

文章编号:1000-5862(2020)02-0196-06

# 豆豉中 $\beta$ -甘露聚糖酶高产菌的分离、鉴定及其酶学性质

赵文鹏,李浩,王筱兰\*

(江西师范大学生命科学学院,江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室,江西 南昌 330022)

**摘要:**通过对传统曲霉型豆豉菌群分离纯化,结合刚果红显色及DNS筛选法,共得到高产 $\beta$ -甘露聚糖酶且形态学差异较大的细菌4株、真菌1株,其中真菌的酶活力为 $2\,016\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。经过序列鉴定与比对,细菌鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)不同种,真菌为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。酶学性质研究表明:黑曲霉的最适温度和pH值分别为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和5.0;4株芽孢杆菌最适作用温度和pH值范围为 $40\sim55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $6.0\sim7.0$ ,其中1株芽孢杆菌在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时保温240 min或在pH值为9.0时保留30 min,残留相对酶活仍可达61.4%或84.3%。  
**关键词:** $\beta$ -甘露聚糖酶;豆豉;分离筛选;酶学性质  
**中图分类号:**TS 201   **文献标志码:**A   **DOI:**10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2020.02.15

## 0 引言

豆豉是一种以大豆为主要原料,经过发酵而制成的传统调味副食品。依据制曲微生物的不同,豆豉主要可分为曲霉型、毛霉型、细菌型等类别,各类豆豉外在呈现为不同的营养风味<sup>[1]</sup>,其中一个重要原因是各类豆豉微生物分泌酶系的差异。而豆豉发酵微生物产酶往往以蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等主酶系为主,过去许多研究也针对豆豉产主酶系的微生物进行了报道<sup>[2-3]</sup>。近年来,一些研究者利用高通量测序技术等研究了豆豉发酵中的微生物区系<sup>[4-5]</sup>,发现豆豉微生物种类往往比预期复杂得多,这就意味着豆豉发酵中的一些功能酶没有得到充分挖掘。

甘露聚糖是半纤维素主要成分之一,在自然中蕴含丰富。显然,若能借助 $\beta$ -甘露聚糖酶使其得到充分开发,将带来巨大的社会和经济效益。就 $\beta$ -甘露聚糖酶的来源来看,虽然植物、动物及微生物中都普遍存在,但微生物来源的 $\beta$ -甘露聚糖酶具有提取简单、低成本、高稳定性、高活性等诸多优点,故备受国内外研究者的关注,而研究的重点领域包括产酶菌株的选育、产酶条件的优化及酶基因的克隆表达、改造等方面,其中筛选性能良好的产甘露聚糖酶的

菌株一直是探索的重要方向<sup>[6]</sup>,如孙会忠等<sup>[7]</sup>从牡丹内生菌中筛选出1株高酶活的产酶菌株,也有研究者从碱湖中筛选出产碱性甘露聚糖酶的菌种*Bacillus agaradhaerens*。然而,鲜见关于从豆豉发酵菌群中筛选出产 $\beta$ -甘露聚糖酶菌株的报道。

本文以不同发酵期的豆豉为材料,基于分离纯化后的微生物,对其中产 $\beta$ -甘露聚糖酶的菌株进行了筛选、鉴定,并对高产菌株的粗酶液的基本性质进行了探究,以期丰富产 $\beta$ -甘露聚糖酶的微生物遗传资源,并为后续 $\beta$ -甘露聚糖酶基因的克隆、改造奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及设备

- 1.1.1 实验材料 豆豉样品采自南昌稻香园调味品有限公司,采集阶段为发酵1、3、6、10 d,样品采集完毕后装入灭菌自封袋并尽快运回实验室,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。
- 1.1.2 实验试剂 生理盐水,刚果红,DNS试剂,柠檬酸缓冲液, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 。
- 1.1.3 培养基 筛选平板培养基( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):魔芋胶5.00, $\text{NH}_4\text{Cl}$ 5.00, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1.00, $\text{MgSO}_4$ 0.10,琼

收稿日期:2019-11-14  
基金项目:国家自然科学基金(31760449)资助项目。  
通信作者:王筱兰(1965-),女,江西景德镇人,教授,博士,主要从事食品生物化学及微生物发酵研究。E-mail:xlwang08@aliyun.com

脂 20.00, pH 值 6.0; 细菌种子培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 魔芋胶 5.00, 酵母抽提物 50.00, 蛋白胨 10.00, 氯化钠 5.00, 自然 pH 值; 细菌发酵培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 魔芋胶 5.00, 酵母抽提物 50.00, 蛋白胨 10.00,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.00,  $\text{MgSO}_4$  0.25, 自然 pH 值<sup>[9]</sup>; 真菌种子培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 魔芋胶 5.00, 酵母提取物 5.00, 蛋白胨 10.00, 葡萄糖 10.00, pH 值 6.0; 真菌发酵培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 酵母膏 13.00,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.00, 魔芋胶 5.00,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{CaCl}_2$  0.50,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7.54,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.23, pH 值 6.0<sup>[10]</sup>; BHI 培养基与 PDA 培养基为购置的成品, 灭菌后分别添加纳他霉素 ( $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及氯霉素 ( $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[11]</sup>.

1.1.4 实验仪器 电子天平, pH 计, 移液器, 酶标仪, 电泳仪, 凝胶成像仪, 超净工作台, 高压蒸汽灭菌锅, 恒温培养箱, 恒温水浴锅, 恒温摇床, PCR 仪, 高速离心机.

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化 称取 4 个发酵阶段的豆豉各 5 g, 分别加入 50 mL 生理盐水, 摇床振荡 30 min, 取适宜稀释度的菌液分别涂布在 BHI 或 PDA 固体培养基上, 用于细菌或真菌的分离. 细菌于 36 ℃ 培养 24 h, 真菌 30 ℃ 培养 72 h. 挑出若干单菌落再次分离划线, 直至得到单菌落.

1.2.2 菌株的初筛与复筛 将各阶段的细菌点接于筛选平板中, 另按同一布局点接于 BHI 平板中备用. 培养 16 h 后, 对筛选平板进行刚果红染色及生理盐水脱色. 按形态差异, 每个形态各挑选出透明圈直径 ( $H$ ) 与菌落直径 ( $C$ ) 比值较大的 4 ~ 5 株, 再次点接筛选平板复筛, 确定同一形态中最高酶活的细菌株. 由于真菌种类较少且大多数都有扩散生长、产色素的特性, 故采用种子液的摇瓶发酵法对其筛选.

1.2.3 产酶菌株的摇瓶发酵 挑取复筛后的细菌株及分离得到的真菌, 分别接入不同的种子培养基. 细菌于种子液中培养 12 h 后, 接入发酵培养基继续发酵 16 h 后离心得到粗酶液. 真菌于种子培养基中培养 72 h 后离心得到上清, 在按下述方法测定酶活力后, 选取最高酶活的菌株转入真菌发酵培养基培养 96 h, 离心后得到发酵上清液.

1.2.4 β-甘露聚糖酶活力的测定 (i) 甘露糖标准曲线的绘制: 参照文献[12]的方法绘制标准曲线, 每组 3 个平行. 以甘露糖浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标  $x$ , 吸光度值为纵坐标  $y$ , 绘制标准曲线; (ii) β-甘露聚糖酶活力测定: 参照文献[13]的方法适当修改, 取粗酶液 20  $\mu\text{L}$  与 80  $\mu\text{L}$  0.5% 的魔芋胶溶液

( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液配制, pH 值为 6.0) 充分混匀并短暂离心, 置于 55 ℃ 水浴反应 30 min 加入 100  $\mu\text{L}$  DNS 沸水浴 10 min, 冷却后定容至 1.0 mL 测定  $OD_{540}$ , 以蒸馏水代替酶液作为对照组; (iii) β-甘露聚糖酶活力计算: 酶活力定义为在所选取的反应条件下, 以每分钟水解底物产生相当 1  $\mu\text{mol}$   $D$ -甘露糖所需要的酶液量定义为 1 个酶活力单位 ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 具体计算方法参照文献[14].

1.2.5 高酶活菌株的鉴定 利用试剂盒提取复筛得到的各菌株的基因组 DNA, 通过 27F/1492R 及 ITS1/ITS4 2 对引物分别对细菌、真菌的基因保守片段进行 PCR 扩增, 具体条件参照文献[15], 扩增完毕使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物质量后, 送至上海生工测序. 同源性序列比对分析用 NCBI 中的 BLAST 软件进行分析, 采用 MEGA 软件对各菌株进行系统发育分析, 系统发育树的构建采用 Neighbor-joining 法.

1.2.6 酶学性质研究 (i) 最适反应温度: 分别在 25、35、45、55、65、75 ℃ 下按照标准方法测定粗酶液的酶活, 以酶活力最高者为 100%; (ii) 酶的温度稳定性: 将酶液分别在 35、45、55、65 ℃ 温度下保温不同时长, 按标准方法测定残余酶活; (iii) 最适反应 pH 值: 用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液及  $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  分别配制不同 pH 值的底物溶液, 按标准方法测定酶活. 以酶活力最高者为 100%; (iv) 酶的 pH 值稳定性: 将酶液分别于不同 pH 值的缓冲溶液 (同 (iii)) 中于 30 ℃ 放置 1 h, 按标准方法测定残余酶活, 以初始酶活为 100%. 每组 3 个平行, 取平均值计算相对酶活力.

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化

稀释涂布后, 4 个发酵阶段 (编号分别为 A、B、C、D) 菌群总数存在较大差异, 其中发酵前期较高 (约  $10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). 各阶段菌落形态种类大致相当, 其中以芽孢菌属典型特征 (表面粗糙、不透明、褶皱、乳白或褐色) 的菌落为大多数, 而真菌则主要包括曲霉状真菌、部分毛霉状真菌及少量酵母菌.

2.2 产酶细菌株的初筛、复筛

每个发酵阶段各选择分离单菌株 (40 株) 进行点板初筛 (见图 1(a) 和图 1(b)). 初筛中选择每个形态  $H_c$  ( $H/C$ ) 值的前 4 ~ 5 株, 共 18 株进入复筛 (见图 1(c)). 复筛中最终确定每个形态  $H_c$  值最高

的细菌株,各形态  $H_c$  值的最高株分别为 A-8、B-3、B-6、C-3(见表1),其中 B-3 的  $H_c$  值为 6.84,故选择这 4 株细菌进行后续研究.

表 1 产较大水解圈的细菌  $H_c$  值比较

编号	$H_c$ 值	编号	$H_c$ 值	编号	$H_c$ 值	编号	$H_c$ 值
A-4	3.73	B-3	6.84	C-3	3.59	D-5	2.89
A-8	4.82	B-6	4.16	C-19	3.93	D-14	3.65
A-14	5.94	B-21	4.75	C-26	5.18	D-22	5.81
A-17	3.25	B-28	3.06	C-31	4.57	D-37	6.40
		B-33	6.41	C-36	5.37		

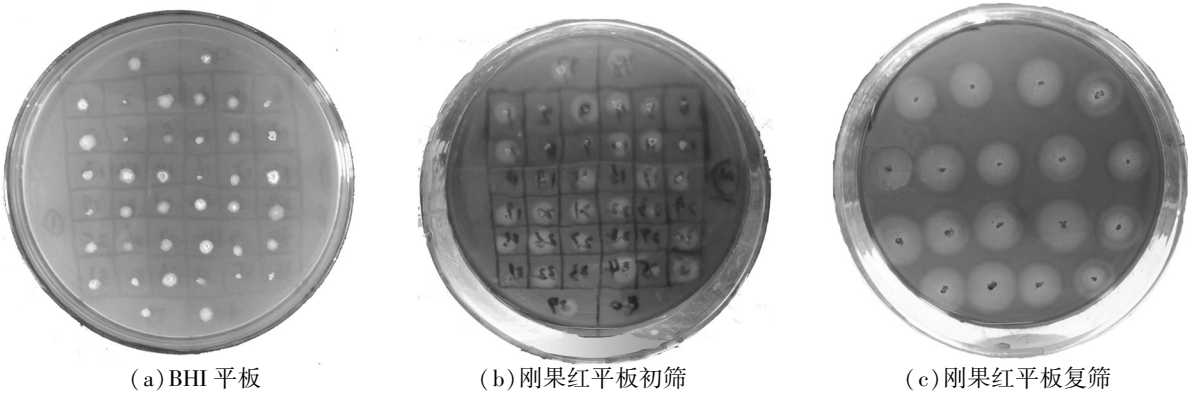


图 1 产酶细菌株初筛及复筛

2.3 摇瓶发酵与  $\beta$ -甘露聚糖酶活力的测定

实验结果表明,甘露糖含量与吸光度  $OD_{540}$  值标准曲线方程为  $y = 1.001\ 6x - 0.009\ 8$ ,且相关性 ( $R^2 = 0.999\ 5$ )良好(见图2),满足后续酶活力测定的要求.

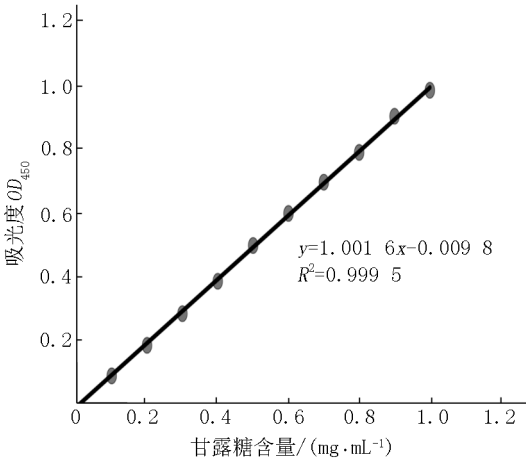


图 2 甘露糖标准曲线

将各真菌接入种子液发酵后,结合标准曲线,通过 DNS 法筛选出 1 株最高酶活的真菌 Fu-2,该株真菌及 4 株细菌形态如图 3 所示.通过对 4 株细菌及该株真菌酶活进行测定发现:就细菌来看,B-3 酶活最高( $1\ 845\ U \cdot mL^{-1}$ ),与筛选平板结果基本一致,而从整体来看,真菌的发酵液酶活更高,达到  $2\ 016\ U \cdot mL^{-1}$ (见图4).

2.4 高产酶菌株的分子鉴定

PCR 扩增结果表明:4 株细菌 16S 保守区域的 PCR 产物均为明亮单一条带,约为 1 500 bp,真菌的 ITS 扩增产物大小约为 600 bp(见图5).  
基于序列与 GenBank 中相关细菌菌株的对应序列比较的结果,建立系统发育树(见图6).分析表明:4 株细菌均属于 *Bacillus* 属,但分属于不同种.其中 A-8 菌株与 *Bacillus tequilensis* 相似程度最高,B-3、B-6、C-3 则分别与 *Bacillus. Velezensis*、*Bacillus. subtilis* 和 *B. licheniformis* 同源性最高.另外,根据 BLAST 在线分析结果,最高酶活的真菌鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*).

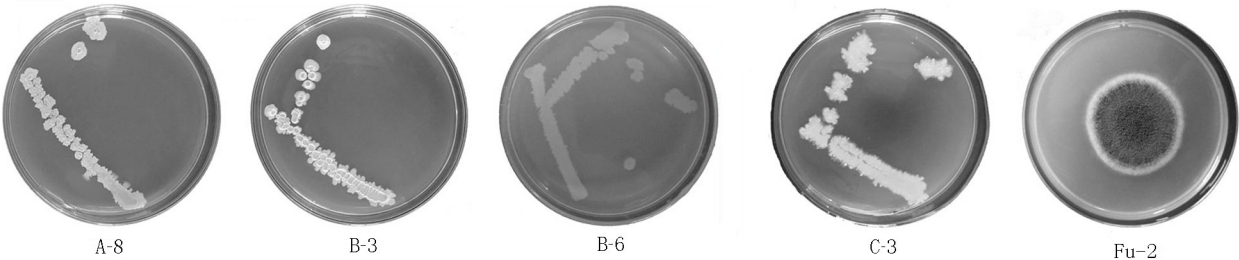


图 3 5 株高产酶菌株的基本形态特征

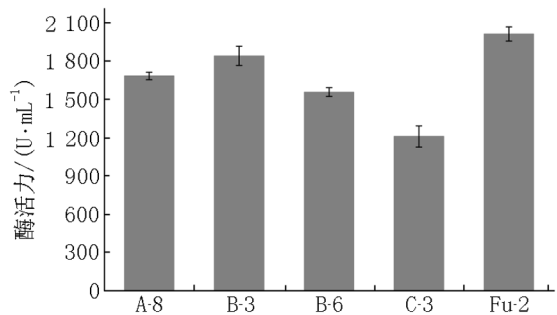


图4 高产菌株酶活力的比较

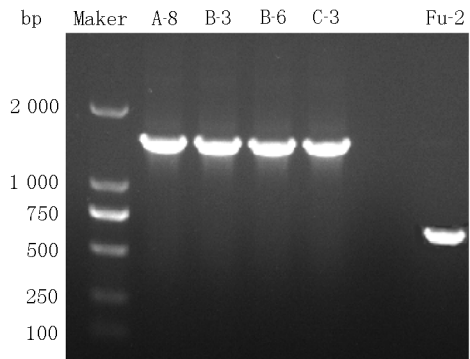


图5 PCR产物电泳图

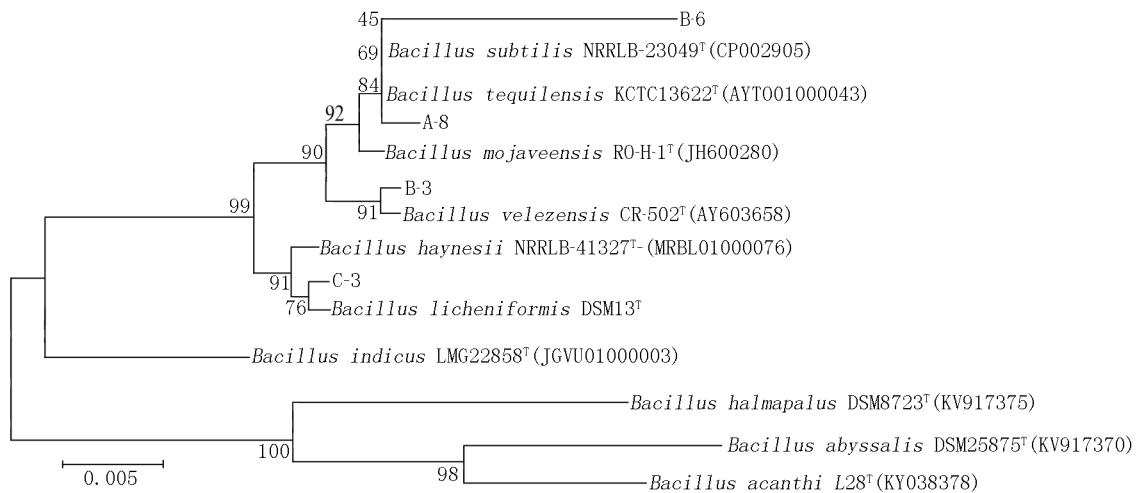
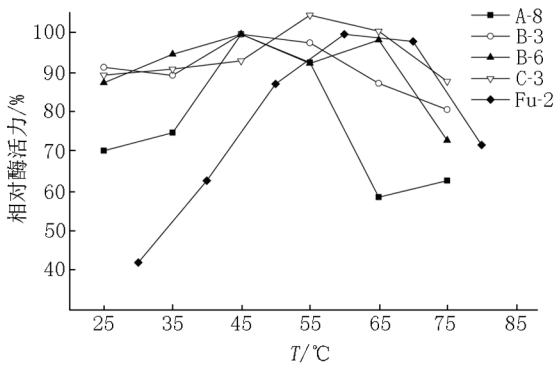


图6 细菌株的16S rDNA系统进化树

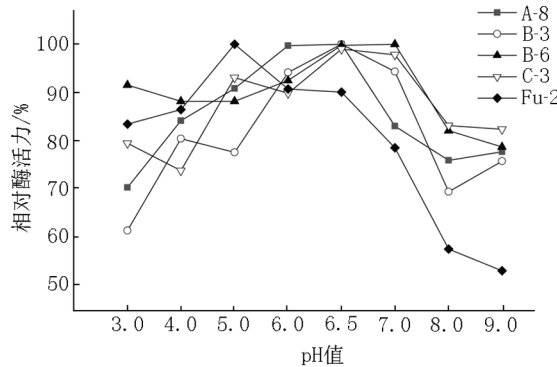
2.5 酶学性质研究

通过对比不同温度下相对酶活力发现:不同来源酶的最适宜反应温度为40~60℃(见图7(a)),且均呈先升后降趋势,其中黑曲霉的相对酶活力在60℃时达到最高.就各不同pH值下各菌株酶活力的表现来看,细菌来源的相对酶活力最适pH值为6.0~7.0,且在pH值为4.0~8.0时大致仍保留80%以上的酶活力(见图7(b));黑曲霉的最适pH值则约为5.0,且在碱性条件下相对酶活下降明显.

而就酶的稳定性的来看,不同细菌间差异化明显.其中菌株B-6的温度与pH值稳定性均为最佳,其在65℃时保温240 min及在pH值9.0时保留30 min,残留的相对酶活仍分别达61.4%与84.3%.而A-8、B-3来源的酶的温度与pH值稳定性均较弱,酶活在65℃及pH值3.0时尤其下降明显(见图8(a)和图8(b)).另外,就黑曲霉而言,其温度与pH值稳定性则整体表现一般.



(a) 最适反应温度



(b) 最适反应pH值

图7 温度及pH值对菌株甘露聚糖酶活力的影响



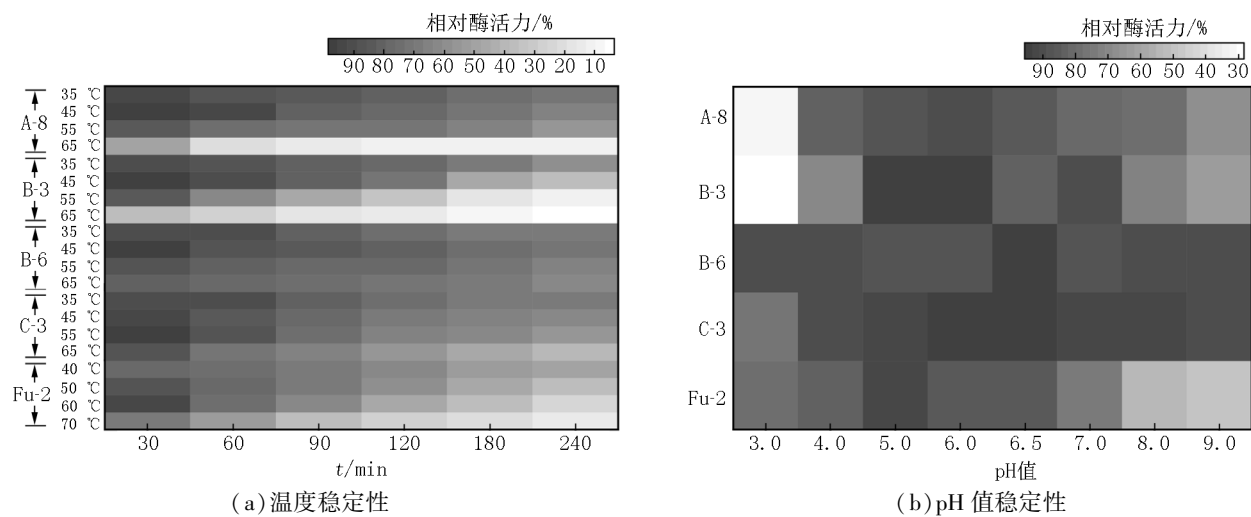


图8 温度及 pH 值对各菌株甘露聚糖酶稳定性的影响

3 讨论

由于β-甘露聚糖酶在诸多工业领域中扮演重要角色,因此很多研究者对其从不同角度展开了大量研究,特别是产酶菌株的筛选与改良方向.本文通过从豆豉发酵环境中进行产酶菌株的筛选,最终获得了5株高产β-甘露聚糖酶菌株并进行了分子鉴定,同时对不同菌源的粗酶液的基本性质进行了比较.

由于土壤、海洋及湖泊等环境中菌种资源丰富,过去很多研究者倾向于从该类生镜中筛选高酶活的菌株,如李云程等<sup>[16]</sup>对海洋中细菌、真菌及放线菌产β-甘露聚糖酶进行了筛选,得到1株酶活较高的芽孢杆菌.黄俊丽等<sup>[17]</sup>从土壤中筛出1株酶活为50.36 U·mL<sup>-1</sup>的假单胞菌,周芳等<sup>[14]</sup>则从土壤中筛选出酶活为1487 U·mL<sup>-1</sup>的芽孢杆菌.本文通过借鉴前人优化后的培养基,共得到5株高酶活的菌株,且均在1 200 U·mL<sup>-1</sup>以上,4株芽孢杆菌酶活力与周芳等<sup>[14]</sup>的研究数据大致相当,而高于其他大部分报道.而就黑曲霉来看,以往大部分学者往往采用固态发酵进行产酶试验,与以往利用突变或基因工程的部分黑曲霉液体发酵相比,本研究与其仍有一定差异<sup>[18-19]</sup>.需要指出的是,由于酶活方法的定义及具体试验条件不同,故这也是许多研究酶活力数据存在较大差异的重要原因.

另一方面,较高酶活力往往只是筛选产酶菌株的一个重要指标,良好的应用前景往往需考虑酶在不同环境中的稳定性.为此,本文针对不同产酶菌株的酶液的基本性质进行了探索.可以发现,真菌的在偏酸偏热的环境中达到最高酶活,而芽孢杆菌最高酶活更集中于温和的中性环境,这与之前的一些报

道类似<sup>[14,17,20]</sup>.同时,部分芽孢菌株来源的酶液(如B-6、C-3)在许多温度及酸碱度区间内均能保持较高酶活力,这说明其或许更能耐受严酷环境,可能具有较好的应用开发价值.此外,本文虽筛选到了一些高产β-甘露聚糖酶菌株,但可培养法往往只能在特定培养基中筛选出易于培养的菌株,很多难于培养菌株的β-甘露聚糖基因资源未能得到有效挖掘,未来有必要结合宏基因组策略进行更为广泛的筛选,并针对现有的产酶菌株进一步地改造.

4 参考文献

[1] 胡会萍. 豆豉后酵中有益微生物及接菌发酵低盐豆豉品质、风味与功能性的研究[D]. 北京: 中国农业大学,2012.

[2] 宋园亮,张忠华,熊骏,等. 元阳豆豉中高产蛋白酶乳酸菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 中国微生态学杂志,2011,23(1):8-12.

[3] 廖焰焰,张菊,李翔,等. 传统曲霉型豆豉中高产脂肪酶的米曲霉筛选及鉴定[J]. 江西师范大学学报:自然科学版,2018,42(5):58-63.

[4] 石聪,李世瑞,李跑,等. 基于高通量测序浏阳豆豉不同发酵阶段微生物多样性分析[J]. 食品与发酵工业,2018,44(2):27-32.

[5] He Bin,Li Haoran,Hu Zhihong,et al. Difference in microbial community and taste compounds between *Mucor*-type and *Aspergillus*-type douchi during koji-making[J]. Food Research International,2019,121:136-143.

[6] 郭尚旭,王瑶,那金,等. 细菌β-甘露聚糖酶研究进展[J]. 中国农学通报,2017(27):61-65.

[7] 孙会忠,李金萍,陈旭,等. 牡丹内生菌 JP13 的产β-甘露聚糖酶活性及鉴定[J]. 基因组学与应用生物学,2016,35(10):2702-2706.

[ 8 ] 廖婷婷,翟磊,高成华,等. 1 株产甘露聚糖酶菌株的分离鉴定及酶的纯化与性质 [ J ]. 微生物学报,2011,51 ( 11 ):1520-1526.

[ 9 ] 靖德军. $\beta$ -甘露聚糖酶产生菌株的分离鉴定、产酶条件优化及其酶学性质研究 [ D ]. 雅安:四川农业大学,2013.

[ 10 ] 廖晓霞,张学武. 紫外线诱变对  $\beta$ -甘露聚糖酶产酶菌株的影响研究 [ J ]. 现代食品科技,2010,26 ( 8 ): 801-804.

[ 11 ] Chen Tingtao,Wang Mengjuan,Li Shengjie,et al. Molecular identification of microbial community in surface and undersurface douchi during postfermentation [ J ]. Journal of Food Science,2014,79(4) :M653-M658.

[ 12 ] 王静. 成团泛菌甘露聚糖酶的体外定向进化 [ D ]. 武汉:华中农业大学,2013.

[ 13 ] Parker K N,Chhabra S R,Lam D,et al. Galactomannanases Man2 and Man5 from Thermotogaspecies: growth physiology on galactomannans, gene sequence analysis, and biochemical properties of recombinant enzymes [ J ]. Biotechnology and Bioengineering,2001,75(3) :322-333.

[ 14 ] 周芳,牟海津,江晓路. 芽孢杆菌 M-21 产  $\beta$ -甘露聚糖酶发酵条件研究 [ J ]. 食品与发酵工业,2007,33(2) :10-14.

[ 15 ] 侯爱香,刘静,李珂,等. 面筋食品中微生物群落分析及优势菌分离鉴定 [ J ]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2017,43(1) :79-86.

[ 16 ] 李云程,林娟,梁燕辉,等. 产甘露聚糖酶海洋微生物的筛选及酶学性质研究 [ J ]. 中国食品学报,2015,15 ( 12 ):72-79.

[ 17 ] 黄俊丽,包凌霞,王贵学. $\beta$ -甘露聚糖酶产生菌的分离、鉴定及产  $\beta$ -甘露聚糖酶最适条件的研究 [ J ]. 生物技术通报,2009(7) :166-170.

[ 18 ] 盛金萍. 黑曲霉酸性  $\beta$ -甘露聚糖酶液体发酵的研究 [ D ]. 无锡:江南大学,2008.

[ 19 ] 张娟,罗长财. 耐酸性黑曲霉  $\beta$ -甘露聚糖酶的克隆及其在毕赤酵母中的表达分析 [ J ]. 生物技术通讯,2011,22(2) :182-187.

[ 20 ] Naganagouda K,Salimath P V,Mulimani V H. Purification and characterization of endo- $\beta$ -1,4 mannanase from *Aspergillus niger* gr for application in food processing industry [ J ]. Journal of Microbiology and Biotechnology,2009,19 ( 10 ):1184-1190.

The Isolation, Identification of  $\beta$ -Mannanase High-Yield Strains from Douchi and  $\beta$ -Mannanase Characterization

ZHAO Wenpeng,LI Hao,WANG Xiaolan\*

( College of Life Science,Key Laboratory of the Conservation and Sustainable Utilization for Subtropical Plant Resources of Jiangxi Province,Jiangxi Normal University,Nanchang Jiangxi 330022,China)

**Abstract:** In this study, by microbial isolation and purification of traditional *Aspergillus*-type douchi, and following with Congo Red staining and DNS colorimetric methods, a total of four bacterial strains and one fungal strain with high  $\beta$ -mannanase and morphological differences are obtained with a highest enzyme activity of  $2\,016\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  for fungal strain, respectively. Through sequence identification and comparison, bacteria are identified as different species of *Bacillus* and fungi as *Aspergillus niger*. The results of enzymatic properties show that the optimum temperature and pH of *Aspergillus niger* are  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $5.0$ , respectively. And the optimum temperature range of four *Bacillus* strains is from  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  and pH range of four *Bacillus* strains is from  $6.0$  to  $7.0$ , among which one *Bacillus* strain keeps at  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  for  $240\text{ min}$  or pH  $9.0$  for  $30\text{ min}$ , and the residual relative enzyme activity is  $61.4\%$  or  $84.3\%$ .

**Key words:**  $\beta$ -mannanase; douchi; isolation and screening; enzymatic properties

( 责任编辑:刘显亮)