



宏基因组学应用于耐盐酶类及耐盐基因研究的进展

杨雁霞¹ 张文洪¹ 杨云娟^{1,2,3} 黄遵锡^{1,2,3} 唐湘华^{1,2,3} 李俊俊^{1,2,3} 慕跃林^{1,2,3} 许波^{*1,2,3}

1 云南师范大学生命科学学院 云南 昆明 650500

2 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 云南 昆明 650500

3 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室 云南 昆明 650500

摘要: 耐盐酶在高盐浓度下仍具备催化活性和稳定性, 在高盐食品和海产品加工、洗涤及其它高盐环境生物技术领域被广泛应用; 耐盐基因在高盐条件下可以使微生物维持正常功能, 获取并研究不同环境中的耐盐基因对揭示微生物的耐盐机制, 以及实现其高盐环境中的定向应用具有重要意义。宏基因组学避开纯培养技术探知微生物的多样性及其功能, 为我们提供了一种发现新基因、开发新的微生物活性物质和研究微生物群落结构及其功能的新技术。文中结合本课题组的研究工作, 综述了利用宏基因组学获取耐盐酶类及耐盐基因的策略, 同时着重介绍利用宏基因组学从海洋、土壤、胃肠道等环境中获取耐盐酶类及耐盐基因的研究。

关键词: 宏基因组学, 耐盐, 酶, 基因

Metagenomics in studying salt tolerance enzymes and salt tolerance genes

YANG Yan-Xia¹ ZHANG Wen-Hong¹ YANG Yun-Juan^{1,2,3} HUANG Zun-Xi^{1,2,3}
TANG Xiang-Hua^{1,2,3} LI Jun-Jun^{1,2,3} MU Yue-Lin^{1,2,3} XU Bo^{*1,2,3}

1 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China

2 Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Education, Kunming, Yunnan 650500, China

3 Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming, Yunnan 650500, China

Abstract: Salt tolerance enzymes are active and stable at high salt concentrations and widely applied in high salt food processing, seafood processing, washing and other biotechnology fields with high salt concentrations. Salt tolerance genes can maintain normal function of microorganisms under high salt conditions. Therefore, obtaining and exploration of salt tolerance genes and salt tolerance enzymes in different environments have profound significance for revealing the salt tolerance mechanism of microorganisms and directing its application in the high salinity environment. The metagenomic technology skips the pure culture to explore the diversity and function of microorganisms and provide a

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31860299, 31560305); National Key Research and Development Program of China (2017YFB0308400)

***Corresponding author:** Tel: 86-871-65920952; E-mail: xubo128028@163.com

Received: 03-04-2018; **Accepted:** 16-10-2018; **Published online:** 26-12-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31860299, 31560305); 国家重点研发计划项目(2017YFB0308400)

*通信作者: Tel: 0871-65920952; E-mail: xubo128028@163.com

收稿日期: 2018-04-03; 接受日期: 2018-10-16; 网络首发日期: 2018-12-26

new technology for discovering novel genes, developing new microbial active substances and studying microbial community structure and function. Combined with our own findings, this paper summarizes the strategies of using metagenomic technology to acquire salt tolerance enzymes and salt tolerance genes, and emphatically introduces the study of obtaining salt tolerance enzymes and salt tolerance genes from ocean, soil and gastrointestinal tract environment with metagenomics.

Keywords: Metagenomics, Salt tolerance, Enzymes, Genes

自然栖息地中存在大量盐环境, 如海洋、盐湖、盐滩、晒盐场、盐渍土壤以及地下岩盐和卤水, 嗜盐及耐盐菌因对盐离子有较大耐受范围而广泛分布于地球各种盐环境内^[1]。特殊的环境可能激活该类微生物的某些沉默基因, 从而产生适应极端环境的特殊蛋白^[2]和耐盐酶类。耐盐酶一般是指在一定盐浓度下(0.1–5.0 mol/L)能维持酶活性及稳定性的酶类, 例如土壤微生物宏基因组来源的耐盐漆酶 LacM 在 100 mmol/L 的盐环境中能维持 85%–95% 的酶活性^[3], 深海沉积物来源的耐盐酯酶 H8 在 4.5 mol/L NaCl 中保持稳定^[4]。耐盐微生物在高盐条件下(0.2–2.5 mol/L)仍可维持正常功能, 使其维持正常功能的基因即耐盐基因, 例如 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白、水通道蛋白等能使微生物在高盐环境(0.2–2.5 mol/L)中维持正常功能, 因此, 针对这类微生物开展酶及基因资源的挖掘与利用工作, 不仅在生命起源探索和生物适应极端环境研究等多方面具有重要理论意义, 而且在工农业生产、食品加工和环境污染治理等领域具有重要的应用价值^[5]。

目前, 自然界中仅有约 1% 的微生物能通过传统纯培养分离方法获得, 使得优良耐盐酶及耐盐基因的开发遭遇限制瓶颈。宏基因组学也称为微生物环境基因组学、元基因组学或生态基因组学, 由 Handelsman 等^[6]于 1998 年首次提出, 即生境中全部微小生物遗传物质的总和。它主要以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象, 辅以功能基因筛选和测序分析等研究手段, 以微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系为研究目的新的

微生物研究方法。宏基因组学技术避开了微生物分离培养的问题, 使得从环境中获得大量未培养微生物的基因资源成为现实, 极大地扩展了微生物酶及基因资源的利用空间, 为寻找和发现新的耐盐功能基因及生物催化剂——酶提供了新的研究策略。由于宏基因组学技术在研究和开发优良耐盐酶类及耐盐基因方面具有独特优势, 随着其迅速发展, 已被广泛应用于海洋、土壤、热液口、热泉、人体口腔及胃肠道等多种环境微生物的研究中, 并在医药、替代能源、环境修复、生物技术、农业、生物防御等领域显示出重要的价值^[7]。

1 耐盐酶类及耐盐基因的应用

1.1 微生物耐盐酶的种类

微生物来源的常见耐盐酶(表 1)包括水解酶类(酯酶、脂肪酶、纤维素酶、单宁酶、谷氨酰胺酶、淀粉酶、漆酶、蛋白酶等)、氧化还原酶类(汞还原酶等)、裂解酶类(果胶裂解酶等)和转移酶类(谷氨酰胺转移酶等), 这些耐盐酶具有良好的耐盐性, 在环境污染修复、食品加工等领域具有广泛的应用。

1.2 微生物耐盐基因的种类

近年来, 与微生物耐盐相关的许多基因相继被克隆和研究(表 2), 主要包括与胞内 Na⁺排出机制相关基因(*nhaH* 基因), 胞内小分子相容性物质合成相关基因(甘氨酸甜菜碱合成相关基因 *gbsT*)和胞内小分子相容性物质转运相关基因(甜菜碱转运相关基因 *betM*)^[8]。耐盐基因的挖掘有助于揭示微生物耐盐机制, 并为其在高盐环境中的应用奠定基础。

表 1 微生物来源耐盐酶的分类

Table 1 Classification of salt tolerance enzymes from microorganisms

耐盐酶种类 Type of salt tolerance enzymes	耐盐酶名称 Name of salt tolerance enzymes
氧化还原酶类 Oxidoreductase	Mercuric reductase, Nitrate reductase, Polyphenoloxidase, Glucose oxidase, Alanine dehydrogenase, Aldo/Keto reductases, Azoreductase, Terminal oxygen reductases
转移酶类 Transferase	Transglutaminase, Glycosyl transeferase, DNA polymerase, Transketolase, Serine hydroxymethyltransferase, Methyl chloride transferase
水解酶类 Hydrolase	Esterase, Glutaminase, Cellulase, Xylosidase, Xylanase, Pectinase, Tannase, Lipase, Protease, α -Amylase, Laccase, Exonuclease, Phytase, Inulinase, β -Galactose, Chitobiosidase, β -N-Acetylglucosaminidase
裂解酶类 Lyase	Pectate lyases, Polysaccharide lyase, Alginate lyase, Oligoalginate lyases

表 2 微生物的耐盐相关基因^[8]Table 2 Salt tolerance genes associated with microorganisms^[8]

耐盐基因种类 Type of salt tolerance genes	耐盐基因名称 Name of salt tolerance genes
Na ⁺ 排出相关基因 Na ⁺ antiporter biosynthesis genes	<i>nhaH</i> gene
胞内小分子相容性物质合成相关基因 Compatible solutes biosynthesis genes	Ectoine and hydroxyectoine biosynthesis gene cluster: <i>ectABCD</i> ; Glycine betaine biosynthesis genes: <i>gbsT</i> , <i>gbsI</i> , <i>gbsA</i> , and <i>gbsB</i> ; Trehalose biosynthesis genes: <i>ostA</i> , <i>otsB</i> , and <i>treS</i> ; Glutamate and glutamine biosynthesis genes: <i>gdh</i> and <i>gs</i> ; Proline biosynthesis genes: <i>proA</i> , <i>proB</i> , and <i>proC</i>
胞内小分子相容性物质转运相关基因 Compatible solutes transport genes	K ⁺ transport system: Trk system and Kdp system; Proline and betaine transport system: ProP system and ProU system; Betaine transport genes: <i>betM</i> and <i>betH</i>

1.3 耐盐酶类的应用

1.3.1 环境污染修复

高盐废水处理过程中, 酶活性会受到高盐浓度的抑制而降低处理效果, 耐盐酶在高浓度 NaCl 条件下仍然具有催化活性, 因而在环境污染修复中具有重要作用。例如, 耐盐单宁酶可用于治理单宁污染的工业废水和农业废料^[9], 耐盐木聚糖酶可用于污水处理以及海产品的降解^[10], 此外某些嗜盐微生物产生的有机磷酸脱水酶制剂也已用于净化盐环境中的有机磷化学毒剂^[11]。还可从耐盐酶氨基酸的组成特性获得启发, 对用于高盐废水处理的生物酶人工修饰改造, 在不改变酶活性位点的前提下, 改变蛋白质的表面氨基酸种类, 增加酸性氨基酸比例, 获得耐高盐活性强的生物酶, 这种生物酶与固定化酶技术结合并应用于废水处理工程中, 不仅高效、环保、无二次污染, 还提高了酶处理废水的稳定性及酶的利用率^[8]。

1.3.2 食品加工

在食品及海产品加工过程中, 利用耐盐酶可

改善加工产品口感、品质及生产工艺等。例如, 在酱油高盐稀态发酵过程中加入耐盐性的谷氨酰胺酶, 不仅能有效提高酱油中谷氨酸的含量, 进而提高其鲜味, 改善酱油的综合口感, 而且不会对酱油的其它理化指标和感官指标产生负面影响^[12]。

1.4 耐盐基因的应用

1.4.1 提高农林业产量

土壤盐渍化是影响农林业生产、导致农林业生物量减少的主要非生物胁迫因子之一。盐分胁迫严重干扰植物体内已存在的细胞及整株水平上的水分及离子稳态, 造成植物细胞分子损伤, 生长延滞甚至死亡^[13]。因而, 发掘和研究耐盐基因资源, 并通过常规杂交、组织培养、分子标记辅助选择和转基因等手段, 将耐盐基因转入优良农作物品种中^[14], 以获得耐盐性较强的农作物品种, 从而使农林作物的生物量增加, 以满足广大含盐量高的地区对耐盐、高产优质农作物品种的需求。

1.4.2 节约生产成本

在相关酶制剂、药物、工业原料等目标产物的发酵制备中,常需要通过高温、高压创造无菌环境,这不仅需要消耗大量水电能源,同时也会增加连续发酵过程中的时间和设备成本。耐盐微生物可在高盐培养基中正常生长,而其它微生物的生长在此条件下则受到明显的抑制,因此通过分离或遗传改造,耐盐微生物进行上述目标产物的生产可在未灭菌和消毒的条件下进行,在一定程度上将大大降低生产成本^[15]。

1.4.3 污水处理

污水中盐度及有机污染物种类不一,利用常规微生物处理污水很难发挥作用,耐盐微生物在高盐环境下有明显的优势,因此挖掘具有高盐有机污染物耐受性的降解菌能有效解决上述问题,且通过基因工程改造优势菌株比传统筛选分离微生物更快获得目的菌株。将挖掘出的优良耐高盐基因元件整合到目的菌株中,赋予不同污染物降解菌株以高盐耐受能力,使其能在高盐废水处理上发挥应用价值;也可根据实际需要,结合合成生物学手段,构建耐高盐基因或者蛋白质生物元件标准化元件库,设计新的代谢网络和途径,重构目标菌株^[16]。此外,还可将产耐盐基因的耐盐微生物用于化工、石油、采矿等工业。

2 利用宏基因组学获取耐盐酶类及耐盐基因的策略

微生物是地球上已知种类最多、数量最大、分布最广的生物类群,然而通过传统分离培养获得的微生物仅占自然环境中微生物的1%^[17]。宏基因组学提供了一种跳过纯培养技术探知微生物多样性及其功能的免培养方法,是发现新基因、开发新的微生物活性物质和研究微生物群落结构及其功能的新技术。目前,利用宏基因组学技术获取耐盐酶类及耐盐基因的策略主要有3种:(1)宏基因组文库筛选法,构建特定环境的宏基因组文

库并从中筛选耐盐酶类及耐盐基因;(2)同源克隆法,根据同源基因设计引物,对宏基因组DNA进行PCR扩增,获得相应耐盐酶类及耐盐基因;(3)宏基因组直接测序。

2.1 宏基因组文库筛选法

从特定环境样品中提取微生物基因组DNA后,选择适宜的载体,如质粒、黏粒和细菌人工染色体(Bacterial artificial chromosome, BAC)等构建宏基因组文库并进行筛选。目前筛选耐盐酶类及耐盐基因的方法主要包括基于序列的筛选和基于功能的筛选两种。

2.1.1 基于序列的筛选

序列筛选无需依赖重组基因在外源宿主中的表达,可通过设计已知相关功能基因的序列探针或PCR引物,依赖目的基因保守区域的DNA序列进行杂交或PCR扩增筛选得到目的基因,再使其异源表达,获得具有生物活性的代谢物。该法克服了功能筛选法中必须依赖表达后的活性产物进行检测的不足,效率较高。但是该筛选法存在两个主要的缺陷:(1)引物的设计依赖于已有的序列信息,筛选文库中那些与已知基因序列完全不同的基因就非常困难,因而很难发现新的活性物质;(2)通过PCR扩增功能基因,一般只能获得结构基因的片段,并不能获得完整的功能基因。利用PCR扩增, Ausec等^[3]从沼泽土壤宏基因组 Fosmid文库中筛选获得漆酶基因 *LacM*, 该酶在100 mmol/L NaCl条件下保留85%~95%的活性。

2.1.2 基于功能的筛选

功能筛选不依赖于任何已知序列信息,直接根据文库中目的克隆表达的性状在选择培养基上进行筛选。因此,可依据携带耐盐基因的克隆能在高含盐量平板上生长的特点,筛选获得具有耐盐活性的阳性克隆,再对其进行测序及分析,进而获得相应的耐盐基因。该方法可获得完整的功能基因或带有目的基因的基因簇,而且这些功能基因很可能是全新的。功能筛选法通常要求目的

基因(簇)在宿主中表达良好,能够正常溶解表达产物,而且能够准确地折叠产生蛋白质。然而,许多克隆的外源基因在新的遗传背景中并不能表达或表达后没有活性,导致筛选效率较低。

利用功能筛选, Martin 等^[18]从与褐藻相关的微生物宏基因组文库中获得一个耐盐的纤维素酶 Cell5.1_3, 该酶在 3 mol/L KCl 或 4 mol/L NaCl 中培养 24 h 仍分别保持 93% 和 97% 酶活性。梁华忠^[19]以 0.2 mol/L NaCl 为筛选因子, 从古盐井宏基因组文库中获得 98 个耐盐克隆及耐盐基因 *K-ArsB* (*ArsB* 膜转运蛋白基因), 其编码的蛋白属于 *ArsB/NhaD* 透性酶超蛋白家族。Mirete 等^[20]首次构建恢复后盐场的卤水和中度盐根际样品宏基因组文库, 并通过 3% NaCl 筛选获得 11 个耐盐相关基因, 其中包括编码与渗透适应有关的甘油转运蛋白、DNA/RNA 解旋酶及内切酶 III (Nth) 等。

2.2 同源克隆法

同源克隆法以核酸或氨基酸序列的保守区域为依据设计特异的简并引物, 利用该引物获得基因片段, 然后通过 TAIL-PCR、反转 PCR 等方式获得全长基因, 获得的序列经 BLAST 比对后初步确定序列的新颖性, 从而提高获得新颖活性蛋白的可能性。该方法建立在数据库序列的基础上, 随着蛋白数据库的几何式扩增, 越来越受到人们的关注, 但同时不易获得新颖家族的蛋白序列^[21]。应用同源克隆的方法, Purohit 等^[22]从土壤中获得一个耐盐碱性蛋白酶, 该酶在 1、2、3 mol/L NaCl 中分别孵育 3 h 仍然保留约 50% 的活性。

2.3 宏基因组直接测序

对从环境样品中提取的宏基因组 DNA 直接进行测序, 并对测序所得数据进行分析, 能较全面地揭示环境微生物组的遗传信息, 进而通过功能注释获取耐盐基因, 揭示耐盐机制。以 454、Solexa 和 Solid 技术为标志的新一代测序技术大大降低了测序成本, 提高了测序速度^[23]。同时, 为

高效分析宏基因组测序产生的海量数据, 生物信息学平台成为宏基因组学研究的重要手段, 数据组装、基因预测、功能注释等相关的计算系统和软件平台不断开发, 被大量用于环境样品微生物宏基因组的物种分类和功能组成研究^[24]。Sayed 等^[25]对红海 Atlantis II 盐水池的下对流层样品进行 454 测序获得一个汞还原酶 *MerA*, 该酶活性随 NaCl 浓度的增加而增强, 当 NaCl 浓度增至 4 mol/L 时达到最大。

3 宏基因组学在不同环境样品中获取耐盐酶类及耐盐基因的研究

3.1 宏基因组学用于海洋微生物中耐盐酶类及耐盐基因的研究

海洋占地球表面积的 70% 以上, 有着极为丰富的微生物资源, 汇集了低营养、低光照、低温、高压、高盐等极端条件, 赋予了海洋微生物在物种、基因组成和生态功能等方面的生物多样性, 同时海洋微生物的可培养率也更低, 仅为 0.001%–0.1%^[26]。随着海洋微生物资源的进一步开发, 与海洋微生物酶有关的研究逐渐增多, 海洋微生物已成为获得新型酶制剂的重要来源。利用宏基因组学技术, 研究者从海洋中获得了大量耐盐酶类(表 3)。Zhang 等^[4]通过功能筛选从南海海域沉积物 Fosmid 文库中获得一个酯酶基因 *H8*, 该酯酶在 4.5 mol/L NaCl 中仍然保持稳定。通过构建南海海洋微生物宏基因组文库, Fang 等^[30]获得一个新的酯酶 *Est9x*, 与已知酯酶仅有 27% 的相似性, 但具有 α/β -水解酶活性, 该酶的活性随着 NaCl 浓度的增加而增强, 4 mol/L NaCl 存在的条件下, 其活性可增加至 190%。由于海洋环境盐浓度较高, 近年来对该环境微生物宏基因组的研究不断增多, 研究者通过功能筛选从中获得了很多耐盐性较好的酶类, 尤其是酯酶, 但对耐盐基因的挖掘多是通过微生物纯培养的方法获得, 利用宏基因组学技术获得的耐盐基因未见报道。

表 3 利用宏基因组学从海洋中获得的主要耐盐酶类

Table 3 Identifying salt tolerance enzymes from the metagenome of sea

样品 Sample	筛选方法(筛选因子) Screening method (screening factor)	文库类型 Library type	酶 Enzyme	耐盐性 Salt tolerance	参考文献 References
South China Sea	Functional screening (tributylin)	Fosmid library	Esterase	Remaining stable in 4.5 mol/L NaCl	[4]
			Esterase	Remain 110% activity in 3.5 mol/L NaCl	[27]
		BAC library	Esterase	Endure 200 mmol/L NaCl	[28]
	Functional screening (esuculin hydrate, ammonium ferric)	BAC library	β -Glucosidase	Lost its activity to 86% in the presence of 500 mmol/L NaCl	[29]
	Sequence screening	-	Esterase	The activity increased to 190% in the presence of 4 mol/L NaCl	[30]
East Pacific	Metagenomic sequencing	-	Esterase	Stable in 3 mol/L NaCl for 6 h	[31]
Arctic marine	Functional screening (tributylin)	Fosmid library	Esterase	The highest activity value 675.0% \pm 0.021% being obtained in 3 mol/L NaCl	[32]
Pacific Ocean	Functional screening (tributylin)	Fosmid library	Esterase	Have the highest activity in 3 mol/L NaCl	[33]
Red Sea	454 pyrosequencing	-	Reductase	Its enzymatic activity increases with the increasing NaCl concentration, displaying maximum activity at 4 mol/L NaCl	[25]
Arabian Sea	Functional screening (X-Gal)	pUC19 library	α -Amylase	More than 51% activity in 2.5 mol/L NaCl	[34]

注: -: 无或文献中没有提及.

Note: -: None or not mentioned in the literature.

3.2 宏基因组学用于土壤微生物中耐盐酶类及耐盐基因的研究

土壤微生物种类多、数量大、组成复杂、功能多样,是获取微生物基因资源和代谢产物的重要来源。通过构建宏基因组文库,研究者从土壤微生物组中获得了大量耐盐酶(表 4)及耐盐基因(表 5)。陆坚等^[35-36]首次构建高糖土壤微生物文库,从中获得一个编码新型 β -葡萄糖苷酶的基因 *unbgl3A*,该 β -葡萄糖苷酶对葡萄糖和 NaCl 都具有很强的耐受性,酶活性在 600 mmol/L NaCl 中不受影响。Sang 等^[47]对小麦田土壤文库进行功能筛选得到酯酶基因 *estF27*,该酶在 3 mol/L KCl 孵育 96 h 或 5 mol/L NaCl 孵育 120 h 仍能保持 50% 以上活性。以 7.5% NaCl 为筛选因子,张波^[49]从陕北花马盐湖土壤沉积物微生物宏基因组文库中筛选出 37 株耐盐克隆,并从中获得多个潜在耐盐或耐其它逆境的功能基因,如焦磷酸

酶、转座酶、钙调蛋白、泛素连接酶以及脂质转移蛋白等。

红树林分布于热带和亚热带海岸潮间带,其土壤兼有海洋和陆地的性质却与二者不同,具有沼泽化、盐渍化、强酸性、有机质含量高和部分厌氧等特征,独特的生境特征造就了丰富独特的微生物和相应的基因及酶资源。2013 年,李长杰^[43]对红树林土壤宏基因组文库进行功能筛选获得酯酶基因 *estl* 和 *estz*,其中酯酶 *Estz* 有较好的耐盐性,在 4 mol/L NaCl 溶液中放置 1 h 可保留 80% 活性。之后, Mai 等^[44]也通过功能筛选从红树林土壤宏基因组文库得到一个新的内切葡聚糖酶基因 *mgcel44*,该酶在 0.5 mol/L NaCl 条件下活性增强 >1.6 倍,并能在 1.5 mol/L NaCl 中保持稳定。与海洋环境相比而言,土壤微生物宏基因组中获得的耐盐性酶种类更为丰富和多样,然而耐盐性却相对要低。

表 4 利用宏基因组学从土壤中获得耐盐酶类

Table 4 Identifying salt tolerance enzymes from the metagenome of soil

样品 Sample	筛选方法 (筛选因子) Screening method (screening factor)	文库类型 Library type	酶 Enzyme	耐盐性 Salt tolerance	参考文献 References
Bog soil	Sequence screening	Fosmid library	Laccase	85%–95% activity was preserved in the presence of 100 mmol/L NaCl	[3]
Cotton field soil	Functional screening (X-caprylate)	pUC118 library	Tannase	Stable in the presence of 4 mol/L NaCl	[9]
Soil	PCR amplification	–	Alkaline protease	Retaining around 50% activity after incubation 3 h in 1, 2, 3 mol/L NaCl	[22]
	Functional screening (esculin hydrate)	Fosmid library	β -glucosidase	NaCl has very strong stimulating effect on the enzyme when its concentration is below 200 mmol/L	[35–36]
	Functional screening (H ₂ O ₂)	pBC library	Exonuclease	Have endonuclease activity in the presence of 1 mol/L KCl	[37]
	Functional screening (tributyryn)	Fosmid library	Lipase	Stable up to 3.7 mol/L NaCl	[38]
	Functional screening (CMC)	Cosmid library	Endoglucanase	Retaining 86%–87% activity after incubation with 3 mol/L NaCl or 4 mol/L KCl for 20 h	[39]
Permafrost	Functional screening (tributyryn)	Fosmid library	Esterase	Activity is stimulated in the presence of 0.25–1.50 mol/L NaCl	[40]
Tibetan glacier soil	Functional screening (tributyryn)	Fosmid library	Esterase	Remain 60% activity in 2.5 mol/L NaCl	[41]
Chitin-amended agricultural soil	Repeated PCR cycles	Fosmid library	Chitobiosidase	Activity increased in the presence of NaCl, up to 2 mol/L final concentration	[42]
Mangrove soil	Functional screening (tributyryn)	pUC118 library	Esterase	Remain 80% activity after 1 h in 4 mol/L NaCl	[43]
	Functional screening (CMC)	Fosmid library	Endoglucanase	Its activity was enhanced in 0.5 mol/L NaCl by >1.6 fold and stable up to 1.5 mol/L NaCl	[44]
Red soil	Functional screening (CMC)	BAC library	Endo- β -1,4-glucanase	Retaining more than 70% activity of the control after 10 d of pre-incubation with 4 mol/L NaCl	[45]
Chandigarh soil	Functional screening (CMC)	pEZSeq library	Cellulase	There was about 24%, 28% and 13% enhancement in the catalytic activity of Cel5R in the presence of 1, 2 and 3 mol/L NaCl respectively	[46]
Wheat field soil	Functional screening (tributyryn)	pUC118 library	Esterase	Retaining more than 50% of its activity after 96 or 120 h incubation in the presence of 3 mol/L KCl or 5 mol/L NaCl	[47]

注: –: 无或文献中没有提及。

Note: –: None or not mentioned in the literature.

3.3 宏基因组学用于胃肠道微生物中耐盐酶类及耐盐基因的研究

胃肠道微生物是动物长期进化的结果, 与动物的食性、机体的免疫功能、营养需求等有着密

切的关系。为深入探究胃肠道微生物对人类健康的影响, 宏基因组学技术已被广泛而深入地应用于胃肠道微生物的研究中。栖息于胃肠道的微生物面临着如酸、胆盐、渗透压等压力^[50], 研究表

明相对高渗的胃肠道腔(相当于 0.3 mol/L NaCl)^[51]及饮食的变化^[52]可导致胃肠道中渗透压力的产生, 适应外部环境压力对于胃肠道内微生物的定殖和生存至关重要。然而, 目前基于宏基因组学技术对胃肠道微生物耐盐酶类及耐盐基因的研究还较少。

近年来, 一些新的耐盐基因相继从人肠道微生物宏基因组中被发现, 异源表达发现这些基因

能使转化的受体菌具有耐盐性(表6)。以 6.5% NaCl 为筛选因子, Culligan 等从人肠道微生物 Fosmid 文库中筛选获得 53 个耐盐克隆, 并进一步得到 *galE*、*murB*、*MazG*^[53]、*stlA*^[54]、*sdtR*^[55]和 *brpA*^[56]等与耐盐性相关的基因。其中, *galE* 的基因产物为 4-UDP 葡萄糖差向异构酶; *murB* 的基因产物与肽聚糖和细胞壁的合成有关; *MazG* 的基因产物可以延缓细胞程序性死亡, 使细胞在有补充营养的

表 5 利用宏基因组学从土壤中获得耐盐基因

Table 5 Identifying salt tolerance genes from the metagenome of soil

样品 Sample	筛选方法 (筛选因子) Screening method (screening factor)	文库类型 Library type	蛋白 Protein	基因 Genes	参考文献 References
Saline soil	Functional screening (5.8% NaCl)	pUC19 library	ABC transporter ATP-binding protein Glucose/sorbosone dehydrogenase Serine/threonine protein kinase Protein of unknown function duf3445	<i>BCAA_ABCTP</i> <i>GSDH</i> <i>STKc_PknB</i> <i>DUF3445</i>	[48]
Soil	Functional screening (7.5% NaCl)	Fosmid library	Pyrophosphate Transferase Calmodulin Ubiquitin-linked enzymes Lipid transfer proteins	-	[49]

注: -: 无或文献中没有提及。

Note: -: None or not mentioned in the literature.

表 6 利用宏基因组学从胃肠道中获得耐盐基因

Table 6 Identifying salt tolerance genes from the metagenome of gastrointestinal tract

样品 Sample	筛选方法 (筛选因子) Screening method (screening factor)	文库类型 Library type	蛋白 Protein	基因 Genes	参考文献 References		
Human faeces	Functional screening (6.5% NaCl)	Fosmid library	UDP-N-acetylglucosamine Enolpyruvyl reductase UDP glucose 4-epimerase NTPase StlA protein	<i>murB</i> <i>galE</i> <i>mazG</i> <i>stlA</i>	[53] [54]		
			σ 54-Dependent transcriptional regulator	<i>sdtR</i>	[55]		
			β -Carotene 15,15'-monooxygenase	<i>brpA</i>	[56]		
			Functional screening (4.3% NaCl)	pCC16 library	Putative uncharacterized protein Putative ABC transporter permease protein -	<i>TLSRP1</i> <i>ABCTPP</i> <i>TMSRP1</i>	[57]

注: -: 无或文献中没有提及。

Note: -: None or not mentioned in the literature.

情况下存活更长时间; *stlA* 属于人类肠道特有的耐盐基因, 能通过 LGT (Lateral gene transfer) 事件获得邻近的基因, 从而在高盐环境中占据竞争优势; *sdtR* 来源于 *Bacteroides*, 编码假定的转录调节因子; 基因 *brpA* 属于 β -胡萝卜素单加氧酶 *brp/blh* 家族, 编码膜表面蛋白。2018 年, Verma 等^[57] 又从人粪便宏基因组文库中筛选获得耐盐克隆 SR6 和 SR7, 亚克隆分析发现 *TMSRP1*、*ABCTPP*、*TLSRP1* 等基因与其耐盐性相关。上述耐盐相关基因及酶类的鉴定, 为研究胃肠道微生物的耐盐机制奠定了基础。

此外, 研究者从胃肠道微生物宏基因组中也获得了一些耐盐的水解酶类(表 7)。例如, 冷园园^[58] 通过功能筛选从山羊瘤胃微生物文库中获得内切葡聚糖酶 CelA, 该酶在 1–4 mol/L NaCl 条件下孵育 12 h, 仍可保留 70% 的活性。Ilmberger 等^[59] 从大象粪便微生物 Fosmid 文库中筛选到 GH5 家族的纤维素酶 CelA84, 该酶在 4 mol/L NaCl 中孵育 34 d 仍有 50% 的相对活性。

本实验室长期从事胃肠道微生物宏基因组学研究及酶基因资源的开发, 通过宏基因组 Shotgun 测序及生物信息学分析^[62], 从植食性灵长类动物——滇金丝猴的胃肠道微生物组中获得了多个耐盐酶。对其进行异源表达和功能鉴定表明, 木聚糖酶 XynRBM 在 1.0–3.5 mol/L NaCl 条件下具有较好的稳定性^[60], β -半乳糖苷酶 galRBM1 在 0–15% NaCl 条件下耐受 12 h 仍保持 80% 以上的相对酶活^[61]。这些酶具有较好的耐盐性及其它酶学

特性, 使其在高盐及食品等领域具有应用潜力。

3.4 宏基因组学用于其它生境耐盐酶类及耐盐基因的研究

潮汐平坦沉积物具有独特的微生物多样性, 是发现新酶的良好生境。Jeon 等^[63] 以韩国江华岛的潮汐平坦沉积物样品构建宏基因组 Fosmid 文库, 以甘油酯为筛选因子从中筛选获得 3 个酯酶 IV 家族的新基因(*estKT4*、*estKT7*、*estKT9*), 异源表达纯化及酶学性质研究表明, 3 个酯酶都能在 3 mol/L KCl 或 NaCl 中保持 50% 以上的活性。

池塘水或湖水微生物群体需要忍受由于蒸发和稀释引起的盐浓度的不断改变, 因此池塘水或湖水中未培养微生物可能拥有与适应这种压力相关的酶及基因。Kapardar 等^[64] 通过添加 750 mmol/L NaCl 从池塘水宏基因组文库中筛选出 2 个与耐盐性相关的蛋白 GspM 和 EchM, GspM 与压力蛋白类似, EchM 有 Enoyl-CoA 水合酶活性, 后续研究发现 ClpS (ATP-dependent Clp protease adaptor protein) 也与耐盐性相关^[65]。Martínez- Martínez 等^[66] 从湖水沉积物宏基因组文库中获得 7 个 α/β 水解酶超家族的酶, 其中 LAE1、LAE2、LAE4、LAE5、LAE6、LAE7 添加 0.1–1.2 mol/L NaCl 后, 活性增加 1.5–2.2 倍。

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

表 7 利用宏基因组学从胃肠道中获得的耐盐酶类

Table 7 Identifying salt tolerance enzymes from the metagenome of gastrointestinal tract

样品 Sample	筛选方法(筛选因子) Screening method (screening factor)	文库类型 Library type	酶 Enzyme	耐盐性 Salt tolerance	参考文献 References
Goat rumen microbiome	Functional screening (CMC)	Fosmid library	Endoglucanase	Retaining 70% activity after incubation with 1–4 mol/L NaCl for 12 h	[58]
Elephant faeces	Functional screening (CMC)	Fosmid library	Cellulases	Retaining 50% relative activity after 34 d in 4 mol/L NaCl	[59]
Yunnan snub-nosed monkey faeces	Shotgun sequencing	Fosmid library	Xylanase	Stable at 1.0–3.5 mol/L NaCl	[60]
			β -galactose	Retaining more than 80% relative activity after 12 h in 0–15% NaCl	[61]

化, 传统发酵食品发酵环境中微生物资源的开发和利用成为研究的热点^[67]。为了丰富酯酶资源, 叶茂等^[68]构建传统发酵食品酱醪微生物宏基因组文库, 从中筛选获得一个新的酯酶基因 *est₁₅*, 该酶在 10%–18% NaCl 条件下可保持良好的催化活性。

此外, 研究者从沼气发电厂和污水处理厂也获得了耐盐酶。例如, Ilmberger 等^[59]从沼气发电厂宏基因组文库筛选获得纤维素酶 CelA2 和 CelA3, 两者在 4 mol/L NaCl 中孵育 34 d 后分别保持 80% 和 50% 的相对活性。Yang 等^[69]通过宏基因组测序和基因功能注释, 从污水处理厂中获得一个新的纤维素酶 Cel7482, 该酶在 4 mol/L NaCl 中仍有 80% 的活性。

4 总结与展望

耐盐酶类及耐盐基因在自然界中分布广泛、种类繁多, 宏基因组学的应用大大拓宽了其研究内容和范围。目前已报道了利用宏基因组学技术从海洋(表 3)、土壤(表 4、5)、胃肠道(表 6、7)、池塘^[64-65]、湖水^[66]、传统发酵食品^[68]及沼气发电厂^[59]、污水处理厂^[69]等环境中获得的耐盐酶类及耐盐基因。这些酶类及基因的挖掘对揭示微生物的耐盐机制具有重要意义, 同时在污水处理、食品加工等领域具有潜在的应用价值。然而, 研究过程中仍有许多问题需要解决:

(1) 筛选效率低、工作量大且耗时耗材。可通过半液体培养的方法筛选阳性克隆, 即利用低熔点琼脂糖(37 °C 可成半液体)与文库转化液混合于 37 °C 过夜培养, 取少量培养液即可直接筛选耐盐基因。此外, 变性梯度凝胶电泳(DGGE)与染色体步移技术结合可提高宏基因组中耐盐基因全长序列的筛选效率。基因陷阱技术筛选法也能有效提高筛选效率, 即利用目的基因缺失的突变体宿主菌株, 依据其转化后在选择性培养基上能进行功能互补的生长特征来筛选。或将宏基因组 DNA 随机克隆到无启动子的绿色荧光蛋白(GFP)基因前面, 然后通过荧光激活细胞分离(FACS)技术, 在

添加特定底物的前提下对表达库进行富集, 就能够筛选出对该底物具有代谢活性的克隆。还可在宏基因组技术中引入表面展示(Surface display), 能有效解决功能筛选中存在的因外源基因异源表达水平较低, 蛋白质或底物需要跨越细胞膜才能进行反应等导致的反应速度较慢、活性筛选不奏效等问题。

(2) 筛选方法针对性不强。一般采用的是间接方法, 即先通过宏基因组学技术获得所需的某种酶类, 再通过对该酶进一步功能鉴定和酶学特性研究, 以确定该酶的耐盐性。因此, 根据已报道的耐盐机制, 借助耐盐酶类氨基酸的组成特点, 有针对性地进行耐盐酶类及耐盐基因的筛选是目前亟待需要解决的问题。

(3) 筛选对象范围较窄。利用宏基因组学技术对耐盐酶类及耐盐基因的研究目前仍主要集中在高盐环境, 且获得的耐盐酶种类较少, 多为水解酶类。今后从更多环境中发现和鉴定新的耐盐基因及更多种类的酶类, 对于进一步研究微生物的耐盐机制及拓宽耐盐酶类的应用领域将具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Ren PG, Zhou PJ. Research progress of moderately halophilic eubacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(3): 427-431 (in Chinese)
任培根, 周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展[J]. *微生物学报*, 2003, 43(3): 427-431
- [2] Wang WL. Studies on halotolerant fungal strains: isolation, culture and secondary metabolites[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008 (in Chinese)
王文良. 耐盐微生物的分离及两株耐盐真菌次级代谢产物的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2008
- [3] Ausec L, Berini F, Casciello C, et al. The first acidobacterial laccase-like multicopper oxidase revealed by metagenomics shows high salt and thermo-tolerance[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(15): 6261-6276
- [4] Zhang Y, Hao J, Zhang YQ, et al. Identification and characterization of a novel salt-tolerant esterase from the deep-sea sediment of the South China Sea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 441
- [5] Shen YQ. Isolation of halophilic (halotolerant) microorganisms and its application to pickled vegetable processing wastewater treatment[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2008 (in Chinese)

- 沈宇强. 嗜盐(耐盐)微生物的分离及其在榨菜废水处理中的应用[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2008
- [6] 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 and Biology*, 1998, 5(10): R245-R249
- [7] He JZ, Zhang LM, Shen JP, et al. Advances and perspectives of metagenomics[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(2): 209-218 (in Chinese)
贺纪正, 张丽梅, 沈菊培, 等. 宏基因组学(Metagenomics)的研究现状和发展趋势[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(2): 209-218
- [8] Wang WW, Tang HZ, Xu P. Salt-tolerance related genes in halophilic bacteria and archaea[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(3): 550-558 (in Chinese)
王伟伟, 唐鸿志, 许平. 嗜盐菌耐盐机制相关基因的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(3): 550-558
- [9] Yao J, Fan XJ, Lu Y, et al. Isolation and characterization of a novel tannase from a metagenomic library[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(8): 3812-3818
- [10] Liu Z, Zhao XP, Bai FW. Production of xylanase by an alkaline-tolerant marine-derived *Streptomyces viridochromogenes* strain and improvement by ribosome engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(10): 4361-4368
- [11] Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology[J]. *Extremophiles*, 2001, 5(2): 73-83
- [12] Ye M, Zhang YP, Deng MC. The application effect of a novel salt-tolerant L-glutaminase in soy sauce liquid fermentation with high-salt process[J]. *China Condiment*, 2014, 39(7): 5-7, 17 (in Chinese)
叶茂, 张远平, 邓毛程. 一种耐盐性谷氨酰胺酶在高盐稀态酱油酿造过程中的应用研究[J]. *中国调味品*, 2014, 39(7): 5-7, 17
- [13] Guo SL. Exploitation and application of salt-tolerant genes of halophyte *Limonium sinense* and *Suaeda salsa*[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong Normal University, 2005 (in Chinese)
郭善利. 盐生植物(补血草与盐地碱蓬)耐盐基因的发掘及应用[D]. 济南: 山东师范大学博士学位论文, 2005
- [14] Hu TT, Liu C, Wang JK, et al. Progress of genetic and breeding on salt tolerance in rice[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(1): 110-116 (in Chinese)
胡婷婷, 刘超, 王健康, 等. 水稻耐盐基因遗传及耐盐育种研究[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(1): 110-116
- [15] Adamiak J, Otlewska A, Gutarowska B. Halophilic microbial communities in deteriorated buildings[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(10): 1489-1499
- [16] Khalil AS, Collins JJ. Synthetic biology: applications come of age[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(5): 367-379
- [17] Fan NS, Qi R, Yang M. Current technical progresses in the cultivation for uncultured microorganism[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(3): 524-530 (in Chinese)
范念斯, 齐嵘, 杨敏. 未培养微生物的培养方法进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(3): 524-530
- [18] Martin M, Biver S, Steels S, et al. Identification and characterization of a halotolerant, cold-active marine endo- β -1,4-glucanase by using functional metagenomics of seaweed-associated microbiota[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(16): 4958-4967
- [19] Liang HZ. Screening the salt-tolerance gene from halophile colonized in Ancient Brine Well by metagenomic library[D]. Chengdu: Master's Thesis of Xihua University, 2012 (in Chinese)
梁华忠. 宏基因组文库高通量筛选古盐井中嗜盐微生物耐盐基因[D]. 成都: 西华大学硕士学位论文, 2012
- [20] Mirete S, Mora-Ruiz MR, Lamprecht-Grandfo M, et al. Salt resistance genes revealed by functional metagenomics from brines and moderate-salinity rhizosphere within a hypersaline environment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(2): 1121
- [21] Zhou JP. Preliminary study on cellulases and hemicellulases from symbiotic bacteria harbored in the gut of *Batocera horsfieldi* larvae[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese)
周峻沛. 云斑天牛胃肠道内共生细菌来源的纤维素酶和半纤维素酶的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2010
- [22] Purohit MK, Singh SP. A metagenomic alkaline protease from saline habitat: Cloning, over-expression and functional attributes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 53(2): 138-143
- [23] Dai LM, Xiong CY, Huang ZX, et al. Metagenomics in studying cellulase[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(6): 1089-1100 (in Chinese)
戴利铭, 熊彩云, 黄遵锡, 等. 宏基因组学在纤维素酶研究中的应用进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(6): 1089-1100
- [24] Xu B, Yang YJ, Li JJ, et al. Metagenomics in studying gastrointestinal tract microorganism[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(12): 1721-1735 (in Chinese)
许波, 杨云娟, 李俊俊, 等. 宏基因组学在人和动物胃肠道微生物研究中的应用进展[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(12): 1721-1735
- [25] Sayed A, Ghazy MA, Ferreira AJS, et al. A novel mercuric reductase from the unique deep brine environment of Atlantis II in the red sea[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(3): 1675-1687
- [26] Cowan DA. Microbial genomes-the untapped resource[J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(1): 14-16
- [27] Li PY, Ji P, Li CY, et al. Structural basis for dimerization and catalysis of a novel esterase from the GTSAG motif subfamily of the bacterial hormone-sensitive lipase family[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289: 19031-19041
- [28] Chu XM. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea[D]. Hefei:

- Doctoral Dissertation of University of Science and Technology of China, 2008 (in Chinese)
储新民. 南海海洋微生物宏基因组文库中酯酶基因的筛选与鉴定[D]. 合肥: 中国科学技术大学博士学位论文, 2008
- [29] Fang ZM, Fang W, Liu JJ, et al. Cloning and characterization of a β -glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(9): 1351-1358
- [30] Fang ZM, Li JJ, Wang Q, et al. A novel esterase from a marine metagenomic library exhibiting salt tolerance ability[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24(6): 771-780
- [31] Yang XW, Wu LZ, Xu Y, et al. Identification and characterization of a novel alkalistable and salt-tolerant esterase from the deep-sea hydrothermal vent of the East Pacific Rise[J]. *MicrobiologyOpen*, 2018, 7(5): e00601
- [32] de Santi C, Altermark B, Pierechod MM, et al. Characterization of a cold-active and salt tolerant esterase identified by functional screening of Arctic metagenomic libraries[J]. *BMC Biochemistry*, 2016, 17: 13
- [33] Jiang XW. Cloning, expression and enzymatic characterization of esterase identified by the genomic and metagenomic approaches[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2013 (in Chinese)
江夏薇. 基于嗜耐盐菌基因组分析与深海宏基因组文库的酯酶研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2013
- [34] Nair HP, Vincent H, Puthusseri RM, et al. Molecular cloning and characterization of a halotolerant α -amylase from marine metagenomic library derived from Arabian Sea sediments[J]. *Biotechnology*, 2017, 7: 65
- [35] Lu J, Du LQ, Pang H, et al. Construction of metagenomic library of microbes from sugar enriching soil and identification of β -glucosidase genes[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32(1): 30-35 (in Chinese)
陆坚, 杜丽琴, 庞浩, 等. 高糖土壤微生物宏基因组文库的构建及 β -葡萄糖苷酶基因鉴定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(1): 30-35
- [36] Lu J, Du LQ, Wei YT, et al. Expression and characterization of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from a soil metagenome[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2013, 45(8): 664-673
- [37] Silvaportela RCB, Carvalho FM, Pereira CPM, et al. ExoMeg1: a new exonuclease from metagenomic library[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19712
- [38] Glogauer A, Martini VP, Faoro H, et al. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(1): 54-68
- [39] Voget S, Steele HL, Streit WR. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126(1): 26-36
- [40] Petrovskaya LE, Novototskaya-vlasova KA, Spirina EV, et al. Expression and characterization of a new esterase with GCSAG motif from a permafrost metagenomic library[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(5): fiw046
- [41] de Santi C, Ambrosino L, Tedesco P, et al. Errata: Identification and characterization of a novel salt-tolerant esterase from a Tibetan glacier metagenomic library[J]. *Biotechnology Progress*, 2015, 31(5): 1442
- [42] Cretoiu MS, Berini F, Kielak AM, et al. A novel salt-tolerant chitobiosidase discovered by genetic screening of a metagenomic library derived from chitin-amended agricultural soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(19): 8199-8215
- [43] Li CJ. Gene cloning, characterization of two novel esterases derived from mangrove soil and construction of metatranscriptomic library of mangrove water[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Zhongshan University, 2013 (in Chinese)
李长杰. 红树林生境新型酯酶的基因克隆、酶学性质研究及红树林水体宏转录组文库的构建[D]. 广州: 中山大学硕士学位论文, 2013
- [44] Mai ZM, Su HF, Yang J, et al. Cloning and characterization of a novel GH44 family endoglucanase from mangrove soil metagenomic library[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(8): 1701-1709
- [45] Liu J, Liu WD, Zhao XL, et al. Cloning and functional characterization of a novel endo- β -1,4-glucanase gene from a soil-derived metagenomic library[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(4): 1083-1092
- [46] Garg R, Srivastava R, Brahma V, et al. Biochemical and structural characterization of a novel halotolerant cellulase from soil metagenome[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39634
- [47] Sang SL, Li G, Hu XP, et al. Molecular cloning, overexpression and characterization of a novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2011, 20(4): 196-203
- [48] Ahmed V, Verma MK, Gupta S, et al. Metagenomic profiling of soil microbes to mine salt stress tolerance genes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 159
- [49] Zhang B. Diversity and salt-tolerance of prokaryotes in Shaanxi Huama salt lake[D]. Hanzhong: Master's Thesis of Shaanxi University of Technology, 2016 (in Chinese)
张波. 陕北花马盐湖原核微生物多样性及耐盐逆境研究[D]. 汉中: 陕西理工学院硕士学位论文, 2016
- [50] Louis P, O'Byrne CP. Life in the gut: microbial responses to stress in the gastrointestinal tract[J]. *Science Progress*, 2010, 93(1): 7-36
- [51] Alvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, et al. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract[J]. *Microbiology*, 2011, 157(12): 3268-3281
- [52] de Dea Lindner J, Canchaya C, Zhang Z, et al. Exploiting *Bifidobacterium* genomes: The molecular basis of stress response[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 120(1/2): 13-24
- [53] Culligan EP, Sleator RD, Marchesi JR, et al. Functional metagenomics reveals novel salt tolerance loci from the human gut microbiome[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6: 1916-1925

- [54] Culligan EP, Sleator RD, Marchesi JR, et al. Functional environmental screening of a metagenomic library identifies *stlA*; a unique salt tolerance locus from the human gut microbiome[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82985
- [55] Culligan EP, Marchesi JR, Hill C, et al. Combined metagenomic and phenomic approaches identify a novel salt tolerance gene from the human gut microbiome[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 189
- [56] Culligan EP, Sleator RD, Marchesi JR, et al. Metagenomic identification of a novel salt tolerance gene from the human gut microbiome which encodes a membrane protein with homology to a brp/blh-Family β -carotene 15,15'-monooxygenase[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e103318
- [57] Verma MK, Ahmed V, Gupta S, et al. Functional metagenomics identifies novel genes *ABCTPP*, *TMSRP1* and *TLSRP1* among human gut enterotypes[J]. Scientific Report, 2018, 8: 1397
- [58] Leng YY. Isolation and characterization of cellulases and xylanases from a goat rumen-derived metagenome library[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2012 (in Chinese)
冷园园. 山羊瘤胃宏基因组中葡聚糖酶/木聚糖酶的筛选与性质分析[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2012
- [59] Ilmberger N, Meske D, Juergensen J, et al. Metagenomic cellulases highly tolerant towards the presence of ionic liquids-linking thermostability and halotolerance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(1): 135-146
- [60] Dai LM. Characterization of xylanolytic enzymes in fecal microbiome from *Rhinopithecus bieti*[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan Normal University, 2016 (in Chinese)
戴利铭. 滇金丝猴粪便微生物木聚糖降解酶研究[D]. 昆明: 云南师范大学硕士学位论文, 2016
- [61] Yang ZF, Yang YX, Zhang WH, et al. Study on the heterogeneous expression and enzymatic properties of beta-galactose derived from Metagenome[J]. Journal of Yunnan Normal University (Natural Sciences Edition), 2018(4): 55-60 (in Chinese)
杨正凤, 杨雁霞, 张文洪, 等. 宏基因组来源 β -半乳糖苷酶的异源表达与酶学性质研究[J]. 云南师范大学学报: 自然科学版, 2018(4): 55-60
- [62] Xu B, Xu WJ, Li JJ, et al. Metagenomic analysis of the *Rhinopithecus bieti* fecal microbiome reveals a broad diversity of bacterial and glycoside hydrolase profiles related to lignocellulose degradation[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 174
- [63] Jeon JH, Lee HS, Kim JT, et al. Identification of a new subfamily of salt-tolerant esterases from a metagenomic library of tidal flat sediment[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 623-631
- [64] Kapardar RK, Ranjan R, Grover A, et al. Identification and characterization of genes conferring salt tolerance to *Escherichia coli* from pond water metagenome[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(11): 3917-3924
- [65] Kapardar RK, Ranjan R, Puri M, et al. Sequence analysis of a salt tolerant metagenomic clone[J]. Indian Journal of Microbiology, 2010, 50(2): 212-215
- [66] Martínez-Martínez M, Alcaide M, Tchigvintsev A, et al. Biochemical diversity of carboxyl esterases and lipases from Lake Arreo (Spain): a metagenomic approach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(12): 3553-3562
- [67] Nie ZQ, Wang M, Zheng Y. Application of three molecular biotechnologies in microbial diversity of microorganisms from traditional fermented foods[J]. Food Science, 2012, 32(23): 346-350 (in Chinese)
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
- [68] Ye M, Deng MC, Liu HP, et al. Cloning, expression, and characterization of the esterase from metagenomic DNA of traditional food fermentation environment[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(8): 66-71 (in Chinese)
叶茂, 邓毛程, 刘慧平, 等. 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[J]. 现代食品科技, 2017, 33(8): 66-71
- [69] Yang C, Xia Y, Qu H, et al. Discovery of new cellulases from the metagenome by a metagenomics-guided strategy[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 138