

研究报告

源于红树林土壤宏基因组文库的新型磷脂酶 A₁ 基因的
筛选、克隆表达及酶学性质

冯娟 李荷*

(广东药学院 基础学院 生物化学与分子生物学系 广东 广州 510006)

摘要:【目的】利用宏基因组学的方法从红树林土壤中筛选新型酯水解酶类。【方法】构建红树林土壤宏基因组文库,采用以三丁酸甘油酯为底物的功能筛选方法,对筛选出的阳性克隆进行系统发育树分析,实现新型磷脂酶 A₁ 基因的原核表达,研究重组酶的酶学性质。【结果】筛选到一个新的磷脂酶 A₁ 编码基因 *phop1413* (GenBank 登录号 KF767097),测序表明其全长 1 413 bp,可编码 470 个氨基酸残基,表达蛋白约 51.7 kD,表达量高达 220 mg/L,NCBI 中 BLAST 比对及系统进化树分析显示该蛋白属于磷脂酶类的 FAMILY VI 家族;酶学性质分析表明,该重组酶的最适反应底物为对硝基苯酚乙酸酯,比酶活为 124 U/mg;最适反应温度为 54 °C,最适 pH 7.8;50 °C 热处理 1.5 h 剩余相对酶活为 44%,表现出很好的热稳定性。【结论】通过构建宏基因组文库利用功能筛选方法获得一个新型磷脂酶 A₁ 基因;研究中获得的新型磷脂酶 A₁ 性质较好,可用于植物油酶法脱胶。

关键词: 宏基因组文库, 磷脂酶, 克隆表达, 酶学性质

Cloning, expression and characterization of a novel
phospholipase A₁ gene from the metagenomic library of
mangrove soil

FENG Juan LI He*

(Department of Biochemistry & Molecular Biology, School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: [Objective] The aim was to isolate new hydrolytic enzymes from the metagenomic library from mangrove soil. [Methods] To isolate new hydrolytic enzymes, we constructed a metagenomic library from mangrove soil and screened clones with lipolytic activities by a function-driven approach based on a tributyrin hydrolysis. The identification of Phop1413 was based on deduced amino acid sequence comparison and phylogenetic analysis. [Results] One new phospholipase A₁ gene *phop1413* (GenBank KF767097) was finally identified from the library by functional screening. The result of BLASTp analysis revealed that *phop1413* consisted of an open reading frame of 1 413 bp and encoded

基金项目: 广东省科技厅项目(No. 2012B010300021); 广东省教育厅项目(No. 2013KJ CX0107)

*通讯作者: Tel: 86-20-39352187; 信箱: lihe32@163.com

收稿日期: 2014-07-11; 接受日期: 2014-07-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-18

a protein of 470 amino acids. The protein showed 42% amino acid identity to phospholipase from *Pseudomonas* (WP 018928790.1). According to the phylogenetic analysis of Phop1413, Phop1413 belonged to FAMILY VI of lipase. Phop1413 was then subcloned to the express vector pET-32a(+), and overexpressed in *E. coli* BL21 with 1 mmol/L IPTG induction at 30 °C. The overexpressed protein revealed a molecular weight of 51.7 kD. A detailed analysis of the enzyme's substrate spectrum with eight different substrates revealed that Phop1413 could hydrolyze a wide variety of substrates. Phop1413 showed the highest activity with p-Nitrophenyl caproate (C6). The optimum temperature of Phop1413 was determined to be 54 °C, and the recombinant enzyme showed an optimum pH of 7.8. The enzyme retained 44% initial activity after incubating at 50 °C for 1.5 h. It indicated that Phop1413 had a good thermostability. **[Conclusion]** A new phospholipase A₁ gene *phop1413* was screened by function-driven approach from metagenomic library. The characterization of Phop1413 is good enough to apply to industry.

Keywords: Metagenome library, Phospholipase, Cloning and expression, Enzymatic properties

1998 年, Handelsman 等^[1]首次提出“宏基因组”的概念,即特定生态环境中所有生物遗传物质的总和,目前宏基因组学已经被广泛用于挖掘新型生物催化剂中。宏基因组的产生克服了传统微生物分离培养的难题,扩大了微生物资源的利用。利用宏基因组学技术已经筛选到多种新型生物催化剂^[2-5],使得宏基因组成为微生物活性物质筛选的新途径^[6]。

磷脂酶来源不同,其与磷脂的作用方式也不同,根据其作用位点的差异(图 1)可以将磷脂酶分为磷脂酶 A₁、磷脂酶 A₂、磷脂酶 C 和磷脂酶 D 四种,其中磷脂酶 A₁ 和磷脂酶 A₂ 能应用于植物油脱胶,它们能特异性的水解磷脂的 1 位或 2 位脂肪酸链^[7],其中磷脂酶 A₂ 必须以钙离子为激活剂,且来源有限,价格昂贵。因此,磷脂酶 A₁ 日益受到研究者的关注,对磷脂酶 A₁ 应用于植物油脱胶的研究越来越深入^[8-11]。传统的油脂精炼由于脱胶不完全导致精炼损失大,对设备影响也较大,且易造成成品油酸败和回色现象^[7],而利用磷脂酶 A₁ 的酶法脱胶反应条件温和,大大节约化学物质的消耗量,几乎不产生废水,在工业应用中具有潜在优势,但是磷脂酶 A₁ 在天然材料中含量低以及其理化性质的缺陷无法完全满足生产的要求,因此获得高产量且适合工业生产应用的磷脂酶迫在眉睫。目前对于磷脂酶的研究,主要是通过筛选性能优良的磷脂酶产生菌,但是环境中的微生物大部分是不可培养的,大大限制了微生物磷脂酶资源的利用。

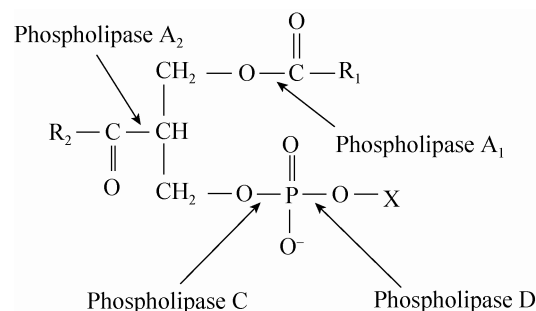


图 1 不同磷酸酶作用的位点

Figure 1 Hydrolysis sites of different phospholipase

本研究通过宏基因组学的方法,利用功能筛选方法以三丁酸甘油酯为底物,从红树林这一特殊生境中筛选新型酯酶,而磷脂酶是酯酶的一种,也可以三丁酸甘油酯为底物,所以同时也可用于磷脂酶的筛选。本研究中筛选到的磷脂酶能水解三丁酸甘油酯且不需钙离子作激活剂,所以为磷脂酶 A₁ 类。对筛选到的磷脂酶 A₁ 进行酶学性质分析,为其工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

土样采自广东珠海淇澳岛沿海红树林,采集深度 10–20 cm 的表层土样,于 -20 °C 保存。*Escherichia coli* DH5α 和原核表达载体 pET-32a(+) 由本实验室保存。载体 pUC118/*Bam*H I (BAP)、*Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I、*Pst* I、Prime STARTM Max Premix、Protein marker 及 DNA marker 购自

TaKaRa 公司; 氨苄青霉素(Amp)、X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-半乳糖苷)、IPTG (异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷)购自 Amresco 公司; Plasmid Mini Kit、DNA Gel Extraction Kit 购自 OMGEA 公司; 三磷酸甘油酯(Tributyrin)购自阿拉丁; p-Nitrophenyl acetate (C2)、p-Nitrophenyl butyrate (C4)、p-Nitrophenyl caproate (C6)、p-Nitrophenyl octanoate (C8)、p-Nitrophenyl caprate (C10)、p-Nitrophenyl laurate (C12)、p-Nitrophenyl myristate (C14)、p-Nitrophenyl palmitate (C16)、乙腈购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 提取环境样品宏基因组 DNA: 土壤宏基因组 DNA 的提取方法在 Zhou 等^[12]方法上加以改进。如增加一倍体积的 DNA extraction buffer, 减少土壤中腐植酸对 DNA 的吸附, 促进 DNA 的溶解; 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀时, 选用冰乙醇, 低温促进 DNA 的沉淀, 增加 DNA 的回收率。提取的基因组 DNA 用琼脂糖凝胶电泳检测并采用 OMEGA 公司 Gel Extraction Kit, 回收并纯化所提取的土壤基因组 DNA。

1.2.2 红树林土壤宏基因组文库的构建: 纯化后的基因组 DNA 用 *Bam*H I 酶切 5 h, 回收 2–8 kb 的 DNA 片段。不完全酶切的基因组片段与载体 pUC118/*Bam*H I (BAP)采用 Fermentas 公司的 T4 DNA ligase 于 22 °C 连接 2 h, 连接产物纯化具体步骤如下: 加入 0.7 倍体积异丙醇混匀后, -20 °C 过夜沉淀, 14 000 r/min 离心 20 min 后弃上清, 沉淀用 80%的乙醇洗涤, 离心收集管中沉淀, 室温晾干后加入 10 μ L 灭菌的超纯水重悬连接产物。将纯化好的连接产物用电击转化法转入 *E. coli* DH5 α 超级感受态细胞中。*E. coli* DH5 α 超级感受态细胞的制备和电转的具体步骤参考分子克隆实验指南^[13]。取适量培养物涂布于蓝白斑筛选平板上(100 mg/L Amp、0.1 mmol/L IPTG 和 40 mg/L X-gal), 37 °C 倒置培养过夜。

1.2.3 磷脂酶 A₁ 基因的筛选: 将白色克隆点板于以三丁酸甘油酯为底物、罗丹明 B 为背景染料的筛

选(100 mg/L Amp、1% Tributyrin、1% Arabic gum)平板中, 37 °C 恒温培养 2–3 d, 观察克隆子周围有无透明圈。挑取有透明圈的克隆子, 进行提质粒、酶切验证之后送 Invitrogen 公司序列测定。测序后序列进行生物信息学分析。

1.2.4 磷脂酶 A₁ 基因的 PCR 扩增和纯化: 按照磷脂酶基因 *phop1413* 的序列设计引物如下: *phop1413*-Fw: 5'-CCGGAATTCATGAAAAAATCGAAACTGCATCTTCACCTGGCGG-3' (下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点); *phop1413*-Rv: 5'-CCCAAGCTTTCATGGCCAGACCCTGGAGGCCTTG-3' (下划线部分为 *Hind* III酶切位点)。引物合成由 Invitrogen 公司完成。以含目的基因的质粒为模板, 利用高保真酶 Prime STAR™ Max Premix 进行 PCR 扩增。扩增后的 PCR 产物用 OMEGA 胶回收试剂盒纯化。

1.2.5 构建表达体系及重组菌株的表达: 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 对纯化后的 PCR 产物和 pET-32a(+)分别进行双酶切, 37 °C 酶切 10 h, 用 OMEGA 胶回收试剂盒纯化酶切产物, 采用 T4 DNA ligase 对经过双酶切并纯化后的 pET-32a(+)载体及 PCR 产物进行连接, 连接产物导入 *E. coli* BL21 感受态细胞中。*E. coli* BL21 感受态细胞及转化具体步骤参考分子克隆实验指南^[13]。随机挑取转化子培养后, 提取其质粒并双酶切验证。酶切结果表明, 该基因已经成功构建表达载体。转化子于 37 °C 摇床中培养, 当 OD₆₀₀ 达 0.8 左右时, 加入 IPTG, 使其终浓度为 1 mmol/L, 30 °C 诱导表达 16 h。培养好的发酵液离心后收集菌体并超声破碎, 并对发酵液上清、细胞破碎液进行 SDS-PAGE 电泳分析。后期粗酶液采用 His-Bind® Resin 试剂盒对重组磷脂酶 Phop1413 进行纯化。

1.2.6 磷脂酶 Phop1413 底物特异性研究: 在 54 °C、pH 7.8 条件下, 取 10 μ L 粗酶液在 400 μ L 反应体系中: 1 mmol/L 底物, 1%乙腈, 40 mmol/L B-R 酸缓冲液(pH 7.8)混匀后 54 °C 反应 20 min, 每个反应设置 3 个平行实验和 1 个空白对照实验。底物分别为 p-Nitrophenyl acetate (C2), p-Nitrophenyl butyrate

(C4), p-Nitrophenyl caproate (C6), p-Nitrophenyl octanoate (C8), p-Nitrophenyl caprate (C10), p-Nitrophenyl laurate (C12), p-Nitrophenyl myristate (C14), p-Nitrophenyl palmitate (C16)。测定磷脂酶水解不同底物的酶活力, 探究其底物特异性。

1.2.7 温度对酶活力及酶稳定性的影响: pH 7.8 时, 测定在不同温度下(4、30、40、50、60 °C)磷脂酶 A₁ 水解对硝基苯酚己酸酯的活力, 再缩小温度区间(间隔 2 °C), 逐步确定最适温度; 在不同温度下分别温育 15、30、45、60、120 min, 以 4 °C 保存的酶液酶活为 100%, 计算残余酶活。

1.2.8 pH 对酶活力及稳定性的影响: 54 °C 时, 测定磷脂酶 A₁ 在 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 时水解对硝基苯酚己酸酯的活力, 再缩小 pH 区间, 逐步确定最适 pH; 在不同 pH 时分别温育 15、30、45、60、120 min, 以 4 °C 保存的酶液酶活为 100%, 计算残余酶活。

1.2.9 磷脂酶酶活的测定: 方法参加 1.2.6。磷脂酶 A₁ 酶活力(U)单位的定义: 每分钟水解底物对硝基苯酚己酸酯生成 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。计算公式为: 酶活(U/mL)= $\Delta A_{405} \times V \times K \times 1\,000 / (T \times \epsilon)$ 。其中, A : 吸光度, V : 反应液体积(mL), K : 酶液稀释倍数, T : 反应时间(min), $\epsilon=0.016\ \mu\text{mol/L}$ 。

1.2.10 目的蛋白浓度测定: 采用 BCA 法测定蛋白质浓度, 以牛血清白蛋白作为标准对照。标准曲线如图 2 所示, 标准方程为 $y=0.034\ 7x+0.014\ 2$, $R^2=0.992\ 0$ 。

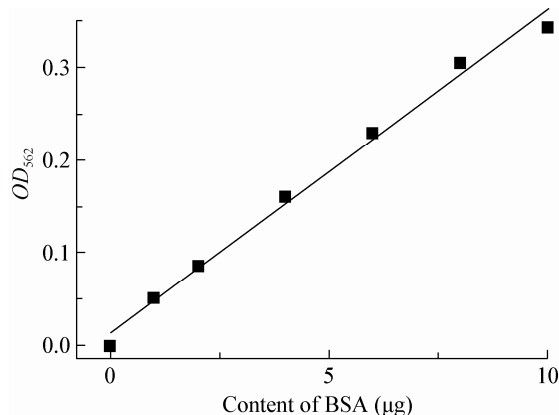


图 2 蛋白质标准曲线

Figure 2 The standard curve of protein

2 结果与分析

2.1 土壤总 DNA 的提取

获得高纯度、高浓度的基因组 DNA 是构建宏基因组文库的前提。本研究土壤基因组 DNA 提取结果如图 3 所示, 提取的宏基因组 DNA 主要集中在 23 kb 以上, 且较少降解, 满足构建宏基因组文库的需要。

2.2 红树林土壤宏基因组文库的构建

不完全酶切后的基因组片段与 pUC118 载体相连后, 采用电击方法转化入 *E. coli* DH5α 超级感受态中, 蓝白斑平板显示转化情况良好, 计算该文库约含 50 000 个阳性克隆子, 文库含量较多, 随机挑取 20 个阳性克隆子提质粒、*Bam*H I 酶切验证, 电泳检测插入片段的大小及多样性。插入片段平均大小约 3.5 kb, 且文库基因片段的多样性较好, 文库质量符合后期筛选要求。

2.3 磷脂酶基因的筛选

以 1%三丁酸甘油酯为底物和罗丹明 B 为背景染料配制磷脂酶筛选培养基, 对宏基因组文库进行

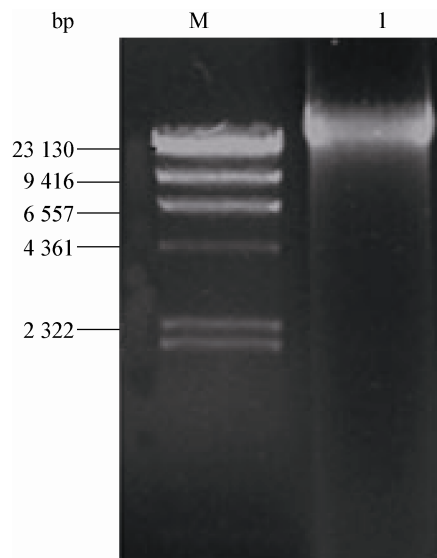


图 3 土壤基因组 DNA 的提取电泳图

Figure 3 Electrophoresis identification of soil genomic DNA

Note: M: λDNA/*Hind* III DNA marker; 1: Soil genomic DNA.

初筛, 筛选出一株有明显透明圈的克隆, 初步确定其有水解活性。后期通过提质粒、酶切验证后送 Invitrogen 公司测序。

2.4 磷脂酶基因 *phop1413* 的序列分析

经 NCBI 中的 ORF Finder 进行分析, 插入片段中含有一个全长 1 413 bp 的磷脂酶基因, 该基因命名为 *phop1413*, 已将其序列提交到 GenBank 获得登录号为 KF767097。该基因可编码一个由 470 个氨基酸残基组成的、预计分子量为 51.7 kD 的磷脂酶蛋白。经 NCBI 的 BLAST 软件分析 Phop1413 与已报道的磷脂酶 *Pseudomonas* (WP 018928790.1), 序列相似性最大为 42%, 所以我们将其归为磷脂酶类。而采用 MEGA 软件对 Phop1413 与已知报道的酯水解酶类做进化关系分析, 构建系统发育树(图 4), 结果显示 Phop1413 属于 FAMILY VI 家族。

2.5 磷脂酶基因 *phop1413* 的克隆

以重组质粒 pUC118-*phop1413* 为模板, 以 *phop1* 545-Fw/*phop1* 545-Rv 为引物扩增, 得到一条明显的特异性 DNA 条带(图 5), 片段大小在 1 400 bp 左右, 与预期相符。

2.6 基因 *phop1413* 的表达

将重组质粒 pET-32a(+)-*phop1413* 转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞, IPTG 诱导后 30 °C 表达 16 h, 超声裂解菌体, SDS-PAGE 电泳分析表达产物, 如图 6A 所示。在 65 kD 处有明显的蛋白条带, 与理论预测大小相符, 说明 *phop1413* 基因正确表达。纯化后的 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 6B 所示, 为单一条带, 分子量大小与预测相符。可见, 该重组蛋白表达量较高, 采用 BCA 法测得蛋白表达量高达 220 mg/L。

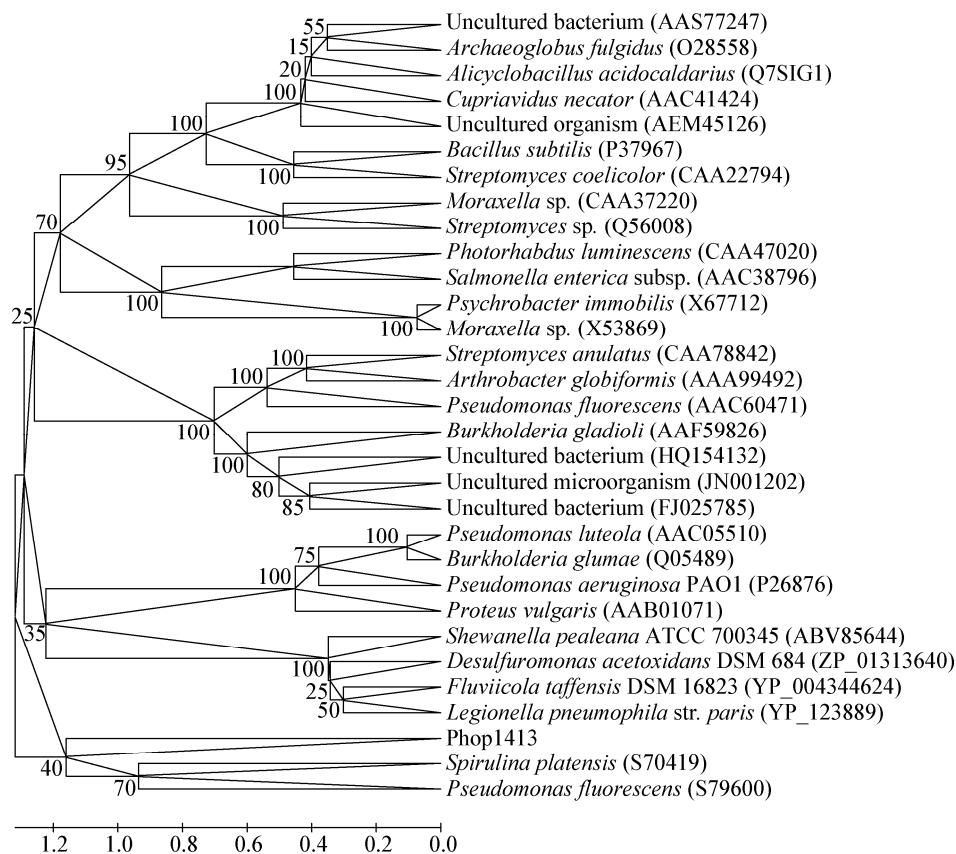


图 4 Phop1413 与亲缘性较近蛋白的系统进化树

Figure 4 Unrooted Neighbor-Joining phylogenetic analysis of Phop1413

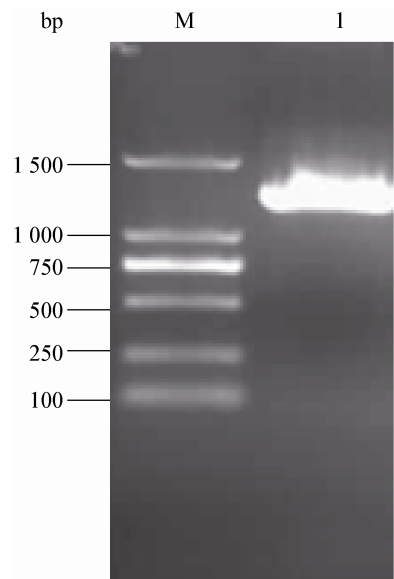


图5 基因 *phop1413* 的 PCR 扩增产物
Figure 5 Amplified products of gene *phop1413*
Note: M: DL2000 DNA marker; 1: Gene *phop1413*.

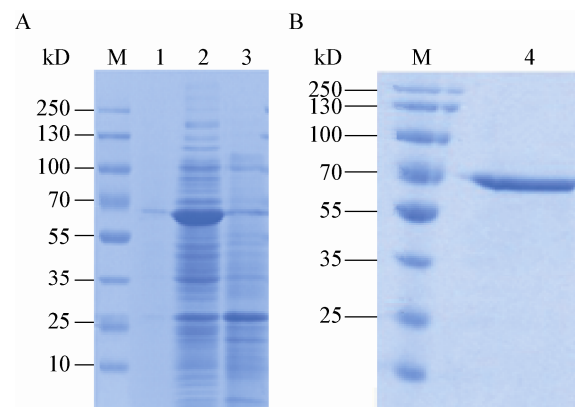


图6 *E. coli* BL21(pET-32a(+)-*phop1413*)表达(A)及纯化(B)结果的 SDS-PAGE 鉴定
Figure 6 SDS-PAGE of gene expression in *E. coli* BL21 (pET-32a(+)-*phop1413*)
注: M: 标准量分子蛋白; 1: 诱导液上清蛋白; 2: 超声破碎后上清蛋白; 3: 阴性对照[*E. coli* BL21(pET-32a(+))的破碎液]; 4: 纯化的 Phop1413.
Note: M: Protein MW marker; 1: Centrifugal supernatant of fermentation; 2: The cells lysis solution of *E. coli* BL21 (pET-32a(+)-*phop1413*); 3: The cells lysis solution of *E. coli* BL21(pET-32a(+)); 4: Purified recombinant Phop1413.

2.7 磷脂酶 A₁ Phop1413 的底物特异性

如表 1 所示, Phop1413 对 C2–C16 的对硝基苯酚酯有不同的水解活性, 其中对对硝基苯酚己酸酯 (C6)活性最高, 计算其比酶活为 124 U/mg。该酶对 C2–C16 底物都具有水解活性, 表明该重组酶水解底物范围较广, 由于对 C14 仍具有较高活性, 推测该磷脂酶也具有部分脂肪酶活性, 更适合用于油脂精炼。

2.8 温度对酶活性的影响

从图 7 中可以看出, 随着温度的升高, 酶活性逐渐上升, 且在 54 °C 时达到最大值, 因此该重组蛋白的最适温度为 54 °C, 且温度在 40–65 °C 时, 相对酶活性仍保持 50%以上, 说明该重组蛋白较耐高温。在 40、45、50、60 °C 温育不同时间, 重组酶相对活力呈现下降趋势, 50 °C 温育 1.5 h 后残余酶活为 44%, 45 °C 温育 2.5 h 后仍残余 45.3%, 表明该重组酶有较好的热稳定性。

2.9 pH 对酶活力的影响

如图 8 所示, 当 pH 小于 5.5 时, Phop1413 的酶活性随着 pH 值的升高而增加; pH 达到 7.8 时, 酶活性最高; 之后随着 pH 值的升高, 酶活性逐渐降低, 当 pH 为 4.0 或 10.0 时该酶几乎没有活性, pH 为 6.0 时, 温育 2.5 h 后仍残存 50%以上酶活,

表 1 重组蛋白 Phop1413 的底物特异性 Table 1 Substrate specificity of recombinant Phop1413	
底物 Substrates	相对酶活 Relative activity (%)
C2	71.2±3.6
C4	55.3±2.9
C6	100.0±4.3
C8	15.4±1.3
C10	33.3±2.7
C12	41.6±2.4
C14	74.3±3.7
C16	39.1±2.2

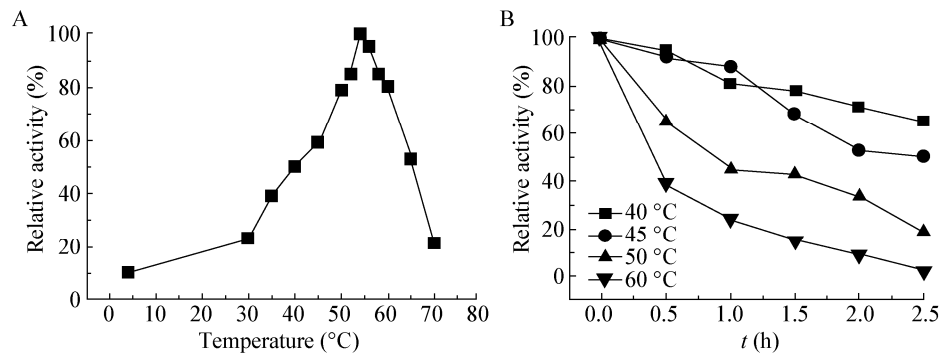


图 7 温度对重组酯酶 Phop1413 活性(A)及稳定性的影响(B)
Figure 7 Effect of temperature on activity (A) and stability (B) of Phop1413

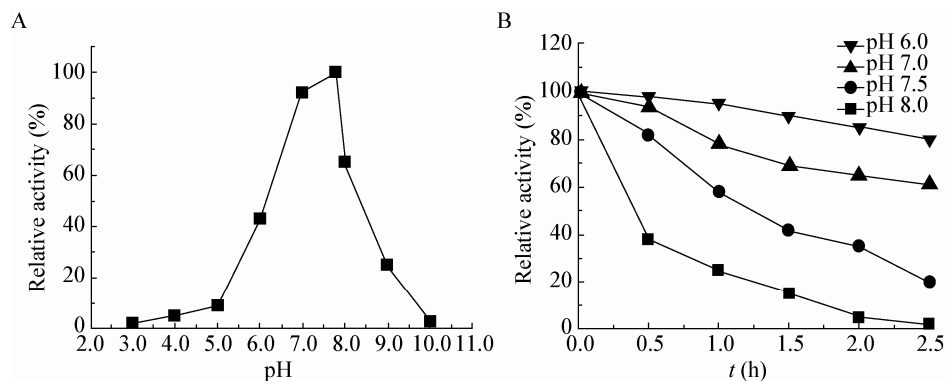


图 8 pH 对重组酶 Phop1413 活性(A)及稳定性的影响(B)
Figure 8 Effect of pH on activity (A) and stability (B) of Phop1413

pH 为 8.0 时, 温育 1 h 后, 酶活仅剩 16%, 说明该重组酶对酸的耐受性比对碱的耐受性好。

3 讨论

新开发的脱胶工艺, 主要是采用酸脱胶、化学添加剂络和法脱胶、酶法脱胶及超滤脱胶等方法^[14]。酶法脱胶广泛应用于各种植物油, 与其他脱胶方法相比, 该法脱胶条件温和, 营养成分不被破坏, 而且节省能源, 且由于酶专一性强, 副反应少, 产品容易回收^[15], 目前酶法脱胶技术已经引起了世界油脂工业界的高度重视。但是脱胶工业生产过程中的高温、高压、高酸度以及重金属离子超标等造成的极端环境, 使得野生的磷脂酶很难满足工业生产的需要^[16]。

长期生活在特定环境中的微生物具有特有的酶学特性, 红树林是自然分布于热带、亚热带海岸

的潮间带的木本植物群落, 处于海洋与陆地的动态交界面, 该地区的微生物由于长期处于湿热环境, 环境中的土著菌及其酶类具有耐热等特质。本研究中的新型磷脂酶 Phop1413 的最适反应温度为 54 °C, 这比大多数已报道的磷脂酶最适温度都要高。如 Gomes Heleno 等^[17]所研究的磷脂酶最适温度为 35–45 °C, Mo 等^[18]研究的磷脂酶 C 最适温度为 45 °C; 该酶最适反应 pH 为 7.8, 与大多数已报道的磷脂酶相差不大; 此外该酶较其他已报道的磷脂酶有更好的热稳定性以及在弱酸环境中稳定性更好的特性。但由于工业化油脂精炼生产中的极端环境, 下一步我们将对该重组蛋白进行定向进化分子改造, 以期获得对温度和 pH 耐受性更好的酶; 其次通过固定化技术获得性质更稳定的磷脂酶, 从而为工业化应用奠定基础。

参考文献

- [1] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): 245-249
- [2] Jiang CJ, Chen G, Huang J, et al. A novel beta-glucosidase with lipolytic activity from a soil metagenome[J]. *Folia Microbiologica (Praha)*, 2011, 56(6): 563-570
- [3] Ko KC, Rim SO, Han Y, et al. Identification and characterization of a novel cold-adapted esterase from a metagenomic library of mountain soil[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2012, 39(5): 681-689
- [4] Jimenez DJ, Montana JS, Alvarez 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
- [5] Tang XX, Yi ZW, Li N, et al. Bioactivity screening of fermentation crude extract from deep sea metagenomic library clones[J]. *China Biotechnology*, 2011, 31(6): 58-63 (in Chinese)
汤熙翔, 易志伟, 李宁, 等. 深海宏基因组文库克隆子发酵产物的生物活性筛选[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(6): 58-63
- [6] Yan B, Hong K, Xu Y, et al. Metagenome cloning—a new approach for novel microbial bioactive compounds discovery[J]. *Microbiology China*, 2005, 32(1): 113-117 (in Chinese)
阎冰, 洪葵, 许云, 等. 宏基因组克隆—微生物活性物质筛选的新途径[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(1): 113-117
- [7] Li QS, Yang JG, Yang B, et al. Vegetable oil degumming by different phospholipases[J]. *China Oils and Fats*, 2004, 29(1): 19-22 (in Chinese)
李秋生, 杨继国, 杨博, 等. 不同磷脂酶用于植物油脱胶的研究[J]. *中国油脂*, 2004, 29(1): 19-22
- [8] Loeffler F, Plainer H, Sproessler B. Vegetable oil enzymatic degumming process by means of *Aspergillus* phospholipase: US, 6001640[P]. 1999
- [9] Clausen IG, Patkar SA, Borch K, et al. Method for reducing phosphorus content of edible oil: US, 6103505[P]. 2000
- [10] Hasida M, Tsutsumi N, Halkier T, et al. Acid phospholipase, production and method using thereof: US, 6127137[P]. 2000
- [11] Roy SK, Rao BVSK, Prasad RBN. Enzymatic degumming of rice bran oil[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2002, 79: 845-846
- [12] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322
- [13] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. Translated by Huang PT. 3rd Edition. Beijing: Science Press, 2005: 98-102 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2005: 98-102
- [14] Zhao ZG, Liu XL, Liu RF. The technology of oil degumming process[J]. *Cereals Oils*, 2004(1): 3-8 (in Chinese)
赵国志, 刘喜亮, 刘锐锋. 油脂脱胶技术[J]. *粮食与油脂*, 2004(1): 3-8
- [15] Wang YY, Luan X, Wei CP, et al. Application of enzyme technology in oil processing industry[J]. *China Oils and Fats*, 2010, 35(7): 8-11 (in Chinese)
王瑛瑤, 栾霞, 魏翠平, 等. 酶技术在油脂加工业中的应用[J]. *中国油脂*, 2010, 35(7): 8-11
- [16] Liang L, Chang M, Liu RJ, et al. Research progress in phospholipase[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(4): 393-396 (in Chinese)
梁丽, 常明, 刘睿杰, 等. 磷脂酶研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(4): 393-396
- [17] Gomes Heleno MA, Baldasso PA, Ponce-Soto LA, et al. Biochemical characterization and pharmacological properties of new basic PLA₂ BrTX-I isolated from *Bothrops roedingeri* (Roedinger's Lancehead) merrins, 1942, snake venom[J]. *BioMed Research International*, 2013: 591470
- [18] Mo S, Kim JH, Cho KW. Enzymatic properties of an extracellular phospholipase C purified from a marine *Streptomyces*[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2009, 73(9): 2136-2137