

## *Trichoderma lentiforme* ACCC30425 脂肪酶基因的原核表达及其酶学性质的初步研究

王宇洲<sup>1</sup>, 马锐<sup>2</sup>, 向杰<sup>1</sup>, 陈敬师<sup>1</sup>, 李世贵<sup>1</sup>, 龚明波<sup>1</sup>, 顾金刚<sup>1\*</sup>

1. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业农村部农业微生物资源收集保藏重点实验室, 北京 100081;

2. 中国农业科学院饲料研究所, 农业农村部饲料生物技术重点实验室, 北京 100081

**摘要:** 基于在 *Trichoderma lentiforme* ACCC30425 全基因组序列注释的 15 个脂肪酶基因, 进行脂肪酶基因合成与 *Escherichia coli* BL21 异源表达, 获得 11 个产脂肪酶阳性克隆, 其中酶活力最高为 1.5 U/mL。经初步酶学分析, 结果表明重组表达脂肪酶普遍具有耐热性、耐碱性的特征, 最适温度范围为 50~90℃, 最适 pH 范围为 8.5~9.5。其中, LipP 最适温度为 90℃, 远高于目前已知脂肪酶的最适温度; LipQ 最适温度为 50℃, 最接近洗涤工业的中温温度; 其他脂肪酶最适温度为 70℃ 或 80℃, 均属耐热脂肪酶。

**关键词:** 木霉; 脂肪酶; 原核表达; 耐热性

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2018.0039

## Prokaryotic Expression of Recombinant Lipases Gene from *Trichoderma lentiforme* ACCC30425 and Preliminary Study of its Enzymatic Properties

WANG Yuzhou<sup>1</sup>, MA Rui<sup>2</sup>, XIANG Jie<sup>1</sup>, CHEN Jingshi<sup>1</sup>, LI Shigui<sup>1</sup>, GONG Mingbo<sup>1</sup>, GU Jingang<sup>1\*</sup>

1. Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Key Laboratory of Feed Biotechnology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** According to the genome analysis of *Trichoderma lentiforme* ACCC30425, the coding sequences of 15 lipase genes were annotated, and then used for gene synthesis and heterologous expression in *Escherichia coli* BL21. 11 lipase-producing clones were obtained, and the highest lipase activity was up to 1.5 U/mL. Results of preliminary enzymatic analysis indicated that the recombinant lipases had the characteristics of heat resistance and alkali resistance universally, showing optimal activities at 50~90℃ and pH 8.5~9.5. Among them, the optimum temperature of LipP was 90℃, which was much higher than all known counterparts, and LipQ showed optimal activity at 50℃, which was close to the intermediate temperature of detergent industry. And other lipases were also thermostable lipase, showing optimal activities at 70℃ or 80℃.

**Key words:** *Trichoderma*; lipase; prokaryotic expression; heat resistance

脂肪酶(EC 3.1.1.3)被认为是最重要的商业酶之一,可在油水界面上催化甘油三酯水解释放甘油二酯、长链脂肪酸(>8 碳)和甘油<sup>[1]</sup>。在水解过程中,脂肪酶与甘油酰基结合形成脂肪酶酰

基复合物,然后将酰基转移到水的-OH 上;而在非水性催化条件下,脂肪酶将羧酸酰基转移至亲核化合物上<sup>[2]</sup>。根据蛋白质结构的相似性,脂肪酶属于 $\alpha/\beta$ 水解酶家族,其中催化三联体(通常

收稿日期:2018-03-22; 接受日期:2018-04-17

基金项目:国家科技基础性工作专项资金项目(2014FY120900);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(IARRP-2015-24; 1610132016050)资助。

作者简介:王宇洲,硕士研究生,研究方向为农业微生物资源与基因工程。E-mail:bitwyz92@163.com。\* 通信作者:顾金刚,副研究员,硕士生导师,研究方向为农业微生物资源的应用研究。E-mail:gujingang@caas.cn

为丝氨酸、组氨酸、谷氨酸或天冬氨酸)和氧离子空穴是催化反应的关键<sup>[3]</sup>,此外,盖子结构、底物亲和性也与活性位点的结合能力有着紧密关系。

脂肪酶广泛存在于微生物、植物和动物中,其中,细菌脂肪酶、真菌脂肪酶因具有产量高、易操作等特点,一直是研究和应用的重点。研究表明,细菌和酵母来源的脂肪酶可在高温下保持较高的酶活力,如来源于 *Pseudomonas aeruginosa*、嗜热芽孢杆菌 (*Bacillus thermophilus*) 和酵母 (*Kurtzmanomyces* sp.) 的脂肪酶,最适温度在 60~75℃<sup>[4,5]</sup>。

木霉 (*Trichoderma*) 具有显著的木质纤维素降解能力,能产生多种水解酶、裂解酶和辅助酶,包括纤维素酶、木聚糖酶、几丁质酶、漆酶、脂肪酶等<sup>[6]</sup>,而且木霉是酶制剂产业的重要表达系统之一<sup>[7]</sup>。目前,已完成了 13 株木霉菌株的基因组测序<sup>[8,9]</sup>,其中绿色木霉<sup>[10]</sup>、里氏木霉<sup>[11]</sup>、哈茨木霉<sup>[12]</sup>和 *T. gamsii*<sup>[13]</sup> 的基因组序列分析结果表明,木霉普遍具有多个脂肪酶基因<sup>[14]</sup>。本课题组在前期研究中筛选获得了 1 株脂肪酶酶活力较高的木霉菌株 *T. lentiforme* ACCC30425<sup>[15]</sup>,本研究依据该菌株的全基因组测序结果,注释了 15 个脂肪酶基因,以此进行基因合成和原核异源表达,并对脂肪酶的酶学性质进行初步研究,以期耐热脂肪酶的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

大肠杆菌感受态细胞 *Escherichia coli* TransI 和 BL21(DE3) 均购自北京全式金生物技术有限公司;质粒 pET-30a(+) 载体购于美国 Invitrogen 公司。

### 1.2 溶剂和底物配制

异丙基硫代  $\beta$ -D-半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、硫酸卡那霉素、LB 培养基等配制方法均参考孙乔乔等<sup>[16]</sup>的配方。

底物配制:A液:取固体对硝基苯酚棕榈酸酯 (p-nitrophenylpalmitate, pNPP) 8 mmol 溶于 10 mL 异丙醇中,温热溶解,于 4℃ 保存,有效期为 1 周;B液:用蒸馏水配制 20 mmol/L Tris,加 0.22 g 阿拉伯胶,用盐酸调至 pH 8(视具体情况而定),于 4℃ 保存,有效期为 1 周。按照 1:9 的比例混合 A 液和 B 液,制成底物溶液。

### 1.3 脂肪酶基因分析

利用 KOG/KEGG/GO 数据库对全基因组测序结果进行注释,获得脂肪酶基因。再利用 Vector NTI 10 软件(美国 Invitrogen 公司)对 cDNA 序列进行翻译并获得推导氨基酸序列,分析等电点和蛋白质分子量,然后利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 线上软件预测信号肽长度,最后利用 BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析序列相似性。同时,利用 Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 完成预测脂肪酶的同源建模以及与 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中序列的比对,并采用 MEGA 6 和 ClustalX 1.81 构建系统发育树,进行蛋白质聚类分析。

### 1.4 脂肪酶基因合成与原核表达

根据 ACCC30425 全基因组序列,经数据库注释获得了 15 个脂肪酶基因 cDNA,以此为基础,手动删除信号肽,选择合适酶切位点,删除原有终止密码子,将所需合成的成熟肽链的 DNA 序列信息交至上海捷瑞生物工程有限公司,以合成密码子优化的适合原核表达的核苷酸序列。对合成产物以及 pET30a(+) 质粒进行 *EcoR* I 与 *Xho* I 双酶切后,使用 T4 DNA 连接酶进行连接(20℃ 过夜)。将连接产物 pET30a(+)-*lip* 热激转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中,获得 pET30a(+)-*lip*-BL21,挑单菌落验证阳性克隆。再利用 IPTG 诱导菌株表达,并通过超声波破碎获得脂肪酶粗酶液<sup>[16]</sup>。

### 1.5 重组脂肪酶的酶学性质分析

**1.5.1 pNPP 法测定脂肪酶酶活力** 按照 pNPP 法测定脂肪酶酶活力,于 37℃ 反应 15 min 后,加入 2 mL 无水乙醇终止反应,随后 12 000 r/min 离心 2 min 取上清液,于 410 nm 处测定吸光度(OD 值),进而计算重组脂肪酶的活性<sup>[15]</sup>。1 个脂肪酶活性单位(U)定义为在一定的反应条件下,每分钟分解 pNPP 生成 1  $\mu$ mol 对硝基酚(p-Nitrophenol, pNP)所需的脂肪酶酶量<sup>[16]</sup>。

**1.5.2 酶学性质分析** 酶活粗筛:按照 1.5.1 分别测定重组酶酶活力。

最适反应 pH:保持 A 液不变,用不同 pH (7.0、8.0、8.5、9.0、9.5 和 10.0) 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液配制 B 液。其他步骤同 1.5.1。

最适反应温度:在酶的最适 pH 条件下,于不同温度(40℃、50℃、60℃、65℃、70℃、80℃、90℃和95℃)中测定酶活力。其他步骤同 1.5.1。

## 2 结果与分析

### 2.1 脂肪酶基因分析

经 *T. lentiforme* ACCC30425 基因组序列分析,共注释获得 15 个脂肪酶编码基因(表 1)。Vector NTI 10 软件分析结果表明菌株 ACCC30425 的脂肪酶分子量在 55~70 kDa 之间,其中 ACCC30425\_8519 基因编码的脂肪酶分子量最大,高达 68.8 kDa,而 ACCC30425\_5744 编码的脂肪酶分子量最小。脂肪酶的等电点处于 4.0~6.0 之间。SignalP 线上软件确定所有脂肪酶均为胞外分泌。

基于 Swissprot 数据库的 Blast 比对,有 11 个脂肪酶与已知序列的相似性低于 50%,其中有 5 个低于 40%;而于 PDB 数据库中序列比对,有 10 个脂肪酶与已知序列的相似性低于 40%,其中有 3 个低于 30%。结合 2 个数据库的比对结果,有 5

个脂肪酶基因(表 1 中下划线标注)在酶学性质和结构比方面都具有一定的新颖性。

### 2.2 *T. lentiforme* ACCC30425 脂肪酶的聚类分析

将 *T. lentiforme* ACCC30425 的 15 个脂肪酶基因与相似序列以最大相似法构建聚类关系树(图 1)。结果表明,菌株 ACCC30425 的脂肪酶与哈茨木霉(*T. harzianum*)和贵州木霉(*T. guizhouense*)来源的脂肪酶的同源性更高,其中脂肪酶 ACCC30425\_2714 更接近于 *T. lixii* 来源的脂肪酶。

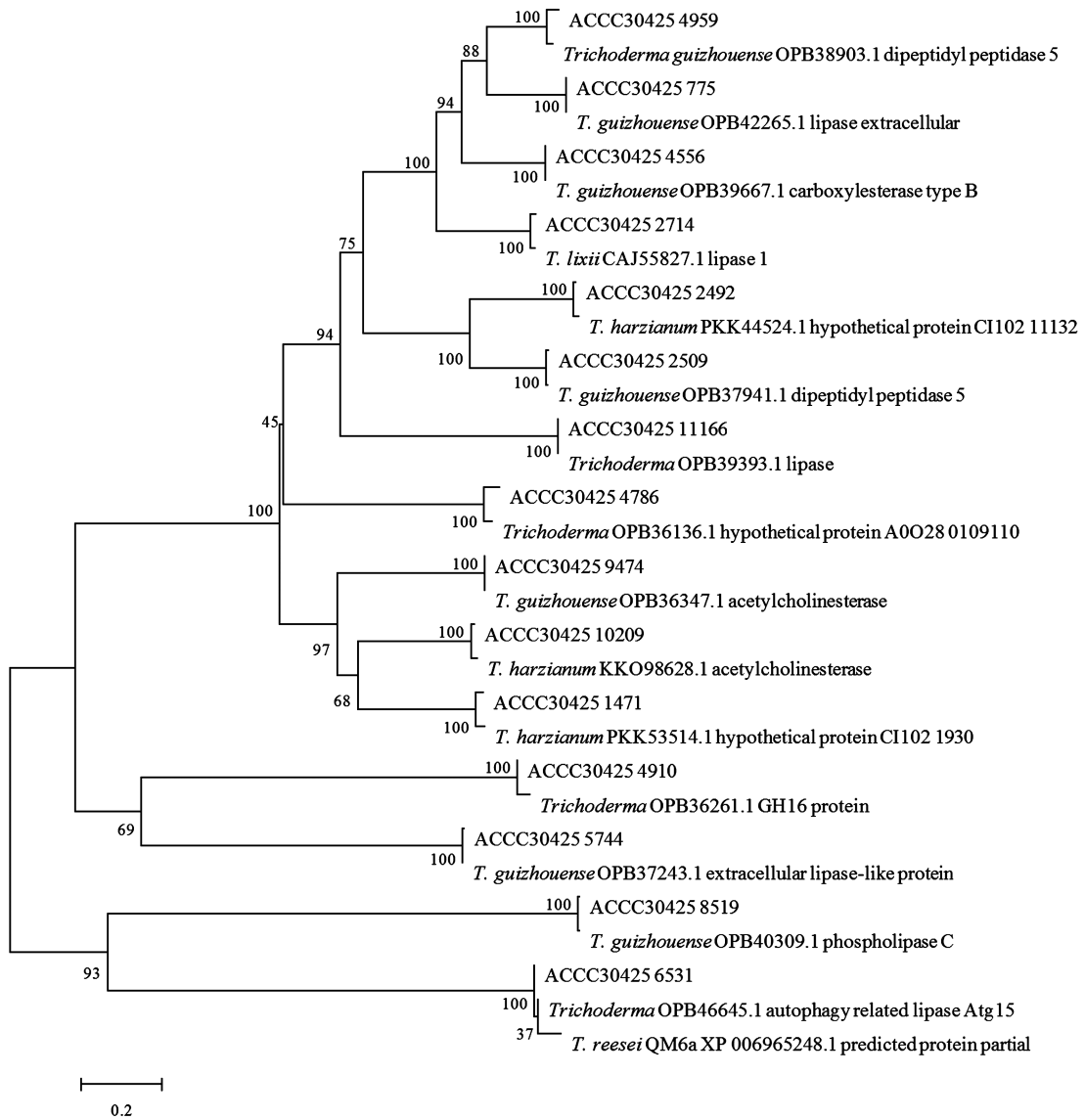
### 2.3 *T. lentiforme* ACCC30425 重组脂肪酶的酶学性质分析

*T. lentiforme* ACCC30425 的 15 个脂肪酶基因经密码子优化后分别与载体 pET30a(+) 连接以构建重组质粒,并在 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中表达。

**2.3.1 脂肪酶酶活力筛选** 按照 1.5.1 测定重组脂肪酶酶活力,结果表明,共有 11 个阳性克隆产脂肪酶,分别为 LipA、LipB、LipC、LipD、LipH、LipI、LipK、LipL、LipM、LipP、LipQ,具体酶活力见

表 1 *Trichoderma lentiforme* ACCC30425 的脂肪酶基因分析  
Table 1 Analysis of the lipase genes from *Trichoderma lentiforme* ACCC30425.

脂肪酶基因编号	脂肪酶	cDNA (bp)	信号肽 (aa)	成熟肽 (aa)	蛋白质分子量 (kDa)	等电点	序列相似性(%)	
							Swissprot	PDB
ACCC30425_11166	LipA	1 728	19	557	60.5	5.15	50	36
ACCC30425_10209	LipB	1 668	18	538	58.5	5.70	41	32
<u>ACCC30425_4786</u>	LipC	1 701	17	550	60.7	6.19	28	29
<u>ACCC30425_2492</u>	LipD	1 704	22	546	60.4	5.30	35	32
<u>ACCC30425_2509</u>	LipE	1 713	25	546	59.6	6.03	34	33
ACCC30425_4959	LipF	1 707	19	550	59.7	4.58	50	50
ACCC30425_4910	LipG	1 359	19	434	45.9	4.44	53	31
ACCC30425_2714	LipH	1 317	23	416	44.1	4.51	61	57
ACCC30425_4556	LipI	1 713	19	552	60.0	5.29	54	57
ACCC30425_5744	LipJ	1 023	15	326	34.7	4.47	40	52
<u>ACCC30425_9474</u>	LipK	1 662	19	535	58.3	6.06	38	28
<u>ACCC30425_8519</u>	LipL	1 938	23	623	68.8	5.30	34	22
ACCC30425_6531	LipM	1 842	31	583	62.7	5.24	66	38
ACCC30425_1471	LipP	1 668	20	536	58.2	5.11	42	31
ACCC30425_775	LipQ	1 707	20	549	60.0	4.59	46	49



**图 1** *T. lentiforme* ACCC30425 脂肪酶的聚类分析  
**Fig.1** Cluster analysis of the lipases from *T. lentiforme* ACCC30425.

表 2。其中, LipP、LipK、LipH、LipM、LipQ、LipD 的酶活力均高于 0.1 U/mL, LipB 的酶活最低, 而其他 4 个克隆未产脂肪酶。

**2.3.2 最适反应 pH** 在 37°C、不同 pH 条件下测定 *T. lentiforme* ACCC30425 重组脂肪酶酶活力。如图 2 所示, LipB 最适 pH 为 8.5, LipA、LipH 最适 pH 为 9.0, 而 LipC、LipD、LipI、LipK、LipL、LipM、LipP 和 LipQ 的最适 pH 均为 9.5。当 pH < 8.5 时, LipL 失去活性; 当 pH > 10.0 时, LipA 和 LipB 的相对活性低于 60%; 而其他脂肪酶均保持着 60% 以上的相对活性。因此, *T. lentiforme* AC-

CC30425 脂肪酶普遍具有耐碱性, 即在碱性条件下可保持较高的酶活力。

**表 2** 重组脂肪酶活性  
**Table 2** Activities of recombinant lipases.

脂肪酶	酶活力 (U/mL)	脂肪酶	酶活力 (U/mL)
LipP	0.19	LipL	0.08
LipK	0.13	LipA	0.08
LipH	0.13	LipC	0.06
LipM	0.13	LipI	0.03
LipQ	0.13	LipB	0.01
LipD	0.10		

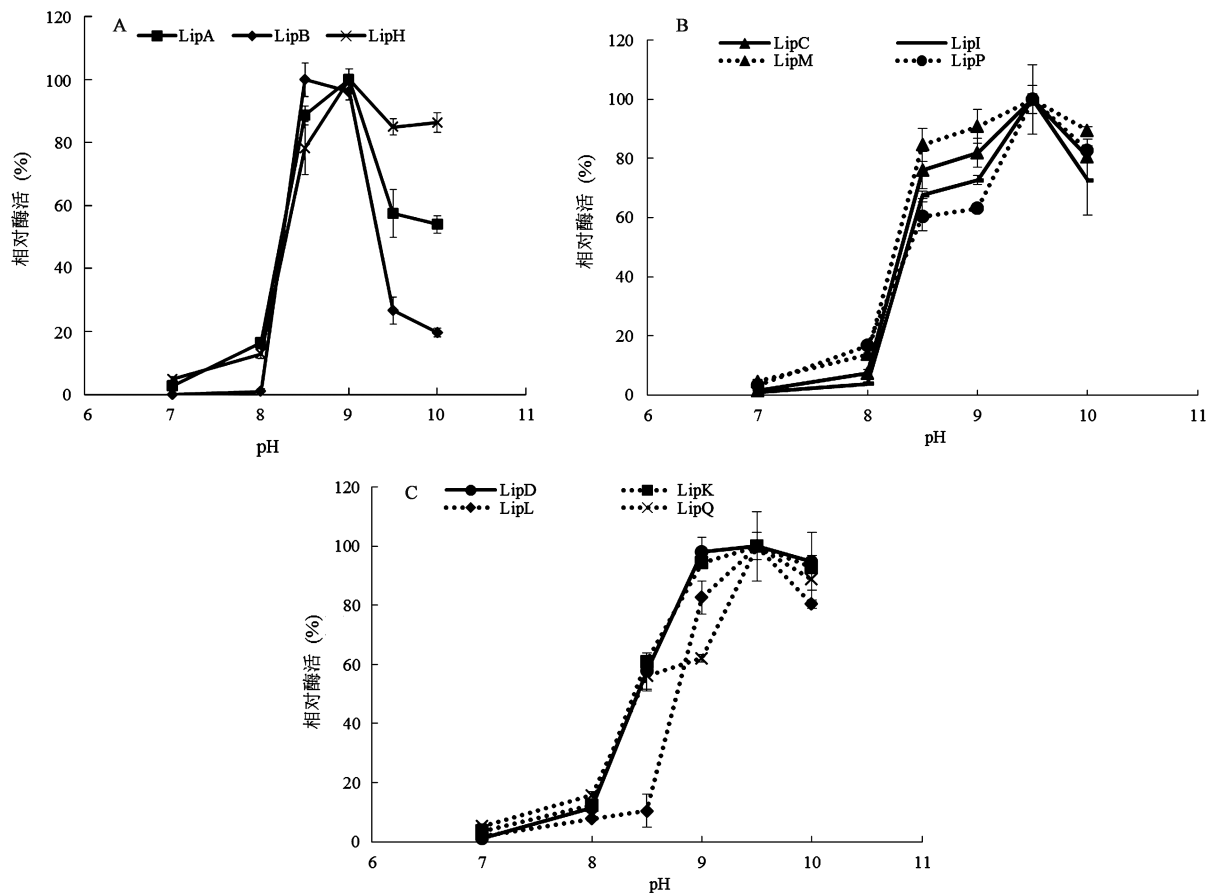


图2 pH对 *Trichoderma lentiforme* ACCC30425 重组脂肪酶酶活力的影响

Fig.2 Effect of pH on the activities of recombinant lipases from *Trichoderma lentiforme* ACCC30425.

A: 具有特性的酶 LipA、LipB、LipH; B: 性质相近的酶 LipC、LipI、LipM、LipP; C: 性质相近的酶 LipD、LipK、LipL、LipQ。

**2.3.3 最适反应温度** 在最适 pH、不同温度的条件下测定脂肪酶酶活力。结果如图 3 所示, LipQ 为中温酶, 最适温度为 50℃, 当温度高于 60℃ 时, 其酶活力急剧下降。其他脂肪酶均属高温脂肪酶, 最适温度在 70~90℃。其中, LipP 的最适温度为 90℃, 且在中温环境也保持 50% 以上的相对活性; LipA、LipL 的最适温度为 70℃; 而其他脂肪酶的最适温度均为 80℃。

**2.3.4 最适条件下测定酶活力** 如图 4 所示, 重组脂肪酶在最适条件下的酶活力, 相较于标准条件均有明显提高。如在标准条件下酶活力最低的 LipB, 在最适条件下其酶活力提高了 87 倍; LipP 酶活力仍为最高, 在最适条件下其酶活力提高了 8 倍, 高达 1.5 U/mL。最适温度为 80℃ 的脂肪酶在最适条件下的酶活力普遍在 0.8~1.2 U/mL 范围内。

### 3 讨论

筛选具有特殊性质的脂肪酶一直备受研究领域和工业应用领域的关注, 微生物来源的脂肪酶最适温度普遍在 30~50℃ 之间, 温度过高会导致脂肪酶结构变性至失活, 国内单志文等<sup>[17]</sup> 在 2001 年首次筛选到 1 个来源于 *Pseudomonas fragi* 的脂肪酶, 其最适温度为 65~70℃, 具有耐热性。

在实际应用中, 脂肪酶参与的工业催化反应过程大多需要较高的反应温度, 尤其是替代化石能源的生物柴油的生产工艺的研究。近年来, 人们一直在挖掘耐热以及超耐热酯酶/脂肪酶, 通常是先在热泉和笼屉等高温环境下筛选嗜热菌株, 再对嗜热微生物中的脂肪酶基因进行克隆、异源表达, 亦或构建突变体, 从而改良酶学性质, 如来自嗜热细菌<sup>[18]</sup>、短梗霉<sup>[19]</sup>、假单胞菌<sup>[20]</sup>、芽孢杆



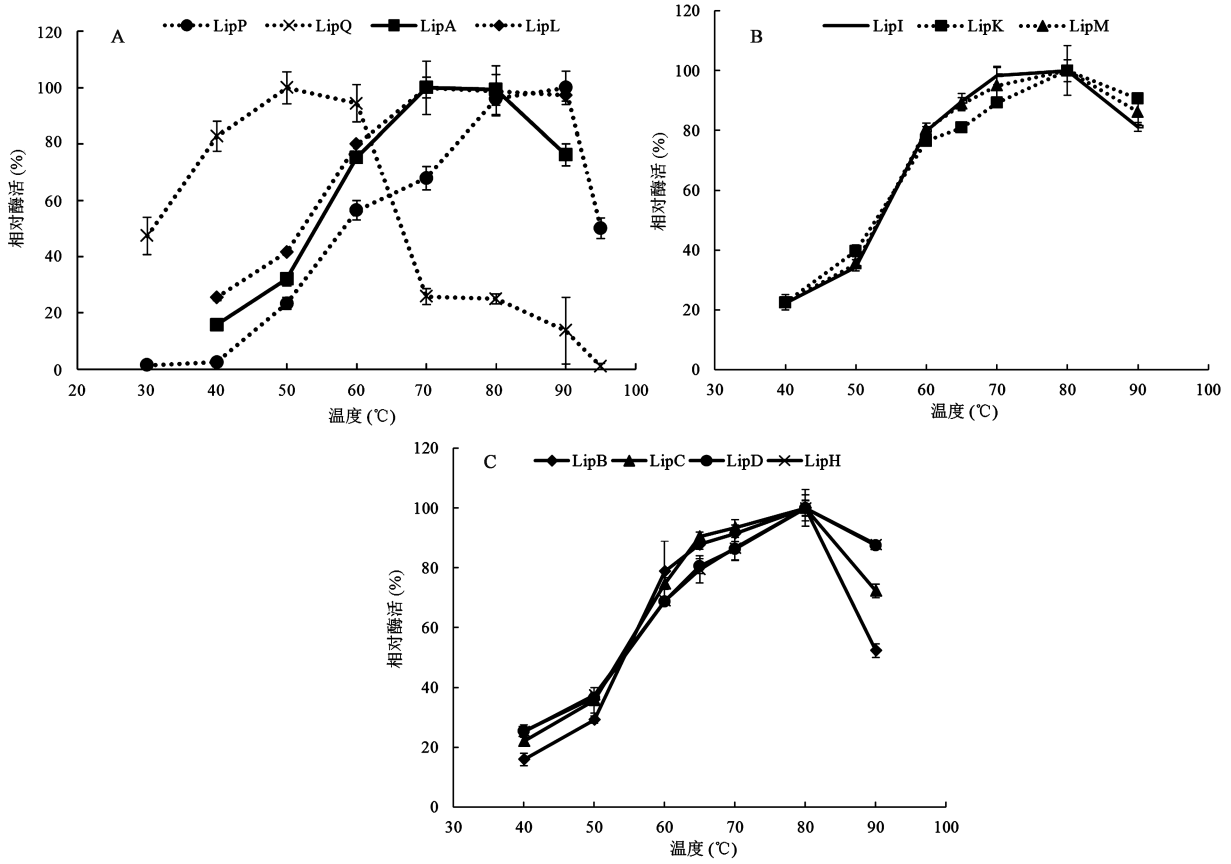


图3 温度对 *Trichoderma lentiforme* ACCC30425 的重组脂肪酶酶活力的影响

Fig.3 Effect of temperature on the activities of recombinant lipases from *Trichoderma lentiforme* ACCC30425.

A: 具有特性的酶 LipP、LipQ、LipA、LipL; B: 性质相近的酶 LipI、LipK、LipM; C: 性质相近的酶 LipB、LipC、LipD、LipH。

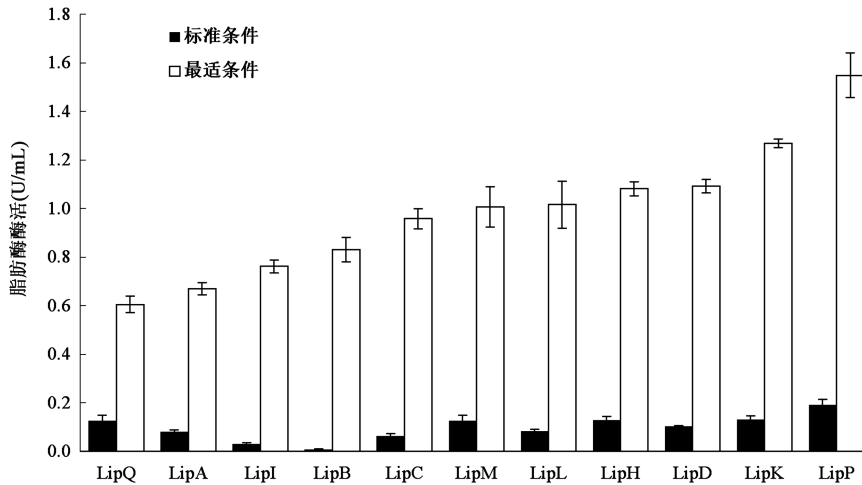


图4 脂肪酶在标准条件酶活和最适反应条件下的酶活力

Fig.4 The activities of lipases under standard and optimal reaction conditions.

菌<sup>[21,22]</sup>等嗜热微生物<sup>[23]</sup>的耐热酯酶/脂肪酶基因重组表达后的最适反应温度往往在 60~75°C, 此外,来自嗜热古细菌的酯酶<sup>[24]</sup>的最适反应温度

为 90°C,此为迄今国内发现的最适反应温度最高的酯酶,然而超耐热脂肪酶的研究近来鲜有报道。

本研究首次报道了基于基因组序列分析的木

霉 *Trichoderma lentiforme* 脂肪酶的系统研究,来源于 *T. lentiforme* ACCC30425 的脂肪酶 LipP 最适温度为 90℃,是目前已知的最适反应温度最高的脂肪酶。此外,本研究还发现了多个具有耐碱性 (pH 8.5~9.5)、耐热性 (70~90℃) 的脂肪酶,为脂肪酶的基础研究和潜在应用提供了宝贵的材料。这些性质各异的木霉脂肪酶具有很好的应用前景和开发潜能,需要通过更加高效的表达系统进行表达和纯化,以便在酶学的结构功能上进行更深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Brockerhoff H. Model of interaction of polar lipids, cholesterol, and proteins in biological membranes [J]. *Lipids*, 1974, 9(9): 645-650.
- [2] Kashmiri M A, Adnan A, Butt B W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride* [J]. *Afr. J. Biotechnol.*, 2006, 5(10): 878-882.
- [3] Gupta R, Kumari A, Syal P, et al.. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology [J]. *Prog. Lipid Res.*, 2015, 57: 40-54.
- [4] Kakugawa Y, Wada T, Yamaguchi K, et al.. Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99(16): 10718-10723.
- [5] Karadzic I, Masui A, Zivkovic L I, et al.. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid [J]. *J. Biosci. Bioeng.*, 2006, 102(2): 82-89.
- [6] Zhang X, Xia L. Expression of *Talaromyces thermophilus* lipase gene in *Trichoderma reesei* by homologous recombination at the *cbh1* locus [J]. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 2017, 44(3): 377-385.
- [7] Singh A, Taylor L E, Vander Wall T A, et al.. Heterologous protein expression in *Hypocrea jecorina*: A historical perspective and new developments [J]. *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33(1): 142-154.
- [8] Xie B B, Qin Q L, Shi M, et al.. Comparative genomics provide insights into evolution of *Trichoderma* nutrition style [J]. *Genome Biol. Evol.*, 2014, 6(2): 379-390.
- [9] Studholme D J, Harris B, Le Cocq K, et al.. Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture—insights from genomics [J]. *Front. Plant Sci.*, 2013, 4: 258.
- [10] Shi-Kunne X, Seidl M F, Faino L, et al.. Draft genome sequence of a strain of cosmopolitan fungus *Trichoderma atroviride* [J]. *Genome A.*, 2015, 3(3): e00287-15.
- [11] Martinez D, Berka R M, Henrissat B, et al.. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*) [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2008, 26(5): 553-560.
- [12] Baroncelli R, Piaggieschi G, Fiorini L, et al.. Draft whole-genome sequence of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T6776 [J]. *Genome A.*, 2015, 3(3): e00647-15.
- [13] Baroncelli R, Zapparata A, Piaggieschi G, et al.. Draft whole-genome sequence of *Trichoderma gamsii* T6085, a promising biocontrol agent of *Fusarium* head blight on wheat [J]. *Genome A.*, 2016, 4(1): e01747-15.
- [14] Yang D, Pomraning K, Kopchinskiy A, et al.. Genome sequence and annotation of *Trichoderma parareesei*, the ancestor of the cellulase producer *Trichoderma reesei* [J]. *Genome A.*, 2015, 3(4): e00885-15.
- [15] 隋聪颖. 产脂肪酶木霉的分离筛选鉴定及酶学性质研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 硕士学位论文, 2008.
- [16] 孙乔乔, 谭笑, 吕依, 等. 嗜热真菌 *Neosartorya fischeri* P1 脂肪酶基因的克隆、表达及酶学性质分析 [J]. *中国农业科技导报*, 2014, 16(5): 53-59.
- [17] 单志文, 王鲁, 周晓云. 脂肪酶基因表达、调控及其作用机制的研究进展 [J]. *国际遗传学杂志*, 2001, 24(3): 123-128.
- [18] 毛迪. 一种嗜热脂肪酶的表达、表征及机理研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 硕士学位论文, 2015.
- [19] 李杨, 蔡海莺, 赵敏洁, 等. 高产耐高温脂肪酶生产菌的筛选与鉴定 [J]. *生物技术通报*, 2015, 31(1): 144-150.
- [20] 蔡祥海. 嗜热脂肪酶/酯酶的酶库构建、性质表征及其催化应用研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 博士学位论文, 2017.
- [21] 刘秀萌. 热泉菌 *Bacillus* sp. BI-19 产耐高温脂肪酶的基因克隆及其酶学性质研究 [D]. 济南: 山东大学, 硕士学位论文, 2016.
- [22] 罗漫杰, 谢渊, 钱志刚, 等. 超嗜热酯酶 EST2 在不同宿主中的异源高效表达研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(12): 36-44.
- [23] 魏涛, 杨昆鹏, 郑未未, 等. *Thermoanaerobacter* sp. X514 嗜热脂肪酶 LipTX 的异源表达与酶学性质研究 [J]. *现代食品科技*, 2016, 32(11): 91-97.
- [24] 解桂秋, 高仁钧, 毕云枫, 等. 古细菌 *Aeropyrum pernix* K1 超嗜热酯酶 APE1547 的稳定性 [J]. *高等学校化学学报*, 2008, 29(1): 109-112.