

脂肪酶的底物特异性及其应用潜力*

曹淑桂

(吉林大学酶工程国家重点实验室, 长春 130023)

摘要 不同来源的 Lipase 对底物油脂中脂肪酸的链长、不饱和度及不饱和脂肪酸的双键位置表现出不同的脂肪酸特异性; 对甘油酯中 Sn-1 (3) 和 Sn-2 位酯键具有不同的位置特异性; 对甘油酯中立体对映结构的 1 位和 3 位酯键呈现不同的立体特异性. 脂肪酶能够催化酯水解和酯合成 (或酯交换) 反应, 用于制备甘油单酯、多不饱和脂肪酸及其酯和具有光学活性的有机化合物, 因此它在油脂加工和有机合成中具有很大的应用潜力.

关键词 脂肪酶, 底物特异性, 油脂加工, 有机合成

脂肪酶即甘油三酯水解酶 (lipase, E. C 3.1.1.3). 它催化天然底物油脂水解, 生成脂肪酸、甘油和甘油单酯或二酯, 是生物体内脂代谢不可缺少的重要水解酶. 虽然已有近百年的研究历史, 而且 60 年代后期许多国家都已工业化生产了微生物脂肪酶. 但是, 它的应用 (特别是在我国) 远不及其它工业用酶. 其原因是: 脂肪酶的底物难溶于水, 酶只能在油-水界面或有机相中作用, 涉及到的界面酶学和非水酶学的一些问题尚不十分清楚, 因此, 限制了脂肪酶的应用.

80 年代后期以来, 界面酶学和非水酶学的研究与应用取得了突破性的进展, 极大地促进了脂肪酶多功能催化作用的开发. 脂肪酶不仅能催化油脂水解, 生产各种脂肪酸、甘油和甘油单酯或二酯; 而且在有机相中还能催化酯合成和酯交换反应, 生产医药、化工、食品和化妆品的重要原料, 其中有些产品是用化学方法难以得到的, 而在常温、常压下, 酶催化却能一举成功. 因此, 脂肪酶在油脂加工和有机合成中显示了巨大的应用潜力. 它以其来源广, 催化功能多的优势, 已成为应用酶中的一枝新秀.

1 脂肪酶的底物特异性

脂肪酶多功能催化作用的开发必须以脂肪

酶的底物特异性为基础. 众所周知, 酶的底物特异性取决于酶分子的结构, 特别是酶活性中心的结构. 因此, 酶的来源不同, 其结构的差异使酶的底物特异性也不同. 脂肪酶的底物特异性包括:

1.1 脂肪酸特异性 (Acyl Chain Specificity)

它是指酶对不同 (碳链长度和饱和度) 的脂肪酸所表现出的特殊反应性. 不同来源的脂肪酶水解甘油三酯的脂肪酸特异性有很大差异. 例如圆弧青霉 (*Penicillium cyclopium*) 脂肪酶对短链 (C_8 以下) 脂肪酸, 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和根霉 (*Rhizopus delemar*) 脂肪酶对中等链长 (C_8 — C_{12}) 脂肪酸, 白地霉 (*Geotrichum candidum*) 脂肪酶对三油酸 (不饱和酸) 分别呈现强的特异性. 这些来源的酶都对甘油三油酸酯表现出同等程度的水解能力; 黑曲霉脂肪酶对 C_2 — C_{18} 范围的脂肪酸均可水解, 而白地霉脂肪酶仅能水解 C_8 — C_{12} 范围的脂肪酸. 玉米、蓖麻子、油菜籽等植物种子的脂肪酶分别对三癸酸和三亚麻酸甘油酯、三蓖麻醇酸甘油酯、廿二碳酸甘油酯有很高的水解活力. 猪胰脂肪酶对短链酸 (特别是三丁酸甘油酯) 水解特异性高^[1].

这些酶对底物中不饱和脂肪酸的双键位置

* 国家自然科学基金委员会和吉林省科委资助.

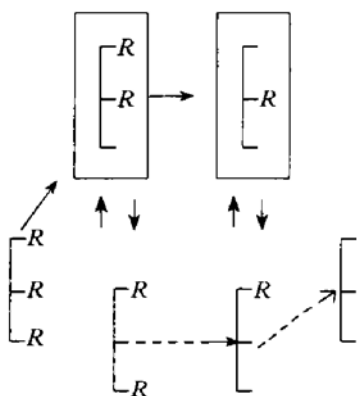
收稿日期: 1994-01-17, 修回日期: 1994-03-29

也呈现不同反应性,如猪胰脂肪酶对甘油三酯中 *cis*-C_{18:1} 酸异构体的特异性水解的研究表明,羧基酯键附近的双键($\Delta 2-\Delta 7$,特别是 $\Delta 5$ 异构体)不利于酶对酯键的水解;而白地霉脂肪酶在类似的实验中,对 *cis*-9-C_{18:1} 酸和 *cis*-9、12-C_{18:2} 酸的酯键表现出特异水解活力^[2].

1.2 位置特异性 (Positional Specificity)

它是指酶对底物甘油三酯中 Sn-1(或 3)和 Sn-2 位酯键的识别和水解的反应性.

(a) 黑曲霉脂肪酶
根霉脂肪酶



(b) 白地霉脂肪酶
圆弧青霉脂肪酶

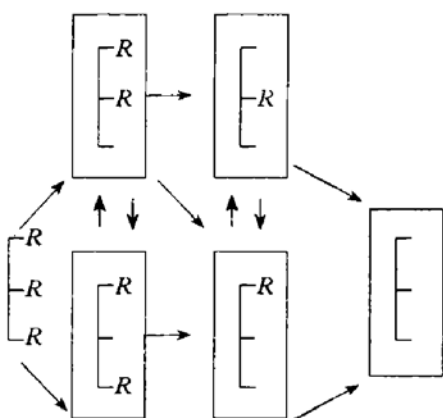


图 1 四种微生物脂肪酶水解甘油三酯的机制

R: 酰基; [: 甘油; $\rightarrow$: 脂肪酶催化的反应; $\uparrow \downarrow$: 非酶催化的酰基转移; $\dashrightarrow$: 长时间反应而产生的分解; $\square$: 积累的产物.

早在 1935 年就对猪胰脂肪酶的位置特异性进行了研究,但由于酶不纯和部分甘油酯的非酶催化的酰基转移反应的影响以及当时脂质分析技术的限制,所得到的研究结果各不相

同.直到 60 年代,才确定猪胰脂肪酶仅水解 1 和 3 位酯键. Noma 用放射性标记方法详细地研究了蓖麻子脂肪酶的位置特异性,发现它没有位置选择性,对 1 (或 3) 和 2 位酯键水解速度相同,酯键合成速度也相同. Okumura 比较了四种微生物脂肪酶水解甘油三油酸酯的位置选择性,其结果如图 1 所示:黑曲霉和根霉的脂肪酶仅催化 1 (或 3) 位酯键水解,对 2 位酯键无作用;白地霉和圆弧青霉的脂肪酶无位置特异性,水解甘油三酯的所有酯键.他们还从这些酶水解可可脂(混合脂肪酸组成)的实验中得到相同结果,即来源于猪胰、黑曲霉和根霉的脂肪酶不论可可脂的脂肪酸种类如何,均不能水解 2 位酯键;白地霉和圆弧青霉的脂肪酶虽然都能水解 2 位酯键,但是前者优先水解不饱和脂肪酸,而后者对饱和与不饱和脂肪酸水解能力相同.大鼠脂肪组织的脂蛋白脂肪酶水解甘油三酯的三个位置的酯键速度相同;牛奶脂蛋白脂肪酶(纯酶)和人的脂蛋白脂肪酶只水解 1 (3) 位酯键^[2].

1.3 立体特异性 (Stereospecificity)

一般是指酶对底物甘油三酯中立体对映结构的 1 位和 3 位酯键的识别和选择性水解,在有机相中酶促酯合成和酯交换时,酶对底物的不同立体结构也表现出立体特异性.

猪胰脂肪酶水解甘油三酯无 1 和 3 位的立体选择性;人奶和牛奶中脂蛋白脂肪酶优先水解 1 位酯键.

以上介绍的仅是脂肪酶催化甘油三酯水解反应的各种特异性;事实上,脂肪酶在催化酯的合成与交换时,也具有底物特异性^[3, 4];脂肪酶来源的广泛性和底物特异性的多样化给脂肪酶底物特异性的研究带来一定困难.然而,正是由于这两点也使脂肪酶在油脂加工和有机合成中有巨大应用潜力.

2 在油脂加工中的应用

2.1 油脂水解

脂肪酶可水解天然油脂,制备脂肪酸、甘油和甘油单酯,它特别适用于具有生理活性而

又不稳定的脂肪酸和具有特定结构的甘油单酯的生产^[5]。因为酶法催化油脂水解可以避免高温高压化学法水解所引起的不饱和脂肪酸的氧化、变质,而且利用酶的位置特异性和脂肪酸特异性,可以选择性的水解甘油三酯中的特定位置的酯键和特定脂肪酸。

酶催化油脂水解时,除了选择适当的酶以外,还应该根据生产目的选择合适的油脂做为底物,并根据底物的溶解性,选择相应的溶剂系统。高桥穰二研究了脂肪酶在水-有机溶剂双相体系催化油脂水解时,有机溶剂对催化效果的影响。发现添加丙酮等极性强的溶剂,水解反应不能进行;添加异辛烷、异庚烷等弱极性或无极性的溶剂,能促进水解反应。促进效果与溶剂性质之间的相关性,目前并不十分明确。他们用溶剂的溶解参数(δ)比较好地描述了这一相关性,即 δ 值越小,与水相溶性越小,促进水解效果越高。有机溶剂的添加量对水解率也有明显的影响。添加适量的异辛烷,不仅能提高油脂水解率,而且有利于酶的回收、再利用。他们还选用廉价的动物骨做为载体(PB),制备了高催化效率的固定化脂肪酶,PB经橄榄油处理后,其固定化酶活力比未处理的提高7倍。虽然,其中机理还不清楚,但是,这种固定化载体及其处理方法很有实用价值。

2.2 油脂改良

近几年,随着非水酶学研究的不断深入和发展,脂肪酶的应用已从油脂水解扩展到酯合成和酯交换。利用酯交换反应,可以把廉价的油脂改成具有食用和医用价值的特殊油脂。

Saeamura 利用脂肪酶在微水溶剂系统中催化的酯交换反应,成功地制备了类似可可脂的油脂。因为可可脂的主要成分是1(3)-棕榈酸-3(1)硬脂酸-2油酸甘油三酯(SOP),或1,3-二硬脂酸-2油酸甘油三酯(SOS)。因此,选用1,3位特异脂肪酶催化2位是油酸的油脂同棕榈酸和硬脂酸之间的酯交换反应,应该得到SOP或SOS的类似物。日本富士油脂公司已得到有关技术的发明专利。

Matsushima 等^[6]用单甲氧基聚乙二醇修

饰的脂肪酶(PEG-lipase)催化牛油、猪油和羊油等分别同橄榄油间的酯交换反应,使它们的熔点显著降低。Eigtved 等用脂肪酶催化人造奶油与不饱和脂肪酸的酯交换反应,使人造奶油熔点降低,改良了人造奶油质量^[7]。

鱼油的主要成分是由大量 n-3 系高度不饱和脂肪酸(n-3 PUFA)组成的甘油三酯(TG)。n-3 PUFA 具有预防循环系统疾病和提高智力等生理功能。因此,加工、改良鱼油,制备功能性保健医药和食品的研究与开发日益增多。但是,由于人体对 n-3 PUFA 难以消化和吸收,而且 PUFA 极易氧化。所以,制成富含 n-3 PUFA 的甘油三酯最为理想。山根等^[7]用脂肪酶选择性地水解鱼油,使鱼油中 n-3 PUFA 含量由原来的 15%—30%提高到 50%;Okada 等^[8]用脂肪酶在微水介质中催化鱼油的酯交换反应和廿碳五烯酸(EPA),廿二碳六烯酸(DHA)同甘油的酯合成反应,得到富含 n-3 PUFA 的甘油三酯。

磷脂具有降低血中胆固醇和中性脂肪酸的含量,防止脂肪肝等重要生理功能。但是如果体内磷脂饱和脂肪酸含量过高,将发生生理障碍,引起疾病。因此,若把磷脂中饱和脂肪酸换为人体必需脂肪酸,不仅可以避免上述由于饱和脂肪酸过多而引起的疾病,而且,含高不饱和脂肪酸的卵磷脂具有细胞分化诱导作用,作为癌症治疗药物已引起瞩目。但是,高不饱和脂肪酸磷脂极易氧化,至今难以用化学方法简单地合成。我们研究了不同来源的脂肪酶催化亚油酸与二棕榈酰卵磷脂(DPPL)的酯交换反应,发现酵母脂肪酶具有明显的催化活力。Yoshimoto 等用 PEG-lipase 催化廿碳五烯酸(EPA)同 DPPL 的酯交换反应,制备了廿碳五烯酰棕榈酰卵磷脂(EPPC)。

2.3 油脂甘油醇解

油脂的甘油醇解是生产甘油单酯的重要途径之一,化学方法催化该反应时,甘油单酯的转化率仅达到 40%—50%,而且还有高温氧化的副产物和金属催化剂的毒性。我们研究了四种脂肪酶及其固定化酶在无溶剂系统中催化橄

榄油、猪油和牛油等油脂的甘油醇解反应,发现假单胞杆菌脂肪酶催化牛油的甘油醇解反应时,甘油单酯转化率可达63%以上,而且无氧化副产物,产物分离简单。

3 在有机合成中的应用

酶能在有机介质中表现出生物活性,这并不奇怪,因为生物体中许多酶,如膜酶就是在天然的疏水环境中发挥作用的。酶在几乎无水的有机溶剂中,只要保证维持酶构象的分子表面“必需水”(essential water),酶就具有活性,而且比水相催化具有许多优点^[9]: a. 提高脂溶性底物的溶解度,有利于高浓度底物连续生物转化; b. 可以进行一些在水相中热力学和动力学上所不能进行的反应,如酯交换和酯合成或肽合成; c. 可以降低底物或产物对酶的抑制作用; d. 有利于产物和非固定化酶的回收; e. 可以抑制由水引起的副反应; f. 酶的热稳定性高; g. 可以防止微生物污染。

因此,酶在有机相中催化反应的研究发展迅速,特别是脂肪酶在以下几方面的研究与应用尤为引人注目。

3.1 不对称合成

许多抗生素、生理活性物质、农药、除草剂等都以其光学活性结构而发挥作用。化学合成高光学纯度的这些化合物一直是有机合成化学的重要课题之一。

Tanaka 等用脂肪酶催化选择性酯合成或酯交换反应,制备了高光学纯度的 *D*-薄荷醇、 α -取代环己醇、2-丁醇和含卤素的羧酸等光学活性化合物。他们设计了酶可以在有机溶剂中连续拆分 2-(4-氯苯氧)丙酸的生物反应器。Klibanov 等^[10]用脂肪酶拆分了醇、羧酸、酯和胺的外消旋化合物。

我们研究了几种不同来源的脂肪酶催化 2-辛醇外消旋体的拆分,发现来源不同的脂肪酶对 *R* 型或 *S* 型的 2-辛醇立体选择性及其选择性的均不相同,在最适条件下,假单胞杆菌脂肪酶催化 2-辛醇拆分,可得到光学纯度达 97% 以上的 2-辛醇。

3.2 大环内酯和聚酯的合成

大环内酯和聚酯是医药和化工生产的重要原料。它们的有机合成,尤其是不对称合成过程烦琐,收率低。在有机相中脂肪酶催化 ω -羟基羧酸的甲酯分子内缩合,形成大环内酯,产率可高达 80%^[11]。选择合适来源的酶可以达到不对称合成的目的。猪胰脂肪酶在己烷中催化含有不对称碳的 4-羟基戊甲酯和 5-羟基己甲酯的内酯化反应,能合成具有光学活性的 γ -内酯和 δ -内酯;同样方法催化 4-羟基庚二酸酯的不对称内酯化,能合成旋光纯度为 98% 的 *R* 型内酯^[12]。脂肪酶催化二羧酸和二醇缩合,形成大环内酯的收率与酶的来源和底物链长密切相关^[13]。

脂肪酶催化 ω 羟酸,二羧酸二酯同二醇的分子间缩合,能合成生物可降解的聚酯,用于农用薄膜^[14]。

3.3 糖酯的合成及二醇和甾体的选择性酰化

对多羟基进行选择性的酰化是有机合成的困难之一。Klibanov 用猪胰脂肪酶在无水吡啶中催化各种脂肪酸 (C_2 、 C_4 、 C_8 、 C_{12}) 的三氯乙酯与单糖的酯交换反应,完成了葡萄糖 1 位羟基的选择性酰化。但是对二糖的酰化率极低,可能由于立体障碍的影响。不同来源的脂肪酶催化上述反应时,选择性酰化羟基的位置不同。因此,根据不同目的选择相应的酶,能够实现糖类、二元醇和类固醇的选择性酰化,制备具有特殊生理活性的糖酯和类固醇酯^[15]。

3.4 其它

脂肪酶活性中心 Ser 的存在,使它表现出肽合成活力,可合成某些生理活性肽^[16]。利用脂肪酶的底物特异性还能合成许多作为香料的短链脂肪酸酯、用于化妆品和药物的长链脂肪酸酯以及具有广泛用途的甘油单酯和甘油二酯。

为了使脂肪酶在上述反应中充分发挥催化作用,必须注意有机溶剂的选择和最适水含量的控制。因为溶剂或含水量对酶活性和选择性有显著影响, Klibanov 对此提出了“溶剂工程”(solvent engineering) 新概念,他认为这有

可能发展成为蛋白质工程的一种辅助工程而受到重视。

此外,适于有机相酶催化的固定化载体和固定化方法的开发与研究;生物反应器的设计;产物分离与分析技术的建立;用于不同催化反应的脂肪酶酶源(特别是微生物)的开发,必将促进对脂肪酶的研究和利用。

参 考 文 献

- 1 岩井美枝子. 油脂, 1989; 42 (3): 84
- 2 岩井美枝子. 油脂, 1989; 42 (4): 89
- 3 Okumura S, Iwai M, Tujisaka Y. Biochim Biophys Acta, 1979; 575: 156
- 4 Gao Shugui, Feng Y, Liu Z B *et al.* Appl Biochem Biotechnol, 1992; 32: 7
- 5 高桥稷二. Bio Industry, 1990; 7 (7): 407
- 6 Matsushima A, Kadera Y, Takahashi K *et al.* Biotechnol Lett, 1986; 8: 73
- 7 山根恒夫, 星野保. Bio Industry, 1990; 7 (7): 477
- 8 Okada K, Takahashi K, Hatano M *et al.* J Jpn Oil Chem Soc (YUKAGAKU), 1990; 39: 50
- 9 Dordick J S. Enzyme Microb Technol, 1989; 11: 194
- 10 Klivanov A M. Acc Chem Res, 1990; 23: 114
- 11 Makita A, Nihira T, Yamada Y *et al.* Tetrahedron Lett, 1987; 28: 805
- 12 Gutman A L, Zuobi K, Bravdo T *et al.* J Org Chem, 1990; 55: 3546
- 13 Guo Z W, Sih C J. J Am Chem Soc, 1988; 110: 1999
- 14 Margolin A L, Crenne J Y, Klivanov A M *et al.* Tetrahe-

dron Lett, 1987; 28: 1607

- 15 Therisod M, Klivanov A M. J Am Chem Soc, 1987; 109: 3977
- 16 Margolin A, Klivanov A M. J Am Chem Soc, 1987; 109: 3802

The Substrate Specificity of Lipase and Its Application Potentiality. Cao Shugui (*The State Key Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023, China*).

Abstract Lipases from different resources exhibit three specificities for substrate glyceride: The acyl chain specificity for chain length, unsaturation degree, and positions of double bonds in glyceride; The positional specificity for the position of Sn-1 (3) and Sn-2 ester bonds in glyceride; and The stereospecificity for enantiomorphous 1-and 3-ester bond of glyceride. Lipase catalyzes ester hydrolysis and esterification (or transesterification) to prepare monoglyceride, polyunsaturated fatty acid and its ester, and optically active organic compounds, thus it has great potential in fatty oil processing and organic synthesis.

Key words lipase, substrate specificity, fatty oil processing, organic synthesis

蛋白质-DNA 相互作用与真核基因转录

李明义 贾弘提

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

摘要 结合最近几年对真核转录调节因子和 DNA 的结构与机能研究, 概述了蛋白质-蛋白质及蛋白质-DNA 相互作用方式以及介导相互作用的分子结构基础, 论述了转录因子之间、转录因子与 DNA 之间相互作用过程中的协同与拮抗作用、发生机制及其在真核基因转录调节中的普遍性和重要意义。

关键词 蛋白质-蛋白质相互作用, 蛋白质-DNA 相互作用, 真核基因转录调节