

微生物脂肪酶资源挖掘及其催化性能改良策略

阎金勇, 闫云君*

(华中科技大学生命科学与技术学院, 教育部分子生物物理重点实验室, 武汉 430074)

摘要: 脂肪酶催化在食品、医药、化工、能源等领域发挥重要作用。开发新型微生物脂肪酶资源, 对脂肪酶进行修饰改良, 是脂肪酶催化领域的重要研发内容。极端微生物和不可培养微生物脂肪酶的发掘是获取新型工业催化剂的热点; 体外定向进化、杂合酶、表面展示等蛋白质工程等分子生物学技术手段为开发特定性质“新酶”提供了有力工具; 生物印迹、pH 记忆、定向固定化、交联酶晶体、脂质体包埋等高效物理化学修饰方法拓宽了脂肪酶原有的催化性质。微生物脂肪酶资源挖掘及其改良将推动脂肪酶的生物催化产业快速发展。

关键词: 脂肪酶; 宏基因组; 定向进化; 生物印迹

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1276-06

作为生物催化剂的微生物脂肪酶, 由于其高度的化学底物选择性 (chemoselectivity)、区域选择性 (regioselectivity)、对映体选择性 (enantiotopic selectivity)^[1], 能高效完成天然和非天然底物的专一性催化反应; 在得到高品质产品的同时, 对环境友好, 有着传统化学催化剂不可比拟的优势, 因而是“绿色化学”倡导的优良工业催化剂。以高附加值手性化合物为代表的生物催化已成为各大生物技术公司和化学公司竞相研发的热点^[2]。开发高活性、高选择性和高稳定性的脂肪酶, 是实现绿色化工, 合成重要化工和医药产品的重要保障。自然界中尚未充分发掘的微生物资源为新型脂肪酶的获得提供了宝贵的酶源, 发掘潜在的微生物及其基因资源是当前的重要方向, 是生物催化的重要基础; 运用生物学、物理化学方法对现有脂肪酶进行修饰改造, 获得优异性能的工业催化用酶, 是生物催化的关键。本文就微生物脂肪酶的资源挖掘及其修饰改造策略作一综述, 为脂肪酶更好地应用于生物催化提供理论指导与技术支持。

1 脂肪酶资源挖掘

1.1 极端微生物脂肪酶

极端微生物 (extremophile) 及其产生的酶类不仅为生物科学提供基础研究素材^[3], 而且对苛刻条件下的工业生物催化过程有积极的实践意义^[4]。由于极端微生物培养条件苛刻, 可以采用重组 DNA 技术在常规宿主中表达极端酶, 从而避开极端菌的直接培养^[5]。*Geobacillus* sp. 嗜热耐碱的脂肪酶 T1 在以 pGEX 为载体, 以 *Escherichia coli* BL21 (De3) 为宿主的原核表达系统中得以可溶性表达^[6]。通过脂肪酶 GST 标签的亲层析纯化得到纯酶。其最适温度 70 °C, 最适 pH 9.0。在 65 °C 以下很稳定, 在 pH 9.0 时半衰期为 5.25 h。该脂肪酶可应用到食品工业中脂肪酸的生产, 因为棕榈油和牛脂等在常温下为固态, 只有在较高的温度下才能呈液态, 发生反应; 而常规微生物脂肪酶在较高的温度下易失活。Karadzic 等^[7]从金属加工排放液中分离出一株产胞外脂肪酶的 *Pseudomonas aeruginosa* 菌, 该脂肪酶最适温度和最适 pH 分别为

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA020203); 武汉市科技攻关重点资助项目(200720422138)

*通讯作者。Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yjiny@126.com, yanyunjun@tom.com

作者简介: 阎金勇(1979-), 男, 湖北人, 博士研究生, 从事酶工程研究。E-mail: yjiny@126.com

收稿日期: 2008-02-25; 修回日期: 2008-04-17

70 和 11, 在 pH 4~11.5 范围内较稳定。在有机合成和金属加工业中有广泛应用。

1.2 不可培养微生物脂肪酶

特定生境中只有一小部分微生物可用实验方法分离培养, 占绝大多数的不可培养微生物(uncultured microorganism)是地球上尚未开发的巨大资源^[8]。宏基因组(metagenome)技术绕过纯培养步骤, 直接从生境样品中获取遗传信息, 提供更加全面的基因资源, 从而有效地提高了新酶的筛选效率^[9,10]。采用宏基因组技术筛选脂肪酶有两种途径-功能筛选和序列筛选^[11]。功能筛选途径即把来源于不可培养微生物的 DNA 克隆到大肠杆菌质粒中, 构建宏基因组文库, 然后基于脂肪酶活性筛选获得微生物脂肪酶基因。序列筛选途径以脂肪酶三联体活性中心(Ser-Asp-His)和氧阴离子洞(oxyanion hole)区的保守序列设计引物, 以环境基因组 DNA 为模板, 扩增脂肪酶基因片段, 然后用基因组步查(genomic-walking)的方法克隆出全长脂肪酶基因。Bell 等^[11]用基于序列筛选途径从新西兰 Kairua Park 温泉环境基因组中克隆到一种新脂肪酶基因, 并在异源宿主大肠杆菌中实现表达。该脂肪酶在氨基酸水平上与已知脂肪酶的最高同源性只有 20%, 在 70 °C 高温下仍能保持活力。Ranjan 等^[12]用基于构建宏基因组文库的途径从池塘不可培养微生物基因组中筛选出 11 个独特的解脂酶, 它们都具有脂肪酶的活性中心保守区五肽 GXSGX。

2 脂肪酶催化性能改良策略

2.1 定向进化脂肪酶

对酶分子的改造, 一是基于序列的合理化设计方案(sequential ration design), 如化学修饰、定点突变(site-directed mutagenesis)等; 二是利用基因的可操作性, 模拟自然界进化过程的非合理设计方案(irrational design), 如定向进化(directed evolution)、杂合进化(hybrid evolution)等^[13]。酶分子的定向进化无需了解酶的结构功能和催化机制等方面的信息, 人为地创造特殊的进化条件, 模拟自然进化机制(随机突变、基因重组和自然选择), 在体外改造酶基因, 并定向筛选出所需性质的突变酶^[14, 15]。脂肪酶的定向进化即是通过基因突变、基因表达和高通量筛选技术获得预期性质的突变酶, 如提高酶活力、提高稳定性、提高底物专一性和提高对映体选择性等。脂肪酶的定向进化尤以提高对映体选择性研究得最多^[16]。经过四

轮随机突变, *P. aeruginosa* 脂肪酶选择性水解外消旋癸酸甲酯的对映选择率(E)从 1 提高到 11.3^[17]。其它微生物脂肪酶对外消旋癸酸甲酯的对映体选择性的进化工程也取得了显著的效果(表 1)。

表 1 定向进化脂肪酶选择性水解外消旋癸酸甲酯
Table 1 Directed evolved lipase enantioselectivity on resolution of 2-methyldecanoic acid esters by hydrolysis

Lipase	Enantiomeric ratio(E)	Reference
<i>Humicola lanuginosa</i>		[18]
Wild type	10	
Single mutation (Glu87Ala) in the lid region	17	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		[19]
Wild type	1	
Random mutagenesis	11	
Random and saturation mutagenesis	26	
<i>Geotrichum candidum</i>		[20]
Wild type I	32	
Wild type II	10	
Hybrid	54	

2.2 杂合脂肪酶

杂合酶是指把来自不同酶分子中的结构单元或使整个分子进行组合和交换, 产生酶杂合体, 以改进或创造酶的某种功能^[21]。杂合酶的构建也为酶的结构与功能之间的关系研究提供了模型。通过定向组合, 将白地霉脂肪酶 N 末端序列和白地霉脂肪酶 C 末端序列在不同的位点融合, 构建一系列杂合脂肪酶^[20]。以三油酸甘油酯和三辛酸甘油酯作为模式底物, 对杂合酶的底物特异性酶活力进行测定, 确定酶分子上影响底物结合和催化的序列。研究结果表明决定白地霉脂肪酶对油酸甘油酯特异性的序列位为 349~406 的 58 个氨基酸。该区段氨基酸的置换显著地改变了对短链脂肪酸底物(三辛酸甘油酯)的活力。同时, 最终优化的杂合酶选择性水解外消旋癸酸甲酯的对映选择率比天然的脂肪酶和都要高(见表 1)。

利用进化手段较容易构建出高度多样性的突变基因库, 酶的可利功能突变体常被埋没在众多的中性突变和不利突变群中, 因此建立高效的、有针对性的高通量筛选体系是定向(杂合)进化最具挑战性的内容。

2.3 表面展示脂肪酶

表面展示技术借助锚定载体, 将外源蛋白以融合蛋白的形式展示在噬菌体、细菌或酵母的表面, 使其保持相对独立的空间构象和原有的生物活性^[22]。不同脂肪酶的底物特异性不一样。利用共展示技术, 在同

一宿主上同时展示两种脂肪酶,可以扩大其催化的底物谱,更好地发挥其生物催化作用。Kobayashi 等^[23]以 CWB (cell wall-binding domain) 为锚定蛋白,在 *B. subtilis* 宿主上同时展示了 *B. subtilis* 脂肪酶 B 和 *Aspergillus oryzae* 脂肪酶。以 INP 蛋白(ice-nucleation protein)为锚定蛋白,通过 INP-TliA 融合蛋白的方式在大肠杆菌表面成功展示了 *Pseudomonas fluorescens* 嗜热脂肪酶(TliA)。该展示的新型“固定化”脂肪酶,可高效催化非水相体系中橄榄油的水解反应^[24]。

表面(共)展示技术开辟了表面催化剂的新领地,是未来重点发展的催化剂,其瓶颈在于高效、兼容性好的锚定载体的筛选。高效载体的开发必将推动表面催化工程快速发展。

2.4 生物印迹脂肪酶

根据酶在有机溶剂中具有“刚性”结构的特点,利用酶与印迹分子的相互作用,诱导、改变酶的构象,制备具有结合该印迹分子及其类似物能力的“新酶”,是修饰改造酶的一种方法^[25]。水溶性脂肪酶在通常状况下,活性位点被“盖子”结构覆盖,呈非活性状态。当底物及其类似物介导的油水界面产生时,盖子打开,呈活性状态。为了获得高效非水相脂肪酶,选择适当两亲性的表面活性剂或底物类似物作为印迹分子,待印迹分子与酶充分印迹接触后,将印迹分子-酶复合物冷冻干燥,用非水溶剂洗脱印迹分子,形成了活性中心开启的印迹酶,并且这种状态在有机溶剂的刚性环境里仍能维持。选择不同结构的印迹分子诱导,会产生结合部位构象不同的印迹酶,适应不同的底物,从而催化活力比非印迹酶显著提高^[26]。Fishman 等^[27]用一系列脂肪酸和表面活性剂 Tween 20 作为印迹分子,制备有机相生物印迹脂肪酶,在非水相介质中催化水解己酸甲酯反应。印迹脂肪酶的催化活力依赖于脂肪酶类别、有机溶剂和印迹分子本身。辛酸印迹的 *Candida rugosa* 脂肪酶的反应初速度与介质的疏水性有关。将该印迹脂肪酶吸附于惰性载体 celite 上,制备成活力更高稳定性更强的脂肪酶。经辛酸印迹和 Celite 固定双重修饰的 *Pseudomonas* 脂肪酶比游离型脂肪酶催化活力高出 20 倍。

2.5 pH 记忆脂肪酶

有机溶剂中酶分子表面的必需水只有在特定的 pH 和离子强度下,才能使酶分子活性中心周围的基团处于最佳的离子化状态,从而有利于酶活性的表现。所以有机溶剂中的酶活力与酶冷冻干燥或有机溶

剂沉淀前所在的缓冲液的 pH 和离子强度密切相关,其最适 pH 与水相中酶的最适 pH 是一致的。当酶分子从水溶液转移到有机溶剂中时,它保持了原有的离子化状态^[28]。利用酶的 pH 记忆特性可以提高有机相中酶催化活力。利用皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*) pH 记忆脂肪酶在二甲基亚砷介质中催化乙烯基癸酸和右旋糖苷的转酯反应,合成多聚右旋糖苷表面活性剂。冷冻干燥前的脂肪酶在 pH 为 7.5 的磷酸盐缓冲液中处于最适离子状态,因而在非水相催化中表现出高转酯效率^[29]。

对于生物印迹、pH 记忆修饰型脂肪酶,不够透彻的“印迹”和“记忆”分子机理及其仅能在有机溶剂中起催化作用制约了其进一步的发展与应用。因此阐明脂肪酶分子构象诱导的细微变化与脂肪酶催化活性的关系,研究不同印迹分子对脂肪酶活性的影响,开发以水不溶性底物为代表的新型印迹分子,突破印迹酶、记忆酶仅在有机介质中起催化活性作用的局限,进而开发水相印迹酶、记忆酶,是大势所趋。

2.6 脂质体包埋脂肪酶

酶粉虽然在非水介质中能够催化反应,但是其催化效率比水溶液中的酶低几个数量级,其中原因之一是酶一般难溶于有机溶剂。虽然有些酶能直接溶解在少数有机溶剂中,但是酶催化效率常常很低。双亲分子共价或非共价修饰酶分子表面,可以增加酶表面的疏水性,使酶均一地溶于有机溶剂,提高酶的催化效率^[30]。增加水溶性脂肪酶在疏水性有机介质中的溶解性可显著提高脂肪酶的催化效率。通过混合脂肪酶和脂溶液,收集并冷冻干燥所得沉淀即得脂质体包埋脂肪酶。脂质体包埋脂肪酶不溶于水溶液但能很好地溶解于有机溶剂,如苯、乙酸乙酯、异辛烷、异丙醚、二甲基亚砷(DMSO)和乙醇等。脂分子亲水头与酶分子亲水表面相互作用集结在一起,而脂分子的疏水烃基端延伸到疏水有机溶剂中,增加了酶的溶解性。一个酶分子约可以吸附 100~200 个脂分子,酶蛋白含量约占 8%~10%。经脂质体修饰的 *Pseudomonas fragi* 脂肪酶催化(R,S)-苯乙醇与月桂酸的酯化反应,在 2 h 内能催化 R-苯乙醇全部转化成酯,而 S-苯乙醇几乎不反应^[31]。

脂质体包埋技术面临的主要问题是包埋材料的附着稳定性。作者运用固定化-脂质体包埋联用的方法很好地防止了包埋材料脱落,制备的脂肪酶催化剂不仅具有良好的有机溶剂溶解性,而且重复操作性也

显著提高。

2.7 交联脂肪酶晶体

交联酶晶体(cross-linked enzyme crystal, CLES)是固定化酶的延续和发展,是一种有发展潜力的固定化方法。酶结晶本身就是一个分离纯化和固定化的过程,双功能交联剂戊二醛对酶微晶进行交联,酶蛋白既是催化剂又是载体,它提供非常高的酶浓度,不存在传质阻碍。通常固定化酶中酶含量仅占 5%左右,相同质量的交联酶晶体的催化活性比一般固定化酶要高很多。高纯度的酶晶体催化剂具有超强稳定性,可在有机溶剂、气相、超临界流体等非常规介质中表现出高度立体选择性^[32]。*Burkholderia cepacia* 脂肪酶交联晶体在离子液体[Bmim][PF₆]非常规介质中高效拆分(*R*, *S*)-1-苯基乙醇, 2 h 的转化率就高达 50%,对映体过量值(enantiomeric excess, ee)达 99%,对映选择率 $E > 1000$;而游离脂肪酶转化率仅达 8%^[33]。

交联脂肪酶晶体集众多优点于一身,但其结晶过程不易操作,成本也较高,克服这两点才可望应用于工业催化。

2.8 定向固定化脂肪酶

酶的定向固定化技术可以将酶分子表面特定区域的氨基酸直接或间接(通过某些化学试剂、空间手臂)与载体偶联,实现酶分子活性中心背向载体,从而有效地消除对大分子底物结合的空间障碍,提高催化效率。在大多数情况下,影响酶活性中心的氨基酸残基在固定化载体上的无序附着导致酶固定化后催化活性部分丧失。定向固定化可使酶蛋白以有序的方式附着于载体表面,减小无序态造成的酶蛋白结构变形,使酶活力损失降低^[34]。*Mucor miehei* 纯脂肪酶共价固定于一系列环氧树脂上,再通过界面激活定向吸附于十八烷基-Sepabeads 系列树脂上制备成定向固定化脂肪酶,在不同的温度和 pH 条件下选择性水解(*R*, *S*)-2-丁酰-2-苯乙酮。其中亚氨基二乙酸-Sepabeads (IDA-Sepabeads)树脂定向固定化脂肪酶表现出最大的对映选择率($E=59$)^[35]。

定向固定化的核心技术是特异性载体的开发,筛选与酶活性中心基团亲和力低的载体或对载体基团进行定向修饰是该项技术的发展方向。

3 结语和展望

生物催化剂作为生物催化和转化的核心,尤其是脂肪酶正受到越来越广泛和深入的研究开发。一方

面,发掘潜在的微生物及其基因资源,利用基因重组表达和发酵技术大量制备脂肪酶;另一方面,利用蛋白质工程手段、物理和化学方法对现有脂肪酶进行修饰改造,以满足生物催化的要求。嗜极微生物和不可培养微生物的脂肪酶,将会在工业生产中部分替代现有的酶或作为新行业的催化剂。随着基因工程、结构生物学和生物信息学的迅猛发展,利用分子进化等手段获得最适特性的脂肪酶已经越来越被重视。作为分子进化的一个分支,酶的定向进化(杂合酶)不仅能使酶进化出单一优良的非天然特性,还能使酶的两个或多个特性叠加,产生具有多项优良性能“集成”的新酶,极大地发展和丰富了生物催化剂来源。

新型酶催化剂的获得应立足于明确的设计思路(图 1)。作者正以生物印迹技术为基础,通过 pH 记忆、脂质体包埋等修饰改良技术的优化组合,进行新型脂肪酶的创制研究;同时,所在课题组也正在开展脂肪酶的定向进化和表面展示技术的研究。初步研究结果表明:基于有理设计—定向进化的组合改造,分子生物学—物理化学方法的统筹整合比单一的方法更具优势。

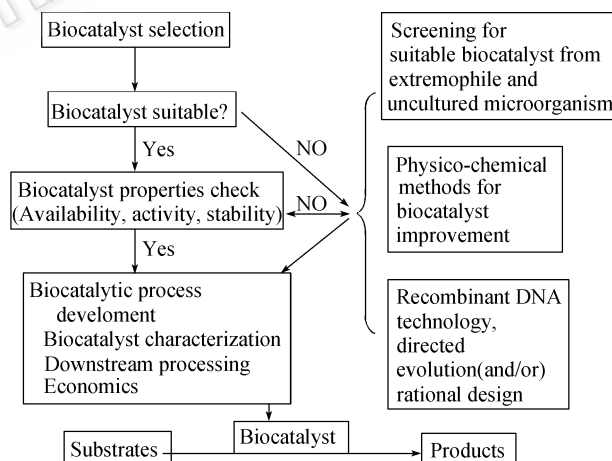


图 1 生物催化剂的开发策略

Fig. 1 Strategies for exploitation of biocatalyst.

参 考 文 献

- [1] Yan JY, Yang JK, Xu L, *et al.* Gene cloning, overexpression and characterization of a novel organic solvent tolerant and thermo-stable lipase from *Galactomyces geotrichum* Y05. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 49: 28–35.
- [2] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 9: 235–251.

- [3] Birbir M, Calli B, Mertoglu B, *et al.* Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, 23: 309–316.
- [4] Siddiqui KS, Cavicchioli R. Improved thermal stability and activity in the cold-adapted lipase B from *Candida antarctica* following chemical modification with oxidized polysaccharides. *Extremophiles*, 2005, 9: 471–476.
- [5] Groudieva T, Kambourova M, Yusef H, *et al.* Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. *Extremophiles*, 2004, 8: 475–488.
- [6] Leow TC, Raja Abd Rahman RNZ, Basri M, *et al.* A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. *Extremophiles*, 2007, 11: 527–535.
- [7] Karadzic I, Masui A, Zivkovic LI, *et al.* Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metal-working fluid. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2006, 102: 82–89.
- [8] Schmeisser C, Steele H, Streit WR. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75: 955–962.
- [9] Lee SW, Won K, Lim HK, *et al.* Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil Microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65: 720–726.
- [10] Henne A, Schmitz RA, Bomeke M, *et al.* Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 3113–3116.
- [11] Bell PJL, Sunna A, Gibbs MD, *et al.* Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology*, 2002, 148: 2283–2291.
- [12] Ranjan R, Grover A, Kapardar RK, *et al.* Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 335: 57–65.
- [13] Rubingh DN. Protein engineering from a bioindustrial point of view. *Current Opinion in Biotechnology* 1997, 8: 417–422.
- [14] Jaeger KE, Eggert T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15: 305–313.
- [15] Bornscheuer UT, Bessler C, Srinivas R, *et al.* Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20: 433–437.
- [16] Bornscheuer UT. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13: 543–547.
- [17] Reetz MT, Zonta A, Schimossek K, *et al.* Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution. *Angew Chem Int Ed Eng*, 1997, 36: 2830–2832.
- [18] Berglund P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomolecular Engineering*, 2001, 18: 13–22.
- [19] Liebeton K, Zonta A, Schimossek K, *et al.* Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem Biol*, 2000, 7: 709–718.
- [20] Holmquist M, Berglund P. Creation of a synthetically useful lipase with higher than wild-type enantioselectivity and maintained catalytic activity. *Org Lett*, 1999, 1: 763–765.
- [21] Reetz MT. Directed evolution of selective enzymes and hybrid catalysts. *Tetrahedron*, 2002, 58: 6595–6602.
- [22] Ueda M, Tanaka A. Cell surface engineering of yeast: construction of arming yeast with biocatalyst. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90: 125–136.
- [23] Kobayashi G, Fujii K, Serizawa M, *et al.* Simultaneous display of bacterial and fungal lipases on the cell surface of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93: 15–19.
- [24] Jung HC, Ko S, Ju SJ, *et al.* Bacterial cell surface display of lipase and its randomly mutated library facilitates high-throughput screening of mutants showing higher specific activities. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 26: 177–184.
- [25] Alexander C, Andersson HS, Andersson LI, *et al.* Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including. *Journal of Molecular Recognition*, 2006, 19: 106–180.
- [26] Navarro HG, Brace L. Improving lipase activity in solvent-free media by interfacial activation-based molecular bioimprinting. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1997, 3: 111–119.
- [27] Fishman A, Cogan U. Bio-imprinting of lipases with fatty acids.

- Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 22: 193–202.
- [28] Manohar B, Divakar S. An artificial neural network analysis of porcine pancreas lipase catalysed esterification of anthranilic acid with methanol. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 3372–3376.
- [29] Kaewprapan K, Tuchinda P, Marie E, *et al.* pH-imprinted lipase catalyzed synthesis of dextran fatty acid ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 47: 135–142.
- [30] Kamiya N, Goto M, Nakashio F. Surfactant-Coated lipase suitable for the enzymatic resolution of menthol as a biocatalyst in organic media. *Biotechno Prog*, 1995, 11: 270–275.
- [31] Okahata Y, Mori T. Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media. *Trends in Biotechnology*, 1997, 15(2): 50–54.
- [32] Lalonde JJ, Navia M, Margolin AL. Cross-linked enzyme crystals of lipases as catalysts for kinetic resolution of acids and alcohols. *Methods in Enzymology*, 1997, 286: 443–464.
- [33] Shah S, Gupta MN. Kinetic resolution of (\pm)-1-phenylethanol in [Bmim][PF₆] using high activity preparations of lipases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17: 921–924.
- [34] Evelyn L, Thomas AK, Zoltan D. Reversible oriented surface immobilization of functional proteins on oxide surfaces. *Analytical Chemistry*, 1997, 69: 1979–1985.
- [35] Palomo JM, Muñoz G, Fernández-Lorente G, *et al.* Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins hydrolytic resolution of (*R*, *S*)-2-butyryl-2-phenylacetic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 21: 201–210.

Strategies for exploiting microbial lipase resource and improving lipase biocatalyst—A review

Jinyong Yan, Yunjun Yan*

(Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Lipase plays a very important role in food, pharmaceutical, fine chemical and bio-energy industries. Obtaining microbial lipase resource and improving their biocatalyst are important. Based on protein engineering and molecular techniques, directed evolution, hybrid enzyme, surface display give effective approaches to obtain novel lipase biocatalysts. By physical and chemical modification approaches such as bio-imprinting, pH memory, oriented immobilization, cross-linked enzyme crystal and lipid-coated enzyme, more broad and suitable characteristics of modified lipases are achieved. In conclusion, strategies for exploitation of microbial lipase resource and improvement of lipase biocatalyst will accelerate industrial application of lipase.

Keywords: lipase; metagenome; directed evolution; bio-imprinting

Supported by the National Program for High Technology Research and Development of China (2006AA020203) and the Key Scientific and Technological Project of Wuhan (200720422138)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yjiny@126.com, yanyunjun@tom.com

Received: 25 February 2008/ Revised: 17 April 2008

《微生物学报》答作者问——关于署名

问：我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表，如果想在作者和单位方面增、减新的内容，并且修改作者及单位署名顺序是否可以？是否需要提供什么证明或者相关的材料？

答：可以变更，但需要作者再提供以下材料。

- (1) 如变单位署名顺序，需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信，证明内容：原署名顺序 现署名顺序 盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序，需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容：原作者姓名及顺序 修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄或扫描后 e-mail 发来)，新的变更即可生效。