

偏甘油酯脂肪酶的研究进展及应用现状

丁小刚, 钟小荣, 周 端, 李道明

(陕西科技大学 食品科学与工程学院, 西安 710021)

摘要:相较于甘油三酯脂肪酶,偏甘油酯脂肪酶因其独特的底物选择性和催化高效性,逐渐成为相关领域的研究热点。旨在为偏甘油酯脂肪酶在油脂加工、脂质分子的定向合成等领域研究提供理论和技术参考,并为挖掘新型的偏甘油酯脂肪酶打下基础,首先对偏甘油酯脂肪酶的来源和分类进行介绍,随后阐述了偏甘油酯脂肪酶的结构特征和催化特性,最后对其应用现状进行了总结归纳和展望。偏甘油酯脂肪酶有动物来源、植物来源和微生物来源,分为甘油单酯脂肪酶和甘油单酯-甘油二酯脂肪酶;偏甘油酯脂肪酶有帽区、催化三联体和氧负离子洞穴等结构,具有底物特异性和位置特异性;偏甘油酯脂肪酶在食品、有机合成、医疗等领域有着广泛的应用和独特的发展潜力。

关键词:偏甘油酯脂肪酶;结构特征;催化特性;油脂脱酸;生物柴油

中图分类号:Q55;TQ426

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2024)02-0123-09

Research progress and application status of partial glyceride lipase

DING Xiaogang, ZHONG Xiaorong, ZHOU Duan, LI Daoming

(School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: Compared with triglyceride lipase, partial glyceride lipase has gradually become a hot research focus in related fields due to its unique substrate selectivity and high catalytic efficiency. In order to provide theoretical and technical references for the research of partial glyceride lipase in the fields of oil processing and directed synthesis of lipids, and lay a foundation for excavating new partial glyceride lipase, firstly, the source and classification of partial glyceride lipase were introduced; subsequently, the structural and catalytic characteristics of partial glyceride lipase were expounded; finally its application status was summarized and prospected. Partial glyceride lipase comes from animal, plant and microbe, and is divided into monoacylglyceride lipase and glycerol mono- and diglyceride lipase. Partial glyceride lipase has structures of a cap region, catalytic triplet, and oxygen anion cave, and it has substrate specificity and site specificity. Partial glyceride lipase has extensive applications and unique development potential in fields such as food, organic synthesis, and medicine.

Key words: partial glyceride lipase; structure characteristics; catalytic characteristics; oil deacidification; biodiesel

物理法和化学法是我国工业生产中应用最为广泛的方法,如油脂工业生产中为了去除油脂中含有

的游离脂肪酸,通常采用物理蒸馏或化学碱炼的方法对油脂进行精炼。但随之而来的便是能效的提高、原料的浪费以及经济效益的降低,甚至对我国的生态环境造成了严重的影响。2020年我国明确提出“双碳”战略目标,即“碳达峰”与“碳中和”,倡导绿色、环保、低碳的生活方式,这对我国工业的转型提出了一定的要求,因此亟需一种新型的工业生产方法来代替现有的方法。

收稿日期:2023-03-24;修回日期:2023-10-26

基金项目:国家自然科学基金(32001640);陕西省重点研发计划(2023-YBNY-168)

作者简介:丁小刚(1999),男,硕士研究生,研究方向为油脂酶法脱酸(E-mail)1121170971@qq.com。

通信作者:李道明,副教授,博士(E-mail)dml@ sust.edu.cn。

近年来,随着生物技术的飞速发展,酶工程技术也得到了长足的进步。与传统物理法和化学法相比,生物酶催化法摆脱了物理法的高能耗、低效率及化学法的污染大、不安全等缺点,具有催化效率高、绿色环保、成本和能耗低等优点^[1],得到了工业领域的极大重视。脂肪酶(E. C. 3. 1. 1. 3 triacylglycerol lipase)作为生物酶的一种,是一系列可以在油水界面催化水解甘油三酯为脂肪酸和甘油或水解不完全中间产物甘油单酯、甘油二酯的酶^[2],是工业化应用的一类重要酶制剂,其可以催化脂解、酯交换、酯合成等反应,广泛应用于油脂加工、食品、医药、日化等工业领域。生物酶催化法的发展离不开酶制剂的开发研究,在脂肪酶广泛应用发展的同时,其一些应用限制也逐渐被发现,如油脂工业生产中会分解原料,某些情况下催化效率低等。偏甘油酯脂肪酶的发现进一步解决了现有脂肪酶的应用限制问题。偏甘油酯脂肪酶是一类仅能选择性作用于甘油单酯和甘油二酯或仅能作用于甘油单酯而不作用于甘油三酯的特殊脂肪酶^[3-5]。而且偏甘油酯脂肪酶在催化油脂水解、脱酸时的效率是甘油三酯脂肪酶的几倍,采用偏甘油酯脂肪酶对油脂进行脱酸,在合适的反应条件下,脱酸后游离脂肪酸(FFA)含量能降低90%以上。

由于偏甘油酯脂肪酶独特的底物选择性和催化高效性,其逐渐成为相关领域的研究热点,在食品工业、医疗健康及有机合成等方面也展现了巨大的应用潜力,如食品中食用油脂的脱酸和功能性甘油二酯的合成、医疗中结构化磷脂的合成以及有机合成中生物柴油的合成等,值得进一步研究与开发。因此,本文就偏甘油酯脂肪酶的来源和分类、结构特征、催化特性以及偏甘油酯脂肪酶的应用进行了综述,以期偏甘油酯脂肪酶在油脂加工、脂质分子的定向合成等领域的研究提供理论和技术参考,为挖掘新型的偏甘油酯脂肪酶打下基础。

1 偏甘油酯脂肪酶的来源与分类

作为一类特殊的脂肪酶,偏甘油酯脂肪酶与脂肪酶一样,广泛分布于动植物和微生物体内^[6]。因此,可根据来源将其分为动物偏甘油酯脂肪酶、植物偏甘油酯脂肪酶和微生物偏甘油酯脂肪酶三大类。在动物来源方面,动物体内含偏甘油酯脂肪酶较多的是高等动物的胰脏、脂肪以及肠组织,如:Ikeda等^[7]从大鼠肝微粒中分离纯化得到偏甘油酯脂肪酶;De Jong等^[8]从大鼠小肠上皮细胞中分离纯化得到偏甘油酯脂肪酶;Hee - Cheong等^[9]从兔主动脉中分离得到偏甘油酯脂肪酶。植物来源方面,植物

中含偏甘油酯脂肪酶较多的是油料作物的种子。如:Kim等^[10]从十字花科的拟南芥中分离纯化得到偏甘油酯脂肪酶 AtMAGL;Wang等^[11]从杨树中分离得到偏甘油酯脂肪酶 CSE。但是目前,动植物来源的偏甘油酯脂肪酶的报道仍比较少,主要是因为动植物体内成分繁杂,基因数据庞大,要想分离纯化出单一的偏甘油酯脂肪酶十分困难。而相较于动植物缓慢生长发育进程而言,微生物生长繁殖快,易于培养,且微生物脂肪酶分离纯化相对简单,培养生产周期短,生产成本较低,具有更宽泛的适用 pH、温度以及特殊的底物专一性^[12],而且微生物来源的偏甘油酯脂肪酶一般都是分泌性的胞外酶,所以目前关于微生物偏甘油酯脂肪酶的报道屡见不鲜。因此,微生物成为了偏甘油酯脂肪酶的重要来源,生产偏甘油酯脂肪酶的菌株主要为球形马拉色菌、芽孢杆菌、青霉和曲霉等,如:Deangelis等^[13]在球形马拉色菌中发现了偏甘油酯脂肪酶 SMG1;Tang等^[14]从海洋土芽孢杆菌中分离纯化出了偏甘油酯脂肪酶 GMGL;Yamaguchi等^[15]从卡门氏青霉菌中分离纯化出偏甘油酯脂肪酶 PCL;Toida等^[16]从米曲霉中纯化鉴定了偏甘油酯脂肪酶 AOL。

偏甘油酯脂肪酶不作用于甘油三酯,而只作用于甘油单酯和甘油二酯或仅能作用于甘油单酯,根据这一底物催化特性,偏甘油酯脂肪酶又被分为甘油单酯脂肪酶(MGL)和甘油单酯-甘油二酯脂肪酶(MDGL)两大类。MGL首先被发现于大鼠脂肪组织中,它能催化细胞外和细胞内代谢中间产物甘油单酯分解为游离脂肪酸和甘油^[17],对于动植物有着不可或缺的作用。除此之外,MGL已被证实参与哺乳动物体内参与了内源性大麻素神经系统调节的重要信号分子2-花生四烯酸甘油酯(2-AG)的代谢过程^[18-20]。而在微生物中,甘油单酯具有高毒性,所以MGL对于微生物的生存至关重要。目前,关于MGL的报道多为微生物所产,如:芽孢杆菌菌株H-257所产的甘油单酯脂肪酶 MGLP^[21];酿酒酵母所产的甘油单酯脂肪酶 Yju3p^[22];海洋土芽孢杆菌菌株12AMOR1所产的甘油单酯脂肪酶 GMGL^[14]等。MDGL也广泛存在于动植物、微生物体内,其能合成与分解甘油单酯和甘油二酯,对于动植物的生理调节有至关重要的作用。但目前关于植物体内 MDGL的报道少之又少。在微生物中,MDGL对甘油单酯和甘油二酯均表现出很高的活性,但在动物中MDGL对甘油二酯具有特异选择性,而对甘油单酯表现出很低的活性^[23]。另外,相对于微生物而言,动物体内的 MDGL有着更严苛的位置选择性。因

此,微生物所产的 MDGL 获得了更广泛的报道与应用,如:球形马拉色菌所产的甘油单酯-甘油二酯脂肪酶 SMG1^[24]和 MgMDL2^[25];青霉菌所产的甘油单酯-甘油二酯脂肪酶 PrLip^[26]等。

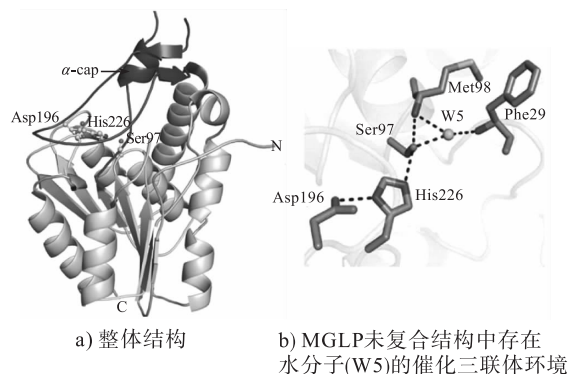
2 偏甘油酯脂肪酶的结构特征

脂肪酶的本质是蛋白质,所以脂肪酶也存在复杂的三维构象和高级结构。自从 Brady 等^[27]解析了米黑根毛霉脂肪酶 RML 的晶体结构后,迄今为止,人们利用 X-射线衍射等手段和定向修饰等技术解析了数百种脂肪酶的氨基酸组成和晶体结构等特征。偏甘油酯脂肪酶作为一种具有特异性的脂肪酶,其基本结构与脂肪酶大同小异。研究发现,不同脂肪酶的一级结构,即氨基酸的组成大相径庭^[28],但是它们在二级结构和三级结构上的活性中心均相对保守,都采用相同的拓扑核心结构,即 α/β 水解酶折叠结构,且催化中心都拥有类似或者相同的特征区域。绝大多数脂肪酶的活性中心都由丝氨酸(Ser)和组氨酸(His)组成^[29],丝氨酸和组氨酸再与另一种氨基酸残基,一般为谷氨酸(Glu)或者天冬氨酸(Asp)等共同构成脂肪酶活性中心的催化三联体结构^[30]。类似地,偏甘油酯脂肪酶也具有脂肪酶经典活性中心基序 G-X-S-X-G 和催化三联体结构。

除此之外,在脂肪酶活性中心的上方还存在由一个或多个 α -螺旋构成的盖子(帽区),使得活性中心与分子表面隔开形成了由暴露憎水基包围的、由亲水基组成的脂肪酶亲电区(氧负离子洞穴)^[31-32]。据报道, α/β 水解酶的底物特异性很大程度上取决于相应酶的帽区^[33],大部分脂肪酶盖子的运动是通过铰链类型的盖子刚性位移或者盖子部分结构重新折叠达成的^[34-36]。当盖子打开时,底物得以进入脂肪酶催化口袋与活性中心相结合,使得脂肪酶表现出活性。而当盖子关闭时,底物无法进入脂肪酶催化口袋,使得脂肪酶失活。但有少数偏甘油酯脂肪酶盖子构象与激活并非如此,如 Guo 等^[37]研究发现,偏甘油酯脂肪酶 SMG1-F278N 的盖子区域并不是一段 α -螺旋,而是一段松散的 loop 结构,当盖子打开时,催化中心上方仍存在一个由残基 F278 与 N102 构成的桥状结构,阻碍底物进入催化中心,只有当残基 F278 与 N102 相向运动才使得催化中心暴露,脂肪酶表现出活性。这一激活过程被命名为 SMG1 的门控机制。氧负离子洞穴是由脂肪酶肽链上 NH 基团与底物形成的氧负离子以氢键结合形成的结构,这种结构有利于催化过程中底物对活性中心亲和力的提高以及活性中间体的稳定,降低了反应的活化

能,从而实现了脂肪酶的催化作用。

得益于帽区、催化三联体和氧负离子洞穴等结构的存在,使得偏甘油酯脂肪酶具备了相应的作用。Rengachari 等^[38]研究了芽孢杆菌 H257 的甘油单酯脂肪酶 MGLP 的结构,确定了其催化三联体和氧负离子洞穴结构,如图 1 所示。如同在 hMGL^[5](来源于人)和 bMGL^[39](来源于芽孢杆菌)中观察到的一样,MGLP 帽区下方存在一个长通道,催化残基和活性位点位于通道底部,埋在帽层和核心区域之间,通道从表面通向活性位点,从而使活性中心远离极性环境。相关报道显示,bMGL 活性位点暴露呈开放构象,hMGL 既有开放构象又有封闭构象,而 MGLP 一般呈封闭构象,这与帽区结构有很大的关系。而且 MGLP 帽区存在一个甘油出孔,孔几何形状会在底物结合和/或帽区移动期间发生变化,这与 MGLP 的底物选择性存在一定的关联。MGLP 的氧负离子洞穴由 Met98 和 Phe29 形成,其结构中含有大量氢键,能够稳定催化中心的活性构象,使甘油单酯水解反应过程中形成的四面体中间体稳定。可见,结构的差异导致偏甘油酯脂肪酶功能性和选择性的差异。



注:cap 结构即为盖子,氢键用虚线表示

图1 MGLP 的结构(参照文献[38]整理)

3 偏甘油酯脂肪酶的催化特性

众所周知,酶的催化具有特异性。因此,作为酶家族的一份子,偏甘油酯脂肪酶也有着其独特的催化特性。脂肪酶的催化特性主要是指其在催化时对底物种类和催化位置选择的偏好。不同的偏甘油酯脂肪酶,即使是来自于同一家族的偏甘油酯脂肪酶,它们结构与功能类似,但是性质却大相径庭,甚至编码同一偏甘油酯脂肪酶的基因,因为表达载体的不同,所表达出的偏甘油酯脂肪酶性质也不同^[23]。因此,深入研究偏甘油酯脂肪酶的性质,了解其具体的催化特性,对其生产和工业应用大有裨益。

脂肪酸是脂肪酶的重要底物之一,可在脂肪酶

的催化下与其他物质结合形成酯类。偏甘油酯脂肪酶一般可催化脂肪酸与甘油或甘油酯发生酯化反应或者酯交换反应生成甘油单酯或甘油二酯。由于偏甘油酯脂肪酶的底物特异性,不同偏甘油酯脂肪酶对于脂肪酸选择性也有所不同,如 Imamura 等^[21]从芽孢杆菌菌株 H-257 中分离纯化出甘油单酯脂肪酶 MGLP 后,对其脂肪酸选择性进行了探究,最终发现在 C2~C18 的酰基中,MGLP 对 1-单月桂酸甘油酯(C12 酰基)表现出最高的活性,当底物的酰基链长度增加到 C12 以上或降低到 C12 以下时,酶活性急剧降低。孙丽娟^[24]对甘油单酯和甘油二酯脂肪酶 SMG1 进行纯化表征后发现其对饱和脂肪酸没有选择性,但对不饱和脂肪酸油酸表现出了很好的选择性。刘璐^[40]研究发现,SMG1 的最佳选择性脂肪酸为辛酸。

由于偏甘油酯脂肪酶的特异性,仅甘油单酯和甘油二酯能作为其底物。偏甘油酯脂肪酶作用于甘油酯时存在 sn-1、sn-2 和 sn-3 3 个特异性位点。微生物偏甘油酯脂肪酶大部分没有特定的位置特异性,如 Lipase G50、SMG1 和 MgMDL2 等,但也有部分例外,Yuan 等^[41]发现青霉菌 HTCC2649 所产的甘油单酯-甘油二酯脂肪酶 MAJ1 具有 sn-1,3 位特异性。而在动物中,偏甘油酯脂肪酶对于甘油酯有着更严格的位置特异性。如:在果蝇体内,inaE 基因编码产生两种 MDGL,即 INAE-A 和 INAE-D,两者都具有高度的 sn-1 位选择性,是 sn-2 位选择性的 10 倍^[42];人体内 MDGL 亚型对于 sn-2 位的选择性是 sn-1 位选择性的 3~8 倍^[43]。

磷脂是生物膜的主要结构成分之一,在细胞的生化和生理中起着至关重要的作用^[44]。与脂肪酶类似,偏甘油酯脂肪酶也能对磷脂表现出活性。同样,磷脂作为底物时,偏甘油酯脂肪酶对其也具有一定的选择性。Wang 等^[45]以 L- α -溶血磷脂酰胆碱(LPC)和 L- α -磷脂酰胆碱(PC)为底物,通过结构分析和分子模拟发现,偏甘油酯脂肪酶 SMG1 能够水解 LPC 而不水解 PC,而造成这一选择性的原因是 LPC 的磷脂部分能很好地进入 SMG1 催化口袋发生反应,但 SMG1 催化口袋上方的残基会阻止 PC 的 sn-1 位部分进入催化口袋,使得 SMG1 对 PC 不表现出活性。Selvaraju 等^[46]通过实验论证发现,酿酒酵母细胞膜磷脂水平的增长与酵母中主要对甘油二酯表现出活性,占总甘油二酯脂肪酶活性 90% 的偏甘油酯脂肪酶 Yju3 关系不大,而是与另一种偏甘油酯脂肪酶 ORF MGL2 有关,在其过表达的菌株中能很明显检测到

细胞膜磷脂水平的提高,而且在过表达菌株的细胞裂解物和纯化的膜制备物中容易检测到其活性。

作为脂肪酶家族的一份子,偏甘油酯脂肪酶与甘油三酯脂肪酶存在诸多类似的形态与结构,但由于某些特殊差异性,使其在某些应用方面相较甘油三酯脂肪酶更加高效,这使得偏甘油酯脂肪酶有了更加广阔的应用前景。

4 偏甘油酯脂肪酶的应用

生物酶法相较于物理法和化学法,绿色环保,催化效率高,能耗低,在我国发展虽然比较迟,但近几年发展飞速,隐隐有赶超之势,也吸引着越来越多的科研工作者投身其中,挖掘其在更多领域的应用。偏甘油酯脂肪酶作为一种特殊的脂肪酶,得益于脂肪酶丰富的应用背景,在此基础上优化和扩展了脂肪酶的应用面。目前,偏甘油酯脂肪酶在食品、医疗和有机合成等领域均有着广泛的应用和独特的发展潜力。

4.1 食品领域

油脂在生产过程中会不可避免地混杂有游离脂肪酸,游离脂肪酸的性质很不稳定,易氧化导致油脂酸败,严重影响油脂的贮藏稳定性和品质。因此,脱除油脂中的游离脂肪酸是油脂精炼中至关重要的一步。在传统油脂加工业中,通常采用物理蒸馏或化学碱炼的方法来脱除油脂中的游离脂肪酸,其中:物理蒸馏脱酸中性油损失较少,但能耗大,对原料含磷量要求高,增加了脂类风险因子的产生风险^[47-48];化学碱炼脱酸彻底,但中性油和功能性脂类伴随物损失大,而且会产生大量工业废水,不适用于高酸值油脂脱酸^[49]。甘油酯为脂肪酶的天然底物之一,近年来随着酶技术的发展,酶法脱酸引起了研究者的广泛关注,相应的研究也越来越多。

迄今为止,酶法脱酸主要关注点集中在甘油三酯脂肪酶上,油脂工业生产采用的都还是商品化酶制剂 Novozym 435、Lipozyme 435、Lipozyme RM IM、Lipozyme TL IM 等甘油三酯脂肪酶。然而甘油三酯与醇类试剂(如伯醇和仲醇)同时存在时,在脂肪酶的催化下会发生醇解反应,生成脂肪酸醇酯、甘油、甘油单酯和甘油二酯^[50],醇解反应生成了多种副产物,这使得油脂的酶法脱酸时间变长,效果变差,所获得的油品质量降低。

由于偏甘油酯脂肪酶不会作用于甘油三酯,因而能够有效避免醇解反应发生,且脱酸效果好(即游离脂肪酸去除率高),脱酸效率高(即游离脂肪酸

去除速率高),无疑使其成为酶法脱酸的最优催化剂之一。Li等^[51-53]采用仅能选择性作用于甘油单酯和甘油二酯而不作用于甘油三酯的偏甘油酯脂肪酶催化高酸值米糠油和鲑鱼油脱酸,有效避免了脱酸过程中的甘油三酯醇解副反应,脱酸效果显著提升,但偏甘油酯脂肪酶对上述油脂的脱酸效率存在较大差异,其对高酸值米糠油(脂肪酸组成主要为

C16:0~C18:3)的脱酸效率较高,而对高酸值鲑鱼油(富含EPA/DHA,即C20:5n3/C22:6n3)的脱酸效率偏低,推测偏甘油酯脂肪酶对脂肪酸选择性的不同是导致脱酸效率差异的根本原因,具体原因仍有待进一步发掘。偏甘油酯脂肪酶与甘油三酯脂肪酶催化油脂脱酸的效果和效率比较如图2所示。

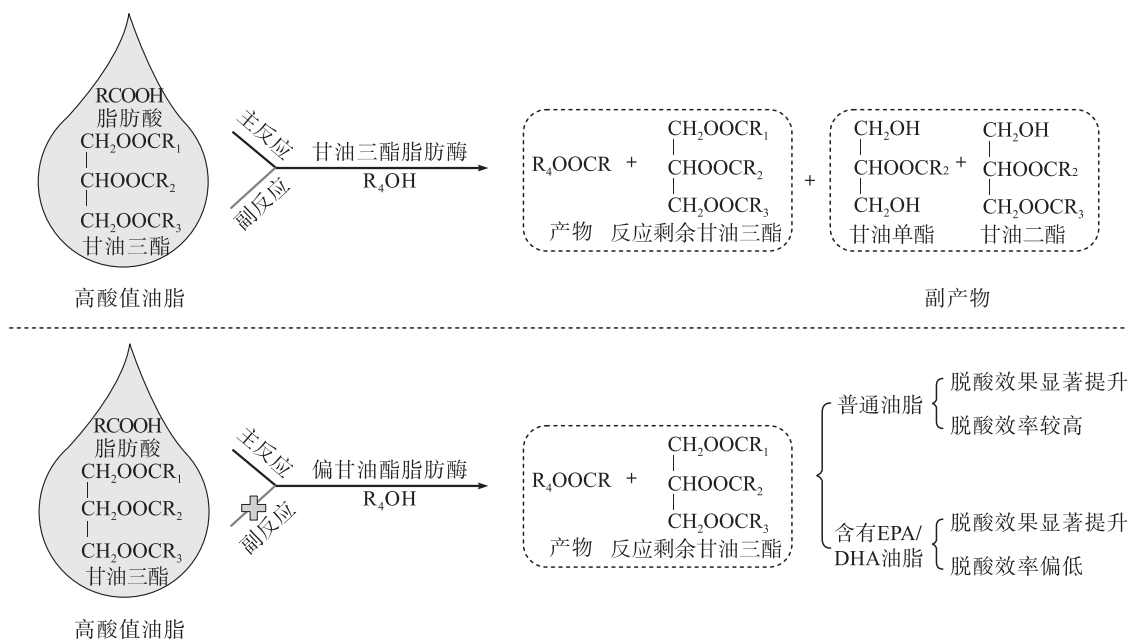


图2 偏甘油酯脂肪酶与甘油三酯脂肪酶催化油脂脱酸的效果和效率比较

甘油二酯是一种对人体有益的功能性物质,采用偏甘油酯脂肪酶合成甘油二酯能有效避免原材料的浪费和副产物甘油三酯的产生。另外,丁酸、己酸、辛酸和癸酸是能产生风味的脂肪酸,发酵产品和乳制品的风味与此相关,将其添加到食品中能增强食品的风味,采用偏甘油酯脂肪酶生产这些脂肪酸,相比于普通脂肪酶有更高的效率与得率。

4.2 有机合成领域

生物柴油是指由长链烷基酯组成的燃料,通常由脂质与醇发生化学反应生成脂肪酸单酯制成。生物柴油是一种可再生、可降解的燃料,符合可持续发展观,在面对石油供应减少、持续燃烧化石燃料带来的环境与气候问题的严峻情况下,生物柴油俨然成为一种新兴燃料。目前,制备生物柴油的传统化学法有许多局限性,如腐蚀仪器、乳化问题及脂肪酸皂化等问题。与传统化学法相比,酶法具有反应条件温和、反应副产物少和废物处理量少等优点,但酶法合成生物柴油也面临着许多困难,其中之一就是早期合成生物柴油普遍采用甘油三酯脂肪酶作为催化剂,这会导致发生醇解副反应,生成一些副产物,后续难以分离,而且普通甘油三酯

脂肪酶没有特异性,使得产物生成率和原料利用率较低。随着偏甘油酯脂肪酶的功能性被逐渐发掘,相关研究开始采用甘油三酯脂肪酶和偏甘油酯脂肪酶作为催化剂来共同生产生物柴油,在甘油三酯脂肪酶催化甘油三酯水解产生甘油二酯和甘油单酯后,偏甘油酯脂肪酶也参与反应水解相应产物,其原理如图3所示。

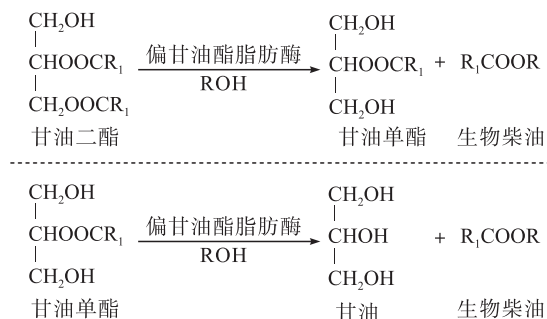


图3 偏甘油酯脂肪酶催化甘油二酯和甘油单酯制备生物柴油

相较于普通脂肪酶的催化方法,组合脂肪酶共同催化生产生物柴油避免了副产物的产生,反应耗时短、效率高、产物得率与原料利用率最大化,如:Hama等^[54]将偏甘油酯脂肪酶AOL加入到米根酶催化植物油生产生物柴油反应中,解除了甘油单酯

和甘油二酯对反应的限速,最终生物柴油产率达90%以上;Wei等^[55]采用磁性壳聚糖微胶囊快速包裹的方法,将偏甘油酯脂肪酶 AOL与脂肪酶 RML共固定化,催化废弃食用油制备生物柴油,在最佳条件下生物柴油产率达98.5%,分别是单一固定化 AOL和RML的1.3倍和1.6倍,为将废弃食用油转化为生物柴油提供了一种高效、经济的方法。

4.3 医疗领域

脂质包含脂肪酸、磷脂和甘油酯等,是人体不可或缺的一类疏水性生物分子,其作为结构成分、信号传导及激素传递在人体能量代谢和储存中均起着至关重要的作用。随着分子技术的进步以及体外高通量筛选方法和组合化学的发展,使得大量水溶性差的分子被列为候选药物,其中,近40%的新型候选药物具有亲脂性^[56-57]。相关研究表明,膳食或药物中脂质成分的存在可以结合人体脂质代谢通路影响药物的吸收,且脂质还可以刺激肠道淋巴系统对药物的吸收,使得药物能进一步绕过肝代谢从而直接进入体循环^[58-59]。因此,开发新型脂质药物或脂质-药物偶联物是医疗领域的重要突破点之一。

结构化磷脂是以磷脂为载体,将功能性脂肪酸如DHA、EPA和 α -亚麻酸等连接在其结构上形成的一种具有生物活性的磷脂。结构化磷脂作为载体,可以有效增强人体对功能性脂肪酸的吸收和利用。此外,多不饱和脂肪酸形成的结构化磷脂对于治疗与预防动脉粥样硬化、高血压、糖尿病和冠心病有着很大的帮助^[60]。Kaki等^[61]使用脂肪酶转酯化制备了sn-1位含59% α -亚麻酸的结构化磷脂,Chojnacka等^[62]使用来自*Candida antarctica*的脂肪酶B制备得到了sn-1位含56%石榴酸的结构化磷脂。但由于以上研究采用的均为甘油三酯脂肪酶,会不可避免地产生甘油二酯,影响了目标产物的产量,倘若采用MGL进行催化反应,理论上会有更高的产率。动物偏甘油酯脂肪酶虽然纯化分离困难,但参与了代谢过程,所以其在医疗领域应用研究较多,如花生四烯酸代谢对人体起着重要的生理调控作用,因此作为介导2-花生四烯酸甘油酯(2-AG)信号传导的MGL是一种良好的药物研发靶蛋白^[63-64]。除此之外,人体血清偏甘油酯脂肪酶水平也是医疗上判断某些疾病的重要指标之一,如阿尔茨海默病和癌症等。无论是偏甘油酯脂肪酶的检测还是脂质药物的定向合成与开发,都显现出了偏甘油酯脂肪酶在医疗领域的重大潜力,值得进一步研究与挖掘。详细的偏甘油酯脂肪酶应用总结如图4所示。

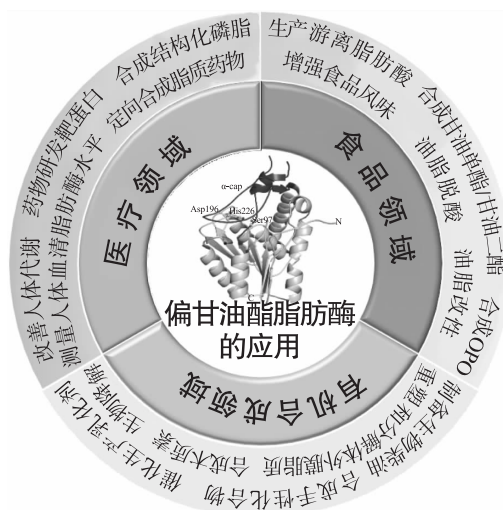


图4 偏甘油酯脂肪酶的应用现状总结

5 总结与展望

由于生物技术起步较晚,且对脂肪酶的相关研究和应用主要集中在甘油三酯脂肪酶上,因此目前关于偏甘油酯脂肪酶的研究比较匮乏,已发现的偏甘油酯脂肪酶种类和数目都很稀少,对于其具体催化机制、三维构象以及特定功能也知之甚少,加之提取纯化和贮存活性保留难度大,严重限制了偏甘油酯脂肪酶的相关研究和工业化应用。微生物种类繁多,随着基因组学和蛋白组学的高速发展,越来越多的微生物基因组已经被全部解析并录入数据库中,偏甘油酯脂肪酶的本质是蛋白质,迄今研究并解析的各种蛋白质也都有如Uniprot和PDB等数据库,因此对照已发现的偏甘油酯脂肪酶基因数据在基因组或蛋白数据库中寻找类似基因数据,不失为一种发掘新型偏甘油酯脂肪酶,解决其种类、数目稀少的有效方法。而对于偏甘油酯脂肪酶活性保留问题,可以从酶改性、溶剂以及固定化等方面入手解决。不同偏甘油酯脂肪酶的结构有很大差异,对其活性位点上氨基酸的增补、修改都能在一定程度上影响酶的活性;偏甘油酯脂肪酶作为一种界面酶,在不同溶剂中活性不同,近年来研究发现低共熔溶剂对酶的活性有很大影响,这种新型溶剂的发掘和筛选也对偏甘油酯脂肪酶的未来应用起到了很大推动作用;除此之外,固定化技术是脂肪酶商业化应用的重要手段之一,可以很好地延长脂肪酶的保质期及提高脂肪酶的活性,固定化技术亦可以应用在偏甘油酯脂肪酶上,不同固定化方法(物理吸附、交联等)和不同固定化原料(树脂、活性炭等)的探究是解决酶活性保留问题,推动其工业化应用的重要手段之一。

随着近年来酶工程技术的发展及绿色化学等领

域的兴起,偏甘油酯脂肪酶因其独特的底物选择性和催化高效性,且催化过程绿色环保,可重复利用,符合可持续发展观念,使其在各领域具有广阔的应用前景,也吸引了越来越多学者的关注。相信随着更多偏甘油酯脂肪酶被发掘和研究,其在食品、医疗等领域的应用将迎来长足发展。

参考文献:

- [1] ARNOLD F H, VOLKOV A A. Directed evolution of biocatalysts [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, 3 (1): 54 - 59.
- [2] MARUYAMA T, NAKAJIMA M, UCHIKAWA S, et al. Oil - water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2000, 77(11): 1121 - 1127.
- [3] SAKIYAMA T, YOSHIMI T, MIYAKE A, et al. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from *Pseudomonas* sp. LP7315 [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91(1): 27 - 32.
- [4] KARLSSON M, CONTRERAS J A, HELLMAN U, et al. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(43): 27218 - 27223.
- [5] LABAR G, BAUVOIS C, BOREL F, et al. Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling [J]. *Chem Biochem*, 2010, 11(2): 218 - 227.
- [6] GUPTA R, GUPTA N, RATHI P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(6): 763 - 781.
- [7] IKEDA Y, OKAMURA K, FUJII S. Purification and characterization of rat liver microsomal monoacylglycerol lipase in comparison to the other esterases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 488(1): 128 - 139.
- [8] DE JONG B J, KALKMAN C, HÜLSMANN W C. Partial purification and properties of monoacylglycerol lipase and two esterases from isolated rat small intestinal epithelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 530(1): 56 - 66.
- [9] HEE - CHEONG M, SEVERSON D L. Properties of monoacylglycerol lipase in rabbit aorta [J]. *Lipids*, 1987, 22(12): 999 - 1004.
- [10] KIM R J, KIM H J, SHIM D, et al. Molecular and biochemical characterizations of the monoacylglycerol lipase gene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2016, 85(6): 758 - 771.
- [11] WANG X, CHAO N, ZHANG A, et al. Systematic analysis and biochemical characterization of the caffeoyl shikimate esterase gene family in poplar [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (24): 13366 [2023 - 03 - 24]. <https://doi.org/10.3390/ijms222413366>.
- [12] JAEGER K E, EGGERT T. Lipases for biotechnology [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(4): 390 - 397.
- [13] DEANGELIS Y M, SAUNDERS C W, JOHNSTONE K R, et al. Isolation and expression of a *Malassezia globosa* lipase gene, LIP1 [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(9): 2138 - 2146.
- [14] TANG W, LAN D, ZHAO Z, et al. A thermostable monoacylglycerol lipase from marine *Geobacillus* sp. 12AMOR1: Biochemical characterization and mutagenesis study [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 780 [2023 - 03 - 24]. <https://doi.org/10.3390/ijms20030780>.
- [15] YAMAGUCHI S, MASE T. Purification and characterization of mono - and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U - 150 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 34(6): 720 - 725.
- [16] TOIDA J, KONDOH K, FUKUZAWA M, et al. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(7): 1199 - 1203.
- [17] TORNQVIST H, BELFRAGE P. Purification and some properties of a monoacylglycerol - hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue [J]. *J Biol Chem*, 1976, 251(3): 813 - 819.
- [18] DINH T P, KATHURIA S, PIOMELLI D. RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2 - arachidonoylglycerol [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 66(5): 1260 - 1264.
- [19] MARSICANO G, WOTJAK C T, AZAD S C, et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories [J]. *Nature*, 2002, 418 (6897): 530 - 534.
- [20] HOHMANN A G, SUPLITA R L, BOLTON N M, et al. An endocannabinoid mechanism for stress - induced analgesia [J]. *Nature*, 2005, 435(7045): 1108 - 1112.
- [21] IMAMURA S, KITAURA S. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H - 257 [J]. *J Biochem*, 2000, 127(3): 419 - 425.
- [22] HEIER C, TASCHLER U, RENGACHARI S, et al. Identification of Yju3p as functional orthologue of mammalian monoglyceride lipase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(9): 1063 - 1071.

- [23] HUANG J, YANG Z, GUAN F, et al. A novel mono- and diacylglycerol lipase highly expressed in *Pichia pastoris* and its application for food emulsifier preparation [J]. *Process Biochem*, 2013, 48(12): 1899–1904.
- [24] 孙丽娟. 球形马拉色菌脂肪酶 SMG1 的重组表达及性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [25] 徐环. 球形马拉色菌脂肪酶 MgMDL2 的酶学性质表征及底物识别机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [26] 刘晓慧, 蓝东明, 王永华. 偏甘油酯脂肪酶 PrLip 的重组表达及酶学性质表征[J]. *食品科学技术学报*, 2020, 38(4): 70–78.
- [27] BRADY L, BRZOZOWSKI A M, DEREWENDA Z S, et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase[J]. *Nature*, 1990, 343(6260): 767–770.
- [28] NEU E, FEATHERSTON J, REES J, et al. A draft genome sequence of the rose black spot fungus *Diplocarpon rosae* reveals a high degree of genome duplication [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185310[2023-03-24]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185310>.
- [29] BALCÃO V M, PAIVA A L, MALCATA F X. Bioreactors with immobilized lipases; State of the art [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 18(6): 392–416.
- [30] CASAS-GODOY L, DUQUESNE S, BORDES F, et al. Lipases: An overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 861: 3–30.
- [31] 叶纯, 王玉娟. 脂肪酶的生物学改造研究进展[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(1): 77–80.
- [32] RENGACHARI S, ASCHAUER P, SCHITTMAYER M, et al. Conformational plasticity and ligand binding of bacterial monoacylglycerol lipase [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(43): 31093–31104.
- [33] CARR P D, OLLIS D L. α/β Hydrolase fold: An update [J]. *Protein Pept Lett*, 2009, 16(10): 1137–1148.
- [34] BARBE S, LAFAQUIÈRE V, GUIEYSSE D, et al. Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations [J]. *Proteins*, 2009, 77(3): 509–523.
- [35] RAHMAN M Z A, SALLEH A B, ABDUL RAHMAN R N Z R, et al. Unlocking the mystery behind the activation phenomenon of T1 lipase: A molecular dynamics simulations approach [J]. *Protein Sci*, 2012, 21(8): 1210–1221.
- [36] DEREWENDA U, BRZOZOWSKI A M, LAWSON D M, et al. Catalysis at the interface: The anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase [J]. *Biochemistry*, 1992, 31(5): 1532–1541.
- [37] GUO S, XU J, PAVLIDIS I V, et al. Structure of product-bound SMG1 lipase: Active site gating implications [J]. *FEBS J*, 2015, 282(23): 4538–4547.
- [38] RENGACHARI S, BEZERRA G A, RIEGLER-BERKET L, et al. The structure of monoacylglycerol lipase from *Bacillus* sp. H257 reveals unexpected conservation of the cap architecture between bacterial and human enzymes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(7): 1012–1021.
- [39] BERTRAND T, AUGÉ F, HOUTMANN J, et al. Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition [J]. *J Mol Biol*, 2010, 396(3): 663–673.
- [40] 刘璐. 马拉色菌脂肪酶 SMG1 酶学性质表征及晶体学研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [41] YUAN D, LAN D, XIN R, et al. Biochemical properties of a new cold-active mono- and diacylglycerol lipase from marine member *Janibacter* sp. strain HTCC2649 [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 10554–10566.
- [42] LEUNG H T, TSENG-CRANK J, KIM E, et al. DAG lipase activity is necessary for TRP channel regulation in *Drosophila photoreceptors* [J]. *Neuron*, 2008, 58(6): 884–896.
- [43] BISOGNO T, HOWELL F, WILLIAMS G, et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain [J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(3): 463–468.
- [44] JALA R C, HU P, YANG T, et al. Lipases as biocatalysts for the synthesis of structured lipids [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 861: 403–433.
- [45] WANG X, XU H, LAN D, et al. Hydrolysis of lysophosphatidylcholines by a lipase from *Malassezia globosa* [J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2015, 117(10): 1655–1658.
- [46] SELVARAJU K, GOWSALYA R, VIJAYAKUMAR R, et al. MGL2/YMR210w encodes a monoacylglycerol lipase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(8): 1174–1186.
- [47] PRASAD R B N. Refining of rice bran oil [J]. *Lipid Technol*, 2006, 18(12): 275–279.
- [48] JIN J, XIE D, CHEN H, et al. Production of rice bran oil with light color and high oryzanol content by multi-stage molecular distillation [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2016, 93(1): 145–153.
- [49] ARYUSUK K, PUENGTHAM J, LILITCHAN S, et al. Effects of crude rice bran oil components on alkali-refining loss [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2008, 85(5): 475–479.
- [50] 周志华, 洪育翎, 陈娜, 等. 酶法改性微藻油脂制备功能性油脂的研究进展 [J]. *中国油脂*, 2023, 48(2):

- 79–80, 81.
- [51] LI D, WANG W, DURRANI R, et al. Simplified enzymatic upgrading of high – acid rice bran oil using ethanol as a novel acyl acceptor[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(35): 6730–6737.
- [52] LI D, LIU P, WANG W, et al. An innovative deacidification approach for producing partial glycerides – free rice bran oil[J]. *Food Bioprocess Technol*, 2017, 10(6): 1154–1161.
- [53] LI D, LIU P, WANG W, et al. An efficient upgrading approach to produce *n* – 3 polyunsaturated fatty acids – rich edible grade oil from high – acid squid visceral oil [J]. *Biochem Eng J*, 2017, 127: 167–174.
- [54] HAMA S, NUMATA T, TAMALAMPUDI S, et al. Use of mono – and diacylglycerol lipase as immobilized fungal whole cells to convert residual partial glycerides enzymatically into fatty acid methyl esters[J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2009, 58(1/2/3/4): 93–97.
- [55] WEI H, WANG Q, ZHANG R, et al. Efficient biodiesel production from waste cooking oil by fast co – immobilization of lipases from *Aspergillus oryzae* and *Rhizomucor miehei* in magnetic chitosan microcapsules [J]. *Process Biochem*, 2023, 125: 171–180.
- [56] LIPINSKI C A, LOMBARDO F, DOMINY B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1/2/3): 3–26.
- [57] VAN DE WATERBEEMD H, SMITH D A, BEAUMONT K, et al. Property – based design: Optimization of drug absorption and pharmacokinetics [J]. *J Med Chem*, 2001, 44(9): 1313–1333.
- [58] MARKOVIC M, BEN – SHABAT S, APONICK A, et al. Lipids and lipid – processing pathways in drug delivery and therapeutics[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3248 [2023 – 03 – 24]. <https://doi.org/10.3390/ijms21093248>.
- [59] PORTER C J H, TREVASKIS N L, CHARMAN W N. Lipids and lipid – based formulations: Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(3): 231–248.
- [60] MASSARO M, CARLUCCIO M A, DE CATERINA R. Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: A clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet[J]. *Cardiologia*, 1999, 44(6): 507–513.
- [61] KAKI S S, RAVINDER T, ASHWINI B, et al. Enzymatic modification of phosphatidylcholine with *n* – 3 PUFA from silkworm oil fatty acids [J/OL]. *Grasas Y Aceites*, 2014, 65(2): e021 [2023 – 03 – 24]. <https://doi.org/10.3989/gya.097213>.
- [62] CHOJNACKA A, GŁADKOWSKI W, GLISZCZYŃSKA A, et al. Synthesis of structured phosphatidylcholine containing punicic acid by the lipase – catalyzed transesterification with pomegranate seed oil [J]. *Catal Commun*, 2016, 75: 60–64.
- [63] SCALVINI L, PIOMELLI D, MOR M. Monoglyceride lipase: Structure and inhibitors [J]. *Chem Phys Lipids*, 2016, 197: 13–24.
- [64] BERTRAND T, AUGÉ F, HOUTMANN J, et al. Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition [J]. *J Mol Biol*, 2010, 396(3): 663–673.
-
- (上接第 87 页)
- [21] VERSTRINGE S, DANTHINE S, BLECKER C, et al. Influence of monopalmitin on the isothermal crystallization mechanism of palm oil[J]. *Food Res Int*, 2013, 51(1): 344–353.
- [22] 王凤艳, 王兴国, 陶冠军, 等. 巧克力起霜研究进展 [J]. *食品科学*, 2011, 32(5): 301–305.
- [23] BELŠČAK – CVITANOVIĆ A, KOMES D, DUJMOVIĆ M, et al. Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives [J]. *Food Chem*, 2015, 167: 61–70.
- [24] STORTZ T A, MARANGONI A G. Heat resistant chocolate [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2011, 22(5): 201–214.
- [25] ZHAO H, JAMES B J. Fat bloom formation on model chocolate stored under steady and cycling temperatures [J]. *J Food Eng*, 2019, 249: 9–14.
- [26] 司华光, 黄健花, 张凌芷, 等. 凝胶油 – 棕榈仁油混合油在夹心巧克力中的应用性能评价 [J]. *中国油脂*, 2016, 41(6): 73–78.
- [27] SAPUTRO A D, VAN DE WALLE D, KADIVAR S, et al. Feasibility of a small – scale production system approach for palm sugar sweetened dark chocolate [J]. *Eur Food Res Technol*, 2017, 243(6): 955–967.