

微生物脂肪酶的研究进展

Research Progress on Microbes of Lipases

王小芬/WANG Xiao-fen, 张艳红/ZHANG Yan-hong, 王俊华/WANG Jun-hua, 杨洁/YANG Jie

新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046

School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumuqi 830046, China

[摘要] 讨论了微生物脂肪酶的生产、纯化、鉴定、特性等,介绍了相关脂肪酶在工业生产中的应用。

[关键词] 酶学, 微生物, 脂肪酶 **[中图分类号]** Q936

[文献标识码] A **[文章编号]** 1000-7857(2006)02-0010-03

Abstract: The production, recovery, and use of microbial lipases are discussed. Issues of thermostability, bioactivity and production of recombinant lipases are discussed.

Key Words: enzymology, microbes, lipases

CLC Number: Q936

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)02-0010-03

1 引言

近年来,脂肪酶的研究主要集中在对它的结构鉴定、动力学机制、基因测序及基因克隆等方面,而对工业上可利用的脂肪酶生物反应体系的研究相对较少。许多脂肪酶在有机物中也具有活性,它们能够催化许多反应,包括酯化反应、酯基转移反应、甘油和薄荷醇的区域选择性酰化反应、肽的合成及其它化学反应。

许多微生物和高等真核生物都可产脂肪酶,而绝大多数工业脂肪酶是来自微生物的。目前已经在工业废水、植物油生产厂、含油土壤、油料种子和腐烂的食物、乳制品、堆积的混合肥料及温泉中发现了产脂肪酶的微生物,其中有细菌、真菌、酵母和放线菌。本文报道了微生物脂肪酶的培养、特性和鉴定,并介绍了相关脂肪酶的应用领域。

2 脂肪酶的培养

2.1 产酶培养基

微生物脂肪酶主要是用液体深层发酵培养,但是也可采用固体发酵的方法或采用固定化细胞来培养。人们会对液体深层发酵培养的最佳培养条件和所需的氮源作了大量研究,发现碳源和氮源的类型和浓度、培养基 pH、生长温度和溶氧浓度都会影响脂肪酶的产生,一般认为油脂碳源可以提高脂肪酶产量。

2.2 碳源的影响

许多实验证实了油可作为产脂肪酶的一种良好的诱导物,这些诱导物包括植物油(乳化的橄榄油、棕榈油等)和动物油脂(三酰甘油、油酸等)。

从马来群岛的温泉中分离 *B.thermoleovorans* ID-1 脂肪酶的实验中,用 1.5%(V/V)橄榄油作为唯一碳源时,分离出来的 ID-1 可以在各种脂类物质中生长,如合成表面活性剂(Tween20 和 Tween40)、油(橄榄油、大豆油、矿物油)和三酰甘油(三油酸甘油酯、三丁酸甘油酯)^[1]。王艳茹等人^[2]在对一种产脂肪酶的微球菌进

行碳源筛选时发现,淀粉、葡萄糖等碳源不利于产酶,而豆油、芝麻油、三丁酸甘油酯及橄榄油均能诱导该菌产酶,其中 1% 的橄榄油最有利于该脂肪酶的产生,但油脂过多会抑制菌体产酶。

2.3 氮源的影响

通常用作产脂肪酶微生物培养基的氮源有大豆粉、蛋白胨、玉米浆、酵母粉、有机氮源等。Hiol 等人^[3]从含有 4% 玉米浆和 1% 蛋白胨作为氮源的培养基中分离出 *Rhizop.oryzae* 的胞外脂肪酶,该酶最适 pH7.5、最适温度 35 °C,在 450 °C 条件下培养 30 min 后,该酶仍有 65% 的活力。牛冬云等人^[4]在解淀粉芽孢杆菌的培养基中加入 2% 黄豆粉和 2% 玉米粉为氮源时,产酶量最大。该酶最适 pH8.5、最适反应温度 37 °C。

2.4 金属离子的影响

金属离子可能是脂肪酶的激活剂,也可能是抑制剂而影响其活性。Kok 等人^[5]发现在培养基中加入 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 后, *Aci.calcoacticus* BD413 的胞外脂肪酶的产量增加,而该酶在 pH7.8-8.8 水解长链对硝基苯酚酯(如 pNPP)时,具有最佳的水解活力。

Sharon 等人^[6]报道了 *P.pseudoalcaligenes* KKA-5 在含有 0.8 mol/L Mg^{2+} 的培养基中产酶量最大,如果在培养基中不加 Mg^{2+} 其产量约减少 50%,而加入 Ca^{2+} 对酶的产量没有影响。Sidhu 等人^[7]在培养基中加入 Ca^{2+} 使 *Bacillus*.RS-12 产酶量增加,该细菌的最适生长温度是 50 °C,在低于 40 °C 时不生长。当在 *Bacillus*.RS-12 培养基中加入 0.5 % Tween80 和 0.5 % 酵母粉、50 °C 培养时,可以得到最大的酶产量。

3 脂肪酶的特性

3.1 脂肪酶的纯化

许多文献主要对少量脂肪酶的纯化和鉴定进行了介绍,而对大规模的工业用脂肪酶的纯化处理过程很少提到。因为大多数工

收稿日期: 2005-09-19

作者简介: 王小芬,女,新疆乌鲁木齐市胜利路 14 号新疆大学生命科学与技术学院,研究生,主要从事生物化学与分子生物学、生化制药研究;E-mail:suseiawang@163.com

杨洁(通讯作者),女,新疆大学生命科学与技术学院,副教授,主要从事生物化学与分子生物学、生化制药研究;E-mail: yangjie234@hotmail.com

业用脂肪酶的纯度要求不高,过度的纯化反而会提高成本并且降低酶的回收率。实验室中脂肪酶的纯化方法一般有沉淀法、疏水层析、凝胶过滤和离子交换层析等。一些实验还运用了亲和层析,减少了纯化步骤。

Chahinian 等人^[8]发现 *Pe.cuclopium* 静置培养时会产生两种脂肪酶——脂肪酶 I 和脂肪酶 II。脂肪酶 I 对三酰甘油有活性,脂肪酶 II 通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀和两步层析得到纯化。脂肪酶 II 存在几种糖基化形式(分子量: 40~43kD),但可以通过除去糖基化使该酶变成分子量为 37kD 的单体,它的最适 pH7.0、最适温度 40℃,超过 50℃时活力迅速降低。Hiol 等人^[9]通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、磺丙基 Sepharose 层析, Sephadex G-75 凝胶过滤等对 *Rhizop.oryzae* 胞外脂肪酶进行纯化,该酶纯化倍数达到 1 200 倍,再通过 SDS-PAGE 和凝胶过滤测其分子量为 32 kD、pH7.6。董宏伟等人^[9]采用氯仿萃取、中空纤维柱超滤、CM-SepharoseFF 阳离子交换柱层析等对一种海洋微生物产低温碱性脂肪酶进行纯化。该酶分子量为 38 kD,最适水解温度 35℃、最适 pH8.5。

3.2 脂肪酶的热稳定性

当温度每升高 10℃,酶的反应速率约增加 1 倍。假设在升高温度时,酶是稳定的,那么在一个相对高的温度条件下,酶的反应速率将大大加快,因此,近年来对于热稳定性高的酶极为关注,目前,已经分离得到许多热稳定性高的酶。

Sidhu 等人^[10]从芽孢杆菌中分离得到了一种胞外脂肪酶,该酶的最适温度为 50℃。在 75℃时,其半衰期为 15min,并且它在各种氧化剂、还原剂、螯合剂中均以稳定的形式存在,同时在表面活性剂和有机溶剂中也很稳定。在 50℃、pH8.0 的条件下该酶的活力为 8.2 U/ml,在 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、和 Ba^{2+} 存在的情况下,其活力进一步增大。

脂肪酶的热稳定性和它的结构有着密切的关系,环境因素可以影响酶的热稳定性,如 pH 和金属离子。Zhu 等人^[11]发现酶的热稳定性出现在多肽链打开的中期,而在酶的“cap”位点进行突变对酶的热稳定性的影响是显著的,因此可以通过蛋白质工程来提高脂肪酶的热稳定性。

3.3 金属离子和螯合剂对脂肪酶活性的影响

某些金属离子与酶结合对酶的最佳活力构象起稳定作用,有利于底物的接近,从而活化或加强酶的催化活性。因此,选择合适的金属离子对酶的利用有一定的价值。

Hiol 等人^[9]研究了各种复合物和酶抑制子对 *Rhizop.oryzae* 脂肪酶活性的影响,发现 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 强烈抑制其活性。徐岩等人^[12]研究了 Cu^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 对解脂假丝酵母脂肪酶活性的影响,发现 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对其活化效果好,而 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 抑制其活性。加入 EDTA 该酶失活,说明它是金属酶,其最适 pH7.5。

3.4 脂肪酶的剪切耐受力

脂肪酶是在界面上发生催化反应,因此界面区域和界面性能对反应速率影响很大。实验中常常通过机械搅拌来处理脂肪酶在发生催化水解反应时所处的液-液界面,而通过需氧深层培养得到的脂肪酶是在气-液界面上发生反应的。许多酶包括脂肪酶在气-液和液-液界面会发生与剪切相关的失活,随着温度的上升和流体中的涡流作用使得界面上发生的变性率升高。这种变性通常遵循热力学第一定律,它取决于加入反应物中特殊的粉末及与气-液界面的接触面积,而加入聚丙烯乙二醇等物质可极大地减缓变性率。脂肪酶在界面上发生的变性仅是由于肽链的伸展而非断裂成多个肽段。

4 脂肪酶的鉴定

1991 年,Alberghina 等人最早报道了脂肪酶基因的测序和克隆。目前,已经克隆出许多微生物脂肪酶基因和高等动物的脂肪酶基因。

Van Kampen 等人^[13]利用位点专一性诱变和区域互换来研究 *S.hyicus* 脂肪酶 (SHL)C 末端区域的作用以及 *S.aureus* 脂肪酶 (SAL)的底物选择性。对 SHL 的 356 位上的丝氨酸利用单点突变替换成编码缬氨酸的密码子后,该酶仍然具有脂肪酶活性,但其磷酸酶活性降低了 12 倍。再将 SHL 突变体(第 356 位为缬氨酸)的 C 端 40 个氨基酸残基替换上 SAL 序列上相应的残基,从磷酸酶/脂肪酶活性比例的变化结果来看 C 端上 356 位丝氨酸主要决定了该磷酸酶的活性。

A.oryzae 至少分泌 3 种胞外脂肪酶 L1、L2 和 L3。其中,L3 脂肪酶(三酰甘油脂肪酶)基因(暂假定为 *tgla*)已经得到克隆。该基因组 DNA 和 cDNA 核苷酸序列表明,L3 基因(*tgla*)具有 1 个含 954 个核苷酸的开放阅读框,还含有 3 个分别为 47bp、83bp、62bp 的内含子。根据 *tgla* 基因推测的氨基酸序列表明,该酶蛋白含有 254 个氨基酸残基,并且具有与真菌角质酶同源的序列,由丝氨酸、天冬氨酸和组氨酸组成的催化中心是其保守序列。克隆的 *tgla* 基因的 cDNA 可在 *E.coli* 中表达出一种功能性的三酰基甘油脂肪酶^[14]。

5 脂肪酶的应用

脂肪酶广泛应用于脂肪的生产工艺、去污剂和脱脂业、食品工艺、精细化学品合成业、造纸业、化妆品制造业以及制药业中,脂肪酶还可用于油脂垃圾和聚氨酯的快速降解。脂肪酶的主要应用见表 1,大多数工业生产的微生物脂肪酶是出自真菌和细菌的酶(见表 2)。

表 1 微生物脂肪酶在工业生产中的应用
Tbl. 1 Industrial applications of microbial lipases

工业	反应	产品或应用
去污剂业	水解脂肪	从纤维中除油
制酪业	水解乳脂、奶酪成熟、黄油的改良	诱发牛奶、奶酪和黄油中的芳香成分
焙烤业	风味改良	焙烤食品业
饮料业	植物香味改良	饮料
食物调味品	品质改良	蛋黄酱、调味品
健康食品业	转酯作用	健康食品
肉和鱼	风味改良	肉制品和鱼制品、脱脂
脂肪和油	转酯作用、水解作用	可可脂、人造奶油、脂肪酸、甘油单酰基甘油酯、二酰基甘油酯
化学业	合成反应、对应异构选择性	化学制品
制药业	转酯作用、水解作用	脂制品药物、助消化药物
化妆品业	合成作用	保湿品、乳液
皮革业	水解作用	皮革生产
造纸业	水解作用	提高纸制品质量
洗涤剂业	水解作用	除脂作用

表 2 部分工业用微生物脂肪酶
Tbl. 2 Some commercially available microbial lipases.

类型	来源	应用	生产公司
真菌	<i>C.rugosa</i>	有机合成	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mann - eimFluka, Genzyme, Sigma
	<i>C.antarctica</i>	有机合成	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T.lanuginosus</i>	去污剂添加剂	Boehringer annheim, Novo ordisk
细菌	<i>R.miehei</i>	食品工业	NovoNordisk, Biocatalysts, Amano
	<i>Burkholderia.pacia</i>	有机合成	Amano, Fluka, Boehringer annheim
	<i>P.alcaligenes</i>	去污剂添加剂	Genencor
	<i>P.mendocina</i>	去污剂添加剂	Genencor
	<i>Ch.viscosum</i>	有机合成	Asahi, Biocatalysts

5.1 脂肪酶在去污剂工业中的应用

脂肪酶可以水解脂肪,在工业上主要作为添加剂应用于洗涤剂 and 家用去污剂的生产。作为去污剂所用的脂肪酶需满足下列条件:① 底物特异性低,如可水解不同脂肪的混合物;② 可适用于

不同的洗涤条件(pH10~11,30~60℃);③可防止表面活性剂和蛋白酶的破坏。目前还可通过连续筛选和蛋白质技术结合获得所需的脂肪酶。1994年,Novo Nordisk首次合成了市售的重组脂肪酶(Lipolase),它是真菌 *Thermomyces lanuginosus* 脂肪酶基因在 *Aspergillus oryzae* 中表达获得的。

5.2 脂肪酶在食品工业中的应用

脂肪酶可以改变脂肪酸链在甘油酯中的位置或替换上1个或多个新的脂肪酸来修饰酯,通过这种方法,可以将廉价的脂加工成昂贵的脂肪。可可脂是一种昂贵脂肪,它在口中熔化时可以产生一种类似于巧克力的凉爽的口感。它含有棕榈酸和硬脂酸,熔点为37℃。而脂肪酶的水解作用和合成反应可以用于工业上将脂肪改良为可可脂的替代品,比如利用固定化的 *Rhizomucor miehei* 脂肪酶的转酯作用把棕榈油中的棕榈酸替换成硬脂酸。

由于脂肪酶的交换作用,多不饱和脂肪酸(PUFAs)越来越多地应用于制药业、营养业和食品业中,许多PUFAs对脂膜和前列腺素的合成也有重要作用。微生物脂肪酶还应用于从动物脂质中获取PUFAs,例如鲱鱼油、金枪鱼油等。游离的PUFAs及其单酯和二酰甘油酯可应用于生产各类药物,如抗胆固醇血药、消炎药和溶栓剂类药物。

此外,脂肪酶也用作奶酪制造业、焙烤业和饮料业中除去脂肪的辅料。

5.3 脂肪酶在双水相中的生物转化

通常,脂肪酶在双水相中会发生水解作用。Pencreac和Baratti报道了 *P.cepacia* 脂肪酶可水解在庚烷中的对硝基苯十六烷(pNPP)^[15]。

此外,应用突变可以增强脂肪酶的对映异构选择性。在经过4个突变循环后, *P.aeruginosa* 脂肪酶催化水解手性酯的对应异构选择性从2%增加到81%。*C.parapsilosis* 脂肪酶酰基转移酶能够在水/油两相介质中催化脂肪发生生物合成反应,反应中酶的底物是酰基供体(脂肪酸或脂肪酸甲基酯)和羟胺。与游离脂肪酸相比,酯酶供体中的酰基优先转移到羟胺(氨解作用)上,这种特性可催化油在水相中发生生物转化反应^[16]。

5.4 脂肪酶在外消旋酸和醇的分解中的应用

脂肪酶催化转酯反应可以将外消旋酸分解成对映异构体的单一形式。而利用脂肪酶的立体选择性,可以分解在互不相溶两相系统中的外消旋有机酸混合物。Arroyo和Sinisterra^[17]发现 *C. andidaantarctica* 脂肪酶B在无水介质中发生酯化反应时,使用一种非手性溶剂介质如异丁基甲基酮时,可以使酯化反应对酮洛酚的R-异构体产生立体选择性。

6 结论

目前,脂肪酶已广泛地应用于工业生产中。每年约有1000t的脂肪酶应用于约130亿t的去污剂生产中,而用于油脂化学转化中的脂肪酶相对少一些。脂肪酶可以用于多不饱和脂肪酸(γ -亚麻酸)、食物色素(虾青素)、典型蓝干酪的气味分子(甲基酮)和水果香料(4-羟基苯酸)的生产中;还可用作甘油酯中的酯交换替代品(如生产巧克力中可可脂的替代品);可通过脂肪酶修饰植物油中的三酰甘油获得婴儿食品中的人乳脂肪类似物;同时,脂肪酶也可用于化妆品的生产以及生产食品业和制药业中重要的乳化剂。

脂肪酶还可在药物的生产中合成单一异构体,如合成抗炎药物奈普生和异丁苯丙酸、合成血管紧张肽转化酶抑制子(如卡托普利、依那普利、赖诺普利)以及合成钙离子通道药物硫氮草酮等。

随着酶学研究的快速发展,微生物脂肪酶的应用领域将不断扩展,可以预测,脂肪酶将成为重要的工业生产酶。

参考文献(References)

- [1] LEE D,KOK Y,KIM K,et al.Isolation and characterization of athermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1[J]. FEMS Microbiol Lett,1999,179:393-400.
- [2] 王艳茹,高贵,王玉玉,等.产脂肪酶菌种的筛选及部分酶学性质[J].吉林自然科学学报,1999,10(4):91-94.
- [3] HIOL A, JONZO M D, RUGANI N, et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit[J]. Enzyme Microb Technol, 2000,26:421-30.
- [4] 牛冬云,张义正.碱性脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件的优化[J].食品与发酵工业,2004,29(5):82-85.
- [5] KOK R G, THOR J J V, RODZANT I M N,et al. Characterization of the extracellular lipase lipA of *Acinetobacter colcoacetis* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene[J]. Mol Microbiol 1995,15:803-18.
- [6] SHARON C, FURUGOH S, YAMAKIDO T,et al. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis [J]. Ind Microbiol Biotechnol, 1998, 20: 304-7.
- [7] SIDHU P,SHARMA R,SONI S K,et al.Effect of cultural conditions on extracellular lipase production by *Bacillus* sp RS-12 and its characterization[J]. Indian Microbiol 1998b,38: 9-12.
- [8] CHAHINIAN H, VANOT G, IBRIK A,et al. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of partial acylglycerol lipase [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000,64:215-22.
- [9] 董宏伟,孙谧,王跃军,等.海洋微生物低温碱性脂肪酶的纯化与性质研究[J].海洋与湖泊,2004,35(4):376-383.
- [10] SIDHU P, SHARMA R, SONI S K,et al. Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp [J]. Folia Microbiol,1998a, 43: 51-4.
- [11] ZHU K, JUTILA A, TUOMINEN E K J,et al.Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability[J].Biochim Biophys Acta,2001,1547: 329-38.
- [12] 徐岩,李建波,王栋.解脂假丝酵母脂肪酶的纯化及性质研究[J].无锡轻工大学学报,2001,20(3):851-854.
- [13] VAN K M D,SIMONS J W,DEKKER N,et al.The phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase strongly depends on a single Ser to Val mutation[J]. Chem Phys Lipids,1998, 93: 39-45.
- [14] TOIDA J,FUKUZAWA M,KOBAYASHI G,et al.Cloning and sequencing of triacylglycerol lipase gene of *Aspergillus oryzae* and its expression in *E. coli*[J]. FEMS Microbiol Lett,2000,189:159-64.
- [15] PENCREAC H G,BARATTI J C.Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by *Pseudomonas cepacia* lipase:a simple test for the determination of lipase activity in organic media[J]. Enzyme Microb Technol,1996,18:417-22.
- [16] VAYSSE L, DUBREUCQ E,PIRAT J L, et al. Fatty hydroxamic acid biosynthesis in aqueous medium in the presence of the lipase-acyl transferase from *Candida parapsilosis* [J].Biotechnol, 1997,53:41-6.
- [17] ARROYO M, SANCHEZ-MONTERO J M, SINISTERRA J V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *C.andidaantarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media [J]. Enzyme Microb Technol, 1999, 24:3-12.

(责任编辑 王 莹)