

脂肪酶的分子结构及应用研究进展*

Advances in Molecular Structure and Application of Lipases

韦宇拓,滕 昆

WEI Yu-tuo, TENG Kun

(广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530005)

(College of Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:脂肪酶能催化水解、酸解、醇解、氨解、转酯以及酯化合成等反应,广泛应用于食品工业、造纸业、洗涤工业、医药领域以及相关的行业和领域中。本文概述了目前脂肪酶在分子结构、催化类型和机制、基因克隆来源及其应用领域等方面的研究进展。

关键词:脂肪酶 酯酶 分子结构

中图分类号:Q-31 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2014)02-0093-06

Abstract: Lipase catalyzed hydrolysis, acid hydrolysis, alcoholysis, ammonolysis, transesterification, esterification and other reaction, and widely used in food industry, paper industry, washing industry, pharmaceutical industry and related industries and fields. In this paper, we reviewed the molecular structure, catalytic types and mechanism, gene cloning of lipases.

Key words: lipases, esterase, molecular structural

脂肪酶(EC3.1.1.13)是指一类具有多种催化能力的酶,其可以催化三酰甘油酯及其他一些水不溶性酯类的水解、醇解、酯化、转酯化及酯类的逆向合成反应,除此之外还表现出其他一些酶的活性,如磷脂酶、溶血磷脂酶、胆固醇酯酶、酰胺水解酶活性等。

脂肪酶最早是从动物中发现,1834年 Eberl 发现了兔胰脂肪酶,1864年发现了猪胰脂肪酶,1871年在植物种子中发现了脂肪酶。微生物脂肪酶直到1901年才发现,当时的研究人员观察到粘质沙雷氏菌、绿脓假单胞菌及荧光假单胞菌能够产生脂肪酶。随着脂肪酶分子生物学的不断发展,对脂肪酶基因以及酶的结构和功能等方面有了更深入、更全面的认识。目前为止,Genbank 共收录各种不同来源的脂肪酶氨基酸序列 187738 条,脂肪酶基因核苷酸序列 33470 条,为脂肪酶的研究提供了丰富的序列信息。如今脂肪酶基因已经在酿酒酵母、毕赤酵母和大

肠杆菌表达系统中实现了活性表达^[1],使得对脂肪酶的分子结构、催化机制、反应类型和应用成为了工业酶的研究热点之一。

1 脂肪酶蛋白分子结构特点

目前脂肪酶蛋白分子的 3D 结构已经得到初步的阐明,大多脂肪酶都具有 α/β 水解酶折叠的结构特征,即 α 螺旋和 β 折叠^[2](见图 1)。虽然来源于不同微生物的脂肪酶在分子量、氨基酸序列、底物特异性及其他理化性质上存在较大的差异,但是它们都具有相似的 α/β 水解酶折叠^[3,4]。脂肪酶的 α/β 水解酶折叠结构内部由 8 个 β 折叠($\beta_1 \sim \beta_8$)排列(其中第二个 β 折叠为反向排列)组成,外部从 β_3 折叠、 $\beta_5 \sim \beta_8$ 折叠之间分别由 6 个 α 螺旋($\alpha_A \sim \alpha_F$)相连(见图 2)。脂肪酶的催化活性中心是由 Ser-His-Asp/Glu 组成的催化三联体结构,在活性位点丝氨酸残基周围存在 Gly-x-Ser-x-Gly 的五肽结构^[5], α/β 水解酶折叠结构为脂肪酶的活性位点提供了一个稳定的支架,带有亲核基团的丝氨酸残基通常位于 β_5 与 α_C 之间,酸性氨基酸(天冬氨酸或谷氨酸)残基通常位于 β_7 与 α_E 之间,组氨酸残基通常位于 β_8 与 α_F 之间。在蛋白质二

收稿日期:2014-03-09

作者简介:韦宇拓(1971-),男,教授,主要从事发酵与酶工程方向的研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(No. 11107008-3)资助。

级结构水平上,不同微生物脂肪酶的结构差异主要体现在 α 螺旋和 β 折叠的数量、 α 螺旋的空间分布和 β 折叠扭曲角度的差异^[6,7]。

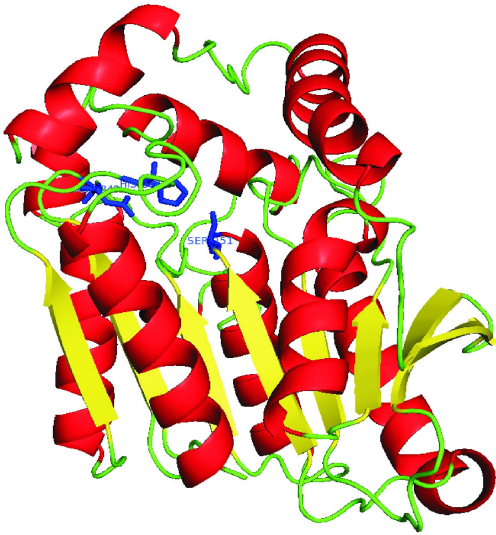


图 1 脂肪酶的 3D 结构

Fig. 1 The 3D structure of lipase

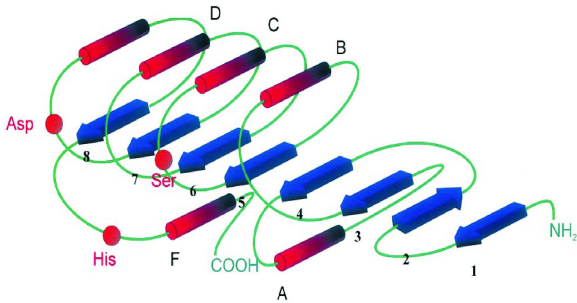


图 2 α/β 水解酶折叠图解

Fig. 2 Schematic presentation of the α/β -hydrolase fold

2 脂肪酶的反应类型和催化机理

如图 3 所示,脂肪酶能催化酯键的水解^[8]、酸解^[9]、醇解^[10]、氨解^[11]、转酯^[12]以及酯化合成反应^[13]。脂肪酶在反应中不需要辅助因子的参与,能够在有机溶剂中保持活性并维持稳定,因而具有多种工业应用价值。

微生物脂肪酶活性中心为 Ser-His-Asp/Glu 组成的催化三联体,如图 4 所示,Jaeger 将酯键的水解过程分为以下 6 个阶段^[14]:

(1)底物与活性中心丝氨酸残基结合。在活性中心组氨酸残基的参与下,丝氨酸残基被激活,其羟基上的质子氢转移到组氨酸残基的咪唑环上。

(2)丝氨酸负氧离子对底物羰基碳原子发起亲核攻击,形成四面体中间复合物。

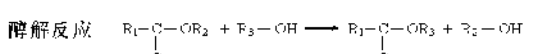
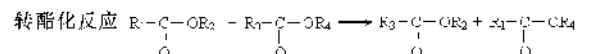
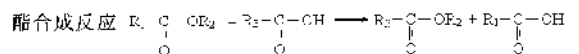
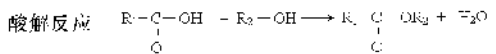
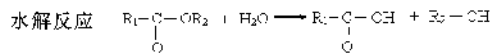
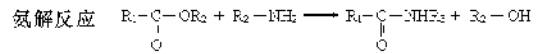


图 3 脂肪酶催化的反应类型

Fig. 3 Types of lipase catalyzed reactions

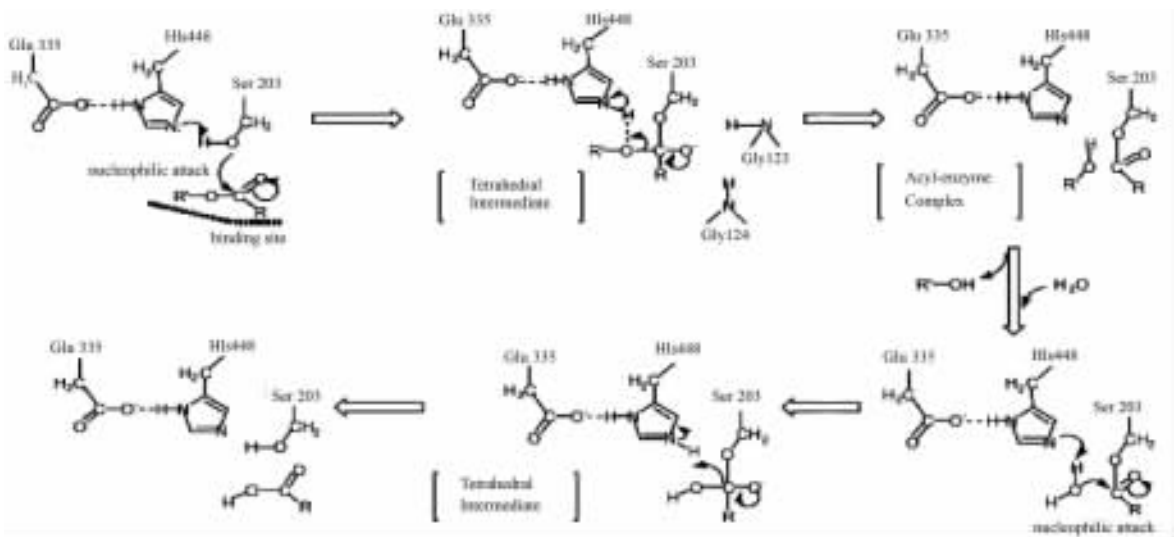


图 4 脂肪酶的催化机理

Fig. 4 Catalysis mechanism of lipase

(3)组氨酸咪唑环上从丝氨酸羟基获得的质子氢转移到酯键的醇羟基上,导致酯键断裂,从而释放出游离的醇。此时质子化的丝氨酸与羰基重新形成酯键,形成“酰基-酶”复合物。

(4)组氨酸咪唑环将质子氢转移给酯键后,又从进入活性中心的水分子中夺取质子氢。

(5)水分子剩下的氢氧根离子攻击新生成的酯键的碳原子,使得酯键断裂。

(6)组氨酸咪唑环再次将质子氢转移给丝氨酸的阴离子氧,从而释放出游离的羧酸。

3 脂肪酶的类型

不同来源的脂肪酶在底物特异性上具有较大差异,从底物特异性的角度,传统的广义脂肪酶主要分为“真正的脂肪酶”和酯酶。“真正的脂肪酶”指的是狭义的脂肪酶,即三酰基甘油酯酰基水解酶(triacylglycerol acylhydrolases, EC 3. 1. 1. 3),倾向于催化具有长脂肪酸链的水不溶性底物的分解;而酯酶,即羧基酯水解酶(carboxyl ester hydrolases, EC 3. 1. 1. 1),倾向于催化具有短脂肪酸链的水溶性底物的分解^[15]。狭义的脂肪酶与酯酶在空间结构、反应类型和催化机理等方面并无本质上的区别,两者在底物特异性上也无明显的界限划分,两者只是对底物在脂肪酸链的长度上的偏好有所不同;狭义的脂肪酶一般能水解酯酶的短链底物,而酯酶不能水解脂肪酶的长链底物。

大多数狭义的脂肪酶中存在“界面激活”现象,而酯酶中不存在;酯酶反应遵循经典的米氏动力学模式,而狭义的脂肪酶则不遵循^[16]。结构鉴定显示,脂肪酶的“界面激活”现象是由于一个疏水结构域形成的“盖子”结构覆盖了脂肪酶的催化活性中心,在催化时吸附在油-水两相界面的脂肪酶在油相疏水作用的诱导下,构象发生改变,“盖子”结构被打开,将活性中心暴露出来,底物从而能够靠近活性中心,催化过程得以进行。

4 脂肪酶应用

许多脂肪酶具有较宽的底物范围,使得它们被认为在进化过程中逐步形成了具备利用碳源的能力或与分解代谢途径有关^[17]。目前研究发现脂肪酶能催化酯类物质的水解、酸解、醇解、氨解、转酯以及酯化合成反应,使得脂肪酶在食品工业、造纸业、洗涤工业、医药领域等相关行业具有多种工业应用价值。脂肪酶成为在许多工业加工过程中具有巨大潜力的生物催化剂,如食品调味料的合成,作为添加剂应用于

洗涤剂中,手性药物和精细化学产品的合成等。脂肪酶用于化学选择性、区位选择性和对映选择性的水解作用及一系列化合物的合成中,已成为人们普遍选择的生物催化剂之一^[18,19]。

4.1 食品工业

脂和油是重要的食品添加剂。在食品加工领域,脂肪酶可以通过转酯作用改变油脂中的脂肪酸链的长度来获得所需要的更高价值的脂类,从而提升了油脂工业的经济效益和发展潜力。如棕榈油通过酯交换反应生产代可可脂,从而被运用于巧克力的生产^[20,21]。脂肪酶还可以通过分解油脂释放出短链脂肪酸来改善食品的香味和风味,如在生产奶酪的过程中,脂肪酶能使游离脂肪酸分解成二乙酰、3-羟基丁酮和异戊醛等风味物质,使得乳制品的风味得到提升,营养价值也进一步提高^[22]。

4.2 造纸业

在造纸业中,在纤维素酶和木质纤维素酶的辅助作用下,用脂肪酶处理纸浆能够去除树脂和蜡等物质,避免纸张严重破裂,不仅减少了处理树脂所需要的化学品的用量,还能够保持纸的质量和产量^[23]。

4.3 洗涤工业

脂肪酶具有水解酯类的特性使得其能够作为酶添加剂应用于洗涤剂中。酶添加剂相比传统合成洗涤剂,其优势在于酶能够在更低的温度下催化油脂的分解,除此之外还减少了对环境的污染^[24]。目前,脂肪酶已经成为除了蛋白酶之外洗涤剂行业中的第二大酶添加剂。

4.4 医药领域

手性化合物在医药领域有着重要的应用价值。手性对于很多药品的功效来说是一个至关重要的因素,因为一个对映体形式通常表现为活性,而另一个则没有活性或者是毒性^[25,26]。20世纪50~60年代欧洲发生令人震惊的“反应停”事件给人们敲响了警钟,引起人们对两个对映异构体在药效学差异上的严重关注^[27]。

脂肪酶具有立体专一性和高度的立体选择性,能够将其中的一个对映体选择性转化,从而拆分外消旋体^[28],因此脂肪酶可以应用于手性药物的合成和旋光异构体的拆分。利用微生物脂肪酶可以对2-芳基丙酸类药物如布洛芬、萘普生等进行手性拆分^[29,30],如Bayer公司在20世纪90年代开发了对映选择性水解消旋乙酰胺的生产工艺^[31,32]。随着现代生物技术突飞猛进的发展,脂肪酶获得了越来越多的关注和研究,使得脂肪酶在医药领域得到了不断的开发和

5 微生物脂肪酶家族

在自然界中产生脂肪酶的微生物资源非常丰富,据不完全统计,产脂肪酶的微生物多达 65 个属^[3,33],其中细菌占 28 个属,放线菌占 4 个属,酵母菌占 10 个属,真菌占 23 个属。脂肪酶生产能力比较强的菌株主要有假丝酵母^[34,35],黑曲霉^[36],根霉^[37],假单胞菌^[38,39],链霉菌^[40]和碱假单胞菌^[41],因此,微生物脂肪酶是工业酶催化剂的重要来源。

1999 年 Apriny 和 Jaeger 整理了微生物脂肪酶的核苷酸、蛋白质和晶体结构的有关信息,基于对氨基酸序列和一些基本生物学性质的比较,提出了一种较前人更为详尽的脂肪酶分类方法^[42]。这种分类方法将脂肪酶分为 8 个家族,即 True lipase, The GD-SL family, Family III, The hormone-sensitive lipase (HSL) family, Family V ~ VIII, 其中 True lipase 又包括 7 个亚族 Subfamily I.1 ~ I.7。

Family I: 该家族成员较多,序列差异也比较大,主要包括假单胞菌属脂肪酶(*Pseudomonas* lipase),这类酶被称为“真正的脂肪酶”(true lipase),是最早研究的脂肪酶,在工业生产中形成了一定的优势。革兰氏阳性菌脂肪酶(Gram-positive organisms lipase),大多来自芽孢杆菌属(*Bacillus*),其特点是催化活性中心丝氨酸残基附近的五肽序列为 Gla-x-Ser-x-Gly,与其他脂肪酶家族的 Gly-x-Ser-x-Gly。

Family II: 该家族又称为 GD-SL 家族,因其催化活性中心丝氨酸残基附近的序列为 Gly-Asp-Ser-(Leu)(GD-SL),与常见的五肽序列 Gly-x-Ser-x-Gly 不同。研究发现,具有该 GD-SL 序列的一部分脂肪酶存在一个 Ser-His 催化二联体,而不是常见的 Ser-Asp-His 催化三联体结构。

Family III: 该家族的成员具有典型的 α/β 水解酶折叠结构和典型的催化三联体结构。研究发现,这一家族的脂肪酶与人血小板激活因子乙酰水解酶(PAF-AH)有大约 20% 的氨基酸序列一致性。

Family IV: 该家族成员与来自哺乳动物的荷尔蒙敏感脂肪酶(hormone-sensitive lipase)在氨基酸序列上有着令人意外的相似性,因而该家族也被称为荷尔蒙敏感脂肪酶家族(The hormone-sensitive lipase family)。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,这揭示了脂肪酶对温度的适应性并不由序列的保守性决定,而原因可能在于

其蛋白质的三级结构中。

Family V: 该家族成员与 Family IV 类似,成员有来自嗜温菌(*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*),嗜冷菌(*Moraxella* sp., *Psy. immobilis*)和嗜热菌(*Sulfolobus acidocaldarius*),在氨基酸水平上与来自各种微生物并同时具有 α/β 水解酶折叠结构和环氧化物水解酶、脱卤化酶和卤代过氧化物酶等催化三联体的非脂解酶有 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 Ser-Asp-His 催化三联体,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,是分子量最小的脂肪酶,酶蛋白的分子量在 23~26kDa 之间。

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

Family VIII: 目前报道的种类较少,组成该家族的 3 个酶均是由大约 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 -内酰胺酶有达 45% 的相似性。

6 展望

近年来全球工业酶市场规模保持较快的增长速度,2013 年,全球工业酶市场规模达到了 40.4 亿美元,是 2007 年的 1.4 倍。在全球酶制剂市场中,传统脂肪酶是在蛋白酶和糖酶之后占据第三大销售份额的酶制剂。脂肪酶由于其是具有多重催化功能的生物催化剂,能催化底物的水解、酸解、醇解、氨解、转酯以及酯化合成反应,被广泛应用于食品工业、造纸业、洗涤工业、医药领域以及相关的行业和领域中。脂肪酶的广泛应用使得相关行业改进了工业生产,不仅降低了设备和原料的消耗,有效地节约了生产成本,还提高了产品的质量,更重要的是减少了对环境的污染,因此,近年来脂肪酶成为了科研工作者的研究热点。

虽然不少脂肪酶已经得到广泛应用,但是脂肪酶表现出的多种催化能力,必将在生物化学工艺中具有巨大的应用潜力。而目前只有少量的脂肪酶被分离出来并详细进行功能鉴定,可以预见,还有大量生物的脂肪酶还没有被发现和鉴定,对它们的反应特性和催化潜力的认识还远远不够,还不能充分发挥脂肪酶的应用潜力。因此,需要对更多的脂肪酶进行基因克隆,并对其酶学特性和催化机理进行更充分的研究,

才能提高脂肪酶在生物催化中的应用,为脂肪酶的进一步工业化应用奠定良好的基础。

参考文献:

- [1] Wong C H, Whitesides G M. Enzymes in synthetic organic chemistry[M]. Oxford: Pergamon Press, 1994.
- [2] Ollis D L, Cheah E, Cygler M, et al. The α/β hydrolase fold[J]. Protein Eng, 1992, 5: 197-211.
- [3] Jaeger K E, Ransac S, Dijkstra B W, et al. Bacterial lipases[J]. FEMS Microbiol Rev, 1994, 15(1): 29-63.
- [4] Nardini M, Dijkstra B W. α/β hydrolase fold enzyme: the family keeps growing[J]. Current Opinion in Structure Biology, 1999, 9(16): 732-737.
- [5] Pouderoyn G V, Egger T, Jaeger K E. The crystal of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme[J]. J Mol Biol, 2001, 309: 215-226.
- [6] Kim K K, Song H K, Shin D H. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor[J]. Structure, 1997, 5(2): 173-185.
- [7] Lang D, Hofmann B, Haaick L. Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC6918 refined at 1.6 Å resolution[J]. J Mol Biol, 1996, 259(4): 704-717.
- [8] Chowdary G V, Ramesh M N, Prapulla S G. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: multivariate analysis[J]. Process Biochem, 2001, 36: 331-339.
- [9] Krishna S H, Karanth N G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A kinetic study[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1547: 262-267.
- [10] Rao P, Divakar S. Lipase catalyzed esterification of α -terpineol with various organic acids: application of the Plackett-Burman design[J]. Process Biochem, 2001, 36: 1125-1128.
- [11] Liese A, Seelbach K, Wandrey C. Industrial biotransformations[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.
- [12] Weber N, Klein E, Mukerjee K D. Long chain acyl thioesters prepared by solvent free thioesterification and transesterification catalyzed by microbial lipases[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51: 401-404.
- [13] Zhang L Q, Zhang Y D, Xu L, et al. Lipase-catalyzed synthesis of RGD diamide in aqueous water-miscible organic solvents[J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 29: 129-135.
- [14] Jaeger K, Dijkstra B W, Reetz M T. Bacterial biocatalysis: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases[J]. Annual Review of Microbiology, 1999, 53(1): 315-351.
- [15] Bornscheuer U T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2002, 26(1): 73-81.
- [16] Verger R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts[J]. Tibtech January, 1997(15): 32-38.
- [17] Phytian S J. Esterases. In: Biotechnology-Series, Vol. 8a (Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P. J. W. and Kelly, D. R., Eds.) [M]. Weinheim: Wiley-VCH, 1998: 193-241.
- [18] Patel R N. Stereoselective biocatalysis[M]. New York: Marcel Dekker, 2000.
- [19] 孙新城, 马淑玲, 张玲丽, 等. 一株高产脂肪酶产生菌 16S rDNA 的序列分析[J]. 南方农业学报, 2012, 43(9): 1269-1272.
- Sun X C, Ma S L, Zhang L L, et al. Sequence analysis of 16S rDNA derived from a high yield lipase strain[J]. 2012, 43(9): 1269-1272.
- [20] Slim C, Ahmed F I, Nabil M. Crab digestive lipase acting at high temperature purification and biochemical characterization[J]. Biochimie, 2007, 89(8): 1012-1018.
- [21] Uyama H, Kabayashi S. Enzyme catalyzed polymerization to functional polymers[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 19(20): 117-121.
- [22] Pabai F, Kermasha S, Morin A. Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 1995, 11: 669-677.
- [23] Jaeger K E, Reetz T M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16: 396-403.
- [24] Cardenas F, Alvarez E, de Castro-Alvarez M-S, et al. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases[J]. J Mol Catal B: Enzym, 2001, 14: 111-123.
- [25] Kim K H, Jeong C K, Kim D H. Synthesis of homologated binaphthyl NP-ligands for Pd-catalyzed asymmetric allylic alkylation[J]. Tetrahedron: Asymm, 2006, 17: 1688-1692.
- [26] 王普善, 王宇梅. 手性药物开发战略的再认识[J]. 精细与专用化学品, 2004, 12(10): 4.
- Wang P S, Wang Y M. Recognition of development strategy about chiral pharmaceuticals[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2004, 12(10): 4.
- [27] Wolberg M, Kaluzna L, Muller M. Regio and enantioselective reduction of *t*-butyl 6-chloro-3,5-dioxohexanoate with baker's yeast[J]. Tetrahedron: Asymm, 2004, 15: 2825-2828.
- [28] Klibanov A M. Asymmetric transformations catalyzed

- by enzymes in organic solvents[J]. *Acc Chem Res*, 1990,23:114-120.
- [29] Schmid A, Dordick S J, Hauer B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow[J]. *Nature*, 2001, 409: 258-268.
- [30] Van R F, Sheldon R A. Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases[J]. *Tetrahedron*, 2004, 60 (3): 501-519.
- [31] Alfonso I, Gotor V. Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polyfunctional substrates[J]. *Chem Soc Rev*, 2004, 33 (4): 201-209.
- [32] Smidt H, Fischer A, Fischer P, et al. Process for preparing optically active amines; ZA, 9601676 [P]. 1996-09-05.
- [33] 张博. 响应面法优化醋酸钙不动杆菌菌株 23 的脂肪酶产酶条件[J]. *广西科学*, 2008, 15(4): 419-423, 430.
Zhang B. The lipase production optimization of *Acinetobacter calcoaceticus* 23 using response surface methodology[J]. *Guangxi Sciences*, 2008, 15 (4): 419-423, 430.
- [34] 陈林林, 辛嘉英, 张颖鑫, 等. 粗状假丝酵母产脂肪酶发酵条件的优化[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(1): 183-185.
Chen L L, Xin J Y, Zhang Y X, et al. Optimization of fermentation condition of producing lipase by *Candida valida* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(1): 183-185.
- [35] Muralidhar R V, Chirumamila R R, Marchant R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 9(1): 17-23.
- [36] 舒正玉, 杨江科, 徐莉, 等. 黑曲霉脂肪酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2007, 53(2): 204-208.
Shu Z Y, Yang J K, Xu L, et al. Cloning of the Lipase gene of *aspergillus niger* F044 and its expression in *pichia pastoris*[J]. *J Wuhan Univ: Nat Sci Ed*, 2007, 53(2): 204-208.
- [37] 夏葵, 曾虹燕, 姜和, 等. 诱变选育脂肪酶高产菌株及其脂肪酶固定化[J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(5): 88-94.
Xia K, Zeng H Y, Jiang H, et al. Induced mutagenesis of high lipase productivity strain and immobilization of produced lipase[J]. *China Biotechnology*, 2009, 29(5): 88-94.
- [38] 张煜星, 武寒雪, 祝建波, 等. 铜绿假单胞菌脂肪酶 Lipase 基因的原核表达[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(35): 15384-15385, 15388.
Zhang Y X, Wu H X, Zhu J B, et al. Prokaryotic expression of *pseudomonas aeruginosa* lipase gene[J]. *Journal of Agri Sci*, 2008, 36(35): 15384-15385, 15388.
- [39] 张博, 王青艳. 导入脂肪酶基因提高荧光假单胞菌 26-2 的产酶效率[J]. *广西科学*, 2009, 16(2): 185-187.
Zhang B, Wang Q Y. Improving the lipase production of *Pseudomonas fluorescence* 26-2 through Transform Its Lipase Gene into the Originally Strain[J]. *Guangxi Sciences*, 2009, 16(2): 185-187.
- [40] 周晓云, 黄建宁, 欧志敏, 等. 链霉菌 Z94-2 碱性脂肪酶产生条件及酶学性质[J]. *微生物学报*, 2000, 40(1): 75-79.
Zhou X Y, Huang J N, Ou Z M, et al. Conditions of enzyme production and properties of alkaline lipase by *streptomyces* Z94-2 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(1): 75-79.
- [41] 吴松刚, 谢新东, 黄建忠, 等. 类产碱假单胞菌耐热碱性脂肪酶的研究[J]. *微生物学报*, 1997, 37(1): 32-39.
Wu S G, Xie X D, Huang J Z, et al. Studies on thermostable and alkaline lipase from *pseudomonas pseudoalcaligenens* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1997, 37(1): 32-39.
- [42] Arpigny J L, Jaeger K E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties[J]. *Biochem J*, 1999, 343: 177-183.

(责任编辑: 陆 雁)