

## 嗜盐淀粉酶产生菌的筛选鉴定及其酶学性质研究\*

# Isolation, Identification and Enzymatic Characteristics of a Halophilic-amylase-producing Strain

覃晓丽<sup>1,2</sup>,李剑龙<sup>1,2</sup>,吴昊<sup>1,2</sup>,杜丽琴<sup>1,2</sup>,韦宇拓<sup>1,2\*\*</sup>

QIN Xiao-li<sup>1,2</sup>,LI Jian-long<sup>1,2</sup>,WU Hao<sup>1,2</sup>,DU Li-qin<sup>1,2</sup>,WEI Yu-tuo<sup>1,2</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530005;2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室,广西南宁 530005)

(1. College of Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China;

2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530005, China)

**摘要:**【目的】筛选分离新的嗜盐淀粉酶产生菌,并对其进行酶学性质研究。【方法】从广西大学奶牛厂的奶牛粪便土壤中分离得到一株能产耐盐淀粉酶的菌株,利用 16S rRNA 序列对比进行鉴定,经破胞提取胞内总蛋白测定嗜盐淀粉酶酶学性质。【结果】经 16S rRNA 初步鉴定该菌株为阴沟肠杆菌属(*Enterobacter cloacae*)。该菌株是非嗜盐菌株,却能产生一种胞内嗜盐淀粉酶。酶学性质研究表明该酶在 NaCl 终浓度为 4mol/L 时,酶活力最强,当盐浓度为 5.5mol/L 时,仍能保持最高酶活的 60%;以 MOPS-NaCl 配制的 1% 可溶性淀粉溶液为底物时,其最适反应温度为 50℃,最适 pH 值为 6.5, pH 值在 4.5~8.5 时均能保持 60% 以上的相对活力;在 35~45℃ 的温度范围内显示较好的稳定性,相对酶活保持在 80% 以上,但当温度达到 50℃ 时,酶活力急剧下降;Ca<sup>2+</sup> 浓度对酶活力几乎没有影响;EDTA 浓度在 10~140mmol/L 时酶活力变化不大,大于 140mmol/L 之后,酶活力逐渐下降。【结论】该菌株是在非嗜盐菌株中发现的具有嗜盐淀粉酶基因的菌株,其嗜盐淀粉酶在高盐环境下具有很高的酶活力。

**关键词:**阴沟肠杆菌 嗜盐淀粉酶 酶学性质

中图分类号:Q939.97 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2014)02-0129-06

**Abstract:**【Objective】Screening and isolating halophilic-amylase-producing strains, and studying on their enzymology properties. 【Methods】A bacterium which produced salt tolerance amylase was isolated from the cow manure soil in the dairy plant of Guangxi University. The strain was identified by 16S rRNA alignment, and extracted total intracellular protein via cracking the strains' cell to study on the enzymology properties. 【Results】By analyzing of 16S rRNA sequence, the strain was initially identified as genus of *Enterobacter cloacae*. It is a non-halophilic strain, but can produce a kind of intracellular halophilic amylase. Studies on enzymology properties had shown that it had the highest enzyme activity when the final NaCl concentration

reached 4mol/L. It had still maintained 60% relative activity at the 5.5mol/L salt concentration. When MOPS-NaCl soluble starch was used as substrate, its optimal activity was at 50℃ and pH 6.5, while more than 60% relative enzyme activity maintained from pH4.5 to pH8.5; the thermostability holded high stability from 35℃ to 45℃ and the relative activity is more than

收稿日期:2013-10-24

修回日期:2013-12-11

作者简介:覃晓丽(1987-),女,硕士研究生,主要从事微生物生物技术研究。

\* 广西科学研究与技术开发计划项目(项目号 11107008-3)资助。

\*\* 通讯作者:韦宇拓(1971-),男,教授,主要从事发酵与酶工程方向的研究。

80%, however, when the temperature reached 50°C, the activity dropped sharply; Ca<sup>2+</sup> concentration had almost no effect on enzyme activity; the enzyme activity had hardly changed when the EDTA concentration was among 10~140mmol/L, but decreased gradually above 140mmol/L. **【Conclusion】**The experimental strains were found in the non-halophilic strain with halophilic amylase gene, and the halophilic amylase has the very high enzyme activity in high salt environment.

**Key words:** *Enterobacter cloacae*, halophilic amylase, enzymatic property

**【研究意义】**嗜盐  $\alpha$ -淀粉酶是一种重要工业用酶<sup>[1~4]</sup>, 已被广泛应用于制糖、焙烤工业、酒精工业、啤酒酿造、发酵以及纺织等许多行业, 此外, 嗜盐  $\alpha$ -淀粉酶还可用于含淀粉或纤维素的高盐污水处理, 其在盐碱地改造利用等方面也发挥着重要的作用, 所以寻找新的能产嗜盐淀粉酶的微生物具有重大意义。嗜盐菌是指能在高盐浓度环境下生长的微生物, 其生理性质独特, 体内有很多酶能在高盐浓度下保持稳定, 因其拥有极高的盐耐受性和对有机溶剂的抗性, 嗜盐菌已成为产嗜盐酶资源的研究热点<sup>[5]</sup>, 并被广泛应用于水产、化工、制药、石油、发酵等排放高浓度无机盐废水的工业部门<sup>[6]</sup>。**【前人研究进展】**八十年代以来, 人们对盐适应机理的研究日益深入, 从渗透调节机理推进到分子水平, 并分离和鉴定了与渗透保护物合成途径有关的结构基因。1990年, Javed<sup>[7]</sup>发现其分离得到的克雷伯氏菌的唯一内源质粒与耐盐有关。对嗜盐酶的分子结构研究可为筛选具有更高应用价值的嗜盐酶提供基础, 促进嗜盐酶的工业应用。**【本研究切入点】**目前研究的嗜盐酶大多是从嗜盐菌中分离出来的, 因此有必要从非嗜盐菌中寻找嗜盐酶, 从而为能更深入的研究嗜盐酶机理提供新的方向和途径。**【拟解决的关键问题】**本文从广西大学奶牛场的奶牛粪便土壤中分离得到一株有淀粉酶活力的菌株, 经 16S rRNA 初步鉴定该菌株为阴沟肠杆菌属 (*Enterobacter cloacae*)。生长特性研究显示该菌株是非嗜盐菌株, 但其产生的淀粉酶是一种依赖 NaCl 的  $\alpha$ -淀粉酶, 这为从非嗜盐菌中寻找嗜盐酶找到新的途径。为此, 对该菌株所产嗜盐  $\alpha$ -淀粉酶进行初步的酶学性质研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

样品: 从广西大学奶牛场的粪便土壤中采集土样。

试剂: MOPS 购自 Amresco 公司, IPTG 购自 CALBIOCHEM 公司, Yeast extract 与 Tryptone 购于 OXOID 公司, rTaq DNA 聚合酶购自大连宝生物

(TaKaRa) 公司。

仪器: PCR 仪 (型号 Biometra), 恒温摇床 (ZH-WY-211B), 凝胶成像仪 (SYNGENE PTC-200), 冷冻离心机 (Universal 320 R), 水浴锅 (SHEL LAB W20M-2), 分光光度计 (Bekman Coulter DU800), 超净台 (CLEAN BENCH ZHJH-C1109B), 低温冰箱 (Thermo Forma), 台式离心机 (Eppendorf Centrifuge 5415D), 酶标仪 (U Quamt TM)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品处理

将 5g 土样加入到盛有 45mL 无菌水并带有玻璃珠的三角瓶中, 振荡约 20min, 使其充分分散, 用滤纸过滤后, 用移液枪吸取上清进行富集培养。

#### 1.2.2 肠杆菌总 DNA 提取

收集菌体, 用 CTAB 法进行肠杆菌总 DNA 的提取, 然后取 4 $\mu$ L 在 0.8% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

#### 1.2.3 菌株 16S rRNA 基因序列分析

以阴沟肠杆菌总 DNA 为模板, 应用 16S rRNA 引物: 正向引物 P1 (5' - ATGCGCAACCCAA-CACTTTT - 3') 和反向引物 P2 (5' - TTA-CAGCGCGTCCTCAATCA - 3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 $\mu$ L): 10 $\times$ PCR buffer 5 $\mu$ L, 正向引物 P1 1 $\mu$ L, 反向引物 P2 1 $\mu$ L, dNTP (25mM) 4 $\mu$ L, 模板 0.5 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 38 $\mu$ L, rTaq 酶 0.5 $\mu$ L。反应体系: 94°C 2min, 94°C 45s, 45°C 30s, 72°C 2min, 共 30 个循环, 72°C 10min。扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 进行胶回收, 将回收产物连入 pMD19-T 载体后, 转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞。在蓝白斑筛选平板上挑取阳性克隆子, 送深圳华大生物技术有限公司进行测序。

#### 1.2.4 粗酶液的制备

将测序正确的菌珠于 37°C、220rpm 摇床中振荡培养过夜, 并以此作为种子液, 取 200 $\mu$ L 接种于装有 200mL LB (含 0.1mg/mL Amp) 液体培养基的容量为 500mL 三角瓶中, 37°C、220rpm 摇床培养 2~3h, 当 OD<sub>600</sub> 达到 0.8 左右时, 加入终浓度为 1mmol/L

的 IPTG 进行诱导表达,在 37℃、220rpm 摇床继续培养 10h。

将上述培养液在 8000rpm 的离心机中离心 10min 后收集菌体沉淀,用终浓度为 0.1mol/L 的 MOPS 缓冲液 (pH 值为 7.0) 充分洗涤菌体沉淀 2 次,离心弃上清后用适量 MOPS 缓冲液重悬菌体,在冰水混合浴中进行超声波破胞,超声破胞的工作时间 7s,间歇时间 10s,总工作时间 25min,功率 200W。破胞后在 4℃、12000rpm 的离心机中离心 15min,将上清置于冰面上即为所得粗酶液。

#### 1.2.5 酶活的测定

淀粉酶活力测定参照 Bernfeld 法<sup>[8]</sup>:取 350 $\mu$ L 1%(W/V)可溶性淀粉加入 1.5mL Eppendorf 管中,加入 50 $\mu$ L 适当稀释的酶液,而空白对照管中加入 50 $\mu$ L 已失活的酶液,在最适的条件下反应 10min 后,加入 800 $\mu$ L DNS 以终止酶反应,沸水浴 6min,迅速于流动水中冷却后,在 520nm 处测 OD 值。酶活力单位定义为在最适温度及最适 pH 值条件下,按上述反应,每分钟生成 1 $\mu$ mol 还原糖所需的酶量为一个酶单位(1U)。

#### 1.2.6 酶学性质的研究

(1)与 EDTA 螯合后的酶活情况:取适当稀释后的粗酶液 50 $\mu$ L 和用终浓度为 0.1mol/L 的 EDTA 螯合后稀释相同倍数的粗酶液 50 $\mu$ L,分别与 350 $\mu$ L 用 MOPS 配制的 1%可溶性淀粉溶液反应 10min 后测定酶活情况,再用终浓度为 0.1mol/L 的 EDTA 螯合后稀释相同倍数的粗酶液 50 $\mu$ L 与 350 $\mu$ L 用 MOPS-NaCl 配制的 1%可溶性淀粉溶液反应 10min 后测酶活情况。

(2)在不同缓冲液下的酶活情况:取 50 $\mu$ L 适当稀释后的粗酶液分别与 350 $\mu$ L 用不同缓冲液 (Tris-HCl、MOPS-NaOH 和柠檬酸-氢氧化钠-盐酸) 配制的 1%可溶性淀粉溶液反应测定酶活力,再分别向各体系加入 3mol/L 的 NaCl 后,测定其酶活情况。

(3)嗜盐酶的最适 NaCl 浓度:取适当稀释后的粗酶液 50 $\mu$ L 与 350 $\mu$ L 用 MOPS-NaOH 和浓度分别为 2.0mol/L、2.5mol/L、3.0mol/L、3.5mol/L、4.0mol/L、4.5mol/L、5.0mol/L、5.5mol/L 的 NaCl 溶液配制的 1%可溶性淀粉溶液在 50℃下测定酶活力,以最高酶活力为 100%绘制 NaCl 浓度对酶活力影响的曲线。

(4)嗜盐酶的最适反应温度:取 50 $\mu$ L 适当稀释后的粗酶液与 350 $\mu$ L 用 MOPS-NaOH 配制的 1%可溶性淀粉溶液分别在 35~65℃(间隔 5℃)条件下测定酶活力,以最高酶活力为 100%绘制温度对酶活力

的影响曲线。

(5)嗜盐酶的最适反应 pH 值:取 50 $\mu$ L 适当稀释后的粗酶液与 350 $\mu$ L 用 MOPS-NaCl 配制的 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 (pH 在常温下调节)的 1%可溶性淀粉溶液,在反应温度为 50℃条件下测定酶活力,以最高酶活力为 100%绘制 pH 值对酶活力的影响曲线。

(6)嗜盐酶的 pH 稳定性:用不同 pH 值 (4.5~8.5,间隔 0.5)的 MOPS 缓冲液稀释粗酶液,并将稀释好的酶液在 4℃放置 12h 后,各取 50 $\mu$ L 加入到 350 $\mu$ L 用 MOPS-NaCl 配制的 1%可溶性淀粉溶液在 50℃反应 10min,以未处理过的酶液在同等条件下反应测得的酶活力为 100%绘制 pH 稳定性曲线。

(7)嗜盐酶的热稳定性:将粗酶液分别置于 35~65℃(间隔 5℃)水浴锅中恒温温浴 30min 后稀释到适当的倍数,取 50 $\mu$ L 分别加入 350 $\mu$ L 用 pH 值为 6.5 的 MOPS-NaOH 缓冲液配制的 1%的可溶性淀粉溶液反应,以未经过恒温水浴处理的酶液在同等条件下反应测得的酶活力为 100%绘制热稳定性曲线。

(8)Ca<sup>2+</sup>对嗜盐酶活性的影响:分别用浓度为 0mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L、2mmol/L、3mmol/L、4mmol/L、5mmol/L、6mmol/L 的 Ca<sup>2+</sup>-MOPS 溶液稀释适当相同倍数的粗酶,然后将其放置在 4℃12h,取 50 $\mu$ L 稀释后的酶液加入到 350 $\mu$ L 用 MOPS-NaCl (pH 值为 6.5)配制的 1%可溶性淀粉溶液在 50℃反应 10min,以不参加反应的酶液同等条件下反应测得的酶活力为 100%绘制 Ca<sup>2+</sup>对酶活性影响的曲线。

(9)EDTA 对嗜盐酶活性的影响:将 EDTA 终浓度分别为 0mmol/L、10mmol/L、30mmol/L、50mmol/L、80mmol/L、100mmol/L、120mmol/L、140mmol/L、160mmol/L、180mmol/L、200mmol/L、500mmol/L 的稀释酶液于 4℃处理 12h,然后分别取 50 $\mu$ L 处理的酶液与 350 $\mu$ L 的 1%可溶性淀粉溶液在最适条件下测定残余酶活力,以未加 EDTA 的酶液在同等条件下反应测得的酶活力为 100%绘制 EDTA 对嗜盐酶活力的影响的柱形图。

(10)嗜盐酶与不同底物反应:分别取 1mL 浓度为 1%的可溶性淀粉、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽糖、麦芽三糖、蔗糖、 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、普鲁兰糖,与 100 $\mu$ L 嗜盐酶粗酶反应 12h,再用 HPLC 检测嗜盐酶与不同底物的反应情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 肠杆菌总 DNA 提取及 16S rRNA 鉴定

如图 1 所示,肠杆菌总 DNA 大小约为 23kb,以此总 DNA 为模板进行 16S rRNA 鉴定,将获得的 16S rRNA 序列提交到 NCBI 数据库进行比对分析,结果表明与 *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* NCTC 9394 draft genome 的一致性为 98%,筛选的菌株初步鉴定为 *Enterobacter cloacae* 菌株。

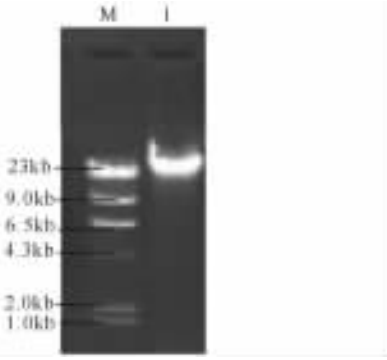


图 1 肠杆菌总 DNA

Fig. 1 Total DNA of *Enterobacter cloacae*

Lane M:  $\lambda$ DNA/ *Hind*III Marker Lane 1: totalDNA

### 2.2 嗜盐酶的酶学性质

#### 2.2.1 与 EDTA 螯合后的酶活情况

实验结果表明,与 EDTA 螯合过的酶和没有与 EDTA 螯合过的酶,在与可溶性淀粉反应时,均没有酶活,而 EDTA 螯合过的酶与加入 NaCl 的可溶性淀粉反应时表现出有酶活,可见该嗜盐酶确实有在 NaCl 的情况下才有酶活(如表 1)。

表 1 嗜盐酶与 EDTA 螯合后的酶活情况

Table 1 Enzyme activity of halophilic enzyme with EDTA chelation

不同反应体系 Different reaction system	酶活(有/无) Enzyme activity (Y/N)
酶+可溶性淀粉 Enzyme+Soluble amylase	无 (N)
EDTA+酶+可溶性淀粉 EDTA+enzyme+Soluble amylase	无 (N)
EDTA+酶+NaCl+可溶性淀 EDTA+enzyme+NaCl+Soluble amylase	有 (Y)

#### 2.2.2 在不同缓冲液下的酶活情况

如表 2 所示,嗜盐酶在 Tris-HCl 和 MOPS-NaOH 反应体系中没有酶活,在柠檬酸-氢氧化钠-盐酸反应体系中有酶活,向各体系加入 NaCl 后,嗜盐酶均表现出酶活,说明嗜盐酶在  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  同时存在时才有酶活。

表 2 在不同缓冲液下的酶活情况

Table 2 The enzyme activity under different buffers

缓冲液类型 Buffer type	不加 NaCl Without NaCl	加入 NaCl With NaCl
Citric acid-NaOH-HCl	有(Y)	有(Y)
Tris-HCl	无(N)	有(Y)
MOPS-NaOH	无(N)	有(Y)

#### 2.2.3 嗜盐酶的最适 NaCl 浓度

如图 2 所示,肠杆菌嗜盐酶在与不同 NaCl 浓度的 1% 可溶性淀粉溶液反应中,当 NaCl 终浓度为 2~4mol/L 时酶活力呈现上升趋势,且在 3~3.5mol/L 之间上升速度最快,在 NaCl 终浓度达到 4mol/L 时酶活力最高,而在 4mol/L 之后就缓慢下降,但是在 5.5mol/L 时仍然有 60% 以上的相对活力。

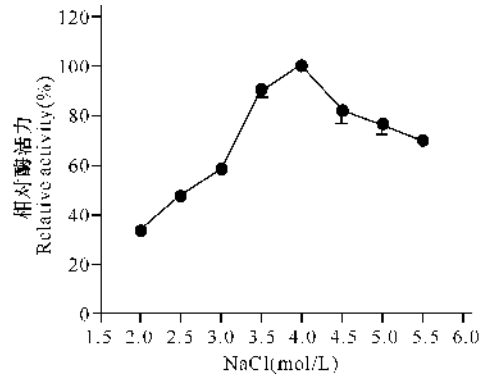


图 2 NaCl 浓度对酶活性的影响

Fig. 2 Effect of NaCl concentration on enzyme activity

#### 2.2.4 嗜盐酶的最适反应温度及其热稳定性

由图 3 可见,嗜盐酶在 35~50℃ 时,酶活力呈现缓慢上升趋势,且最适温度为 50℃,但是在 50℃ 之后则酶活力迅速下降;而酶的热稳定性则是在 35~45℃ 之间保持相对高的酶活力,在 50℃ 之后则酶活下降,在 55℃ 之后几乎没有了酶活力(如图 3)。

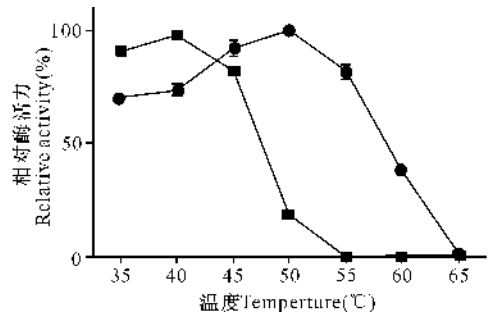


图 3 温度对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity

#### 2.2.5 嗜盐酶的最适 pH 值及其 pH 稳定性

如图 4 可见,肠杆菌嗜盐酶在 pH 值 4.5~6.5 之间的酶活力呈现上升趋势,且上升较快,在 pH 值为 6.5 时达到了最高,可见嗜盐酶的最适 pH 值为 6.5,但是在 pH 值超过 6.5 之后就迅速下降了。从 pH 值对肠杆菌嗜盐酶的稳定性的角度来看,在 pH 值为

4.5~8.5的条件下均能保持在60%以上。

### 2.2.6 Ca<sup>2+</sup>对嗜盐酶活性的影响

实验结果表明,肠杆菌嗜盐酶在不同浓度的Ca<sup>2+</sup>条件下比较稳定,酶活力均能保持在80%以上,即Ca<sup>2+</sup>浓度对酶活力几乎没有影响(如图5)。

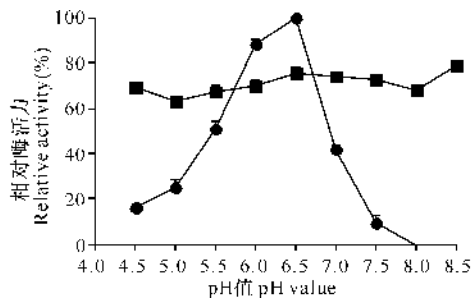


图4 pH值对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH value on enzyme activity

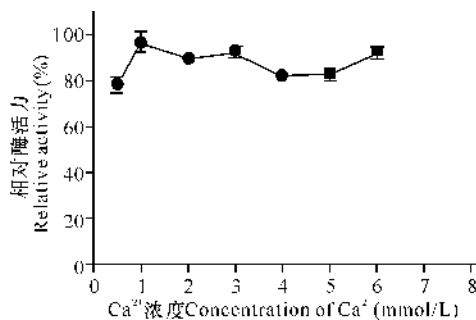


图5 Ca<sup>2+</sup>对酶稳定性的影响

Fig. 5 Effect of Ca<sup>2+</sup> on enzyme stability

### 2.2.7 EDTA对嗜盐酶活性的影响

实验结果表明,在10~140mmol/L的浓度范围内,EDTA对嗜盐酶活力的抑制作用不大,当浓度大于140mmol/L之后抑制作用明显,到了180mmol/L时酶活力几乎为零(如图6)。

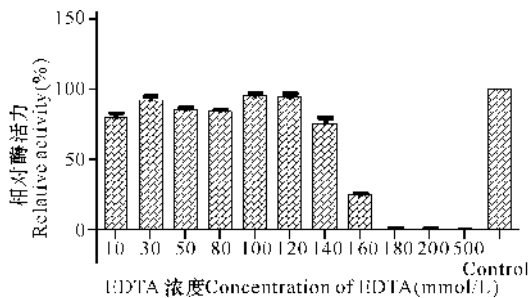


图6 EDTA对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of EDTA on enzyme activity

### 2.2.8 嗜盐酶与不同底物反应

经HPLC检测,嗜盐酶可以和可溶性淀粉、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖反应,而不能和麦芽糖、麦芽三糖、蔗糖、 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、普鲁兰糖反应(见表3),说明此嗜盐酶具有典型的 $\alpha$ -淀粉酶特征。

表3 嗜盐酶与不同底物反应情况

Table 3 Halophilic enzyme reaction with different substrates

底物 Substrate	反应(是/否) Reaction(Y/N)
可溶性淀粉 Soluble amylase	+
麦芽糖 Maltose	-
麦芽三糖 Maltotriose	-
麦芽四糖 Maltotetraose	+
麦芽五糖 Maltopentaose	+
麦芽六糖 Maltohexaose	+
蔗糖 Sucrose	-
$\alpha$ -环糊精 Alpha-cyclodextrin	-
$\beta$ -环糊精 Beta-cyclodextrin	-
普鲁兰糖 Pullulan	-

注:其中+表示能反应,-表示不能反应;Note: + said reaction, - said no reaction

## 3 结论

嗜盐淀粉酶能在高盐的条件下保持活力,因此在腌制食品、海洋食品及发酵等食品中具有重要的应用价值。目前报道的嗜盐淀粉酶大多来自极端嗜盐菌和中度嗜盐菌,如 *Halomonas meridiana* [9], *Halobacillus* sp. Strain MA-2 [10], *Halorhabdus utahensis* [11], *Haloarcula hispanica* [12], *Pseudoalteromonas* sp. Strain CP76 [13]。本研究筛选到的阴沟肠杆菌菌株(*Enterobacter cloacae*)属于非耐盐的普通菌株,但其产生的淀粉酶却是一种典型嗜盐淀粉酶,该酶的最适反应温度是50℃,最适pH值为6.5,最适NaCl浓度是4mol/L,当盐浓度为5.5mol/L时,仍能保持最高酶活的60%。这说明嗜盐淀粉酶也可以从非嗜盐菌获得,下一步继续对该菌株的嗜盐淀粉酶基因进行克隆,并对其同源性进行比较分析,探讨其可能的进化来源。

### 参考文献:

- [1] Malhotra R, Noorwez S, Satyanarayana T. Production and partial characterization of thermostable and calcium independent  $\alpha$ -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54[J]. Lett Appl Microbiol, 2000, 31: 378-384.
- [2] Murakami S, Nishimoto H, Toyama Y, et al. Purification and characterization of two alkaline, thermotolerant  $\alpha$ -amylases from *Bacillus halodurans* 38C-2-1 and expression of the cloned gene in *Escherichia coli* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71: 2393-2401.
- [3] Hashim S O, Delgado O, Hatti-Kaul R, et al. Starch hydrolysing *Bacillus halodurans* isolates from a Kenyan

- soda lake[J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 823-828.
- [4] Murakami S, Nagasaki K, Nishimoto H, et al. Purification and characterization of five alkaline, thermotolerant and maltotetraose-producing  $\alpha$ -amylases from *Bacillus halodurans* MS-2-5, and production of recombinant enzymes in *Escherichia coli* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2008, 43: 321-328.
- [5] 阎松, 陈雷, 林秀坤. 微生物嗜盐酶盐适应性的分子结构基础研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(1): 91-97. Yan S, Chen L, Lin X K. Molecular structural basis of microbial halophilic enzymes related to their haloadaptation[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2012, 34(1): 91-97.
- [6] 孟凡旭, 吴敏, 张会斌, 等. 阿牙克库木湖嗜盐菌的分离及功能酶的筛选[J]. *浙江大学学报: 理学版*, 2006, 33(6): 671-675. Meng F X, Wu M, Zhang H B, et al. Isolation and enzyme screening of halophiles from Ayakekum Lake[J]. *Journal of Zhejiang University: Science Edition*, 2006, 33(6): 671-675.
- [7] Javed A Q, Malik K A. Evidence for a plasmid conferring salt-tolerance in plant-root associated diazotroph *Klebsiella* sp. [J]. *Biotec Letter*, 1990, 12(10): 783-788.
- [8] Kim T U, Gu B G, Jeong J, Y, et al. Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline ( $\alpha$ )-amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3105-3122.
- [9] Coronado M J, Vargas C, Hofemeister J, et al. Production and biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 183(1): 67-71.
- [10] Amoozegar M A, Malekzadeh F, Malik K A. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. Strain MA-2[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(3): 353-359.
- [11] Waino M, Ingvorsen K. Production of beta-xylanase and beta-xyloridase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis* [J]. *Extremophiles*, 2003, 7(2): 87-93.
- [12] Hutcheon G W, Vasisht N, Bolhuis A. Characterization of a highly stable  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica* [J]. *Extremophiles*, 2005, 9(6): 487-495.
- [13] Sanchez-Porro C, Mellado E, Bertoldo C, et al. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain CP76[J]. *Extremophiles*, 2003, 7(3): 221-228.

(责任编辑: 陆雁)