

土壤宏基因组文库来源酯酶的鉴定与表征

李云娣 曹明明 顾昕琪 郑林格 龙伊迪 蔡栋梁 王绍琛 冯治洋*

(南京农业大学食品科技学院 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】利用宏基因组学技术挖掘土壤微生物来源的新型酯酶。【方法】构建土壤微生物宏基因组文库,利用三丁酸甘油酯平板法对所构建的文库进行筛选,并对阳性克隆中鉴定出的酯酶基因进行异源表达和生物化学特性分析。【结果】通过筛选文库中的 12 万个克隆,获得了一个阳性克隆,对克隆中的 DNA 片段进行序列分析,发现了一个可能的酯酶基因,通过研究其表达产物,确定其最适 pH 为 9.0,最适反应温度为 56 °C,在 90 °C 下仍可保持 20% 的酶活性;能专一性水解短链脂类,对长链脂类无水解作用;对一定浓度范围内的有机试剂如二甲基亚砷、甲醇、乙醇有较好的耐受性,尤其当二甲基亚砷含量为 10% (体积比)时,相对酶活可提高 44%。【结论】不依赖于微生物可培养性的宏基因组学技术可以发现新的活性酶,本研究获得的对高温、有机试剂有较好耐受性的酯酶 ESTYN1 具有在工业生产中的应用的潜力。

关键词: 宏基因组学, 酯酶, 功能性筛选, 土壤微生物

Identification and characterization of a new esterase from a soil metagenomic library

LI Yun-Di CAO Ming-Ming GU Xin-Qi ZHENG Lin-Ge LONG Yi-Di
CAI Dong-Liang WANG Shao-Chen FENG Zhi-Yang*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] To discover novel esterase from soil microbes by metagenomic approach. [Methods] Tributyrin-containing LB agar plates were used to screen a metagenomic library and the predictive esterase gene on the positive clone was heterologously expressed for biochemical analysis. [Results] We successfully found a positive clone from a soil microbial metagenomic library that comprised of 120 000 clones by function-based screening. Then the putative esterase gene (*estyn1*) of this clone was heterologously expressed and its properties including optimum pH, optimal temperature, and tolerance to organic solvents and metal ions were studied. Its optimum pH was 9.0 and its optimal temperature was 56 °C. The esterase activity was enhanced in low concentration of organic solvents, especially in DMSO (dimethylsulfoxide, activity enhanced to 144% at 10% DMSO). [Conclusion]

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31370088, 31500035); Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (No. KYZ201546)

*Corresponding author: Tel: 86-25-84399511; E-mail: zfeng@njau.edu.cn

Received: September 28, 2016; Accepted: December 01, 2016; Published online (www.cnki.net): February 08, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370088, 31500035); 国家高校基本科研基金项目(No. KYZ201546)

*通讯作者: Tel: 86-25-84399511; E-mail: zfeng@njau.edu.cn

收稿日期: 2016-09-28; 接受日期: 2016-12-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-08

Novel enzymes could be discovered by metagenomic approach. ESTYN1, with good tolerance to organic solvents and high temperature, would be a promising enzyme for industrial production.

Keywords: Metagenomics, Esterases, Functional-based screening, Soil microorganisms

土壤中含有的丰富的微生物是现代小分子药物、工业酶类的重要来源。传统的微生物活性酶是通过微生物的分离、培养和发酵来获得。然而有研究表明,在现有实验条件下,土壤中可培养微生物不足全部微生物的1%^[1],这极大地限制了研究者对微生物资源的研究与利用。20世纪90年代末期,宏基因组学方法^[2-3]的提出则成为解决这一重大难题的有力工具。该方法提取土壤中全部微生物基因组DNA,然后将其克隆到合适的载体后在宿主中进行功能性表达,极大地丰富了不可培养微生物遗传资源的开发利用。目前利用宏基因组学方法已成功地发现了木聚糖酶^[4]、糖基水解酶^[5]、淀粉酶^[6]、酯酶^[7]等生物活性酶。

酯酶(EC3.1.1.1)是脂肪水解酶的一个家族,因其能催化底物水解,合成短链酯类^[8-9],因而被广泛应用在食品生产、清洁剂、化妆品、天然产物修饰等^[10-12]行业中。酯酶广泛存在于植物、动物、微生物中。由于微生物具有大规模工业化生产的产量高、反应稳定、操作简单等诸多优点,因而工业用酯酶大都是微生物来源^[13-15]。很多研究者成功地从不同DNA来源的宏基因组文库中发现耐高温、耐有机试剂、耐酸碱的特异酯酶^[16-19],为新型酯酶的开发提供了一个有力工具。

本研究通过筛选含有12万个克隆的云南土壤宏基因组文库,获得了一个具有酯解活性的克隆。对该克隆中的酯酶基因*estyn1*进行异源表达,检测ESTYN1最适反应温度、最适pH,以及对不同有机溶剂、金属离子及金属离子螯合剂EDTA的耐受性。对温度和有机试剂有较好耐受性的酯酶ESTYN1有潜力作为生物催化剂应用在工业生产中。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和载体: pTG19-T购自上海捷瑞生物工程有限公司; *E. coli* EPI100、pET-28a(+)和 *E. coli*

BL21(DE3)由本课题组保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器: pWEB-TNCTM Cosmid Cloning Kit 试剂盒购自 Epicentre 公司; *Xho* I、*Sau*3A I、*Bam*H I、*Nco* I、CIAP 购自宝生物工程有限公司; T4 连接酶、三丁酸甘油酯购自赛默飞世尔科技有限公司; 质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根有限公司; 胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素购自上海捷瑞生物有限公司。

梯度PCR仪(Hema 9600), 珠海黑马医学仪器有限公司; 稳压稳流电泳仪(GYY-6C), 北京六一生物技术有限公司; 紫外凝胶成像仪(Gel X1520), 上海欧翔科学仪器有限公司; 高速冷冻离心机(CT15RT), 上海天美科学仪器有限公司; -80 °C 超低温冰箱(WUF-400), DAHAN 科学仪器有限公司; 超声波破碎仪(VCX750), 上海思伯明仪器设备有限公司; 酶标仪(Multiskan FC), Thermo Scientific 科技有限公司。

1.1.3 LB培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0; 对于含抗性质粒的克隆, 对应添加氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素至终浓度 100、15、30 mg/L; 筛选培养基为固体LB培养基添加1%三丁酸甘油酯, 1%阿拉伯树胶。

1.2 实验方法

1.2.1 文库构建: 按照 pWEB-TNCTM Cosmid Cloning Kit 试剂盒操作步骤, 并结合已发表的宏基因组文库构建方法^[20], 构建宏基因组文库。

1.2.2 功能性筛选酯酶菌株: 预实验确定合适菌落稀释度至150 mm培养板上菌落数为400-500左右。将文库菌稀释涂布在含1%三丁酸甘油酯底物的培养平板上, 37 °C培养3-5 d后观察产生透明水解圈的阳性克隆子^[21-22]。挑取阳性克隆子, 再次于含100 mg/L氨苄青霉素和1%三丁酸甘油酯的LB培养基上验证为阳性后, 将阳性克隆接种于LB液体培养基中37 °C、220 r/min培养过夜, 采用天

根质粒小提试剂盒抽提质粒。

1.2.3 亚克隆制备: 用稀释后终浓度为 0.01 U/ μ L 的 *Sau3A* I 限制性内切酶对产酯酶柯斯质粒进行不完全酶切, 随后进行琼脂糖凝胶电泳检测, 将 1–4 kb 之间的酶切 DNA 产物进行切胶回收。

将胶回收的 DNA 片段和 *Bam*H I 酶切过的 pWEB-TNC 载体通过 T4 连接酶连接, 电转化后涂布在含三丁酸甘油酯底物的培养平板上筛选有酯酶活性的亚克隆菌株。对亚克隆中所含质粒的插入片段进行测序, 通过在 NCBI 上的 BLAST 比对分析, 获得酯酶的基因序列。

1.2.4 构建重组表达质粒: 利用引物 ESTYN1-F (5'-CATGCCATGGTATGACACATCAAAGACG-3') 和 ESTYN1-R (5'-CCGCTCGAGGCTTCTGGTCCGAGTAATCGA-3') 扩增酯酶基因 *estyn1*, 上下游引物下划线处表示 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点, 粗体表示起始密码子。PCR 反应体系(50 μ L): 超纯水 35.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5.0 μ L, dNTP mixture 4.0 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 2.0 μ L, 阳性亚克隆质粒 pWEB-TNC-*estyn1* (100 ng/ μ L) 1.0 μ L, DNA 聚合酶 (1.0 U/ μ L) 0.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 61 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物克隆至 pTG19-T 载体后进行蓝白斑筛选, 测序验证扩增产物序列。

将测序验证正确的重组质粒 pTG19-T-*estyn1* 中的酯酶基因用 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切回收后, 与相同酶切的 pET-28a(+) 表达载体连接构建原核重组表达质粒 pET-28a(+)-*estyn1*。将其电转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 大肠杆菌表达宿主中, 进行后续诱导表达。

1.2.5 诱导表达、纯化蛋白: (1) 将获取的具有酯酶基因的重组菌接种至对应抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜。(2) 取适量培养过夜的菌液转接至 400 mL 新鲜 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD_{600} 在 0.6–0.8 之间。(3) 添加 IPTG 至其终浓度为 0.4 mmol/L, 将温度、转速分别调至 18 $^{\circ}$ C、200 r/min 后继续培养 18 h。

将诱导表达 18 h 左右的菌液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 条件下离心 15 min 收集菌体。将菌体

悬浮于 10 mL 裂解液(50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1% Triton)后超声破碎(冰水浴, 超声 1.5 s 间隔 2.0 s, 20 min), 离心(4 $^{\circ}$ C, 15 000 r/min, 30 min)取上清液过偶联镍离子的亲和层析柱, 将上清液中的酯酶蛋白偶联到亲和柱上, 10 倍体积的清洗液(50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl)清洗后, 利用洗脱液(50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑)将蛋白从柱上洗脱下来。纯化后的蛋白利用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测, 凝胶中聚丙烯酰胺浓度为 12%。

1.2.6 ESTYN1 酶促反应最适温度和最适 pH 的确定: 将总体积为 95 μ L, 含有 0.5 mmol/L 对硝基苯酚酸酯的相应 pH 缓冲液在相应反应温度下预热 1 min 后, 加入 5 μ L 的 ESTYN1 酶, 温育 10 min 后加入 20 μ L 20% SDS 终止反应。不同 pH 条件下的缓冲液分别为 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0–8.0) 和 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0–10.0)。测定温度在 10–70 $^{\circ}$ C 范围时 10 $^{\circ}$ C 为一个温度梯度, 在 50–70 $^{\circ}$ C 酶活性较高的范围时 2 $^{\circ}$ C 为一个温度梯度。每个反应 3 个平行。

1.2.7 ESTYN1 酶对不同有机试剂的耐受性: 向反应体系(0.5 mmol/L 对硝基苯酚酸酯, 5 μ L ESTYN1 酶, 50 mmol/L pH 9.0 的 Tris-HCl; 以下反应体系均为此体系)内分别添加 10%–50% (体积比)的甲醇、二甲基亚砜、乙醇等有机试剂, 检测有机试剂对酯酶 ESTYN1 酶活的影响。以添加有机试剂、未加酯酶的反应体系作为其空白对照, 以添加酯酶、未加有机试剂的反应酶活定义为 100%。

1.2.8 不同金属离子及 EDTA 对 ESTYN1 酶活的影响: 向反应体系内分别加入氯化锌、氯化铜、氯化钴、氯化锰、氯化钙、氯化镍至 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 终浓度为 5 mmol/L, 检测金属离子对酯酶 ESTYN1 酶活的影响。以添加金属离子、未加酯酶的反应体系作为其空白对照, 以添加酯酶、未加金属离子的反应酶活定义为 100%。

向反应体系内加入 EDTA 至终浓度分别为 5、10、15 mmol/L, 检测不同浓度的 EDTA 对酶活

的影响。以添加 EDTA 未加酯酶的反应体系作为空白对照,以添加酯酶未加 EDTA 的反应酶活定义为 100%。

1.3 核苷酸序列登记号

ESTYN1 酯酶基因 *estyn1* 核苷酸序列在 GenBank 数据库中的登录号为 KU737522。

2 结果与分析

2.1 阳性亚克隆目标基因序列分析

通过筛选含 12 万个克隆的云南土壤宏基因组文库,获得了一个在三丁酸甘油酯平板上产生水解透明圈的克隆菌。随后的亚克隆筛选和质粒序列分

析发现了一个 1 122 bp 的可能酯酶基因,其蛋白序列与来源于非培养微生物的某酯酶(AIT69749.1)具有 70%的相似性,同时还与来自于可培养 *Fibrisoma limi* 菌株的酯酶(WP009281746.1)有 41%的相似性。

将该酯酶 ESTYN1 蛋白序列和已发现的其它酯酶蛋白序列构建近邻系统发育进化树(图 1)。参照目前最常用的羧酸酯水解酶八大家族分类标准^[23],获得的酯酶归属于第 III 家族。酯酶 ESTYN1 含有高保守 α/β 水解酶亚家族 Ser¹⁹⁵Ala³⁰⁶His³⁹³ 的催化三联体^[24];同时,与很多其他酯酶相似,亲核的氨基酸残基 Ser²³² 位于酯酶保守的 G-X-S-X-G 五肽基序中,构成一个重要的活性催化位点^[25](图 2)。

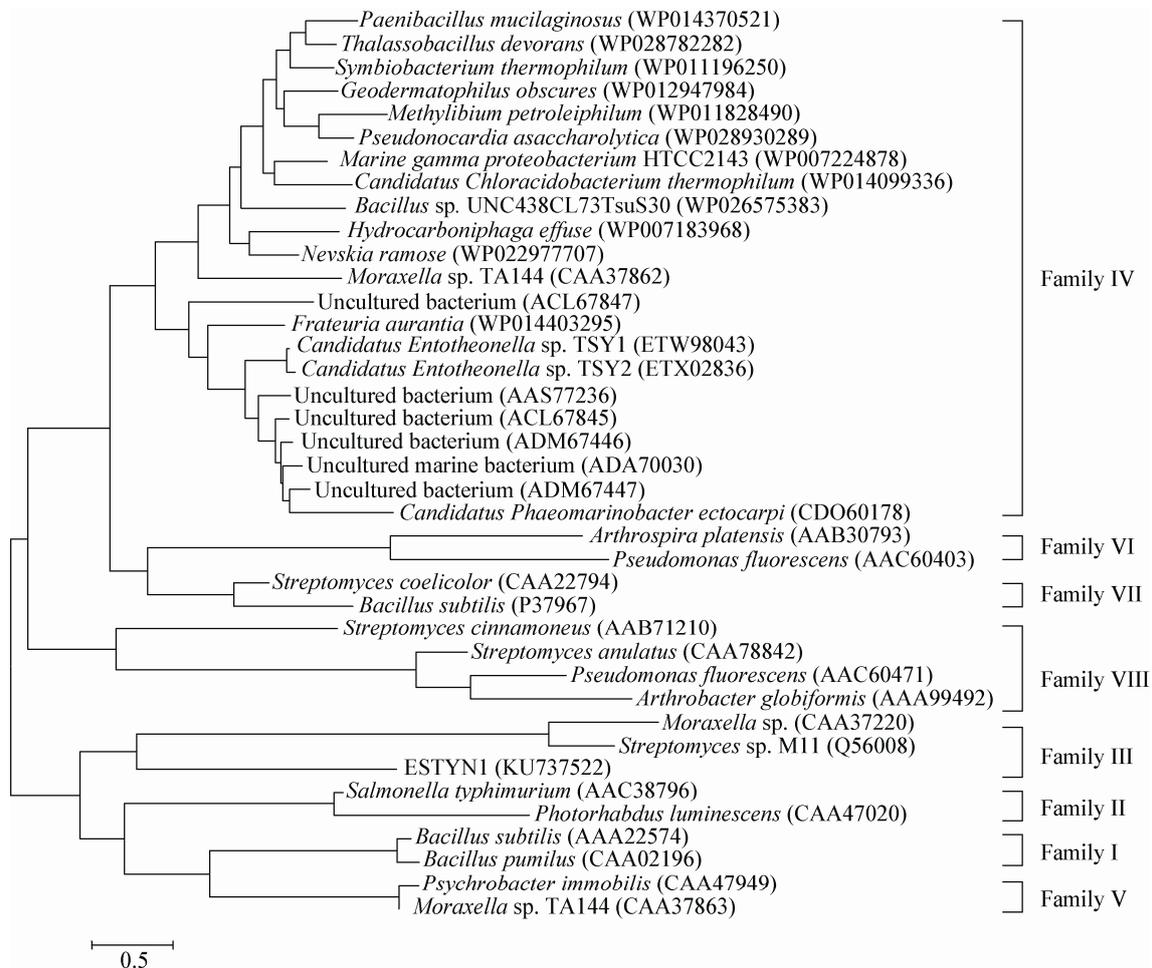


图 1 ESTYN1 进化树分析

Figure 1 Neighbour-joining analysis of ESTYN1

注: 括号中的序号为不同来源酯酶的序列登录号; 标尺指示遗传距离。

Note: The numbers in parentheses indicate the accession numbers for different esterase sequences; The scale bar represents the number of substitutions per site.

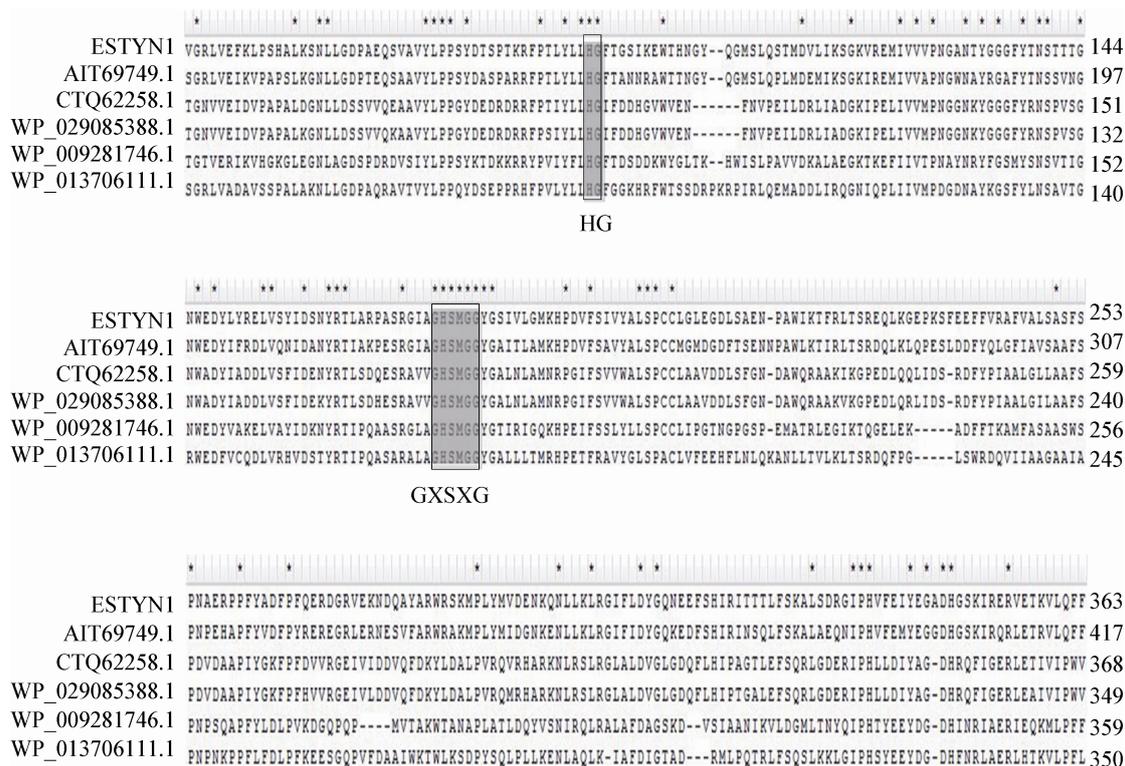


图 2 ESTYN1 与其他已知微生物酯酶的多序列比对

Figure 2 Multiple-sequence alignments of ESTYN1

注: 星号表示为保守区域; 第一个方框内为 HG 核心保守区域; 第二个方框内为 G-X-S-X-G 核心保守区域。

Note: Regions of high identity or similarity among sequences are shown as asterisks. The first box is HG conservative region; The second box is G-X-S-X-G conservative region.

2.2 重组表达体系的构建与 ESTYN1 的表达纯化

以阳性亚克隆重组质粒为模板, 以 ESTYN1-F 和 ESTYN1-R 为引物 PCR 扩增出大小为 1.1 kb 左右的 *estyn1* 基因(图 3), 与 pET-28a(+)载体连接后获

得 pET-28a(+)-*estyn1*, 电转化至 *E. coli* BL21(DE3) 宿主菌中进行表达。

将含 pET-28a(+)-*estyn1* 的 *E. coli* BL21(DE3)重组菌表达后的蛋白利用镍柱对含有 His-tag 标签的 ESTYN1 蛋白进行分离纯化, SDS-PAGE 电泳检测纯化后蛋白, 其大小和根据氨基酸组成预测的分子量 41 kD 大小基本一致(图 4)。

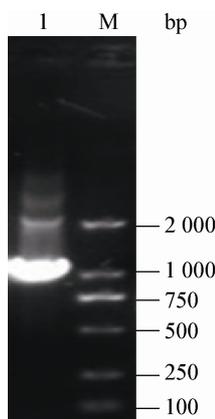


图 3 电泳检测 *estyn1* 基因

Figure 3 Electrophoresis analysis of *estyn1*

注: 1: *estyn1* PCR 产物; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1: PCR product of *estyn1*; M: DL2000 DNA marker.

2.3 ESTYN1 酶促反应最适温度和最适 pH 的确定

因为前期预实验时, 该酯酶与酸性缓冲体系混合后出现絮状沉淀, 无法通过吸光度检测准确表征酶活力。由此表明该酯酶是碱性酯酶, 而酯酶活性检测实验也只在中性和碱性 pH 缓冲液内测定。

预实验初步确定较适温度是 60 °C。在此温度下, 分别在 pH 7.0、8.0、9.0、10.0 条件下反应, 分析数据发现 pH 9.0 时酶活最高, 因此在 pH 9.0 缓冲体系中确定最适温度。

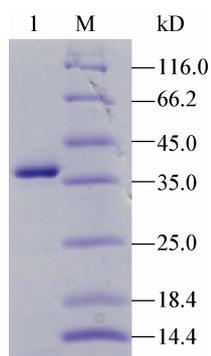


图4 SDS-PAGE 检测过镍柱纯化后的酯酶蛋白

Figure 4 SDS-PAGE detection of purified protein

注: 1: 纯化后蛋白; M: 蛋白 Marker.

Note: 1: Purified protein; M: Protein marker.

在 pH 9.0 反应体系下, 检测酯酶在 10、20、30、40、50、60、70 °C 不同温度下的相对酶活, 初步确定较高酶活温度范围是 50–70 °C。在 50–70 °C 范围内以 2 °C 为温度梯度, 最终确定 56 °C 为酯酶 ESTYN1 酶促反应最适温度(图 5)。在最适温度 56 °C 下测定 pH 7.0、8.0、9.0、10.0 缓冲条件下的酶活, 最终确定酯酶 ESTYN1 酶促反应最适 pH 为 9.0 (图 6)。

2.4 ESTYN1 酶促反应底物特异性

在 56 °C、pH 9.0 条件下, 向反应体系内分别添加 C4 底物对硝基苯酚丁酸酯和 C14 底物对硝基苯酚肉豆蔻酸酯至终浓度为 0.5 mmol/L, 检测酯酶水解底物能力。结果表明, 该酶对 C4 底物有良好的催化水解性, 但是对 C14 底物却几乎没有活性(图 7)。这些现象表明纯化后的 ESTYN1 是酯酶, 不是脂肪酶, 只专一水解短链脂肪酸酯底物。

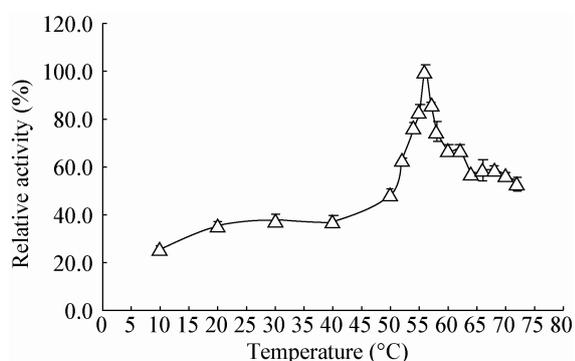


图5 温度-活力曲线图

Figure 5 Effects of temperature on activities of ESTYN1

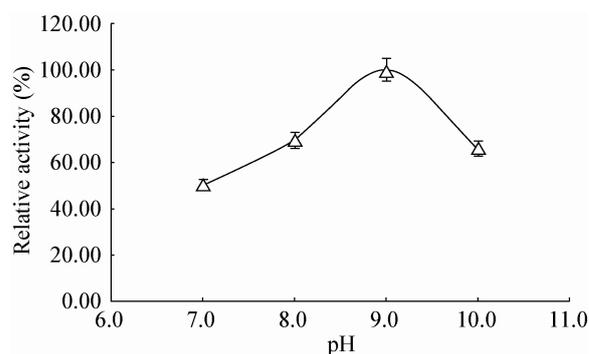


图6 pH-活力曲线图

Figure 6 Effects of pH on activities of ESTYN1

2.5 ESTYN1 酶对不同有机试剂的耐受性

在 56 °C、pH 9.0 条件下, 向反应体系中添加不同体积的有机试剂: 甲醇、二甲基亚砜、乙醇, 测定不同反应条件下的酶活值结果如图 8 所示。在 10%二甲基亚砜有机试剂存在的反应体系内, 酯解酶活力最强, 相对活性高达 144%。在 10%甲醇、10%–30%二甲基亚砜、10%乙醇有机溶剂存在的缓冲体系内, 酯酶 ESTYN1 活性均大于不添加有机试剂的阳性对照。这些结果表明一定浓度的甲醇、二甲基亚砜、乙醇等有机缓冲体系适合作为酯酶 ESTYN1 催化反应的溶剂体系, 以此发挥其最大酶活性, 同时也表明了酯酶 ESTYN1 对有机试剂有很好的耐受性。

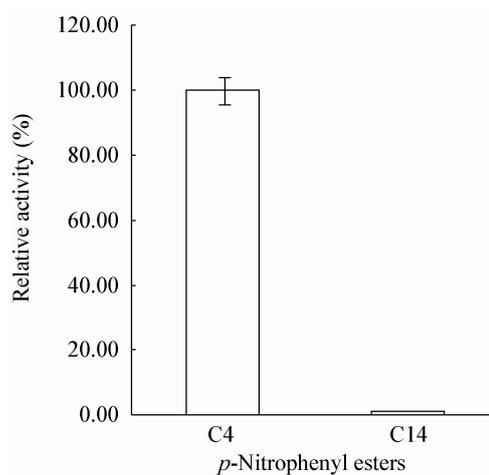


图7 ESTYN1 底物特异性

Figure 7 Substrate specificity of ESTYN1

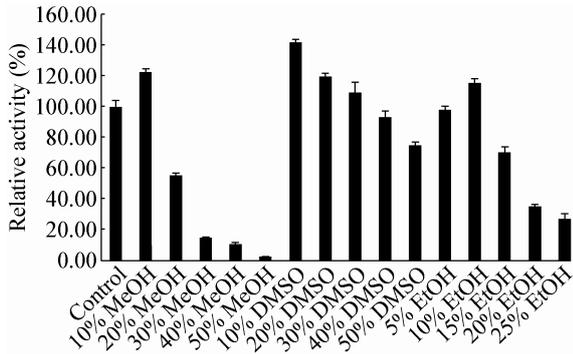


图 8 酯酶 ESTYN1 对不同有机溶剂的耐受性
Figure 8 Different organic solvents on activities of ESTYN1

2.6 不同金属离子及 EDTA 对 ESTYN1 酶活的影响

在 56 °C、pH 9.0 条件下, 向反应体系中分别加入 Zn²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Ni²⁺金属离子至终浓度为 5 mmol/L, 发现除 Zn²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺外, 其它均出现不溶解絮状沉淀物, 因此只检测了 Zn²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺金属离子对酯酶 ESTYN1 的影响。在终浓度为 5 mmol/L 的 Zn²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺金属离子存在的缓冲体系内, 酯酶 ESTYN1 酶活相对不加金属离子的缓冲体系内酶活都有减少, 这些结果表明金属离子会抑制酯酶 ESTYN1 酶活性(图 9)。

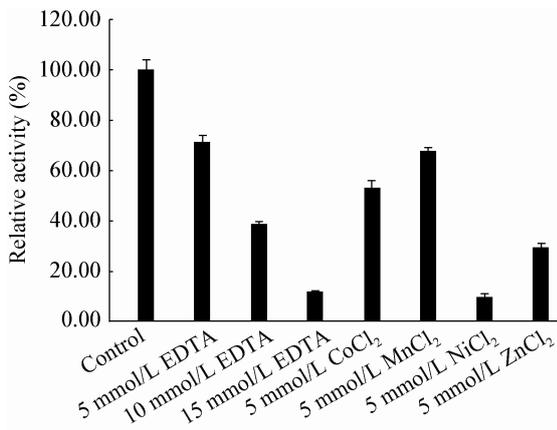


图 9 EDTA 及不同金属离子对酯酶 ESTYN1 活性的影响
Figure 9 Effect of EDTA and metal ions on activities of ESTYN1

在 56 °C、pH 9.0 条件下, 向反应体系中添加 EDTA 至终浓度分别为 5、10、15 mmol/L, 结果表明不同浓度金属螯合剂 EDTA 的存在均降低了酯酶 ESTYN1 的酶活性(图 9)。

2.7 不同反应温度及反应时间对 ESTYN1 酶活的影响

在 pH 9.0 条件下, 将反应体系在 56、70、80、90 °C 温度下分别反应 15、30、45、60 min, 检测 ESTYN1 酶活性(图 10)。

在最适温度 56 °C 时酯酶 ESTYN1 有很好的热稳定性, 即使在长达 60 min 的反应时间内, 酶活仍能维持 70%以上。随着温度(56、70、80、90 °C)的升高, 酶活有所下降, 但即使是在 90 °C 的高温下 60 min, 酯酶 ESTYN1 仍然保持着 20%的相对酶活力, 体现了酯酶 ESTYN1 较好的热稳定性。

3 结论与讨论

从土壤微生物宏基因组文库中筛选到酯解三丁酸甘油酯底物的酯酶 ESTYN1, 再次证明宏基因组学方法是筛选特异活性酶类的有力工具^[4,6,26]。

酶学性质分析确定了酯酶 ESTYN1 最适催化温度为 56 °C, 最适 pH 是 9.0。ESTYN1 酯酶为水解短链脂类(链长度少于 10 个碳原子的酯类)的酯酶。研究发现该酶在较低浓度的二甲基亚砜、甲醇、乙醇等有机试剂存在时活性有所提高, 在较高浓度

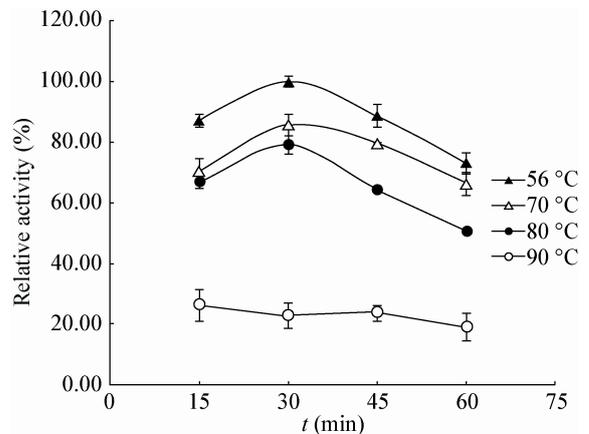


图 10 温度、时间-活力曲线图
Figure 10 Effects of temperature and time on activities of ESTYN1

的有机试剂条件下也能保持较高的活性,表明了该酯酶对有机溶剂有很好的耐受性。同时,酯酶 ESTYN1 对高温也有较好的耐受性,因此该酯酶有潜力作为生物催化剂应用于工业生产中。

参 考 文 献

- [1] Torsvik V, Goksøyr J, Daae FL. High diversity in DNA of soil bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(3): 782-787
- [2] 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): R245-R249
- [3] Rondon MR, Goodman RM, Handelsman J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity[J]. *Trends in Biotechnology*, 1999, 17(10): 403-409
- [4] Qian CL, Liu N, Yan X, et al. Engineering a high-performance, metagenomic-derived novel xylanase with improved soluble protein yield and thermostability[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 70: 35-41
- [5] Sathya TA, Khan M. Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry[J]. *Journal of Food Science*, 2014, 79(11): R2149-R2156
- [6] Vester JK, Glaring MA, Stougaard P. An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from a metagenomic library of a cold and alkaline environment[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 717-727
- [7] Gu XQ, Wang SL, Wang SC, et al. Identification and characterization of two novel esterases from a metagenomic library[J]. *Food Science and Technology Research*, 2015, 21(5): 649-657
- [8] Rhee SK, Liu XD, Wu LY, et al. Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 4303-4317
- [9] Park HJ, Jeon JH, Kang SG, et al. Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome[J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 52(2): 340-347
- [10] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 390-397
- [11] Aurilia V, Parracino A, D'Auria S. Microbial carbohydrate esterases in cold adapted environments[J]. *Gene*, 2008, 410(2): 234-240
- [12] D'Errico C, Börjesson J, Ding HS, et al. Improved biomass degradation using fungal glucuronoyl-esterases-hydrolysis of natural corn fiber substrate[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 219: 117-123
- [13] Strohl WR. The role of natural products in a modern drug discovery program[J]. *Drug Discovery Today*, 2000, 5(2): 39-41
- [14] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 240-245
- [15] Li ZY, Rong Z, Wang Z, et al. Cloning, expression and characterization of a novel esterase (E29) from a marine bacterium *Altererythrobacter luteolus* SW109^T[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1051-1059 (in Chinese)
李正阳, 戎振, 王昭, 等. 来源于海洋细菌 *Altererythrobacter luteolus* SW109^T 的新型酯酶 E29 的克隆表达及其酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 1051-1059
- [16] Chu XM, He HZ, Guo CQ, et al. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(4): 615-625
- [17] Elend C, Schmeisser C, Leggewie C, et al. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3637-3645
- [18] Lämmle K, Zipper H, Breuer M, et al. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127(4): 575-592
- [19] Rashamuse K, Magamani V, Ronneburg T, et al. A novel family VIII carboxylesterase derived from a leachate metagenome library exhibits promiscuous β -lactamase activity on nitrocefin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83(3): 491-500
- [20] Brady SF. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(5): 1297-1305
- [21] Liu KL, Wang JQ, Bu DP, et al. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 385(4): 605-611
- [22] Miller RB, Karn RC. A rapid spectrophotometric method for the determination of esterase activity[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1980, 3(6): 345-354
- [23] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties[J]. *Biochemical Journal*, 1999, 343(1): 177-183
- [24] Bugg TDH. Diverse catalytic activities in the α/β -hydrolase family of enzymes: activation of H₂O, HCN, H₂O₂, and O₂[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2004, 32(5): 367-375
- [25] Kim HK, Jung YJ, Choi WC, et al. Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 235(2): 349-355
- [26] Ma HX, Zhang LL, Sun XM, et al. Understanding microbial communities and their functions by meta-omics approaches[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(5): 902-912 (in Chinese)
马海霞, 张丽丽, 孙晓萌, 等. 基于宏组学方法认识微生物群落及其功能[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(5): 902-912