

# 新型微生物脂肪酶资源开发

舒正玉 薛龙吟 林瑞凤 蔡少丽 黄建忠\*

(福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 福建师范大学生命科学学院  
福建省现代发酵技术工程研究中心 福建 福州 350108)

**摘要:** 微生物脂肪酶是一类重要的工业生物催化剂, 广泛应用于工农业生产的诸多领域。筛选、挖掘和开发出具有新型催化活性或高稳定性的微生物脂肪酶一直是脂肪酶研究的重点。本文从极端微生物、宏基因组技术、基因组数据库挖掘、定向进化技术、固定化技术和化学修饰技术等方面介绍了当前新型脂肪酶开发的途径和方法。

**关键词:** 脂肪酶, 极端微生物, 宏基因组, 基因组数据库, 蛋白质工程, 固定化, 化学修饰

## Development of Novel Microbial Lipase Resources

SHU Zheng-Yu XUE Long-Yin LIN Rui-Feng CAI Shao-Li HUANG Jian-Zhong\*

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, College of Life Sciences, Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, Fuzhou, Fujian 350108, China)

**Abstract:** Microbial lipase, one of important industrial biocatalysts, has been used widely in many industrial and agricultural fields. It is always the research focus to screen, mine and develop the microbial lipases with novel catalytic activity and high stability. This paper introduces briefly the pathways and methods to mine novel microbial lipase resources from six aspects, including extremophile, metagenome, genome database, protein engineering, immobilization, chemical modification, etc.

**Keywords:** Lipase, Extremophile, Metagenome, Genome database, Protein engineering, Immobilization, Modification

微生物脂肪酶(Lipase, EC 3.1.1.3, 甘油三酰酯水解酶)是一类能催化长链脂肪酸甘油酯水解为甘油和长链脂肪酸的酶类(或此反应的逆反应)。除了能催化水解反应和酯化反应外, 脂肪酶还能催化酯交换反应、转酯反应、醇解反应、酸解反应以及氨解反应等多种化学反应。脂肪酶催化的化学反应具有严格的底物专一性, 如化学选择性、立体选择性、位点选择性等, 催化活性高而副反应少, 催化反应过程不需要辅助因子等特点, 因此被广泛应用于食

品加工、油脂加工、新型生物材料、生物传感器、生物医学、化妆品、杀虫剂、生物柴油、去污剂、皮革加工、造纸、生物修复、医药、精细化工、去污剂的添加剂、造纸、皮革等多种工业领域。通过各种技术手段, 筛选、挖掘并开发出具有新型催化活性或高度稳定性的微生物脂肪酶, 满足各种酶促反应体系(尤其是各种极端酶促反应体系, 如造纸行业的强碱性和高温、生物柴油生产工艺中的高浓度短链醇等)的工艺要求, 以期进一步扩大脂肪酶的应

用领域,提高脂肪酶的催化效率和重复利用率,降低生产成本,具有重要的经济意义。

## 1 利用极端微生物及古细菌筛选新型脂肪酶

各种极端微生物(包括古细菌)为了适用其所处的恶劣生境,常常分泌一些在该恶劣生境下仍具有高度稳定性和催化活性的胞外酶或胞内酶。从嗜热(Thermophile)、嗜冷(Psychrophile)、嗜酸(Acidophile)、嗜碱(Alkalophile)、嗜盐(Halophile)、嗜压(Piezophile)、嗜金属(Metalophile)、嗜辐射(Radiophile)、嗜微气性(Microaerophile)、高有机溶剂耐受性(Organic solvent tolerant)等各种嗜极性微生物及古细菌中,筛选出具有新型催化性质的酶,已成为寻找新型工业酶制剂的常规方法<sup>[1,2]</sup>。利用这种方法,已从各种极端微生物及古细菌中成功筛选

到一批性能优良、具有开发潜力的新型微生物脂肪酶,部分脂肪酶基因被克隆并在异源宿主中实现了大量表达<sup>[3]</sup>。表 1 列举了几种极端微生物(古细菌)分泌的脂肪酶的酶学性质。国内对低温脂肪酶和高温脂肪酶的研究比较活跃,但对其他极端脂肪酶的研究相对较少。本实验已建立起多种极端环境条件下的产脂肪酶菌种库,并对低温罗伦隐球酵母脂肪酶(最适作用温度为 25°C~30°C)的酶学性质进行了初步研究<sup>[4]</sup>。

在耐受性(或适应性)机制研究方面,低温脂肪酶适应性机制和高温脂肪酶耐受性机制研究得比较透彻<sup>[11,12]</sup>,而对其他各种极端微生物脂肪酶的耐受性(或适应性)机制鲜有研究。解析各种极端微生物脂肪酶的结构,澄清其耐受性(或适应性)机制,借助现代蛋白质工程技术,对其它脂肪酶分子进行理性设计,有望获得预期的新型脂肪酶分子。

表 1 极端微生物(或古细菌)及其产生的极端脂肪酶  
Table 1 Novel lipases from extremophile and archaeobacteria

产脂肪酶菌株 Lipase-producing strains	菌株分离环境 Microbial habitats	脂肪酶性质 Property of lipases	参考文献 Reference
<i>B. stearothermophilus</i>	温泉	100°C 的半衰期 15 min~25 min	[5]
<i>S. solfataricus</i>	古细菌(不详)	90°C 的半衰期 83 min	[6]
<i>C. paurometabolum</i>	低温湖水	最适作用温度为 25°C	[7]
<i>Pseudomonas</i> sp.	地下水(700 m~800 m)	最适作用温度为 35°C	[8]
<i>S. saprophyticus</i>	海水	在苯、甲苯、正己烷等有机溶剂中具有较好的稳定性	[9]
<i>B. sphaericus</i>	土壤	在二甲苯、正己烷等有机溶剂中,具有较好的稳定性	[10]

值得注意的是,微生物对某种极端环境的耐受能力与其是否处于某种极端环境并无必然的联系。已有多篇文献报道,从各种非极端环境中分离筛选到对某种极端环境具有高度耐受性的微生物菌株或新型极端耐受性(适应性)的酶<sup>[3,13]</sup>。因此,利用现代分析技术,对现有的各种产脂肪酶微生物及其分泌的脂肪酶进行更深入的研究,有可能发现现有脂肪酶具有的某些新性质。

## 2 利用宏基因组技术筛选新型微生物脂肪酶

自然环境中 99%的微生物利用传统的培养基未能实现纯培养,挖掘并开发未可培养微生物(Uncultured microbes)的基因资源,是当前微生物学和酶学研究的热点之一。筛选未培养微生物基因资

源技术主要涉及两个方面:利用 Cosmid、Fosmid 和 Bacterial artificial chromosome 等载体构建宏基因组文库和基于功能筛选(Function-based screening)、序列筛选(Sequence-based screening)、底物诱导基因表达筛选(Substrate-induced gene expression screening)等高通量筛选技术对宏基因组文库进行筛选等<sup>[14,15]</sup>。利用宏基因组技术已成功地从环境样品中克隆到脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶、加氧酶、几丁质酶、纤维素酶、乙醇氧化还原酶、 $\beta$ -内酰胺酶等多种新型酶基因序列<sup>[16]</sup>。利用宏基因组技术, Ranjan 从池水样品中一次性克隆到 12 个脂解酶基因,其中一个基因编码的氨基酸序列与已知蛋白的同源性仅为 25%<sup>[17]</sup>; Hårdeman 和张金伟利用宏基因组技术分别从海洋沉积物中克隆到新型低温脂肪酶的编码基因<sup>[18,19]</sup>; Tirawongsaroj 利用宏基因组技术从温泉

的泥样中直接克隆到耐高温的脂解酶编码基因<sup>[20]</sup>。

目前, 制约宏基因组技术发展的主要因素是高通量筛选技术。基于序列筛选的筛选技术花费昂贵, 而功能筛选的筛选技术必须以成熟的表达系统作为基础。由于宏基因组中的基因序列具有高度的多样性和个体的复杂性, 没有任何一个表达系统能满足宏基因组中所有基因的功能性表达。为了克服上述筛选技术方面的局限性, Bell 根据脂肪酶分子的保守性氨基酸设计特异性的引物, 成功地以宏基因组 DNA 为模板, 直接 PCR 扩增获得新型的脂肪酶基因资源<sup>[21]</sup>。

### 3 利用基因组数据库挖掘新型微生物脂肪酶

随着越来越多微生物全基因组测序工作的完成, 分析、注释和挖掘出这些基因组序列中蕴藏的有价值的信息, 从中寻找具有新型酶学性质的基因资源, 已引起酶学研究者的注意并进行了积极探索<sup>[22]</sup>。与已知脂肪酶基因序列的相似性比较或两两比较 (Pair-wise comparison), 大量的新基因已被注释为脂肪酶编码基因 (<http://www.led.uni-stuttgart.de/>), 但其功能有待进一步验证。以脂肪酶一级结构中氨基酸序列的保守性特点为依据 (如构成活性中心的 Ser 位于 -G-X-S-X-G- 的保守五肽中; 组成第一个氧阴离子洞附近的氨基酸保守区域距离活性中心丝氨酸的距离为 70~100 个氨基酸左右), 对这些被注释为脂肪酶基因的序列进行评估。对符合脂肪酶保守结构特点的基因序列设计引物进行 PCR 扩增、异源表达、功能验证, 可以直接、快速、高效地获得新型脂肪酶基因资源, 从而避免基因文库筛选方法中由于表达水平太低 (Sub-threshold expression level) 而漏筛的情况。利用此方法, Kim 从 4 个菌株的 9 个候选基因中成功筛选到 5 个新型脂肪酶基因<sup>[23]</sup>。

此外, 充分挖掘基因组信息, 建立起对应的高通量定向筛选技术, 可以极大地提高特定产脂肪酶菌株的筛选效率。常规的选择性培养基筛选产脂肪酶微生物, 常常因为某些微生物由于不是环境中的优势菌群而漏筛。本实验室充分挖掘 *Burkholderia* sp. 菌株的基因组信息, 建立起一种针对产脂肪酶 *Burkholderia* sp. 菌株的高通量定向的筛选技术, 从常规环境 (油料植物根际) 中快速批量筛选到 24 株具

有广谱有机溶剂耐受性的 *Burkholderia* sp. 菌株 (未发表数据, 相关文章正在整理之中)。

### 4 蛋白质工程改造和优化微生物脂肪酶

蛋白质工程技术手段更新和发展层出不穷。在生物信息学、生物物理和量子化学等学科知识的支持下, 各种理性设计和定向进化技术广泛应用于对微生物脂肪酶分子的改造和优化中, 获得了一系列新型的微生物脂肪酶资源, 包括提高脂肪酶的脂(酯)解活性、酰胺水解活性、磷脂水解活性、醇解活性、醛缩反应活性和对映体拆分活性; 提高脂肪酶的温度稳定性、有机溶剂耐受性和对氧化剂的耐受性; 改变底物的链长选择性、最适作用温度和最适作用 pH, 扩大脂肪酶的可接受底物谱范围等。表 2 简要列举了利用蛋白质工程技术对脂肪酶不同性质的改造情况。

利用蛋白质工程改造和优化脂肪酶的关键技术主要有两点: (1) 建立起与特定脂肪酶基因对应的表达体系。不同脂肪酶分子形成活性构象及激活需要不同的条件<sup>[38]</sup>, 因此脂肪酶突变库基因表达系统的选择需要因基因而异。(2) 针对脂肪酶的不同催化活性, 建立起对应的高通量筛选技术平台。Tielmann 利用傅立叶红外光谱建立起脂肪酶对映体拆分活性的高通量筛选技术, 每天可以完成 20000 个转化子的筛选工作<sup>[39]</sup>。

### 5 脂肪酶的固定化技术及化学修饰技术

除了上述筛选、挖掘新型脂肪酶基因资源或产脂肪酶菌株资源外, 对现有脂肪酶进行固定化处理或化学修饰处理, 可以极大地改变现有脂肪酶的酶学性质和催化性质, 获得新型的脂肪酶酶制剂。

#### 5.1 脂肪酶的固定化

酶的固定化技术朝两个方向发展: 新材料和新方法的应用。在各种新型固定化材料中, 以纳米材料的固定化效果尤为引人注目。Dyal 和 de Lathouder 分别用  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 纳米颗粒和碳纳米管固定 *Candida rugosa* 脂肪酶和 *Candida antarctica* 脂肪酶, 在反应器中的稳定性超过 1 个月之久<sup>[40,41]</sup>。而 Persson 用 sol-gel 形成的纳米颗粒包埋 *Humicola lanuginosa* 脂肪酶, 脂肪酶的比活力提高了 320 倍<sup>[42]</sup>。在脂肪酶固定化方法方面, 细胞表面展示技术作为一种新

表 2 蛋白质工程改造和优化脂肪酶分子  
Table 2 Modification of microbial lipases by protein engineering

酶学性质改良 Modified activities	脂肪酶种类 Lipase genes	技术手段 Methods	突变位点* Mutation sites	参考文献 Reference
提高对映体拆分活性 Modified the enantioselectivity	<i>B. subtilis</i> 脂肪酶	多重 PCR 基础上的重组技术	N18Q/Y49V	[24]
	<i>B. cepacia</i> 脂肪酶	单分子 PCR	L17F/ F119I/L167G/L266V; L17F/L167G/L266I	[25]
改变链长偏爱性 Modified the chain length selectivity	<i>C. rugosa</i> 脂肪酶 4	定点突变	A296I; V344Q; V344H	[26]
扩大可接受底物谱范围 Expanded the range of substrate acceptance	<i>C. antarctica</i> 脂肪酶 B	环行置换	A283/A283-KRPRINSP	[27]
	<i>P. aeruginosa</i> 脂肪酶	组合活性位点饱和和测试	M16A/L17F; M16G, M16G/L17F 等	[28]
提高脂(酯)解活性 Improved the hydrolysis activity	<i>P. expansum</i> 脂肪酶	定点突变	R182K	[29]
提高酰胺水解活性 Improved the amide-hydrolysis activity	<i>P. aeruginosa</i> 脂肪酶	易错 PCR/ 定点突变	F207S/A213D	[30]
提高磷脂水解活性 Improved the phospholipase activity	<i>B. thermocatenuatus</i> 脂肪酶	定点突变	L353S	[31]
提高醛缩反应活性 Improved the activity for aldol reactions	<i>C. antarctica</i> 脂肪酶 B	定点突变	S105A	[32]
提高醇解活性 Improved the methanolysis activity	<i>R. oryzae</i> 脂肪酶	易错 PCR	K138R	[33]
	<i>R. arrhizus</i> 脂肪酶	定点突变和 DNA 改组技术	E190V	[34]
提高温度稳定性 Improved the thermostability	<i>P. expansum</i> 脂肪酶	定点突变	K55R	[35]
提高对有机溶剂的耐受性 Improved the stability in organic solvents	<i>Pseudomonas</i> sp. 脂肪酶	易错 PCR	F146L; I289T; V304A	[36]
提高对氧化剂的耐受性 Improved the resistance to oxidative degradation	<i>C. antarctica</i> 脂肪酶 B	定点突变	M72L	[37]
改变最适 pH Modified the optimum pH	<i>R. arrhizus</i> 脂肪酶	定点突变和 DNA 改组技术	E190V	[34]

\*: 分号代表突变发生在不同突变体中; 斜杠代表同一个突变体中的不同位点同时发生的突变。

Note: The semicolon is represented that multiple mutations occurred in different mutants; the slash is represented that multiple mutations occurred in a same mutant.

型的固定化技术,使全细胞生物催化剂的催化效率逐步提高并逐步应用到实际生产中。到目前为止,包括 *S. carnosus*、*B. subtilis*、*P. putida*、*S. cerevisiae*、*P. pastoris*、*E. coli* 在内的各种细胞表面展示技术均已应用于脂肪酶的固定化。Shiraga 用 *S. cerevisiae* 细胞表面展示 *R. oryzae* 脂肪酶导致脂肪酶的水解活性和酯化活性分别提高了  $4.4 \times 10^4$  倍和  $3.8 \times 10^4$  倍<sup>[43]</sup>。

## 5.2 脂肪酶的化学修饰

相比通过分子进化技术改造脂肪酶分子而言,化学修饰技术对脂肪酶分子的侧链几乎可以进行无穷无尽的设计和改造。常见的脂肪酶分子的化学修

饰技术包括:利用小分子化合物(如氨基葡萄糖)对脂肪酶活性部位或活性部位之外的侧链基团进行化学修饰、双功能或多功能交联剂(如戊二醛)共价交联脂肪酶分子、形成交联酶晶体及单功能试剂(如聚乙二醇及其衍生物)的化学修饰等<sup>[44]</sup>。脂肪酶分子的化学修饰可以显著增强脂肪酶分子的稳定性、提高(或改变)脂肪酶分子的活性。Siddiqui 采用多糖修饰 *Candida antarctica* 脂肪酶 B 后,脂肪酶 70°C 的半衰期由 18 min 提高到 168 min<sup>[45]</sup>。Ueji 和 Palomo 分别用苄氧羰基和乙二胺修饰 *C. rugosa* 脂肪酶和 *C. antarctica* 脂肪酶 B,脂肪酶对映体拆分的活性分别提高了 15 倍和 50 倍<sup>[46,47]</sup>。本实验室进行黑曲霉脂

肪酶基因毕赤酵母异源表达时, 也观察到糖基化侧链修饰对脂肪酶的性质(尤其是比活力)有显著影响<sup>[48]</sup>。

## 6 展望

作为一种非水相酶, 微生物脂肪酶在精细化工、有机合成等诸多领域有着广泛的应用潜力和市場价值。不同的化学工艺对脂肪酶的催化活性有不同的要求。随着绿色化工的深入发展, 微生物脂肪酶的市场需求和应用领域还将进一步加大。微生物脂肪酶固有的催化活性和稳定性将远不能满足化学工艺的多样性和发展。因此, 利用各种现代生物技术手段, 寻找和开发新型微生物脂肪酶资源、开发新型催化活性的脂肪酶制剂、提高微生物脂肪酶制剂的催化效率、活性和稳定性, 有助于进一步拓展微生物脂肪酶的应用领域, 提高微生物脂肪酶制剂的市場竞争能力。

## 参 考 文 献

- [1] Antranikian G, Vorgias CE, Bertoldo C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2005, **96**: 219–262.
- [2] Eichler J. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv*, 2001, **19**(4): 261–278.
- [3] Salameh M, Wiegel J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Adv Appl Microbiol*, 2007, **61**: 253–283.
- [4] 蒋咏梅, 章文贤, 周晓兰, 等. 极端环境脂肪酶菌种库建立及其酶学性质研究. *生物技术*, 2003, **13**(5): 9–10.
- [5] Sinchaikul S, Sookkheo B, Phutrakul S, *et al.* Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression, purification and characterizations. *Protein Expr Purif*, 2001, **22**(3): 388–398.
- [6] Littlechild JA, Guy J, Connelly S, *et al.* Natural methods of protein stabilization: thermostable biocatalysts. *Biochem Soc Trans*, 2007, **35**(Pt6): 1558–1563.
- [7] Joshi GK, Kumar S, Tripathi BN, *et al.* Production of alkaline lipase by *Corynebacterium paurometabolum*, MTCC 6841 isolated from Lake Naukuchiat, Uttaranchal State, India. *Curr Microbiol*, 2006, **52**(5): 354–358.
- [8] Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, *et al.* Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Envir Microbiol*, 2001, **67**(9): 4064–4069.
- [9] Fang YW, Lu ZX, Lv FX, *et al.* A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. *Curr Microbiol*, 2006, **53**(6): 510–515.
- [10] Hun CJ, Rahman RNZA, Salleh AB, *et al.* A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochem Eng J*, 2003, **15**(2): 147–151.
- [11] Arpigny JL, Lamotte J, Gerday C. Molecular adaptation to cold of an antarctic bacterial lipase. *J Mol Catal B: Enzym*, 1997, **3**(1): 29–35.
- [12] Li WF, Zhou XX, Lu P. Structural features of thermozymes. *Biotechnol Adv*, 2005, **23**(4): 271–281.
- [13] Luo Y, Zheng Y, Jiang Z, *et al.* A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **73**(2): 349–355.
- [14] Manuel F, Martínez-Abarca F, Golyshev PN, *et al.* Mining genomes and metagenomes for novel catalysts. *Curr Opin Biotech*, 2005, **16**(6): 588–593.
- [15] Yun J, Ryu S. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. *Microb Cell Fact*, 2005, **4**(1): 8.
- [16] Lorenz P, Eck J. Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(6): 510–516.
- [17] Ranjan R, Grover A, Kapardar RK, *et al.* Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **335**(1): 57–65.
- [18] Hårdeman F, Sjö LS. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, **59**(2): 524–534.
- [19] 张金伟, 曾润颖. 南极深海沉积物宏基因组 DNA 中低温脂肪酶基因的克隆、表达及性质分析. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(12): 1207–1214.
- [20] Tirawongsaroj P, Sriprang R, Harnpicharnchai P, *et al.* Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *J Biotechnol*, 2008, **133**(1): 42–49.
- [21] Bell PJ, Sunna A, Gibbs MD, *et al.* Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiol*, 2002, **148**(8): 2283–2291.
- [22] Wackett LP. Novel biocatalysis by database mining. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(4): 280–284.
- [23] Kim HK, Jung YJ, Choi WC, *et al.* Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **235**(2): 349–355.
- [24] Eggert T, Funke SA, Rao NM. Multiplex-PCR-based recombination as a novel high-fidelity method for directed evolution. *ChemBioChem*, 2005, **6**(6): 1062–1067.
- [25] Kato R, Nakano H, Konishi H, *et al.* Novel strategy for

- protein exploration: high-throughput screening assisted with fuzzy neural network. *J Mol Biol*, 2005, **351**(3): 683–692.
- [26] Lee LC, Chen YT, Yen CC, *et al.* Altering the substrate specificity of *Candida rugosa* LIP4 by engineering the substrate-binding sites. *J Agric Food Chem*, 2007, **55**(13): 5103–5108.
- [27] Qian Z, Stefan L. Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(39): 13466–13467.
- [28] Reetz MT, Bocola M, Carballeira JD, *et al.* Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. *Angew Chem*, 2005, **117**(227): 4264–4268.
- [29] 王彩梅, 蔡少丽, 吴义真, 等. 扩展青霉脂肪酶 ep8 与 R182K 叠加突变体的构建. 生物技术通报, 2007, 4: 165–168.
- [30] Fujii R, Nakagawa Y, Hiratake J, *et al.* Directed evolution of *Pseudomonas aeruginosa* lipase for improved amide-hydrolyzing activity. *Protein Eng Des Sel*, 2005, **18**(2): 93–101.
- [31] Kauffmann I, Schmidt-Dannert C. Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design. *Protein Eng*, 2001, **14**(11): 919–928.
- [32] Branneby C, Carlqvist P, Magnusson A, *et al.* Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(4): 874–875.
- [33] Shibamoto H, Matsumoto T, Fukuda H, *et al.* Molecular engineering of *Rhizopus oryzae* lipase using a combinatorial protein library constructed on the yeast cell surface. *J Mol Catal B: Enzym*, 2004, **28**(4-6): 235–239.
- [34] Niu WN, Li ZP, Zhang DW, *et al.* Improved thermostability and the optimum temperature of *Rhizopus arrhizus* lipase by directed evolution. *J Mol Catal B: Enzym*, 2006, **43**(1-4): 33–39.
- [35] 蔡少丽, 林俊涵, 王彩梅, 等. K55R 与 ep8 叠加突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的改善. 生物工程学报, 2007, **23**(4): 677–680.
- [36] Nakano H, Ide Y, Tsuda T, *et al.* Improvement in the organic solvent stability of *Pseudomonas* lipase by random mutation. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, **864**: 431–434.
- [37] Patkar S, Vind J, Kelstrup E, *et al.* Effect of mutations in *Candida antarctica* B lipase. *Chem Phys Lipids*, 1998, **93**(1): 95–101.
- [38] 舒正玉, 杨江科, 徐莉, 等. 微生物脂肪酶活性构像的形成及激活过程中的影响因子. 生物技术通报, 2007, **2**: 61–62.
- [39] Tielmann P, Boese M, Luft M, *et al.* A practical high-throughput screening system for enantioselectivity by using FTIR spectroscopy. *Chem Eur J*, 2003, **9**(16): 3882–3887.
- [40] Dyal A, Loos K, Noto M, *et al.* Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(7): 1684–1685.
- [41] de Lathouder KM, Marques Fló T, Kapteijn F, *et al.* A novel structured bioreactor: development of a monolithic stirrer reactor with immobilized lipase. *Catal Today*, 2005, **105**(3-4): 443–447.
- [42] Persson M, Mladenoska I, Wehtje E, *et al.* Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**(6): 833–841.
- [43] Shiraga S, Kawakami M, Ishiguro M, *et al.* Enhanced reactivity of *Rhizopus oryzae* lipase displayed on yeast cell surfaces in organic solvents: potential as a whole-cell biocatalyst in organic solvents. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(8): 4335–4338.
- [44] Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B: Enzym*, 2000, **9**(4-6): 113–17528.
- [45] 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**(6): 471–476.
- [46] Ueji S, Uedal A, Tanaka H, *et al.* Chemical modification of lipases with various hydrophobic groups improves their enantioselectivity in hydrolytic reactions. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(1): 83–87.
- [47] Palomo JM, Fernández-Lorente G, Guisán JM, *et al.* Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination. *Adv Synth Catal*, 2007, **349**(7): 1119–1127.
- [48] 舒正玉. 黑曲霉脂肪酶的酶学性质、基因克隆与表达及结构预测. 华中科技大学博士论文, 2007.