

母乳化结构脂制备研究进展

刘汝慧, 孙博涵, 陈玉洁*, 吕欣*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100)

摘要: 母乳脂可以为婴儿提供约 50% 的能量, 并且其特殊的成分组成和脂肪酸位置分布, 对婴儿的生长发育具有重要的生理功能。婴幼儿配方奶粉作为母乳最好的替代品, 其脂质成分和功能应与母乳脂最大程度保持一致才能满足婴幼儿的生理需求。目前, 婴幼儿配方奶粉中主要以添加 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯和长链多不饱和脂肪酸来使其脂质成分和功能更加贴近母乳。而中国母乳中含量最丰富的 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯和具有重要生理功能的中长链甘油三酯的制备还未受到广泛重视。脂肪酶可利用其特定的选择性控制脂肪酸在甘油三酯中的位置分布, 因此被广泛应用于结构脂的制备中。本文主要阐述了脂肪酶法制备母乳化结构脂的研究现状, 以及今后利用分子改造技术提高脂肪酶的催化性能, 尤其是选择性, 为未来母乳化结构脂的发展和研究方向提供了新的思路, 对国产婴幼儿配方奶粉的产业升级具有重要意义。

关键词: 母乳化结构脂; 制备; 脂肪酶; 分子改造

Research progress in the preparation of human milk fat substitutes

LIU Ru-Hui, SUN Bo-Han, CHEN Yu-Jie*, LV Xin*

(College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, 712100, China)

ABSTRACT: Human milk fat not only provide around 50% of the energy for infants, but has significant physiological function for the growth and development of infants, owing to its unique components composition and fatty acids distribution. Infant formula as the best substitute for human milk, its lipids composition and function should be maximum consistency with human milk to meet the physiological needs of infants. At present, 1,3-dioleate-2-palmitate triglyceride and long-chain polyunsaturated fatty acids are mainly added to infant formula to make its lipid composition and function closer to human milk. Nonetheless, the preparation of 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleoylglycerol, the most abundant substance in human milk of China, and medium/long-chain triacylglycerol, which has important physiological function, still receive limited attention. Lipases have specific selectivity to manage the distribution of fatty acids in triacylglycerol, revealing their widely application in the preparation of structural fat. This article mainly expounded the research status of lipase prepared milk fat structure, as well as future using molecular modification technology to

基金项目: 西北农林科技大学 2020 年博士科研启动项目(Z1090220300)

Fund: Supported by the Launch of Doctoral Research in 2020, Northwest Agriculture and Forestry University (Z1090220300)

***通信作者:** 陈玉洁, 博士, 副教授, 主要研究方向为母乳中脂质组成及结构的解析、婴幼儿配方奶粉中仿母乳结构脂的制备。E-mail: chen_yujie@nwsuaf.edu.cn

吕欣, 博士, 教授, 主要研究方向为采用现代分子生物学与发酵工程理论和技术解决生产中的基础和应用问题。E-mail: xinlu@nwsuaf.edu.cn

***Corresponding author:** CHEN Yu-Jie, Ph.D, Associate Professor, College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China. E-mail: chen_yujie@nwsuaf.edu.cn

LV Xin, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China. E-mail: xinlu@nwsuaf.edu.cn

improve the catalytic performance of lipase, especially the selectivity, so as to provide a new idea for the development and research direction of human milk fat substitutes in the future, and have significance for the industrial upgrading of domestic infant formula milk powder.

KEY WORDS: human milk fat substitutes; preparation; lipase; molecular modification

0 引言

母乳中的脂质是婴儿获取能量的主要来源, 约占母乳的 3%~5%, 其中 98%都为甘油三酯^[1]。母乳甘油三酯的分子组成及其脂肪酸的特殊位置分布对婴儿的生长发育有着重要意义^[2]。目前, 婴幼儿配方奶粉中的脂质成分都是基于国外母乳的脂质组分开发。1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯(1,3-diacylglycerol-2-palmitoylglycerol, OPO)由于在欧美等国家的母乳甘油三酯中含量最高, 因此一直是研究的热点。有研究发现, 中国母乳中含量最丰富的甘油三酯是 1-油酸-2-棕榈酸-3-亚油酸甘油三酯(1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleoylglycerol, OPL), 其主要位置异构体 *rac*-OPL (85%以上) 含有两种含量不等的对映异构体 (*R*)-OPL 和 (*S*)-OPL^[3]。但是, 传统制备方法中使用的 sn-1,3 位置选择性脂肪酶, 无法合成含量不等、功能不同的两种对映异构体, 所以 OPL 的制备还未能产业化, 无法添加到婴幼儿配方奶粉中。母乳中的长链多不饱和脂肪酸(long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA), 如二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)、二十碳四烯酸(eicosatetraenoic acid, ARA)等, 对婴幼儿视觉和神经系统的发育具有重要作用^[4], 一直是婴幼儿配方奶粉中重点添加的成分。中长链甘油三酯(medium and long-chain triacylglycerol, MLCT)总含量约占母乳中总甘油三酯的 30%^[5]。但是, 婴幼儿配方奶粉中几乎不含与母乳脂结构相似的 MLCT, 并且, 目前以母乳甘油三酯为模板制备 MLCT 尚未受到重点关注。

脂肪酶制备母乳化结构脂, 具有合成条件温和、副产物少、可回收利用、不需要辅助因子等优点, 并可通过特定的位置选择性控制脂肪酸在结构脂中的位置分布^[6], 应用前景广阔。但脂肪酶存在热稳定性差、选择性不足等问题, 致使反应产物得率低, 成分组成复杂、不理想。因此, 往往需要通过基因工程、蛋白质工程、固定化技术等调整脂肪酶的选择性和催化性能, 使其能够精准合成母乳化结构脂。本文通过总结分析近年来母乳化结构脂制备的研究现状, 从结构和功能的角度阐明目前母乳化结构脂存在的问题, 对今后母乳化结构脂的发展和研究方向具有指导意义。

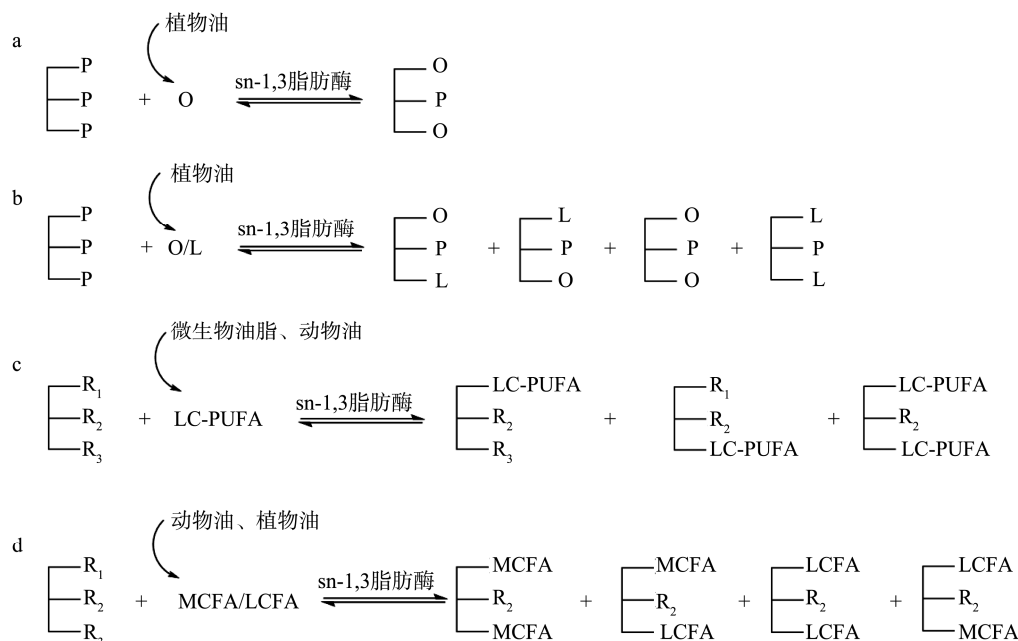
1 母乳化结构脂的制备

1.1 1,3-二不饱和脂肪酸-2-棕榈酸甘油三酯的制备

母乳中大于 70%的棕榈酸分布在甘油三酯的 sn-2 位, 这种特殊的分布能够促进婴儿体内棕榈酸和钙离子的吸

收, 防止婴儿便秘^[7]。为了满足棕榈酸在母乳甘油三酯中的特殊分布, 1,3-二不饱和脂肪酸-2-棕榈酸甘油三酯(1,3-diunsaturated fatty acid-2-palmitin triacylglycerols, UPU)的制备一直是研究的热点^[8]。如图 1 中 a、b 过程所示, UPU 型结构脂通常以从棕榈仁油或椰子油中分离出的三棕榈酸甘油酯为原料, 添加富含油酸或亚油酸的植物油, 例如大豆油、菜籽油等, 使用 sn-1,3 位置选择性的脂肪酶(EC3.1.1.3), 通过酯交换反应制备而得。但是植物油经过反应后其甘油三酯的 sn-1,3 位仍含有大量的棕榈酸, 位于 sn-1,3 位的棕榈酸会以游离的形式存在于婴儿的肠道中, 易与体内钙离子结合形成不溶性皂钙, 增加大便硬度, 造成婴儿便秘甚至肠堵塞。猪油由于富含 sn-2 位棕榈酸, 也是早期制备母乳化结构脂的原料来源^[1], 但因宗教信仰等原因, 实际生产过程中并不能将猪油作为制备结构脂的原料来源。

目前, 制备 UPU 型结构脂通常分为一步法和多步法, 一步法工艺较为简单, 但获得的产率和纯度不高。例如, LEE 等^[9]采用一步法制备 OPO, 在最优条件下, OPO 含量为 31.34%。ESTEBAN 等^[10]采用两步法制备 OPO, 最终获得 sn-1,3 位油酸含量为 67.5%, sn-2 位棕榈酸含量为 66.0%的 OPO。尽管目前某些品牌的婴幼儿配方奶粉中已经通过添加 OPO 来调整脂质中 sn-2 位棕榈酸的含量, 但其成分组成和功能仍然与中国母乳脂差异巨大^[11]。SUN 等^[12]通过对中国市场上 180 种商业婴幼儿配方奶粉中甘油三酯成分进行分析, 得出结论, 虽然在含有 OPO 的婴幼儿配方奶粉中, OPO 的含量没有显著差异, 但是 sn-2 位的棕榈酸含量仍低于母乳水平。由于中国母亲摄入的食用油(尤其是大豆油、菜籽油和葵花籽油等)中亚油酸的含量较高^[13], 致使中国母乳中 OPL 的含量远高于 OPO。而中国母乳中甘油三酯的分子组成和同分异构体的分析起步较晚, 目前只有 CHEN 等^[3]检测出 OPL 的主要位置异构体为 *rac*-OPL (85%以上), 其含有两种含量不等的对映异构体 (*R*)-OPL 和 (*S*)-OPL, 由于 sn-1 位和 sn-3 位脂肪酸在婴儿脂质消化过程中的作用不同, (*R*)-OPL 和 (*S*)-OPL 具有不同的生理功能, 婴幼儿配方奶粉应当与母乳保持一致, 添加 OPL 主要的同分异构体, 如含量不等的 (*R*)-OPL 和 (*S*)-OPL, 才能满足婴儿的生理需求。GAO 等^[6]通过两步酸解法制备 OPL, 优化条件后, OPL 含量为 57.7%, 但是并没有考虑 OPL 的同分异构体组成。此外, 适用于制备 OPO 的 sn-1,3 特异选择性脂肪酶并不完全适用于 OPL 的制备, 如图 1b 所示,



注: a: OPO 的制备原理, b: OPL 的制备原理, c: LC-PUFA 的添加原理, d: MLCT 的制备原理; 油酸(oleic acid, O), 亚油酸(linoleic acid, L), 棕榈酸(palmitic acid, P), 中链脂肪酸(medium-chain fatty acid, MCFA), 长链脂肪酸(long-chain fatty acid, LCFA); R₁, R₂, R₃: 甘油三酯中的脂肪酸分子(fatty acid molecules in triglycerides)。

图 1 不同原料来源制备母乳化结构脂的原理

Fig.1 Principle of preparation of human milk fat substitutes from different raw materials

在 OPL 的生产过程中, 1,3-二亚油酸-2-棕榈酸甘油三酯(1,3-dilinoleoyl-2-palmitoylglycerol, LPL)和 1-亚油酸-2-棕榈酸-3-油酸甘油三酯(1-linoleoyl-2-palmitoyl-3-oleoylglycerol, LPO)的产生也极大地影响着 OPL 的合成率。因此, 目前并没有生产出可以添加到婴幼儿配方奶粉中的 OPL 成品。

1.2 LC-PUFA 的添加

如图 1c 所示, 婴幼儿配方奶粉中添加的 LC-PUFA 主要来自微生物油脂, 例如从真核藻类中提取 DHA 的二十二碳六烯酸单细胞油(single cell oil of docosahexaenoic acid, DHASCO)和从真菌高山被孢霉中提取 ARA 的花生四烯酸单细胞油(peanut tetroderite single cell oil, ARASCO)^[14]。微生物油脂中含有丰富的 LC-PUFA, 其产油率高, 获取途径较多, 例如微藻可以在海洋、淡水和沼泽地等水生环境中生长, 也可以在废水和微咸水中培养^[15], 并且培养条件易于控制, 与动物油相比, 天然微藻油更加适合作为提供 LC-PUFA 的原料来源^[16-20]。HE 等^[18]评估了 12 种天然微藻油产生的甘油三酯, 结果表明, 从等鞭金藻获得的甘油三酯最有望成为制备母乳化结构脂的原料来源。WANG 等^[21]制备出 sn-2 位含有 ARA 的结构脂, 其中 ARA 含量为 9.8%。ÁLVAREZ 等^[14]采用富含 DHA 和 ARA 的单细胞油通过酶促酯交换反应成功合成 sn-2 位同时含有 DHA 和 ARA 的结构脂。FAUSTINO 等^[22]通过将三棕榈酸甘油酯与茶油混合,

制备出 sn-1,3 位富含 α -亚麻酸, sn-2 位富含棕榈酸的甘油三酯。LC-PUFA 在母乳中的含量很少, 其检测与分析存在一定的局限性, 因此, 对于 LC-PUFA 在母乳甘油三酯中的位置分布尚存在争议, 进而导致其在制备过程中的模板也存在争议。SUN 等^[23]对中国市场上 180 种商业婴幼儿配方奶粉进行了 LC-PUFA 含量分析, 几乎所有的配方奶粉都含有 DHA 和 ARA, 但其含量均远低于中国母乳水平^[24]。

目前, 商业婴幼儿配方奶粉多以添加 DHA 和 ARA 来补充婴儿所需的 LC-PUFA, 但是对婴儿生长发育同样重要的二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十四碳一烯酸(神经酸)等其他 LC-PUFA 的研究较少, 未来应不断升级检测技术, 选择更加精准的分析方法, 明确母乳中 DHA、ARA、EPA 等 LC-PUFA 的含量及在母乳甘油三酯中的位置分布, 为制备母乳化结构脂提供更加合适的模板。

1.3 MLCT 的制备

MCFA 可以直接被门静脉吸收, 快速为婴幼儿提供能量, 是婴幼儿配方奶粉中的重要成分之一^[25]。由于椰子油和棕榈仁油含有高浓度的 MCFA, 尤其是月桂酸和肉豆蔻酸, 因此, 常用于 MCFA 补充剂添加到婴幼儿配方奶粉中^[26]。YUAN 等^[27]采用巴沙鲶鱼油和椰子油通过酶促酯交换反应合成 MLCT, 含量为 62.14%, 其中 MLL 型(不包含位置分布)甘油三酯含量为 39.85%。目前, 有关 MLCT 制备的研究较少, 已有的相关研究其在制备过程中并没有考虑甘油三酯

中 MCFA 及 LCFA 的位置分布, 根据 CHEN 等^[11]之前的研究发现 MCFA 通常位于母乳甘油三酯的 sn-2 位(30%~34%)和 sn-3 位(45%~50%), LCFA 通常位于母乳甘油三酯的 sn-1 位(约 30%)和 sn-2 位(约 67%), 以及同一种脂肪酸在不同位置的含量分布, 例如肉豆蔻酸约 25%位于 sn-1 位, 约 70%位于 sn-2 位, 约 5%位于 sn-3 位。因此, 现制备的 MLCT 仍与母乳存在着较大的差异, 并不能完全替代母乳中 MLCT 的生理功能。近 5 年母乳化结构脂制备的研究现状如表 1 所示。

通过脂肪酶制备母乳化结构脂是目前应用最广泛的制备方法。其中米黑根毛酶脂肪酶(lipozyme RM IM, RML), 南极假丝酵母脂肪酶 B (lipase B from *Candida antarctica*, CALB)和疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶(lipozyme TL IM, TLL) 由于能够很好地抑制 sn-2 位棕榈酸的酰基转移, 在 sn-2 位棕榈酸脂的制备中应用最广。但由于脂肪酶的选择性和稳定性的限制, 往往导致其反应效率低、反应产物不理想、生产成本高等问题。因此, 脂肪酶需要通过基因工程、蛋白质工程、固定化技术等来调整脂肪酶的结构和催化性能,

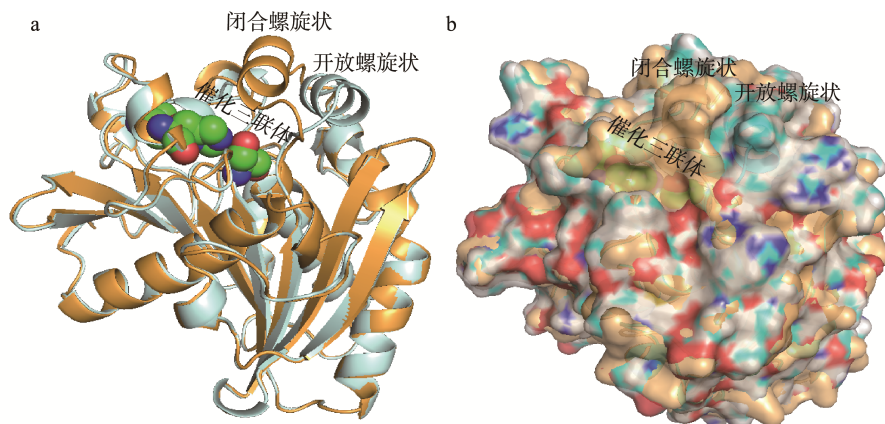
使其能够更好地应用于母乳化结构脂的制备中。

2 脂肪酶的分子改造策略

脂肪酶是一种 α/β 水解酶, 催化位点由 Ser-His-Asp (丝氨酸-组氨酸-天冬氨酸, 一些脂肪酶中谷氨酸会代替天冬氨酸)催化三联体和氧负离子洞组成^[33]。多数脂肪酶的活性中心都被一段两亲性的 α -螺旋结构覆盖, 形成类似“盖子”状的结构(图 2)。当脂肪酶分子接触油-水界面或疏水界面时, “盖子”结构被打开, 暴露出活性部位, 便于疏水性底物与酶活性中心接触, 这称为脂肪酶的“界面激活”现象^[34]。脂肪酶的催化活性和选择性是由脂肪酶的分子结构和构象决定的。研究表明, 影响脂肪酶选择性的分子因素主要包括脂肪酶拓扑结构与其底物之间的空间互补性、催化位点周围残基与四面体中间体之间的氢键、脂肪酶区域结构的灵活性等^[35]。通过蛋白质工程、固定化技术等控制这些分子因素, 即可控制脂肪酶的选择性和催化性质。

表 1 母乳化结构脂制备的研究现状
Table 1 Research status of preparation of human milk fat substitutes

结构脂	脂肪酸类型	方法	所用脂肪酶	地区	文献
OPL	UPU	酸解反应	NS40086	无锡	[6]
OPL	UPU	酸解反应	NS40086	无锡	[28]
OPO、OPL	UPU	酸解反应	NS40086	无锡	[29]
OPO、OPL	UPU	酯交换反应	lipozyme RM IM lipozyme TL IM	北京	[30]
sn-2 位含有 PA/ARA	LC-PUFA	酸解反应	lipozyme RM IM	无锡	[21]
MLCT	MCFA、LCFA	酸解反应	lipozyme RM IM	无锡	[20]
MLCT	MCFA、LCFA	酯交换反应	lipozyme RM IM lipozyme TL IM NS 40086	无锡	[27]
MLCT	MCFA、LCFA	酸解反应	lipozyme AOAB8	杭州	[31]
MLCT	MCFA、LCFA	酯交换反应	lipozyme 435	无锡	[32]



注: a: 开放状态; b: 闭合状态。

图 2 RML 脂肪酶的三维结构图

Fig.2 Three-dimensional structure diagram of RML lipase

2.1 蛋白质工程

采用蛋白质工程在分子水平上改造酶本身的性质是提高酶催化性能非常有效的策略。然而, 在母乳化结构脂的制备过程中, 无法对反应产物进行高通量检测, 限制了脂肪酶突变体的高通量筛选。因此, 蛋白质工程中的定向进化和半理性设计策略由于大容量的突变库和需要高通量的筛选方法并不适用于相关脂肪酶的分子改造^[36-38]。而理性设计策略由于能够生成小型高质量的设计酶库, 规避了迭代、高通量的实验筛选方法, 基于对脂肪酶的结构、序列、功能和催化机制相关的知识, 进而能够更高效地预测脂肪酶突变体所需的氨基酸残基, 为应用于母乳化结构脂的脂肪酶分子改造提供了可能性。如很多研究在分子对接或分子动力学模拟获得的酶-底物复合物结构的基础上, 通过改变脂肪酶催化口袋的拓扑结构^[39], 提高脂肪酶对底物的空间排斥效应, 从而限制底物的取向, 以提高脂肪酶的选择性。或基于过渡态中间体对脂肪酶进行从头设计控制催化位点周围残基与四面体中间体之间的氢键, 获得理想的脂肪酶突变体^[35]。BRUNDIEK 等^[40]通过理性设计对南极假丝酵母脂肪酶 A (*Candida antarctica* lipase A, CAL-A) 进行了改造, 阻断位于 G237 位置的 CAL-A 的初级酰基结合通道, 通过关闭与主通道的连接, 创建了 CAL-A 变体 (G237A/L/V/Y), 使其对 MCFA 具有高度选择性。

计算酶设计已经成为预测特定位点突变对蛋白质稳定性、活性和选择性影响的强有力工具^[41]。目前, 很多酶设计的计算方法和工具已经被开发并使用, 如 Rosetta^[42]、FoldX^[43]、FuncLib^[44]等。随着深度学习技术的进步, AlphaFold 2^[45]、RoseTTAFold^[46]先后问世, 大幅度提高了蛋白质结构的预测水平^[47]。而蛋白质设计本质上是与蛋白质结构预测的互逆问题, 同样迎来了新的机遇。如蛋白质设计专家 David Baker 团队提出的 RFDesign 蛋白质设计方法是以 RoseTTAFold 神经网络模型为核心, 能够准确地设计生成包含特定功能位点的蛋白质。并且该方法采用 AlphaFold 2 对新设计的蛋白结构进行高精度的正交验证, 大大降低了利用传统实验对新设计的蛋白结构和功能进行评价和表征的工作量^[48]。这为改造脂肪酶应用于母乳化结构脂中提供了新的研究思路。

2.2 脂肪酶固定化

由于脂肪酶的“界面激活”现象, 采用疏水性载体对脂肪酶进行固定化可以有效提高脂肪酶的催化活性^[49]。同时, 通过固定化技术可有效控制脂肪酶的构象变化和区域结构的灵活性, 从而提高脂肪酶的选择性^[50]。脂肪酶通过固定化, 可有效提高酶回收和再利用的可能性, 并且具有产品易于纯化、效率高、可应用于连续固定床操作等优点, 因此, 固定化技术被广泛用于提高脂肪酶的催化性能。ZHENG 等^[51]通过疏水和阳离子交换作用, 将 *Candida*

lipolytica 脂肪酶(CLL)固定在磁性多壁碳纳米管(magnetic multiwalled carbon nanotubes, mMWCNT)上, 结果表明, 与游离态相比, 固定化 CLL 具有更好的热稳定性、生物催化活性, 并且易于回收利用, 该研究以固定化 CLL 为生物催化剂, 通过酸解反应成功合成 OPO 结构脂。GHIDE 等^[52]利用吸附在 mMWCNT 上的 *Rhizomucor miehei* 脂肪酶, 通过两步酸解反应合成富含 OPO 的结构脂, 结果表明, 固定化脂肪酶(mMWCNT-COOH-RML)具有较好的热稳定性, mMWCNT-COOH-RML 也比传统的商业脂肪酶 Lipozyme RM IM 表现出更好的重复使用性和催化活性。TECELAO 等^[53]将 *Candida parapsilosis* 脂肪酶固定在 Accurel MP1000 中, 通过酯交换反应成功合成 OPO 结构脂, 固定化后的 CpLIP2 脂肪酶表现出更高的活性和选择性。

3 结束语

母乳化结构脂是婴幼儿配方奶粉中重要的功能性配料, 突破其关键制备技术瓶颈能够有效促进婴幼儿配方奶粉的产业升级, 使国产婴幼儿配方奶粉向高端、超高端行列发展。尽管目前国内婴幼儿配方奶粉中已经通过添加 OPO 来调整脂质中 sn-2 位棕榈酸的含量, 但其成分组成和功能仍然与中国母乳脂相差巨大。目前, 母乳化结构脂在 OPL 及其同分异构体的制备、LC-PUFA 在甘油三酯中的位置分布、MCFA 和 LCFA 在 MLCT 中的含量及位置分布均存在诸多问题, 因此, 这些问题将是未来母乳化结构脂的重点研究对象。脂肪酶的选择性、热稳定性往往是造成反应产物不理想的根本原因。随着对脂肪酶催化反应机制、选择性识别机制的深入研究, 根据特定需求对脂肪酶进行设计和改造将是突破母乳化结构脂制备技术瓶颈的主要途径之一。近几年, 蛋白质设计技术和酶固定化技术的快速发展为母乳化结构脂的高效制备迎来了发展契机, 其可按需求特定改造脂肪酶为母乳化结构脂行业发展注入了新鲜血液, 使制备新型高质量的母乳化结构脂成为可能。

参考文献

- [1] WEI W, JIN Q, WANG X. Human milk fat substitutes: Past achievements and current trends [J]. *Prog Lipid Res*, 2019, 74: 69-86.
- [2] CHEN YJ, ZHOU XH, HAN B, *et al.* Composition analysis of fatty acids and stereo-distribution of triglycerides in human milk from three regions of China [J]. *Food Res Int*, 2020, 133: 109196.
- [3] CHEN YJ, ZHOU XH, HAN B, *et al.* Regioisomeric and enantiomeric analysis of primary triglycerides in human milk by silver ion and chiral HPLC atmospheric pressure chemical ionization-MS [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(9): 7761-7774.
- [4] 于修焯. 食品脂类学[M]. 北京: 科学出版社, 2021.
YU XZ. *Food lipology* [M]. Beijing: Science Press, 2021.
- [5] LU J, JIN Q, WANG X, *et al.* Preparation of medium and long chain triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a solvent-free

- system [J]. *Process Biochem*, 2017, 54: 89–95.
- [6] GAO L, CHENG X, YU X, *et al.* Lipase-mediated production of 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleoylglycerol by a two-step method [J]. *Food Biosci*, 2020, 36: 100678.
- [7] 杜芳芳, 李建平, 郑晓辉, 等. 母乳及婴幼儿配方奶粉中脂肪酸的组成及分布特点[J]. *食品科学*, 2015, 36(11): 245–250.
DU FF, LI JP, ZHENG XH, *et al.* Characteristics of fatty acid composition and distribution in human milk and infant formulas [J]. *Food Sci*, 2015, 36(11): 245–250.
- [8] 张星河, 韦伟, 李菊芳, 等. 母乳 1,3-二不饱和脂肪酸-2-棕榈酸甘油三酯(UPU)的组成与营养功能[J/OL]. *中国油脂*, 1-12. [2022-07-15]. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220031>
ZHANG XH, WEI W, LI JF, *et al.* Composition of 1,3-diunsaturated fatty acid-2-palmitin triacylglycerols (UPU) in human milk and their functions [J/OL]. *China Oils and Fats*, 1-12. [2022-07-15]. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220031>
- [9] LEE JH, SON JM, AKOH CC, *et al.* Optimized synthesis of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich triacylglycerol via interesterification catalyzed by a lipase from *Thermomyces lanuginosus* [J]. *New Biotechnol*, 2010, 27(1): 38–45.
- [10] ESTEBAN L, JIMENEZ MJ, HITA E, *et al.* Production of structured triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position and oleic acid at sn-1, 3 positions as human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis [J]. *Biochem Eng J*, 2011, 54(1): 62–69.
- [11] CHEN Y, ZHANG X, LI D, *et al.* Fatty acid and triacylglycerol comparison of infant formulas on the Chinese market [J]. *Int Dairy J*, 2019, 95: 35–43.
- [12] SUN C, WEI W, ZOU X, *et al.* Evaluation of triacylglycerol composition in commercial infant formulas on the Chinese market: A comparative study based on fat source and stage [J]. *Food Chem*, 2018, 252: 154–162.
- [13] WANG L, LI X, HUSSAIN M, *et al.* Effect of lactation stages and dietary intake on the fatty acid composition of human milk (a study in northeast China) [J]. *Int Dairy J*, 2020, 101: 104580.
- [14] ÁLVAREZ CA, AKOH CC. Enzymatic synthesis of high sn-2 DHA and ARA modified oils for the formulation of infant formula fat analogues [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2016, 93(3): 383–395.
- [15] XUE Z, WAN F, YU W, *et al.* Edible oil production from microalgae: A review [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2018, 120(6): 1700428.
- [16] MATOS J, CARDOSO C, BANDARRA NM, *et al.* Microalgae as healthy ingredients for functional food: A review [J]. *Food Funct*, 2017, 8(8): 2672–2685.
- [17] BERNAERTS TMM, GHEYSEN L, KYOMUGASHO C, *et al.* Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides [J]. *Algal Res*, 2018, 32: 150–161.
- [18] HE Y, WU T, SUN H, *et al.* Comparison of fatty acid composition and positional distribution of microalgae triacylglycerols for human milk fat substitutes [J]. *Algal Res*, 2019, 37: 40–50.
- [19] HU X, YE Y. Improving infant formula using algae from the sea [J]. *Plant Physiol*, 2022, 73: 1594–1605.
- [20] ZOU X, YE LF, HE X, *et al.* Preparation of DHA-rich medium-and long-chain triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis of microbial oil from *Schizochytrium* sp. with medium-chain fatty acids [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 191(3): 1294–1314.
- [21] WANG X, ZOU S, MIU Z, *et al.* Enzymatic preparation of structured triacylglycerols with arachidonic and palmitic acids at the sn-2 position for infant formula use [J]. *Food Chem*, 2019, 283: 331–337.
- [22] FAUSTINO AR, OSORIO NM, TECELAO C, *et al.* *Camelina* oil as a source of polyunsaturated fatty acids for the production of human milk fat substitutes catalyzed by a heterologous *Rhizopus oryzae* lipase [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2016, 118(4): 532–544.
- [23] SUN C, ZOU X, YAO Y, *et al.* Evaluation of fatty acid composition in commercial infant formulas on the Chinese market: A comparative study based on fat source and stage [J]. *Int Dairy J*, 2016, 63: 42–51.
- [24] QI C, SUN J, XIA Y, *et al.* Fatty acid profile and the sn-2 position distribution in triacylglycerols of breast milk during different lactation stages [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(12): 3118–3126.
- [25] YUAN T, GENG Z, DAI X, *et al.* Triacylglycerol containing medium-chain fatty acids: Comparison of human milk and infant formulas on lipolysis during *in vitro* digestion [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(14): 4187–4195.
- [26] 袁婷兰. 母乳脂的中长链甘油三酯组成及其代谢特征[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
YUAN TL. The composition and metabolic characteristics of medium-and long chain triacylglycerol in human milk fat [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [27] YUAN T, WEI W, WANG X, *et al.* Biosynthesis of structured lipids enriched with medium and long-chain triacylglycerols for human milk fat substitute [J]. *LWT*, 2020, 128: 109255.
- [28] WANG X, HUANG Z, HUA L, *et al.* Preparation of human milk fat substitutes similar to human milk fat by enzymatic acidolysis and physical blending [J]. *LWT*, 2021, 140: 110818.
- [29] WANG X, JIANG C, XU W, *et al.* Enzymatic synthesis of structured triacylglycerols rich in 1, 3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol and 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleoylglycerol in a solvent-free system [J]. *LWT*, 2020, 118: 108798.
- [30] SUN D, LI S, SHANG J, *et al.* Process optimization of simultaneous enzymatic production of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol and 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleoylglycerol [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2021, 98(12): 1167–1176.
- [31] LI Y, LI C, FENG F, *et al.* Synthesis of medium and long-chain triacylglycerols by enzymatic acidolysis of algal oil and lauric acid [J]. *LWT*, 2021, 136: 110309.
- [32] KORMA SA, ZOU X, ALI AH, *et al.* Preparation of structured lipids enriched with medium-and long-chain triacylglycerols by enzymatic interesterification for infant formula [J]. *Food Bioprod Process*, 2018, 107: 121–130.
- [33] MELANI NB, TAMBOURGI EB, SILVEIRA E. Lipases: From production to applications [J]. *Sep Purif Rev*, 2020, 49(2): 143–158.
- [34] RODRIGUES RC, VIRGEN-ORTIZ JJ, DOS-SANTOS JCS, *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: Immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions [J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(5): 746–770.
- [35] CHEN H, MENG X, XU X, *et al.* The molecular basis for lipase stereoselectivity [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2018, 102(8): 3487–3495.
- [36] QU G, LI A, ACEVEDO-ROCHA CG, *et al.* The crucial role of

- methodology development in directed evolution of selective enzymes [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59(32): 13204–13231.
- [37] ALBAYATI SH, MASOMIAN M, ISHAK SNH, *et al.* Main structural targets for engineering lipase substrate specificity [J]. *Catalysts*, 2020, 10(7): 747.
- [38] LOVELOCK SL, CRAWSHAW R, BASLER S, *et al.* The road to fully programmable protein catalysis [J]. *Nature*, 2022, 606(7912): 49–58.
- [39] MALDONADO MR, ALNOCH RC, ALMEIDA JM, *et al.* Key mutation sites for improvement of the enantioselectivity of lipases through protein engineering [J]. *Biochem Eng J*, 2021, 172: 108047.
- [40] BRUNDIEK H, PADHI SK, 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]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2012, 114(10): 1148–1153.
- [41] OTTEN R, PADUA RAP, BUNZEL HA, *et al.* How directed evolution reshapes the energy landscape in an enzyme to boost catalysis [J]. *Science*, 2020, 370(6523): 1442–1446.
- [42] LEMAN JK, WEITZNER BD, LEWIS SM, *et al.* Macromolecular modeling and design in Rosetta: Recent methods and frameworks [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(7): 665–680.
- [43] BUB O, RUDAT J, OCHSENREITHER K. FoldX as protein engineering tool: Better than random based approaches? [J]. *Comput Struct Biotechnol*, 2018, 16: 25–33.
- [44] KHERSONSKY O, LIPSH R, AVIZEMER Z, *et al.* Automated design of efficient and functionally diverse enzyme repertoires [J]. *Mol Cell*, 2018, 72(1): 178–186.
- [45] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold [J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583–589.
- [46] BAEK M, DIMAIO F, ANISHCHENKO I, *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network [J]. *Science*, 2021, 373(6557): 871–876.
- [47] SENIOR AW, EVANS R, JUMPER J, *et al.* Improved protein structure prediction using potentials from deep learning [J]. *Nature*, 2020, 577(7792): 706–710.
- [48] WANG J, LISANZA S, JUERGENS D, *et al.* Deep learning methods for designing proteins scaffolding functional sites [Z]. 2021.
- [49] RODRIGUES RC, VIRGEN-ORTIZ JJ, DOS-SANTOS JCS, *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: Immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions [J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(5): 746–770.
- [50] LI K, WANG J, HE Y, *et al.* Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles [J]. *Chem Eng J*, 2018, 351: 258–268.
- [51] 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 Chem*, 2017, 228: 476–483.
- [52] GHIDE MK, LI K, WANG J, *et al.* Effective production of human milk fat substitutes rich in 1,3-dioleoyl-2-palmitoyl glycerol (OPO) via new strategy [J]. *Food Biophys*, 2022. DOI: 10.1007/s11483-022-09723-0
- [53] TECELAO C, PERRIER V, DUBREUCQ E, *et al.* Production of human milk fat substitutes by interesterification of tripalmitin with ethyl oleate catalyzed by *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2019, 96(7): 777–787.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

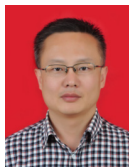
作者简介



刘汝慧, 硕士研究生, 主要研究方向为婴幼儿配方奶粉中仿母乳结构脂的制备。
E-mail: 927013285@qq.com



陈玉洁, 博士, 副教授, 主要研究方向为母乳中脂质组成及结构的解析、婴幼儿配方奶粉中仿母乳结构脂的制备。
E-mail: chen yujie@nwfufu.edu.cn



吕 欣, 博士, 教授, 主要研究方向为采用现代分子生物学与发酵工程理论和技术解决生产中的基础和应用问题。
E-mail: xinlu@nwsuaf.edu.cn