



脂肪酶 催化反应化学

辛嘉英 等 编著



科学出版社

脂肪酶催化反应化学

辛嘉英 等 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

脂肪酶作为一种重要的水解酶,广泛应用于食品、医药、有机合成和生物化工等领域,在科学上也具有极重要的研究价值。本书系统地叙述了脂肪酶的性质、结构、催化特性及其在非水介质中的催化反应,以作者的科研成果和一些国内外最新进展为素材,介绍了近20年来脂肪酶在食品添加剂及其配料生物合成、手性药物拆分等领域中的应用。

本书可供从事生物化工、食品、医药等领域的科研和生产技术人员以及大专院校教师、本科生、研究生阅读,也可作为生物工程与技术领域研究生教材使用。

图书在版编目(CIP)数据

脂肪酶催化反应化学/辛嘉英等编著. —北京:科学出版社, 2017.9

ISBN 978-7-03-054670-8

I. ①脂… II. ①辛… III. ①脂肪酶—酶催化剂—催化反应 IV. ①TQ426.97

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第242106号

责任编辑:张析高微/责任校对:韩杨

责任印制:张伟/封面设计:东方人华

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年9月第一版 开本:720×1000 1/16

2017年9月第一次印刷 印张:17

字数:330 000

定价:95.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

笔者开展有关脂肪酶催化反应化学的研究始于 20 世纪 90 年代末期，随着研究工作的进展，对脂肪酶催化反应化学的认识也逐渐深入。近 20 年来，脂肪酶作为一种已实现商品化的生物催化剂显示出越来越诱人的前景，在基础理论、生产以及实际应用方面都更趋成熟。2012~2016 年，仅国内以中文形式发表的有关脂肪酶的文章平均每年都超过 200 篇，Science Direct 数据库显示每天有 2 篇关于脂肪酶的文章问世，其中绝大多数是有关脂肪酶催化方面的。从事有关脂肪酶催化基础和应用研究的单位也如雨后春笋般不断涌现，大有星罗棋布之势。经网上检索发现，到目前为止国内还没有一部关于脂肪酶催化反应化学方面的专著，因此有必要尽快出版本书，为从事生物化工、食品、医药等领域的科研和生产技术人员介绍脂肪酶及其催化反应化学的发展以及高新技术产品的开发。

本书主要从催化反应化学角度出发，以笔者的科研成果和一些国内外最新进展为素材，介绍了近 20 年来脂肪酶在食品添加剂及其配料生物合成、手性药物拆分等领域中的应用。由哈尔滨商业大学王艳博士(第 2、5、8 章)、陈林林博士(第 3、4、6 章)和笔者(第 1、7 章)分别编写，由笔者负责作必要的补充修改后定稿。本书在编写过程中得到了科学出版社编辑的热情支持和帮助，在此表示感谢。感谢我的导师李树本研究员最初将我引入了脂肪酶催化领域，并在研究工作中给予的指引支持和帮助，感谢在该领域长期与我合作的同事和研究生们。

由于脂肪酶催化领域的研究发展迅速，本书虽然尽可能收录近 20 年来的相关成果与报道，但挂一漏万，难以收集完全。笔者虽然多年从事此项研究工作，但由于水平和时间所限，难免存在疏漏和不足之处，恳请各界同仁指正。

辛嘉英

2017 年 6 月于哈尔滨商业大学

目 录

前言

第 1 章 脂肪酶的概述	1
1.1 脂肪酶的来源与获得.....	1
1.1.1 脂肪酶的来源.....	1
1.1.2 脂肪酶的分类.....	4
1.1.3 产脂肪酶微生物的筛选.....	5
1.1.4 脂肪酶的发酵生产.....	6
1.1.5 微生物脂肪酶的分离纯化.....	8
1.2 脂肪酶活力的测定.....	11
1.2.1 脂肪酶活力测定的底物.....	12
1.2.2 底物的乳化.....	13
1.2.3 脂肪酶活力的检测方法.....	13
1.2.4 脂肪酶活力的定义.....	17
1.3 脂肪酶的特性和催化机理.....	17
1.3.1 脂肪酶的分子质量、最适 pH 和最适温度.....	17
1.3.2 脂肪酶活力的影响因子.....	18
1.3.3 脂肪酶蛋白分子结构特性.....	18
1.3.4 脂肪酶催化机理.....	23
1.4 脂肪酶的选择性.....	24
1.4.1 脂质底物类型的选择性.....	25
1.4.2 脂肪酸或酰基供体的选择性.....	25
1.4.3 区域或位置选择性.....	26
1.4.4 立体选择性.....	27
1.4.5 非选择性.....	28
1.4.6 脂肪酶选择性的分子基础.....	28
1.4.7 影响酶选择性的因素.....	31
参考文献.....	34
第 2 章 非水介质中脂肪酶催化反应	40
2.1 非水介质中脂肪酶催化反应类型及其优势.....	40
2.1.1 非水介质中脂肪酶催化反应类型.....	40
2.1.2 非水介质中脂肪酶催化反应的优势.....	41

2.1.3	水相体系中微量水对酶催化性能的影响	42
2.2	有机溶剂体系脂肪酶催化反应	43
2.2.1	有机相中脂肪酶的催化反应及其应用	43
2.2.2	有机溶剂中脂肪酶的结构与催化特性	44
2.2.3	有机溶剂中脂肪酶的催化反应机理	45
2.2.4	影响有机溶剂体系中脂肪酶催化活力的因素	46
2.3	无溶剂体系脂肪酶催化反应	50
2.3.1	无溶剂体系脂肪酶催化反应的类型	50
2.3.2	无溶剂体系脂肪酶催化反应的机理及特点	52
2.4	反胶束体系酶催化反应	53
2.4.1	反胶束体系中脂肪酶的结构	53
2.4.2	反胶束体系中酶催化反应的动力学特征	54
2.4.3	反胶束体系中酶的活力及稳定性	54
2.4.4	反胶束作为酶催化反应介质的优点	54
2.4.5	反胶束体系在酶催化反应中的应用	54
2.4.6	反胶束体系脂肪酶催化反应的应用	55
2.5	超临界流体	55
2.5.1	脂肪酶在超临界流体中的生物催化作用	55
2.5.2	影响脂肪酶稳定性的因素	56
2.6	离子液体体系脂肪酶催化反应	57
2.6.1	离子液体的概述	57
2.6.2	离子液体中的脂肪酶催化反应特性	58
2.6.3	离子液体对脂肪酶催化性能的影响	61
2.6.4	离子液体场/反应器强化酶促酯类合成	63
2.7	微乳液体系脂肪酶催化反应	67
2.7.1	微乳液的定义	67
2.7.2	微乳液的形成及性质	67
2.7.3	微乳液的分类	68
2.7.4	微乳液中的脂肪酶及其催化反应	69
	参考文献	71
第3章	脂肪酶的固定化及应用	75
3.1	固定化方法	75
3.1.1	吸附法	75
3.1.2	交联法	78
3.1.3	共价结合法	80
3.1.4	包埋法	83

3.2 新型脂肪酶固定化方法	85
3.2.1 传统方法联用	85
3.2.2 交联酶聚集体	86
3.2.3 交联脂肪酶晶体	86
3.2.4 定向固定化	87
3.2.5 共固定化	87
3.2.6 亲和固定化	87
3.2.7 溶胶-凝胶包埋法	88
3.2.8 分子沉积技术	88
3.2.9 酶膜反应器	88
3.2.10 脂肪酶固定化新载体	89
3.3 固定化脂肪酶的特性	91
3.3.1 固定化脂肪酶的催化活力	91
3.3.2 固定化脂肪酶的稳定性	92
3.3.3 最佳反应条件的变化	92
3.3.4 米氏常数的变化	92
3.4 固定化脂肪酶的评价指标及应用	93
3.4.1 固定化脂肪酶的评价指标	93
3.4.2 固定化脂肪酶的应用	96
参考文献	98
第4章 脂肪酶催化合成人乳脂替代品	103
4.1 人乳脂替代品的概述	103
4.1.1 人乳脂替代品的定义及发展	103
4.1.2 人乳脂替代品的优势	104
4.1.3 酶法合成人乳脂替代品的的方法	104
4.2 脂肪酶催化反应体系的建立	109
4.2.1 反应底物的选择	109
4.2.2 脂肪酶的筛选	110
4.2.3 反应介质的确定	111
4.2.4 人乳脂替代品的脂肪酸组成和甘油三酯种类分析	111
4.3 产物分离纯化与产品评价	112
4.3.1 产物的分离纯化与性质测定	112
4.3.2 人乳脂替代品产品评价	115
4.4 其他功能性油脂	117
4.4.1 中长碳链甘油三酯	117
4.4.2 低热量脂肪	118

参考文献	118
第 5 章 脂肪酶催化淀粉酯的合成	122
5.1 糖脂在食品中应用	122
5.2 脂肪酶催化糖脂合成	124
5.2.1 脂肪酶催化糖脂合成的反应媒介	124
5.2.2 脂肪酶催化糖脂的反应温度	126
5.2.3 脂肪酶催化糖脂合成的反应底物	126
5.2.4 水活度	128
5.3 酶法与化学法合成糖脂的比较	129
5.4 常用于糖脂合成的脂肪酶	130
5.5 非水相体系脂肪酶催化糖脂的合成	130
5.5.1 葡萄糖酯的合成	130
5.5.2 果糖酯的合成	131
5.5.3 木糖醇酯的合成	131
5.5.4 蔗糖酯的合成	131
5.5.5 麦芽糖酯的合成	131
5.5.6 其他糖脂的合成	132
5.6 糖脂的结构与功能	132
5.7 糖脂的合成方法	134
5.7.1 化学合成糖脂	134
5.7.2 微生物发酵合成糖脂	134
5.7.3 酶法合成糖脂	135
5.8 糖脂脂肪酶合成研究存在的问题	135
5.9 脂肪酶催化淀粉酯的合成	136
5.9.1 脂肪酶催化脂肪酸淀粉酯的合成	138
5.9.2 脂肪酶催化脂肪酸淀粉酯合成的影响因素	141
5.9.3 脂肪酶催化脂肪酸淀粉酯合成的反应机制研究	148
5.9.4 酯化淀粉取代度测定方法的分析	150
参考文献	151
第 6 章 脂肪酶催化阿魏酸酯的合成	157
6.1 阿魏酸与阿魏酸的衍生物	157
6.1.1 阿魏酸的性质与分布	157
6.1.2 阿魏酸及其衍生物的生理活性	158
6.1.3 阿魏酸衍生物的合成	159
6.2 脂肪酶催化阿魏酸油酸甘油酯的合成	163
6.2.1 阿魏酸油酸甘油酯反应体系的构建及表征	163

6.2.2	有机相酶促阿魏酸甘油酯的合成	165
6.2.3	无溶剂体系酶促阿魏酸甘油酯的合成	173
6.3	非水相 α -生育酚阿魏酸酯的酶促合成	173
6.3.1	反应体系的建立	173
6.3.2	水活度对酯化反应的影响	175
6.3.3	旋转蒸发反应消除副产物	175
6.4	非水相中添加极性物质阿魏酸酯的酶促合成	175
6.4.1	无溶剂体系中加入甘油酶促合成阿魏酸油酸甘油酯	176
6.4.2	非水相体系中加入树脂酶促合成阿魏酸油酸甘油酯	177
6.4.3	无溶剂体系中加入硅胶酶促合成 α -生育酚阿魏酸酯	177
6.4.4	添加极性物质对批式反应操作稳定性的影响	178
6.5	非水相酶促合成阿魏酸酯的抗氧化活性	178
6.5.1	阿魏酸油酸甘油酯反应体系的氧化稳定性	179
6.5.2	阿魏酸油酸甘油酯对自由基的清除作用	179
6.5.3	阿魏酸油酸甘油酯抑制亚硝化反应	180
6.5.4	α -生育酚阿魏酸酯对食用油脂的抗氧化性能	181
6.6	脂肪酶催化阿魏酸油醇酯的合成	181
6.6.1	阿魏酸脂肪醇酯的酶促合成反应体系的构建	183
6.6.2	无溶剂系统酶促合成阿魏酸油醇酯	184
	参考文献	185
第 7 章	脂肪酶催化 2-芳基丙酸类药物前药合成及手性拆分	191
7.1	芳基丙酸类药物	191
7.2	脂肪酶催化 2-芳基丙酸类药物的前药合成	192
7.2.1	萘普生油酸甘油酯	193
7.2.2	萘普生淀粉酯	193
7.2.3	L-抗坏血酸氟比洛芬酯	194
7.3	脂肪酶催化 2-芳基丙酸类药物手性拆分	196
7.3.1	手性及手性药物	196
7.3.2	脂肪酶催化手性拆分	197
7.3.3	酶催化拆分过程中的几个重要参数	199
7.3.4	脂肪酶催化 2-芳基丙酸类药物手性拆分的主要反应类型	202
7.3.5	催化 2-芳基丙酸类药物拆分反应的脂肪酶	206
7.3.6	催化 2-芳基丙酸类药物拆分反应的脂肪酶固定化载体	207
7.3.7	水-有机溶剂两相体系中脂肪酶催化 2-芳基丙酸类药物拆分反应	208
7.3.8	离子液体中脂肪酶催化 2-芳基丙酸类药物拆分	212
7.3.9	反应器操作方式对酶动力学拆分立体选择性的影响	223

7.3.10	脂肪酶催化二次动力学拆分制备高光学纯度 <i>S</i> -萘普生	227
7.3.11	2-芳基丙酸类药物的动态动力学拆分	235
	参考文献	240
第 8 章	脂肪酶催化生物柴油的合成	247
8.1	脂肪酶在生物柴油中的应用	248
8.1.1	用于生物柴油合成的脂肪酶	248
8.1.2	全细胞生物催化剂在生物柴油中的应用	250
8.1.3	生物柴油合成用脂肪酶的种类	250
8.2	生物柴油的胞外脂肪酶催化合成	251
8.2.1	有机溶剂体系中的催化合成	251
8.2.2	无溶剂体系中的催化合成	251
8.2.3	AOT 反胶束体系中的催化合成	252
8.2.4	离子液体中的催化合成	252
8.3	脂肪酶催化生物柴油的合成	253
8.3.1	生物柴油的短链醇分解合成	253
8.3.2	生物柴油的甲醇分解合成	253
8.3.3	生物柴油的胞内脂肪酶催化合成	254
8.3.4	复合脂肪酶催化生物柴油的合成	254
8.3.5	不同酰基受体对脂肪酶催化制备生物柴油的影响	255
8.4	超声辅助脂肪酶催化合成生物柴油	255
8.5	酶催化法制备生物柴油的影响因素	256
8.6	生物柴油制备方法	256
8.6.1	酶催化酯交换法制备生物柴油	257
8.6.2	酶催化酯交换法制备的优点	257
8.6.3	酶催化酯交换法制备出现的问题	258
8.6.4	酶催化酯交换法制备生物柴油的展望	258
	参考文献	259

第1章 脂肪酶的概述

1.1 脂肪酶的来源与获得

1.1.1 脂肪酶的来源

脂肪酶(lipase E.C.3.1.1.3)亦称酰基甘油水解酶(acylglycerol hydrolases),是一类在油-水界面上催化天然油脂(甘油三酯)降解为甘油和游离脂肪酸的酶,广泛存在于细菌等原核生物,霉菌、酵母等真核生物以及其他一些动植物中,既可以通过培养微生物得到,也可以从动物或植物组织中提取。目前从细菌中获得的脂肪酶最多(占45%),其次是真菌脂肪酶(占21%)、动物脂肪酶(占18%)和植物脂肪酶(占11%),藻类脂肪酶最少(占5%)^[1]。

脂肪酶最早是从哺乳动物的胰脏中被发现。1834年Eberl发现了兔胰脂肪酶,1864年发现了猪胰脂肪酶。目前实验室常用的商品化动物脂肪酶主要为Sigma公司供应的冷冻干燥纯猪胰脂肪酶(porcine pancreas lipase,产品编号L0382,活力为20000~100000U/mg的蛋白)、包含部分胰蛋白酶和胰淀粉酶的粗猪胰脂肪酶(产品编号L3126,橄榄油为底物,活力为100~400U/mg的蛋白)和人胰脂肪酶(human pancreas lipase,产品编号L9780)。总体来说,动物体内的脂肪酶含量较少且活力很低。但动物来源的猪胰脂肪酶是个特例,其催化的反应活性及稳定性都很高,在许多反应中已得到应用。

脂肪酶在植物中也普遍存在,主要存在于大戟科(如蓖麻、乌桕)、萝藦科、番木瓜科植物和油料作物的种子中。对植物脂肪酶的研究也很早,1871年就报道了植物种子脂肪酶,其活力因植物种类的不同而差异很大。从植物中提取脂肪酶的材料主要包括油菜籽、蓖麻籽、米糠、燕麦、木瓜汁等。植物脂肪酶过去研究得很少,近十几年来,木瓜脂肪酶等植物脂肪酶因渐渐显露出的价格便宜、用途广、稳定性好等优势而逐渐受到关注^[2,3]。

木瓜未成熟的果实里含有丰富的乳白色木瓜汁,其中15%是干物质,85%是水。在木瓜胶乳中,脂肪酶与干物质紧密地结合在一起,不溶于水,因此,可以把它看成是一种天然的固定化酶。木瓜胶乳中的脂肪酶活力是脂肪酶表现出来的,与木瓜胶乳中的蛋白酶无关,对于木瓜脂肪酶的一些生物化学的特征研究较少。迄今,还没有从乳液中成功提纯木瓜脂肪酶的报道。尽管纯化木瓜脂肪酶很困难,但近年来木瓜脂肪酶作为一种新型、多用途的生物催化剂,应用非常广泛。目前,木瓜脂肪酶在脂肪酸修饰、非水相转酯化、芳香酯合成、手性化合物拆分等方面,

都取得了非常好的结果。这表明木瓜脂肪酶不仅具有优良的催化性能,也具有较高的开发利用价值。相比于微生物脂肪酶,作为植物来源的脂肪酶,只需要经过一些简单的物理过程就可以完成分离纯化,没有化学溶剂污染,更适宜用于食品、化妆品、香精香料等行业。相比于其他来源脂肪酶,植物脂肪酶还具有不同的酶学性质。因此,木瓜脂肪酶具有很好的应用和发展前景^[4,5]。另一个为大家所关注的植物脂肪酶是小麦胚芽脂肪酶。该酶具有较好的热稳定性和有机溶剂耐受性。小麦胚芽脂肪酶的粗酶含有多种蛋白,表现出解酯酶活力的包括三种酶:脂肪酶、酯酶、甘油三丁酸酯酶^[6]。小麦胚芽脂肪酶的分子质量为 42kDa 左右,等电点为 5.4。但是粗酶中有多个与其性质相近的杂蛋白,故分离纯化并不容易。一般常组合使用沉淀、凝胶过滤、疏水色谱及离子交换色谱等方法。小麦胚芽脂肪酶近年来在医药、化工、食品等领域有了一定的应用,特别是在手性拆分和油脂工业方面有较大的潜力^[7]。实验室常用的商品化植物脂肪酶主要为麦胚脂肪酶(wheat germ lipase, WGL),由 Sigma 公司供应(产品编号 L3001)。

微生物是目前脂肪酶的重要来源,产脂肪酶菌株主要集中在根霉、曲霉、假丝酵母、青霉、毛霉、须霉及假单胞菌等。脂肪酶在微生物界的分布广泛,据统计,产脂肪酶的微生物有 65 个属^[8,9]。其中细菌 28 个属,放线菌 4 个属,酵母菌 10 个属,其他真菌 23 个属。微生物脂肪酶被发现以来,由于具有种类多、作用 pH 和温度范围较动植物脂肪酶广、对底物的专一性强、便于生产和获得高纯度制剂等优点,目前已得到了广泛的应用。由于微生物脂肪酶易变异,可定向筛选,生长繁殖快,产酶周期短,发酵产物单纯,故微生物脂肪酶的研究成为当前脂肪酶研究领域的主流,深入研究和应用于生产的微生物脂肪酶不断增加。细菌、酵母、霉菌中均筛选到较高酶活的菌株。至今在脂肪酶中,也只有微生物来源的脂肪酶如黑曲霉、白地霉、毛霉、巢子须霉、荧光假单胞菌等所产生的脂肪酶被提纯得到了结晶。另外,无根根霉、柱状假丝酵母、耶尔氏球拟酵母、黏质色杆菌产生的脂肪酶等也得到高度提纯,并对它们的理化性质开展了研究。德氏根霉、柱状假丝酵母菌等微生物的脂肪酶制剂已供应市场。

由于基因工程技术的出现,许多新的、纯度更高的、具有特定功能的脂肪酶在原有微生物脂肪酶基因的基础上通过基因重组技术先后开发成功。1987 年,Novo 公司用安全性已得到证实且酶生产力高的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的遗传因子改造柔毛腐质霉(*Humicola lanuginosa*),生产出了大量的脂肪酶。有关微生物脂肪酶的基因克隆研究代表了这一领域最新、最重要的进展。迄今,只有很少几种脂肪酶的基因得到克隆和定序。通过将脂肪酶的基因克隆到适于工业生产的宿主菌如 *Aspergillus oryzae* 可使脂肪酶的发酵生产发生质的飞跃。

除对已知微生物进行基因工程改造外,极端环境下的微生物脂肪酶由于能耐低温、耐酸碱、耐高压等,引起了研究者的重视。近来还发现了许多能在极端条

件下保持较高活力的细菌脂肪酶, 如从南极海域中分离出的微生物的菌体中得到的脂肪酶可在 4℃ 的低温下保持较高的活力。从冰岛的温泉中分离出的嗜热菌脂肪酶在高达 80℃ 条件下仍具有较高的活力, 当以菌体细胞的形式存在时, 在 100℃ 仍具有较高的活力。

迄今, 实现商业化的主要是微生物脂肪酶, 包括褶皱假丝酵母脂肪酶(CRL)、爪哇毛霉脂肪酶(MJL)、米氏毛霉脂肪酶(MML)、米氏根毛霉脂肪酶(RML)、少根根霉脂肪酶(RAL)、南极假丝酵母脂肪酶(CAL)、染色黏性菌脂肪酶(CVL)、假单胞菌脂肪酶(PSL)、荧光假单胞菌脂肪酶(PFL), 生产商主要包括丹麦的 Novo-Nordisk、荷兰的 Genencor International B. V., 德国的 Boehringer-Mannheim 和日本的 Amano Co., 供应商主要是 Sigma Chemical Co. 和 Fluka Chemie AG。

表 1-1 列出了实验室常用的 Sigma 公司供应的脂肪酶。

表 1-1 实验室常用的 Sigma 公司供应的脂肪酶

来源	缩写代码	Sigma Chemical Co. 商品号
<i>Candida rugosa</i>	CRL	L1754, L8525
<i>Mucor javanicus</i>	MJL	L8906
<i>Mucor miehei</i>	MML	L9031
<i>Rhizomucor miehei</i>	RML	L4277
<i>Rhizopus arrhizus</i>	RAL	L4384
<i>Candida antarctica</i>	CAL	L4777 (在 <i>Aspergillus oryzae</i> 表达, 固定化酶)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	TLL	L0902, L0777
<i>Chromobacterium viscosum</i>	CVL	L0763
<i>Pseudomonas sp.</i>	PSL	L9518 L4783 (固定化酶)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PFL	28602

另外, Fluka 公司供应的脂肪酶还有白地霉脂肪酶(*Geotrichum candidum* lipase, GCL)、柔毛腐质霉脂肪酶(*Humicola lanuginosa* lipase, HLL)、米曲霉脂肪酶(*Aspergillus oryzae* lipase, AOL)、青霉菌脂肪酶(*Penicillium camemberitii* lipase, PEL)、德氏根霉脂肪酶(*Rhizopus delemar* lipase, RDL)、米根霉脂肪酶(*Rhizopus oryzae* lipase, ROL)、颖壳假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas glumae* lipase, PGL)、洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶(*Burholderia cepacia* lipase, BCL)、类产碱假单胞菌脂肪酶(*Pseudoalcaligenes* lipase, PCL)、门多萨假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas mendocina* lipase, PML)、链状嗜热杆菌脂肪酶(*Bacillus thermocatenulatus* lipase, BTL-2)和腐皮镰孢霉脂肪酶(*Fusarium solani* lipase, FSL)等。在我国, 1967 年中国科学院微生物研究所筛选到一株解脂假丝酵母(*Candida lipolytica* AS2.1203), 并于 1969 年制成酶制剂投放市场至今^[10]。

1.1.2 脂肪酶的分类

对脂肪酶的分类目前还没有形成一个完整的共识,通常按最适酶活力 pH 可分为酸性脂肪酶和碱性脂肪酶,一般植物种子和动物胰脏所含的脂肪酶为酸性脂肪酶,而微生物所产生的脂肪酶大多为碱性脂肪酶。

1999 年, Apriny 和 Jaeger 整理了脂肪酶的核苷酸、蛋白质和晶体结构的有关信息,通过对氨基酸序列和基本生物学性质的比较,提出了一种较详尽的脂肪酶家族分类方法^[11]。这种分类方法将脂肪酶分为 8 个家族,即 Family I (true lipase), Family II (GDSL family), Family III, Family IV [HSL, hormone-sensitive lipase (HSL) family], Family V ~ Family VIII, 而脂肪酶家族 Family I 又包括 7 个亚族 Subfamily I.1 ~ Subfamily I.7。

Family I: 该家族成员较多,氨基酸序列差异较大,主要包括假单胞菌属脂肪酶 (*Pseudomonas lipase*) 和革兰氏阳性菌脂肪酶 (Gram-positive organisms lipase), 这类酶被称为“真正的脂肪酶”(true lipase), 是最早研究的脂肪酶。大多数假单胞菌属的脂肪酶可划分到 1.1 至 1.3 亚科。1.1 亚科的脂肪酶分子质量最小(约 30kDa), 代表性微生物为绿脓杆菌 (*P.aeruginosa*) 和草莓假单胞菌 (*P.fragi*)。1.2 亚科与 1.1 亚科脂肪酶具有 60% 的氨基酸序列相似性, 由 320 个氨基酸残基组成, 分子质量约为 33kDa, 包括荚壳伯克霍尔德菌 (*B.glumae*) 和洋葱伯克霍尔德菌 (*B.cepacia*) 的脂肪酶。这两个亚科的脂肪酶分子都有一个二硫键, 而且需要助蛋白的帮助才能完成蛋白质的正确折叠和分泌。1.3 亚科的脂肪酶分子质量要比 1.1 亚科、1.2 亚科的分子质量大得多, 假单胞菌属的荧光假单胞菌 (*P.fluorescens*) SIK WI (50kDa) 和假单胞菌 (*P.strain*) MIS 38 (65kD) 以及沙雷氏菌属中黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) (65kDa) 的脂肪酶是这一亚科的主要代表。这一亚科的脂肪酶分子由于缺失了半胱氨酸残基, 从而失去了形成分子内二硫键的能力。

革兰氏阳性菌脂肪酶大多来自芽孢杆菌属。与其他脂肪酶家族的甘氨酸-X-丝氨酸-X-甘氨酸不同, 其催化活性中心丝氨酸残基附近的五肽序列为丙氨酸-X-丝氨酸-X-甘氨酸。

Family II: 该家族因其催化活性中心丝氨酸残基附近的序列为甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸-(亮氨酸) (GDSL), 又称 GDSL 家族。与常见的五肽序列甘氨酸-X-丝氨酸-X-甘氨酸 (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly) 不同, 具有 GDSL 序列的一部分脂肪酶存在一个丝氨酸-组氨酸催化二元组催化位点, 而不是常见的丝氨酸-天冬氨酸-组氨酸三元组 (triad) 催化位点。

Family III: 该家族的脂肪酶具有典型的 α/β 水解酶折叠结构和三元催化位点结构, 与人血小板激活因子乙酰水解酶 (PAF-AH) 有大约 20% 氨基酸序列一致性。

Family IV: 该家族成员与来自哺乳动物的激素敏感型脂肪酶 (hormone-sensitive

lipase)在氨基酸序列上有相似性,因而该家族也被称为激素敏感型脂肪酶家族。该家族成员包括从嗜冷菌(*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*)、嗜温菌(*Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*)、嗜热菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Archeoglobus fulgidus*)中获得的脂肪酶,可见脂肪酶对温度的适应性并不由序列的保守性决定,而由其蛋白质的高级结构决定。

Family V: 该家族成员与 Family IV类似,成员有来自嗜温菌(*Pseudomonas oleooraans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*)、嗜冷菌(*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*)和嗜热菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)的脂肪酶,在氨基酸水平上该家族脂肪酶与来自各种微生物并同时具有 α/β 水解酶折叠结构的环氧化物水解酶、脱卤化酶和卤代过氧化物酶等具有三元催化位点的非脂解酶有 20%~25%的相似性。

Family VI: 该家族成员具有 α/β 水解酶折叠结构和典型的丝氨酸-天冬氨酸-组氨酸三元组催化位点活性中心结构,这类脂肪酶水解短链底物并具有宽底物特异性,而对长链的三酰甘油不具有活力,酶蛋白的分子质量在 23~26kDa 之间,是分子质量最小的脂肪酶。

Family VII: 该家族成员一般具有大于 55kDa 的相对较大的分子质量,在氨基酸水平上与来自真核生物的乙酰胆碱脂肪酶和肝脏的羧酸脂肪酶有 40%的相似性。

Family VIII: 目前报道组成该家族的 3 个酶都是由大约 380 个氨基酸组成,其中的一段包含 150 个氨基酸(50~200)的序列与来自阴沟肠杆菌的 β -内酰胺酶有 45%的相似性。

1.1.3 产脂肪酶微生物的筛选

除少数微生物外,大多数微生物脂肪酶属胞外酶。相比较来说,产脂肪酶的微生物比较容易发现,但寻找到适于工业生产的脂肪酶产生菌及其发酵条件却非常困难。

筛选产脂肪酶微生物的方法应具有快速、简捷、准确、选择性强和易于自动化等特点,常用的方法是用含有甘油三酯的琼脂平板,酶催化水解产生清晰的环带或混浊的脂肪酸沉淀。对于适用于霉菌筛选的牛脂法,脂肪酶作用脂肪后产生的脂肪酸会与 pH 指示剂反应,在平板上呈有色透明水解圈;对于以三丁酸甘油酯为底物的固体琼脂平板法,可根据菌落周围形成透明圈的大小来挑选高产菌种,但该方法在酶活力较低时不易形成清晰的透明圈。如果在固体琼脂平板内添加维多利亚蓝作为指示剂,可明显地提高测定方法的清晰度和灵敏度。也可利用生色底物或产脂肪酶微生物的某些特性进行产脂肪酶菌种的筛选,乙酸对硝基苯酚酯和辛酸对硝基苯酚酯是常用的脂肪酶筛选的生色底物,对硝基苯辛酸酯、对硝基苯肉豆蔻酸酯和对硝基苯棕榈酸酯可筛选对不同碳链长脂肪酸具有专一性的脂肪酶产生菌。

琼脂平板法只在微生物产酶水平较低时适用,当产酶水平达到一定程度后,根据透明圈、沉淀圈和变色圈则很难区分微生物之间产酶能力的差异。此时,可以利用滴定法或比色法对产脂肪酶微生物进行筛选。

1.1.4 脂肪酶的发酵生产

脂肪酶的生产方法包括从动植物器官或组织中提取酶的提取法和利用微生物发酵获得脂肪酶的发酵法。由于动植物资源受气候、土壤等条件限制且分离提纯复杂,大部分酶都是采用发酵法生产的。

有些霉菌可通过固态发酵及液态发酵两种方法进行脂肪酶的发酵生产,而有些霉菌固态发酵时几乎检测不出脂肪酶活力,但液态发酵时却能检出,原因可能是固态发酵时产生的蛋白酶将脂肪酶水解掉了,而液体发酵不产生蛋白酶。另外,液态发酵时提高通风量通常有利于所有的单细胞微生物及大部分丝状真菌的脂肪酶生产。邓永平等对不同微生物发酵产脂肪酶的产酶条件和产酶活力进行了综合比较(表 1-2)^[12]。

表 1-2 不同微生物发酵产脂肪酶的条件及其活力

菌株	诱导物	初始 pH	培养温度/°C	转速/(r/min)	培养时间/h	酶活力
<i>Klebsiella</i> sp.B-36	—	4.9	46.5	—	—	21.8U/mL
<i>Enterobacter</i> sp.	—	8.5	32.0	180	120	118U/mL
<i>Teratosphaertaceae</i> Ctrl2.	—	5.5	35.0	150	72	8.5U/mL
<i>Aspergillus niger</i> AN0512	—	—	28.0	180	96	30U/mL
<i>Trichosporon capitatum</i>	橄榄油吐温 80	6.5	28.0	160	48	—
<i>Pseudomonas cepacia</i>	吐温 60	8.0	35.0	130	72	32.935U/mL
<i>Candida rugosa</i>	橄榄油	7.0	30.0	200	36	4351.6U/mL
<i>Pseudomonas</i> sp.T1-39	橄榄油	9.0	15.0	—	—	9.77U/mL
<i>Aspergillus niger</i> C2J6	—	8.0	35.0	—	72	18.75U/mL
<i>Burkholderia cepacta</i>	豆油	7.0	30.0	—	48	24.1U/mL
<i>Penicillium</i> sp.	—	8.5	25.0	150	48	186U/g
<i>Trichoderma harzianum</i>	橄榄油	—	28.0	180	48	1.4U/mL
<i>Trichoderma harzianum</i>	橄榄油	7.0	28.0	—	96	4U/g
<i>Candida utilis</i>	—	—	30.0	—	72	25U/g
<i>Penicillium camembertii</i> KCCM11268	—	—	30.0	—	184	7.8U/mL
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	橄榄油	6.5	45.0	—	72	19.5U/g
<i>Candida rugosa</i> NCIM3462	—	—	32.6	—	60	22.4U/g
<i>Aspergillus</i> sp.	—	5.6	25.0	—	60	18.67U/g
<i>Pichia pastoris</i>	甲醇	7.0	27.0	—	144	1960U/mL

脂肪酶产生菌的种类及酶的特性不一,其培养基配比和培养条件也各不相同。大多数微生物来源的脂肪酶是诱导酶,只有诱导物存在时才产生脂肪酶,添加诱导物可以有效提高酶活力。脂肪酶作用底物及可以增强细胞膜通透性的变性剂常被用作脂肪酶诱导物。甘油三酯、长链脂肪酸、游离脂肪酸及其某些结构类似物如司盘(Span)、聚乙二醇单油酸酯等表面活性剂通常被作为诱导物。非离子表面活性剂如吐温(Tween)、司盘及糖脂能刺激胞外酶的产生。如 Long 等^[13]对黏质沙雷菌脂肪酶诱导物研究表明,以糊精和牛肉膏结合硫酸铵作为碳源和氮源,随着培养基中吐温 80 从 0g/L 增加到 10g/L,脂肪酶产量从 250U/L 提高至 3340U/L,充分说明诱导物在脂肪酶生产中的重要作用。需要注意的是,当培养基中含有高浓度的甘油酯时,可引起培养基形成多相混合液,会引起酶回收的困难。另外,培养基中高浓度甘油三酯在水解过程中会释放过多的脂肪酸而引起阻遏作用,导致酶产量减少。

也有一些微生物产脂肪酶不受脂类底物的诱导。多数实验表明,添加脂类到培养基中能够引起脂肪酶产量的明显增加。另外,培养基中含有单糖、双糖和甘油,会抑制脂肪酶的产生。因此,用于生产胞外脂肪酶的生长培养基一般多以淀粉、麸皮、甘油三酸酯或脂肪酸作为碳源,少量的葡萄糖可在开始生长时加入,氮源一般为黄豆粉、蛋白胨、酵母浸出物、酪蛋白水解物和玉米浆。由于微生物营养谱宽泛,很多工业或农业废渣都可以作为微生物生长代谢的良好基质。Coradi 等^[14]比较了农业和工业废渣液体或固体发酵哈茨木霉产脂肪酶的生产,发现无论液体发酵还是固体发酵,培养基中添加 1%(体积分数)的橄榄油都可以有效提供产酶量。Salgado 等^[15]利用橄榄油厂和酒厂的残留物作为培养基质固态发酵曲霉生产脂肪酶,发现尿素是影响脂肪酶产量的关键因子。吐温 80 和尿素都为变性剂,可以增大细胞膜的通透性,从而使脂肪酶能够快速分泌出细胞。Venkatesagowda 等^[16]以提取椰子油后的糟粕为原料固体发酵 *Lasiodiplodia theobromae* VBE-1,发现一定量的矿物盐和椰子油均可以增强脂肪酶活力。Fleuri 等^[17]研究发现以 75%麦麸和 25%甘蔗渣为培养基,含水量 40%时脂肪酶产量为 10.82U/g。除了利用微生物发酵工农业废渣产脂肪酶外,Luis 等利用微生物发酵橄榄油厂工业废水生产脂肪酶,需要对废水进行稀释,同时添加矿物盐可以有效提高产酶量,该步骤处理还可降低废水 COD 值,减少酚类和芳族化合物^[18],微量元素和有些添加物对发酵产酶也有显著影响。有报道无机离子如 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等对脂肪酶产生有促进作用,而 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 等则抑制脂肪酶产生。Treichel 等^[19]从菌株、培养基、底物和过程控制等角度综述了脂肪酶的发酵生产,并介绍了数学建模在脂肪酶发酵生产中的应用。通过基因工程手段提高脂肪酶产量对脂肪酶基因进行突变或重组,从基因角度提高酶活力或稳定性是现在一个新的研究热点。吴厚军等^[20]对来源于 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 的脂肪酶进行了