

研究报告

粪便宏基因组来源低分子量碱性 β -半乳糖苷酶的异源表达及酶学性质范琴^{#1}, 曾璐瑶^{#1}, 杨金茹¹, 韩楠玉^{1,2,3}, 杨云娟^{1,2,3}, 黄遵锡^{1,2,3}, 吴倩^{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

范琴, 曾璐瑶, 杨金茹, 韩楠玉, 杨云娟, 黄遵锡, 吴倩, 许波. 粪便宏基因组来源低分子量碱性 β -半乳糖苷酶的异源表达及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1594-1607

Fan Qin, Zeng Luyao, Yang Jinru, Han Nanyu, Yang Yunjuan, Huang Zunxi, Wu Qian, Xu Bo. Heterologous expression and enzyme properties of low-molecular-weight and basic β -galactosidase derived from the metagenome of faeces[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1594-1607

摘要:【背景】 β -半乳糖苷酶在食品加工、临床医疗及基因工程等领域有重要的应用价值, 开发酶活性高、热稳定性强的 β -半乳糖苷酶已成为研究热点。【目的】从西黑冠长臂猿(*Nomascus concolor*)粪便微生物宏基因组中挖掘新型 β -半乳糖苷酶并进行酶学性质研究。【方法】以西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组 DNA 为模板扩增 β -半乳糖苷酶基因 *GalNC1-8*, 构建重组表达质粒 pEASY-E2/*GalNC1-8*, 转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)异源表达, 研究其酶学性质。【结果】获得 GH35 家族碱性 β -半乳糖苷酶 GalNC1-8, 其分子量为 28.18 kDa, 最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 8.0。将该酶在 30-50 °C 下处理 1 h, 剩余酶活仍保持在 80%以上; pH 7.0-9.0 下处理 1 h, 剩余酶活大于 54%。在含乙醇的反应体系中, 其酶活性几乎不受影响; β -巯基乙醇、丙三醇、甲醇、Na⁺、K⁺和 Li⁺对其酶活性有促进作用。在 0.5-3.5 mol/L NaCl 下处理 1 h 后, 仍保留 50%以上的酶活性。【结论】从粪便微生物宏基因组中克隆得到 β -半乳糖苷酶基因 *GalNC1-8*, 并在 *E. coli* BL21(DE3)中成功表达。GalNC1-8 是已知宏基因组来源蛋白质分子量最小的 β -半乳糖苷酶, 其 pH 作用范围较广、温度稳定性和 NaCl 耐受性较好, 具有较好的应用前景。

关键词: β -半乳糖苷酶; 粪便微生物; 宏基因组; 酶学性质

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

#对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31860299); National Key Research and Development Program of China (2017YFB0308400)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: xubo128028@163.com

Received: 2021-06-07; Accepted: 2021-07-15; Published online: 2021-10-26

Heterologous expression and enzyme properties of low-molecular-weight and basic β -galactosidase derived from the metagenome of faeces

FAN Qin^{#1}, ZENG Luyao^{#1}, YANG Jinru¹, HAN Nanyu^{1,2,3}, YANG Yunjuan^{1,2,3}, HUANG Zunxi^{1,2,3}, WU Qian^{1,2,3}, XU Bo^{*1,2,3}

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

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

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

Abstract: **[Background]** β -galactosidase has important application value in many fields such as food processing, clinical medicine, and genetic engineering. Thus, the development of β -galactosidase with high activity and strong thermal stability has become a research focus. **[Objective]** This paper aims to screen novel β -galactosidases from the fecal microbial metagenome of *Nomascus concolor* and study its enzymatic properties. **[Methods]** β -galactosidase gene *GalNC1-8* was cloned by PCR with the fecal microbial metagenomic DNA of *N. concolor* as template. Then, the recombinant plasmid pEASY-E2/*GalNC1-8* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for expression, and the enzymatic properties of recombinase GalNC1-8 was tested. **[Results]** The basic β -galactosidase GalNC1-8, belonging to GH35 family, had the molecular weight of 28.18 kDa. The optimal conditions for GalNC1-8 were pH 8.0 and 50 °C. After incubation at 30, 37, 40, and 50 °C for 1 h, the relative enzyme activity was still above 80%. After 1 h treatment at pH 7.0–9.0, the enzyme kept more than 54% of the activity. The activity of GalNC1-8 was hardly influenced by the reaction system containing ethanol. β -mercaptoethanol, glycerol, methanol, Na⁺, K⁺, and Li⁺ enhanced the enzyme activity. It retained above 50% activity after being treated with 0.5–3.5 mol/L NaCl at 50 °C for 1 h. **[Conclusion]** A novel β -galactosidase gene *GalNC1-8* was screened from the *N. concolor* fecal microbial metagenome, which expressed in *E. coli* BL21(DE3). GalNC1-8 has the lowest molecular weight among the known metagenome-derived β -galactosidases. With adaptability to a wide pH range, thermal stability, and salt tolerance, it has good application prospects.

Keywords: β -galactosidase; fecal microorganism; metagenome; enzymatic properties

β -半乳糖苷酶, 全称 β -D-半乳糖苷半乳糖水解酶 (β -D-galactosidegalactohydrolase, EC 3.2.1.23), 简称乳糖酶, 由 β -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 编码合成, 具有水解和转糖苷 2 种催化功能^[1]。由于其能够催化 β -D-半乳糖苷类化合物非还原性末端的 β -糖苷键水解断裂, 因此

β -半乳糖苷酶属于糖苷水解酶类 (glycoside hydrolases, GH, EC 3.2.1)。根据氨基酸序列的相似性, 该酶被归入 GH1、GH2、GH35、GH42、GH50 和 GH59 这 6 大家族^[2-3]。

β -半乳糖苷酶最初应用于食品加工。利用该酶对乳制品进行脱乳糖处理, 可将其乳糖含

量降低至 20%–30%^[4], 不仅能改善产品风味(增甜), 还有效解决了乳糖不耐受者消费乳制品的限制性问题。为防止乳糖结晶析出影响产品品质, 在生产浓缩乳或冷冻乳时通常会加入 β -半乳糖苷酶; 用乳糖水解乳代替普通脱脂乳进行乳酸发酵可明显缩短酸奶的凝固时间并延长其保质期^[5]。此外, 利用 β -半乳糖苷酶的转糖苷活性, 以乳糖为受体制备低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)现已成为研究热点, GOS 是唯一能被人体肠道益生菌全部利用的益生元, 被称为双歧杆菌的生长因子, 常作为膳食补充剂或代糖添加到食品中^[4]。

β -半乳糖苷酶的天然来源丰富, 包括动物、植物和微生物^[6]。由于微生物产酶具有生产周期短、生产不受地域季节限制、酶产量及酶活性高、酶易于分离等优点, 因此工业上大规模生产获得的 β -半乳糖苷酶主要来源于微生物^[2]。其中, 克鲁维酵母和霉菌来源的 β -半乳糖苷酶是目前“公认安全(generally recognized as safe, GRAS)”级别的安全酶, 已应用于食品生产^[7]。

胃肠道中定殖着大量的微生物, 是一个亟待开发的酶基因资源库^[8]。据报道, 有近 50%的胃肠道微生物无法通过纯培养获得^[9]。然而宏基因组学技术可通过避开微生物的传统培养和分离纯化直接获取特定环境样品中所有微小生物的总遗传物质^[10], 这为人类深入研究胃肠道菌群的结构组成、功能活性及挖掘微生物新功能基因提供了新策略。利用宏基因组学技术, 研究者已从动物和人的粪便^[11-15]、热泉^[16-17]、土壤^[18-22]、牛奶厂废水^[23]、小麦秸秆降解物^[24]、海洋沉积物^[25-26]及海底石灰岩柱^[27]中获得并异源表达了 β -半乳糖苷酶。其中, 粪便微生物宏基因组来源的 β -半乳糖苷酶仅见于蚯蚓排

泄物宏基因组^[11]、滇金丝猴粪便微生物宏基因组^[12-13]和人类粪便微生物宏基因组^[14-15]。

西黑冠长臂猿(*Nomascus concolor*)是与人类亲缘关系最近的类人猿类群之一^[28], 食性较杂且“婴儿”时期的主要食物来源为乳汁, 因此其胃肠道微生物可能含有 β -半乳糖苷酶及基因。本研究从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组出发, 从中筛选、扩增 β -半乳糖苷酶基因, 并对其进行异源表达及酶学性质研究, 以期挖掘出应用前景更为广阔的新型 β -半乳糖苷酶。

1 材料与方法

1.1 样品

西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组 DNA、pEASY-E2 质粒, 本实验室保存; 宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3), 北京擎科新业生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

DNA Marker (DL15000)、Protein Marker, 北京博迈德基因工程技术有限公司; 质粒小提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒, Omega 公司; 氨苄青霉素、*Ex Taq* DNA Polymerase、dNTP Mix、 $10\times Ex Taq$ Buffer、限制性核酸内切酶(*Xho* I、*Nde* I), 宝生物工程(大连)有限公司; 镍柱, QIAGEN 公司; 对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, pNPG)、邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, oNPG), 上海源叶生物科技有限公司。

核酸电泳仪、蛋白胶电泳仪, Bio-Rad 公司; 全自动凝胶成像分析仪, 北京赛智创业科技有限公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; PCR 仪, 苏州东胜兴业

科学仪器有限公司; 全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技公司。

1.3 基因克隆和序列分析

1.3.1 基因克隆

根据 β -半乳糖苷酶基因 *GalNC1-8* 的全长序列设计引物 *GalNC1-8F* (5'-TAAGAAGGAGA TATACATATGGAATTGGAACAAGTTTATGGA GAAACTG-3', 下划线代表 *Nde* I 的识别位点) 和 *GalNC1-8R* (5'-GTGGTGGTGGTGGTGCCTC GAGTTTGAAAATAGGCTTATCGGTTAG-3', 下划线代表 *Xho* I 的识别位点)。以西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组 DNA 为模板(基因组 DNA 由上海美吉生物医药科技有限公司完成提取), 常规 PCR 扩增目的基因 *GalNC1-8*。PCR 反应体系(50 μ L): 西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组 DNA 2.5 μ L, 引物 *GalNC1-8F*、*GalNC1-8R* (10 μ mol/L)各 1.2 μ L, 10 \times *Ex Taq* Buffer 5.0 μ L, dNTP Mix (10 mmol/L) 2.5 μ L, *Ex Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.6 μ L, ddH₂O 37.0 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 30 min。反应结束后, 取扩增产物进行 1% (质量体积分数)琼脂糖凝胶电泳(130 V, 25 min)验证, 并纯化目的片段。

1.3.2 序列分析

用 BioXM 2.6 预测蛋白质的理论分子量; 在 SignalP 4.0 Server 上预测信号肽。使用 BLAST 服务器获取 *GalNC1-8* 的同源序列(均来自 NCBI-PubMed 数据库); 在 MEGA X 软件中进行多序列比对分析, 并选择邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树, 建树质量的检验采用 bootstrap 法(次数设为 1 000), 树的美化由 ESPript 3.0 完成。

1.4 大肠杆菌重组表达系统的构建

取含有质粒 pEASY-E2 的大肠杆菌菌液按 0.1% (体积分数)的量接种于 5 mL LB 液体培养基(含体积分数为 0.1%的 Amp)中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 活化 12–16 h 后使用质粒小提试剂盒提取质粒 pEASY-E2; 采用限制性核酸内切酶(*Xho* I 和 *Nde* I)对质粒进行双酶切, 得到的线性化载体 pEASY-E2 与纯化后的目的片段连接后获得重组表达质粒 pEASY-E2/*GalNC1-8*, 热激转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)得到重组菌株 BL21(DE3)/*GalNC1-8*; 通过阳性克隆验证筛选正确的重组子送北京擎科生物科技有限公司测序。

1.5 重组蛋白的表达与纯化

取测序正确的阳性克隆子 BL21(DE3)/*GalNC1-8* 按 0.1% (体积分数)的量接种于 2 L LB 液体培养基(含体积分数为 0.1%的 Amp)中; 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 恒温培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时(约 4–5 h), 加入适量异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)至终浓度为 0.7 mmol/L, 于 20 $^{\circ}$ C、160 r/min 诱导培养 20 h 后离心收集(5 000 r/min、10 min)含重组蛋白的工程菌, 并用无菌水重悬菌体; 再依次超声破壁(超声开 5 s, 超声关 7 s, 共 20 min)、4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 收集粗酶液, 并采用 Nickel-NTA Agarose 纯化粗酶(咪唑洗脱的最佳浓度为 0.5 mol/L); 最后进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳, 以含空载质粒的细胞裂解液为阴性对照, 判断重组 β -半乳糖苷酶 *GalNC1-8* 表达的准确性及纯化效果。

1.6 酶活性的测定

参照张文洪^[12]的方法略做调整。邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(oNPG)底物溶液的初始浓度调整为 2.2 mmol/L, OD 值的测定波长调

整为 420 nm。以下研究中, 每种反应条件均设 1 个空白组(灭活的酶)、3 个平行实验组(取平均值计算相对酶活力); 若无特殊说明, 纯化得到的酶液(起始浓度为 1.0 mg/mL)经无菌水稀释 5 倍后再用于酶学性质分析; 相对酶活力(%)定义为: 将各项研究中的最大酶活力或未预处理时的酶活力定为 100%, 则相对酶活力为其他反应条件下的酶活力与最大酶活力或未预处理时的酶活力的比率。

1.7 重组 β -半乳糖苷酶 GalNC1-8 的酶学性质研究

1.7.1 底物特异性的测定

用 pH 7.0、0.1 mol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液分别配制浓度为 2.2 mmol/L 的底物溶液(邻硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷、对硝基苯基- β -D-吡喃木糖苷、对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷和邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷)。按照酶活测定方法, 于 37 °C 下测定重组酶在上述不同底物溶液中的酶活力。

1.7.2 最适温度和最适 pH 的测定

用不同 pH 缓冲液(pH 3.0–8.0、0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和 pH 8.0–12.0、0.2 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液)分别配制浓度为 2.2 mmol/L 的 oNPG。于 37 °C 测定重组酶在上述不同 pH 反应体系中的酶活力, 以相对酶活力为纵坐标绘制 GalNC1-8 的最适 pH 曲线。

在最适 pH 反应体系中, 测定重组酶在不同温度(0、10、20、30、37、40、50、60 °C)下的酶活力, 以相对酶活力为纵坐标绘制 GalNC1-8 的最适温度曲线。

1.7.3 温度稳定性和 pH 稳定性的测定

原酶液经 pH 3.0–12.0 的缓冲液分别适当

稀释后置于 37 °C 保温 1 h, 然后在最适反应条件下(pH 8.0、50 °C)同时测定重组酶的酶活力, 将未预处理的酶的酶活力定为 100%, 以相对剩余酶活力为纵坐标绘制 GalNC1-8 的 pH 稳定性曲线。

将重组酶分别置于 30、37、40、50 °C 处理不同时间(10、20、30、40、50、60 min)后, 在最适反应条件下(pH 8.0、50 °C)同时测定重组酶的酶活力, 将未预处理的酶的酶活力定为 100%, 以相对剩余酶活力为纵坐标绘制 GalNC1-8 的温度稳定性曲线。

1.7.4 金属离子和化学试剂对重组酶的影响测定

将不同金属离子和化学试剂(Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Na^+ 、 Ag^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、SDS、EDTA、DTT、PEG4000、Tween-80、Triton X100、甲醇、乙醇、丙三醇、乙酸、乙酸乙酯、尿素、 β -巯基乙醇和盐酸胍)分别加到酶促反应体系中, 使体系中金属离子和化学试剂的终浓度分别为 10 mmol/L、1% (体积分数)。于最适反应条件下(pH 8.0、50 °C)同时测定重组酶在各体系中的酶活力, 以未加金属离子和化学试剂时的酶活力为 100%, 计算相对酶活力。

1.7.5 动力学参数测定

在最适温度和最适 pH 下, 于一级反应时间内(16 min)同时测定以不同浓度的 oNPG (0–2.2 mmol/L)为底物时重组酶的酶活力, 并根据 Lineweaver-Burk 法计算 K_m 和 V_{max} 值。

1.8 NaCl 对重组 β -半乳糖苷酶 GalNC1-8 的影响

用 pH 8.0、0.2 mol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液分别配置浓度为 0.5–5.0 mol/L 的 NaCl 溶液。

50 °C 时向上述不同浓度的 NaCl 溶液中加入适量 oNPG (终浓度为 2 mmol/L) 和酶液进行酶促反应, 将未加 NaCl 的体系中的酶活力定为 100%, 计算相对酶活力。

原酶液经不同浓度的 NaCl 溶液 (0.5–5.0 mol/L) 适当稀释后置于 50 °C 恒温水浴 1 h, 在最适反应条件下 (pH 8.0、50 °C) 同时测定各体系中的酶活力, 将未预处理的酶的酶活力定为 100%, 以相对剩余酶活力为纵坐标绘制 GalNC1-8 的 NaCl 稳定性曲线。

2 结果与分析

2.1 β -半乳糖苷酶基因 *GalNC1-8* 的克隆和序列分析

从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组 DNA 中扩增得到 β -半乳糖苷酶基因 *GalNC1-8* (GenBank 登录号: MW685408), 基因全长 768 bp, GC 含量为 41.9%, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAA, 编码 255 个氨基酸, 理论分子量为 28.18 kDa, 其中 N-末端的前 19 个氨基酸构成信号肽序列, 等电点为 4.37。BLAST 序列比对发现, *GalNC1-8* 与拟杆菌属 (*Bacteroides*) 来源的 β -半乳糖苷酶氨基酸序列 (GenBank 登录号: WP_009037861.1) 的相似性为 100%, 但后者为假想蛋白 (未进行酶学性质鉴定); 与单形拟杆菌 (*B. uniformis*) 来源的 β -半乳糖苷酶核苷酸序列 (GenBank 登录号: CP072239.1) 有 99.74% 的相似性。综上, *GalNC1-8* 极有可能来源于拟杆菌属微生物。据报道, 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 是人等动物胃肠道中的优势菌门之一^[9]。

GalNC1-8 与 GH35 家族 β -半乳糖苷酶的氨基酸多序列比对发现 (图 1), 保守性氨基酸

残基为 123-RPGPY-127、135-GGLP-138、189-ENEY-193、307-GGTNFGFT-314、329-VTSYDY-334 和 562-VWING-566 等。系统进化分析显示 (图 2), *GalNC1-8* 与 GH1、GH35、GH42 家族 β -半乳糖苷酶的进化关系较近, 其中又与 GH35 家族的 β -半乳糖苷酶聚于一簇, 这表明重组酶 *GalNC1-8* 可能是 GH35 家族的 β -半乳糖苷酶。

2.2 重组蛋白的异源表达与纯化

重组菌株 BL21(DE3)/*GalNC1-8* 经 0.7 mmol/L IPTG 诱导培养 20 h 后表达重组 β -半乳糖苷酶 *GalNC1-8*, 收集菌体后依次经超声破壁、4 °C 离心得到粗酶液 (上清), 经镍柱亲和层析纯化获得的 *GalNC1-8* 纯酶液再经 SDS-PAGE 检测显示为单一条带, 其蛋白分子量与理论值相符, 约为 28.18 kDa (图 3)。

2.3 重组 β -半乳糖苷酶 *GalNC1-8* 的酶学性质

2.3.1 底物特异性分析

由表 1 知, 重组酶的最适底物为邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷 (oNPG)。其次, 重组酶对对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷 (pNPG) 有较强的水解能力, 几乎或完全不能水解其余的对硝基苯基衍生物。

2.3.2 最适 pH 和 pH 稳定性

重组酶的最适 pH 为 8.0, 属于碱性酶; 在 pH 7.0–9.0 之间, 均能保持 43% 以上的酶活力; pH 6.0 时, 酶活力仅约为 10%; pH 5.0 和 pH 10.0 时, 重组酶完全失活 (图 4A)。

重组酶在中性及碱性条件下的稳定性较好。在 pH 7.0、8.0、9.0 下耐受 1 h 后, 剩余酶活力分别为 54%、72% 和 70%; 在 pH 10.0 的强碱环境中耐受 1 h 后, 仍保留 20% 的酶活力 (图 4B)。

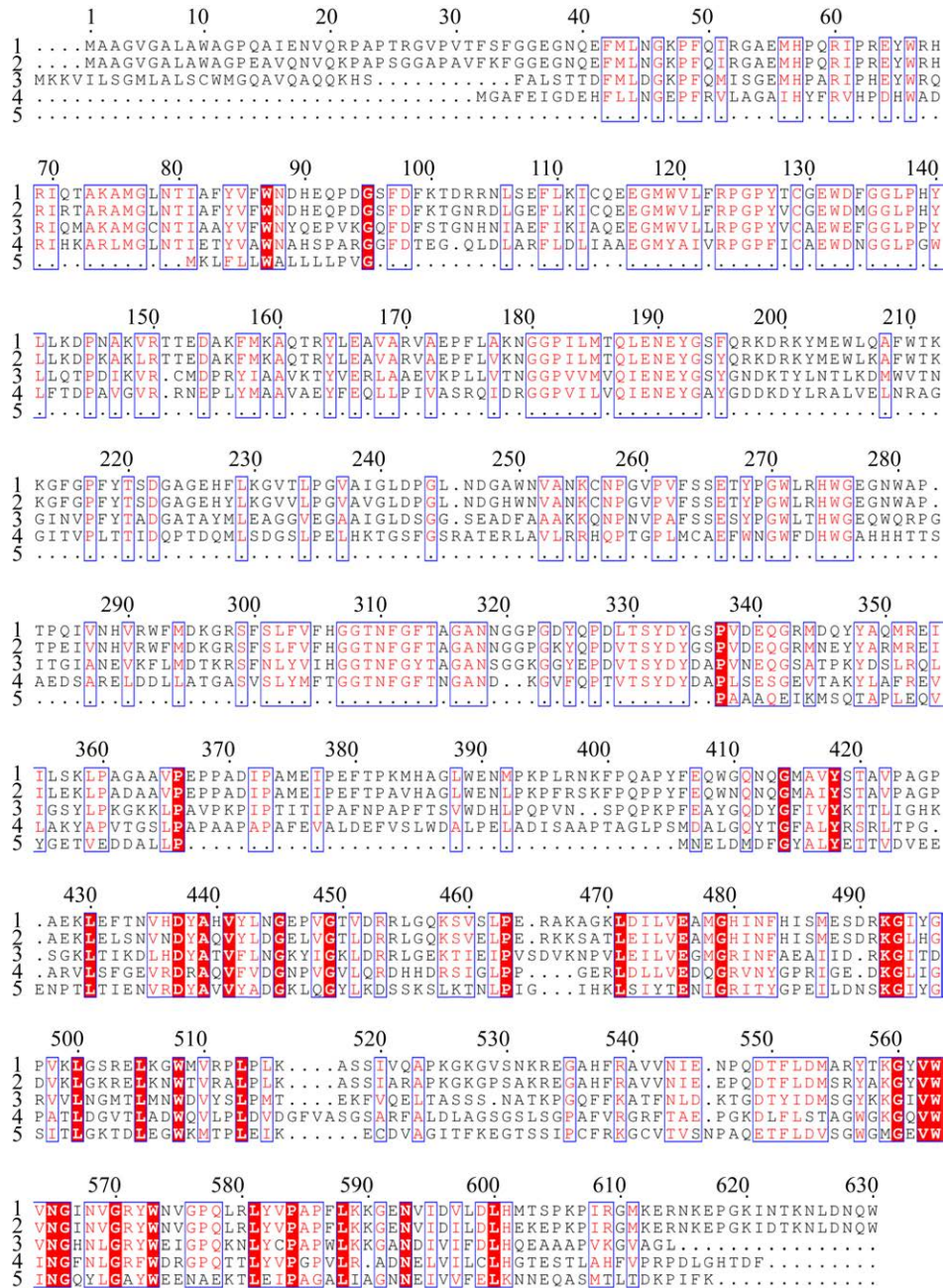


图 1 GalNC1-8 的多序列比对分析 序号 1、2、3、4 分别代表 *Rhinopithecus bieti* 粪便微生物宏基因组来源(QCI55732.1)、*Akkermansia muciniphila* 来源(WP_102726120.1)、*Chitinophaga arvensicola* 来源(WP_089895994.1)、*Cryobacterium* sp. LW097 来源(ASD21060.1)的 GH35 家族氨基酸序列；序号 5 代表 *Nomascus concolor* 粪便微生物宏基因组来源的 GalNC1-8 (MW685408)氨基酸序列

Figure 1 Multiple sequence alignment analysis of GalNC1-8. The serial numbers 1, 2, 3 and 4 respectively represent the amino acid sequence of GH35 family from *Rhinopithecus bieti* fecal microbial metagenome (QCI55732.1), *Akkermansia muciniphila* (WP_102726120.1), *Chitinophaga arvensicola* (WP_089895994.1), and *Cryobacterium* sp. LW097 (ASD21060.1). The number 5 represents the amino acid sequence of GalNC1-8 (MW685408) from *Nomascus concolor* fecal microbial metagenome.

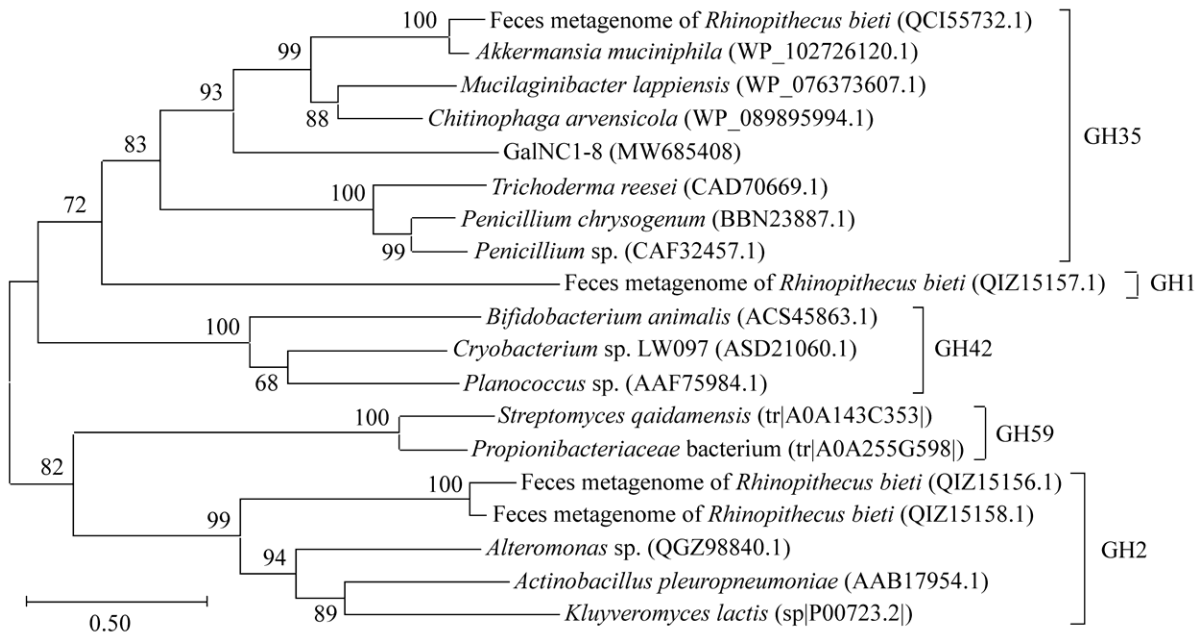


图2 重组酶 GalINC1-8 与不同微生物来源 β -半乳糖苷酶的系统发育树 结点附近的数值代表分支的可信度; 括号中的号码代表不同来源 β -半乳糖苷酶的 GenBank 登录号; 标尺代表序列差异度

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of GalINC1-8 and β -galactosidase from various microbial sources. The value near the node represents the credibility of the branch (bootstrap value); The numbers in parentheses represent the GenBank accession No. of β -galactosidase from different sources; The scale represents the degree of difference between sequences.

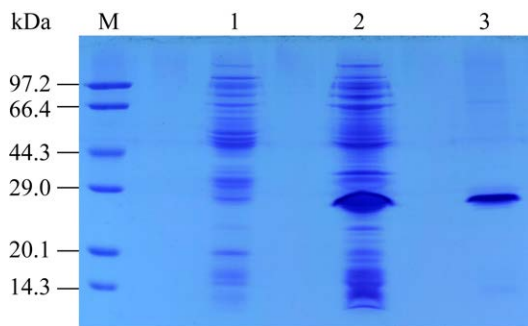


图3 重组酶 GalINC1-8 的 SDS-PAGE 电泳分析 M: 蛋白质分子量标准; 1: 含空载质粒 pEASY-E2 的 *E. coli* BL21(DE3) 细胞裂解液; 2: GalINC1-8 粗酶; 3: GalINC1-8 纯酶

Figure 3 SDS-PAGE analysis of recombinase GalINC1-8. M: Protein molecular weight marker; 1: Cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) harboring empty pEASY-E2 following IPTG induction; 2: Unpurified GalINC1-8; 3: Purified GalINC1-8.

2.3.3 最适温度和温度稳定性

重组酶的最适温度为 50 °C; 在 20 °C 和 30 °C 时, 相对酶活力分别为 18% 和 48%; 在 37–50 °C 范围内, 相对酶活力均在 65% 以上 (图 5A)。

重组酶在 30–50 °C 的中高温范围内表现出了较好的热稳定性。经 30、37、40 °C 分别处理 1 h 后, 剩余酶活力均达 90% 以上; 经 50 °C 处理 1 h 后, 仍保留 80% 的酶活力 (图 5B)。

2.3.4 金属离子和化学试剂对重组酶的影响

结果表明 (表 2), 吐温-80、乙醇、PEG4000 和尿素对重组酶的酶活性基本无影响; K^+ 对该酶有轻微的激活作用; Na^+ 、 Li^+ 、丙三醇、甲醇、 β -巯基乙醇对该酶有明显的激活作用; Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、

表 1 GalNC1-8 对各种底物的水解活性

Table 1 Hydrolysis activities of recombinase GalNC1-8 on various substrates

Substrate (2 mmol/L)	Relative activity of GalNC1-8 (%)
o-nitrophenyl β -D-glucopyranoside	0
p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (pNPG)	60.97 \pm 3.88
p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside	0.12 \pm 0.11
p-nitrophenyl β -D-xylopyranoside	0
p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside	0
o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (oNPG)	100.00 \pm 2.97

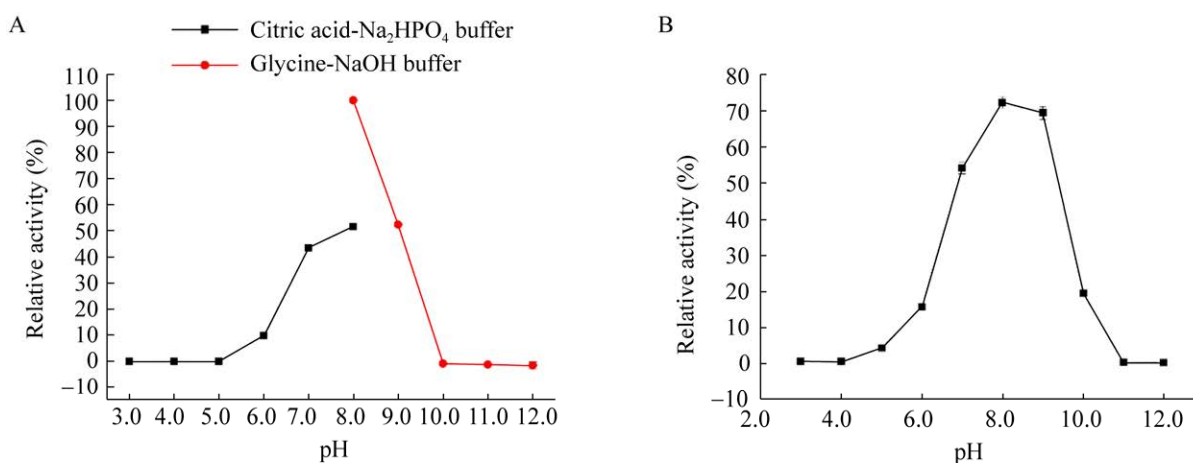


图 4 重组酶 GalNC1-8 的最适 pH (A) 及其 pH 稳定性 (B) 曲线

Figure 4 Optimal pH (A) and pH stability (B) curve of recombinase GalNC1-8.

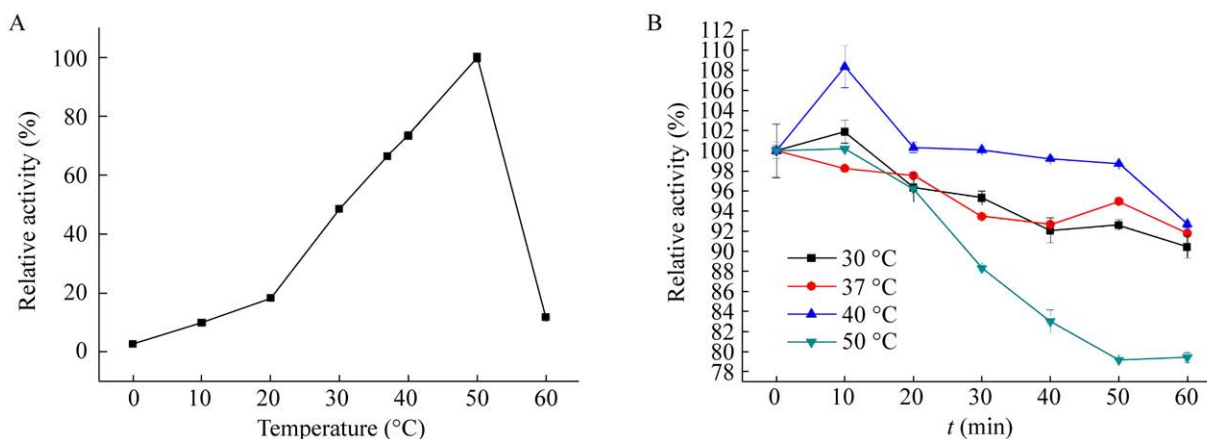


图 5 重组酶 GalNC1-8 的最适温度 (A) 及其温度稳定性 (B) 曲线

Figure 5 Optimal temperature (A) and temperature stability (B) curve of recombinase GalNC1-8.

表 2 金属离子和化学试剂对酶活力的影响
Table 2 Effects of metal ions and chemical agents on enzyme activity

Metal ions or chemical reagents		Relative activity of GalNC1-8 (%)	
Metal ions (10 mmol/L)	Control	100.00±0.89	
	Na ⁺	110.84±0.97	
	K ⁺	105.31±0.78	
	Li ⁺	116.74±1.66	
	Ag ⁺	1.70±0.31	
	Cu ²⁺	0	
	Ca ²⁺	10.73±1.20	
	Zn ²⁺	0	
	Co ²⁺	50.54±0.67	
	Mn ²⁺	33.37±1.39	
	Ni ²⁺	0	
	Mg ²⁺	80.85±0.35	
	Sn ²⁺	39.00±0.70	
	Pb ²⁺	81.88±0.02	
	Hg ²⁺	0	
	Fe ²⁺	30.85±0.28	
	Fe ³⁺	0	
	Al ³⁺	0	
	Chemical reagents 1%	Control	100±2.92
		SDS	7.96±0.13
EDTA		1.75±0.03	
Guanidine Hydrochloride		5.57±0.83	
Tween-80		94.59±1.00	
Triton X100		77.47±0.69	
DTT		87.00±1.75	
Glycerol		127.58±0.87	
Acetic acid		0	
Ethanol		100.37±0.31	
Methanol		112.03±0.76	
PEG4000		96.84±1.62	
Ethyl acetate		70.77±1.53	
Urea		89.60±1.61	
β -mercaptoethanol		128.54±0.45	

SDS、EDTA、盐酸胍、乙酸完全或几乎完全抑制酶活性；其余金属离子及化学试剂均对重组酶有不同程度的抑制作用。

2.3.5 动力学参数

GalNC1-8水解oNPG的 K_m 为0.061 18 mmol/L, V_{max} 为 2.161 0 mmol/min。

2.4 NaCl 浓度的影响和稳定性

NaCl 对重组酶的影响较大(图 6A)。当体系中 NaCl 浓度仅为 0.5 mol/L 时, 酶活力下降 60%左右; 体系中 NaCl 浓度在 1.0–5.0 mol/L 之间时, 其酶活力均小于 16%。

重组酶具有较好的 NaCl 耐受性(图 6B)。经 0.5–3.5 mol/L 的 NaCl 处理 1 h 后, 剩余酶活力均维持在 50%–65%之间; 经 5.0 mol/L 的 NaCl 处理 1 h 后, 仍保留 27%的酶活力。

3 讨论与结论

本研究从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中获得 GH35 家族的 β -半乳糖苷酶 GalNC1-8。

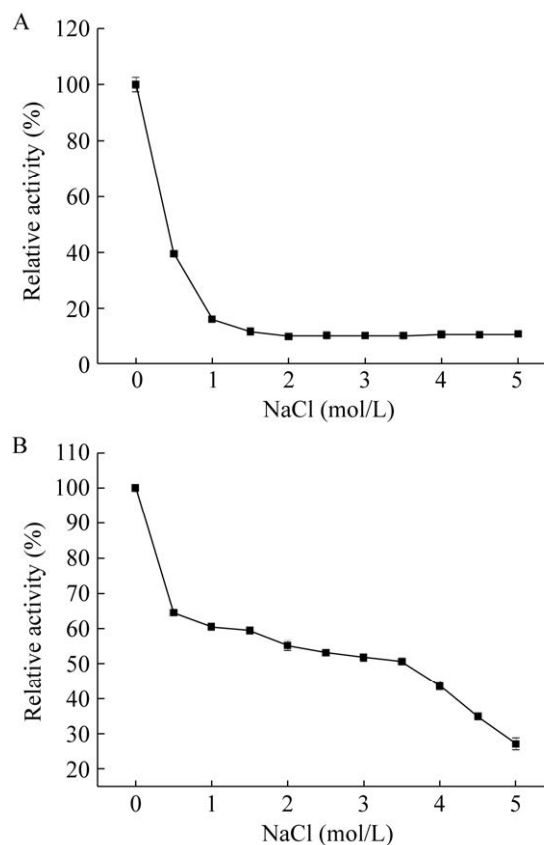


图 6 NaCl 对重组酶 GalNC1-8 的影响(A)及其 NaCl 稳定性(B)

Figure 6 Effect (A) and stability (B) of NaCl on recombinase GalNC1-8.

综合国内外研究现状发现, 粪便微生物宏基因组来源的 β -半乳糖苷酶多数属于 GH2 家族, 只有少数属于 GH35 和 GH1 家族, 其中 GH35 家族的报道仅见来源于滇金丝猴粪便微生物宏基因组的 galRBM20_1 及本研究获得的 GalNC1-8 (表 3)。

重组酶 GalNC1-8 的蛋白分子量仅为 28.18 kDa, 是已知宏基因组来源的蛋白分子量最小的 β -半乳糖苷酶。一般来说, 低分子量的酶蛋白折叠较为迅速、能耗低, 与高分子量的酶相比更易于异源表达, 因此 GalNC1-8 在工业上具有高效生产酶蛋白的可能。

表 3 目前胃肠道粪便微生物宏基因组来源的 β -半乳糖苷酶酶学性质比较

Table 3 Comparison of the enzymatic properties of recombinase with β -galactosidase derived from gastrointestinal fecal microbial metagenome

Source	Enzyme	GH family	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	Temperature stability	pH stability
Fecal microbial metagenome from <i>Nomascus concolor</i>	GalNC1-8	GH35	50	8.0	30–40 °C for 1 hour has more than 90% activities; 50 °C for 1 hour has 80% activities	pH 7.0–9.0 for 1 hour has more than 54% activities; pH 10.0 for 1 hour has 20% activities
Metagenome from earthworms	G03-3 ^[11] G04-9 ^[11]	–	40 50	7.0–8.0 8.0–10.0	– –	– –
Fecal microbial metagenome from <i>Rhinopithecus bieti</i>	galRBM20_1 ^[12] galRBM20_2 ^[12] galRBM20_13 ^[12] galRBM20_15 ^[12] GalRBM1 ^[13]	GH35 GH2 GH1 GH2	45 45 45 45 50	5.0 7.0 7.0 8.0 7.0	37 °C or 45 °C for 1 hour has 100% activities; 50 °C for 20 min has 20% activities 37, 45 or 50 °C for 1 hour has 100% activities; 55 °C for 1 hour has more than 40% activities 37, 45 or 50 °C for 1 hour has 100% activities; 55 °C for 1 hour has about 40% activities 37 °C and 50 °C for 1 hour has separately 100% and 70% activities; 55 °C for 1 hour has about 40% activities 30–50 °C for 4 hours has more than 85% activities	pH 5.0–8.0 for 1 hour has about 100% activities; pH 9.0–12.0 for 1 hour has no activity pH 5.0–10.0 for 1 hour has more than 50% activities pH 7.0–11.0 for 1 hour has 20%–30% activities pH 5.0–10.0 for 1 hour has more than 100% activities pH 5.0–11.0 for 1 hour has more than 70% activities
Infant fecal microbial metagenome	β -Gal _{INF} ^[14]	GH2	50	6.5	37 °C or 40 °C for 80 min has more than 90% activities; 50 °C for 20 min has about 50% activities	pH 6.5 or pH 8.0 for 72 hours has more than 90% activities
Human fecal metagenome	BgaC ^[15]	GH2	37	7.0	30–40 °C 1 hour has more than 65% activities; 50 °C for 1 hour has less than 20% activities	pH 4.0–10.0 for 24 hours has more than 80% activities

注: –, 无或文献中未提及

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

重组酶 GalNC1-8 为高温酶, 其最适温度 (50 °C) 与蚯蚓排泄物宏基因组来源的 G04-9、滇金丝猴粪便微生物宏基因组来源的 GalRBM1、婴儿粪便微生物宏基因组来源的 β -Gal_{INF} 一致(表 3)。另外, 重组酶的温度作用范围广、热稳定性较好。这可能与酶蛋白带电氨基酸残基的数目有关(表 4), 而且大量谷氨酸 (E) 有利于酶对高温的适应性和稳定性^[29]。重组酶在 37–50 °C 下耐受 1 h 后, 仍剩余 80% 以上的酶活力(图 5), 比人类粪便微生物宏基因组来源 BgaC 的稳定性更好(表 3); 其中, 重组酶在 50 °C 下的稳定性还明显优于滇金丝猴粪便微生物宏基因组来源的 galRBM20_1 以及婴儿粪便微生物宏基因组来源的 β -Gal_{INF} (表 3)。由于乳糖在高温反应体系中的溶解度更高 (25 °C, $S_{\text{乳糖}}=18.9 \text{ g}/100 \text{ g 水}$), 因此 GalNC1-8 具有在生产 GOS 方面的应用优势。

重组酶 GalNC1-8 的最适 pH 为 8.0, 具有较为宽泛的 pH 作用范围和较好的 pH 稳定性。该酶在 pH 7.0–9.0 条件下均能保持 43% 以上的活性; 在此 pH 范围内耐受 1 h 后剩余酶活 54% 以上(图 4), 高于滇金丝猴粪便微生物宏基因组来源的 galRBM20_13 (表 3)。在 pH 10.0 的强碱环境下耐受 1 h 后, 重组酶仍能保留 20% 的酶活力(图 4B), 比 galRBM20_1 (酶失活) 的稳定性好(表 3)。

表 4 GalNC1-8 的氨基酸数目及其百分比

Table 4 The number and percentage of amino acids of GalNC1-8

Name of amino acid	Number and percentage of amino acids of GalNC1-8
Positively charged amino acids	K (Lys) 17 (6.67%)
	R (Arg) 3 (1.18%)
	H (His) 1 (0.39%)
Negatively charged amino acid	E (Glu) 25 (9.80%)
	D (Asp) 13 (5.10%)

为避免微生物污染, 食品加工过程中通常会使用胺或氢氧化钠对反应容器进行热处理和无菌处理, 要求酶在高温和碱性条件下要有较好的稳定性。因此重组酶 GalNC1-8 具有应用于食品工业的潜力。大多数动物胃肠道微生物宏基因组来源的 β -半乳糖苷酶都对 37 °C、pH 7.0–8.0 的环境表现出良好的稳定性(表 3), 这可能与其长期存在的小肠腔环境(37 °C 左右、pH 约为 7.6)有关。

金属离子和化学试剂对重组酶 GalNC1-8 的影响较大, 大部分表现为抑制作用。Na⁺、K⁺、Li⁺ 分别能将其酶活力提高 10%、5% 和 16%, 这 3 种金属离子可能作为 GalNC1-8 的辅因子, 稳定了该酶的立体结构使其酶活性增加。Mg²⁺ 对大多数灵长类动物粪便微生物宏基因组来源的 β -半乳糖苷酶^[12-15] 起促进作用, 却抑制了 GalNC1-8 的活性。Cu²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺ 均完全抑制了 GalNC1-8 的活性, 这与婴儿粪便微生物宏基因组来源的 β -Gal_{INF}^[14] 相似。金属离子螯合剂 EDTA 几乎完全抑制重组酶 GalNC1-8 的活性, 这表明二价金属离子可能对该酶活性构象的维持起关键作用。 β -巯基乙醇能将重组酶的酶活力提高至 128%, 说明催化过程中可能有巯基基团的参与。由于 β -半乳糖苷酶能将乳糖降解为更易于微生物利用的葡萄糖和半乳糖, 因此以乳清(含大量乳糖)为原料发酵制备生物乙醇时, 可加入对乙醇有较好耐受力的 β -半乳糖苷酶来提高乙醇的生产效率。本研究获得的重组 β -半乳糖苷酶 GalNC1-8 在含乙醇的反应体系中活性几乎不受影响, 这为该酶应用于生物乙醇的制备提供了新可能。

重组酶 GalNC1-8 具有较好的 NaCl 耐受性。这可能与酶蛋白带电氨基酸的数目及分布有关, 研究表明带负电的氨基酸会与盐离子竞

争水合作用,在蛋白分子表面形成稳定的水化层,并在高离子浓度存在下保持其功能构象^[30]。GalNC1-8在0.5–3.5 mol/L NaCl中预处理1 h后能保持50%以上的酶活力,经5.0 mol/L NaCl处理1 h后酶活力仍剩余27%(图6B)。这与本课题组前期从滇金丝猴粪便微生物宏基因组中挖掘到的5个 β -半乳糖苷酶^[12-13]相似,可能都是为了更好地适应相对高渗的胃肠道腔(相当于0.3 mol/L的NaCl)环境。

本研究获得已知宏基因组来源蛋白分子量最小、pH作用范围广泛、热稳定性和NaCl耐受性较好的GH35家族碱性 β -半乳糖苷酶GalNC1-8,在生产GOS、制备生物乙醇等领域具有较好的潜在价值。

REFERENCES

- [1] 董艺凝,陈卫,陈海琴,赵建新,陈永泉,张灏.嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)来源耐热 β -半乳糖苷酶BgaB转糖苷催化活性改造[J].食品与发酵工业,2020,46(2):1-6
Dong YN, Chen W, Chen HQ, Zhao JX, Chen YQ, Zhang H. Enhances transglycosylation activity of thermostable β -galactosidase BgaB from *Geobacillus stearothermophilus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(2): 1-6 (in Chinese)
- [2] Silvério SC, Macedo EA, Teixeira JA, Rodrigues LR. New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis[J]. Bioresource Technology, 2018, 250: 131-139
- [3] Liu P, Wang W, Zhao J, Wei DZ. Screening novel β -galactosidases from a sequence-based metagenome and characterization of an alkaline β -galactosidase for the enzymatic synthesis of galactooligosaccharides[J]. Protein Expression and Purification, 2019, 155: 104-111
- [4] Sieber R, Stransky M, De Vrese M. Lactose intolerance and consumption of milk and milk products[J]. Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft, 1997, 36(4): 375-393
- [5] 张莉,李庆章,田雷. β -半乳糖苷酶研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(7): 128-131
Zhang L, Li QZ, Tian L. Research advancement of β -galactosidase[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009, 40(7): 128-131 (in Chinese)
- [6] 高秀容,马力,叶华. β -半乳糖苷酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2005(3): 18-20, 30
Gao XR, Ma L, Ye H. Research advancement of β -galactosidase[J]. Biotechnology Bulletin, 2005(3): 18-20, 30 (in Chinese)
- [7] Oliveira C, Guimarães PMR, Domingues L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 600-609
- [8] 许波,杨富亚,慕跃林,李俊俊,唐湘华,杨云娟,黄遵锡. 胃肠道微生物及其分子生态学技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 136-145
Xu B, Yang FY, Mu YL, Li JJ, Tang XH, Yang YJ, Huang ZX. Molecular ecology applied to gastrointestinal tract microorganisms[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 136-145 (in Chinese)
- [9] 许波,杨云娟,李俊俊,唐湘华,慕跃林,黄遵锡. 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
Xu B, Yang YJ, Li JJ, Tang XH, Mu YL, Huang ZX. Metagenomics in studying gastrointestinal tract microorganism[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(12): 1721-1735 (in Chinese)
- [10] 杨雁霞,张文洪,杨云娟,黄遵锡,唐湘华,李俊俊,慕跃林,许波. 宏基因组学应用于耐盐酶类及耐盐基因研究的进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 900-912
Yang YX, Zhang WH, Yang YJ, Huang ZX, Tang XH, Li JJ, Mu YL, Xu B. Metagenomics in studying salt tolerance enzymes and salt tolerance genes[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 900-912 (in Chinese)
- [11] Beloqui A, Nechitaylo TY, López-Cortés N, Ghazi A, Guazzaroni ME, Polaina J, Strittmatter AW, Reva O, Waliczek A, Yakimov MM, et al. Diversity of glycosyl hydrolases from cellulose-depleting communities enriched from casts of two earthworm species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(17): 5934-5946
- [12] 张文洪. 粪便微生物宏基因组来源的 β -半乳糖苷酶的异源表达及酶学性质研究[D]. 昆明: 云南师范大学硕士学位论文, 2019
Zhang WH. Heterologous expression and characterization of β -galactosidase from fecal microorganisms[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan Normal University, 2019 (in Chinese)
- [13] 杨正凤,杨雁霞,张文洪,黄吉芬,黄遵锡,许波. 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, 38(4): 55-60
Yang ZF, Yang YX, Zhang WH, Huang JF, Huang ZX, Xu B. Expression and characterization of

- β -galactosidase from metagenome[J]. Journal of Yunnan Normal University: Natural Sciences Edition, 2018, 38(4): 55-60 (in Chinese)
- [14] Xin YP, Guo TT, Zhang Y, Wu JP, Kong J. A new β -galactosidase extracted from the infant feces with high hydrolytic and transgalactosylation activity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(20): 8439-8448
- [15] Mulualem DM, Agbavwe C, Ogilvie LA, Jones BV, Kilcoyne M, O'Byrne C, Boyd A. Metagenomic identification, purification and characterisation of the *Bifidobacterium adolescentis* BgaC β -galactosidase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(3): 1063-1078
- [16] 郑健, 张琦, 魏云林, 林连兵. 来源于热泉宏基因组的 β -半乳糖苷酶及其特征[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(5): 60-64
- Zheng J, Zhang Q, Wei YL, Lin LB. A β -galactosidase derived from hot springs metagenome and its characteristics[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(5): 60-64 (in Chinese)
- [17] DeCastro ME, Doane MP, Dinsdale EA, Rodríguez-Belmonte E, González-Siso MI. Exploring the taxonomical and functional profile of As Burgas hot spring focusing on thermostable β -galactosidases[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 101
- [18] 魏萍, 宋文刚, 郝岗平. 泰山土壤宏基因组 DNA 中耐热 β -半乳糖苷酶基因的克隆、表达及性质[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1686-1690
- Wei P, Song WG, Hao GP. Clone, expression and characterization of the thermostable β -galactosidase from soil metagenomic DNA of Taishan Mountain[J]. Microbiology, 2008, 35(11): 1686-1690 (in Chinese)
- [19] Wang K, Li G, Yu SQ, Zhang CT, Liu YH. A novel metagenome-derived beta-galactosidase: gene cloning, overexpression, purification and characterization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(1): 155-165
- [20] Zhang X, Li H, Li CJ, Ma T, Li G, Liu YH. Metagenomic approach for the isolation of a thermostable β -galactosidase with high tolerance of galactose and glucose from soil samples of Turpan Basin[J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1): 237-246
- [21] Wang SD, Guo GS, Li L, Cao LC, Tong L, Ren GH, Liu YH. Identification and characterization of an unusual glycosyltransferase-like enzyme with β -galactosidase activity from a soil metagenomic library[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 57: 26-35
- [22] Cheng JJ, Romantsov T, Engel K, Doxey AC, Rose DR, Neufeld JD, Charles TC. Functional metagenomics reveals novel β -galactosidases not predictable from gene sequences[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0172545
- [23] Eberhardt MF, Irazoqui JM, Amadio AF. β -galactosidases from a sequence-based metagenome: cloning, expression, purification and characterization[J]. Microorganisms, 2020, 9(1): 55
- [24] Maruthamuthu M, Jiménez DJ, Stevens P, Van Elsland JD. A multi-substrate approach for functional metagenomics-based screening for (hemi)cellulases in two wheat straw-degrading microbial consortia unveils novel thermoalkaliphilic enzymes[J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 86
- [25] 李平一. 利用宏基因组技术研究南海沉积物中 MCG 类群泉古菌的生理与进化以及 β -半乳糖苷酶[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2011
- Li PY. Insights into the physiology and evolution of Miscellaneous Crenarchaeota Group (MCG) and β -galactosidases from the sediment from the South China Sea based on metagenomic analyses[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2011 (in Chinese)
- [26] Li L, Li G, Cao LC, Ren GH, Kong W, Wang SD, Guo GS, Liu YH. Characterization of the cross-linked enzyme aggregates of a novel β -galactosidase, a potential catalyst for the synthesis of galacto-oligosaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(3): 894-901
- [27] Vester JK, Glaring MA, Stougaard P. Discovery of novel enzymes with industrial potential from a cold and alkaline environment by a combination of functional metagenomics and culturing[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 72
- [28] 华朝朗, 杨东, 毕艳玲, 阎璐, 宋劲忻, 郑进烜. 云南省西黑冠长臂猿现状及保护对策[J]. 林业调查规划, 2013, 38(4): 55-60, 66
- Hua CL, Yang D, Bi YL, Yan L, Song JX, Zheng JX. Status and conservation of western black crested gibbon in Yunnan[J]. Forest Inventory and Planning, 2013, 38(4): 55-60, 66 (in Chinese)
- [29] Kumar V, Sharma N, Bhalla TC. In silico analysis of β -galactosidases primary and secondary structure in relation to temperature adaptation[J]. Journal of Amino Acids, 2014, 2014: 47583
- [30] Karan R, Capes MD, Dassarma S. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity[J]. Aquatic Biosystems, 2012, 8(1): 4