

传统食品发酵环境宏基因组中酯酶基因的克隆、表达及性质分析

叶茂, 邓毛程, 刘慧平, 李静

(广东轻工职业技术学院食品与生物技术学院, 广东高校特色调味品工程技术开发中心, 广东广州 510300)

摘要: 微生物酯酶是一种广泛应用于食品、医药和精细化工等领域的工业化酶。为了丰富酯酶资源, 本文通过提取我国传统发酵食品环境样品总基因组 DNA, 构建宏基因组文库, 从中筛选获得一个新的酯酶基因 (*est_115*), 该基因全长 948 bp, 编码 316 个氨基酸, 其蛋白序列同源性分析, 表明与来自 *Pseudomonas lutea* 的羧酸酯水解酶同源性最高为 38%, 显示酯酶 Est_115 属于新的酯酶类。然后构建了 *est_115* 基因重组表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中获得表达, 经纯化得到重组酯酶 Est_115。酶学性质的分析表明, 该重组酯酶 Est_115 对酰基碳链较短的对硝基苯酚酯具有较高的催化活性, 最适作用温度为 35 °C, 最适 pH 值为 7.0, 在 10%~18% NaCl 条件下, 酶蛋白可保持较高的催化活性, 具有良好的耐盐性, 提示该酶可以应用在高渗透压食品加工中, 是一个新型的极具潜力的酯酶。

关键词: 传统食品; 宏基因组; 酯酶; 克隆; 性质

文章编号: 1673-9078(2017)8-66-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.011

Cloning, Expression, and Characterization of an Esterase Gene from Traditional Food Fermentation Environment Metagenomic DNA

YE Mao, DENG Mao-cheng, LIU Hui-ping, LI Jing

(Develop Center for Special Condiments Engineering & Technology of Guangdong Higher Education Institutes, School of Food and Biotechnology, Guangdong Industry Polytechnic College, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Microbial esterases play an important role in food, pharmaceutical, and fine chemicals industries. In order to enrich available esterase resources, metagenomic DNA was extracted from traditional food fermentation environment, and the metagenomic library was constructed. An esterase gene (*est_115*) was obtained after screening of the library; it contained 948 bp and encoded a protein of 316 amino acids (AA). Sequence homology analysis showed that its protein had the highest homology (38%) with the carboxylic-ester hydrolase from *Pseudomonas lutea*, indicating that esterase Est_115 was a new type of esterase. Subsequently, a recombinant expression vector containing the *est_115* gene was constructed and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3), and the recombinant esterase Est_115 was obtained after purification. Analysis of its enzymatic properties indicated that recombinant esterase Est_115 showed a relatively high catalytic activity on *p*-nitrophenyl esters with a short carbon chain on their acyl group, and the optimal temperature and pH value were 35°C and 7.0, respectively. Under conditions of 10~18% sodium chloride, the esterase could maintain a high catalytic activity, and showed good salt resistance, which suggested that this new type of esterase enzyme could be used in food processing using high osmotic pressure.

Key words: traditional food; metagenome; esterase; cloning; characterization

酯酶 (Esterases, EC 3.1.1.X) 是一种催化酯键水解和合成的酶的总称, 水解时催化酯键产生甘油和脂肪酸; 合成时, 把酸的羧基与醇的羟基脱水缩合, 产

收稿日期: 2016-12-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31500102); 广东轻工职业技术学院创新强校工程专项资金项目 (2A21005、1A20105、1A10605、2A10905、1A20201); 广东高校特色调味品工程技术开发中心建设项目 (GCZX-B1103)

作者简介: 叶茂 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

物为酯类及其他香味物质^[1]。酯酶是一类用途广泛的水解酶, 在食品加工及食品风味改良、油脂水解、皮革绢纺原料脱脂、废水处理、洗涤工业和医药行业等领域得到广泛的使用^[2]。宏基因组学 (Metagenomics) 是近年来随着微生物学和现代生命科学的迅猛发展兴起的一门新兴的科学技术。其基本研究思路是直接提取环境中所有微生物的基因组 DNA, 克隆到合适的载体, 构建宏基因组文库, 将环境中全部微生物的核酸信息收集在一起, 并运用序列筛选或功能筛选方式从

文库中获得有用的酶、抗生素和活性物质等^[3]。许多新型的生物催化剂已通过宏基因组文库技术成功筛选到,如酯酶、纤维素酶、木聚糖酶及 β -葡萄糖苷酶等生物催化剂,并且在此基础上获得了有关新酶的许多特征信息^[4]。

我国传统发酵食品生产历史悠久,风味独特,传统发酵食品独特的风味及品质与其复杂的微生物群落关系密切,因此蕴藏着丰富的微生物资源,随着传统发酵食品生产的现代化和产业化,传统发酵食品发酵环境中微生物资源的开发和应用成为研究的热点^[5]。目前,尚未见有从传统食品发酵环境宏基因组中克隆酯酶的报道。为此,本研究以我国传统食品发酵环境代表-高盐稀态发酵酱油为样本,构建宏基因组文库,通过功能筛选的方法从文库中筛选出新型酯酶基因进行克隆,并对其表达蛋白的酶学性质进行分析,为更好开发利用我国传统发酵食品发酵环境中微生物资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌宿主 E.coli DH5 α 和 BL21(DE3), 本实验室保存; 载体质粒 pUC118/BamHI(BAP) 购于 TaKaRa(大连); 表达载体 pET-32(+)-购于 Novagen(德国); 胶回收试剂盒、质粒提取购于 QIAGEN 公司(德国); 总 DNA 提取试剂盒购于 MP Biomedicals(美国); 各种限制性内切酶、T4 连接酶购于 TaKaRa(大连); 其它生化试剂均为进口分装, 购于北京普博生物科技有限公司。

样品于广东省某酱油厂的酱醪采集, 于 -80 °C 保存。

1.2 仪器与设备

ABI Veriti 梯度 PCR 仪美国 Applied Biosystems 9700 GeneAmp® 仪器; 超声波细胞破碎仪, 美国 Sonics 公司; UV-1700 pharmpespec 紫外-可见光分光光度计, 日本岛津公司; Eporator 电转化仪, 德国 Eppendorf 公司; Eppendorf 5418 离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 宏基因组 DNA 的提取及纯化

参见试剂盒说明书 Fast DNA®SPIN kit for soil(MP Biomedicals), 提取酱醪基因组 DNA, 然后用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.3.2 宏基因组文库的构建

将获得的纯化后的总 DNA 用 Sau3AI 不完全酶切后, 连接到预先用 BamHI 完全酶切和去磷酸化的 pUC118/BamHI(BAP) 载体上。连接产物经异丙醇沉淀、80% 乙醇洗涤后, 加入 10 μ L 超纯水重溶, 电击转化 DH5 α 菌株, 涂布 LB 平板 (100 μ g/mL 氨苄青霉素、0.1 mmol/L IPTG 和 40 μ g/mL X-gal), 37 °C 过夜培养, 即构建成发酵食品环境样品宏基因组文库。随机取 15 个转化子, 提取质粒用 BamHI 酶切, 电泳分析插入片段的长短, 评价所建宏基因组文库多样性^[6]。

1.3.3 酯酶基因的筛选及序列分析

挑取上述文库中的白色克隆子, 点板于三丁酸甘油酯筛选 (100 μ g/mL 氨苄青霉素、0.1 mmol/L IPTG、1% 三丁酸甘油酯和 1% 阿拉伯胶) 平板上, 30 °C 培养 2~3 d, 观察菌落周围是否有透明水解圈。若有水解圈可确定有酯酶活性。挑选具有水解圈的克隆子, 提质粒进行序列测定。利用 NCBI 网站上的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 对序列进行 ORF 寻找。此外, 对该酯酶的蛋白序列用 ClustalW 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) 进行同源性分析。

1.3.4 酯酶基因的原核表达

根据酯酶基因 *est_115* 的序列设计引物, 设计扩增引物, 上游引物 F1: 5'-CGCGGATCCATGGTCC CCGCCGCCGAGTC-3' (下划线为 BamHI 酶切位点序列); 下游引物 F2: 5'-CGGAAGCTTGGCCTGGCT GTGACATCC-3' (下划线为 HindIII 酶切位点序列)。以提取的质粒 pUC118-*est_115* 为模板, 进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后用试剂盒回收。

胶回收酯酶基因 *est_115* 的 PCR 产物后, 与载体 pET-32a(+), 分别进行 HindIII 和 BamHI 双酶切反应, 用 PCR 产物回收试剂盒纯化酶切产物。采用 T4 连接酶对酶切产物进行连接, 电转化至表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3), 通过抗性筛选, 挑取阳性克隆子, 提取质粒 DNA 进行测序验证。

将含有经测序验证正确质粒的菌株接种至含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 30 °C, 250 r/min 下培养, 当生长至 OD₆₀₀=0.8 时加入 IPTG 至终浓度 0.6 mM, 20 °C, 200 r/min 下培养 20 h, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 将菌体重悬于 20 mL、50 mM Tri-HCl (pH 7.5) 中, 用超声波破碎仪破碎菌体, 4 °C, 13000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 即获得重组酯酶粗酶液。

将粗酶液用 His 标签蛋白纯化试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 进行纯化重组蛋白。纯化后的重组蛋白液氮速冻, 保存至超低温冰箱中。

1.3.5 酶学性质研究

1.3.5.1 底物特异性检测

100 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0), 1 mM 底物, 加入纯化的酶液 10 μ L, 在 35 $^{\circ}$ C 测定吸光值 $A_{405\text{nm}}$ 。测定底物分别为: 对硝基苯酚乙酸酯(C2)、对硝基苯酚丁酸酯(C4)、对硝基苯酚己酸酯(C6)、对硝基苯酚辛酸酯(C8)、对硝基苯酚癸酸酯(C10)和对硝基苯酚十二酸酯(C12)。

1.3.5.2 温度对酯酶活性的影响

100 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0), 以 1 mM 对硝基苯酚丁酸酯为底物, 加入纯化后的酶液 10 μ L, 分别在 20、25、30、35、40、45、50 和 55 $^{\circ}$ C 测定吸光值 $A_{405\text{nm}}$ 。

1.3.5.3 pH 值对酯酶活性的影响

以 1 mM 对硝基苯酚丁酸酯为底物, 加入纯化后的酶液 10 μ L, 分别在 pH 4.0~7.0(100 mM 磷酸盐缓冲液)及 pH 7.0~9.0(Tris-HCl 缓冲液)等不同 pH 值条件下, 35 $^{\circ}$ C 测定吸光值 $A_{405\text{nm}}$ 。

1.3.5.4 NaCl 对酯酶活性的影响

纯化后的酶液分别在 5%、10%、15%和 18%的 NaCl 溶液下室温放置, 不同时间点取样, 测定酶活力。测定酶活力的方法为: 100 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.2), 以 1 mM 对硝基苯酚丁酸酯为底物, 加入样品酶液 20 μ L, 在 35 $^{\circ}$ C 测定吸光值 $A_{405\text{nm}}$ 。

2 结果与讨论

2.1 酱醪宏基因组 DNA 的提取及文库构建

通过试剂盒提取制备酱醪宏基因组 DNA(见图 1), 所提取的基因组 DNA 大部份在 25 kb 以上, 说明基因组 DNA 比较完整, 基本满足了构建高质量宏基因组文库对基因组 DNA 的要求。



图 1 提取的基因组 DNA 的电泳鉴定结果

Fig.1 Gel electrophoresis to confirm genomic DNA extraction

注: M 表示 λ DNA/Hind III Maker; Line 1 表示提取的基

因组 DNA。

回收纯化后的基因组 DNA 片段与载体 pUC118/BamHI(BAP)按摩尔比 10:1 比例连接反应过夜, 连接产物电击转化 *E. coli*DH5 α 。随机挑取 15 株白色单菌落, 提取质粒后酶切检测插入片段的大小, 结果显示大部分酶切片段大小在 2~7.5 kb 之间(见图 2), 而且阳性克隆率高、连接率高达 95%, 因此足以构建宏基因组文库筛选酯酶基因^[6]。

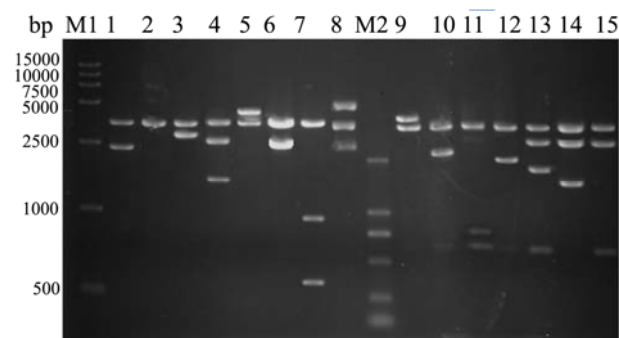


图 2 宏基因组文库插入片段的电泳鉴定结果

Fig.2 Electrophoretic identification of the different sized inserted fragments in the metagenome library

注: M1 表示 DL15000; M2 表示 DL2000; Line1~15 表示质粒酶切。

2.2 酯酶基因的筛选及其序列分析

采用三丁酸甘油酯底物的筛选方法, 从上述酱醪宏基因组文库的约 10000 个转化子中筛选出 1 个具有酯酶活性的阳性转化子。提取阳性克隆子的质粒重新转化到 *E. coli*DH5 α , 转化后的克隆子也同样出现酯酶活性, 说明插入的外源片段是酯酶酶活的来源。

具有酯酶活性的阳性转化子经测序, 并进行 ORF 寻找, 结果显示插入片段中含有一个新的酯酶编码基因, 该基因全长 948 bp, 编码 316 个氨基酸组成的多肽, 我们将该基因命名为 *est_115*。所编码蛋白 Est_115 经 ClustalW 软件分析, 结果表明该酯酶含有特征保守的五肽序列 Gly-x-Ser-x-Gly, 该功能区域是酯水解酶类蛋白的重要特征(见图 3)。此外, 我们对酯酶 Est_115 的蛋白序列进行了同源性分析, 结果表明它与来自 *Pseudomonas lutea* 的羧酸酯水解酶(A0A098SV65)同源性最高为 38%, 其次分别与 *Caulobacter henrici* (A0A0P0NYL4), *Methylobacterium* sp. Leaf99 (A0A0Q5CG82)、*Pseudomonas syringae* CC1557 (W0N0S0)和 *Pseudomonas syringae* pv. Pis. (F3G4G1) 四种酯水解酶的同源性分别为 37%、37%、37%和 36%。显示酯酶 Est_115 属于新的羧酸性酯酶类^[7]。

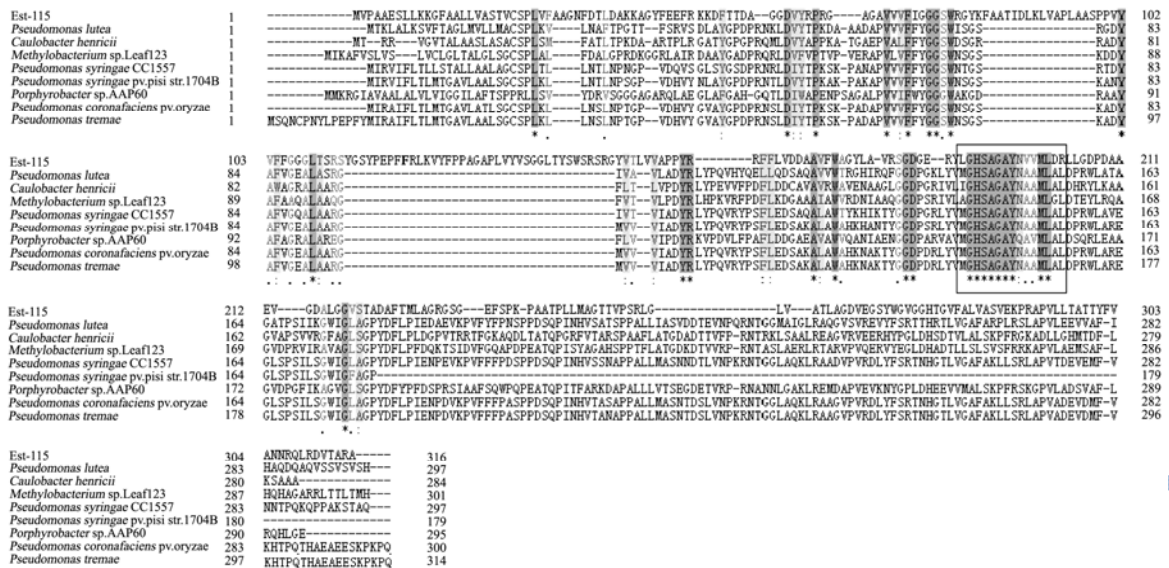


图3 酯酶 Est_115 和其它来源酯酶的蛋白序列比对

Fig.3 Alignment of Est_115 protein against other esterases

注：方框所包括序列即功能保守区域。

2.3 酯酶基因 est_115 的克隆及原核表达

以阳性克隆子的质粒为模版,以 F1 和 F2 为引物,进行 PCR 扩增,PCR 产物纯化后酶切,与表达载体 pET-32a 连接后,转化至宿主菌株 BL21。随机挑选转化子进行测序,测序结果显示连接目的基因序列与我们 est_115 的序列完全一致,即得到表达酯酶基因 est_115 的重组菌株 BL21/pET-est_115。

重组菌株 BL21/pET-est_115 经 IPTG 诱导表达,经超声波破壁,收集上清,通过粗酶液酯酶活力的测定验证了目的基因得到了有效的表达。获得的粗酶液经 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化,即可得到纯化重组酯酶 Est_115。纯化的酯酶在 SDS-PAGE 上条带较为单一,分子量大小约为 50 ku,与基于氨基酸序列计算的理论分析结果相近,结果见图 4。纯化后酯酶 Est_115 酶活比活力达到 1593 IU/mg。

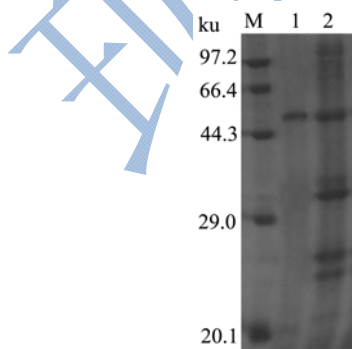


图4 重组酯酶 Est_115 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE analysis of recombinant esterase Est_115

注：M 表示低分子量标准蛋白(TaKaRa); Lane 1 表示纯

化前的重组蛋白 Est_115; Lane2 表示纯化后的重组蛋白 Est_115。

2.4 酯酶 Est_115 的底物特异性

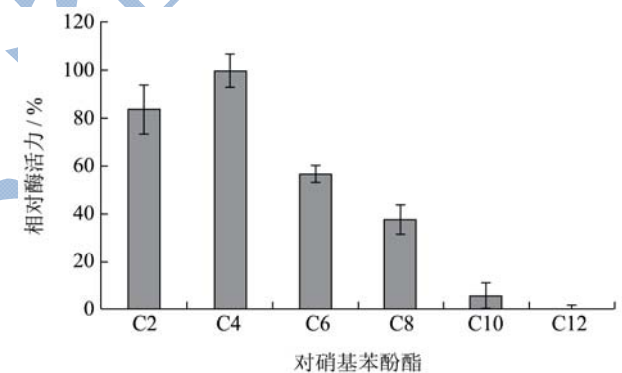


图5 重组酯酶 Est_115 的底物特异性

Fig.5 Substrate specificity of recombinant esterase Est_115

酯酶的脂肪酸特异性是指对碳链长度和饱和度不同的脂肪酸所表现出的特异反应性^[8]。我们在 100 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)中,测定重组酯酶 Est_115 对于对硝基苯酚酯的底物特异性,结果如图 5 所示。重组酯酶 Est_115 对酰基碳链较短的对硝基苯酚酯(C2、C4、C6、C8 和 C10)具有较高的催化活性,其中催化活性最高的底物为对硝基苯酚丁酸酯(C4),其次为对硝基苯酚乙酸酯(C2)和对硝基苯酚己酸酯(C6),并且随着酯底物链长的增加,其催化活力降低,说明该酶偏好水解酰基碳链较短的对硝基苯酚酯底物,所以该酶为真正的酯酶而非脂肪酶^[9]。

2.5 酯酶 Est_115 的最适反应温度

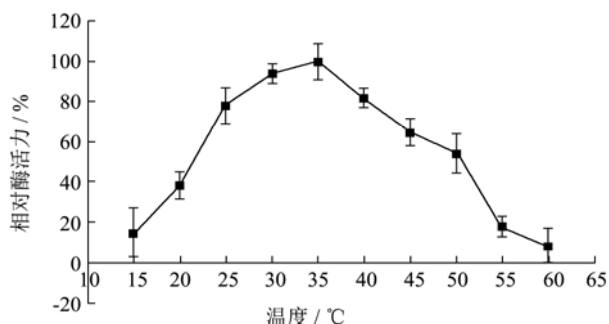


图6 重组酯酶 Est_115 的最适反应温度

Fig.6 Optimal reaction temperature of recombinant Est_115

如图6所示,在一定范围内,酯酶的活力随着温度的升高而升高,并在35℃活性达到最高,随后酶活力呈现缓慢下降趋势,但在低于最适温度的较宽范围(25~50℃)内仍具有较高的催化活性,残余酶活力达40%以上。与其它来源的酯酶^[10,11]比较,本研究的重组酯酶 Est_115 显示出较广的温度适应性。

2.6 酯酶 Est_115 的最适反应 pH 值

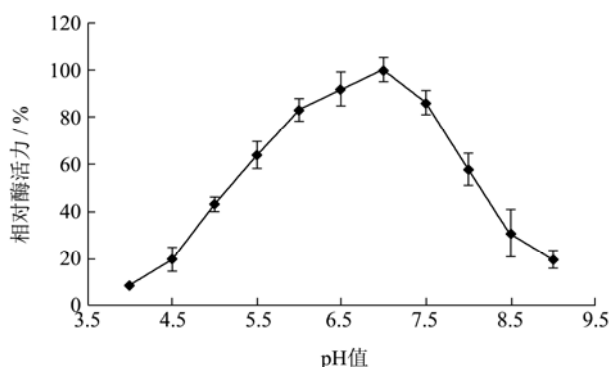


图7 重组酯酶 Est_115 的最适 pH

Fig.7 Optimal pH for recombinant Est_115 activity

固定温度下,不同范围 pH 缓冲液检测酶活力随 pH 的变化情况。如图7所示,重组酯酶 Est_115 最适反应 pH 为 7.0,在 pH 5.5~6.5 酸性范围内酶活力仍有60%以上,表明该酯酶为弱酸性酯酶。微生物生长的环境差异较大,因此从中筛选获得酶类的最适作用条件也不尽相同,目前很多的研究表明,酯酶一般为中性蛋白,其最适 pH 一般都在中性的 6.5~7.5 范围内,其中许多动物、微生物酯酶的最适 pH 都接近 7.0,适宜于中性介质中应用^[12,13]。

2.7 酯酶 Est_115 的耐盐性

由于该酯酶来源于我国传统高盐发酵食品环境,而我国因此,我们研究了酯酶 Est_115 在不同盐浓度的活力变化情况。将一定量酶液与不同浓度 NaCl 在室温保存一定的时间,检测其残余活力。结果如图 8

所示,重组酯酶 Est_115 在 18% NaCl 浓度下存放 30 d 仍能保持 40%的酶活力。结果表明,重组酯酶 Est_115 具有很强的耐盐性。到目前为止的耐盐酯酶还鲜有报道,如来自假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas sp.* NJ70 的酯酶在 3 mol/L (约 17.5%) 溶液中只有 2.6%的酶活力^[14],嗜冷杆菌 *Psychrobacter sp.* 的酯酶在高浓度 5 mol/L (约 29%) 时,酶的活能保持原来 80%左右的活性^[15],但是这两者没有研究酶在高浓度 NaCl 溶液中长时间处理的稳定性情况。Est_115 在高盐浓度长时间处理下比较稳定,这使其在高渗透压环境具有很大的应用潜力。

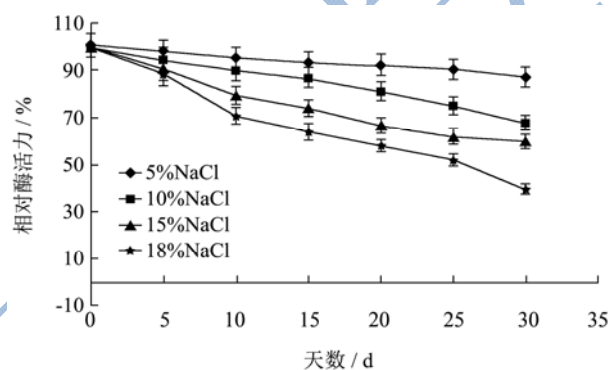


图8 重组酯酶 Est_115 的耐盐性

Fig.8 Salt resistance of recombinant Est_115

3 结论

本研究采用功能筛选法从我国传统发酵食品环境宏基因组文库中筛选获得新的酯酶基因 *est_115*,并在大肠杆菌中成功克隆表达,纯化得到纯化重组酯酶 Est_115, SDS-PAGE 结果表明该酯酶分子量约为 50 ku,底物特异性实验表明该酯酶对酰基碳链较短的对硝基苯酚酯具有较高的催化活性,最适底物为对硝基苯酚丁酸酯 (C4),最适反应温度为 35℃,最适 pH 值为 7.0。与其它已知酯酶相比较,重组酯酶 Est_115 的最大特点是,在 10~18% NaCl 条件下,酶蛋白可保持良好的催化活性,具有极强的耐盐性。因此,该酶可以应用在高渗透压食品加工中,是一个新型的极具潜力的酯酶,同时该酶的发现也有利于微生物酯酶研究领域的扩展及其耐盐机制的研究。本研究下一步工作将对该基因的诱导表达条件进行优化,并对其酶学性质和耐盐机制进行更深入的分析,以期获得特性更好的酶,为将来实现规模化工业生产提供技术支撑。

参考文献

- [1] Svendsen A. Lipase protein engineering [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2000, 1543(2): 223-238
- [2] 张敏文,刘悦,李荷.微生物酯酶的研究进展[J].广东第二师

- 范学院学报,2012,32(3):66-72
ZHANG Min-wen, LIU Yue, LI He. The research progress of microbial esterases [J]. Journal of Guangdong University of Education, 2012, 32(3): 66-72
- [3] Shestakov S V. Impact of metagenomics on biotechnological development [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2012, 48(9): 705-715
- [4] 于雷,于丽,张薇,等.宏基因组技术及其在酶制剂中的应用[J].食品科学,2013,34(9):404-407
YU Lei, YU Li, ZHANG Wei, et al. Research progress of metagenomic technology and its application in enzyme preparation [J]. Food Science, 2013, 34(9): 404-407
- [5] 聂志强,王敏,郑宇.3种分子生物学技术在传统发酵食品微生物多样性研究中的应用[J].食品科学,2012,32(23):346-350
NIE Zhi-qiang, WANG Min, ZHENG Yu. Application of three molecular biotechnologies in microbial diversity of microorganisms from traditional fermented foods [J]. Food Science, 2012, 32(23): 346-350
- [6] Ye Mao, Li G, Liang W Q, et al. Molecular cloning and characterization of a novel multicopper oxidase with laccase activity originating from mangrove soil via metagenomic approach [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 1023-1031
- [7] Bornscheuer U T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2002, 26(1): 73-81
- [8] 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
WEI Tao, YANG Kun-peng, ZHANG Wei-wei, et al. Heterologous expression and enzymatic properties of lipase lipTX from thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain X514 [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(11): 91-97
- [9] 徐士庆,胡永飞,袁爱花,等.深海沉积物微生物元基因组文库来源的新的酯酶基因的克隆、表达及酶学性质[J].微生物学报,2010,50(7):891-896
XU Shi-qing, HU Yong-fei, YUAN Ai-hua, et al. Cloning, expression and characterization of a novel esterase from marine sediment microbial metagenomics library [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(7): 891-896
- [10] JIANG Xia-wei, XU Xue-wei, HUO Ying-yi, et al. Identification and characterization of novel esterases from a deep sea sediment metagenome [J]. Archives of Microbiology, 2012, 194(4): 207-214
- [11] Biver S, Vandenberg M. Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(2): 191-200
- [12] Jiménez D J, Montana J S, Álvarez D, et al. A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(1): 361-370
- [13] Bunterngsook B, Kanokratana P, Thongaram T, et al. Identification and characterization of lipolytic enzymes from a peat-swamp forest soil metagenome [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(9): 1848-1854
- [14] Wang Q, Hou Y, Ding Y, et al. Purification and biochemical characterization of a cold-active lipase from Antarctic sea ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. NJ70 [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(8): 9233-9238
- [15] WU Guo-jie, WU Gao-bing, ZHAN Tao, et al. Characterization of a cold-adapted and salt-tolerant esterase from a psychrotrophic bacterium *Psychrobacter pacificensis* [J]. Extremophiles, 2013, 17(3): 809-819