

微生物酯酶的开发及其在食品工业中的应用现状

毕文慧¹, 桂伦², 姚健^{2*}

1(山东农业工程学院 食品科学与工程学院, 山东 济南, 250100)

2(江西省农业科学院 农业应用微生物研究所, 江西 南昌, 330200)

摘要 微生物酯酶是一种在食品领域应用广泛的工业酶, 开发和应用微生物酯酶资源对食品工业发展具有重要意义。借助分离纯化、宏基因组学、宏转录组学等技术手段开发具有化学试剂抗性、热稳定性或低温耐受性的高温酯酶和低温酯酶既丰富了酶学知识又扩展了潜在工业酯酶种类; 将各类酯酶用于食品加工及食品农残检测, 能够有效提高生产效率、产品质量, 保障食品安全。该文综述了新型微生物酯酶的开发及其在食品加工、农残检测中的应用研究进展, 以期对酯酶的开发及其工业化应用提供参考。

关键词 高温酯酶; 低温酯酶; 宏组学; 食品加工; 农残检测

酯酶(esterase)是一种能够催化酯键断裂和形成, 参与转酯、酯化和酯交换反应的水解酶。广义上讲, 羧酸酯酶(carboxylesterase, EC 3.1.1.1)、芳基酯酶(arylesterase, EC 3.1.1.2)、脂肪酶(triacylglycerol lipase, EC 3.1.1.3)、丹宁酸酶(tannase, EC 3.1.1.20)等统称为酯酶^[1-2]。酯酶广泛存在于动物、植物和微生物中, 其中大部分工业酯酶都来源于微生物, 如细菌的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia* sp.)、低温杆菌属(*Psychrobacter* sp.)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.); 真菌的根霉菌属(*Rhizopus* sp.)、青霉菌属(*Penicillium* sp.)、曲霉菌属(*Aspergillus* sp.); 酵母的假丝酵母(*Candida* sp.)、毕赤酵母(*Pichia* sp.)、红酵母(*Rhodotorula* sp.)和酿酒酵母(*Saccharomyces* sp.)均为工业生产中重要的产酯酶微生物^[3-4]。微生物酯酶作为生物催化剂具有来源广、种类多、效率高、反应条件温和、不需添加辅酶和副产物少等优点, 因此在食品工业领域应用广泛^[2]。

1 微生物酯酶的研究进展

1.1 新型酯酶的开发

根据酯酶最适反应温度可分为高温酯酶、中温酯

酶和低温酯酶。中温酯酶(Mesophilic esterase)是目前开发和应用最多的一类酯酶, 其在常温下具有较高催化效率, 但在高温、低温环境下易失活。由于中温酯酶对热、冷、有机溶剂和高盐环境抗性较差, 限制了其在一些存在极端温度、化学试剂条件下的工业生产中使用。

高温酯酶(Thermophilic esterase)在高热环境中有着特殊的稳定性和催化能力, 海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*) TM1160 酯酶在 90 °C 下作用 1 h 后仍可保留 50% 酶活性^[5], 而嗜热泉生古细菌 K1 (*Aeropyrum pernix* K1) 酯酶则可将作用时间延长到 160 h^[6]。此外, 许多高温酯酶对有机溶剂、重金属、盐等化学试剂有较高的耐受性。如 TM1160 酯酶可在甲醇、DMSO 等有机试剂中常温处理 12 h 后仍保持活性^[5]; 分离自红海宏基因组文库的 EstATII 酯酶可在 4.5 mol/L 盐溶液中保持活性, 在钙、镁、铁等金属离子存在时至少可以保持 60% 酶活性^[7]。大多数酯酶底物特异性较低, 可催化不同结构酯类的水解, 但来源于海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)的高温酯酶 TM0077 却具有极高的底物特异性, 这一发现有利于提高酯解反应的专一性、降低副产物^[8]。高温酯酶的上述特性有利于降低对生产中冷却系统的需求, 减少杂菌污染, 提高产物纯度, 非常适用于食品热加工行业。

低温酯酶(Psychrophilic esterase)在低温或常温条件下均具有较高催化效率, 但在高温条件下会快速失活。研究人员从海洋、冰川和沼泽等低温环境中分离到了一些性能优良的低温酯酶。这些低温酯酶最

第一作者: 硕士研究生, 讲师(姚健副教授为通讯作者, E-mail: yaojian417@163.com)。

基金项目: 国家自然科学基金项目(地区基金)(31660016); 好氧堆肥高温期微生物宏基因组文库中嗜热酯酶的筛选及酶学特征研究(QNKJZ201901); 肉灵芝群落结构鉴定及人工栽培条件优化(2016CQN008)

收稿日期: 2019-04-05, 改回日期: 2019-05-10

适温度一般在 40 ℃ 左右,并能在较长时间低温处理后保留较高酶活性。如海旋菌 (*Thalassospira* sp.) GB04J01. 的酯酶 ThaEst2349 最适作用温度为 45 ℃,且在 10 ℃ 和 20 ℃ 下孵化 2 h 后仍具有 85% 和 90% 的酶活性^[9];肠杆菌 (*Enterobacter* sp.) 酯酶 EstA 最适作用温度为 40 ℃,在 0 ℃ 下可保留 75% 的酶活性^[4];冰川鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas glacialis*) PAMC 26605 的羧酸酯酶 EstSP2 最适作用温度为 40 ℃,在 4~25 ℃ 活性保持稳定,并且在浓度为 40% 的二甲基亚砷、甲醇、乙醇溶液中仍可保留 75% 酶活性^[10]。此外一些具有特殊抗性的极端低温酯酶也不断被发现,来源于植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 的酯酶 lp_3505 最适作用温度为 5 ℃,在 20 ℃ 下保存 20 h 后仍保留 60% 酶活性,并可耐受 20% 的高浓度盐溶液^[11]。低温酯酶可用于低温加工环境,有利于防止产物分解和热变性;反应活化能较低,可以节约能源,在热敏性食品生产中极具应用潜力。

1.2 宏组学技术在酯酶开发中的应用

新型酯酶的不断发现与酯酶开发技术的进步密切相关。传统开发采用分离培养技术,但近年来利用传统技术获得新活性物质越来越困难,宏基因组学技术的出现则为酯酶的开发提供了新思路。宏基因组学 (Metagenome) 是指以特定环境中提取的全部微生物基因组 DNA 为研究对象,不需要对微生物进行分离纯化培养,通过构建宏基因组文库并运用序列筛选或功能筛选方式从文库中获得有用的活性物质^[12]。目前通过构建土壤、海洋沉积物、活性淤泥、堆肥、温泉等宏基因组文库,已成功筛选到许多新型酯酶。GU 等^[13]提取了栗树林土壤的总 DNA,总 DNA 经纯化后与 pWEB-TNC 载体连接并转化到 *Escherichia coli* EPI100-T1^R 中,构建了土壤宏基因组文库。之后利用含三丁酸甘油酯的 LB 平板从文库中筛选到新型酯酶 EstGX1 和 EstGX2,两者为微生物脂类水解酶第 IV 家族的新成员,对两种酯酶进行特性研究发现 EstGX2 具有较高热稳定性,在 99 ℃ 下处理 55 min 后仍能保持 40% 活性,并且具有独特的嗜碱性,最适 pH 为 9.0。同样利用宏基因组技术,LEE 等^[14]构建了猪粪-蘑菇废弃物堆肥宏基因组文库并分离到新型酯酶 est7K,对该酶酶学特性研究发现其最适反应条件为 40 ℃ 和 pH 10.0,并且在 30% 甲醇存在时其活性可提高 2.1 倍;RANJAN 等^[15]在海洋沉积物宏基因组文库和温泉宏基因组文库中共挖掘到 10 种酯酶基因,这些功能基因在序列结构、催化功能上有其独特

之处,并且部分酯酶基因来源于未知微生物。宏基因组学从大量不可培养微生物中发现了许多催化特性、耐受性独特的新型酯酶,极大地丰富了酯酶种类。

除了发现在工业生产中有潜在用途的酯酶以外,宏基因组文库功能筛选研究还发现了一些新的酶学特性信息,在牛瘤胃细菌宏基因组文库中识别到一种新型酯酶 Est5S,其与任何已知脂肪水解酶均没有显著的序列相似性,被归类为酯酶新家族——第 XV 家族^[16];在一个晒盐场土壤宏基因组文库中筛选到的一种属于第 IV 家族 (HSL) 的新型酯酶 EstSP,但该酶具有独特的 GDSGG 保守区域,这有别于之前在 HSL 酯酶家族中所发现的 GDSAG 和 GTSAG 保守区域^[17]。

宏基因组学研究针对全部基因组序列,但是在基因组中存在大量非编码序列,这些序列的存在干扰了功能序列的研究,使宏基因组学仅适用于基因组较小的原核生物中。宏转录组学 (Metatranscriptomics) 是在宏基因组学基础上发展起来的一项新技术,其以特定环境、特定时期所有生物转录的全部 RNA 为研究对象。该技术可以直接通过微生物 mRNA 反转录获得 cDNA,避免了真核微生物基因组中内含子的影响,将基因筛选范围从原核微生物扩展到了真核微生物^[18]。KELLNER 等^[19]提取、纯化了森林土壤的总 RNA,并以其为模板合成 cDNA,经 *Sfi* I 酶切后的 cDNA 片段与 pTEF-MF 酵母表达载体相连接,再转化到大肠杆菌中,构建了宏转录组文库;并利用 *Saccharomyces cerevisiae* 磷酸酶突变体从文库中筛选到了新型酸性磷酸酯酶。TAKASAKI 等^[20]采用类似方法构建了森林土壤宏转录组文库,通过序列和功能筛选相结合的方法从中获得 129 个糖水解酶类序列,并且这些序列大多来源于真核微生物。随着 RNA 提取、纯化技术的不断进步,宏转录组技术在新酶开发中的应用也将越加深入。

2 酯酶在食品工业中的应用研究

2.1 酯酶在食品加工中的应用

2.1.1 乳制品加工中的应用

酯酶在乳制品增香、脱脂或奶味香精加工方面极具应用潜力,在加工中使用可改善产品的口感、风味和品质。酸热脂环酸杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) 的高温酯酶 EST2 能高效合成短链脂肪酸,将其用于干酪加工可合成风味物质己酸乙酯,而未添加 EST2 酯酶的对照组中则未检测到该成分^[21];脂肪酶

同样可以通过水解牛奶中的短链脂肪丁酸和己酸生成芳香成分,提高牛奶感官品质^[22]。此外,乳制品经酯酶水解处理后可制得富含中、短碳链脂肪酸,奶油香气自然、柔和,风味接近于奶酪的天然奶味香精。Novozyme Palatase 20000L、Lipozyme-435、Novozyme-435 等脂肪酶通过水解牛奶或稀奶油,均可制得奶香浓郁、纯正的酶解产物^[23-24]。

但以单一酯酶催化制备奶味香精,其产物成分分布较窄、风味单调、易存在不良后味,难以获得高品质的产品。为进一步提高奶味香精品质,研究人员尝试将多种酯酶复合用于奶味香精制备。以 Palatase 20000L 和 Lipase MER 组成的复合酶体系酶解处理黄油制得的酶解产物含有中、短链脂肪酸、酮类、酯类等 11 种成分,具有纯正的奶油香气,且口感更加饱满、风味浓郁、无不良后味^[25];先以脂肪酶 A12 和脂肪酶 MER 复合处理黄油,再加入蛋白酶酶解后制得天然奶酪味香基,具有典型奶酪香气,并且味道厚重、柔和,留香时间更长^[26]。

上述商业化酯酶作用温度一般在 45 ~ 80 ℃ 之间,较高的温度易导致乳制品水解产生的热敏性香味成分在加工过程中挥发或氧化变性,影响产品风味。解决上述问题最直接的方法就是降低生产温度,因此研究人员尝试将低温酯酶用于乳品加工。以酯酶 restTB11 在 25 ℃ 下酶解处理稀奶油,所得酶解产物相较 Palatase 20 000L 产物,风味化合物种类更丰富,相对含量更高,酸味较少,奶香更加浓郁^[3],由此证明低温酯酶是乳制品加工行业的潜力工业酶。

2.1.2 油脂加工中的应用

油脂是食物的重要组成成分,油脂中脂肪酸主链的长度、饱和度、支链数及脂肪酸的位置决定着油脂的营养价值、感官价值、商品价值。酯酶可通过改变脂肪酸链中甘油醛的位置,实现油脂的增值加工。代可可脂作为可可脂替代品工业需求量大,具有较高商品价值。其可通过一种或多种低价油脂经酯交换反应制得,如以价格低廉的棕榈油中间分提物为原料,经 LipozymeTM 酶催化可制备代可可脂^[27];而以棕榈油中间分提物与菜籽油混合物为原料,经 Lipozyme RM IM 脂肪酶催化制备的代可可脂中富含 omega-3 和 omega-6,特性与可可脂相近^[28]。

以酯酶处理肉制品可以催化肉类中脂肪水解,实现肉制品降脂、脱脂,从而降低心血管疾病、糖尿病的致病风险。来源于植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 的脂肪酶可在 72 h 内将鸡肉脂肪降解为短链醛

类或酮类物质,从而降低肉制品中脂肪含量^[29]。酯酶处理肉制品还可以提高产品感官品质,以 1.50% 用量 Yiming 脂肪酶在 50 ℃、pH 8 下水解处理浓度为 55% 的猪油 2.5 h,1.25% 用量 Novozymes 脂肪酶在 55 ℃、pH 8 下水解处理浓度为 55% 的猪油 4.0 h,1.00% 用量 Amano 脂肪酶在 pH 6、45 ℃ 下水解处理浓度为 50% 的猪油 2.5 h,所得水解产物中游离脂肪酸含量较对照组分别高出 89.40%、85.80% 和 89.92%。油酸、反油酸、十七碳烯酸等多种脂肪酸为猪肉挥发性芳香物质的前体,大量脂肪酸的产生有助于增加猪肉的特征性香味及促进香气的释放^[30]。

酯酶在油脂工业中的另一重要用途是水解油脂制备游离脂肪酸,如米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 中的 rProROL 脂肪酶可水解大豆油获得甘油二酯^[31]。但单一酶水解油脂效率普遍低于复合酶,Novozym 435、Lipozyme TL-IM 和 Lipozyme RM-IM 等单一商品酶对大豆油水解率均低于 50%,但将 80% Lipozyme RM-IM 与 20% Novozym 435 配合使用水解率可达 80% 以上^[32];对来源于黑曲霉的 4 种脂肪酶的活性研究也同样证实复合酶对大豆油的水解率更高^[33]。

2.1.3 酒类生产中的应用

酯类物质是酒中的主要芳香组分,其产生与酯酶的释放有关,酯酶能促进酯类合成,调控酯类和游离酸之间的平衡,影响酒的特征香气。传统生产中酯类物质合成反应过程非常缓慢,需要长期窖藏才能完成。为快速提升酒中酯类物质含量,生产厂家常以富含酯类物质的酯化液勾兑酒液或在发酵过程中添加酯酶制剂或产酯酶微生物^[34]。

浓香型白酒可以利用酯化液进行勾兑来提高酒体中总酯含量,增加酒香和风味。酯化液是通过酯化反应将有机酸、醇等成分转化为类似白酒香味成分的混合液。以己酸和乙醇混合液为原料,添加脂肪酶仅经过 7 d 的反应即可获得富含己酸乙酯的酯化液,大大缩短了酯类物质合成时间^[35]。更加经济的方式是以产酯酶红曲霉处理白酒酿造中的副产物生产酯化液。酿酒尾水是白酒液态发酵主要副产物,将其与乙醇、己酸混合,经红曲霉发酵可制得总酯含量 137.01 mg/100 mL,其中己酸乙酯含量 222.71 mg/L,乳酸乙酯含量 74.61 mg/L 的酯化液^[36]。黄水是白酒固态发酵的主要副产物,以其为原料添加红曲发酵,在最佳条件下总酯的含量为 0.63 g/100 mL,其中己酸乙酯和乳酸乙酯的相对百分含量最高可达 42.70%^[37]。以上述酯化液进行浓香型白酒的勾兑,可达到提高酒

质和生产效率的双重目的。

酒类生产中所用酶制剂主要包括脂肪酶、磷酸酯酶、酯合成酶、酯分解酶等。传统生产中的酯酶均由酿造微生物分泌产生,在葡萄酒苹果酸-乳酸发酵时期,酿酒酵母及乳酸菌所产酯化酶能够提高或降低酒中各种酯类物质的含量,对酒香的形成具有重要意义^[38]。在现代生产中可通过添加酯化酶制剂或分离纯化产酯化酶微生物来提高其含量。红曲霉酯化酶制剂可提升浓香型白酒中己酸乙酯含量,提高己酸乙酯与乳酸乙酯比例^[39];来源于酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*)的酯酶 EstA7 可将葡萄酒中乙酸己酯的含量提高 22.7%^[38]。筛选自青酒大曲的紫色红曲霉 FBKL3.0018 具有较强酯化能力,以其生产的高酯化大曲用于浓香型白酒的生产可减少用曲量,加快酒酯酯化速度,提高成酒中总酸、总酯含量,出酒率及优质品率分别提高了 0.7% 和 10.8%^[40]。一株从海泥中筛选到的产酯酶枯草芽孢杆菌,将其粗酶制剂用于无窖泥酿造浓香型白酒,成酒中己酸乙酯可达 2 236.13 mg/L^[41]。

2.2 酯酶在食品农残检测中的应用

除了在食品加工领域的应用,酯酶还可用于食品安全监测。在农产品生产过程中通常会施用农药,大多数农药难以完全降解会直接或间接地残留于农产品中,通过生物链的富集最终进入人体,对人体健康造成损害。其中有机磷农药作为使用最广泛、毒性最强的农药,极大影响了食用农产品的安全性^[42]。目前,气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、超临界流体色谱法(SFC)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)等都可对农药残留进行高灵敏度和高精确度的检测,但由于所用仪器设备昂贵、耗时较长和专业性强等因素难以实现农产品原位实时快速检测。

近年来,生物传感器快速检测技术因易操作、成本低、能快速原位检测而被广泛研究及应用于食品(农产品)农残检测中。目前发展最为成熟的生物传感器是以乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)构建的电流型生物传感器。AChE 能催化底物乙酰胆碱水解产生胆碱和乙酸等具有电活性的物质,而有机磷农药可以抑制乙酰胆碱酯酶的催化活性,降低电活性的物质质量,使电流检测信号减弱。利用这一反应,可以建立酶活性抑制率与有机磷农药的线性关系,从而定量检测食品中农残含量^[43]。目前所构建的乙酰胆碱酯酶生物传感器已在多种食品农残检测

中成功应用,以 Pt/ZnO/AChE 为电极的生物传感器检测到苹果中克菌丹残留量,检测范围在 0.05 ~ 25.0 $\mu\text{mol/L}$,检测限为 107 nmol/L,重复率可达 98.4% ~ 102.4%^[44];改进后的 Pt/ZnO/AChE/壳聚糖生物传感器检测到了大米中丁硫克百威残留量,并将检测灵敏度降低到纳米级别,检测范围在 5 ~ 30 nmol/L,检测限为 0.24 nmol/L,重复率为 99.06% ~ 100.96%^[45]。利用构建的玻璃碳/石墨烯/AChE 生物传感器对西红柿样品中的胺甲萘残留进行定量检测,检测值为 $(0.47 \pm 0.04) \mu\text{mol/L}$ ^[46],AChE 生物传感器对农药残留普遍具有较高的检测灵敏度。以上生物传感器是基于对 AChE 的抑制作用而实现对农药残留量的检测,但 AChE 蛋白质的低稳定性及对金属、有机溶剂的敏感性导致其使用受到限制。为提高生物感应器稳定性,JANIS 等^[47]以具有高稳定性可适应不同 pH 值和温度、对低浓度有机溶剂和洗涤剂具有耐受性的羧酸酯酶 EST2 构建生物传感器,并将其用于果汁、酒及水中农残的定性、定量检测,质谱检测证实该生物传感器检测结果可靠。

3 展望

对酯酶的研究一直是生物催化领域的重点,新型酯酶或酯酶家族不断地被发现,但是目前真正投入工业化应用的酯酶种类较少,且以中温性酯酶为主。许多具有独特催化特性,温度、有机溶剂、高盐环境耐受性的高温和低温酯酶由于产量低、成本高、酶学特性不能完全满足工业生产需求,未成功应用于工业生产中。从自然环境中挖掘适用于工业生产的新型酯酶,丰富酯酶资源及酶学信息,扩展其在食品工业领域应用仍是将来的研究重点。

参 考 文 献

- [1] CHANGW L, SENA K, SUN-HA P, et al. Crystal structure and functional characterization of an esterase (EaEST) from *Exiguobacterium antarcticum* [J]. PLoS One, 2017, 12 (1). Doi:10.1371/journal.pone.0169540.
- [2] WHITAKER J R, VORAGEN A G J, WONG D W S. Handbook of food enzymology [M]. Raton: CRC Press, 2003.
- [3] 董娟. 冰川低温酯酶产生菌的选育、基因克隆表达及在奶味香基制备中的应用 [D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [4] 柯蒙蒙. 适冷性酯酶基因的克隆、酶学性质和突变研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [5] TAO Wei, FENG Shengxue, MAO Duobin, et al. Characterization of a new thermophilic and acid tolerant esterase from *Thermotoga maritima* capable of hydrolytic resolution

- of racemic ketoprofen ethylester[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 85 – 86: 23 – 30.
- [6] GAO Renjun, FENG Yan, KAZUHIKO Ishikawa, et al. Cloning, purification and properties of a hyperthermophilic esterase from archaeon *Aeropyrum pernix* K1[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 24: 1 – 8.
- [7] YASMINE M M, MOHAMED A G, AHMED S, et al. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant, thermophilic esterase from a red sea brine pool[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 3358. Doi: 10.1038/srep03358.
- [8] HEDGE M K, GEHRING A M, ADKINS C T, et al. The structural basis for the narrow substrate specificity of an acetyl esterase from *Thermotoga maritima* [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2012, 1824(9): 1 024 – 1 030.
- [9] CONCETTA D S, HANNA-KIRSTI S L, ALESSIA D S, et al. Biochemical characterization and structural analysis of a new cold-active and salt-tolerant esterase from the marine bacterium *Thalassospira* sp. [J]. Extremophiles, 2016, 20: 323 – 336.
- [10] VINAYKUMAR D, CHANGWOO L, SEI-HEON J. Organic solvent-tolerant esterase from *Sphingomonas glacialis* based on amino acid composition analysis: Cloning and characterization of EstSP2[J]. Journal Microbiol Biotechnology, 2018, 28(9): 1 502 – 1 510.
- [11] MARÍA E, LAURA S, BLANCA D L R, et al. Characterisation of a cold-active and salt-tolerant esterase from *Lactobacillus plantarum* with potential application during cheese[J]. International Dairy Journal, 2014, 39: 312 – 315.
- [12] MADHAVAN A, SINDHU R, PARAMESWARAN B, et al. Metagenome Analysis: a Powerful Tool for Enzyme Bioprospecting[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 183(2): 636 – 651.
- [13] GU Xinqi, WANG Shilin, WANG Shaochen, et al. Identification and Characterization of Two Novel Esterases from a Metagenomic Library[J]. Food Science and Technology Research, 2015, 21(5): 649 – 657.
- [14] LEE H W, JUNG W K, KIM Y H, et al. Characterization of a Novel Alkaline Family VIII Esterase with S-Enantiomer Preference from a Compost Metagenomic Library [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(2): 315 – 325.
- [15] RAVI R, MANISH K Y, GARIMA S, et al. Discovery of a diverse set of esterases from hot spring microbial mat and sea sediment metagenomes [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119: 572 – 581.
- [16] KIM M K, TAE H K, JUNGHO K, et al. Cloning and identification of a new group esterase (Est5S) from non-cultured rumen bacterium[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(8): 44 – 53.
- [17] JAYANATH G, MOHANDAS S P, BHAVYA K, et al. A novel solvent tolerant esterase of GDSGG motif subfamily from solar saltern through metagenomic approach: Recombinant expression and characterization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119: 393 – 401.
- [18] GILBERT J, FIELD D, HUANG Y, et al. Detection of largenumbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities [J]. PLoS One, 2008, 3(8). Doi: 10.1371/journal.pone.0003042
- [19] HARALD K, PATRICIA L, DANIEL P, et al. Screening of a soil metatranscriptomic library by functional complementation of *Saccharomyces cerevisiae* mutants[J]. Microbiological Research, 2011, 166(5): 360 – 368.
- [20] KAZUTO T, MIURA T, MANABU K, et al. Discovery of glycoside hydrolase enzymes in an avicel-adapted forest soil fungal community by a metatranscriptomic approach [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55485. Doi: 10.1371/journal.pone.0055485.
- [21] LUIGI M, GIUSEPPE M, MOSE R. *Alicyclobacillus acidocaldarius* Thermophilic Esterase EST2's Activity in Milk and Cheese Models[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(5): 3 191 – 3 197.
- [22] IVAN K, SUSAN N M, HELEN L C, et al. The use of immobilised digestive lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) to generate flavour compounds in milk[J]. Food Chemistry, 2016, 199: 323 – 329.
- [23] 田怀香, 李凤华, 马霞. 天然奶味香精的酶解工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 120 – 124.
- [24] KHAMIS A O, MAHAMADOU E G, LIU R J, et al. Effects of microbial lipases on hydrolyzed milk fat at different time intervals in flavour development and oxidative stability[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 53(2): 1 035 – 1 046.
- [25] 周美玉, 傅亮. 复合酶酶解黄油制备天然奶油香精[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 183 – 187.
- [26] 陈萧萧, 杨东兰, 汪薇, 等. 酶法制备天然奶酪味香精的研究[J]. 食品工业, 2018, 39(4): 83 – 87.
- [27] DANIEL U, ANDRÉS M, SONIA E. Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil mid fraction[J]. Process Biochemistry, 2001, 36(10): 933 – 939.
- [28] REIZA M, DAYANG N A Z, IDA I M. Synthesis of cocoa butter equivalent from formulated hard palm oil mid-fraction and canola oil blends [J]. Advanced Materials Research, 2015, 1113: 453 – 458.
- [29] SITA R U, MAHESHAKULA, ANUPAMBHATTACHARYA, et al. Immobilized lipase from *Lactobacillus plantarum* in meat degradation and synthesis of flavor esters[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(2): 331 – 334.
- [30] SONG Shiqing, TANG Qi, FAN Li, et al. Identification of

- pork flavour precursors from enzyme-treated lard using Maillard model system assessed by GC-MS and partial least squares regression [J]. *Meat Science*, 2017, 124: 15–24.
- [31] LI D, QIN X, WANG J, et al. Hydrolysis of soybean oil to produce diacylglycerol by a lipase from *Rhizopus oryzae* [J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2015, 115: 43–50.
- [32] ALVES J, VIEIRA N, CUNHA A, et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts [J]. *Rsc Advances*, 2014, 4(14): 6 863–6 868.
- [33] QIAO H, ZHANG F, GUAN W, et al. Optimisation of combi-lipases from *Aspergillus niger* for the synergistic and efficient hydrolysis of soybean oil [J]. *Animal Science Journal*, 2017, 88(5): 772–780.
- [34] 李婷. 川南白酒窖池中产酯酵母的筛选及其葡萄酒增香酿造的潜力分析 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017.
- [35] 王晓丹, 胡靖, 胥思霞, 等. 合成己酸乙酯脂肪酶产生菌的产酶条件优化及其催化生产香酯液研究 [J]. *酿酒科技*, 2013(5): 11–13; 17.
- [36] 方春玉, 周健, 李智. 红曲霉发酵液酯化酿酒尾水制备酯化液的研究 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(13): 46–50.
- [37] 张立强, 崔瑞迎, 周荣清, 等. 赭皮红曲培养及酯化黄酒条件的优化 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(19): 171–176; 180.
- [38] DARSONVAL M, ALEXANDRE H, GRANDVALET C. Genetically engineered *Oenococcus oeni* strains to highlight the impact of estA2 and estA7 esterase genes on wine ester profile [J]. *Food Microbiology*, 2016, 60: 21–28.
- [39] 王晓丹, 胥思霞, 班世栋, 等. 红曲酯化酶粗酶制剂在浓香型青酒大曲酒生产中的应用研究 [J]. *酿酒科技*, 2014(7): 57–60.
- [40] 罗小叶, 胥思霞, 邱树毅, 等. 高酯化大曲催化增香技术在浓香型白酒生产上的应用 [J]. *中国酿造*, 2018, 37(10): 141–144.
- [41] 梁龙元. 芽孢杆菌酯酶催化性质及无窖泥酯化工艺研究 [D]. 武汉: 湖北工业大学, 2018.
- [42] 包静. 基于植物酯酶与有机磷水解酶的农药残留电化学传感器研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
- [43] GULER M, TURKOGLU V, KIVRAK A. Electrochemical detection of malathion pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on glassy carbon electrode modified with conducting polymer film [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23: 12 343–12 351.
- [44] NOEL N, SWAMINATHAN S, UMA M K, et al. Cyclic voltametric acetylcholine-esterase biosensor for the detection of captan in apple samples with the aid of chemometrics [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(16): 4 863–4 868.
- [45] NOEL N, SWAMINATHAN S, UMA M K, et al. Electrochemical acetylcholinesterase biosensor based on ZnO nanocuboids modified platinum electrode for the detection of carbosulfan in rice [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 77: 1 070–1 077.
- [46] MARTIN K L, DA S H C, VANZELA L M D, et al. Determination of carbamate pesticide in food using a biosensor based on reduced graphene oxide and acetylcholinesterase enzyme [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 277: 555–561.
- [47] RUSKO J, FEBBRAIO F. Development of an automated multienzymatic biosensor for risk assessment of pesticide contamination in water and food [J]. *EFSA Journal*, 2018, 16. Doi: 10.2903/j.efsa.2018.e16084.

Exploitation and application of microbial esterases in food industries

BI Wenhui¹, GUI Lun², YAO Jian^{2*}

1 (College of Food Science and Engineering Shandong Agriculture and Engineering University, Jinan 250100, China)

2 (Inst. of Agric. Appl. Microbiol., Jiangxi Acad. of Agric. Sci., Nanchang 330200, China)

ABSTRACT Microbial esterases are a kind of industrial enzyme that has been widely used in food industries, and it is important and beneficial for food industries to exploit and apply. Using technologies, such as isolation and purification, metagenome, metatranscriptomics, to find thermophilic esterases and psychrophilic esterases that are thermostable and tolerant to chemicals and low temperature can enrich the enzymatic knowledge and expand the variety. It has been found that applying various esterases in food production and food pesticide residue detection enhances the productivity, product quality and ensures food safety. This review summarized the state of art in exploiting novel esterases, applications in food production and pesticide residue detection in order to provide a reference for their development and industrial scale applications.

Key words thermophilic esterase; psychrophilic esterase; meta-omics; food production; pesticide residue detection