DOI:10.12441/spyswjs.20250103001 [文章编号] 1673-1689(2026)02-0024-09

南极假丝酵母脂肪酶在甘油二酯制备中的应用

侯淑华[1,2] 岳 昊[2] 王 慧[1,2] 宗爱珍[2] 徐同成[2] 张平平[1*]

(1. 天津农学院食品科学与生物工程学院,天津 300392; 2. 山东省农业科学院农产品加工与营养研究所,山东 济南 250100)

摘要:南极假丝酵母是在南极发现的酵母菌种,能够产生南极假丝酵母脂肪酶A(*Candida antarctica* lipase A,CALA)和南极假丝酵母脂肪酶B(*Candida antarctica* lipase B,CALB)。近年来,因其较强的催化效率和独特的位置选择性,南极假丝酵母脂肪酶被广泛应用于生物、化工和食品工业中。该综述首先介绍了南极假丝酵母脂肪酶的结构特点和酶学特征,随后阐述了南极假丝酵母脂肪酶在甘油二酯(diacylglycerol,DAG)制备中的应用现状,最后对其生物学改造和固定化现状进行了总结与展望。旨在为南极假丝酵母脂肪酶在DAG酶解、酯化制备等领域的研究提供理论和技术参考,并为后续酶分子的改造提升奠定基础。

关键词:南极假丝酵母脂肪酶;蛋白质工程;甘油二酯;固定化

Application of *Candida antarctica* Lipases in the Preparation of Diacylglycerol

HOU Shuhua[1,2] *YUE Hao*[2] *WANG Hui*[1,2] *ZONG Aizhen*[2] *XU Tongcheng*[2] *ZHANG Pingping*[1*]

(1. College of Food Science and Bioengineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China; 2. Institute of Food & Nutrition Science and Technology, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: *Candida antarctica* (*C. antarctica*) is a yeast species found in the Antarctic environment. It produces two lipases, *C. antarctica* lipase A (CALA) and *C. antarctica* lipase B (CALB). In recent years, *C. antarctica* lipases have been widely used in the biological, chemical, and food industries for their strong catalytic efficiency and unique positional selectivity. This review first introduces the structural and enzymatic characteristics of *C. antarctica* lipases and then describes the application status of *C. antarctica* lipases in the preparation of diacylglycerol (DAG). Finally, the biological modification and immobilization status of the lipases are concluded and prospected. This review aims to provide theoretical and technical reference for the research on *C. antarctica* lipases in the fields such as DAG hydrolysis and esterification preparation and lay a foundation for the subsequent transformation and improvement of enzyme molecules.

Keywords: *Candida antarctica* lipase; protein engineering; diacylglycerol; immobilization

脂肪酶是一类能够催化油脂发生水解反应的酶类,即三酰甘油水解酶或甘油酯水解酶,隶属于羧基酯水解酶类。近年来,因脂肪酶具备催化酯化、转酯化、水解等多种催化能力,在工业领域(如油脂加工、食品制作以及医药合成领域等)有广泛应用。南极假丝酵母(*Candida antarctica*)是从南极大陆中分离出的性质特殊的酵母菌,可产生α/β型蛋白质的脂肪酶。其中,应用最为广泛的是南极假丝酵母脂肪酶A(*Candida antarctica* lipase A,CALA)和南极假丝酵母脂肪酶B(*Candida antarctica* lipase B,CALB),但两者的酶学性质和结构存在显著差异[1]。DAG是羟基取代了甘油三

基金项目:山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2024D09);山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-28-07)。

通信作者:张平平(1970—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事植物活性物质研究及开发、农产品加工及综合利用研究。E-mail:672136215@qq.com

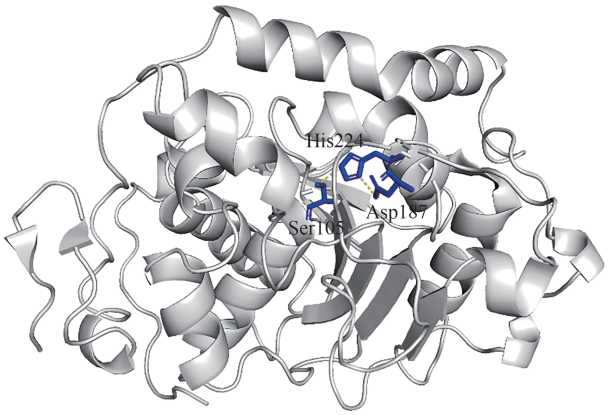
收稿日期:2025-01-03 **修回日期:**2025-02-28

酯（triacylglycerol，TAG）中的某一个脂肪酸的结构脂质，在抑制体质量增加[2]、预防心脑血管疾病[3]、降低血糖[4]以及降低血脂水平[5]等方面有积极作用。目前，酶法因条件温和、副产物少、风险物质含量低，成为DAG工业化制备中的常规方法。

由于独特的底物选择性和高效催化性，南极假丝酵母脂肪酶在食品工业、医疗健康及有机物合成等方面也展现出巨大的应用潜力，在DAG酶法制备中的应用越来越广泛。近年来，随着计算机技术在脂肪酶改造过程中的应用，蛋白质工程也从定向进化逐渐发展到理性设计。这些方法被广泛应用于改善脂肪酶的底物特异性[6]、提高稳定性[7]及催化活性[8]等领域。因此，作者就南极假丝酵母脂肪酶的结构特点、酶学性质及在DAG制备中的应用进行了综述，并总结了其生物学改造和固定化的研究进展，以期为南极假丝酵母脂肪酶在油脂工业中的应用提供理论和技术参考。

1　南极假丝酵母脂肪酶的结构与酶学特征

尽管CALA和CALB来源相同且均为α/β水解酶，但两者展现出了截然不同的结构特点。1994年，Uppenberg等[9]首次利用多重同晶置换（MIR）技术解析了CALB的三维晶体结构。如图1所示，CALB不具有大多数脂肪酶覆盖活性位点入口的“盖子”结构，这种独特的结构使得CALB不依赖于油水界面的活化作用，能够在更广泛的条件下发挥催化活性。作为丝氨酸水解酶，CALB的催化活性中心包含一个亲核丝氨酸残基（Ser105），该残基通过氢键与组氨酸（His224）和天冬氨酸（Asp187）相连。这3个氨基酸残基以高度保守的几何取向构成催化三联体。此外，CALB与其他α/β水解酶的序列相似性较低，具有一个保守的核心结构，包括一个由八链组成的平行扭曲的β折叠，两侧由α螺旋包围。其活性位点腔室类似于隧道，限制了大体积底物（如TAG或芳香族链）的空间定位，具有较强的立体选择性。这些结构特征使得CALB可以包容更多种类的底物，对水溶性或非水溶性物质都有极强的催化活性，同时在有机溶剂体系中也展现出优越的热稳定性。近年来，诺维信公司将CALB固定化后的商业酶命名为Novozym435，广泛应用于分离手性化合物、转酯化和聚合反应[10-12]等工业领域。研究发现，固定化的CALB在酯交换反应中能特异性识别TAG的*sn*-1，3位置的酰基，表现出明显的*sn*-1，3区域特异性[13]。

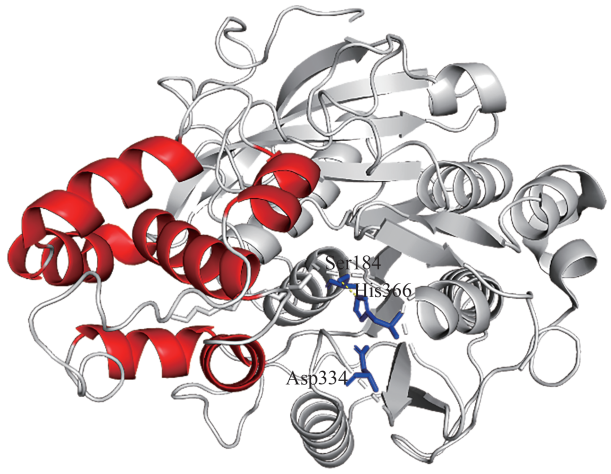


黄色虚线—氢键；蓝色棒状结构—三联体。

图1　CALB的三维结构

Fig. 1　Three-dimensional structure of CALB

相比而言，CALA受到的关注要少得多，其晶体结构在2008年才被解析[14]。如图2所示，CALA有一个可移动且结构特异的“盖子”结构以及一个经典的α/β水解酶折叠结构，需要通过界面活化来引起酶的构象变化。这一特殊的“盖子”结构覆盖在活性位点上方，在底物结合和界面激活过程中起到重要作用。将CALA与数据库中常见脂肪酶的结构进行对比，发现CALA与脱乙酰酶家族的结构最相似。尽管CALA与枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）脱乙酰酶（PDB：1L7A）的序列相似性仅为15%，但两者在α/β水解酶折叠结构上的相似性较高，尤其是催化三联体（Ser184、Asp334、His366）；而枯草芽孢杆菌脱乙酰酶的三联体为Ser181、Asp269、His298[15]。在“盖子”结构方面，CALA的“盖子”由6个α螺旋组成，并在C端区域有2条额外的β链，而枯草芽孢杆菌脱乙酰酶的帽区仅由4个α螺旋组成，但两者有3个α螺旋位于相同的位置。此外，CALA的底物结合位点与皱褶假丝酵母脂肪酶（*Candida rugosa* lipase，CRL）非常相似，两者都具有隧道状的酰基结合位点，能够容纳长链脂肪酸的酰基部分，同时为醇基部分提供足够的空间。值得注意的是，CALA显示出许多独特的生物催化特性，例如较强的热稳定性和酸性溶液稳定性以及可催化醇类，CAL能在高于90 ℃的温度下高效工作，可能是热稳定性最强的野生型脂肪酶A[16]。同时，CALA是目前已知对



红色区域—“盖子”结构；蓝色棒状结构—三联体。

图 2　CALA 的三维结构

Fig. 2　Three-dimensional structure of CALA

TAG 的 *sn*-2 位置酰基水解偏好性最强的脂肪酶，说明其在生物技术中的应用具备特殊性[17]。

2　南极假丝酵母脂肪酶在 DAG 制备中的应用

南极假丝酵母脂肪酶作为制备 DAG 的常用脂肪酶，已有大量研究证明，可通过催化醇解、酯化、水解等多种反应来生产 DAG，具体应用方式如下。

2.1　醇解反应

醇解通常是以醇（如乙醇、甘油等）和 TAG 为反应底物催化制备 DAG 的反应，具有高效、低成本等优势。研究表明，脂肪酶的种类对于 DAG 的产率和产物种类至关重要[18]。已有大量关于探究 CALB 催化甘油解反应制备 DAG 的最优条件研究。例如，Zou 等[19]发现以微生物油脂与甘油作为底物，在底物摩尔比 1∶1、CALB 添加量 8%、50 ℃水浴反应 12 h 的条件下，DAG 最终得率为 48.2%；孙晓雪等[20]优化了亚麻籽油 DAG 的制备条件，发现在底物质量比 1∶20、加酶量 2%、80 ℃反应 10 h 的条件下，DAG 含量可达 47.13%，经过分子蒸馏纯化后其含量达 57.18%；Wang 等[21]将 CALB 固定在改性后的 SBA-15 上催化大豆油制备 DAG，在最优反应条件（底物摩尔比 2∶1、酶添加量 0.2 g、反应温度 60 ℃、磁力搅拌转速 200 r/min、反应时间 12 h）下，获得的 DAG 含量为 26.57%~54.19%；祝雨筱等[22]发现，固定化 CALB 在高油酸葵花籽油与乙醇摩尔比 1∶50、反应温度 50 ℃、加酶量 6%、反应时间 1 h 的条件下，制备的 1,2-DAG 含量达 88%。现有的研究表明，CALB 可通过醇解反应稳定制备含量为 40% 以上的 DAG，其商品化 Novozym435 也是工业化生产 DAG 的优选酶之一，但高成本严重制约了其应用。然而，CALA 在甘油解制备 DAG 中的应用远不如 CALB 广泛，其潜在原因是 CALA 是 *sn*-2 位酰基偏好酶，相较于 *sn*-1,3 位置特异性的 CALB 催化效率较低，且更易生成活性较低的 1,2-DAG。He 等[23]发现，以大豆油为原料，通过大孔树脂 NKA-9 固定化 CALA 催化甘油解反应，在温度 50 ℃的无溶剂体系中，以 600 r/min 搅拌反应 12 h 后，DAG 含量达 64.37%，表明 CALA 具备催化甘油解制备 DAG 的潜力。然而，市售 CALA 一般为游离形式，缺少固定化产品，研究者需要对该酶的固定化条件进行优化。总的来说，现有研究已经初步发现了适用于南极假丝酵母脂肪酶甘油解制备 DAG 的条件，但当前仍存在反应时间长（大多数超过 10 h），无法实现工业化规模应用的限制，在未来需进一步优化提升。

2.2　酯化反应

酯化反应是利用脂肪酶直接催化脂肪酸酯化连接在甘油分子上，该方法获得的产物纯度高，但存在游离脂肪酸成本高的问题。CALB 的 *sn*-1,3 的位置特异性使得其在酯化反应中存在天然优势，可生成高纯度的 1,3-DAG。Wang 等[24]将水解提取的鸭油脂肪酸与甘油（摩尔比为 2∶1）置于 50 ℃的水浴中振荡，加入 5% 脂肪酶反应 9 h，最终产物中 DAG 含量超过 94%。该研究采用两步法进行反应，需要通过蒸馏精制得到高纯度的游离脂肪酸和甘油，再利用 CALB 催化酯化反应，产物得率较高的同时，也伴随着反应时间较长和成本较高的问题。Chen 等[25]分别将辛酸（C_8）、癸酸（C_{10}）与甘油按 1∶7.5 的摩尔比置于 60 ℃的气泡塔反应器中，然后加入 5% 的脂肪酶和 2.5% 的去离子水，反应 30 min 后，联合使用分子蒸馏与硅胶色谱技术对产物进行两步纯化，最终 C_8-DAG 与 C_{10}-DAG 的纯度均达到 99%。气泡塔的工作原理是通过气体鼓泡技术将气体相高度分散在液体相中，增大了底物之间的接触面积，与传统的搅拌式反应器相比，其传质和传热效率更高，同时也在一定程度上避免了机械搅拌对脂肪酶造成的损伤，是降低 DAG 工业化生产成本的可行技术。Huang 等[26]以富含亚油酸的游离脂肪酸与甘油为原料，在叔丁醇 25.8%、酶负

载量2%、反应时间4 h、底物摩尔比2.4∶1、温度60 ℃、真空度0.1 MPa的条件下，可制备含量为65.4%的DAG，经过硅胶柱纯化之后，DAG含量高达96.1%，其中1,3-DAG的含量达到64.7%。杨春芳[27]发现CALA可与CALB协同催化酯化反应，在底物共轭亚油酸与乙醇摩尔比1∶2、pH 8.0、CALA添加量5%、Novozyme435（固定化CALB）添加量2%、反应温度50 ℃、反应时间3 h的条件下，总酯化率达52.84%。然而，He等[23]发现，将大孔树脂固定化CALA加入酯化反应体系中，反应前后体系中DAG的含量并无变化，说明CALA可能并不适用于催化酯化反应制备DAG，在未来需对该反应机理进行深入研究，以明确不同酶的应用范围。

2.3 水解反应

水解反应是指通过脂肪酶催化TAG发生特异性反应，脱去其中一个酰基生成DAG的过程。由于1,3-DAG的健康功效相较于1,2-DAG更为优越，所以能够倾向于水解TAG的*sn*-2位酰基的脂肪酶是更为合适的选择。杨继国等[28]比较了多种脂肪酶水解菜籽油制备DAG的效率，发现CALB在反应体系pH 7.0、加酶量0.5%、加水量20%、反应温度40 ℃的条件下催化反应9 h后，DAG含量仅为4.5%，这表明CALB并不适用于水解制备DAG。这可能是因为在水解反应体系中，过高的含水量容易导致脂肪酶发生聚集，从而限制其催化活性的发挥，同时说明CALB微环境的疏水性会严重影响其催化性能[29]。杨馨怡[30]利用CALA对*sn*-2高倾向性的特点催化高油酸葵花籽油水解制备DAG，确定最佳反应条件为酶添加量3 850 U/g、水添加量32%、酶解温度70.5 ℃、反应时间9.1 h，在此条件下制备出的1,3-DAG含量为34.36%，通过优化分子蒸馏条件，纯化后1,3-DAG的含量提高至41.24%。杨春芳[27]利用CALA催化大豆色拉油水解制备DAG，在加水量10%、加酶量0.1%、70 ℃的条件下反应24 h后，得到的产物中1,3-DAG含量仅为12.35%。这一结果表明游离CALA的催化活性和稳定性较低，在反应体系中容易出现活性低或失活现象。利用水解反应制备DAG的操作简单、不需添加其他底物、能耗低，但会有较多副产物产生，导致DAG得率较低。未来，需要优化制备与纯化条件，以避免过度反应产生大量副产物，并研发副产物分离及再酯化生成DAG的工艺，从而提高DAG的得率。

总体而言，CALA和CALB均在DAG制备中展现出了较强的应用前景，并且针对2种脂肪酶的差异化特性，研究者探索出了适用于不同机理的制备方法。在将其应用于DAG制备领域时，除了制备工艺及反应的潜在机制仍需深入探究以外，还需要利用多种技术协同作用以提升产物得率并降低成本。

3 南极假丝酵母脂肪酶的生物学改造和固定化

野生型南极假丝酵母脂肪酶存在催化效率低、稳定性差、底物特异性低等问题，严重限制了其应用。近20年来，非理性设计、理性设计和半理性设计等多种策略和技术的开发，显著提高了南极假丝酵母脂肪酶的关键性质。此外，脂肪酶的固定化是将游离脂肪酶固定到一定载体上的技术，能够限制脂肪酶的自由移动，但仍然保留了原有的催化性能。这项技术可增强酶的稳定性并实现重复使用，也是南极假丝酵母脂肪酶应用于工业生产的关键策略。

3.1 非理性设计

非理性设计即随机进化策略，具有不需要了解酶分子的结构信息和催化机理、操作简单等优点。Suen等[31]利用DNA改组技术筛选对3-（3’,4’-二氯苯基）戊二酸二乙酯具有高水解活性的CALB突变体，最终得到的突变体活性比CALB提高了20倍，热稳定性也有所提高，在45 ℃下的半衰期比野生型CALB提高了11倍。Peng[32]采用多位点饱和诱变方法获得了2个突变体（mCALB168和mCALB7），在60 ℃、pH 8.0的磷酸钾缓冲液中孵育相同时间，突变体的相对酶活力分别比野生型CALB提高了14倍和6倍。这2个突变体都是通过引入额外的氢键来达到提高热稳定性的目的。由此看出，增加氢键数量是增强CALB热稳定性的可行策略。尽管随机进化策略在南极假丝酵母脂肪酶的改造中取得了一些成效，但仍存在着目标突变数量稀少、随机性大、难以筛选等问题，未来需结合高通量筛选技术，以构建更高质量的突变体文库。

3.2 半理性设计

半理性设计是基于了解蛋白质序列、三维结构等信息的基础之上，采用理性设计的思路选取多个

氨基酸残基作为候选，再利用定向进化的方法进行饱和突变，从而筛选目标突变体。Xu 等[33]以 CALB 为模型，运用聚焦理性迭代位点特异性诱变（FRISM）策略，对结合口袋进行半理性设计改造，得到 4 种高度立体互补的突变体，它们在外消旋酸和外消旋醇之间的酯交换反应中的选择性均大于 90%。有研究者通过迭代半理性设计手段显著提高了 CALB 对大体积底物的特异性催化能力，其中单突变体 T138G、T138A、T138S 和 T138N 催化酯交换反应的活性均增加了 4.0 倍，双突变体 V154L-L278A 的催化活性增加了 3.6 倍[34]。杨柳等[35]针对 CALB 进行了 5 轮迭代突变，确定 V190A 为优势突变体，该突变体对氯乙酸的亲和力增强，且酶活性提升了 1.76 倍，通过优化反应参数建立最佳反应体系，氯乙酰胺产率提升至 100%，相较于野生型提高了 16.02 倍，特异性识别底物的能力显著提升。Zorn 等[36]为研究不同氨基酸的潜在协同作用，采用半理性设计的策略获得了 CALA 单突变体、多突变体，发现单突变体 V290W 可以从亚麻荠油乙酯中富集到 34% 的二十碳烯酸，双突变体 V9（V286Q、V290W）可以从海甘蓝乙酯中富集到 78% 的芥酸，显著提高了 CALA 对特定长链单不饱和脂肪酸的富集能力。Löfgren 等[37]通过半理性设计获得了 CALA 的突变体 L367G，结果显示，该突变体对外消旋 2-苯基丁-3-炔-2-醇的酯交换反应速率相较于野生型提高了 10 倍，同时也保留了原有的高对映选择性和热稳定性。由此可知，半理性设计相较于定向进化，极大地缩小了突变体文库的数量，提高了工作效率。

3.3 理性设计

理性设计是在明晰酶分子氨基酸和基因序列、三级结构及其催化机制的基础上，结合计算机辅助选取影响底物特异性或催化活性关键位点，并将氨基酸残基进行针对性替换以获得具有新性状突变酶的手段。例如，通过对底物结合口袋的合理设计可以改变脂肪酶的立体选择性，CALB 的结合口袋是由 Thr42、Ser47 与 Trp104 构成的，由于该口袋空间容量有限，仅对体积较小的仲醇表现出立体选择性，Magnusson 等[38]将分子量较大的 Trp104 氨基酸替换为 Ala，以达到降低空间位阻、增大结合口袋空间的目的，构建了 Trp104Ala 突变体，该突变体对庚烷-4-醇和壬烷-5-醇的底物特异性分别增加了 270 倍和 5 500 倍。此外，也可以通过改变底物结合口袋附近某些重要氨基酸来改变酶的空间结构，进而提高酶的催化活力。为改善 CALB 的热稳定性，温露文等[39]通过软件计算出蛋白质解折叠自由能的变化量（ΔG），从而选取了影响酶热稳定性的氨基酸位点，并根据空间位置的变化确定了 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 为优势突变体，这 3 个氨基酸位点均位于底物结合口袋附近，且甲硫氨酸（M）含有的硫原子可以形成二硫键，有助于稳定蛋白质的三级结构，这对于提高突变体的稳定性具有重要意义。结果表明，2 种突变体在 50 ℃的半衰期分别是野生型的 1.35 倍和 1.5 倍，最适反应温度提高了 5 ℃，对偏酸性的环境表现出更好的耐受性。刘桂子等[40]基于 CALB 的三维结构信息，通过分子可视化软件对特定区域的氨基酸位点进行替换，采用提高蛋白质分子中疏水氨基酸残基的占比、降低空间位阻、引入具有稳定结构的极性氨基酸、增加氢键数量以及增强分子间作用力的数量和强度等策略，获得了突变体 CALB Tm，与野生型 CALB 相比，其水解活性提高了 10 倍，同时在 50 ℃下的热稳定性也显著提升，保温 3 h 后的相对酶活力为 74.8%。此外，有研究者通过理性设计来提升 CALA 对叔醇的对映选择性酯化。例如，Wagner 等[41]在 CALA 活性位点附近选取了 7 个氨基酸位置作为候选位点，通过分子建模与 2 轮分子对接试验，最终获得的单突变体 V278S 和 S429G 在催化叔醇的动力学分离试验中表现出比野生型 CALA 高出约 2~4 倍的转化率，且组合双突变体 V278S+S429G 在催化 1，2，3，4-四氢萘-1-醇的酯化反应中得到的酯产物（*R*）-2 的转化率和对映体过量分别达到了 45% 和 99%。

总的来说，通过理性设计对南极假丝酵母脂肪酶进行针对性改造已取得部分成效，但是部分脂肪酶的结构与功能关系尚不明确，在未来的研究中，可以将人工智能技术融合到理性设计的计算过程中，以期进一步提高设计的准确性与成功率。

3.4 固定化

脂肪酶固定化是利用物理或化学方法来提高脂肪酶稳定性、重复利用率和催化效率的重要技术。传统的固定化方法主要有物理吸附法、共价结合法、包埋法以及交联法。魏凌枫等[42]采用不同的大孔树脂材料吸附固定 CALB，发现大孔

树脂DA-201固定化的CALB催化甘油解的效率显著升高，在反应24 h后，DAG含量达64.52%。Mang等[43]确定了CALB的最佳吸附载体为LX-1000EP环氧树脂，固定化酶EP-CALB表现出与Novozym435相似的热稳定性、pH稳定性以及有机溶剂耐受性。在催化酯交换合成2,5-呋喃二羧酸二异辛酯的研究中，EP-CALB的转化率为91.3%，Novozym435的转化率为87.8%，原因可能是CALB与树脂在吸附过程中产生了共价连接，阻止了CALB在溶剂中的脱落和失活。Spelmezan等[44]利用共价结合法将CALB固定在壳聚糖包覆的磁性纳米颗粒上，以催化醋酸乙烯酯交换反应，在3~16 h内，其转化率为49.2%~50.0%，且在最佳条件下使用10次仍保留较高的催化活性。Zhang等[45]同样利用共价结合法将CALA固定在ZIF-8上，对其结构进行表征，并将其用于催化卡洛芬对映异构体的分离，反应24 h后对映体过量达97.42%，表明固定后的酶具有更好的热稳定性和pH稳定性。Cavalcante等[46]将CALA与高岭土进行共价结合并对其进行表征，结果表明，固定化CALA的半衰期是游离酶的2~3倍，在培养基中催化rac-1-（三异丙基硅基）戊-1,4-二炔-3-醇动力学分解，具有优异的对映体过量（>99%）。Song等[47]利用包埋和交联的方法分别将CALB固定在二氧化硅基质中，获得了热稳定性和重复利用性更高的脂肪酶，其可催化苯甲酸与苯甲酸酐发生酯化反应，催化效率可达91%。Zhang等[48]将CALB包埋入金属有机框架ZIF-8中，得到的脂肪酶的酶活力回收率为59.8%，固定化率为92.7%。在最佳条件下，经过10次催化合成*L*-抗坏血酸棕榈酸酯，*L*-抗坏血酸转化率仍能达到75.9%以上。然而，单独的固定化方法都存在局限性，因此有学者将不同固定化方法进行结合，如Cai等[49]首先将CALB包埋在ZIF-8中，并通过物理吸附将包埋后的酶固定到大孔树脂上，与游离脂肪酶相比，该固定化酶表现出更优异的热稳定性和操作稳定性，同时在叔丁醇、正己烷等有机溶剂体系中表现出更好的耐受性。

脂肪酶固定化技术选择应根据酶的特性和应用目的来确定，以确保降低酶活力的损失及增强稳定性。随着纳米技术和材料科学的发展，新型固定化方法（如膜固定技术[50]等）和载体材料（如磁性纳米材料[51]、有机载体材料[52]等）的开发将进一步推动固定化脂肪酶技术的进步与应用。在南极假丝酵母脂肪酶的研究领域，应重点突出其位置选择性（CALA针对TAG的*sn*-2位酰基的倾向性和CALB的*sn*-1,3位特异性）及独特性质（CALA的热稳定性），以获得效率更高的酶制剂。

4 展望

近年来，随着酶工程技术的迅速发展，南极假丝酵母脂肪酶家族的CALA和CALB因独特的位置偏好性和催化性能，在食品领域，特别是DAG的酶法制备中展现了优越的应用特性，并且取得了显著成果，成为油脂精深加工的重点研究方向之一。然而，当前这2种脂肪酶仍存在特异性酶解效率低、位置特异性较差、重复利用率低等瓶颈问题。在未来的研究中，应在明晰CALA、CALB构效关系的基础上，利用计算机技术与人工智能技术设计位置特异性和酶活力显著增强的突变体，并开发相匹配的固定化载体及反应体系，以期提高南极假丝酵母脂肪酶催化制备DAG的催化效率和纯度。

参考文献

[1] KIRK O, CHRISTENSEN M W. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin[J]. Organic Process Research & Development, 2002, 6(4): 446-451.

[2] FERREIRA G F, PESSOA J G B, RÍOS PINTO L F, et al. Mono-and diglyceride production from microalgae: challenges and prospects of high-value emulsifiers[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 118: 589-600.

[3] LIU Y N, WANG B W, XU H X, et al. Synergistic effect of diacylglycerol and vitamin D in ameliorating dextran sodium sulfate-induced colitis in rats[J]. Lipids, 2020, 55(6): 585-598.

[4] LEE Y Y, TANG T K, PHUAH E T, et al. Production, safety, health effects and applications of diacylglycerol functional oil in food systems: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(15): 2509-2525.

[5] LU H, GUO T T, FAN Y W, et al. Effects of diacylglycerol and triacylglycerol from peanut oil and coconut oil on lipid metabolism in mice[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(6): 1907-1914.

[6] MOHARANA T R, RAO N M. Substrate structure and computation guided engineering of a lipase for omega-3

fatty acid selectivity[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0231177.

[7] 王亚婵,李阳阳,刘松. 共识序列改造提高南极假丝酵母脂肪酶B的热稳定性[J]. 食品与发酵工业,2023,49(24):29-36.
WANG Y C, LI Y Y, LIU S. Improving the thermal stability of *Candida antarctica* lipase B based on consensus sequence modification [J]. Food and Fermentation Industries,2023,49(24):29-36.(in Chinese)

[8] ZHANG Z H, LONG M F, ZHENG N, et al. Inside out computational redesign of cavities for improving thermostability and catalytic activity of *Rhizomucor miehei* lipase [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023,89(3):e0217222.

[9] UPPENBERG J, HANSEN M T, PATKAR S, et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*[J]. Structure,1994,2(4):293-308.

[10] WU Y, LUO Z L, HUANG M A, et al. An improved biocatalyst from *Candida antarctica* lipase B immobilized on metal organic frameworks for kinetic resolution of chiral secondary alcohols[J]. Molecular Catalysis,2023, 550:113584.

[11] GONÇALVES M C P, CANSIAN A B M, TARDIOLI P W, et al. Production of sugars from mixed hardwoods for use in the synthesis of sugar fatty acid esters catalyzed by immobilized-stabilized derivatives of *Candida antarctica* lipase B [J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2023,17(5):1236-1250.

[12] PERIN G B, FELISBERTI M I. Enzymatic synthesis of poly (glycerol sebacate): kinetics, chain growth, and branching behavior[J]. Macromolecules,2020,53(18): 7925-7935.

[13] HWANG J, AUM J, LEE S J, et al. Immobilized *Candida antarctica* lipase B as an *sn*-1,3 regiospecific biocatalyst for the interesterification of triacylglycerols with fatty acid ethyl esters [J]. Food Science and Biotechnology,2024,33(1):159-170.

[14] ERICSSON D J, KASRAYAN A, JOHANSSON P, et al. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase a shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 376 (1):109-119.

[15] WIDMANN M, JUHL P B, PLEISS J. Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A [J]. BMC Genomics,2010,11(1):123.

[16] SIRÉN S, DAHLSTRÖM K M, PUTTREDDY R, et al. *Candida antarctica* lipase A-based enantiorecognition of a highly strained 4-dibenzocyclooctynol (DIBO) used for PET imaging[J]. Molecules,2020,25(4):879.

[17] ROGALSKA E, CUDREY C, FERRATO F, et al. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases[J]. Chirality,1993,5(1):24-30.

[18] 曲可心,高青山,姚辉耀,等. 延黄牛脂制备高纯度1,3-甘油二酯工艺[J]. 食品与机械,2022,38(2):210-215,227.
QU K X, GAO Q S, YAO H Y, et al. Study on preparation of high purity 1,3-diglyceride from Yanhuang beef tallow[J]. Food & Machinery, 2022, 38(2): 210-215,227.(in Chinese)

[19] ZOU X Q, NADEGE K, NINETTE I, et al. Preparation of docosahexaenoic acid-rich diacylglycerol-rich oil by lipase-catalyzed glycerolysis of microbial oil from *Schizochytrium* sp. in a solvent-free system[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society,2020,97(3):263-270.

[20] 孙晓雪,汪勇,崔立明,等. 酶法催化甘油解制备亚麻籽油甘油二酯及其氧化稳定性分析[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(6):76-83.
SUN X X, WANG Y, CUI L M, et al. Preparation of diglyceride from flaxseed oil by enzymatically catalyzed glycerolysis and analysis of its oxidative stability [J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2022,41(6): 76-83.(in Chinese)

[21] WANG X, HE L H, HUANG J R, et al. Immobilization of lipases onto the halogen & haloalkanes modified SBA-15: enzymatic activity and glycerolysis performance study [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021,169:239-250.

[22] 祝雨筱,王盈盈,金青哲,等. 酶法合成1,2-甘油二酯的工艺研究[J]. 中国油脂,2017,42(1):56-59.
ZHU Y X, WANG Y Y, JIN Q Z, et al. Enzymatic synthesis of 1,2-diacylglyceride[J]. China Oils and Fats, 2017,42(1):56-59.(in Chinese)

[23] HE L H, ZHENG J W, FENG S T, et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase a onto macroporous resin NKA-9: esterification and glycerolysis performance study [J]. Journal of Oleo Science,2022,71(9):1337-1348.

[24] WANG B W, ZHANG M G, GE W H, et al.

Microencapsulated duck oil diacylglycerol: preparation and application as anti-obesity agent[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 101: 646-652.

[25] CHEN J Z, LEE W J, QIU C Y, et al. Immobilized lipase in the synthesis of high purity medium chain diacylglycerols using a bubble column reactor: characterization and application[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 466.

[26] HUANG C Q, LIU Z Y, HUANG W Q, et al. Fabrication, characterization, and purification of nutraceutical diacylglycerol components from *Camellia* oil[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(9): 3856-3871.

[27] 杨春芳. 南极假丝酵母脂肪酶A酶学性质及油脂催化应用研究[D]. 广州：华南理工大学，2012.

[28] 杨继国，杨博，王永华，等. 全酶法制备甘油二酯的研究(I)：油脂酶法部分水解反应工艺条件的优化[J]. 中国油脂，2009，34(2)：6-9.
YANG J G, YANG B, WANG Y H, et al. Production of diacylglycerol using holoenzymatic process(I): optimization of enzymatic partial hydrolysis of oils[J]. China Oils and Fats, 2009, 34(2): 6-9.(in Chinese)

[29] ENGEL S, HÖCK H, BOCOLA M, et al. CALB catalyzed conversion of ε-caprolactone in aqueous medium. Part 1: immobilization of CALB to microgels[J]. Polymers, 2016, 8(10): 372.

[30] 杨馨怡. 1，3-甘油二酯的酶法制备及其功效评价研究[D]. 泰安：山东农业大学，2022.

[31] SUEN W C, ZHANG N Y, XIAO L, et al. Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling[J]. Protein Engineering, Design & Selection, 2004, 17(2): 133-140.

[32] PENG X Q. Improved thermostability of lipase B from *Candida antarctica* by directed evolution and display on yeast surface[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(2): 351-358.

[33] XU J, CEN Y X, SINGH W, et al. Stereodivergent protein engineering of a lipase to access all possible stereoisomers of chiral esters with two stereocenters[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(19): 7934-7945.

[34] DE LOS SANTOS Y L, CHEW-FAJARDO Y L, BRAULT G, et al. Dissecting the evolvability landscape of the CALB active site toward aromatic substrates[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 15588.

[35] 杨柳，姜龙，刘耀杰，等. 半理性设计改造南极假丝酵母脂肪酶B催化合成氯乙酰胺[J]. 中国生物工程杂志，2024，44(9)：33-41.
YANG L, JIANG L, LIU Y J, et al. Semi-rational design modifies *Candida antactica* lipase B to catalyze chloroacetamide synthesis[J]. China Biotechnology, 2024, 44(9): 33-41.(in Chinese)

[36] ZORN K, OROZ-GUINEA I, BRUNDIEK H, et al. Alteration of chain length selectivity of *Candida antarctica* lipase a by semi-rational design for the enrichment of erucic and gondoic fatty acids[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2018, 360(21): 4115-4131.

[37] LÖFGREN J, GÖRBE T, OSCHMANN M, et al. Transesterification of a tertiary alcohol by engineered *Candida antarctica* lipase A[J]. ChemBioChem, 2019, 20(11): 1438-1443.

[38] MAGNUSSON A O, ROTTICCI-MULDER J C, SANTAGOSTINO A, et al. Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B[J]. ChemBioChem, 2005, 6(6): 1051-1056.

[39] 温露文，徐岩，喻晓蔚. 理性设计提高酯合成催化反应脂肪酶的热稳定性[J]. 微生物学通报，2020，47(7)：2106-2118.
WEN L W, XU Y, YU X W. Rational design to improve lipase thermostability for ester synthesis[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2106-2118.(in Chinese)

[40] 刘桂子，丁睿，胡国帅，等. 通过理性设计提高南极假丝酵母脂肪酶B的温度稳定性[J]. 生物技术，2022，32(3)：284-290，296.
LIU G Z, DING R, HU G S, et al. Improving the thermostability of *Candida antarctica* lipase B by rational design[J]. Biotechnology, 2022, 32(3): 284-290, 296.(in Chinese)

[41] WAGNER K, HUMMEL A, YANG J N, et al. Protein engineering of lipase a from *Candida antarctica* to improve esterification of tertiary alcohols[J]. ChemBioChem, 2024, 25(24): e202400082.

[42] 魏凌枫，钟南京. 大孔树脂负载南极假丝酵母脂肪酶B催化甘油解和酯化反应制备甘油二酯[J]. 食品安全质量检测学报，2022，13(23)：7669-7676.
WEI L F, ZHONG N J. Preparation of diacylglycerols from glycerolysis and esterification reaction catalyzed by macroporous resins supported *Candida antartic* lipase B

[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(23): 7669-7676.(in Chinese)

[43] MANG R C, ZHOU Y Y, DU X F, et al. Biosynthesis of diisooctyl 2, 5-furandicarboxylate by *Candida antarctica* lipase B (CALB) immobilized on a macroporous epoxy resin [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2023, 70(5): 1772-1780.

[44] SPELMEZAN C G, BENCZE L C, KATONA G, et al. Efficient and stable magnetic chitosan-lipase B from *Candida antarctica* bioconjugates in the enzymatic kinetic resolution of racemic heteroarylethanols[J]. Molecules, 2020, 25(2): 350.

[45] ZHANG P L, CHEN J, SUN B Z, et al. Enhancement of the catalytic efficiency of *Candida antarctica* lipase A in enantioselective hydrolysis through immobilization onto a hydrophobic MOF support[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 173: 108066.

[46] CAVALCANTE A L G, CHAVES A V, ALMEIDA FECHINE P B, et al. Chemical modification of clay nanocomposites for the improvement of the catalytic properties of lipase A from *Candida antarctica* [J]. Process Biochemistry, 2022, 120: 1-14.

[47] SONG M, CHANG J H. Thermally stable and reusable ceramic encapsulated and cross-linked CALB enzyme particles for rapid hydrolysis and esterification [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2459.

[48] ZHANG X J, QI F Y, QI J M, et al. Efficient enzymatic synthesis of *L*-ascorbyl palmitate using CALB-embedded metal-organic framework [J]. Biotechnology Progress, 2021, 38(1): e3218.

[49] CAI X Y, ZHANG M J, WEI W, et al. The Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by ZIF-8 encapsulation and macroporous resin adsorption: preparation and characterizations [J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(2): 269-276.

[50] CHEN Z, SUN Z, MING S X, et al. Bioinspired proteolytic membrane (BPM) with bilayer pepsin structure for protein hydrolysis [J]. Separation and Purification Technology, 2021, 259: 118214.

[51] ZHANG C Y, YOU S P, LIU Y D, et al. Construction of *Luffa sponge*-based magnetic carbon nanocarriers for laccase immobilization and its application in the removal of bisphenol A[J]. Bioresource Technology, 2020, 305: 123085.

[52] RAMALHO E X, DE CASTRO R J S. Covalent bonding immobilization of a *Bacillus licheniformis* protease on chitosan and its application in protein hydrolysis [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2023, 50: 102713.