

大肠杆菌嗜盐 α -淀粉酶基因的分子改造及其酶学特性*

Escherichia coli Halophilic alpha Amylase Gene Molecular Modification and Enzymology Characteristics

李剑龙^{1,2}, 杨媛^{1,2}, 吴昊^{1,2}, 汤宏赤^{1,2}, 韦宇拓^{1,2**}

LI Jianlong^{1,2}, YANG Yuan^{1,2}, WU Hao^{1,2}, TANG Hongchi^{1,2}, WEI Yutuo^{1,2}

(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 Life 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】对大肠杆菌 *Escherichia coli* 嗜盐 α -淀粉酶基因进行改造, 并探索嗜盐 α -淀粉酶的嗜盐特性。【方法】从非嗜盐的大肠杆菌 JM109 中克隆到一个嗜盐 α -淀粉酶基因 *k6* 并进行重组表达。通过同源建模, 确定 Na^+ 结合位点上的氨基酸残基, 并对相应位点进行定点突变。最后对突变酶的酶学性质进行研究。【结果】相对于野生酶, 突变酶更加嗜盐, 其最适 NaCl 浓度由 2 mol/L 增加到 3 mol/L, 最适 pH 值为 7, 最适温度为 50℃, 酶活力为 4 831 U/mg, 提高近 4 倍。经 HPLC 检测, 突变酶与 2%(W/V) 可溶性淀粉反应后的产物为葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖的混合物。【结论】嗜盐 α -淀粉酶基因 *k6* 的嗜盐特性与 Na^+ 结合位点具有直接联系。

关键词: 非嗜盐菌 嗜盐淀粉酶 同源建模 定点突变

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2016)01-0025-06

Abstract: 【Objective】The modification of halophilic α -amylase gene was conducted in *Escherichia coli* to explore halophilic properties of halophilic α -amylase. 【Methods】Firstly, a halophilic amylase gene was cloned from the non-halophilic bacteria *E. coli* JM109, and the recombinant gene was successfully expressed. Secondly, the amino acid binding site of Na^+ was determined by homology modeling, and site-directed mutagenesis was conducted at the corresponding sites. Finally, the enzymatic properties of the mutant enzymes were studied. 【Results】The mutant enzyme was characterized by higher halophilic property than wild type, and the optimum concentration of NaCl increased from 2 mol/L added to 3 mol/L. The halophilic amylase had the optimum pH at 7 and the optimum temperature at 50℃, under which its specific activity was 4 831 U/mg, revealing nearly fourfold increase than the original enzyme. HPLC testing showed that the products were mixed with glucose, maltose and maltotriose after the reaction with 2%(W/V) of soluble starch. 【Conclusion】Halophilic characteristics of halophilic amylase gene *k6* has direct relationship with Na^+ binding site.

Key words: non-halophilic bacteria, halophilic amylase, homology modeling, site-directed mutagenesis

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160315.005

收稿日期: 2015-11-20

修回日期: 2016-01-31

作者简介: 李剑龙(1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物生物技术研究。

* 国家自然科学基金项目(31460437)和广西研究生教育创新计划项目(YCSZ2014050)资助。

** 通讯作者: 韦宇拓(1971-), 男, 教授, 主要从事发酵与酶工程研究, E-mail: weiyutuo@gxu.edu.cn.

0 引言

【研究意义】 α -淀粉酶作为一种重要的工业用酶^[1], 目前已广泛应用于焙烤、啤酒酿造、纺织退浆、制药等行业中^[2-5]。普通的淀粉酶作为生物催化剂, 效率高但所需条件温和, 在强酸、强碱、高盐等极端环

境下耐受性差,易变性失活;而极端酶却能在这种残酷的环境下依然保持高效的催化能力。因此,研究、挖掘极端酶,开发其潜在的应用价值就具有重要的意义。【前人研究进展】目前对于嗜盐 α -淀粉酶的嗜盐机理,主要存在两种理论:一是在高浓度的离子环境中,通过特定位置上的一些关键离子相互作用及其与水形成的巨大水网络来稳定蛋白质的空间结构^[6];二是通过弱疏水的内核与酸性的、高离子化的蛋白表面作为其在环境中的平衡因子来维持它们在高盐环境下的正确折叠等^[7],这与 Alteemark^[8]、Madern^[9]、Kastritis^[10]、Nonaka^[11]等在嗜盐酶方面的研究结果基本吻合。【本研究切入点】本文研究的嗜盐 α -淀粉酶基因来自于非嗜盐菌 *Escherichia coli* JM109,在高盐环境下依然能保持稳定的结构和高效的生物催化能力,这在食品腌制、调味剂等的工业生产及盐碱地的改造等多方面都具有开发利用价值^[12]。因此,我们参照上述的研究结果,通过同源建模,选定嗜盐 α -淀粉酶定点突变的位置及替换氨基酸 *k6*-P368G,并研究其相关的酶学特性。【拟解决的关键问题】研究嗜盐 α -淀粉酶基因 *k6* 的嗜盐特性是否与 Na^+ 结合位点具有直接的联系,探索嗜盐 α -淀粉酶嗜盐的分子机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

PrimeSTAR HS DNA 聚合酶(TaKaRa 公司), *DpN* I (TaKaRa 公司),金属镍亲和层析介质(pharmacia 公司),IPTG(CALBIOCHEM 公司),麦芽糖及其麦芽三糖为色谱纯,Lysis buffer(50 mmol/L NaH_2PO_4 ,300 mmol/L NaCl ,10 mmol/L 咪唑),其他试剂为国产分析纯。

1.1.2 菌种和质粒

宿主大肠杆菌 *E. coli* JM109 及其表达载体 pSE380 均为实验室保藏菌种。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据已有的大肠杆菌 JM109 嗜盐淀粉酶基因序列,再参照前面所述的嗜盐淀粉酶定点突变位点的选择,设计引物(P1:5'-TTCTATGGCGACCTC-TACGGTGCAT-3';P2:5'-GAGGTCGCCAT-AGAATACCGAAGGAAC-3'),反向定点扩增目的基因。

1.2.2 定点突变基因的扩增

从含有嗜盐 α -淀粉酶基因 *k6* 的 pSE380-K6 菌

株中提取重组质粒作模板,以 P1、P2 为引物,扩增点突变目的基因 *k6*-P368G,其扩增体系为 50 μL ,扩增条件为:98 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,98 $^\circ\text{C}$ 变性 10 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火 15 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 90 s,循环 29 次,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.3 重组表达载体的构建及其目的蛋白的表达纯化

将验证后的 PCR 扩增产物胶回收,*DpN* I 酶消除模板。利用化学转化法,将纯化的点突变产物转入到宿主细胞 JM109 中并测序验证。将点突变成功的菌种接种到 LB(含 100 mg/L 的 Amp)培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床培养,当 OD_{600} 达到 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的诱导剂 IPTG,在 30 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床中继续培养 10 h,进行目的蛋白的诱导表达。离心已培养好的发酵液,收集菌体,用中性磷酸-柠檬酸缓冲液重悬菌体,清洗两次,然后再用 10 mmol/L 的 Lysis buffer(缺少 NaCl 成分)重悬菌体,在冰浴条件下超声波破胞。最后离心破胞液,收集上清,利用金属镍亲和层析纯化目的蛋白,并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测目的蛋白的纯化效果。

1.2.4 酶活的测定

淀粉酶酶活的测定参考 Bernfeld^[13]的方法并结合自己的标准曲线体系:取 190 μL 1%(W/V)的可溶性淀粉为底物,加入到 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,加入稀释一定倍数的纯酶液 10 μL ,而空白对照组中加入相同体积的经煮沸灭活的稀释纯酶液,在最适条件下反应 10 min,反应结束后加入 400 μL 的 3,5-二硝基水杨酸溶液(DNS)终止反应。沸水浴 5 min 显色,再迅速置于冰水混合液中快速冷却,混匀后取 200 μL 混合液于 96 孔板中,测定其吸光值 OD_{540} 。酶活力单位定义为在最适条件下,按照上述的反应体系,每 1 min 生成 1 μmol 还原糖所需要的酶量为一个酶活单位(U)。根据国际酶学会的规定计算比活力,即比活力=酶活(U)/蛋白含量(mg),重组酶蛋白含量按照《蛋白质技术手册》中的 Bradford 方法^[14]来测定。

1.2.5 突变酶的酶学性质研究

(1)最适 pH 值

取稀释一定倍数的纯酶液 10 μL 加入到含 1%(W/V)可溶性淀粉、2 mol/L NaCl (野生型嗜盐淀粉酶 K6 的最适 NaCl 浓度)的不同 pH 值的磷酸-柠檬酸缓冲液中,在 37 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅中反应 10 min 后测定其酶活,以最高酶活力为 1 绘制 pH 值对酶活力的影响曲线。

(2)最适温度

取稀释一定倍数的纯酶液 10 μ L 加入到含 1% 可溶性淀粉、2 mol/L NaCl 的 pH 值为 7.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液中,分别在 25~65 $^{\circ}$ C 水浴条件下反应 10 min,然后测定其酶活,以最高酶活力为 1 绘制温度对酶活力的影响曲线。

(3)最适 NaCl 浓度

取稀释一定倍数的纯酶液 10 μ L 加入到含 1% 可溶性淀粉、pH 值为 7.0、不同 NaCl 浓度的磷酸-柠檬酸缓冲液中,在 50 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中反应 10 min 后测定其酶活,以最高酶活为 1 绘制 NaCl 浓度对酶活力的影响曲线。

(4)Ca²⁺对酶活性的影响

用不同浓度的 Ca²⁺ 溶液同时处理稀释酶液(在 4 $^{\circ}$ C 低温条件下处理 12 h),取 10 μ L 经处理的酶液与 1% 可溶性淀粉在最适条件下反应 10 min 后测定其酶活,以未经处理的酶液在同等条件下测得的酶活力为 1,绘制 Ca²⁺ 对酶活力影响曲线。

(5)EDTA 对酶活力的影响

参照 Ca²⁺ 对酶稳定性影响的测定方法,绘制 EDTA 对酶活力影响的柱状图。

(6)金属离子对酶活力的影响

将终浓度为 5 mmol/L 的不同金属离子分别与 1% 可溶性淀粉混匀,取 10 μ L 稀释后的纯酶液分别与上述混合物作用,在最适条件下反应 10 min 后测定其残余酶活;以未加金属离子的底物为空白对照组,在同等条件下测得的酶活力为 1,绘制金属离子对突变酶活力影响的柱状图。

(7)有机溶剂对酶活力的影响

将终浓度为 5% (V/V) 的不同有机溶剂分别与 1% 可溶性淀粉混匀,取 10 μ L 稀释一定倍数的纯酶液,在最适条件下反应 10 min 后测定其酶活,以未加有机溶剂的为空白对照,在同等条件下测得的酶活力为 1,绘制有机溶剂对酶活力影响柱状图。

(8)pH 稳定性

用不同 pH 值缓冲液稀释纯酶液(pH 值为 5~8 的磷酸-柠檬酸缓冲液),于 4 $^{\circ}$ C 处理 12 h,在最适条件下与 1% 可溶性淀粉反应 10 min,然后测定其残余酶活,以未经处理的酶液为空白对照,在相同条件下测得的酶活力为 1,绘制酶的 pH 值稳定曲线。

(9)突变酶温度稳定性

在各温度梯度下,将稀释一定倍数的纯酶液恒温处理 1 h,再在最适条件下与 1% 可溶性淀粉反应 10 min,然后测试其残留酶活,以未经处理的酶液为空白对照,在相同条件下测得的酶活力为 1,绘制酶的

温度稳定性曲线。

(10)NaCl 对非嗜盐淀粉酶的活力影响

选定非嗜盐的淀粉酶作为对照,对比分析不同浓度的 NaCl 对其活力的影响。在其最适条件下,以 1% 可溶性淀粉为底物,反应 10 min,测定其残余酶活,以未加 NaCl 的为空白对照,相同条件测定其酶活,绘制不同浓度的 NaCl 对非嗜盐淀粉酶的影响曲线。

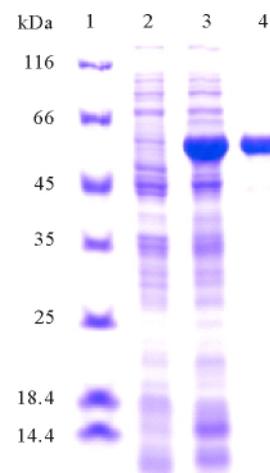
1.2.6 HPLC 对重组嗜盐 α -淀粉酶水解产物的检测分析

取过量的纯酶与 1 mL 2% 可溶性淀粉在最适条件下反应 12 h,其产物经处理后用 HPLC 检测,HPLC 分析条件如下:色谱柱:Ultima Amino 100A 5 μ 柱(4.6 mm \times 250 mm);检测器:Alltech 2000ES 型蒸发光散射检测器;流动相:80% 乙腈,20% H₂O;流速:1 mL/min;柱温:28 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 目的基因在大肠杆菌中的表达及纯化

点突变后的目的基因在大肠杆菌 JM109 中表达,经 SDS-PAGE 凝胶电泳得到一条相对分子质量(Mr)约为 56 kDa 的目的条带(泳道 3)(图 1),经镍柱纯化得到突变的蛋白(泳道 4)。结果表明目的基因在大肠杆菌 JM109 中成功表达,而且经镍柱纯化后的目的蛋白条带单一,可以进行酶学性质的研究分析。



1: 蛋白 Marker; 2: 诱导空载体 pSE380/JM109 可溶性蛋白; 3: 诱导转化子 pSE380-K6-P368G/JM109 可溶性蛋白; 4: 纯化的目的蛋白 K6-P368G

1: Protein marker; 2: Protein from soluble fractions of pSE380/JM109 with induction; 3: Protein from soluble fractions of pSE380-K6-P368G/JM109 with induction; 4: Purified K6-P368G from soluble fractions of pSE380-K6-P368G/JM109

图 1 嗜盐淀粉酶的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of the halophilic amylase

2.2 酶学性质分析

2.2.1 最适 pH 值

如图 2 所示,突变酶与野生酶的最适 pH 值均为 7.0;在 pH 值 6.0 以下,两者的相对酶活力几乎为零;在 pH 值 8.0 以上,两者的相对酶活力仅为最高酶活力的 40%左右。在同等条件下,突变酶具有更高的相对活力,使其在单位酶量下具有更高的生物催化能力。

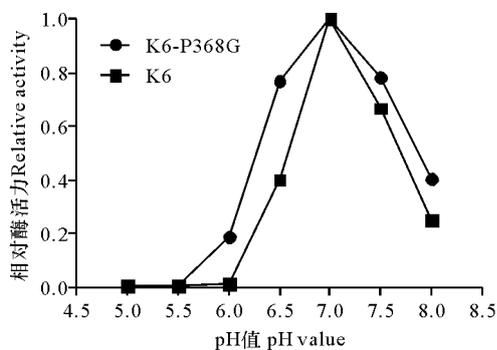


图 2 酶的最适 pH 值

Fig. 2 Optimal pH of enzymes

2.2.2 最适温度

如图 3,野生酶的最适温度是 55℃,而突变酶的最适温度是 50℃,略低于野生酶的最适温度,但是两者非常靠近。温度在 40~60℃时,野生酶与突变酶的酶活较高,相对活力维持在 70%以上。当温度超过 55℃后酶活力急剧下降,可知高温对该酶的抑制作用远大于低温的影响。

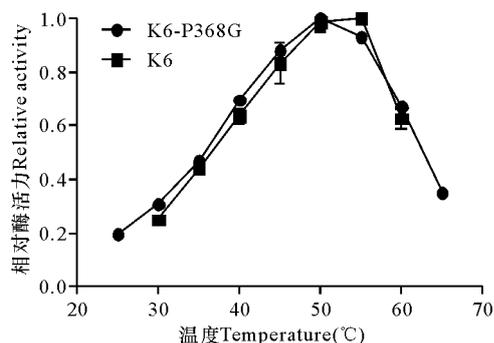


图 3 酶的最适温度

Fig. 3 Optimal temperature of enzymes

2.2.3 最适 NaCl 浓度

由图 4 可知,野生酶的最适 NaCl 浓度为 2 mol/L,而突变酶的最适 NaCl 浓度为 3 mol/L,最适 NaCl 浓度提高 50%,使突变酶在更苛刻的反应条件下依然具有较高的生物催化能力,并且在 NaCl 浓度达到饱和状态时,其相对活力仍接近 50%。

2.2.4 Ca²⁺对突变酶活性的影响

如图 5 所示,Ca²⁺浓度对突变酶的活性影响不大,残留的相对酶活力均保持在 80%以上。

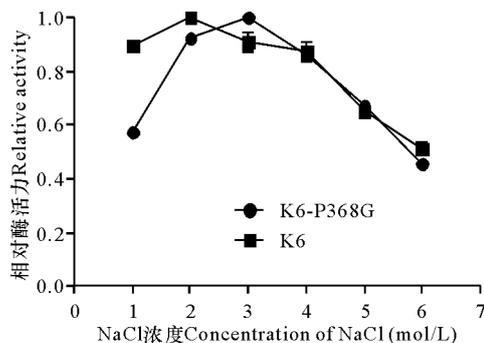


图 4 酶的最适 NaCl 浓度

Fig. 4 Optimal NaCl concentration of enzymes

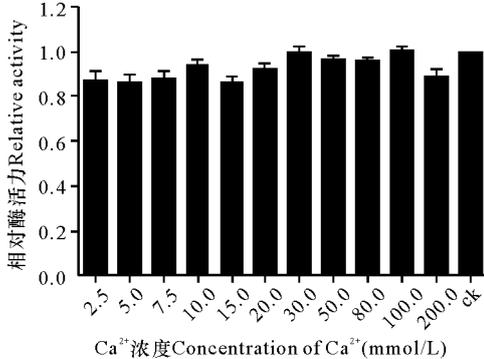


图 5 Ca²⁺对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of Ca²⁺ on enzyme activity

2.2.5 EDTA对突变酶活性的影响

图 6 结果表明,EDTA 的浓度对突变酶活性的影响不大,残留的相对酶活力均超过 85%,且各浓度之间的差异性很小。

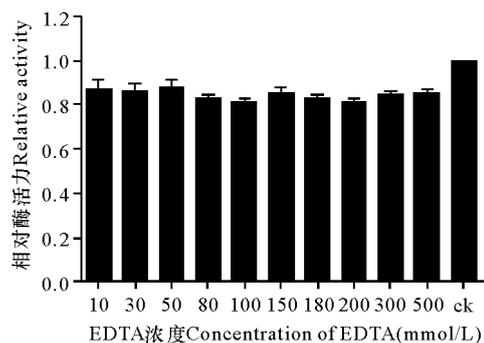


图 6 EDTA 对酶活力的影响

Fig. 6 Effect of EDTA on enzyme activity

2.2.6 金属离子对突变酶活性的影响

由图 7 可见,Cu²⁺的抑制现象最为明显,几乎完全抑制了突变酶的酶活力。Mg²⁺、Ca²⁺和 Ba²⁺的抑制作用最为微弱,残留的相对酶活力均超过 80%。Zn²⁺和 Mn²⁺的影响近似一致,其抑制率约为 60%。

2.2.7 有机溶剂对突变酶活性的影响

如图 8 所示,正丙醇、异丙醇、正丁醇、吡啶和四氢呋喃对酶的抑制作用最为明显,酶的相对酶活力损失均超过 70%,而乙二醇、乙酸乙酯、1,2-丙二醇、丙三醇及二甲基亚砜的影响基本一致,其抑制率为

30%左右。

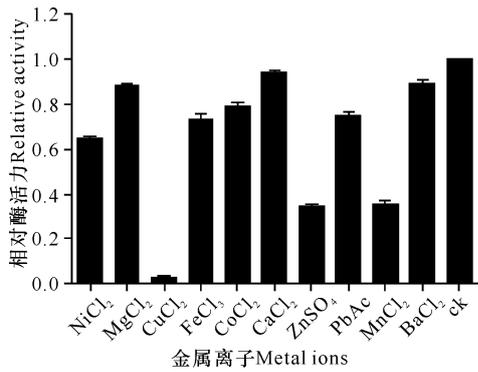


图7 金属离子对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of metal ions on enzyme activity

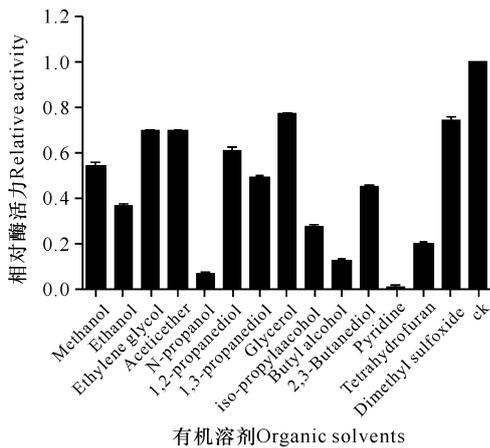


图8 有机溶剂对酶活力的影响

Fig. 8 Effect of organic solvents on enzyme activity

2.2.8 突变酶的 pH 稳定性

如图9所示,该酶在pH值为5.0~8.0环境中比较稳定,相对活力均保持在70%以上,证明突变酶的pH稳定性良好,该性质对酶的储存保藏及其在生产生活中的应用等都有积极作用。

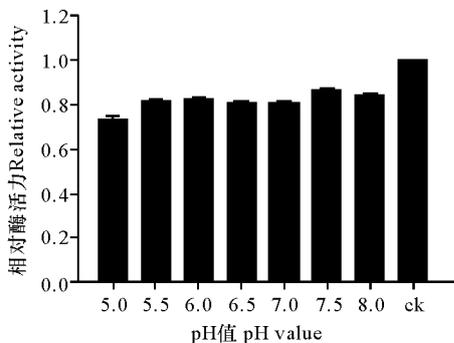


图9 酶的 pH 稳定性

Fig. 9 pH stability of enzyme

2.2.9 突变酶的温度稳定性

该酶在40℃以下时,具有较好的热稳定性,其相对酶活力残留达70%以上;超过45℃后,热稳定性急速降低,50℃恒温处理1h后突变酶的生化催化能力

几乎完全丧失(图10)。

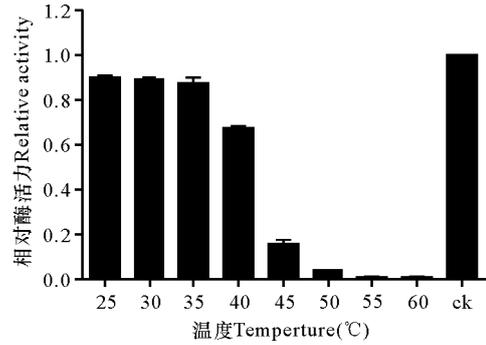


图10 酶的热稳定性

Fig. 10 Thermal stability of enzyme

2.2.10 NaCl 对嗜盐 α-淀粉酶的活性的影响

从图11可以看出,超过一定浓度的NaCl对嗜盐 α-淀粉酶具有明显抑制作用,而对嗜盐 α-淀粉酶就没有相似的作用(图4),说明不是所有的蛋白酶都需要高浓度的氯化钠。

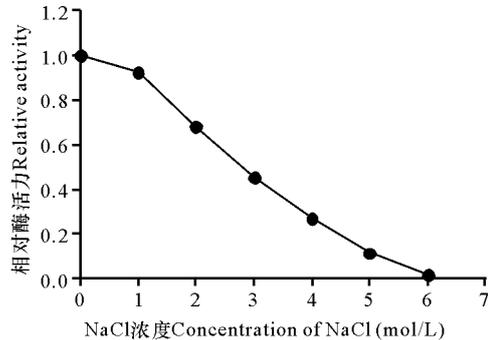


图11 NaCl 对嗜盐淀粉酶活力影响

Fig. 11 Effect of NaCl on nonhalophilic enzyme activity

2.2.11 HPLC 对突变酶水解产物的检测分析

检测结果表明(图12),该酶水解可溶性淀粉后的产物以葡萄糖为主,并含有少量的麦芽糖和麦芽三糖。

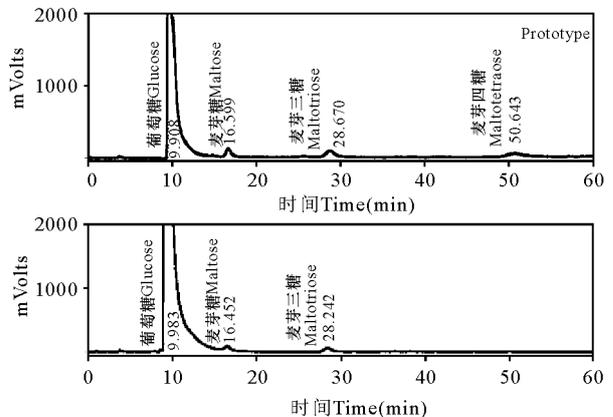


图12 酶水解淀粉产物 HPLC 分析色谱图

Fig. 12 HPLC chromatogram of the products from starch by enzyme

3 讨论

嗜盐 α-淀粉酶能在极端环境下维持空间结构的

稳定和生物催化活性,因而在食品腌制、发酵、调味剂的生产,海洋食品的开发,烘焙等多行业具有广阔的应用前景。本实验组另辟蹊径,从嗜盐的大肠杆菌 JM109 中克隆扩增到一个嗜盐 α -淀粉酶基因并成功表达,并非从传统途径嗜极菌 *Halorhabdus utahensis*^[15]、*Haloacrula hispanica*^[16]、*Pseudoalteromonas* sp. strain CP76^[17] 等中获得嗜盐 α -淀粉酶基因,这为扩展嗜盐 α -淀粉酶的来源,寻找适合人类需求的生物催化酶类提供多种选择途径。通过定点突变,本实验所研究的嗜盐淀粉酶的酶学特性相对于野生型发生明显变化,尤其是其嗜盐程度,最适 NaCl 浓度由野生酶的 2 mol/L 提高到 3 mol/L,其比活力也增加近 4 倍,达到 4 831 U/mg,这为该酶的分子改造打下坚实的基础,也为进一步研究探索其嗜盐机理提供新的信息和依据。

参考文献:

- [1] 覃晓丽,李剑龙,吴昊,等.嗜盐淀粉酶产生菌的筛选鉴定及其酶学性质研究[J].广西科学,2014,21(2):129-134.
QIN X L, LI J L, WU H, et al. Isolation, identification and enzymatic characteristics of a halophilic α -amylase-producing strain[J]. Guangxi Sciences, 2014, 21(2): 129-134.
- [2] MALHOTRA R, NOORWEZ S, SATYANARAYANA T. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54[J]. Letters Applied Microbiology, 2000, 31: 378-384.
- [3] MURAKAMI S, NISHIMOTO H, TOYAMA Y, et al. Purification and characterization of two alkaline, thermotolerant α -amylases from *Bacillus halodurans* 38C-2-1 and expression of the cloned gene in *Escherichia coli* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71: 2393-2401.
- [4] 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.
- [5] MURAKAMI S, NAGASAKI K, NISHIMOTO H, et al. Purification and characterization of five alkaline, thermotolerant, and maltotetraose-producing α -amylases from *Bacillus halodurans* MS-2-5, and production of recombinant enzymes in *Escherichia coli* [J]. Enzyme Microb Technol, 2008, 43: 321-328.
- [6] RICHARD S B, MADERN D, GARCIN E, et al. Halophilic adaptation: Novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* [J]. Biochemistry, 2000, 39(5): 992-1000.
- [7] MEVARECH M, FROLOW F, GLOSS L M. Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt [J]. Biophys Chem, 2000, 86(2/3): 155-164.
- [8] ALTERMARK B, THORVALDSEN S, MOE E, et al. Sequence comparison and environmental adaptation of a bacterial endonuclease [J]. Comput Biol Chem, 2007, 31(3): 163-172.
- [9] MADERN D, EBEL C. Influence of an anion-binding site in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* [J]. Biochimie, 2007, 89(8): 981-987.
- [10] KASTRITIS P L, PAPANDREOU N C, HAMODR- AKAS S J. Haloadaptation: Insights from comparative modeling studies of halophilic archaeal DHFRs [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 41(4): 447-453.
- [11] NONAKA T, FUJIHASHI M, KITA A, et al. Crystal structure of calcium-free α -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-38 (AmyK38) and its sodium ion binding sites [J]. Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 4(28): 818-824.
- [12] 龙彪,饶国华,彭志英,等.食品应用新酶源-极端酶 [J].中国食品添加剂,2005,3:47-50.
LONG B, RAO G H, PENG Z Y, et al. Extremozymes as a source of novel enzymes for application in food industry [J]. China Food Additives, 2005, 3: 47-50.
- [13] BERNFELD P. Amylase, α and β [M] // Methods in Enzymology (vol. 1). COLOVICK S P, KAPLAN N O, eds. New York: Academic Press, 1955: 149-158.
- [14] 汪家政,范明.蛋白质技术手册 [M].北京:科学出版社,2000:42-46.
WANG J Z, FAN M. Protein Technical Manual [M]. Beijing: Science Press, 2000: 42-46.
- [15] WAIN M, INGORSSEN K. Production of beta-xylanase and beta-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis* [J]. Extremophiles, 2003, 7(2): 87-93.
- [16] HUTCHEON G W, VASISHT N, BOLHUIS A. Characterization of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica* [J]. Extremophiles, 2005, 9(6): 487-495.
- [17] SÁNCHEZ-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 Life Under Extreme Conditions, 2003, 7(3): 221-228.

(责任编辑:米慧芝)