



专论与综述

嗜盐古菌几种常见胞外酶研究进展

王锐 陈绍兴*

安徽师范大学生命科学学院 安徽 芜湖 241000

摘要:嗜盐古菌是一类生活于极端高盐环境的化能异养型原核微生物,其所分泌的胞外酶(外泌酶)具有在高盐条件下仍能保持活性的特点,在制革工业、高盐有机废水处理和泡菜加工等腌制食品方面发挥重要用途。本文对嗜盐古菌的胞外蛋白酶、淀粉酶、酯酶等几种常见胞外酶的来源和基本酶学性质的最新研究进展进行综述,为更好地开发利用嗜盐古菌胞外酶资源提供参考。

关键词:嗜盐古菌, 外泌酶, 蛋白酶, 淀粉酶, 酯酶

Extracellular enzymes of halophilic archaea: a review

WANG Rui CHEN Shaoxing*

School of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241000, China

Abstract: Halophilic archaea is a kind of heterotrophic prokaryotes living in extremely high salinity environment. The extracellular enzymes secreted by these microorganisms can maintain enzymatic activity under the high salt condition, and play an important role in the leather industry, the treatment of high salt organic wastewater and pickle processing. In this paper, the sources and basic enzymatic properties of several common extracellular enzymes excreted by halophilic archaea such as extracellular protease, amylase and esterase are reviewed, to provide a reference for better exploitation and utilization of extracellular enzyme resources of halophilic archaea.

Keywords: halophilic archaea, extracellular enzyme, protease, amylase, esterase

古菌是不同于细菌和真核生物的第三种生命形式,大多生活于如高温、厌氧、高盐环境等极端环境或特殊环境中。纯培养的古菌主要有产甲烷古菌、极端嗜热古菌和极端嗜盐古菌等3类^[1]。嗜盐古菌是生长于高盐环境的一类古菌,大多需要至少

1.5 mol/L NaCl,它们主要分布在盐湖、盐矿和晒盐场等高盐环境中^[2-3]。地理隔离、埋深和不同的离子浓度对塑造不同的高盐环境微生物群落结构发挥重要的作用^[4]。盐矿是一种典型的高盐生境,埋藏于地下,经历漫长的地质历史年代。2019年,陈礼楠等

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31460003); Anhui Provincial Key Laboratory of the Conservation and Exploitation of Biological Resources (591601); Priority Projects of Education Department of Anhui Province (KJ2017A318); Key Project of Outstanding Young Talent Support Program in Colleges and Universities of Anhui Province (gxyqZD2017011)

*Corresponding author: Tel: 86-553-3869297; E-mail: chensx@ahnu.edu.cn

Received: 07-05-2020; **Accepted:** 13-07-2020; **Published online:** 18-09-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31460003); 安徽省重要生物资源保护与利用开放课题(591601); 安徽省教育厅重点项目(KJ2017A318); 安徽省高校优秀青年人才支持计划(gxyqZD2017011)

*通信作者: Tel: 0553-3869297; E-mail: chensx@ahnu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-07; 接受日期: 2020-07-13; 网络首发日期: 2020-09-18

研究发现在安徽定远盐矿分离的某些嗜盐古菌具有胞外蛋白酶、淀粉酶和酯酶的活性^[5]。由于嗜盐古菌特定的生存环境,嗜盐古菌的胞外酶不仅具有极高的耐盐特性,还呈现出较强的高温活性,而且在低水活度条件下仍具有较好的催化活性^[6]。

嗜盐古菌分泌的嗜盐酶具有独特的性质,使其能在高盐条件下发挥催化活性。研究发现此类酶的表面有较多的带负电氨基酸^[7],即酸性氨基酸的含量较高^[8-9]。酸性氨基酸的负电荷可以提供水合羧基,使蛋白在高盐浓度下维持溶解状态^[10],因为负电荷的酶蛋白表面可以与水合离子结合,保持表面的水化层,降低表面的疏水性,降低其在高盐浓度下的聚集趋势^[11]。此外,此类酶蛋白分子中存在更多的盐桥和氢键^[12],而且内部的疏水核心区较小^[13]。盐桥及分子内的氢键在整体上能维持蛋白质结构的稳定,这对在高盐环境中嗜盐酶保持其结构的稳定是有利的^[12]。嗜盐酶蛋白在氨基酸组成和分子结构等方面的改变,有利于其更好地适应高盐环境。

嗜盐古菌胞外蛋白有2种分泌途径,即双精氨酸转运(Twin-Arginine Translocation, Tat)途径和普遍分泌(Secretion, Sec)途径。Tat途径负责大多数胞内已折叠蛋白的跨膜转运,而Sec途径负责大多数未折叠蛋白的跨膜转运^[14]。嗜盐古菌的绝大多数胞外酶就是通过Tat途径分泌到胞外^[15]。随着极端环境微生物以及特殊酶资源的开发利用被人们广泛关注,嗜盐古菌胞外酶的相关研究也在不断推进。胞外蛋白酶、淀粉酶和酯酶分别在肽合成、调味剂和食品腌制、多不饱和脂肪酸生产等方面具有较广泛的应用价值^[16],这3种酶也是工业生产中较为常见的几种胞外酶,报道较多,研究也较为深入,有必要及时对此类特殊酶资源的最新研究进展进行系统梳理。因此,本文着重梳理了嗜盐古菌的胞外蛋白酶、淀粉酶、酯酶和其他一些胞外酶的最新研究进展,这对研究者进一步系统地了解及挖掘嗜盐古菌胞外酶资源具有积极意义。

1 胞外蛋白酶

许多嗜盐古菌通过分泌胞外蛋白酶来水解周围环境中的蛋白质,从而能更好地获取营养物质。1969年,首个嗜盐古菌胞外蛋白酶在*Halobacterium salinarium* 中被发现,研究显示该蛋白酶在盐浓度为3 mol/L及pH为8.0时酶活最高,说明该蛋白酶偏碱性,而且具有较强的耐盐特性^[17]。截至目前,酶学性质研究比较清楚的有15个,分别来自*Natrinema*、*Natrialba*、*Haloferax*、*Halogramum*、*Halorubrum*、*Natronococcus*、*Halobacterium*、*Halogeometric*、*Halorussus*和*Halococcus*等10个属。其中,来自*Halobacterium*的胞外蛋白酶最多,有4个(表1)。

1.1 胞外蛋白酶的分类

嗜盐古菌的胞外蛋白酶主要有丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶两类。其中,枯草杆菌素样丝氨酸蛋白酶(Subtilisin-Like Serine Protease)具有较强的耐高温和耐盐碱性的特点,活性中心由经典的Asp-His-Ser氨基酸残基组成,PMSF可抑制其活性^[31-32]。此外,Gaonkar等发现*Halococcus agarilyticus*所产的胞外蛋白酶活性可被 β -巯基乙醇和SDS所抑制,说明其活性中心含有半胱氨酸残基,将其归为半胱氨酸蛋白酶^[31]。

1.2 胞外蛋白酶的酶学性质

本文对酶学性质研究得比较清楚的15个嗜盐古菌胞外蛋白酶的特性进行了归纳整理。按照胞外蛋白酶发挥最佳酶活时所需的NaCl浓度,可以将这些蛋白酶大致分为3类:不耐盐蛋白酶(≤ 1 mol/L)、中度嗜盐蛋白酶(1.0–2.5 mol/L)、极端嗜盐蛋白酶(≥ 2.5 mol/L)。目前研究较为清楚的不耐盐蛋白酶有2个,分别来自*Halorubrum*和*Halorussus*这2个属^[24,30];中度嗜盐蛋白酶有3个,分别来自*Natrialba*和*Natronococcus*两个属;极端嗜盐蛋白酶有8个,分别来自*Natrinema*、*Haloferax*、*Halorubrum*、*Halobacterium*、*Halogeometricum*和*Halococcus*等6个属(表1)。

表 1 酶学性质已知的嗜盐古菌胞外蛋白酶

Table 1 Extracellular protease of halophilic archaea which enzymatic properties have been characterized

属 Genus	种 Species	蛋白酶类型 Type	最优条件 Optimum			相对分子质量 Relative molecular weight (kD)	参考文献 References
			盐浓度	温度	pH		
			NaCl (mol/L)	Temperature (°C)			
<i>Natrinema</i>	<i>Natrinema</i> sp. J7	Serine	2.5	50	8.0	62 ^a	[18]*
<i>Natrinema</i>	<i>Natrinema</i> sp. R6-5	Serine	3.0	45	8.0	62 ^a	[19]
<i>Natrialba</i>	<i>Natrialba magadii</i>	Serine	1.5	60	8.0–10.0	45 ^b	[20]*
<i>Natrialba</i>	<i>Natrialba asiatica</i> 172P1	Serine	2.0	70–80	10.7	42 ^c	[21]*
<i>Haloferax</i>	<i>Haloferax mediterranei</i>	Serine	3.0–4.3	na	na	41.3 ^c	[22]*
<i>Halogramum</i>	<i>Halogramum rubrum</i>	Serine	0	50	8.0	47 ^a	[23]
<i>Halorubrum</i>	<i>Halorubrum ezzemoulense</i>	na	4.3	60	9.0	na	[24]
<i>Natronococcus</i>	<i>Natronococcus occultus</i>	Serine	2.0	50	7.0–9.0	130 ^b	[25]
<i>Halobacterium</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>	na	3.0	na	8.0	na	[17]
<i>Halobacterium</i>	<i>Halobacterium halobium</i>	na	na	na	10.0	66 ^a	[26]
<i>Halobacterium</i>	<i>Halobacterium mediterraneum</i>	Serine	na	na	8.0–8.5	41 ^b	[27]
<i>Halobacterium</i>	<i>Halobacterium</i> sp. HP25	Serine	2.9	60	8.0	21 ^a	[28]
<i>Halogeometric</i>	<i>Halogeometricum borinquense</i>	Serine	3.4	60	10.0	86 ^a	[29]
<i>Halorussus</i>	<i>Halorussus</i> sp. XZYJ18	na	0	55	8.0	na	[30]
<i>Halococcus</i>	<i>Halococcus agarilyticus</i> GUGFAWS-3	Cysteine	3.0	70	7.0	67 ^a	[31]

注: na: 没有相关数据; ^a: 相对分子质量是通过 SDS-PAGE 测得的; ^b: 相对分子质量是通过凝胶过滤的方法测得的; ^c: 相对分子质量是通过计算推测的; *: 该菌株所产生的相应酶的酶学性质由克隆表达的重组蛋白测得

Note: na: No data available; ^a: Molecular weight measured by SDS-PAGE; ^b: Molecular weight measured by gel filtration; ^c: Molecular weight calculated based on translated amino sequence; *: The enzymatic properties are measured by purified protein after gene expression

在发挥最佳酶活时对 pH 值和温度的需求方面, 大多数嗜盐古菌胞外蛋白酶的 pH 偏碱性(pH 8.0–10.0), 温度在 50–60 °C 之间。然而, *Natrialba asiatica* 172P1 所产的胞外蛋白酶表现出明显的耐碱性和耐高温特性^[21]。其在最佳酶活时的 pH 值和温度比其他嗜盐古菌胞外蛋白酶高, 分别为 10.7 和 70–80 °C (表 1)。

嗜盐古菌胞外蛋白酶的相对分子质量分布较广。*Halobacterium* sp. HP25 所产胞外蛋白酶相对分子质量最小, 约为 21 kD^[28]; 而 *Natronococcus occultus* 所产的胞外蛋白酶相对分子质量最大, 约为 130 kD^[25]; 其他主要集中在 40–90 kD (表 1)。

1.3 胞外蛋白酶基因的克隆与表达

在嗜盐古菌胞外蛋白酶基因的克隆和表达方面, 首先在 *Natrialba asiatica* 172P1 中获得突破,

其胞外蛋白酶(Halolysin 172P1)编码基因为 *hly*, 编码 411 个氨基酸, 并在 *Haloferax volcanii* 中成功表达^[21]。Halolysin 172P1 与 *Thermoactinomyces vulgaris* 的嗜热蛋白酶具有最高的相似性^[21]。此后, 1994 年, *Haloferax mediterranei* 的胞外蛋白酶(Halolysin R4)编码基因 *hlyR4* 克隆成功, 并在 *Haloferax volcanii* WFD11 中表达^[22]。*hlyR4* 编码 403 个氨基酸, Halolysin R4 与 Halolysin 172P1 具有最高的相似性, 且其编码基因具有同源性^[22]。2006 年, *Natrinema* sp. J7 的胞外蛋白酶(SptA)基因 *sptA* 克隆成功, 也同样在 *Haloferax volcanii* WFD11 中表达; 该基因编码 565 个氨基酸, 含 49 个氨基酸的信号肽、103 个氨基酸的前肽、成熟区和 C-端延伸, 含有较高比例的酸性氨基酸残基^[18]。2008 年, De Castro 等对 *Natrialba magadii* 的胞外蛋白酶(Nep)

编码基因(*nep*)进行了克隆和序列分析,并在大肠杆菌和 *Haloferax volcanii* 中成功表达;*nep* 编码 541 个氨基酸,从完整的 *nep* 基因推断出 Nep 氨基酸序列与 Halolysin 172P1、R4 和 SptA 具有 62%–85%的相似性,而且 Nep 主肽链与古菌和细菌的枯草菌素家族丝氨酸蛋白酶有 50%–85%的相似性^[33]。在上述 4 个研究较为清楚的嗜盐古菌胞外蛋白酶的基础上,通过同源性搜索(基因序列或蛋白氨基酸序列),可以对已获得基因组的嗜盐古菌菌株产胞外蛋白酶情况开展更加广泛的分析与筛查。

1.4 胞外蛋白酶的结构与功能

嗜盐古菌中一些嗜盐酶的结构已被解析,如 Vogler 等将 γ -碳酸酐酶在 *Halobacterium* sp. NRC-1 中表达,并用 X-射线结晶学和诱变方法对其进行了表征,成功将其晶体结构解析为 2.6 Å, β -折叠(54.5%)含量较高,只有少量的 α -螺旋(13.5%)、转折(12.9%)和不规则卷曲结构(19.1%)^[34]。然而,有关嗜盐古菌胞外蛋白酶主要集中于功能结构域方面的研究。嗜盐古菌胞外丝氨酸蛋白酶又被称为 Halolysin。Halolysin 前体包含负责分泌的双精氨酸信号肽、N 端前肽、枯草杆菌酶催化结构域(S8 家族)和 C 末端延伸(C-Terminal Extension, CTE)结构域组成^[35]。研究者通过对 *Natrialba magadii* 的胞外蛋白酶(Nep)的氨基酸序列分析发现, Asp-His-Ser 这 3 个氨基酸残基的保守结构域对蛋白水解活性是必需的^[33]。Souza 等^[36]发现, Nep 在不同盐浓度下的远紫外 CD 光谱表明,该酶在 1、2 和 3 mol/L NaCl 中保持折叠,二级结构含量没有明显变化,无盐条件下, Nep 表现出典型的卷曲结构的 CD 谱;同时,他们采用分子模拟方法获得了 Nep 的催化核心区和 CTE 的结构, N 末端是在肽酶 S8 家族成员中发现的 α/β 催化域,而 CTE 由 2 个 β -折叠基序组成。*Haloferax mediterranei* 胞外蛋白酶(Halolysin R4)的 CTE 对蛋白酶活性也非常重要,是蛋白酶在高盐环境维持稳定所必需的^[22]。Hou 等研究发现嗜盐古菌胞外蛋白酶的 CTE 在不同 Halolysin 之间可进行功能性互换^[37]。

1.5 胞外蛋白酶的其他功能

嗜盐古菌的胞外蛋白酶除了水解蛋白质获取营养外,还有一些其他方面的功能。研究发现 *Natrinema* sp. J7 的胞外蛋白酶(SptA)对菌株 J7 进入稳定期和凋亡期非常重要,对数期胞外产生的 SptA 促进了菌株本身的生长,而稳定期胞内积累的 SptA 有助于菌株进入凋亡期,凋亡期 SptA 导致的细胞死亡与裂解增加了活细胞所需的营养物质^[35]。

2 胞外淀粉酶

淀粉酶广泛存在于自然界包括极端高盐环境在内的各种生态环境中,然而有关嗜盐古菌胞外淀粉酶的研究相对较少。第一个嗜盐古菌胞外淀粉酶也是在 *Halobacterium salinarum*, 即此前的 *Halobacterium halobium* 中发现的,该淀粉酶属于 α -淀粉酶, pH 在 6.4–6.6 之间时酶活最高,与嗜盐古菌胞外蛋白酶相比该淀粉酶为中性^[38]。截至目前,酶学性质研究得比较清楚的有 10 个,分别来自 *Haloferax*、*Haloarcula*、*Halorubrum*、*Halobacterium*、*Natronococcus* 和 *Haloterrigena* 6 个属(表 2)。其中,来自 *Haloferax* 属的胞外淀粉酶最多,共有 3 个(表 2)。

2.1 胞外淀粉酶的分类

目前酶学性质研究得较为清楚的上述 10 个嗜盐古菌胞外淀粉酶均为 α -淀粉酶类,作用于淀粉的 α -1,4-糖苷键。然而在一些嗜盐细菌中发现存在 β -淀粉酶(水解 α -1,6-糖苷键)。Li 等研究发现嗜盐细菌 *Halobacillus* sp. LY9^[48] 和 *Salimicrobium halophilum* LY20^[49] 所产的胞外淀粉酶属于 β -淀粉酶类。与嗜盐古菌的 α -淀粉酶相比,这 2 个 β -淀粉酶耐高温性和耐碱性能力更强,该酶的最适酶活条件为 NaCl 浓度 1.7–2.1 mol/L、温度 60–70 °C、pH 8.0–10.0^[48–49]。

2.2 胞外淀粉酶的酶学性质

与嗜盐古菌的胞外蛋白酶相比,嗜盐古菌的胞外淀粉酶耐碱性较弱。根据 pH 的范围,我们将其分为嗜酸性淀粉酶(pH<6.5)、嗜中性淀粉酶(pH

表 2 酶学性质已知的嗜盐古菌胞外淀粉酶

Table 2 Extracellular amylase of halophilic archaea which enzymatic properties characterized

属 Genus	种 Species	淀粉酶类型 Type	最优条件 Optimum			相对分子质量 Relative molecular weight (kD)	参考文献 References
			盐浓度 NaCl (mol/L)	温度 Temperature (°C)	pH		
<i>Haloferax</i>	<i>Haloferax mediterranei</i> R4	α -amylase	3.0	50	6.0–7.0	na	[39]
<i>Haloferax</i>	<i>Haloferax mediterranei</i>	α -amylase	3.0	50–60	7.0–8.0	58 ^a	[40]
<i>Haloferax</i>	<i>Haloferax</i> sp. HA10	α -amylase	1.0	55	6.0	66 ^a	[41]
<i>Haloarcula</i>	<i>Haloarcula hispanica</i>	α -amylase	4.0–5.0	50	6.5	50 ^a	[42]
<i>Haloarcula</i>	<i>Haloarcula</i> sp. strain S-1	na	4.3	50	na	70 ^a	[43]
<i>Halorubrum</i>	<i>Halorubrum</i> sp. CY	α -amylase	na	60	6.0	na	[44]
<i>Halorubrum</i>	<i>Halorubrum xinjiangense</i>	α -amylase	4.0	70	8.5	60 ^a	[45]
<i>Halobacterium</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>	α -amylase	na	na	6.4–6.6	na	[38]
<i>Natronococcus</i>	<i>Natronococcus amylolyticus</i> strain Ah-36	α -amylase	2.5	55	8.7	74 ^a	[46]*
<i>Haloterrigena</i>	<i>Haloterrigena turkmenica</i>	α -amylase	2.0	55	8.5	66 ^a	[47]

注: na: 没有相关数据; ^a: 相对分子质量是通过 SDS-PAGE 测得的; *: 该菌株所产生的相应酶的酶学性质由克隆表达的重组蛋白测得

Note: na: No data available; ^a: Molecular weight measured by SDS-PAGE; *: The enzymatic properties are measured using purified protein after gene expression

6.5–7.5)和嗜碱性淀粉酶(pH>7.5)。其中嗜酸性淀粉酶包括 3 种, 分别来自 *Haloferax*、*Halorubrum* 和 *Halobacterium* 这 3 个属; 嗜中性淀粉酶包括 3 种, 分别来自 *Haloferax* 和 *Haloarcula* 这 2 个属; 嗜碱性淀粉酶包括 3 种, 分别来自 *Halorubrum*、*Natronococcus* 和 *Haloterrigena* 这 3 个属(表 2)。

嗜盐古菌胞外淀粉酶有较强的耐盐和耐高温特性, 最适盐浓度在 2–4 mol/L 之间, 温度在 45–70 °C 之间。其中, *Haloarcula hispanica* 的耐盐性最强, 最适盐浓度为 4–5 mol/L^[42]。*Halorubrum xinjiangense* 胞外淀粉酶的耐高温性能最强, 最适温度高达 70 °C^[45]。此外, 这些淀粉酶的相对分子质量分布范围较窄, 在 50–74 kD 之间(表 2)。

第一个克隆的嗜盐古菌胞外淀粉酶基因(amy)来自 *Natronococcus amylolyticus* Ah-36, 并在 *Haloferax volcanii* 中表达^[50]。该基因长度为 1 512 bp, GC 含量较高, 达 63.5%, 编码 504 个氨基酸。此外, 该胞外淀粉酶与之前介绍的嗜盐古菌胞外蛋白酶 Halolysin 的 N-端都具有信号肽, 可能与嗜盐古菌胞外淀粉酶和蛋白酶均采用高度保守的 Tat 分泌途径和加工机制有关^[50]。此后, Hutcheon

等通过逆转录 PCR 确定了 *Haloarcula hispanica* 的胞外淀粉酶(AmyH)编码基因 amyH 的全长序列^[42]。该基因大小为 1 299 bp, 编码 433 个氨基酸, 与 *Natronococcus amylolyticus* 的胞外淀粉酶有最高的相似性, 相似度约 63%; 此外, AmyH 与嗜热古菌 *Thermococcus hydrothermalis* 和 *Pyrococcus woesei* 的 α -淀粉酶也具有很高的基因序列和氨基酸序列相似性^[42]。

2.3 胞外淀粉酶的结构与功能

Natronococcus amylolyticus Ah-36 的胞外淀粉酶前导肽包括一个 43 个氨基酸的信号肽, 该信号肽有一个疏水核心, 与胞外蛋白酶相似, 其有利于嗜盐酶高盐环境下的跨膜运输^[50]。此外, 嗜盐酶的氨基末端可能需要多个正电荷, 因此, *Natronococcus amylolyticus* Ah-36 的胞外淀粉酶和嗜盐古菌的胞外蛋白酶疏水核心前有 5–6 个精氨酸和赖氨酸残基^[50]。*Natronococcus amylolyticus* Ah-36 胞外淀粉酶的催化中心由 Asp-162、His-167、Gly-243、His-251、Glu-275、Asp-278、Phe-335 和 Asp-340 组成, 该催化中心在淀粉酶、支链淀粉酶和环麦芽糊精葡聚糖转移酶中是保守的^[50]。然而, 从嗜盐古菌中分离出

来的任何一种 α -淀粉酶都没有被实验解析出三维结构。Zorgani 等对嗜盐古菌 *Haloarcula marismortui*、*Haloarcula hispanica* 和 *Halalkalicoccus jeotgali* 的 α -淀粉酶进行同源结构建模发现, 古生菌 α -淀粉酶表现出较低的螺旋形成倾向和较高的卷曲区域形成倾向^[51]。

3 胞外酯酶

酯酶在细菌中研究较多, 而在古菌中主要集中在嗜热古菌, 而且大多是脂肪酶。嗜盐古菌胞外酯酶的酶学性质首次在 *Natronococcus* sp. TC6 中被报道, 是一种真正的脂肪酶, 不仅能水解 pNPP, 还能水解橄榄油, 该脂肪酶在盐浓度为 4.0 mol/L、温度为 50 °C、pH 为 7.0 时活性最高, 但该脂肪酶的酶学性质仅基于来自上清液制备的粗酶制品^[52]。嗜盐古菌胞外酯酶活性在盐矿来源的 *Halalkalicoccus subterraneus*、*Halococcus salsus*、*Halomicrococcus hydrotolerans*、*Halorubrum trueperi*、*Halorubrum glutamatedens*、*Halorubrum salsamenti*、*Halorubrum amylolyticum* 和 *Haloterrigena salifodinae* 等均有报道^[53-60], 但相关的分离纯化方面研究并不深入。目前, 酶学性质研究得比较清楚的胞外酯酶有 8 个, 分别来自 *Natronococcus*、*Haloarcula*、*Halorubrum* 和 *Natrialba* 这 4 个属(表 3)。

3.1 胞外酯酶的酶学性质

嗜盐古菌的胞外酯酶与胞外蛋白酶一样, 都具有耐高温和耐盐碱的特点。它们的最适盐浓度在 2.0–4.5 mol/L, *Natrialba* sp. B49 的胞外酯酶耐盐性最强, 最适盐浓度达 4.5 mol/L^[63]。最适温度在 50–70 °C, *Haloarcula* sp. G41 的胞外酯酶耐高温性最强, 最适温度高达 70 °C^[62]。这类酶的最适 pH 偏碱性, 介于 7.0–8.5, 如 *Natronococcus* sp. TC6 的胞外脂肪酶偏中性, 最适 pH 为 7.0^[52]。

3.2 胞外酯酶的结构功能特点及克隆与表达

脂肪酶的结构大多数是保守的, 属于丝氨酸水解酶家族, 一般由 α/β “Hotdog”折叠结构组成, 即 7–8 个反平行的 β 片层形成“Bun”, 并包裹在一个 5–6 个 α 螺旋结构周围^[64]。然而, 关于嗜盐古菌酯酶三维结构的研究非常少, 主要集中在酯酶一级结构即氨基酸序列水平上的分析。第一个嗜盐古菌胞外酯酶分离自 *Haloarcula marismortui*, 其相对分子质量为 50 kD, 在盐浓度为 2 mol/L 及 pH 为 8.5 时活性最强^[65]。该胞外酯酶的编码基因 *lipC* 已被克隆, 并在大肠杆菌中进行了表达^[66]。研究者还发现了 *Haloarcula marismortui* 胞外酯酶的折叠依赖盐环境, 圆二色谱分析表明, 在无盐条件下酯酶结构变得松散, 趋向于完全展开, 而在 0.25–0.5 mol/L KCl

表 3 酶学性质已知的嗜盐古菌胞外酯酶

Table 3 Extracellular esterase of halophilic archaea which enzymatic properties have been characterized

属 Genus	种 Species	酯酶类型 Type	最优条件 Optimum			相对分子质量 Relative molecular weight (kD)	参考文献 References
			盐浓度	温度	pH		
			NaCl (mol/L)	Temperature (°C)			
<i>Natronococcus</i>	<i>Natronococcus</i> sp. TC6	Lipase	4.0	50	7.0	na	[52]
<i>Haloarcula</i>	<i>Haloarcula marismortui</i>	Esterase	2.0	na	8.5	50 ^a	[61]*
<i>Haloarcula</i>	<i>Haloarcula</i> sp. G41	Lipase	2.6	70	8.0	45 ^a	[62]
<i>Haloarcula</i>	<i>Haloarcula</i> sp. A43	Esterase	4.0	65	8.5	na	[63]
<i>Halorubrum</i>	<i>Halorubrum</i> sp. B53	Esterase	4.0	65	8.0	na	[63]
<i>Natronococcus</i>	<i>Natronococcus</i> sp. E7	Esterase	3.0	65	8.5	na	[63]
<i>Natrialba</i>	<i>Natrialba</i> sp. B49	Esterase	4.5	55	8.5	na	[63]

注: na: 没有相关数据; ^a: 相对分子至量是通过 SDS-PAGE 测得; *: 该菌株所产生的相应酶的酶学性质由克隆表达的重组蛋白测得
Note: na: No data available; ^a: Molecular weight is measured by SDS-PAGE; *: The enzymatic properties are measured by purified protein after gene expression

存在下蛋白质开始折叠^[66]。随后, *Haloarcula* sp. G41 的胞外酯酶也得到分离纯化^[62]。该酯酶是一种脂肪酶, 纯化后的相对分子质量是 45 kD, 研究表明其是一种金属酶, 丝氨酸和半胱氨酸残基是其发挥酶活性所必需的^[63]。

4 其他胞外酶

除了上文所提到的 3 种胞外酶, 嗜盐古菌还能产生其他类型的胞外酶。据报道某些类群的嗜盐古菌所分泌的蛋白还具有胞外纤维素酶、几丁质酶、木聚糖酶和果胶酶等活性^[67-69]。Karray 等发现从盐湖分离的嗜盐古菌 *Halorubrum chaoviator* CEJTA37 存在木聚糖酶和果胶酶的活性, *Natrinema altunense* CEJGTEA101 存在木聚糖酶、果胶酶和纤维素酶的活性^[68]。Menasria 等从盐湖分离得到了 68 株嗜盐古菌, 其中 *Haloferax* 属的 30 种菌株中, 有 21 种存在 β -果聚糖酶的活性; *Halococcus* 属的 9 种菌株中有 5 种存在纤维素酶的活性, 5 种存在木聚糖酶的活性; *Halogeometricum* 属的 8 种菌株都存在明胶酶的活性, 7 种存在 β -果聚糖酶的活性; *Natrinema* 属的 8 种都存在明胶酶的活性; *Haloarcula hispanica* 的 2 种菌株都存在明胶酶、果胶酶和木聚糖酶的活性^[67]。研究者对已知嗜盐古菌基因组的分

析发现了许多编码各种家族的糖苷酶的基因, 并且实验证明某些嗜盐古菌在含有纤维素或者几丁质的固体培养基上可以产生水解圈, 也能利用纤维素和几丁质作为营养物质进行生长^[70]。Sorokin 等研究发现了一个新属新种 *Halococcoides cellulosivorans*, 该菌株能以不定形纤维素为生长基质, 并在其周围形成纤维素水解圈^[71]。然而, 这些胞外酶在嗜盐古菌中的研究非常有限, 只是停留在简单的酶活检测上。

5 基于嗜盐古菌物种描述的 3 种常见胞外酶活分布

截至 2020 年 1 月 1 日已正式发表的嗜盐古菌新种的原始文章中关于该新种的生物学特性的描述, 我们对 62 个属 231 个种嗜盐古菌的胞外蛋白酶、胞外淀粉酶和胞外酯酶的酶活检测情况进行了统计分析(图 1), 包括本实验室分离报道的 12 个来自盐矿生境嗜盐古菌物种^[53-60,72-75]。统计结果显示, 约有 29% 的物种存在胞外蛋白酶活性, 能水解酪蛋白或明胶; 约 30% 的物种存在胞外淀粉酶活性, 能水解淀粉; 约 42% 的物种具有胞外酯酶活性, 能水解吐温(图 1)。

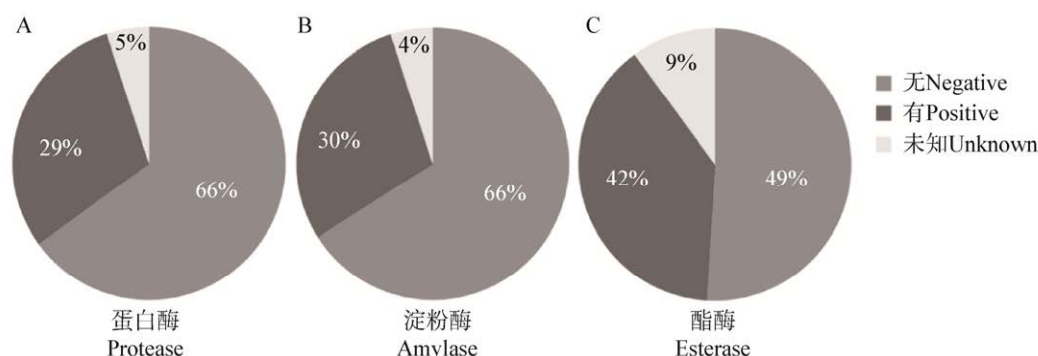


图 1 产胞外酶物种在嗜盐古菌中的占比统计

Figure 1 Statistics of the percentage of extracellular-enzyme-producing species in haloarchaea

注: 基于目前已报道的嗜盐古菌 62 个属 231 个物种的 3 种胞外酶活数据统计; 无: 表示没有相应酶的活性, 即酪蛋白或明胶或淀粉或吐温水解均阴性; 未知: 表示原始发表新种的文章中没有提及相应的水解情况

Note: Proportion of species with three extracellular enzymes calculated based on 231 haloarchaea species from 62 genera. Negative: These species can hydrolyze none of casein, gelatin, starch or tween. Unknown: No information available in these species on hydrolysis of above mentioned substrates

在这 231 个种的嗜盐古菌中, 存在胞外蛋白酶活性的物种有 63 个, 存在胞外淀粉酶活性的物种有 64 个, 存在胞外酯酶活性的物种有 90 个。其中, 同时存在 3 种胞外酶活性的有 21 个物种, 同时存在 2 种胞外酶活性的有 38 种: 7 个物种同时存在胞外蛋白酶和淀粉酶活性, 16 个物种同时存在胞外蛋白酶和酯酶活性, 15 个物种同时存在淀粉酶和酯酶活性(图 2)。

此外, 我们的统计分析发现: (1) *Halovivax* 属的 4 个物种 *Halovivax asiaticus*、*Halovivax cerinus*、*Halovivax limisalsi* 和 *Halovivax ruber* 都具有胞外蛋白酶活性, 而 *Halarchaeum*、*Haloplanus*、*Halosimplex*、*Halostagnicola*、*Natronoarchaeum* 和 *Natronorubrum* 等 6 个属所有物种都未发现胞外蛋白酶活性; (2) *Halomicrobium*、*Halorhabdus* 和 *Natronoarchaeum* 等 3 个属的所有物种都具有胞外淀粉酶活性, 而 *Haloterrigena* 属物种都不存在胞外淀粉酶活性, 但 *Haladaptatus*、*Haloarchaeobius* 和 *Natrinema* 等 3 个属的几乎所有物种都具有胞外酯酶活性; (3) *Haladaptatus* 的 *Haladaptatus litoreus*、*Haladaptatus pallidirubidus* 和 *Haladaptatus paucihalophilus* 等 3 个物种同时存在 3 种胞外酶的

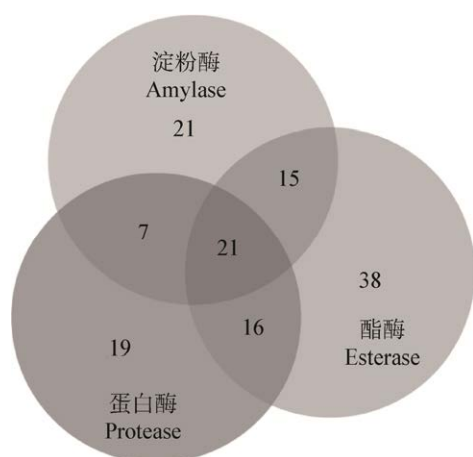


图 2 嗜盐古菌产胞外酶物种产酶情况统计

Figure 2 Venn diagram showed the number of extracellular-enzyme-producing species in haloarchaea

活性, 而 *Halarchaeum*、*Haloplanus*、*Salinigranum* 和 *Halosimplex* 等 4 个属目前报道的所有物种均未检测到有这 3 种胞外酶的活性。上述统计结果将为后续各种胞外酶的开发利用提供参考。

6 问题与展望

酶在生物技术相关的工业生产中有巨大的应用潜力, 如医药、食品加工、洗涤剂、废料废渣处理等方面。截至目前, 工业生产中多应用的是嗜温和嗜热生物体的酶^[76]。对于嗜盐酶在工业生产中的应用也非常少, 而对于条件苛刻的工业生产, 具有良好的耐高温性和耐盐碱性的嗜盐古菌胞外酶是非常好的选择。例如, 嗜盐蛋白酶已经在鱼露生产中应用^[36]。嗜盐 α -淀粉酶在高盐环境中仍然可以保持稳定性和很强的催化活性, 这在调味品、食品腌制等工业生产以及盐碱地改造中有开发利用的价值^[16]。嗜盐酯酶耐受有机溶剂, 是生产不饱和脂肪酸的优良选择^[16]。目前也有研究人员将嗜盐酯酶应用于基于微藻的生物燃料系统, Schreck 等对 *Dunaliella* spp. 海藻类进行基因改造使其产生大量的三酰甘油酯, 这些三酰甘油酯可以被脂肪酶水解产生游离脂肪酸和甘油, 并用作生物燃料的原料, 大多数海藻的生活环境是中度嗜盐的, 因此嗜盐酯酶在其中起到重要作用^[64]。嗜盐酶在高盐废水废渣的处理中也可以发挥巨大的作用^[77]。

与其他胞外酶相比, 嗜盐古菌胞外蛋白酶的研究相对较多, 也较为深入; 但相较于细菌的胞外蛋白酶, 嗜盐古菌胞外蛋白酶的数量少, 而且研究不够深入。酶学性质或编码基因被解析的嗜盐古菌胞外蛋白酶仍不到 20 个, 而胞外淀粉酶、胞外酯酶、胞外纤维素酶和其他胞外酶则更少。由于嗜盐古菌的胞外酶在高盐环境中才能表现出活性, 其基因很难在大肠杆菌中克隆表达出有活性的胞外酶, 这在很大程度上限制了嗜盐古菌胞外酶的研究和大规模生产, 同时也限制了嗜盐古菌胞外酶在工业生产中的商业化应用。因此, 嗜盐古菌胞外酶的研究还需要进一步深入, 如何对嗜盐古菌胞外酶进行分子

改造以提高酶的稳定性和活性, 以及如何利用异源高效表达系统获得高产量、低成本的嗜盐酶将是嗜盐酶资源工业应用需要突破的难题。

REFERENCES

- [1] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(12): 4576-4579
- [2] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 28(1): 56-63
- [3] Litchfield CD. Potential for industrial products from the halophilic archaea[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(10): 1635-1647
- [4] Chen SX, Xu Y, Helfant L. Geographical isolation, buried depth, and physicochemical traits drive the variation of species diversity and prokaryotic community in three typical hypersaline environments[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 120
- [5] Chen LN, Li F, Sun SQ, Xu Y, Chen SX. Species diversity of culturable halophilic microorganisms isolated from Dingyuan salt mine, Anhui[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2186-2197 (in Chinese)
陈礼楠, 李峰, 孙思琪, 许瑶, 陈绍兴. 安徽定远盐矿可培养嗜盐微生物多样性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2186-2197
- [6] Marhuenda-Egea FC, Bonete MJ. Extreme halophilic enzymes in organic solvents[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 385-389
- [7] Eisenberg H. Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 318(1): 1-5
- [8] Baldacci G, Guinet F, Tillit J, Zaccari G, de Recondo AM. Functional implications related to the gene structure of the elongation factor EF-Tu from *Halobacterium marismortui*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(3): 507-511
- [9] Benachenhou N, Baldacci G. The gene for a halophilic glutamate dehydrogenase sequence, transcription analysis and phylogenetic implications[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1991, 230(3): 345-352
- [10] Mevarech M, Frolow F, Gloss LM. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt[J]. *Biophysical Chemistry*, 2000, 86(2/3): 155-164
- [11] Hough DW, Danson MJ. Extremozymes[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3(1): 39-46
- [12] Wang SH, Huang KJ, Zhang GY. Halophilic mechanism of the halophilic enzymes based on the molecule dynamics method[J]. *Journal of Huaqiao University (Natural Science)*, 2013, 34(2): 169-175 (in Chinese)
王四华, 黄可君, 张光亚. 以分子动力学的方法探究嗜盐酶的嗜盐机理[J]. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2013, 34(2): 169-175
- [13] Coquelle N, Talon R, Juers DH, Girard É, Kahn R, Madern D. Gradual adaptive changes of a protein facing high salt concentrations[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 404(3): 493-505
- [14] Pohlschröder M, Giménez MI, Jarrell KF. Protein transport in archaea: sec and twin arginine translocation pathways[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(6): 713-719
- [15] Rose RW, Brüser T, Kissinger JC, Pohlschröder M. Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(4): 943-950
- [16] Shi YY, Li XZ, Zhang GM. Advances in microbial halophilic enzymes[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(8): 1180-1188 (in Chinese)
石云云, 李信志, 张桂敏. 微生物嗜盐酶的研究进展[J]. *微生物学报*, 2017, 57(8): 1180-1188
- [17] Norberg P, von Hofsten BV. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria[J]. *Microbiology Society*, 1969, 55(2): 251-256
- [18] Shi WL, Tang XF, Huang YP, Gan F, Tang B, Shen P. An extracellular halophilic protease SptA from a halophilic archaeon *Natrinema* sp. J7: gene cloning, expression and characterization[J]. *Extremophiles*, 2006, 10(6): 599-606
- [19] Shi WL, Zhong CQ, Tang B, Shen P. Purification and characterization of extracellular halophilic protease from haloarchaea *Natrinema* sp. R6-5[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(1): 161-163 (in Chinese)
石万良, 钟传奇, 唐兵, 沈萍. 极端嗜盐古生菌 (*Natrinema* sp.) R6-5 胞外嗜盐蛋白酶的纯化和性质研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(1): 161-163
- [20] Giménez MI, Studdert CA, Sánchez JJ, de Castro RE. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization[J]. *Extremophiles*, 2000, 4(3): 181-188
- [21] Kamekura M, Seno Y, Holmes ML, Dyll-Smith ML. Molecular cloning and sequencing of the gene for a halophilic alkaline serine protease (halolysin) from an unidentified halophilic archaea strain (172P1) and expression of the gene in *Haloferax volcanii*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(3): 736-742
- [22] Kamekura M, Seno Y, Dyll-Smith M. Halolysin R4, a serine proteinase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*; gene cloning, expression and structural studies[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein*

- Structure and Molecular Enzymology, 1996, 1294(2): 159-167
- [23] Gao RC, Shi T, Liu XD, Zhao MQ, Cui HL, Yuan L. Purification and characterisation of a salt-stable protease from the halophilic archaeon *Halogramma rubrum*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(5): 1412-1419
- [24] Dammak DF, Smaoui SM, Ghanmi F, Boujelben I, Maalej S. Characterization of halo-alkaline and thermostable protease from *Halorubrum ezzemoulense* strain ETR14 isolated from Sfax solar saltern in Tunisia[J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(4): 337-346
- [25] Studdert CA, Seitz MKH, Gil MIP, Sanchez JJ, de Castro RE. Purification and biochemical characterization of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus* extracellular serine protease[J]. Journal of Basic Microbiology, 2001, 41(6): 375-383
- [26] Ryu K, Kim J, Dordick JS. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1994, 16(4): 266-275
- [27] Stepanov VM, Rudenskaya GN, Revina LP, Gryaznova YB, Lysogorskaya EN, IYU F, Ivanova II. A serine proteinase of an archaeobacterium, *Halobacterium mediterranei*. A homologue of eubacterial subtilisins[J]. Biochemical Journal, 1992, 285(1): 281-286
- [28] Elbanna K, Ibrahim IM, Revol-Junelles AM. Purification and characterization of halo-alkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt[J]. Extremophiles, 2015, 19(4): 763-774
- [29] Vidyasagar M, Prakash S, Litchfield C, Sreeramulu K. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101[J]. Archaea, 2006, 2: 430763
- [30] Hou J, Xu JQ, Cui HL. Characteristics of extracellular protease production by halophilic archaea *Halorussus* sp. XZYJ18 and its enzymatic properties[J]. China Condiment, 2018, 43(9): 11-16 (in Chinese)
- 侯靖, 徐佳琪, 崔恒林. 嗜盐古菌 *Halorussus* sp. XZYJ18 产胞外蛋白酶特点及其酶学性质[J]. 中国调味品, 2018, 43(9): 11-16
- [31] Gaonkar SK, Furtado II. Characterization of extracellular protease from the haloarchaeon *Halococcus* sp. strain GUGFAWS-3 (MF425611)[J]. Current Microbiology, 2020, 77(6): 1024-1034
- [32] Siezen RJ, Leunissen JAM. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases[J]. Protein Science, 1997, 6(3): 501-523
- [33] De Castro RE, Ruiz DM, Giménez MI, Silveyra MX, Paggi RA, Maupin-Furlow JA. Gene cloning and heterologous synthesis of a haloalkaliphilic extracellular protease of *Natrialba magadii* (Nep)[J]. Extremophiles, 2008, 12(5): 677-687
- [34] Vogler M, Karan R, Renn D, Vancea A, Vielberg MT, Grötzinger SW, DasSarma P, DasSarma S, Eppinger J, Groll M, et al. Crystal structure and active site engineering of a halophilic γ -carbonic anhydrase[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 742
- [35] Li MR, Yin J, Mei S, Wang XH, Tang XF, Tang B. Halolysin sptA, a serine protease, contributes to growth-phase transition of haloarchaeon *Natrinema* sp. J7-2, and its expression involves cooperative action of multiple cis-regulatory elements[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1799
- [36] Souza TACB, Okamoto DN, Ruiz DM, Oliveira LCG, Kondo MY, Tersario ILS, Juliano L, De Castro RE, Gouveia IE, Murakami MT. Correlation between catalysis and tertiary structure arrangement in an archaeal halophilic subtilase[J]. Biochimie, 2012, 94(3): 798-805
- [37] Hou J, Han D, Zhou Y, Li Y, Cui HL. Identification and characterization of the gene encoding an extracellular protease from haloarchaeon *Halococcus salifodinae*[J]. Microbiological Research, 2020, 236: 126468
- [38] Good WA, Hartman PA. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*[J]. Journal of Bacteriology, 1970, 104(1): 601-603
- [39] Xu C, Wang YZ, Cui HB, Gong LY. Properties of amylase from *Haloferax mediterranei* R4[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2004, 26(4): 32-35 (in Chinese)
- 许晨, 王奕众, 崔寒冰, 龚灵豫. 嗜盐菌 *Haloferax mediterranei* R4 胞外淀粉酶的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(4): 32-35
- [40] Pérez-Pomares F, Bautista V, Ferrer J, Pire C, Marhuenda-Egea FC, Bonete MJ. α -amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*[J]. Extremophiles, 2003, 7(4): 299-306
- [41] Bajpai B, Chaudhary M, Saxena J. Production and characterization of α -amylase from an extremely halophilic archaeon, *Haloferax* sp. HA10[J]. Food Technology and Biotechnology, 2015, 53(1): 11-17
- [42] Hutcheon GW, Vasisht N, Bolhuis A. Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*[J]. Extremophiles, 2005, 9(6): 487-495
- [43] Fukushima T, Mizuki T, Echigo A, Inoue A, Usami R. Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1[J]. Extremophiles, 2005, 9(1): 85-89
- [44] Chen SX, Liu CM, Yang J, Liu Y, Qiu CS, Xie ZX. Identification of *Halorubrum* sp. CY strain and primary study on the basic characteristics of extracellular amylase[J]. Microbiology China, 2009, 36(7): 949-955 (in Chinese)

- 陈绍兴, 刘朝茂, 杨建, 刘晔, 邱成书, 谢志雄. 嗜盐古菌 *Halorubrum* sp. CY 的分离、鉴定及胞外淀粉酶特性初步研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 949-955
- [45] Moshfegh M, Shahverdi AR, Zarrini G, Faramarzi MA. Biochemical characterization of an extracellular polyextremophilic α -amylase from the halophilic archaeon *Halorubrum xinjiangense*[J]. Extremophiles, 2013, 17(4): 677-687
- [46] Kobayashi T, Kanai H, Hayashi T, Akiba T, Akaboshi R, Horikoshi K. Haloalkaliphilic maltotriose-forming α -amylase from the archaeobacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(11): 3439-3444
- [47] Santorelli M, Maurelli L, Pocsfalvi G, Fiume I, Squillaci G, la Cara F, del Monaco G, Morana A. Isolation and characterisation of a novel α -amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92: 174-184
- [48] Li X, Yu HY. Extracellular production of β -amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(11): 1837-1843
- [49] Li X, Yu HY. Purification and characterization of novel organic-solvent-tolerant β -amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 329(2): 204-211
- [50] Kobayashi T, Kanai H, Aono R, Horikoshi K, Kudo T. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the α -amylase gene from the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus* sp. strain Ah-36[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(16): 5131-5134
- [51] Zorgani MA, Patron K, Desvaux M. New insight in the structural features of haloadaptation in α -amylases from halophilic archaea following homology modeling strategy: folded and stable conformation maintained through low hydrophobicity and highly negative charged surface[J]. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2014, 28(7): 721-734
- [52] Boutaiba S, Bhatnagar T, Hacene H, Mitchell DA, Baratti JC. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp.[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 41(1/2): 21-26
- [53] Chen SX, Xu Y, Sun SQ, Liu JW, Chen FL. *Halomicrococcus hydrotolerans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a subterranean salt deposit[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 70(8): 4425-4431
- [54] Xu Y, Lv JT, Xie CZ, Sun SQ, Ke LX, Chen SX. *Halorubrum glutamatedens* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a rock salt[J]. Current Microbiology, 2019, 76(1): 52-56
- [55] Chen SX, Sun SQ, Xu Y, Liu HC. *Halococcus salsus* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from rock salt[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(12): 3754-3759
- [56] Sun SQ, Chen FL, Xu Y, Liu JW, Chen SX. *Halorubrum amylolyticum* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from a salt mine[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2019, 112(12): 1849-1861
- [57] Chen SX, Xu Y, Sun SQ, Chen FL, Liu JW. *Halalkalicoccus subterraneus* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a subterranean halite deposit[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2019, 112(7): 1067-1075
- [58] Chen SX, Xu Y, Ke LX. *Halorubrum trueperi* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a salt mine[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1564-1570
- [59] Chen SX, He J, Zhang J, Xu Y, Huang J, Ke LX. *Halorubrum salsamenti* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from a brine of salt mine[J]. Current Microbiology, 2017, 74(11): 1358-1364
- [60] Chen SX, Xu Y, Sun SQ, Chen FL. *Haloterrigena salifodinae* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a subterranean rock salt[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2019, 112(9): 1317-1329
- [61] Müller-Santos M, de Souza EM, de O Pedrosa F, Mitchell DA, Longhi S, Carrière F, Canaan S, Krieger N. First evidence for the salt-dependent folding and activity of an esterase from the halophilic archaea *Haloarcula marismortui*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2009, 1791(8): 719-729
- [62] Li X, Yu HY. Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production[J]. Folia Microbiologica, 2014, 59(6): 455-463
- [63] Ozcan B, Ozyilmaz G, Cokmus C, Caliskan M. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(1): 105-110
- [64] Schreck SD, Grunden AM. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(3): 1011-1021
- [65] Camacho RM, Mateos JC, González-Reynoso O, Prado LA, Córdova J. Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(7): 901-909
- [66] Rao L, Zhao XB, Pan F, Li Y, Xue YF, Ma YH, Lu JR. Solution behavior and activity of a halophilic esterase under high salt concentration[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e6980
- [67] Menasria T, Aguilera M, Hocine H, Benammar L, Ayachi A, Bachir AS, Dekak A, Monteoliva-Sánchez M. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated

- from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes[J]. Microbiological Research, 2018, 207: 289-298
- [68] Karray F, Ben Abdallah M, Kallel N, Hamza M, Fakhfakh M, Sayadi S. Extracellular hydrolytic enzymes produced by halophilic bacteria and archaea isolated from hypersaline lake[J]. Molecular Biology Reports, 2018, 45(5): 1297-1309
- [69] Kakhki AM, Amoozegar MA, Khaledi EM. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake[J]. International Journal of Environmental Science & Technology, 2011, 8(4): 705-714
- [70] Sorokin DY, Toshchakov SV, Kolganova TV, Kublanov IV. Halo(natrono)archaea isolated from hypersaline lakes utilize cellulose and chitin as growth substrates[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 942
- [71] Sorokin DY, Khijniak TV, Elcheninov AG, Toshchakov SV, Kostrikina NA, Bale NJ, Damsté JSS, Kublanov IV. *Halococcoides cellulivorans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic cellulose-utilizing haloarchaeon from hypersaline lakes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(5): 1327-1335
- [72] Chen SX, Xu Y, Liu HC, Yang AN, Ke LX. *Halobaculum roseum* sp. nov., isolated from underground salt deposits[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(4): 818-823
- [73] Chen SX, Sun SQ, Xu Y, Chen FL, Liu JW. *Halobellus captivus* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a subterranean salt mine[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2020, 113(2): 221-231
- [74] Chen SX, Liu HC, Zhou J, Xiang H. *Halorubrum pallidum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a subterranean rock salt[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(8): 2980-2986
- [75] Chen SX, Liu HC, Zhao DH, Yang J, Zhou J, Xiang H. *Halorubrum yunnanense* sp. nov., isolated from a subterranean salt mine[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65: 4526-4532
- [76] Dumorné K, Córdova DC, Astorga-Eló M, Renganathan P. Extremozymes: a potential source for industrial applications[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(4): 649-659
- [77] Xiang F, Wang HY, Jiang Y. Application research on halophilic bacteria in high-salinity wastewater treatment[J]. Shanxi Architecture, 2012, 38(26): 139-140 (in Chinese)
- 向菲, 王弘宇, 姜宇. 嗜盐菌在高盐废水处理中的应用研究[J]. 山西建筑, 2012, 38(26): 139-140