

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201811010



# 具有合成(S)-度洛西汀潜力的 功能菌株高效筛选及检测分析

江伟<sup>1,2</sup>, 裴蕊<sup>1,2</sup>, 胡鹏程<sup>1,2</sup>, 钟丽娟<sup>1,2</sup>, 周树锋<sup>1,2</sup>

(1. 华侨大学 福建省生物化工技术重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 提出一种高效筛选具有催化合成(S)-度洛西汀功能菌株的方法. 以来源于福建省厦门市附近海域的海水及淤泥中的微生物组为出发材料, 经过菌株培养、富集及贫瘠筛选培养基筛选, 梯度补加苯乙酮, 利用细胞催化降解苯乙酮, 并进行平板筛选和 16S rDNA 鉴定, 从而获得一株可以高效利用苯乙酮的功能菌株 *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*). 利用静息细胞法和核磁共振技术进行检测和验证, 结果表明: *B. megaterium* 具有催化 *N,N*-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩)-1-丙胺(DKTP)不对称转化制备(S)-*N,N*-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺(DHTP)的潜在能力.

**关键词:** (S)-度洛西汀; 生物催化; 手性药物; 高效筛选; *Bacillus megaterium*; 抑郁症

中图分类号: Q 939.97

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2019)03-0370-06

## Efficient Screening and Analysis of Functional Strains With Potential to Synthesize (S)-Duloxetine

JIANG Wei<sup>1,2</sup>, PEI Rui<sup>1,2</sup>, HU Pengcheng<sup>1,2</sup>,  
ZHONG Lijuan<sup>1,2</sup>, ZHOU Shufeng<sup>1,2</sup>

(1. Fujian Provincial Key Laboratory of Biochemical Technology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** An efficient method to screen the functional strain with catalytic synthesis (S)-duloxetine was established. The microbiome which was obtained from sea water and silt near Xiamen City, Fujian Province was selected as the start material. Strain cultivation, enrichment and sterile filter medium in the absence of energy source, gradient addition acetophenone for gradually increasing the concentration of acetophenone, catalytic degradation of acetophenone using cell, plate screening and 16S rDNA were selected to screen functional strain which can use acetophenone efficiently, and finally the *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*) was obtained. Detection and verification by resting cell method and nuclear magnetic resonance technology, the results show that *B. megaterium* has potential to catalyze asymmetric transformation of *N,N*-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-propa-namine (DKTP) to (S)-*N,N*-dimethyl-3-hydroxy-3-(2-thienyl)-1-propanamine (DHTP).

**Keywords:** (S)-duloxetine; biocatalysis; chiral drugs; efficient screening; *Bacillus megaterium*; depression

手性化合物作为很多药物的关键中间体, 其高效合成具有较高的理论效益和经济效益. 相较于

收稿日期: 2018-11-07

通信作者: 江伟(1987-), 男, 讲师, 博士, 主要从事合成生物学与生物信息学、生物催化与生物转化、应用酶学与定向进化的研究. E-mail: wjiang@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省泉州市科技计划项目(2018C008); 华侨大学高层次人才科研启动项目(600005-Z17Y0072)

传统的化学法合成手性化合物,生物法制备手性化合物具有手性和立体选择性高、环境友好等特点,因此,近年来关于生物法制备手性化合物的研究备受关注<sup>[1-9]</sup>。(S)-度洛西汀化学名为(S)-N-甲基-3-(1-萘氧基)-3-(2-噻吩基)-1-丙胺,是由美国 Eli Lilly 公司开发的 5-羟色胺及去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRIs)。盐酸度洛西汀作为盐酸氟西汀的替代品,具有化学稳定性好、安全有效、副作用少、对其他受体亲和力和低等特点<sup>[10-15]</sup>。盐酸度洛西汀的合成方法以化学合成法为主,但化学合成法收率较低、污染环境、副反应较多、工艺路线长<sup>[12-13,16-17]</sup>。而微生物发酵合成盐酸度洛西汀环境友好、节能绿色,但发酵产物浓度低,生产周期较长,工艺管理要求严格。全细胞催化 *N,N*-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩)-1-丙胺(DK-TP)不对称转化制备(S)-*N,N*-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺(DHTP),可作为生产(S)-度洛西汀的手性中间体,其反应路线简洁,易实现辅酶再生。筛选含有催化不对称转化高活性、高选择性的酮基还原酶的菌株是实现有效制备手性度洛西汀的关键<sup>[18-19]</sup>。相较于陆地酶,来源于海洋微生物的氧化还原酶具有耐盐、耐热、适冷、耐压、耐酸、耐碱等特性,而受到更多的关注<sup>[20-23]</sup>。目前,国内生产(S)-度洛西汀的技术和方法相对落后,具有制备度洛西汀等相关手性化合物能力的企业不多。因此,获得具有自主知识产权的制备(S)-度洛西汀的微生物资源和相应的技术显得尤为重要。此外,关于生物法制备(S)-度洛西汀的研究相对较少,已报道的具有生产(S)-度洛西汀潜力的菌株多来自于陆地土壤环境<sup>[18-19]</sup>,而关于水生环境,特别是来自于海洋高盐环境等特殊环境的菌株的研究则较少。因此,本文以来源于海洋环境中的微生物资源为研究对象,对具有合成(S)-度洛西汀潜力的功能菌株进行高效筛选及检测分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 微生物、主要试剂及仪器

1) 微生物:所用菌种来源于福建省厦门市附近海域的海水和近海淤泥。

2) 试剂:DNA 聚合酶,高纯度 dNTP,DNA Marker(福建省厦门市 TaKaRa 公司);高保真快速 DNA 聚合酶(TransStart FastPfu DNA 聚合酶,北京全式金公司);AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(浙江省杭州市爱思进(杭州)技术有限公司);磷酸盐(PBS)缓冲液、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物有限公司);实验所用的化学试剂均为分析级(北京市国药集团)。

3) 仪器:超速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);全波长酶标仪(德国 Thermo 公司);500 MHz/Avance III 型 500 Hz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司)。

### 1.2 培养基及主要缓冲液

筛选培养基 I:5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O;0.2 g MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O;0.002 g MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O;0.002 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O;50 μg 生物素;100 μg VB<sub>1</sub>;体积分数为 2%的苯乙酮,用蒸馏水配置。

筛选培养基 II:在培养基 I 的基础上,加入体积分数为 1.5%~3.0%的琼脂。

LB 培养基:5 g 酵母粉;10 g 蛋白胨;10 g NaCl;pH 值为 7.0。

PBS 缓冲液(1 L):137 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl;2.7 mmol · L<sup>-1</sup> KCl;10.0 mmol · L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;2 mmol · L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;pH 值为 7.0。

### 1.3 制备菌株样品

对近海区域取得的海水及淤泥样品进行搅拌混匀,制成母液,按 20%的接种量加入筛选培养基 I,制成混合细胞液,共 8 组。

培养条件:起始 pH 值为 6.0,装液量体积分数为 20%,温度为 28 ℃,摇床转速为 150 r · min<sup>-1</sup>,培养时间为 24 h。混合细胞液为培养结束时获得的发酵液。

### 1.4 梯度筛选功能菌株

向获得的发酵液中,梯度添加苯乙酮作为唯一碳源,得可降解苯乙酮的功能菌株。全细胞催化反应的方法为每 3 d 向发酵液中添加体积分数为 2%的苯乙酮,连续梯度补加,培养 21 d。培养温度为 28 ℃,摇床转速为 150 r · min<sup>-1</sup>。

1.5 复筛、菌种分离检测及鉴定

使用筛选培养基Ⅱ对初步获得的菌株进行复筛,其方法为:按照培养基Ⅱ的配方制备固体平板,将经梯度补加苯乙酮筛选所获得的菌种进行稀释涂平板,稀释倍数为 100~10 000. 然后,将其置于 28 ℃ 的恒温培养箱中,培养时间为 72 h.

16S rDNA 菌株鉴定有如下 4 个步骤. 1) 挑取经筛选培养基Ⅱ筛选得到的平板上的单菌落,接种到 LB 培养基中进行培养,温度为 28 ℃,摇床转速为 150 r·min<sup>-1</sup>,培养时间为 12 h. 2) 在冷冻离心机中离心(4 ℃,10 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min),获得细胞,弃上清液,沉淀用 PBS 缓冲液(pH 值为 7.0)重悬,充分洗涤后离心,重复操作 3 次. 3) 利用基因组 DNA 提取试剂盒(Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒)提取基因组 DNA,利用 16S rDNA 特异性引物进行多聚酶链式反应(PCR)扩增,对扩增得到的产物进行胶回收纯化(SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒). 4) 对纯化产物进行测序. 16S rDNA 序列在核糖体数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)上比对.

PCR 引物为 27F (AGTTTGATCMTGGCTCAG) 和 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT). PCR 扩增体系为纯化的 1 μL PCR 产物(10 ng·μL<sup>-1</sup>),4 μL BigDye(2.5×),2 μL BigDye Seq Buffer (5×),1 μL 引物(3.2 pmol·μL<sup>-1</sup>),12 μL 灭菌去离子水,总体积为 20 μL. PCR 程序为 96 ℃,1 min→(96 ℃,10 s→50 ℃,5 s→60 ℃,4 min)×25 个循环→4 ℃保温.

1.6 静息细胞法制备(S)-度洛西汀中间体

参照文献[19]报道的静息细胞法,首先,使用原始菌株 *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*)合成(S)-度洛西汀中间体. 将筛选获得的 *B. megaterium* 接种到 LB 培养基中进行培养,温度为 28 ℃,摇床转速为 150 r·min<sup>-1</sup>,培养时间为 24 h. 其次,在冷冻离心机中离心(4 ℃,10 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min),获得细胞,弃上清液,沉淀用 PBS 缓冲液(pH 值为 7.0)重悬,充分洗涤后离心,重复操作 3 次. 然后,在 15 mL 离心管中,控制反应体系为 5 mL,采用 50 mmol·L<sup>-1</sup>的 Tris-HCl 缓冲体系,其中,含有 5 g·L<sup>-1</sup>的 DKTP,湿菌体 200 mg. 反应 72 h 后取样,采用核磁共振分析检测培养液中是否含有 DHTP.

1.7 核磁共振检测体系中的(S)-N,N-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺

将催化得到的反应液离心(4 ℃,12 000 r·min<sup>-1</sup>,15 min),取上清液,利用旋转蒸发仪进行处理,加入 DMSO-d<sub>6</sub> 后进行核磁分析. 核磁共振条件为<sup>1</sup>H NMR(500 MHz,DMSO),δ 值为 8.13(s,1H),16.17~7.87(m,1H),16.17~7.70(m,1H),16.17~7.39(m,1H),16.17~7.01(m,1H),16.17~6.81(m,1H),3.67(s,12H),3.67(s,12H),3.67(s,11H),4.06~2.30(m,12H).

2 结果与讨论

2.1 制备菌株样品

以来源于海洋环境中的微生物资源为研究对象,为获得具有自主知识产权的制备(S)-度洛西汀的技术奠定基础. 化学合成法制备(S)-度洛西汀及其相似手性化合物具有收率较低、副反应较多等缺点<sup>[12-13,16]</sup>. 相比之下,生物法制备(S)-度洛西汀及其相似手性化合物反应时间短、副反应较少. 获得具有催化合成(S)-度洛西汀的功能微生物是开发相应制备技术的关键. DKTP 对微生物有较大的毒性,会严重影响微生物的生长,而具有催化苯乙酮能力的微生物具有制备(S)-度洛西汀关键中间体的能力<sup>[18]</sup>. 因此,采用苯乙酮为底物,利用贫瘠型筛选培养基<sup>[18]</sup>,以苯乙酮为唯一能力来源,进行功能菌株的筛选,经过连续 2 d 的培养,相较于对照组,发酵液的 D<sub>600</sub>值增加了 0.5,说明发酵液中具有可以利用苯乙酮的微生物.

实验结果表明:发酵液的 D<sub>600</sub>值相对增幅较小,其原因可能是使用的筛选培养基比较贫瘠,微生物能量来源少,导致微生物生长缓慢. 然而,使用单一能量来源的贫瘠培养基,可以增加筛选体系的专一性和高效性,确保筛选结果的可靠性.

2.2 梯度筛选功能菌株、复筛、菌株分离及鉴定

苯乙酮对微生物的生长有一定的毒副作用,采用梯度补加苯乙酮的方法,一方面,可以减少苯乙酮对微生物的抑制作用,另一方面,单一因素的选择压力可以增强功能菌株向催化苯乙酮的方向进行进化,使筛选得到的功能菌株具有更强的利用苯乙酮的能力. 文中每 3 d 梯度补加苯乙酮,连续梯度补加

培养 21 d,发现发酵液中菌体的  $D_{600}$  值有显著的变化(图 1).7,8 号样品的  $D_{600}$  值之比为 3 : 2,说明发酵液中具有可降解苯乙酮的功能菌株.随着时间的推移,发酵液  $D_{600}$  值逐渐增大,说明梯度补加的方法有利于逐渐强化功能菌株催化降解苯乙酮的能力.

为了分离发酵液中的微生物,得到单一的菌落,同时,也为了进一步验证筛选结果的可靠性,使用筛选培养基Ⅱ对初步获得菌株进行复筛.稀释涂平板培养和复筛的结果表明:该研究完成了对初筛结果的复筛,且获得了单一的菌株(图 2).复筛培养时,在 8 组发酵液稀释涂平板中,只有 6 组长出单菌落.经过挑单菌和再培养,获得 24 株功能菌株.利用静息细胞法,初步检测了经复筛获得的 24 株功能菌株催化利用 DKTP 的能力,其中,有 8 株表现出较好的性能.



图 1 梯度补加苯乙酮后菌体的生产情况

Fig. 1 Growth situation of microorganism after gradient addition of phenylacetone

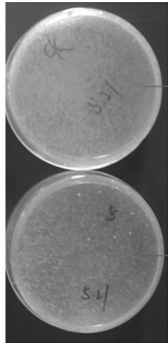


图 2 稀释涂平板进行复筛时菌落的生长情况

Fig. 2 Bacterial colony growth situation of diluted coated plate for rescreening

对获得的 8 株性能较好的菌株进行 16S rDNA 菌株鉴定.利用基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,利用 16S rDNA 特异性引物进行 PCR 扩增.PCR 扩增结果,如图 3 所示.图 3 中:泳道 M 为 DNA Marker;泳道 1~8 分别为 1~8 号单菌 16S rDNA 的 PCR 扩增结果,之后对扩增得到的产物进行胶回收并进行测序.将获得的 16S rDNA 序列在核糖体数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)上比对,结果表明,这 8 株菌为 *B. megaterium* 或 *Bacillus aryabhatai*.由于 *B. megaterium* 的基因组已经报道,且具有相对较好的利用 DKTP 的能力,故选取 *B. megaterium* 进行下一步研究.

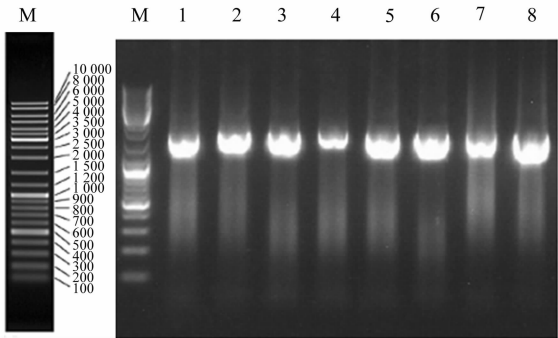


图 3 16S rDNA 特异引物 PCR 扩增结果

Fig. 3 Result of PCR amplification by using specific primers of 16S rDNA

### 2.3 催化性能检测

目前,具有光学特性的纯产品的年生产值已达 2 000 亿美元,已在全球范围内上市销售的药物中,具有手性特征的药物占 56.5%<sup>[1]</sup>,生物催化剂在手性药物中间体的生产中具有重要的作用<sup>[2,4,6,18,22]</sup>.根据世界卫生组织的报告,目前,抑郁症是全球第四大疾病负担,也是导致患者功能残疾的主要原因之一,大约有 1/7 的人会在人生的某个阶段遭受抑郁症困扰<sup>[10-17]</sup>.预计到 2020 年,抑郁症将成为仅次于心血管病的第二大疾病;到 2030 年,抑郁障碍更将成为中国疾病负担位居第一的疾病.作为一种高致残性疾病,抑郁障碍已经成为我国一个重大的公共卫生问题.(S)-度洛西汀是 Eli Lilly 公司研发的新型双递质抗抑郁药,弥补了主流抗抑郁药具有躯体疼痛症状的不足.此后,Eli Lilly 公司还开发了(S)-度洛西汀的一些新适应症,如妇女中度至重度应激性尿失禁、成人糖尿病继发的外周神经痛等.2013 年,(S)-度洛西汀的销售额为 16 亿美元.因此,制备(S)-度洛西汀相应技术的研究和开发具有重要的社会效益和经济效益.

目前,利用生物法制备(S)-度洛西汀及其相似手性化合物的研究相对较少.生物法制备(S)-度洛西汀关键手性中间体的反应条件温和、步骤简单<sup>[18]</sup>.利用 Chembiodraw 软件预测的 DKTP 和 DHTP 的

核磁图谱,如图 4 所示.由图 4 可知:DKTP 和 DHTP 的核磁图谱最主要的差别是 DHTP 在 5.17 处有一个羟基上的氢谱.

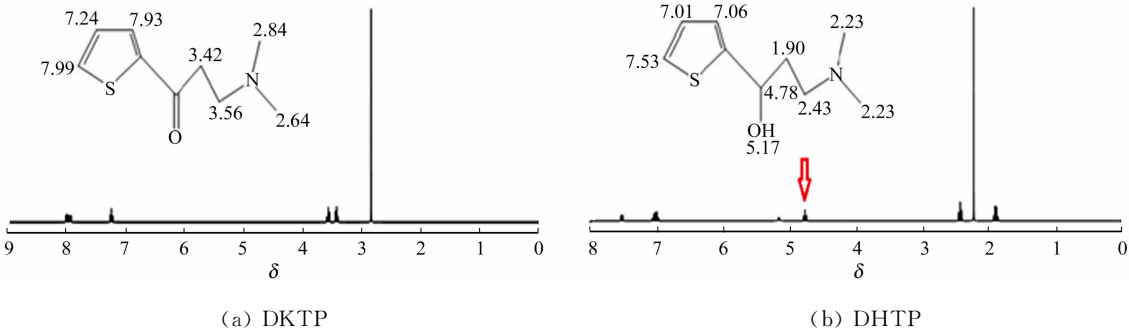


图 4 DKTP 和 DHTP 的核磁图谱

Fig. 4 Nuclear magnetic spectra of DKTP and DHTP

利用静息细胞法检测筛选获得的 *B. megaterium* 催化制备 DHTP 的潜在能力,反应 72 h 后取样,采用核磁共振分析检测培养液中是否含有(S)-N,N-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺,其结果如图 5 所示.由图 5 可知:在 5.34 处出现了一个氢谱.由此可知,*B. megaterium* 具有潜在催化制备 DHTP 的能力.

3 结束语

经过菌株培养、贫瘠筛选培养基筛选、梯度添加苯乙酮及复筛的方法,获得一株可以高效利用苯乙酮的功能菌株 *B. megaterium*. 静息细胞催化法和核磁共振技术检测和验证了 *B. megaterium* 具有潜在催化制备 DHTP 的能力. 高效筛选具有催化合成(S)-度洛西汀的功能菌株方法的建立及获得的 *B. megaterium*,在生物法制备(S)-度洛西汀及相关高附加值手性化合物领域具有较好的工业应用前景,对于新颖生物催化剂的开发与手性化合物生物合成方法的研究具有重要的理论意义和较好的社会效益.

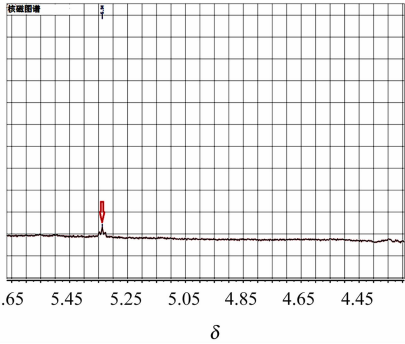


图 5 反应产物的<sup>1</sup>H NMR 核磁谱图

Fig. 5 <sup>1</sup>H NMR spectra of reaction product

参考文献:

[1] SUN Huihua,ZHANG Hongfang,ANG E L,*et al.* Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry,2017,26(7). DOI:10. 1016/j. bmc. 2017. 06. 043.

[2] PATEL R N. Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances[J]. Current Opinion in Biotechnology,2001,12(6):587-604. DOI:10. 1016/S0958-1669(01)00266-X.

[3] WEI Lu, LE Xiaoxia, ZHANG Jiawei, *et al.* Supramolecular shape memory hydrogels: A new bridge between stimuli-responsive polymers and supramolecular chemistry[J]. Chemical Society Reviews,2017,46(5):1284. DOI:10. 1039/c6cs00754f.

[4] BORNSCHEUER U T, HUISMAN G,KAZLAUSKAS R J,*et al.* Engineering the third wave of biocatalysis[J]. Nature,2012,485(7397):185-194. DOI:10. 1038/nature11117.

[5] ITOH T. Ionic liquids as tool to improve enzymatic organic synthesis[J]. Chemical Reviews,2017,117(15):10567-11607. DOI:10. 1021/acs. chemrev. 7b00158.

[6] 于平,岑沛霖,励建荣. 手性化合物制备的方法[J]. 生物工程进展,2001,21(6):89-94. DOI:10. 3969/j. issn. 1671-8135. 2001. 06. 022.

[7] 王立强,雷春花,邱飞,等. 萘甲酰胺衍生物 TW918 的合成及体外活性考察[J]. 华侨大学学报(自然科学版),2015,36(3):309-313. DOI:10. 11830/ISSN. 1000-5013. 2015. 03. 0309.

[8] 雷春花,王雪玉,杨育才,等. 小分子靶向受体酪氨酸激酶抑制剂 TW9183 的合成及体外抗肿瘤活性[J]. 华侨大学学报(自然科学版),2015,36(2):205-210. DOI:10. 11830/ISSN. 1000-5013. 2015. 02. 0205.

- [9] 刘玮玮,李曲祥,程峰昌,等.含D-乙酰氨基葡萄糖和哌嗪的脲类化合物的合成及表征[J].华侨大学学报(自然科学版),2014,35(6):685-688. DOI:10.11830/ISSN.1000-5013.2014.06.0685.
- [10] MCCORMACK P L,KEATING G M. Duloxetine: In stress urinary incontinence[J]. Drugs,2004,64(22):2567-2573. DOI:10.2165/00003495-200464220-00005.
- [11] 张睿华.度洛西汀的药理研究进展[J].医疗装备,2017,30(6):203-204. DOI:1002-2376(2017)06-0203-02.
- [12] 朱占群,杨雪艳,张俊,等.盐酸度洛西汀的合成工艺改进研究[J].中国新药杂志,2009,18(5):447-450. DOI:1003-3734(2009)-05-0447-04.
- [13] 张璐璐,郑洪波.盐酸度洛西汀介绍[J].临床精神医学杂志,2007,17(4):284-285. DOI:1005-3220(2007)04-0284-02.
- [14] 王岳鸿,张晓友,宋铁兵,等.盐酸度洛西汀临床研究近况[J].黑龙江医药科学,2007,30(6):39-40. DOI:10.3969/j.issn.1008-0104.2007.06.063.
- [15] 雷旭伟,梁铁美.抗抑郁药物:盐酸度洛西汀[J].海峡药学,2008,20(4):93-94. DOI:10.3969/j.issn.1006-3765.2008.04.051.
- [16] 刘刚,李荣,张国栋.盐酸度洛西汀的合成[J].黑龙江医药,2010,23(4):559-561. DOI:10.3969/j.issn.1008-021X.2017.20.013.
- [17] 刘莹,李喆.小剂量氨磺必利+度洛西汀在难治性抑郁症治疗中的应用[J].中国继续医学教育,2018(16):101-103. DOI:10.3969/j.issn.1674-9308.2018.16.053.
- [18] SONI P,BANERJEE U C. Biotransformations for the production of the chiral drug (S)-duloxetine catalyzed by a novel isolate of *Candida tropicalis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2005,67(6):771-777. DOI:10.1007/s00253-004-1870-5.
- [19] KIM J S,POWALLA M,LANG S,*et al.* Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions[J]. Journal of Biotechnology,1990,13(4):257-266. DOI:10.1016/0168-1656(90)90074-L.
- [20] HEAD I M,JONES D M,RÖLING W F. Marine microorganisms make a meal of oil[J]. Nature Reviews Microbiology,2006,4(3):173-182. DOI:10.1038/nrmicro1348.
- [21] ARRIGO K R. Marine microorganisms and global nutrient cycles[J]. Nature,2005,437(7057):349-355. DOI:10.1038/nature04159.
- [22] DEMIRJIAN D C,MORISVARAS F,CASSIDY C S. Enzymes from extremophiles[J]. Current Opinion in Chemical Biology,2001,5(2):144-151. DOI:10.1016/S1367-5931(00)00183-6.
- [23] VAN DEN BURG D. Extremophiles as a source for novel enzymes[J]. Current Opinion in Microbiology,2003,6(3):213-218. DOI:10.1016/S1369-5274(03)00060-2.

(责任编辑:钱筠 英文审校:刘源岗)