

# 一株产脂肪酶真菌的筛选、培养条件优化及脂肪酶结构特征

邵泽远<sup>1</sup>, 王舒淇<sup>1</sup>, 刘德江<sup>2</sup>, 张化俊<sup>1\*</sup>

1 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波

2 宁波杰森绿色能源科技有限公司, 浙江 宁波

邵泽远, 王舒淇, 刘德江, 张化俊. 一株产脂肪酶真菌的筛选、培养条件优化及脂肪酶结构特征[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4472-4487.

SHAO Zeyuan, WANG Shuqi, LIU Dejiang, ZHANG Huajun. Screening and culture condition optimization of a lipase-producing fungal strain and characterization of its lipase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4472-4487.

**摘要:** 脂肪酶是一类可在油水界面高效催化酯类化合物水解、醇解、酸解、酯交换及合成等反应的生物酶类, 在医药、化工等多个领域发挥着重要作用。与动物、植物脂肪酶相比, 微生物脂肪酶更易获取, 具有更高的研究和开发利用价值。【目的】从自然环境中筛选脂肪酶产生菌, 优化其培养方案并研究其结构特征。【方法】利用溴甲酚紫指示剂从油污土壤中分离产脂肪酶菌株, 结合形态学观察和 18S rRNA 基因测序进行菌种鉴定; 通过单因素实验及响应面法优化菌株培养条件; 对活性蛋白进行蛋白组测序, 筛选潜在脂肪酶; 对该脂肪酶基因进行 PCR 扩增和测序, 并分析其多级结构。【结果】从油污土壤中分离出一株产脂肪酶真菌 FA3, 经鉴定属于曲霉属(*Aspergillus* sp.)。以橄榄油为唯一碳源培养时, 利用对硝基苯酚比色法测得菌株 FA3 胞内脂肪酶活力为 263.75 U/g。优化后的培养条件为: 乳化橄榄油 4 mL/L, 蛋白胨 18 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, NaCl 10 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 mmol/L, pH 5.3, 培养温度 30 °C, 培养时间 77.5 h。优化后酶活力达 2 120.27 U/g, 提升了约 8.04 倍。经蛋白组分析和结构预测, 该菌脂肪酶为 GDSL 脂肪酶, 具有 Gly-Asp-Ser 保守序列, 且存在严格保守的 Ser、Gly、Asn、His 残基, 属于 N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(N-sulphoglucosamine sulphohydrolase, SGNH)。【结论】经过培养条件优化, 菌株 FA3 产脂肪酶能力显著增强, 具有良好的应用前景; 明确了该脂肪酶的功能和结构特征, 为相关蛋白的工程改造提供了依据。

**关键词:** 脂肪酶; 曲霉属; 响应面法; 脂肪酶结构

资助项目: 宁波大学横向科技项目(H2023000067)

This work was supported by the Horizontal Project of Ningbo University (H2023000067).

\*Corresponding author. Tel: +86-574-87600164, E-mail: zhanghuajun@nbu.edu.cn

Received: 2025-03-10; Accepted: 2025-04-10; Published online: 2025-05-14

# Screening and culture condition optimization of a lipase-producing fungal strain and characterization of its lipase

SHAO Zeyuan<sup>1</sup>, WANG Shuqi<sup>1</sup>, LIU Dejiang<sup>2</sup>, ZHANG Huajun<sup>1\*</sup>

1 School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang, China

2 Ningbo Jiesen Green Energy S&T Co., Ltd., Ningbo, Zhejiang, China

**Abstract:** Lipases are a group of biocatalysts that efficiently catalyze the hydrolysis, alcoholysis, acidolysis, ester exchange, and synthesis of esters at the oil-water interface. These enzymes play crucial roles in various fields, including pharmaceuticals and chemical engineering. Microbial lipases are more readily available and hold greater value for research and application than animal and plant lipases. **[Objective]** To isolate lipase-producing microorganisms from natural environments, optimize their culture conditions, and characterize the structure of the produced lipase. **[Methods]** We used bromocresol purple as an indicator to screen lipase-producing strains from oil-contaminated soil and identified the strains by morphological observation and 18S rRNA gene sequencing. We optimized the culture conditions of the strains by single-factor experiments and response surface methodology. We performed proteomic sequencing on the active proteins to identify the potential lipase. We amplified and sequenced the gene of the potential lipase by PCR and analyzed its multi-level structure. **[Results]** A lipase-producing fungal strain FA3 was isolated from oil-contaminated soil and identified as *Aspergillus* sp. The strain was cultured with olive oil as the sole carbon source, and the *p*-nitrophenol colorimetric method revealed that the intracellular enzyme activity of strain FA3 was 263.75 U/g. The optimized culture conditions were as follows: emulsified olive oil at 4 mL/L, peptone at 18 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at 1 g/L, NaCl at 10 g/L, MgSO<sub>4</sub> at 0.5 mmol/L, and pH 5.3. After culture at 30 °C for 77.5 h, the specific activity reached 2 120.27 U/g, which was about 8.04 times higher than that before optimization. The proteomic analysis and structural prediction revealed the conserved Gly-Asp-Ser motif, confirming the lipase as a typical GDSL lipase. The enzyme contained strictly conserved Ser, Gly, Asn, and His residues and it was thus classified as a member of the N-sulphoglucosamine sulphohydrolase (SGNH) hydrolase family. **[Conclusion]** After optimization of the culture conditions, strain FA3 demonstrated significantly enhanced lipase production, showing great potential for application. We clarify the functions and structural characteristics of the lipase, providing a basis for the engineering of related proteins.

**Keywords:** lipase; *Aspergillus* sp.; response surface methodology; lipase structure

脂肪酶(lipase)是一类能够在油水界面高效水解甘油三酯酯键,生成脂肪酸和甘油的生物酶类,广泛分布于动物、植物的各种组织及微生物中,是最早被研究的酶类之一<sup>[1]</sup>。脂肪酶最

早从动物中发现,后续在褪色沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)等微生物中也有发现<sup>[2-3]</sup>。脂肪酶通

常为诱导酶，在含油脂的条件下可大量合成，霉菌、酵母菌、细菌均为比较常见的高产脂肪酶微生物，其中曲霉菌属、假丝酵母菌属和假单胞菌属是重要的脂肪酶来源<sup>[4]</sup>。微生物在进化过程中逐渐形成了利用多种碳源、氮源的能力，使得脂肪酶具有广泛的底物范围<sup>[5]</sup>。不同分子结构的脂肪酶对不同底物的分解能力存在差异<sup>[6]</sup>，进而形成了脂肪酶的脂肪酸特异性、位置特异性以及立体特异性。脂肪酸特异性是指脂肪酶对碳链长度和饱和度不同的脂肪酸所产生的特异性，例如圆弧青霉(*Penicillium cyclopium*)脂肪酶对短链(C<sub>8</sub>以下)油脂，黑曲霉(*Aspergillus niger*)脂肪酶对中等链长(C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>)油脂，白地霉(*Geotrichum candidum*)脂肪酶对长链(C<sub>12</sub>以上)油脂分别呈现较强的特异性；位置特异性是脂肪酶对底物甘油三酯中 Sn-1 (或 Sn-3)与 Sn-2 位酯键的特异性识别和水解，例如黑曲霉脂肪酶可催化 1 号或 3 号位的酯键水解，对 2 号位的酯键无作用，而圆弧青霉分泌的脂肪酶可水解甘油三酯的所有酯键；立体特异性是指脂肪酶对底物甘油三酯中对应立体结构的酯键的特异性识别和水解<sup>[7]</sup>。

生物柴油(脂肪酸甲酯)是一种环保、可再生、经济实用的清洁燃料，具有重要的经济价值和社会意义。脂肪酶是催化酯化反应合成生物柴油的关键酶类<sup>[8]</sup>，其具有催化条件温和、能耗低、副产物少、高效性、高选择性、环境友好等特点，改变了传统化学反应所需的高温、强酸、强碱等相对苛刻的条件<sup>[9]</sup>，因而具有重要的研究及开发价值。然而，国内脂肪酶研究起步较晚，工业化的脂肪酶制剂种类有限，这极大限制了产业发展。因此，本研究从自然环境中分离产脂肪酶菌株，优化其产酶条件，为生产应用提供指导；同时研究脂肪酶的结构特征，有助于理解其理化性质和催化机制，为脂肪酶的改造和功能优化提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

乳化油：将橄榄油与聚乙烯醇混合，使橄榄油的体积分数为 25%，使用豆浆机以 4 000 r/min 搅拌 15 min 形成均匀的乳白色液体。

乳化油培养基(g/L)：乳化油 40.0，硫酸铵 15.0，氯化钠 10.0，自然 pH。

筛选培养基：在乳化油培养基中添加体积分数为 2% 的 0.1% 溴甲酚紫溶液，琼脂 20.0 g/L，pH 7.0。

富集培养基(g/L)：马铃薯浸粉 6.0，葡萄糖 20.0，自然 pH。

发酵培养基(g/L)：乳化油 40.0，硫酸铵 15.0，氯化钠 10.0，磷酸氢二钾 1.0，pH 7.0。

### 1.2 菌株分离

#### 1.2.1 初筛

从浙江省宁波市奉化区宁波杰森绿色能源科技有限公司的生产车间获取油污土壤。取 5 g 土壤加入至 100 mL 乳化油培养基中，30 °C、160 r/min 摇床培养 120 h，取 1 mL 菌液梯度稀释至 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>，各取 0.1 mL 涂布至筛选培养基上，30 °C 培养 72 h。挑取使培养基变为黄色<sup>[10]</sup>的菌落，在固体富集培养基上划线纯化，30 °C 培养备用。

#### 1.2.2 复筛

取纯化后的单菌落接种至 100 mL 富集培养基中，30 °C、160 r/min 培养 48 h，以 10% 的接种量转接至 100 mL 发酵培养基中，30 °C、160 r/min 培养 72 h。收集菌体并挤干，用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS, pH 7.0)洗涤并重悬。在冰浴状态下使用超声细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)破碎细胞，功率为 400 W，工作时间为 3 s、间隔时间 5 s，总时间 30 min。收集细胞匀浆，12 000×g 离心 5 min，取上清测定脂肪酶活力。

## 1.3 脂肪酶活力测定

### 1.3.1 测定原理

采用对硝基苯酚比色法测定脂肪酶活力。棕榈酸对硝基苯酯(*p*-nitrophenyl palmitate)在脂肪酶的作用下被分解为棕榈酸和对硝基苯酚(*p*-nitrophenol)。对硝基苯酚溶液呈黄色,在405–410 nm 波长处有特异吸收峰<sup>[11]</sup>。

### 1.3.2 底物溶液配制

取 566.28 mg 棕榈酸对硝基苯酯(相对分子质量约 377.52 g/mol),溶解于 50 mL 乙腈中,终浓度为 30 mmol/L。

### 1.3.3 反应体系构建

取 2.7 mL 的 0.05 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.0),加入 0.1 mL 底物溶液,40 °C水浴预热 5 min。加入 0.2 mL 酶液,40 °C水浴反应 5 min 后,立即加入等体积乙醇终止反应,于 405 nm 处测定吸光值。

### 1.3.4 对硝基苯酚标准曲线绘制

取 139.11 mg 对硝基苯酚,用 0.05 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.0)溶解并定容至 100 mL 作为标准溶液,其浓度为 10 mmol/L。将标准溶液依次稀释至 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mmol/L,各溶液在 405 nm 处测定吸光值。以  $OD_{405}$  为横坐标,对硝基苯酚浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

### 1.3.5 酶活力计算

定义在 1 min 内催化产生 1  $\mu\text{mol}$  的对硝基苯酚所需要的酶量为 1 U,通过计算每克蛋白质中所含酶活力单位数来描述酶液的比酶活力,如公式(1)所示。

$$Y=(k \times A + b) \times \frac{V \times 1000}{v \times t \times c} \quad (1)$$

式中:  $Y$  为比酶活力(U/g);  $k$  为对硝基苯酚标准曲线的斜率;  $A$  为  $OD_{405}$ ;  $b$  为对硝基苯酚标准曲线的截距;  $V$  为反应体系总体积(mL);  $v$  为酶液体积(mL);  $t$  为反应时间(min);  $c$  为酶液蛋白浓度(mg/mL)。

蛋白浓度利用 Bradford 试剂盒(上海碧云天

生物技术股份有限公司)测定。

## 1.4 产脂肪酶菌株的鉴定

在固体培养基上观察菌落的生长状态与形态特征,并用接种环挑取菌丝,利用光学显微镜(宁波舜宇仪器有限公司)对菌株个体进行进一步观察。使用 DNA 提取试剂盒[Rapid Fungi Genomic DNA Isolation Kit, 生工生物工程(上海)股份有限公司],按照其说明书提取菌株的总 DNA。使用通用引物 NS1 和 NS8 对菌株 18S rRNA 基因的保守序列进行扩增并测序[生工生物工程(上海)股份有限公司]。将测序结果在 NCBI 中进行同源性比对,并使用 MEGA 11 软件,利用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

## 1.5 发酵培养的单因素条件优化

### 1.5.1 发酵时间优化

将菌株接种于发酵培养基中,30 °C、160 r/min 培养 12、24、48、72、96、120 h,分别测定脂肪酶活力,以确定最适培养时间。

### 1.5.2 氮源优化

在发酵培养基中分别添加硫酸铵、硝酸钠、蛋白胨、酵母粉、尿素,添加量均为 15 g/L,其余条件保持不变。发酵培养后测定脂肪酶活力,确定最适氮源。

### 1.5.3 金属离子优化

在发酵培养基中分别添加  $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ ,添加量均为 0.5 mmol/L,其余条件不变<sup>[12]</sup>。发酵培养后测定脂肪酶活力,确定最适金属离子。

### 1.5.4 初始 pH 优化

调整发酵培养基的初始 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,其余条件不变。发酵培养后测定脂肪酶活力,确定最适初始 pH。

### 1.5.5 糖类碳源优化

在发酵培养基中分别添加葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、乳糖,添加量均为 10 g/L,其余条件不变。发酵培养后测定脂肪酶活力,确定最

适碳源。

上述所有优化实验均设置 3 组平行。

## 1.6 响应面试验设计

在单因素条件优化的基础上设计响应面实验,选择发酵时间、蛋白胨含量、初始 pH 作为 3 个显著性因素,使用 Design-Expert 13 软件中的 Box-Behnken 进行方案设计(表 1),用-1、0、1 代表变量的低、中、高 3 个水平。根据单因素条件优化的结果,设置各水平的具体值。试验设置 3 组平行,并对最终的设计结果进行验证。

## 1.7 脂肪酶的筛选与基因扩增

### 1.7.1 实验分组

按照响应面实验结果得到的培养基配方培养菌株,作为实验组(橄榄油组);用等量葡萄糖代替橄榄油,其余条件不变,作为对照组(葡萄糖组)。

### 1.7.2 盐析

收集 2 组菌体的胞内酶液各 5 mL,缓慢加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  使饱和度达到 80%,4 °C 静置 30 min 后,12 000×g 离心 2 min,弃上清后用 5 mL PBS 缓冲液复性,并于 4 °C 下透析过夜。

### 1.7.3 双水相萃取

分别配制浓度为 60% 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液、浓度为 50% 的聚乙二醇(PEG2000)溶液,各取 4 mL 混匀后静置 15 min,分别加入 2 组酶液各 2 mL,混匀后静置 15 min,取上层聚合物相作为粗酶溶液并测定脂肪酶活力。

### 1.7.4 蛋白组测序

将 2 组粗酶溶液进行蛋白质组测序(天津诺

禾致源生物信息科技有限公司)。根据测序结果中的蛋白表达差异以及 Internal Program Representation (IPR)功能结构域注释<sup>[13]</sup>,结合酶活力测定结果,筛选脂肪酶。

### 1.7.5 脂肪酶基因的扩增

根据脂肪酶的蛋白编号从 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)中获取对应的 DNA 序列,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成。PCR 反应体系(25 μL): 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,上、下游引物(100 μmol/L)各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 3 min。目的基因命名为 *lipG*。利用琼脂糖凝胶电泳(120 V, 30 min)验证 PCR 产物,并进行测序(杭州有康生物科技有限公司)。利用 ORF finder 从测序结果中寻找开放阅读框(open reading frame, ORF),并翻译成氨基酸序列。从 UniProt 数据库中获取同名异源蛋白序列,使用 MEGA 11 以邻接法构建蛋白质发育树。

## 1.8 脂肪酶结构预测

### 1.8.1 一级结构预测

使用 ProtParam 分析脂肪酶的分子量、等电点、氨基酸组成等理化性质;利用 ProtScale 分析脂肪酶亲疏水性信号图;采用 ESPrpt 3.0 对 MEGA 的多序列比对结果进行分析,以探究脂肪酶的保守结构特征。

### 1.8.2 二级结构预测

运用 PSIPRED 分析脂肪酶的二级结构组成;采用 SignalP 5.0 分析脂肪酶的信号肽;利用 TMHMM 2.0 分析脂肪酶的跨膜结构;借助 IUPred2A 分析脂肪酶的固有无序区域。

### 1.8.3 三级结构预测

使用 Phyre2 构建脂肪酶的三维模型;经保守结构域数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)注释,获取活性位点与催化三联体的定位信息;

表1 响应面设计方案

Table 1 Experimental design of response surface methodology

水平 Level	因素 Factor A 时间 t/h	B 蛋白胨 Peptone (g/L)	C pH
1	48	1	5.0
0	72	15	6.0
-1	96	29	7.0

在 PyMOL 中渲染模型, 并使用溶剂可及表面积计算器(上海纽普生物科技有限公司)计算该模型下的溶剂可及表面积。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选与鉴定

经过筛选最终获得 1 株具有脂肪酶活力的菌株 FA3, 该菌株可使溴甲酚紫培养基由紫色转变为黄色(图 1A、1B), 表明菌株 FA3 可通过分泌脂肪酶将橄榄油分解成脂肪酸, 导致菌落周围的 pH 下降。

菌株 FA3 在平板中培养 24 h 后, 菌落呈白色、绒毛状分布(图 1C); 培养 72 h 后, 菌落体积增大增厚, 菌落中心呈黄绿色, 表面干燥且粗糙, 面积大而疏松(图 1D), 初步判断该菌株为霉菌。显微观察发现其分生孢子梗顶端膨大

成球状, 布满了黄绿色小梗, 推测该菌株可能为曲霉(图 1E、1F)。经测序及系统发育分析发现, 菌株 FA3 属于曲霉属(*Aspergillus*); 在种水平上, 菌株 FA3 与黄曲霉组<sup>[14]</sup>(*Aspergillus* section *Flavi*) 形成聚类(图 1G), 与米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 亲缘关系最近, 因此将其命名为 *Aspergillus* sp.。

### 2.2 单因素条件优化

将菌株 FA3 发酵培养 72 h 后, 胞外和胞内的脂肪酶活力均达到峰值, 分别为 119.37 U/g 和 263.75 U/g (图 2A)。蛋白胨为最适氮源, 可使胞外和胞内脂肪酶活力分别提升至 1 041.62 U/g 和 1 045.80 U/g (图 2B、2C)。实验发现该菌株主要产生胞内脂肪酶, 后续研究将针对胞内酶展开。

金属离子如  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  可显著抑制菌株 FA3 的脂肪酶活力, 而  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  可显著提高脂肪酶活力, 其中  $\text{Mg}^{2+}$  的促进作用最

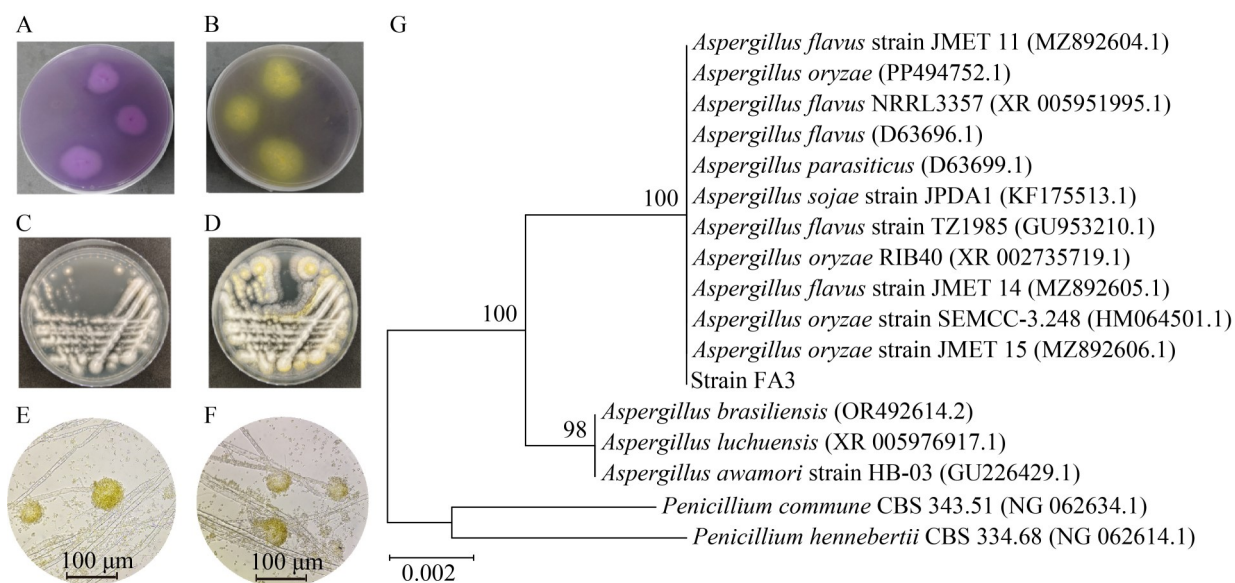


图1 菌株分离、筛选及鉴定。A: 接种无脂肪酶活力菌株的溴甲酚紫培养基; B: 接种菌株FA3的溴甲酚紫培养基; C、D: 菌株FA3的菌落形态(24 h和72 h); E、F: 菌株FA3分生孢子梗形态(放大400倍); G: 基于菌株FA3的18S rRNA基因序列构建的系统发育树。

Figure 1 Isolation, screening, and identification of lipase-producing fungi. A: Bromocresol purple medium inoculated with strains lacking lipase activity; B: Bromocresol purple medium inoculated with strain FA3; C, D: Colony morphology of strain FA3 (24 h and 72 h); E, F: Conidiophore morphology of strain FA3 (magnified 400 times); G: Phylogenetic tree constructed based on the 18S rRNA gene sequence of strain FA3.

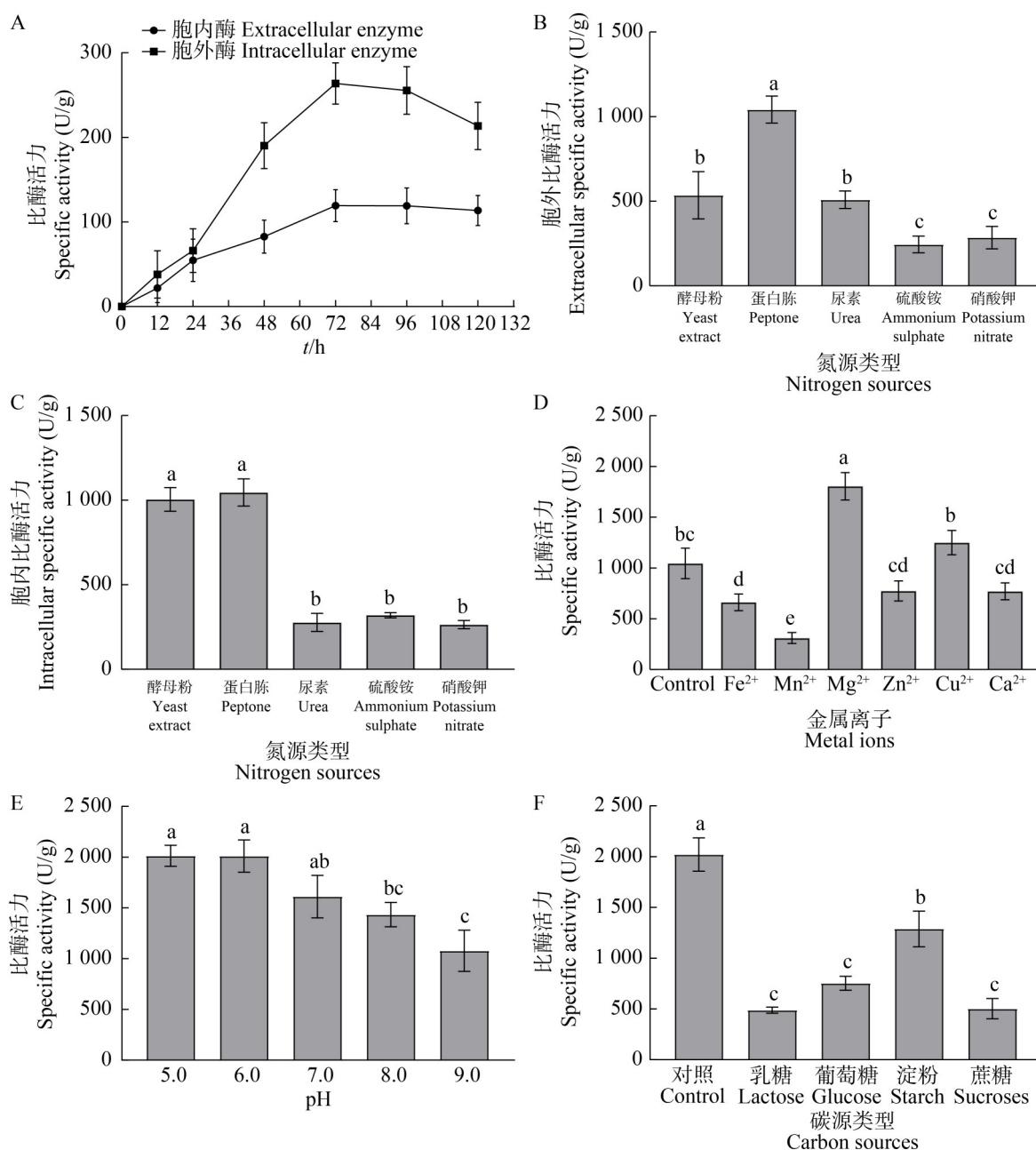


图2 单因素条件优化。A: 培养时间对脂肪酶活力的影响; B、C: 氮源类型对胞外(B)、胞内(C)脂肪酶活力的影响; D: 金属离子对胞内脂肪酶活力的影响; E: pH对胞内脂肪酶活力的影响; F: 糖类碳源对胞内脂肪酶活力的影响。不同小写字母标记表示显著性差异( $P<0.05$ )。

Figure 2 Single-factor optimization experiments. A: The effect of cultivation time on lipase activity; B, C: The effects of nitrogen source types on extracellular (B) and intracellular (C) lipase activities, respectively; D: The effect of metal ions on intracellular lipase activity; E: The effect of pH on intracellular lipase activity; F: The effect of carbohydrate carbon source on intracellular lipase activity. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

强, 使脂肪酶活力达到 1 805.05 U/g (图 2D)。此外, 菌株 FA3 在酸性条件下的产脂肪酶能力有所提升, 在 pH 5.0 时达到 2 012.59 U/g, 而在碱性条件下其产脂肪酶能力受到抑制(图 2E)。在碳源方面, 与对照组(仅含橄榄油)相比, 添加乳糖、葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖后, 菌株 FA3 的脂肪酶活力均显著下降(图 2F)。

### 2.3 响应面设计

采用 Design-Expert 13 软件中的 Box-Behnken 方法设计试验(表 2), 并对试验结果进行拟合, 得到二次回归方程, 如方程式(2)所示。

$$Y = 2\,075.48 + 122.49A + 274.18B - 154.66C + 46.74AB + 82.64AC - 106.17BC - 174.35A^2 - 819.15B^2 - 117.41C^2 \quad (2)$$

式中:  $Y$  (比酶活力, U/g) 为因变量,  $A$  (时间, h)、 $B$  (蛋白胨, g/L)、 $C$  (pH) 为自变量。模型的  $P < 0.000\,1$ , 表明该模型显著性高; 失拟项不显著 ( $P > 0.05$ ), 说明该模型拟合性好(表 3); 模型的  $r^2$  为 0.985 4, 表明该模型能够解释 98.54%

的响应值变化, 能很好地反映真实值。根据  $A$ 、 $B$ 、 $C$  三因素交互作用对脂肪酶活力的影响绘制等高线图及响应面(图 3)。

Design-Expert 13 软件得出的最佳组合为: 发酵时间 77.27 h, 蛋白胨添加量 18.04 g/L, 发酵 pH 为 5.32, 在此条件下的脂肪酶比活力预测值为 2 171.32 U/g。为便于实际操作, 对参数进行修正: 发酵时间 77.5 h, 蛋白胨添加量 18 g/L, 发酵 pH 为 5.3。在该条件下测得胞内酶比活力为 2 120.27 U/g, 相较于优化前提升了约 8.04 倍。该结果与模型预测基本一致, 表明该模型拟合性强、准确性高。

### 2.4 脂肪酶鉴定及相关基因扩增

经双水相萃取, 橄榄油组脂肪酶比活力为 7 295.29 U/g, 葡萄糖组脂肪酶比活力为 555.05 U/g, 2 组脂肪酶表达量存在显著差异。蛋白组测序分别在实验组和对照组检测出 837 种、741 种蛋白质, 其中包含 536 种共有蛋白质。以表达量倍数差异  $> 2.0$  为标准, 根据功能结构域筛选出

表2 响应面设计及其结果

Table 2 Design and results of response surface methodology

编号 Number	A 时间 t/h	B 蛋白胨 Peptone (g/L)	C pH	Y 比酶活力 Specific activity (U/g)
1	48	15	5.0	1 866.35
2	48	15	7.0	1 419.01
3	96	29	6.0	1 556.92
4	72	15	6.0	2 044.83
5	72	15	6.0	2 126.98
6	72	15	6.0	1 927.66
7	48	1	6.0	700.52
8	72	1	7.0	852.68
9	72	15	6.0	2 097.37
10	72	29	7.0	1 088.57
11	72	15	6.0	2 180.54
12	96	15	7.0	1 866.35
13	72	29	5.0	1 637.49
14	48	29	6.0	1 255.53
15	72	1	5.0	976.93
16	96	15	5.0	1 983.12
17	96	1	6.0	814.94

表3 模型方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) of the model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value	显著性 Significance
Model	4 145 052.96	9	460 561.44	52.64	<0.000 1	Significant
<i>A t</i>	120 031.80	1	120 031.80	13.72	0.007 6	
<i>B Peptone</i>	601 398.42	1	601 398.42	68.73	<0.000 1	
<i>C pH</i>	191 359.21	1	191 359.21	21.87	0.002 3	
<i>AB</i>	8 738.61	1	8 738.61	1.00	0.350 9	
<i>AC</i>	27 319.43	1	27 319.43	3.12	0.120 6	
<i>BC</i>	45 085.52	1	45 085.52	5.15	0.057 5	
<i>A<sup>2</sup></i>	127 997.27	1	127 997.27	14.63	0.006 5	
<i>B<sup>2</sup></i>	2 825 257.99	1	2 825 257.99	322.90	<0.000 1	
<i>C<sup>2</sup></i>	58 046.64	1	58 046.64	6.63	0.036 7	
Residual	61 247.98	7	8 749.71			
Lack of fit	24 289.48	3	8 096.49	0.88	0.524 2	Unsignificant
Pure error	36 958.50	4	9 239.63	52.64		
Cor total	4 206 300.95	16	460 561.44			

96种上调蛋白(表4),最终鉴定GDSL脂肪酶(A0A0D9NA42)为该菌的脂肪酶。

该GDSL脂肪酶的ORF长度为780 bp,编码260个氨基酸。经PCR扩增后,*lipG*基因条带清晰明亮(图4A),片段大小与预期相符,且未出现非特异性扩增。经测序,*lipG*基因全长793 bp,存在一个780 bp的ORF。基于蛋白质序列的系统发育分析(图4B)发现,LipG能够与米曲霉和黄曲霉来源的GDSL脂肪酶聚类。

## 2.5 脂肪酶结构预测

### 2.5.1 一级结构预测

多序列比对结果(图5)表明,LipG与GDSL脂肪酶存在大量高相似度序列,说明LipG与此类蛋白质高度同源;N端的Gly34、Asp35、Ser36形成了高度保守的G-D-S序列,这与GDSL脂肪酶的保守结构域一致<sup>[15]</sup>,表明LipG具有GDSL脂肪酶的典型结构特征。经ProtParam分析,LipG由260个氨基酸组成,分子量为28.11 kDa,等电点为9.24,负电荷残基(Asp+Glu)总数为19,正电荷残基(Arg+Lys)总数

为24;亲水性指数(grand average of hydropathicity)为-0.22,说明脂肪酶LipG为亲水可溶性蛋白;在水溶液中其消光系数为32 890 L/(mol·cm),280 nm处吸光度(浓度0.1%)为1.17;不稳定性指数(instability index)为26.95,表明LipG在体外能够稳定存在。

### 2.5.2 二级结构预测

在LipG的二级结构中, $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠、无规卷曲分别占比43.08%、11.15%、45.77%(图6A);LipG的信号肽预测概率为99.76%,信号肽序列为MKLYLLFFFLTLHALPGLPRSTA,类型为Sec/SPI,切割位点为24-25,该位点的预测概率为41.58%(图6B);LipG的整体跨膜预测结果均为“outside”类型,表明其无跨膜结构(图6C);LipG固有无序区域预测分值低于0.5,表明其整体结构有序,能够形成稳定的折叠结构(图6D)。

### 2.5.3 三级结构预测

利用Phyre2对LipG进行三维模型构建(图7),其中Ser36、Gly70、Asn107、His211作为

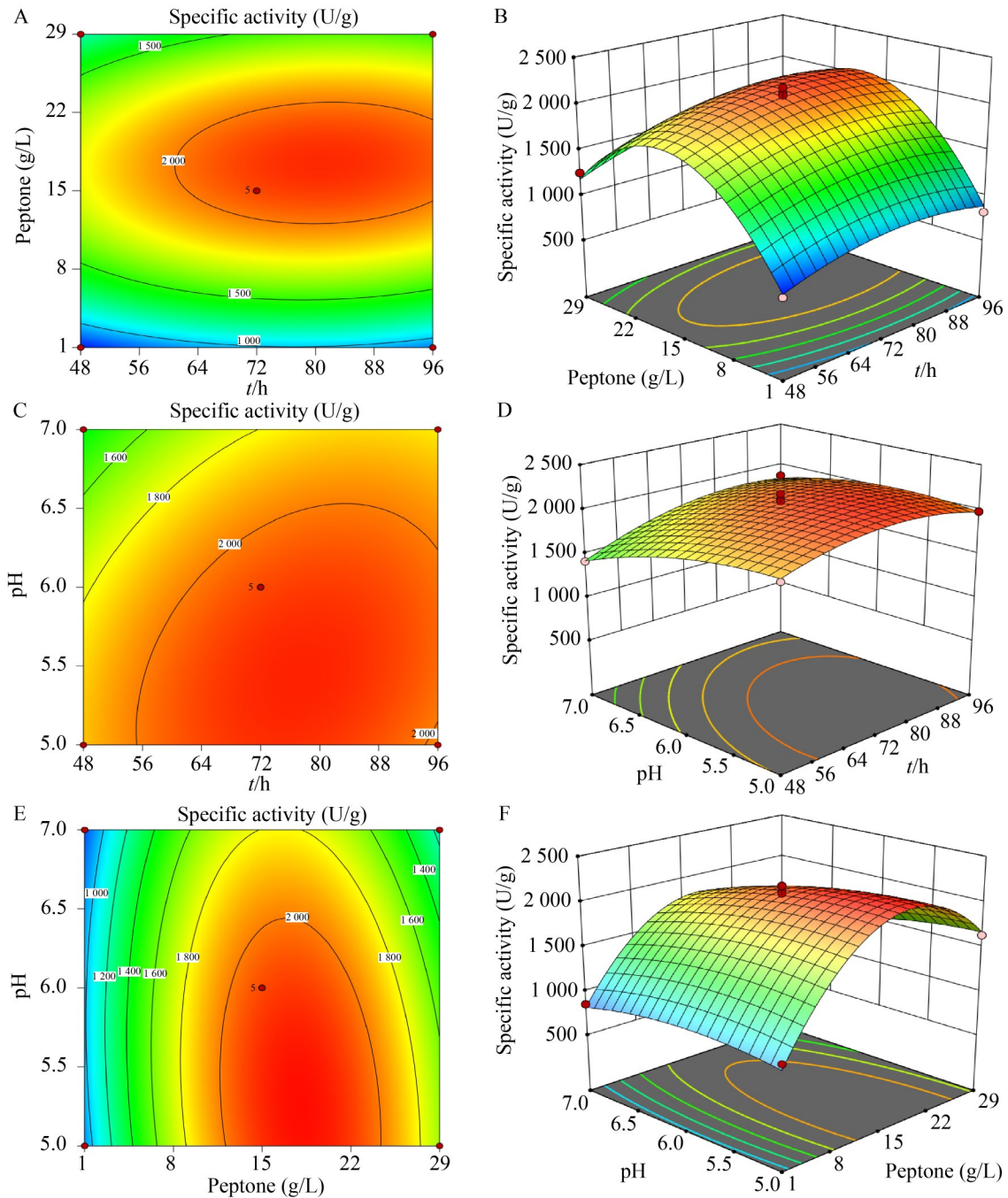


图3 时间、蛋白胨、pH交互作用影响脂肪酶活力的等高线图及响应面。A、B：时间和蛋白胨的交互等高线(A)和响应面(B)；C、D：时间和pH的交互等高线(C)和响应面(D)；E、F：蛋白胨和pH的交互等高线(E)和响应面(F)。

Figure 3 Contour plots and response surfaces of the interaction effects of time, peptone, and pH on lipase activity. A, B: Contour plots (A) and response surfaces (B) of the interaction between time and peptone; C, D: Contour plots (C) and response surfaces (D) of the interaction between time and pH; E, F: Contour plots (E) and response surfaces (F) of the interaction between peptone and pH.

表4 表达量上调最显著的前20种蛋白质

Table 4 The top 20 proteins with the most significant upregulation in expression

蛋白编号 Protein ID	家族/结构域/功能位点 Family/Domain/Functional site	差异倍数 Fold change
A0A1L9WYX2	Renal dipeptidase family	19.59
I8ACH8	Class II aldolase/adducin N-terminal	17.68
A0A2P2HDD1	Fungal chitosanase	16.38
A0A5N6GLH3	AMP-dependent synthetase/ligase	14.52
A0A0D9MS93	Crotonase superfamily	12.92
A0A2G7FKV6	Peptidase M18	12.09
A0A1S9DYA9	Renal dipeptidase family	11.22
A0A0L1IWK1	Deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase	9.83
A0A2P2H6J5	Cutinase/acetylxylan esterase	9.19
A0A5N5XFY9	Chaperonin Cpn60/TCP-1 family	9.08
A0A4S3JIV4	AMP-dependent synthetase/ligase	7.13
A0A1S9DJ32	TIM-barrel domain, IGPS-like	6.80
A0A1S9DHY9	Acyl-CoA oxidase/dehydrogenase, central domain	6.75
A0A0D9N0P7	Protein of unknown function DUF541	6.52
A0A0F0INE2	Unknown	6.15
A0A0H5BJN0	Unknown	5.84
A0A0D9MXU9	Unknown	5.79
A0A1F7ZXV7	Uncharacterised protein family UPF0311	5.77
A0A0L1J7D0	Manganese/iron superoxide dismutase, N-terminal	5.67
A0A0D9NA42	SGNH hydrolase-type esterase domain	5.51

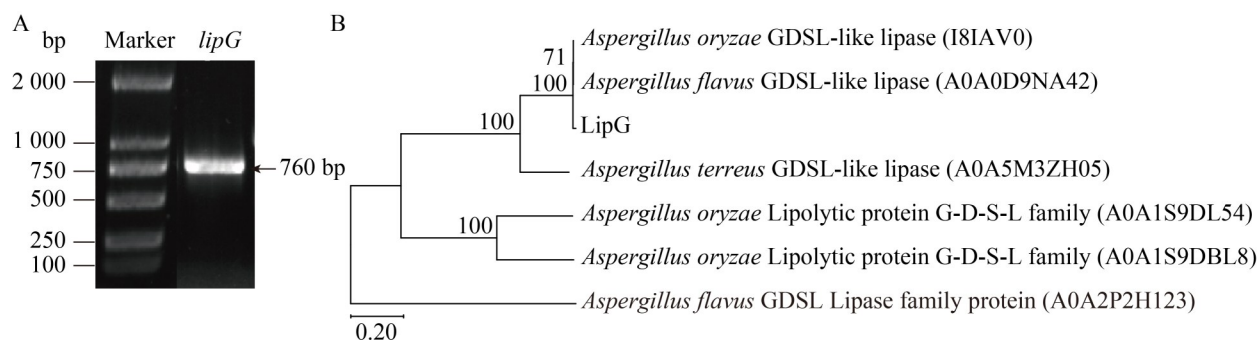
图4 脂肪酶相关基因扩增。A: *lipG* PCR产物电泳条带; B: LipG蛋白质发育树。

Figure 4 Amplification of lipase genes. A: Electrophoretic band of *lipG* PCR product; B: Phylogenetic tree of LipG protein.

活性位点，为底物提供结合和反应的环境；Ser36、Asp208、His211 作为催化三联体负责亲核催化。该模型的溶剂可及表面积为 11 289.59 Å<sup>2</sup>。

### 3 讨论

葡萄糖和油类物质常被用作脂肪酶产生菌

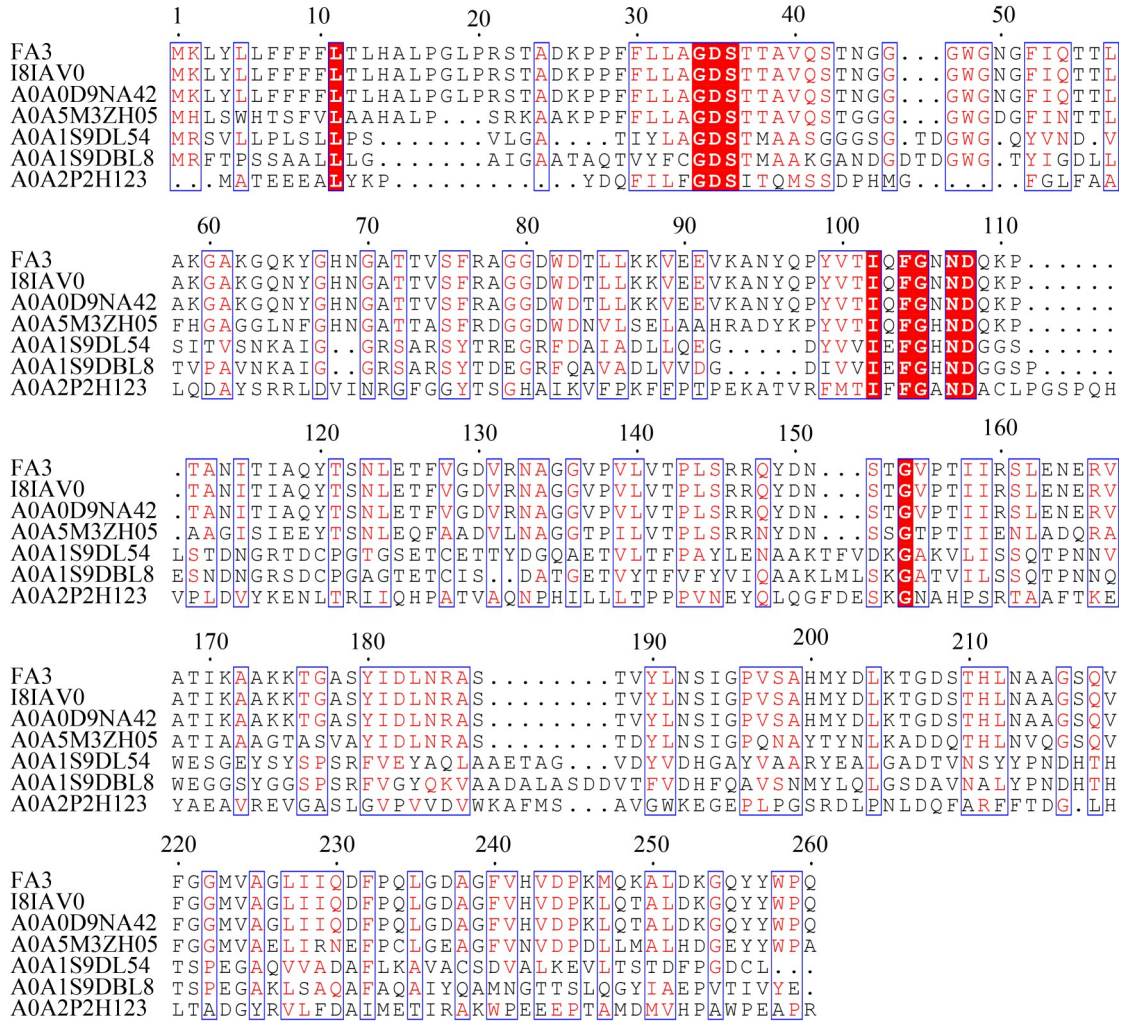


图5 异源GDSL脂肪酶的多序列比对。蓝色矩形框标记相似序列，红色字体表示高度相似的残基，红底字体表示完全相同的残基。

Figure 5 Multiple sequence alignment of GDSL lipases from different microorganisms. Blue rectangular boxes highlight similar sequences. Red font indicates highly similar residues, while red background indicates identical residues.

的碳源和诱导剂<sup>[16]</sup>。细胞对葡萄糖的吸收利用速率较快，从而能够获得更高的生长速率和脂肪酶活性<sup>[17]</sup>。Adham 等<sup>[18]</sup>在含有 3.0% 蛋白胨、0.5% 葡萄糖和 0.5% 橄榄油的培养基中培养黑曲霉，获得了高脂肪酶活力；而仅以葡萄糖为碳源培养时，菌株的脂肪酶活性受到抑制，表明最适合产脂肪酶的培养基并非微生物生长的最佳培养基。Kaushik 等<sup>[19]</sup>利用响应面法对肉色曲

霉(*Aspergillus carneus*)脂肪酶的发酵条件进行优化，最终确定最佳培养基配方为：0.8% 葡萄糖、0.8% 蛋白胨、1.0% 葵花籽油。这些研究表明脂类碳源的存在能够显著提高菌株的产酶能力。在本研究中，当发酵培养基中同时存在橄榄油和糖类碳源时菌株 FA3 的脂肪酶活力显著低于仅以橄榄油为碳源的对照组(图 2F)，这可能是由于细胞在发酵培养过程中产生了分解代谢物

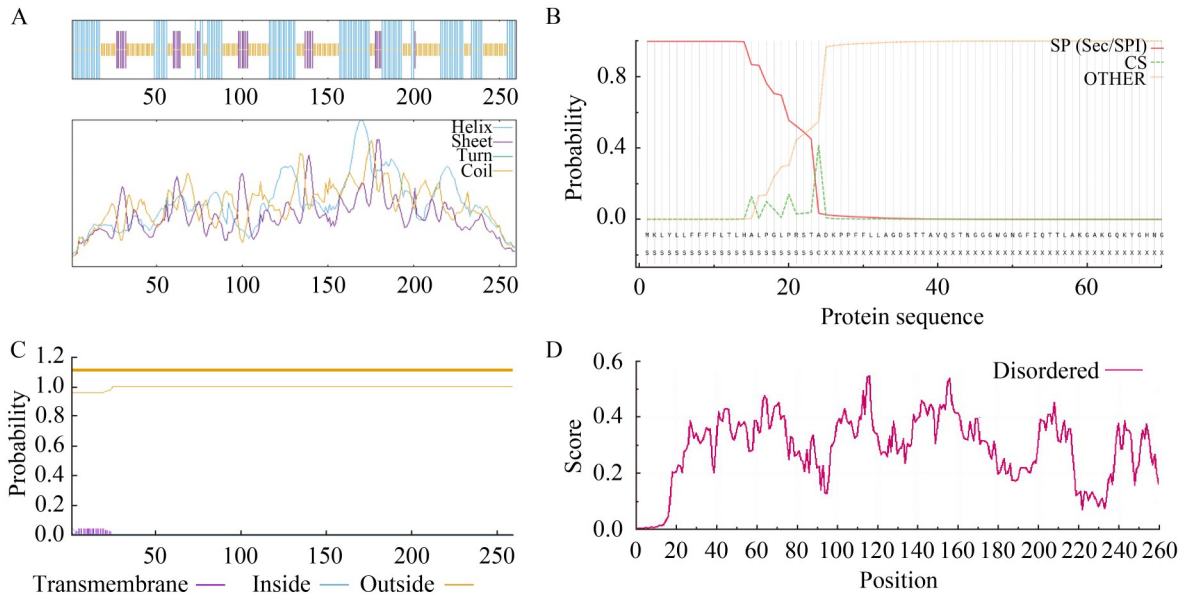


图6 LipG二级结构预测。A: 二级结构预测; B: 信号肽预测; C: 跨膜结构域预测; D: 固有无序区域预测。

Figure 6 Secondary structure prediction of LipG. A: Secondary structure prediction of LipG; B: Signal peptide prediction of LipG; C: Transmembrane domain prediction of LipG; D: Intrinsically disordered region prediction of LipG.

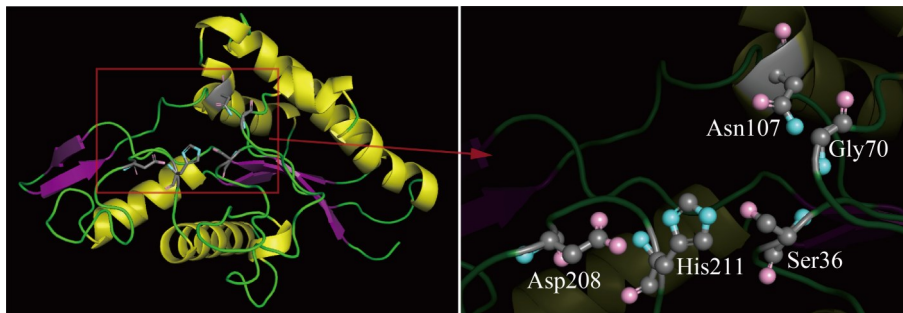


图7 LipG三级结构预测

Figure 7 Tertiary structure prediction of LipG.

阻遏现象<sup>[20]</sup>。在使用混合碳源时 ATP 的充足供应使得细胞的 cAMP 合成减少, 促使其优先利用某种碳源, 进而遏制了其他碳源分解反应的进行<sup>[20]</sup>。类似地, Maidana 等<sup>[21]</sup>分别以葵花籽油、橄榄油、葡萄糖、甘油作为唯一碳源对紧密帚枝霉 (*Sarocladium strictum*) 进行发酵培养, 发现仅使用粗甘油时脂肪酶产量最高 (3.13 U/mg)。这些结果表明, 对于部分菌株脂类碳源是产脂

肪酶的重要碳源, 而葡萄糖等糖类碳源并非产酶所必需。

脂肪酶属于  $\alpha/\beta$  水解酶家族, 其分子量大小在 19–100 kDa 范围内, 一般由 270–641 个氨基酸组成, 典型的  $\alpha/\beta$  水解酶主要由 6 个  $\alpha$  螺旋和 8 个  $\beta$  折叠构成<sup>[22]</sup>。这种折叠结构为活性位点——催化三联体 Ser-Asp-His 提供了一个稳定的支架<sup>[23]</sup>。Ser 作为关键残基, 与其周围的氨基酸形

成了保守的 Gly-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly 基序, 如酵母菌脂肪酶为 Gly-Glu-Ser-Ala-Gly, 霉菌脂肪酶为 Gly-His-Ser-Leu-Gly<sup>[24]</sup>。然而, 并非所有的脂肪酶都具有这种结构, 例如 GDSL 亚家族的脂肪酶具有不同的基序<sup>[25]</sup>, 其核心特征是保守的 Gly-Asp-Ser (-Leu)序列, 该序列通常位于蛋白的 N 端, 其中 Ser 是关键催化残基<sup>[15]</sup>。GDSL 水解酶具有灵活的活性位点, 能够随着不同底物的存在和结合而发生构象变化。例如, 一些 GDSL 酶同时具有硫酯酶、脂肪酶、蛋白酶、芳基酯酶和溶血磷脂酶活性<sup>[25]</sup>。GDSL 家族中的部分蛋白质被进一步归类为 N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶(N-sulphoglucosamine sulphohydrolase, SGNH)水解酶, 其 I、II、III 和 V 4 个保守区中分别存在严格保守的 Ser、Gly、Asn、His 残基<sup>[26]</sup>。

近年来, 对 GDSL 脂肪酶理化特性和结构的研究大多聚焦于植物<sup>[27-30]</sup>, 但植物源脂肪酶获取难度大、制作成本高, 不适合大规模生产。微生物脂肪酶相比动物、植物脂肪酶具有更广的作用温度、作用 pH 和底物类型, 具有更高的研究和开发利用价值。在本研究中, LipG 的 Ser36、Asp208、His211 构成了催化三联体, 表明其符合  $\alpha/\beta$  水解酶的典型特征; Gly34、Asp35、Ser36 构成了 G-D-S 序列, 表明其符合 GDSL 水解酶的典型特征; Ser36、Gly70、Asn107、His211 为严格保守的催化位点, 表明其符合 SGNH 水解酶的典型特征。Rajan 等<sup>[31]</sup>从瓜里科假单胞菌(*Pseudomonas guariconensis*)中克隆出一种 GDSL 脂肪酶, 其对棕榈酸对硝基苯酯的催化活性为 333.33 U/mL; Vujaklija 等<sup>[32]</sup>报道了一种链霉菌的 GDSL 脂肪酶, 其对丁酸对硝基苯酯的催化活力为 3.31 U/mg, 它们均具有 GDS 基序和 Ser-Asp-His 催化三联体结构。然而, Gao 等<sup>[33]</sup>从链霉菌中鉴定出一种含有 Ser-His 二联体结构的 GDSL 脂肪酶, 这种独特的活性位点结构使其在催化机制上与其他 GDSL 酶有所不同, 其对棕榈酸对硝基苯酯的催化活性

为 18.40 U/mg, 但对短链酯的水解能力不足 20%, 说明不同 GDSL 脂肪酶催化结构的多样性导致其产生了底物偏好差异。

## 4 结论

本研究利用溴甲酚紫指示剂从油污土壤中分离出一株产脂肪酶真菌 FA3, 经 18S rRNA 基因测序鉴定为曲霉属。菌株 FA3 主要生产胞内脂肪酶, 比活力为 263.75 U/g。经过单因素条件优化和响应面试验得到其最适培养方案: 乳化橄榄油 4 mL/L、蛋白胨 18 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L、NaCl 10 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, 初始 pH 为 5.3, 培养温度 30 °C, 培养时间 77.5 h。在该条件下酶活力为 2 120.27 U/g, 相较优化前提升了约 8.04 倍。经蛋白组分析与结构预测, 该菌脂肪酶为 GDSL 脂肪酶, 具有 Gly-Asp-Ser 的保守序列, 并且存在严格保守的 Ser、Gly、Asn、His 残基, 属于 SGNH 水解酶。菌株 FA3 在发酵培养时无需额外的糖类碳源, 培养方式简单, 具有良好的应用前景。

## 作者贡献声明

邵泽远: 文献查阅、设计及完成实验并进行数据分析与文章撰写; 王舒淇: 分离纯化产脂肪酶微生物; 刘德江: 收集油污土壤、脂肪酶活力分析; 张化俊: 项目管理、论文框架构思及文章审阅。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 韦宇拓, 滕昆. 脂肪酶的分子结构及应用研究进展[J]. 广西科学, 2014, 21(2): 93-98.  
WEI YT, TENG K. Advances in molecular structure and application of lipases[J]. Guangxi Sciences, 2014, 21(2): 93-98 (in Chinese).
- [2] QUYEN DT, SCHMIDT-DANNERT C, SCHMID RD. High-level expression of a lipase from *Bacillus*

- thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 28(1): 102-110.
- [3] 彭立凤. 微生物脂肪酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 1999, 15(2): 102-110.  
PENG LF. Advances in the research on microbial lipase[J]. Biotechnology Bulletin, 1999, 15(2): 102-110 (in Chinese).
- [4] 金其荣. 功能性食品新材料: 异麦芽低聚糖[J]. 食品工业, 1995, 16(3): 5-6.  
JIN QR. A new functional food material: isomaltooligosaccharide[J]. The Food Industry, 1995, 16(3): 5-6 (in Chinese).
- [5] PHYTHIAN SJ. Esterases[M]. 2nd ed. Germany: Wiley, 2001: 193-241.
- [6] 汪小锋, 王俊, 杨江科, 闫云君. 微生物发酵生产脂肪酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2008, 24(4): 47-53.  
WANG XF, WANG J, YANG JK, YAN YJ. Recent progress on the production of lipase by microbial fermentation[J]. Biotechnology Bulletin, 2008, 24(4): 47-53 (in Chinese).
- [7] 曹淑桂. 脂肪酶的底物特异性及其应用潜力[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(1): 9-13.  
CAO SG. Substrate specificity of lipase and its application potential[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1995, 22(1): 9-13 (in Chinese).
- [8] 陈立功, 周星, 杨鑫. 均相碱催化高动物油含量餐饮废油制备生物柴油[J]. 石油炼制与化工, 2010, 41(12): 52-55.  
CHEN LG, ZHOU X, YANG X. Preparation of biodiesel from waste edible oil with high animal oil content using alkali homogeneous catalyst[J]. Petroleum Processing and Petrochemicals, 2010, 41(12): 52-55 (in Chinese).
- [9] CONTESINI FJ, LOPES DB, MACEDO GA, Da GRAÇA NASCIMENTO M, de OLIVEIRA CARVALHO P. *Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 67(3/4): 163-171.
- [10] 蒋翠翠, 尚昊, 张素芳, 梁会朋, 纪超凡, 陈映羲, 林心萍. 产脂肪酶菌株的筛选、酶学特性及其接种对酸肉风味物质的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(10): 106-113.  
JIANG CC, SHANG H, ZHANG SF, LIANG HP, JI CF, CHEN YX, LIN XP. Screening and enzymatic properties of lipase-producing strains and effects of their inoculation on flavor compounds of fermented sour meat[J]. Food Science, 2023, 44(10): 106-113 (in Chinese).
- [11] KRIEGER N, TAIPA MA, MELO EHM, LIMA-FILHO JL, AIRES-BARROS MR, CABRAL JMS. Purification of a *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes[J]. Bioprocess Engineering, 1999, 20(1): 59-65.
- [12] 刘虹才. 产脂肪酶 *Aspergillus oryzae* WZ007 的诱变选育及其酶的分纯化[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2012.  
LIU HC. Mutation breeding of lipase production strain *Aspergillus oryzae* WZ007 and purification of lipase from the mutation strain[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2012 (in Chinese).
- [13] FINN RD, ATTWOOD TK, BABBITT PC, BATEMAN A, BORK P, BRIDGE AJ, CHANG HY, DOSZTÁNYI Z, EL-GEBALI S, FRASER M, GOUGH J, HAFT D, HOLLIDAY GL, HUANG HZ, HUANG XS, LETUNIC I, LOPEZ R, LU SN, MARCHLER-BAUER A, MI HY, et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D190-D199.
- [14] KJÆRBØLLING I, VESTH T, FRISVAD JC, NYBO JL, THEOBALD S, KILDGAARD S, PETERSEN TI, KUO AL, SATO A, LYHNE EK, KOGLE ME, WIEBENGA A, KUN RS, LUBBERS RJM, MÄKELÄ MR, BARRY K, CHOVIATIA M, CLUM A, DAUM C, HARIDAS S, et al. A comparative genomics study of 23 *Aspergillus* species from section *Flavi*[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1106.
- [15] LEE DS, KIM BK, KWON SJ, JIN HC, PARK OK. *Arabidopsis* GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 379(4): 1038-1042.
- [16] DESTAIN J, FICKERS P, WEEKERS F, MOREAU B, THONART P. Utilization of methyloleate in production of microbial lipase[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005, 121/122/123/124: 269-277.
- [17] MACRIS JB, KOURENTZI E, HATZINIKOLAOU DG. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*[J]. Process Biochemistry, 1996, 31(8): 807-812.
- [18] ADHAM NZ, AHMED EM. Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3; production, partial purification and properties[J]. Indian Journal of Microbiology, 2009, 49(1): 77-83.
- [19] KAUSHIK R, SARAN S, ISAR J, SAXENA RK. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 40(3/4): 121-126.
- [20] 张克旭. 分解代谢物阻遏[J]. 微生物学通报, 1983, 10(4): 189-191.  
ZHANG KX. Catabolite repression[J]. Microbiology China, 1983, 10(4): 189-191 (in Chinese).
- [21] MAIDANA SERPA JD, CAVALIERI De ALENCAR GUIMARÃES N, KIOSHI YONEKAWA MA, PEREIRA de ALMEIDA A, RULLER R, AUGUSTO dos SANTOS JAQUES J, dos ANJOS dos SANTOS E, MASUI DC, ZANOELO FF, GIANNESI GC. *Sarocladium strictum* lipase (LipSs) produced using crude glycerol as sole carbon source: a promising enzyme for biodiesel production[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2022, 40: 102299.
- [22] ANGKAWIDJAJA C, KANAYA S. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63(23): 2804-2817.
- [23] NARDINI M, DIJKSTRA BW.  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzymes: the family keeps growing[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1999, 9(6): 732-737.
- [24] 谭中标. 圆弧青霉脂肪酶的异源表达、耐热性改造及底物专一性分析[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2014.

- TAN ZB. Heterologous expression of lipase genes from *Penicillium cyclopium*, engineering thermostability and substrate specificity analysis of the enzymes[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2014 (in Chinese).
- [25] AKOH CC, LEE GC, LIAW YC, HUANG TH, SHAW JF. GDSL family of serine esterases/lipases[J]. Progress in Lipid Research, 2004, 43(6): 534-552.
- [26] MØLGAARD A, KAUPPINEN S, LARSEN S. Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases[J]. Structure, 2000, 8(4): 373-383.
- [27] LI ZY, LI L, HUO YY, CHEN ZJ, ZHAO Y, HUANG J, JIAN SL, RONG Z, WU D, GAN JH, HU XJ, LI JX, XU XW. Structure-guided protein engineering increases enzymatic activities of the SGNH family esterases[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 107.
- [28] WATKINS JL, LI M, McQUINN RP, CHAN KX, McFARLANE HE, ERMAKOVA M, FURBANK RT, MARES D, DONG CM, CHALMERS KJ, SHARP P, MATHER DE, POGSON BJ. A GDSL esterase/lipase catalyzes the esterification of lutein in bread wheat[J]. The Plant Cell, 2019, 31(12): 3092-3112.
- [29] SUN YG, HE YQ, WANG HX, JIANG JB, YANG HH, XU XY. Genome-wide identification and expression analysis of GDSL esterase/lipase genes in tomato[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(2): 389-406.
- [30] DUAN LS, WANG F, SHEN HT, XIE SQ, CHEN XF, XIE QL, LI R, CAO AP, LI HB. Identification, evolution, and expression of GDSL-type esterase/lipase (GELP) gene family in three cotton species: a bioinformatic analysis[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 795.
- [31] RAJAN D, AMRUTHA M, GEORGE S, SUSMITHA A, ANBURAJ AA, NAMPOOTHIRI KM. Molecular cloning, overexpression, characterization, and *in silico* modelling analysis of a novel GDSL autotransporter-dependent outer membrane lipase (OML) of *Pseudomonas guariconensis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 255: 128050.
- [32] VUJAKLIJA D, SCHRÖDER W, ABRAMIĆ M, ZOU PJ, LESCIĆ I, FRANKE P, PIGAC J. A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene[J]. Archives of Microbiology, 2002, 178(2): 124-130.
- [33] GAO KP, WANG XF, JIANG H, SUN JN, MAO XZ. Identification of a GDSL lipase from *Streptomyces bacillaris* and its application in the preparation of free astaxanthin[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 325: 280-287.