谱法(HPLC)分析鳕鱼油水解产物,高效液相色谱为配备 Waters 2414 示差折光检测器的 waters2695 系统;色谱柱为 Phenomenex Luna Silica (2) (4.6 mm i. d. $\times$ 250 mm, 5 μ m particle size),流动相为正己烷:异丙醇:甲酸 = 15:1:0.003

(体积比),色谱柱温为 30 ℃,流动相流速为 1.0 mL/min。物质的出峰顺序为:甘油三酯、脂肪酸、1,3-甘油二酯、1,2(2,3)-甘油二酯、1(3)-甘油单酯、2-甘油单酯,不同组分利用标准品进行定性,各个组分含量按面积归一化法进行计算。rProROL 的位置选择性可通过 1,2(2,3)-甘油二酯与 1,3-甘油二酯的比值来确定。

1.3.6 甘油酯中脂肪酸组成分析

甘油酯分离:反应结束后,离心,取上层油样,将 20 μ L 油样用毛细管点在层析板(100 mm $\times$ 200 mm, 0.20 ~ 0.25 mm)底部距边缘约 1.5 cm 处。将点好的层析板置于装有展开剂的层析缸中展开,展开剂为石油醚:乙醚:乙酸(体积比) = 80:20:2,展开后将层析板从层析缸中取出,在通风橱中晾干,用 0.1% 的 2,7-二氯荧光素染色,然后在 254 nm 紫外灯下观察酰基甘油酯和脂肪酸所对应的条带。将各对应的条带从层析板上刮下进行甲酯化,以检测脂肪酸组成。

样品甲酯化:采用快速甲酯化方法,将经薄层色谱(TLC)分离得到的甘油酯条带和脂肪酸条带刮下后置于 50 mL 的圆底烧瓶中,加入 5 mL 0.5 mol/L 的 NaOH-甲醇液,置于 75 ℃水浴中回流皂化反应 10 min。取出适当冷却 2 min 后,再加入 3 mL 14% 的 BF_3 -乙醚甲醇溶液,75 ℃恒温水浴反应 5 min,使甲酯化完全。取出冷却,加入正己烷 2.5 mL,轻轻摇荡促进甲酯在正己烷中溶解。加入饱和食盐水溶液,使正己烷上升至瓶口。静置、分层,取上层正己烷相于离心管中,并加入少量无水硫酸钠除水后,进行气相色谱分析。

气相色谱(GC)分析:采用 Agilent7890A 气相色谱进行分析;色谱柱:FFAP(30 m $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 0.20 μ m);载气: N_2 ,流量 1.1 mL/min,压力 0.5 MPa;燃气: H_2 ,流量 38 mL/min,压力 0.25 MPa;助燃气:空气,流量 350 mL/min,压力 0.5 MPa;柱前压:20 psi,分流比 30:1;进样量 1 μ L;进样口温度 250 ℃,检测器温度 300 ℃。程序升温方法:170 ℃维持 2 min,以 5 ℃/min 升温至 200 ℃维持 2 min,10 ℃/min 升温至 230 ℃维持 40 min。计算采用面积归一化法。

2 结果与分析

2.1 rProROL 的位置选择性分析

天然的 ROL 在水解甘油三酯时,具有显著的 sn-1,3 位专一性,因此可以用于甘油二酯的制备和结构脂质的定向合成。重组 ROL(rProROL)活力

更高,但分子结构的改变,可能会影响其位置专一性;本研究以三油酸甘油酯为底物,通过分析 rProROL 在短时间内的水解产物考察其位置专一性,结果如图 1 所示。

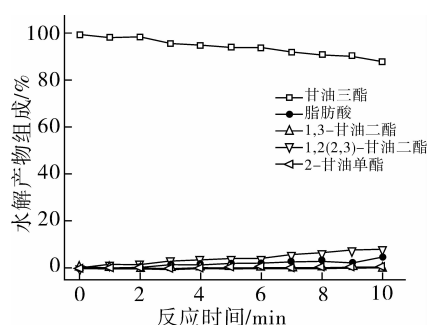


图1 rProROL 水解三油酸甘油酯

由图 1 可知,rProROL 催化水解反应 10 min 后的产物组成为:87.59% 的甘油三酯;0.28% 的 1,3-甘油二酯;7.48% 的 1,2(2,3)-甘油二酯;0.24% 的 2-甘油单酯和 4.42% 的脂肪酸;没有检测到 1(3)-甘油单酯。在催化水解反应起始后 10 min 内 1,2(2,3)-甘油二酯与 1,3-甘油二酯的比值从最初 1 min 时的 3.28 [1,2(2,3)-甘油二酯 1.31%, 1,3-甘油二酯 0.4%] 升高到 10 min 时的 26.71 [1,2(2,3)-甘油二酯 7.48%, 1,3-甘油二酯 0.28%]。这是由于 rProROL 催化三油酸甘油酯时先将甘油三酯中 sn-1 和 sn-3 位的脂肪酸水解,生成大量的 1,2-甘油二酯,这表明 rProROL 在催化水解甘油三酯时表现出明显的 1,3 位专一选择性。

2.2 rProROL 的脂肪酸特异性分析

天然的 ROL 脂肪酶对中长链脂肪酸具有很好的催化活性,特别是对 C8~C18 的脂肪酸。对 ROL 脂肪酶进行重组可以提高其催化活力,也可能会改变其对不同脂肪酸的催化活性。本研究以等摩尔量的 11 种脂肪酸的混合物为底物,与甘油进行酯化反应,通过分析不同脂肪酸酯化的程度来计算脂肪酸的竞争因子(α),从 α 的大小即可评价 rProROL 的脂肪酸特异性, α 的倒数($1/\alpha$)称为底物专一性常数(kcat/Km),用于评价脂肪酶的脂肪酸特异性,结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,rProROL 催化中链脂肪酸辛酸(C8:0)与甘油反应其竞争因子的倒数($1/\alpha$)可以达到 0.781 4,催化长链脂肪酸棕榈酸(C16:0)与甘油反应其竞争因子的倒数($1/\alpha$)可以达到 0.849 3,催化长链脂肪酸 EPA、DHA 与甘油反应其

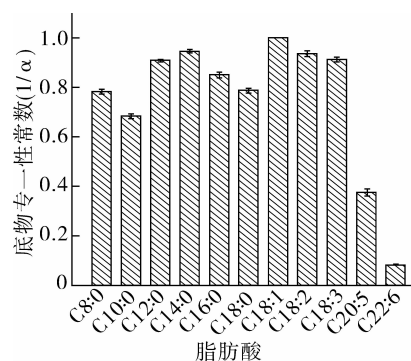


图2 rProROL 对脂肪酸的专一性常数

竞争因子的倒数($1/\alpha$)仅可以达到 0.374 2 和 0.08。rProROL 对中长链脂肪酸如辛酸(C8:0)、癸酸(C10:0)、月桂酸(C12:0)、肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)、亚麻酸(C18:3)等选择性较强,而对 EPA、DHA 的选择性较弱,特别是对 DHA 的选择性很弱,其对 EPA 和 DHA 的酯化活力分别为其催化油酸酯化活力的 37.42% 和 8%。鲛鱼中含有大量的 C18 和 C16 脂肪酸,因此,可以利用 rProROL 对不同脂肪酸的特异性来水解鲛鱼油富集 DHA。

2.3 鲛鱼油甘油酯中 DHA 位置分析

^{13}C NMR 法分析脂肪酸的位置分布是一种无损、快速、准确的方法,Tengku Mohamad Tengku - Rozain-aand^[10]等通过 ^{13}C NMR 方法分析了金枪鱼油中 EPA 和 DHA 在甘油三酯中的位置分布,具有良好的准确性。本研究用 600 MHz 的超导核磁共振波谱仪对鲛鱼油进行 ^{13}C 波谱分析,结果如图 3 所示。

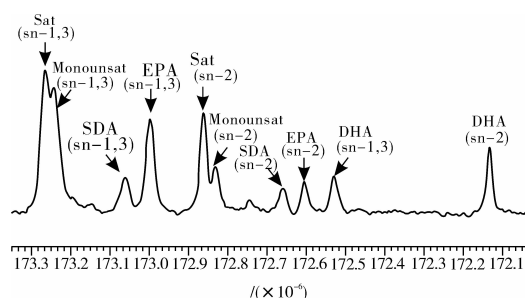


图3 ^{13}C NMR 分析鲛鱼油各脂肪酸的位置分布

注:Sat,饱和脂肪酸;Monounsatur,单不饱和脂肪酸。

利用 MestReNova 软件对鲛鱼油甘油酯 ^{13}C 波谱进行处理,发现 13.98% 的 EPA 分布在 sn-1,3 位,3.39% 的 EPA 分布在 sn-2 位,6.38% 的 SDA (十八碳四烯酸,C18:4) 分布在 sn-1,3 位,2.97% 的 SDA 分布在 sn-2 位,5.78% 的 DHA 分布在 sn-1,3 位,6.36% 的 DHA 分布在 sn-2 位。鲛鱼油中 DHA 主要分布在甘油三酯骨架的 sn-2 位上,

而 EPA、SDA、饱和脂肪酸(Sat)、单不饱和脂肪酸(Monounsaturate)则随机分布在甘油三酯的骨架上。可以利用具有 sn-1,3 位置专一性的脂肪酶水解鳕鱼油的 sn-1,3 位脂肪酸,将 DHA 富集在 1,2-甘油二酯和单甘油酯中。

2.4 rProROL 催化水解鳕鱼油富集 DHA 的研究

由 rProROL 水解三油酸甘油酯可知, rProROL 具有明显的 sn-1,3 位置专一性。核磁共振波谱分析鳕鱼油中甘油酯中脂肪酸的位置分布,发现 DHA 主要分布在甘油骨架的 sn-2 位。本研究利用 rProROL 水解鳕鱼油的 sn-1,3 位脂肪酸,将 DHA 富集在 1,2-甘油二酯和甘油单酯中,结果如图 4 所示。

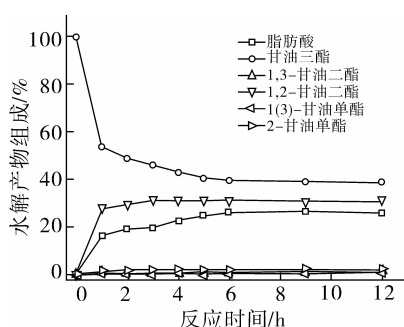


图4 rProROL 水解鳕鱼油

由图 4 可以看出,在反应开始的 1 h 内,鳕鱼油水解迅速,产生大量的脂肪酸和 1,2-甘油二酯。随着反应的进行,到 6 h 时基本达到平衡,此时产物中含有:甘油三酯(39.38%),1,2-甘油二酯(30.93%),1,3-甘油二酯(1.16%),2-甘油单酯(2.16%),1(3)-甘油单酯(0.44%),脂肪酸(26.06%)。将水解产物利用 TLC 分离后,利用 GC 分析分离得到 1,2-甘油二酯和甘油单酯的脂肪酸组成,发现 1,2-甘油二酯中 DHA 含量达到 19.7%,单甘酯(主要为 2-单甘酯)中 DHA 含量达到 25.2%,较未水解鳕鱼油中 DHA(12.1%)的含量有大幅提升,分别是其 1.63 倍和 2.08 倍, DHA 的回收率可以达到 65.6%。这主要是因为鳕鱼油中 DHA 主要分布在 sn-2 位,当 sn-1,3 位专一脂肪酶 rProROL 作用于鳕鱼油时, DHA 在水解产生的大量的 1,2-甘油二酯和甘油单酯中得以富集。

3 结论

本研究考察了重组米根霉脂肪酶(rProROL)的位置特异性和脂肪酸选择性,发现 rProROL 水解三油酸甘油酯时具有显著的 sn-1,3 位置专一性,且其催化 EPA 和 DHA 酯化时其活力分别为催化油酸

酯化活力的 37.42% 和 8%。¹³C NMR 分析结果表明,鳕鱼油中 DHA 主要分布在甘油骨架的 sn-2 位,将 rProROL 应用于水解鳕鱼油富集 DHA 研究表明,水解 6 h 后,反应基本达到平衡,此时产物中含有:甘油三酯(39.38%),1,2-甘油二酯(30.93%),1,3-甘油二酯(1.16%),2-甘油单酯(2.16%),1(3)-单甘酯(0.44%),脂肪酸(26.06%)。气相色谱分析表明,水解产生的 1,2-甘油二酯中 DHA 含量达到 19.7%,单甘酯(主要为 2-甘油单酯)中 DHA 含量达到 25.2%,较未水解鳕鱼油中 DHA(12.1%)的含量有大幅提升, DHA 的回收率可以达到 65.6%。rProROL 水解鳕鱼油富集 DHA 具有一定的研究价值与前景,本研究为将来 rProROL 应用于水解鳕鱼油富集 DHA 提供了依据。

参考文献:

- [1] LI Z, LI X, WANG Y, et al. Expression and characterization of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for enzymatic biodiesel production [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(20): 9810-9813.
- [2] DI LORENZO M, HIDALGO A, HAAS M, et al. Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8974-8977.
- [3] DURATE S H, DEL PESO HERNANDEZ G L, CANET A, et al. Enzymatic biodiesel synthesis from yeast oil using immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 183:175-180.
- [4] LI D, QIN X, WANG J, et al. Hydrolysis of soybean oil to produce diacylglycerol by a lipase from *Rhizopus oryzae* [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 115:43-50.
- [5] WANG W F, LI T, NING Z X, et al. A process for the synthesis of PUFA-enriched triglycerides from high-acid crude fish oil [J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 109(3): 366-371.
- [6] 杨博,杨继国,吕杨效,等. 脂肪酶催化鱼油醇解富集 EPA 和 DHA 的研究[J]. *中国油脂*, 2005, 30(8): 64-67.
- [7] 宋诗军,夏松养,林晓坪,等. 酶法制备高含量 EPA、DHA 甘油酯[J]. *农业机械*, 2013(11): 47-51.
- [8] QIN X L, HUANG H H, WANG Y H, et al. Typospecificity of Crude *Geobacillus* sp. T1 Lipase Fused with a Cellulose-Binding Domain and Its Use in the Synthesis of Structured Lipids [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2014, 91(1): 55-62.
- [9] RANGHEARD M S, LANGRAND G, TRIANTAPHYLIDES C, et al. Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acid specificity [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, 1004(1): 20-28.
- [10] TENGKU-ROZAINA AND T M, BIRCH E J. Positional distribution of fatty acids on hoki and tuna oil triglycerides by pancreatic lipase and ¹³C NMR analysis [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2014, 116:272-281.