

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.60068

末端环化疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶的稳定性

Study on the stability of lipase of terminally cyclized *Thermomyces lanuginosus*

宋文¹ 武霞霞² 娄海伟¹ 方惠敏²SONG Wen¹ WU Xia-xia² LOU Hai-wei¹ FANG Hui-min²

(1. 河南工业大学食品粮油学院, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学生命科学学院, 河南 郑州 450001)

(1. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China; 2. School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

摘要:目的:获取活性高、稳定性好的工业脂肪酶。方法:利用哺乳动物细胞和大肠杆菌分别表达 Butelase 1 和梳棉状嗜热丝孢菌脂肪酶 (*Thermomyces lanuginosus* lipase, TLL), 通过 Flag 亲和层析和 His 亲和层析柱进行纯化;通过纯化的 Butelase 1 连接酶对重组 TLL (rTLL) 进行末端连接,以形成首尾相连的环状 TLL (cTLL), 通过测定 rTLL 和 cTLL 活性、热稳定性、蛋白酶稳定性、抗热聚沉能力等,研究环化处理对脂肪酶的影响。结果:纯化后 cTLL 与 rTLL 的比活基本相当;70 °C 下处理 180 min, cTLL 大部分可保持可溶状态,相同条件下线性蛋白 TLL 几乎完全沉淀或降低;环化后的脂肪酶 cTLL 粒径均一、分子量分布均匀,具有更稳定的蛋白特性。结论:Butelase 1 可有效地环化梳棉状嗜热丝孢菌脂肪酶,环化后的蛋白酶活未改变,热稳定性大大提高,蛋白特性更好。

关键词:环化;疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶;Butelase 1;稳定性

Abstract: Objective: To obtain industrial standard lipase with high activity and stability, Butelase 1 ligase was used to connect the N- and C-termini of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL), and then the protein characteristics, including heat stability, protease resistance, and enzymatic kinetics were analyzed. **Methods:** His6 affinity column was used to purify recombinant Butelase 1 (rButelase 1) and TLL (rTLL) from mammalian cells and *E. coli*; rButelase 1 to was utilized connect the N- and C-termini of rTLL to generate circular rTLL (cTLL); the enzymatic activity, the heat stability, the protease resistance, the resistance to heat-induced precipitation, and the enzymatic kinetics were analyzed to

determine the difference of rTLL and cTLL. **Results:** Recombinant rButelase 1 and rTLL expressed in mammalian cells and *E. coli* were purified; cTLL was obtained, and the comparable enzymatic activity was found in both cTLL and rTLL. After heat treatment at 70 °C for 180 min, most of cTLL remained soluble and 95% of its activity, while rTLL was almost completely precipitated and lost most of its activity. cTLL has characteristics of stable proteins, such as uniform particle size and molecular weight distribution. **Conclusion:** Butelase 1 can effectively circularize lipase from *T. lanuginosus*. cTLL maintained its enzymatic activity. Meanwhile, its protein characteristics, including thermal stability and protease resistance, has also been improved.

Keywords: cyclization protein; *Thermomyces lanuginosus* lipase; Butelase 1; stability

脂肪酶 (Lipase, EC3.1.1.3) 广泛存在于各种动植物与微生物中^[1], 能够催化甘油酯水解为甘油和脂肪酸。作为重要的工业用酶, 脂肪酶已被广泛应用于食品、油脂化工等传统工业领域^[2-3]。在乳制品加工过程中添加脂肪酶, 可使奶酪中的酸、酯类 (十四酸乙酯除外) 挥发性风味物质, 如辛酸、己酸、癸酸等含量明显增加^[4]; 脂肪酶和双乙酰酒石酸单双甘油酯可改善面团持气稳定性, 显著增大面包比容和挺立度^[5]。

疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶 (*Thermomyces lanuginosus* lipase, TLL) 因催化活性高、热稳定性好、pH 值范围宽, 是一种良好的食品和工业催化用酶。但是, 由于工业加工过程中条件不稳或加工时间过长, 仍需降低生产成本、提高催化活性、延长半衰期及抵抗蛋白酶解等^[6]。

脂肪酶属于 α/β 水解酶家族。不同起源的脂肪酶序列相似度不高, 但其折叠方式和活性中心却非常相似, 均具有典型的 α/β 水解酶折叠结构, 包含 8 条平行排列的 β 折叠片, 其中 $\beta 2$ 折叠片与其余 7 条折叠片反向平行,

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31501060)

作者简介:宋文,女,河南工业大学在读本科生。

通信作者:娄海伟(1983—),男,河南工业大学讲师,博士。

E-mail: superharry@163.com

收稿日期:2022-03-15 改回日期:2022-07-11

$\beta 3 \sim \beta 8$ 折叠片通过分布在折叠片中心两侧的 α 螺旋相连^[7]。脂肪酶活性部位被一个称为“盖子”螺旋片段遮挡,当有底物存在时,酶的构象发生变化,“盖子”打开,具有活性的疏水部分被暴露出来^[8]。脂肪酶的两个末端并不直接参与催化作用,尤其是 C-末端是一段无规则卷曲结构,且两个末端空间距离较近,如果通过 Linker 将脂肪酶的 N-末端与 C-末端连接,理论上应该不会影响其催化活性,但却有可能增加其稳定性和蛋白酶耐受性。

将线性蛋白(或肽)的 C-端和 N-端通过酰胺键进行首尾环合形成环状分子称为蛋白质环化。自然界中存在天然环化结构的环肽类物质,与线性蛋白相比,末端环化能够降低蛋白折叠域与非折叠域的构象熵,因此可能具有较高的热稳定性和较稳的结构,但其功能和活性往往不受影响^[9]。

Butelase 1 发现于常见药用植物 *Clitoria ternatea* (也称为蝴蝶豌豆)的豆荚中,它特异识别目标蛋白 C 末端三肽氨基酸序列 Asn / Asp(Asx)-His-Val,以 KALVINHV 作为模型肽评估其与 XIGGIR 和 LXGGIR 的连接效率,发现 Butelase 1 能够有效环化来自各种生物的非天然肽,包括植物 *Cyclootide kalata* BI(kB1)、SFTI、芋螺毒素,昆虫抗菌肽 Thanatin 和人唾液抗菌肽 Histatin^[10]。Butelase1 催化动力学非常高,催化效率高达 542 000 L/(mol·s),是目前已知效率最高的蛋白连接(水解)酶^[11];Butelase 1 也可以环化大于 200 个氨基酸残基的重组蛋白,已报道的有白介素-1 受体拮抗剂(IL1-Ra)、绿色荧光蛋白(GFP)、人生长激素(hGH)等^[12]。

研究拟在梳棉状嗜热丝孢菌脂肪酶(TLL)的 C-端和 N-端分别添加 Butelase 1 连接酶识别序列和柔性接头,利用 Butelase 1 连接酶对 TLL 进行末端环化,分析线性和环化酶蛋白的基本酶学性质、环化提升酶蛋白热稳定性,旨在为提升工业酶的加工及应用范围提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

表达载体 pCold I、大肠杆菌 TG1、BL21(DE3):实验室保存;

限制性内切酶:宝生物工程(大连)有限公司;

DNA marker、2×Taq Mix Master:苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;

DNA 同源重组连接酶:南京诺唯赞生物科技股份有限公司;

HRP 标记的 Anti-His Tag 抗体:苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;

无内毒素质粒大提试剂盒:上海生工生物工程有限公司;

DNA 胶回收试剂盒、去内毒素 DNA 质粒大提试剂

盒:北京康为世纪生物科技有限公司;

对硝基苯基月桂酸酯(pNPL):美国 Sigma-Aldrich 公司;

HisTrap FF crude:美国 GE Healthcare 公司;

引物:北京金唯智生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒构建 从 GeneBank 数据库中获得链霉菌来源的 Butelase 1 的 cDNA 序列(GenBank 登录号 KF918345),在 N 末端加上荧光素酶信号肽,氨基酸序列为 MGVKVLFALICIAVAEA,并在 C 末端加上 Flag 标签,根据哺乳动物密码子偏爱性进行密码子优化;在优化后 DNA 的 5'端和 3'端分别添加 EcoR I 和 NotI 酶切位点,并委托上海生工生物工程有限公司进行全基因合成,获得重组质粒 pUC57-butelase1,经双酶切后连接到真核表达载体 pcDNA3.1(+),重组质粒命名为 pcDNA-butelase。从 GeneBank 数据库获取 TLL 的氨基酸序列(GenBank 登录号 ABV69591.1),在 N-末端添加 Butelase 1 连接酶柔性接头和识别序列(GGGGS)3,并在 C-末端加上 His 标签和识别序列 NHV,按上述方法,优化和合成 TLL 基因,并连接到大肠杆菌表达载体 pColdI 中,命名为 pCold-TLL。

1.2.2 重组 rButelase 1 和 rTLL 的表达与纯化 利用无内毒素质粒大提试剂盒提取重组质粒 pcDNA-butelase,同时培养 HEK 293T 细胞,当细胞密度为 70%~80% 时进行转染。转染体系为:1 μ g 的 pcDNA-butelase 质粒和 1 μ L 的 Lipofectamine 2000 分别用 25 μ L Opti-MEM 稀释后混匀,静置 10 min,加入孔板中轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h,收集细胞利用冻融法裂解细胞,收集上清。

构建好的重组 pCold-TLL 转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,阳性菌接种到 5 mL 含氨苄抗生素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养约 6 h,加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG,15 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡诱导表达 24 h,收集菌体,利用超声破碎机进行菌体破碎,收集上清。

将上述获得的重组 Butelase 1(rButelase)和重组脂肪酶 TLL(rTLL)表达上清,分别利用 Flag 亲和层析柱和 His Trap 层析柱,通过 AKTA 蛋白纯化系统进行纯化,纯化蛋白进行电泳、Western Blot 检测和活性研究。

1.2.3 重组 rTLL 的环化 根据文献^[12]的方法进行 rTLL 的环化。环化反应结束后,通过 AKTA 蛋白纯化系统进行纯化并透析脱盐。取少量纯化后的样品加入 5 倍非还原上样缓冲液处理后进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测。

1.2.4 重组 rTLL 和 cTLL 的酶学活性分析 按 GB/T 23535—2009 执行,并根据文献^[13]的方法计算酶活力。

纯化 rTLL 和 cTLL 分取 500 μ L,分别置于 40、45、50、55、60、65、70、75 $^{\circ}$ C 水浴 1 min,然后测定酶活。

1.2.5 DLS 测量蛋白粒径 按 GB/T 19007—2016 执行。

1.2.6 重组 rTLL 和 cTLL 蛋白酶抵抗 分别取 3 mg rTLL 和 cTLL,各分成 3 等份,分别加入羧肽酶 Y、亮氨酸氨基肽酶、羧肽酶 Y+亮氨酸氨基肽酶进行蛋白质游离末端水解,25 °C 反应 30 min,随后快速置于 100 °C 水浴 30 min,使羧肽酶 Y 和亮氨酸氨基肽酶失活;冷却,采用 SDS-PAGE 鉴定 rTLL 和 cTLL 的蛋白酶解情况。

1.2.7 重组 rTLL 和 cTLL 热稳定性 将溶于 1×PBS 缓冲液的纯化酶蛋白(约 2.5 μg) 分别于 70 °C 孵育 0,30,60,90,120,150,180 min;4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清,取少量上清用于 SDS-PAGE 分析降解和沉淀情况,其余样品以对硝基苯基月桂酸酯(pNPL)为底物进行酶活测定。

2 结果与分析

2.1 Butelase1 在哺乳动物表达系统中的表达与纯化

由图 1 可知,细胞破碎上清中检测到重组 Butelase 1 目的蛋白,可获得单一条带的目的蛋白,Western Blot 检测证实,此条带为重组 Butelase 1 酶。

2.2 重组 TLL 酶在大肠杆菌表达系统中的表达与纯化

由图 2 可知,诱导表达的菌体破碎后的上清液中,在 40 kD 左右处有大量蛋白表达,与重组 TLL 理论大小相同,说明目的蛋白 TLL 在 BL21(DE3)中得到了高效的可溶性表达。由于表达的重组蛋白上含有 His-Tag,因此可以通过 Ni 柱亲和和层析进行纯化,并透析除盐,经密度扫描分析显示纯化的目的蛋白纯度可达 95%左右。

2.3 cTLL 环化结果与酶学活性分析

由图 3 可知,cTLL 表观分子量略小于 rTLL,与 40 kD 的 Marker 基本平齐,与 Hemu 等^[14]的研究结论相一致。

由图 4 可知,当温度为 55 °C 时,rTLL 和 cTLL 的酶活达到最大值;当温度偏离 55 °C 最适温度越多,酶活降低越多,当温度为 75 °C 时,酶活仅为最大值的 68.6%。

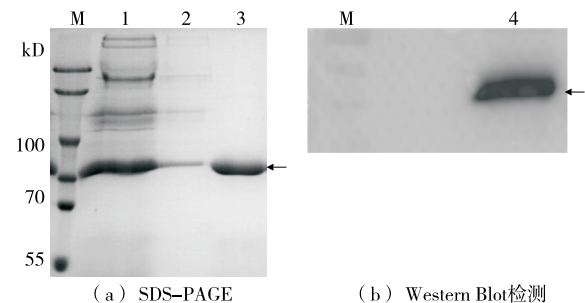


Figure 1 Expression and purification of Butelase 1

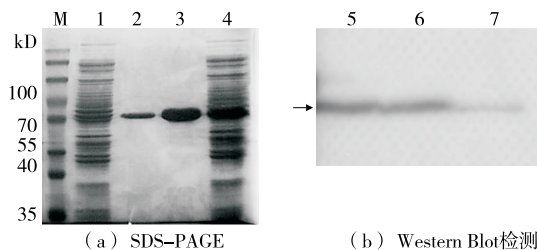


Figure 2 Purified rTLL was detected by SDS-PAGE and Western blotting

图 2 rTLL 酶的纯化

Figure 2 Purified rTLL was detected by SDS-PAGE and Western blotting

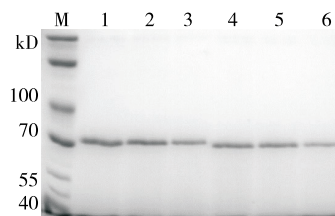


Figure 3 SDS-PAGE analysis of TLL cyclization results

图 3 SDS-PAGE 分析 TLL 环化结果

Figure 3 SDS-PAGE analysis of TLL cyclization results

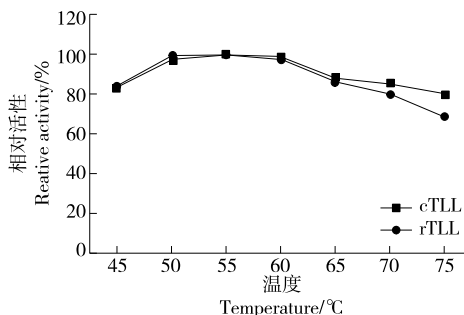


Figure 4 Lipase activity at different temperatures

图 4 脂肪酶在不同温度下的活性

2.4 重组 TLL 和 cTLL 蛋白酶解分析

由图 5 可知,蛋白酶解 30 min 后,rTLL 蛋白的 3 种处理均出现不同程度的降解情况,因为羧肽酶 Y 酶活较弱,因此 rTLL 降解比例较小,羧肽酶 Y 和亮氨酸氨基肽酶共同作用时,rTLL 蛋白几乎完全降解;而 cTLL 的 3 种处理蛋白降解均不明显。

2.5 TLL 和 cTLL 的蛋白粒径分析

由图 6 可知,rTLL 蛋白粒径不均一、分散性较差、蛋白团聚明显,PDI 为 0.313;环化后 cTLL 蛋白粒径均一、分子量分布均匀,平均粒径约为 160 nm,PDI 为 0.173。PDI 是聚合物分散性指数,描述聚合物分子量分布;PDI 越大,分子量分布越宽;PDI 越小,分子量分布越均匀。环化后的 cTLL 分子量分布越均匀。

2.6 稳定性分析

由图 7 可知,线性化的 rTLL 在加热 30 min 后,其稳定性便迅速下降,处理 180 min 后已形成大量沉淀,SDS-PAGE 电泳结果显示可溶部分比例非常少;而对 cTLL 进行 70 °C 加热处理后,蛋白沉淀和降解较弱,直至加热

120 min 后,蛋白条带才有肉眼可见的减少,表明末端连接的分子环化明显提升了 TLL 的热稳定性。

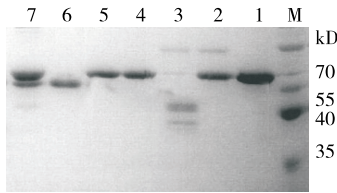
3 结论

蛋白质是由线形的氨基酸折叠而形成的具有一定的生物学功能和三维结构,由于蛋白质肽链的末端容易受到蛋白水解酶类的攻击,通过人工方法使肽链的氨基端和羧基端形成一个肽键,从而形成环形的骨架有利于抵御蛋白水解酶类的攻击^[15],事实也证实大部分蛋白环化后稳定得到了很大提高。Butelase 1 具有高催化活性并在反应中使用的酶量较少,简化了所需连接酶的纯化步骤;具有广泛的底物特异性,识别序列短至 3 个氨基酸,拓宽了酶的应用范围;在连接位点引入极少的残基,应用范围广。

研究利用哺乳动物表达系统 HEK 293T 细胞得到 Butelase 1 连接酶。哺乳动物细胞表达系统优势在于能够指导蛋白质的正确折叠,在提供复杂的 N 型糖基化和准确的 O 型糖基化等多种翻译后加工功能,因而表达产物在分子结构、理化特性和生物学功能方面最接近于天然的高等生物蛋白质分子。同时,在大肠杆菌中高效可溶表达和纯化得到了有活性的重组的疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶,通过 Butelase 1 催化获得了环化的环状疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶蛋白,纯化后环状疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶与重组疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶的比活基本相当,但有着更好的稳定性。但研究仅是对环化后的脂肪酶进行了耐热性试验,后续还应对其耐离子强度、pH 值敏感性等特性进行研究,以更好的评估其应用前景。

参考文献

[1] BHARATHI D, RAJALAKSHMI G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 22: 101368.
 [2] JOSHI R, KUILA A. Lipase and their different industrial applications: A review[J]. Brazilian Journal of Biological Sciences, 2018, 5 (10): 237-247.
 [3] 陈彦婕,唐嘉诚,宫莹,等. 鱼油提取、多不饱和脂肪酸富集及 EPA 和 DHA 的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 205-210, 220.
 CHEN Y Y, TANG J C, GONG X, et al. Research progress on extraction of fish oil, enrichment of polyunsaturated fatty acids and application progress of EPA and DHA[J]. Food & Machinery, 2021, 37(11): 205-210, 220.
 [4] SAXENA R K, MISRA S, RAWAT I, et al. Production of 1,3 regio-specific lipase from *Bacillus* sp. RK-3: Its potential to synthesize cocoa butter substitute[J]. Malaysian Journal of Microbiology, 2011, 7(1): 41-48.



M. 蛋白质分子质量标准 1. cTLL 对照 2. cTLL/羧肽酶+亮氨酸氨基肽酶 3. rTLL/羧肽酶+亮氨酸氨基肽酶 4. cTLL/亮氨酸氨基肽酶 5. rTLL/亮氨酸氨基肽酶 6. cTLL/羧肽酶 7. rTLL/羧肽酶

图 5 SDS-PAGE 分析羧肽酶 Y、亮氨酸氨基肽酶降解 rTLL 和 cTLL

Figure 5 SDS-PAGE analysis of carboxypeptidase Y and leucineaminopeptidase degradation of rTLL and cTLL

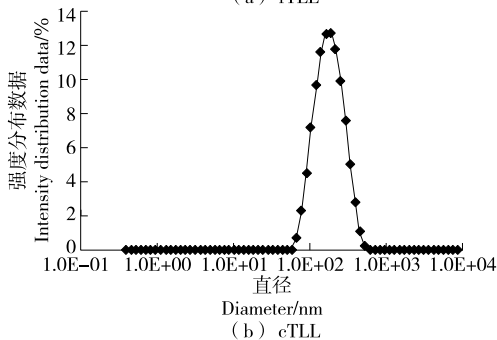
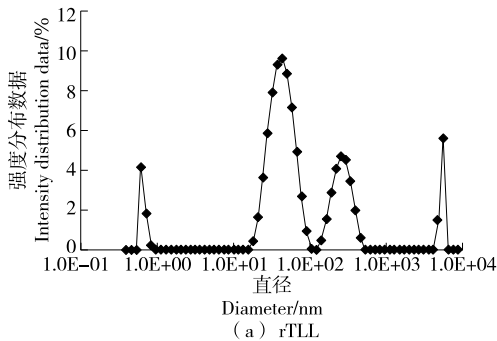
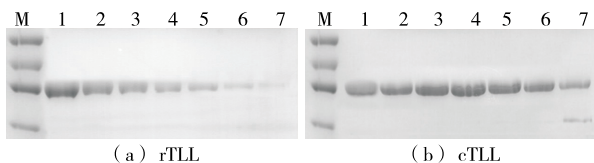


图 6 DLS 分析蛋白粒径

Figure 6 Protein particle size measured by DLS



M. 蛋白质分子质量标准 1~7. 70 °C 加热 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min

图 7 rTLL 和 cTLL 热稳定性分析

Figure 7 Thermal stability analysis of rTLL and cTLL

(下转第 54 页)

- [6] GUILLON F, CHAMP M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology[J]. *Food Research International*, 2000, 33(3/4): 233-245.
- [7] 郭孝源, 陆启玉, 章绍兵, 等. 不同种类油脂对面粉品质的影响研究[J]. *食品科技*, 2013, 38(4): 160-164.
GUO X Y, LU Q Y, ZHANG S B, et al. Effects of different kinds of oils and fats on flour quality [J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(4): 160-164.
- [8] 张书静, 王展, 沈汪洋, 等. 膳食纤维对面团和面筋蛋白影响的研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(12): 7-9.
ZHANG S J, WANG Z, SHEN W Y, et al. Research progress on the effects of dietary fiber on dough and gluten protein[J]. *Grain and Oil*, 2020, 33(12): 7-9.
- [9] WANG C C, YANG Z, XING J J, et al. Effects of insoluble dietary fiber and ferulic acid on the rheological properties of dough [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 121: 107008.
- [10] 张玉爽, 李景明, 倪元颖, 等. 朝鲜蓟超微粉对面团特性及馒头品质的影响[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(24): 65-71.
ZHANG Y H, LI J M, NI Y Y, et al. Effects of artichoke superfine flour on dough characteristics and steamed bread quality[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(24): 65-71.
- [11] XIAO F, ZHANG X, NIU M, et al. Gluten development and water distribution in bread dough influenced by bran components and glucose oxidase [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 137: 110427.
- [12] YAZAR G, KOKINI J L, SMITH B. Effect of endogenous wheat gluten lipids on the non-linear rheological properties of the gluten network[J]. *Food Chemistry*, 2022, 367: 130729.
- [13] MERT B, DEMIRKESEN I. Reducing saturated fat with oleogel/shortening blends in a baked product[J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 809-816.
- [14] LIU N, MA S, LI L, et al. Study on the effect of wheat bran dietary fiber on the rheological properties of dough [J]. *Grain & Oil Science and Technology*, 2019, 2: 1-5.
- [15] GORANOVA Z, MARUDOVA M, BAEVA M. Influence of functional ingredients on starch gelatinization in sponge cake batter[J]. *Food Chemistry*, 2019, 297: 124997.
- [16] WANG M, ZHAO Z, NIU M, et al. Thermomechanical behaviors and protein polymerization in bread dough modified by bran components and transglutaminase[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 133: 109894.
- [17] CAI J, CHAO C, NIU B, et al. New insight into the interactions among starch, lipid and protein in model systems with different starches[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 106323.
- [18] NHOUCHI Z, BOTOSOA E P, CHÈNÉ C, et al. Mid infrared as a tool to study the conformational structure of starch and proteins with oil addition during gelatinization[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 157: 113093.
- [19] WANG S, CHAO C, CAI J, et al. Starch-lipid and starch-lipid-protein complexes: A comprehensive review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19: 1 056-1 079.
- [20] MILICEVIC N, SAKAC M, HADNADEV M, et al. Physico-chemical properties of low-fat cookies containing wheat and oat bran gels as fat replacers[J]. *Journal of Cereal Science*, 2020, 95: 103056.

(上接第 43 页)

- [5] 王家宝, 黄美凤, 杨笛, 等. 脂肪酶替代双乙酰酒石酸单双甘油酯对压面面团流变学和面包烘焙特性的影响[J]. *食品与机械*, 2020, 36(9): 38-42.
WANG J B, HUANG M F, YANG D, et al. A comparative study of lipase and diacetyl tartaric esters of mono-glycerides(DATEM) on rheological properties of dough by pressing process and baking properties of bread[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(9): 38-42.
- [6] LOKHA Y, ARANA-PEN˜A S, RIOS N S, et al. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 133: 109461.
- [7] BAUER T L, BUCHHOLZ P C F, PLEISS J. The modular structure of α/β -hydrolases[J]. *The FEBS Journal*, 2020, 287(5): 1 035-1 053.
- [8] HAMDAN S H, MAIANGWA J, ALI M S M, et al. Thermostable lipases and their dynamics of improved enzymatic properties[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(19): 7 069-7 094.
- [9] PURKAYASTHA A, KANG T J. Stabilization of proteins by covalent cyclization [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2019, 24(5): 702-712.
- [10] HEMU X Y, ZHANG X H, BI X B, et al. Butelase 1-mediated ligation of peptides and proteins[J]. *Enzyme-Mediated Ligation Methods*, 2019, 2 012: 83-109.
- [11] CAO Y, BI X. Butelase-1 as the prototypical peptide asparaginyl ligase and its applications: A review[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2022, 28(1): 1-16.
- [12] CAO Y, NGUYEN G K T, TAM J P, et al. Butelase-mediated synthesis of protein thioesters and its application for tandem chemoenzymatic ligation[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2015, 51(97): 17 289-17 292.
- [13] 季亚美, 王立梅, 齐斌. 常压室温等离子体诱变选育高产脂肪酶解脂耶氏酵母[J]. *食品与机械*, 2020, 36(11): 10-15.
JI Y M, WANG L M, QI B. Breeding of *Yarrowial ipolytica* with high lipase production by atmospheric room temperature plasma mutagenesis[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(11): 10-15.
- [14] HEMU X, ZHANG X, NGUYEN G K T, et al. Characterization and application of natural and recombinant butelase-1 to improve industrial enzymes by end-to-end circularization [J]. *RSC Advances*, 2021, 11(37): 23 105-23 112.
- [15] NAUMANN T A, SAVINOV S N, BENKOVIC S J. Engineering an affinity tag for genetically encoded cyclic peptides [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 92(7): 820-830.