

支链淀粉水解酶水解支链淀粉的特异氨基酸分析*

Analysis of the Key Amino Acid of Amylopectin Hydrolyase on Amylopectin Hydrolysis

莫莉¹, 韦廷宗², 闭海¹, 郭媛², 林丽华^{1,2}, 黄日波^{1,2}, 严少敏², 庞浩^{1,2**}

MO Li¹, WEI Ting-zong², BI Hai¹, GUO Yuan², LIN Li-hua^{1,2}, HUANG Ri-bo^{1,2}, YAN Shao-min², PANG Hao^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】通过对具有支链淀粉水解能力的环糊精水解酶的结构进行分析, 探寻决定酶与支链淀粉水解相关的关键氨基酸残基。【方法】对底物特异性发生改变的环糊精水解酶 cds1-3 进行功能鉴定, 并利用分子模拟方法对其底物作用特异氨基酸序列和空间结构进行分析。【结果】环糊精水解酶 cds1-3 具有特殊的底物作用方式, 它水解支链淀粉的能力强于水解环糊精。cds1-3 和 ThMA 的蛋白质序列只有 30 个氨基酸的差异, 主要位于远离底物结合区域的蛋白质中段, 与环糊精水解酶的底物通道聚集位置相近。【结论】环糊精水解酶 cds1-3 的功能鉴定及其关键氨基酸进行序列和空间结构分析, 为揭示大分子底物, 特别是支链淀粉底物的水解方式提供新的切入点。

关键词: 环糊精水解酶 支链淀粉 酶水解 分子模拟

中图分类号: Q556 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2015)01-0031-06

Abstract:【Objective】Exploring the key amino acid of amylopectin hydrolyzed enzyme, which have the ability of hydrolysis of huge substrate, is a possible way toward this problem.【Methods】A substrate-specificity mutant of cyclodextrin hydrolase was screened out from an environmental metagenomic library. Molecular simulation technique was applied to analyze the special amino acids related with substrate hydrolysis.

【Results】Cyclodextrin hydrolase cds 1-3 showed a special mode of substrate hydrolytic action. The best substrate was amylopectin instead of cyclodextrin. This is different with other known cyclodextrin hydrolased enzymes.【Conclusion】Cyclodextrin hydrolase cds 1-3 is a special cyclodextrin enzyme. The sequence and spatial structure analysis of its key amino acids may provide a good basis for hydrolysis of amylopectin.

Key words: cyclodextrin hydrolase, amylopectin, enzymatic hydrolysis, molecular simulation

收稿日期: 2015-01-06

修回日期: 2015-01-16

作者简介: 莫莉 (1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事分子酶学研究。

* 广西科技合作与交流计划项目 (桂科合 1347004-1), 广西科技攻关项目 (桂科重 14122004-5), 广西自然科学基金项目 (2014GXNSFBA118129, 2014GXNSFAA118078) 和国家自然科学基金项目 (21366007) 资助。

** 通讯作者: 庞浩 (1975-), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事分子微生物学和酶工程研究, E-mail: panghouse@126.com。

0 引言

【研究意义】天然淀粉中支链淀粉约占 80%，直链淀粉约占 20%，支链淀粉是一个具有树枝形分支结构的多糖，在其糖链中具有由 α -1,6-苷键形成的支链，主链中每隔 6~9 个葡萄糖残基就有 1 个分支，每 1 个支链平均含有约 15~18 个葡萄糖残基。支链的 α -1,6-苷键无法被淀粉酶水解^[1]，在淀粉的酶水解反应中，淀粉酶(α -淀粉酶和 β -淀粉酶)仅能切断 1,4-葡糖苷键，而对具有 1,6 位葡糖苷键的分支没有作用^[2]，因而在分解支链淀粉时，除麦芽糖和葡萄糖外，还生成分支部分具有 α -1,6-键的极限糊精。分解限度一般以葡萄糖为准，约为 35%~50%，支链水解过程中极限糊精的残留降低了淀粉的利用率，极限糊精的进一步降解需要 α -1,6-糖苷键的水解^[3]。支链淀粉酶是一类对支链淀粉具有降解能力的酶，这类酶包括普鲁兰酶以及新近发现具有支链水解能力的环糊精水解酶和麦芽糖淀粉酶。支链淀粉酶可水解淀粉分支处的 α -1,6-糖苷键生成直链淀粉和糊精^[2]。因此，在淀粉加工中，支链淀粉酶与淀粉酶合用，不仅能降低淀粉酶的用量，而且可提高淀粉的转化率，大大降低生产成本^[4]。【前人研究进展】自 1961 年在产气杆菌上首次发现具有支链淀粉水解能力的普鲁兰酶以后，各国的科研人员掀起了开发支链淀粉酶的高潮。普鲁兰酶可切开支链淀粉分支点中的 α -1,6-糖苷键，从而剪下整个侧枝，形成直链淀粉^[5]。酶法水解淀粉的过程中，在糖化阶段使用普鲁兰酶与糖化酶协同作用，可降低糖化酶的用量，还可有效提高淀粉的水解速率，缩短反应时间，提高葡萄糖的产量和纯度。目前市场上售卖的复合糖化酶(糖化酶与普鲁兰酶的混合制剂)可以使淀粉水解的葡萄糖值达到 99%，葡萄糖量达总糖质量的 97%。而普鲁兰酶目前已经被诺维信公司申请相关专利并且由该公司生产，国内食品工业所用的普鲁兰酶均是该公司产品。除了普鲁兰酶，后来又陆续发现一些和普鲁兰酶同源的具有支链分解能力的酶，如 tpe I pullulanase, tpe II pullulanase, neopullulanase, isopullulanase 以及 tpe III pullulan hydrolase, 这些酶属于糖基水解酶家族 13, 49 和 57^[6,7]。此外，在糖基水解酶家族 13 中还发现一类具有支链淀粉水解能力的酶，包括环糊精水解酶(cyclodextrinase)、麦芽糖淀粉酶(maltogenic amylase)以及来自 *Thermoactinomyces vulgaris* 菌株的淀粉酶(amylase II)^[8,9]。也有人认为 cyclodextrinase 和 maltogenic amylase 具有相似的酶作用方式，它们应该是属于同一类酶，都可以称

为环糊精水解酶^[10]。【本研究切入点】对具有支链淀粉水解能力的各种水解酶的研究发现，不同微生物来源的酶对底物作用的专一性不同，它们对各种低聚支链淀粉的分子识别和水解能力差异极大^[11,12]。普鲁兰酶和环糊精水解酶对小分子底物的亲和力高，而对大分子底物的亲和力弱，由于对支链淀粉作用专一性不高，导致水解效率较低，阻碍其在支链淀粉水解上的实际应用^[13]。因此，对不同来源的环糊精水解酶进行分析，可以提供糖基水解酶家族 13 的蛋白质对支链淀粉水解差异的蛋白质结构基础。【拟解决的关键问题】从对大分子底物的作用方式入手，研究具有支链水解能力的环糊精水解酶的水解特性，分析其对支链淀粉作用的关键氨基酸，为支链淀粉水解酶的开发提供新的研究路径，从而实现对支链淀粉的彻底水解^[11]。

1 材料与方法

1.1 菌株与材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、模式菌株栖热菌(*Thermus* sp.) IM6501 的环糊精水解酶 ThMA (id 为 O69007)、克隆载体 pUC19 和表达载体 pSE380 由实验保存；柯斯质粒 CDS1 来自实验室保存的广西武鸣糖厂周围土壤的宏基因组文库^[14]；质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司；分子生物学工具酶包括限制性内切酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 和 Protein Marker 购自 TaKaRa 公司； α -环糊精购自上海生物工程有限公司；支链淀粉购自 SIGMA 公司；可溶性淀粉购自国药集团化学试剂有限公司；IPTG 购自 Aldrich 公司；Yeast extract 和 Tryptone 购自 OXOID 公司；其他试剂均为国产分析纯试剂；寡聚核苷酸引物由 invitrogen 公司合成。

1.2 柯斯质粒的亚克隆

提取最后确定能够在淀粉选择培养基上形成透明圈的柯斯质粒 CDS1 的 DNA^[14]。用限制性内切酶 *Bam*H I 酶切 DNA，将获得的 DNA 片段与去磷酸化的经 *Bam*H I 酶切的 pUC19 进行连接。然后转化到 *E. coli* DH5 α 中，在含淀粉的 LA 选择平板上筛选能够形成透明圈的亚克隆 pUC-cds3。对该亚克隆进行测序，送交宝生物工程(大连)有限公司测定 DNA 核苷酸序列。

1.3 亚克隆序列的比对分析

DNA 序列使用 VECTOR NTI Advance 10 软件进行序列拼接，再用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Blast 工具进行序列比对和分析。用简

单组件结构研究工具(Simple Modular Architecture Research Tool, SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de>)分析氨基酸序列的组件结构。

1.4 环糊精水解酶基因 *cds1-3* 的克隆

根据亚克隆的测序结果设计扩增环糊精水解酶基因 *cds* 的引物为 *cds-1*: 5'-AGACCATGGTG CAC-CACCACCACCACCACGGGGAAGAAGCCATC-CACCACCGC-3' 和 *cds-2*: 5'-GCCAAGCTTAC-CAGCTTTCGACCGCGTAAAG-3'。在上游引物 *cds-1* 中引入 *Nco* I 酶切位点(加粗处)和 6xHis-tag(下划线处), 在下游引物 *cds-2* 中引入 *Hind* III 酶切位点(加粗处)。PCR 反应程序: 95°C 2 min; 98°C 10 s, 55°C 15 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。扩增的目的片段经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切后, 与同样经 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切的表达载体 pSE380 连接, 用 CaCl_2 法转入 *E. coli* DH5 α 中。构建的重组质粒命名为 pSE-*cds1-3*。

1.5 重组蛋白的诱导表达与纯化

挑取含有重组质粒的大肠杆菌单菌落接种到 LB 培养基中, 37°C 培养至 OD_{600} 约为 0.4 时, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L, 37°C 诱导 15 h。表达的重组蛋白按照 Qiagen 公司蛋白质纯化试剂盒使用说明用镍亲和层析 Ni-NTA 进行纯化, 再通过 30 kDa 的超滤膜脱盐处理。纯化的 *cds1-3* 蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(SDS-PAGE)。

1.6 重组蛋白的酶活测定及酶学性质的研究

环糊精水解酶活力测定使用 DNS 定糖法^[15]: 分别取纯化的蛋白 *cds1-3* 至 0.5 mL 终浓度为 1% 不同底物中, 反应体系在最适酶反应条件下作用 30 min 后, 加入 2 倍体积 DNS 试剂终止反应, 沸水煮 5 min, 迅速冷却, 在 540 nm 处测 OD 值。所有的实验都做 3 个平行实验。

一个环糊精水解酶的酶活力单位(U)定义为在最适的酶反应条件下每分钟释放 1 μmol 还原糖所需的酶量。

1.6.1 最适 pH 值的测定

分别取纯化的蛋白 *cds1-3* 至 0.5 mL 终浓度为 1% 的 α -环糊精(α -CD)、 β -环糊精(β -CD)、 γ -环糊精(γ -CD)、可溶性淀粉中, 反应体系在 37°C 条件下, 用 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液(pH 值为 3.5~5.5), 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值为 5.5~8.0)测定酶反应的 pH 效应。

1.6.2 最适温度的测定

分别取纯化的蛋白 *cds1-3* 至 0.5 mL 终浓度为 1% 的 α -环糊精(α -CD)、 β -环糊精(β -CD)、 γ -环糊精

(γ -CD)、可溶性淀粉中, 反应体系在最适 pH 值条件下, 温度在 25~65°C 测定酶反应的温度效应。

1.6.3 K_m 和 V_{max} 的测定

将 α -环糊精、可溶性淀粉和支链淀粉 3 种底物分别溶于 pH 值为 5.8 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中, 配制成一系列不同浓度的底物溶液, 分别加入纯化的蛋白质, 50°C 反应 30 min, 用典型的米氏方程求出 *cds1-3* 的 K_m 和 V_{max} 值。

1.7 *cds1-3* 和 ThMA 的底物水解能力比较

以对 α -环糊精的酶活作为参比, 设定为 100%, 比较环糊精水解酶 *cds1-3* 和 ThMA 在最适反应条件下对可溶性淀粉和支链淀粉的水解能力的差异。

1.8 蛋白质的结构分析

使用 M4T server 对环糊精水解酶 *cds1-3* 进行同源建模, 并用 SYBYL 1.2 软件进行蛋白质底物结合分析。

2 结果与分析

2.1 *cds1-3* 基因的序列分析及克隆

测定 pUC-*cds1-3* 质粒里的环糊精水解酶基因, 其开放读码框由 1767 个核苷酸组成, G+C 百分含量为 53.08%, 可编码由 588 个氨基酸组成的蛋白质。该蛋白质的预计分子量为 68177.49 Da, 等电点 pI 为 5.7。

该基因序列经 Blast 软件检索 GenBank 氨基酸数据库发现该基因编码的产物与 *Geobacillus* sp. GHH01 的 hypothetical protein (假定蛋白) 氨基酸序列相似性最高(98% Identities, 80% Positives)。

用 SMART 工具分析该基因编码产物的组件结构, 自 N 端的第 9~128 位氨基酸为 α -淀粉酶 N 功能域, 第 146~504 位氨基酸为 α -淀粉酶功能域(图 1)。



图 1 *cds1-3* 的组件结构

Fig. 1 Modular architecture of *cds1-3*

以质粒 pUC-*cds1-3* 为模板, 用 *cds-1* 和 *cds-2* 引物特异的扩增出一条大约为 1.8 kb 的 DNA 条带, 其大小与预期的 *cds* 基因的编码区相符。

2.2 重组蛋白 *cds1-3* 的诱导表达及纯化

如图 2 所示, 重组蛋白在 65 kDa 处有明显的蛋白质条带, 与由基因序列推测所得理论分子量接近。

2.3 重组蛋白 *cds1-3* 的酶学性质分析

由图 3 可知, *cds1-3* 在 pH 值为 3.5~8.0 时对

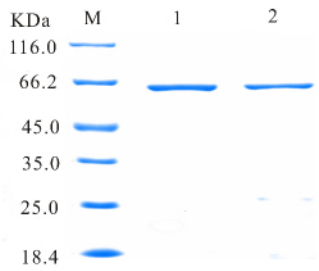


图 2 重组蛋白 cds1-3 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant protein cds1-3

M: 蛋白质分子量标准 1,2: 纯化蛋白 cds1-3

M: Protein molecular weight marker 1,2: Purified protein cds1-3

tein cds1-3

底物都具有活性,超出这个区间则活性完全丧失, cds1-3 对环糊精、可溶性淀粉和支链淀粉 3 个测试底物的最适 pH 值都是 5.5(图 3a);最适作用温度都是 50°C(图 3b)。

在最适温度和最优 pH 值下,分别以 α -环糊精、可溶性淀粉和支链淀粉为底物,测定不同底物浓度下的 cds1-3 酶活,反应结果具有典型的米氏动力学特性,结果见表 1。从米氏动力学特性结果得知,重组蛋白 cds1-3 对 α -环糊精的亲合力是最大的,而对支链淀粉的水解能力则是最大的。

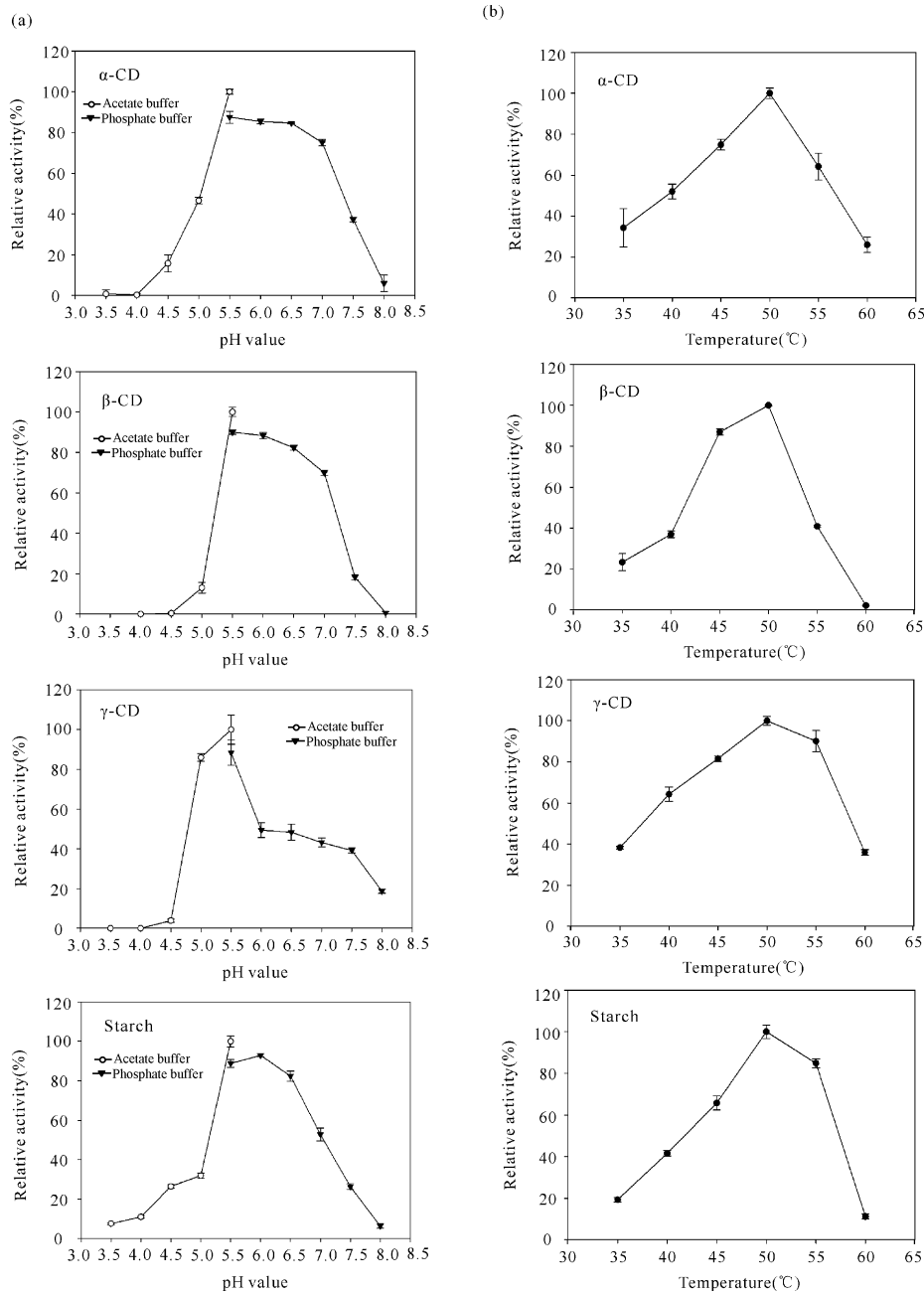


图 3 pH 值和温度对重组蛋白 cds1-3 活性的影响

Fig. 3 Effect of pH value and temperature on recombinant enzyme activity

(a)effect of pH on cds1-3; (b)effect of temperature on cds1-3

表 1 重组蛋白不同底物的酶学特性

Table 1 Enzymatic properties of recombinant protein cds1-3 for different substrates

酶 Enzyme	最适反应条件 The optimum reaction conditions		α-环糊精 α-Cyclodextrin hydrate		可溶性淀粉 Soluble starch		支链淀粉 Amylopectin	
	T (°C)	pH value	K_m (mg/mL)	V_{max} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	K_m (mg/mL)	V_{max} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	K_m (mg/mL)	V_{max} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
cds1-3	50	5.5	1.629	19.45	39.52	20.23	184.9	37.95

2.4 cds1-3 和 ThMA 的底物水解能力比较

由表 2 可知,两个酶对可溶性淀粉的作用方式差异不大,而对支链淀粉的差异非常大,ThMA 对支链淀粉的水解能力只有对 α-环糊精的 0.38%,而 cds1-3 对支链淀粉的水解能力远远高于 α-环糊精,达到 195%。

表 2 环糊精水解酶 cds1-3 和 ThMA 对大分子底物水解能力的差异比较

Table 2 Comparison of activity on huge substrates between cds 1-3 and ThMA

大分子底物 Huge substrate	ThMA(%)	cds1-3(%)
α-环糊精 α-Cyclodextrin hydrate	100	100
可溶性淀粉 Soluble starch	100	104
支链淀粉 Amylopectin	0.38	195

2.5 蛋白质的氨基酸序列和空间结构分析

将来自 cds1-3 的氨基酸序列与已有晶体结构解析的 *Thermus* sp. IM6501 cyclomaltodextrinase (ThMA) 的蛋白质序列进行比对,两个蛋白质氨基酸序列相似度为 94.7%,cds1-3 和 ThMA 蛋白质有 30 个氨基酸的差异(图 4 非标蓝处)。进一步的蛋白质空间结构分析表明,这些差异氨基酸的分布区域远离底物结合区域(图 5),只有 HIS294 氨基酸残基和底物结合区域相近(绿色的环状分子示意了环形的环糊精结合位置)。

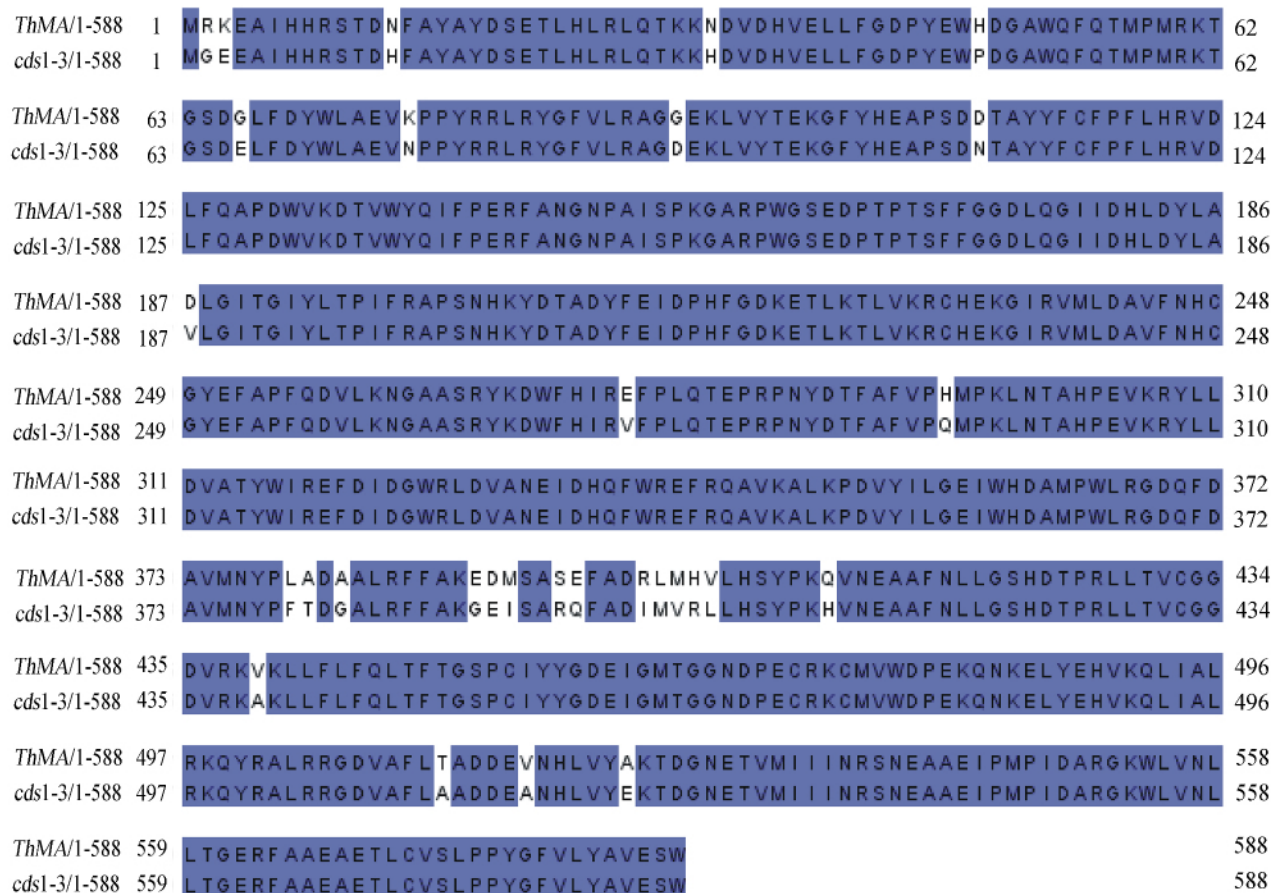


图 4 蛋白质序列比较

Fig. 4 Protein sequences alignment

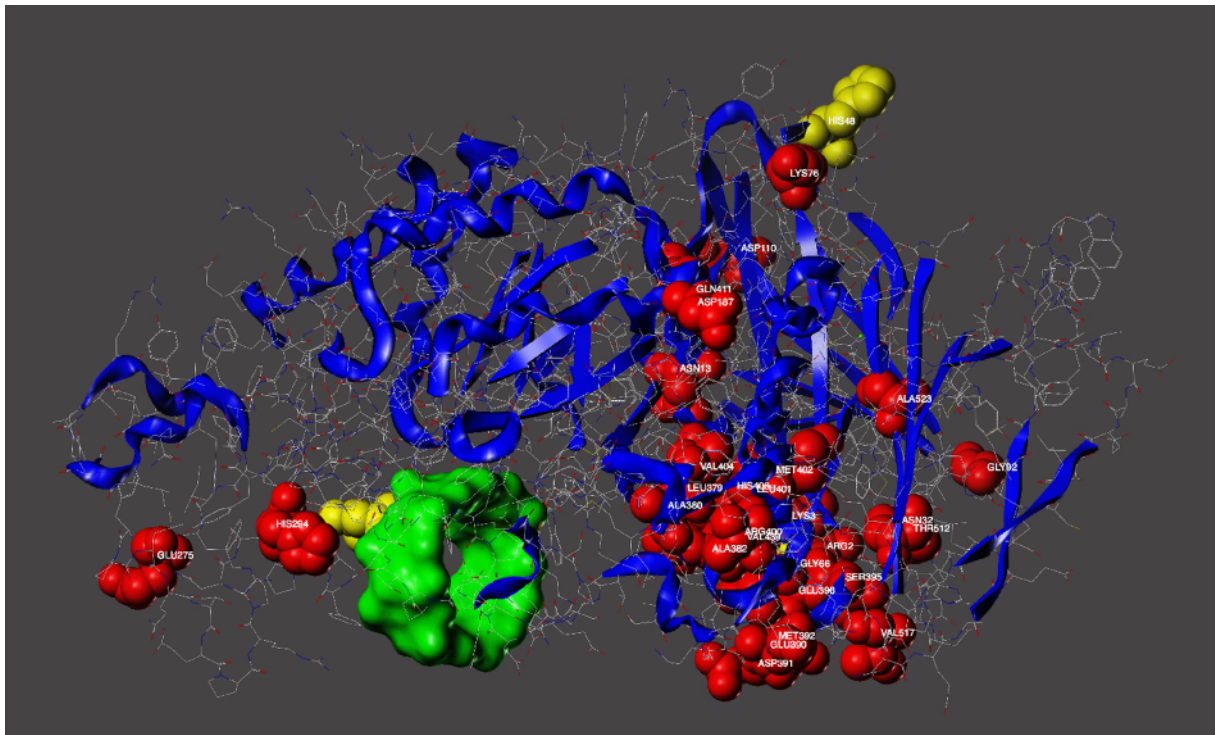


图 5 蛋白质结构模拟分析

Fig. 5 Molecular simulation of protein

3 结论

cds1-3 是一个在偏酸性条件起作用的环糊精水解酶,在蛋白质序列上属于糖基水解酶家族 13,而且和已知的环糊精水解酶 ThMA 的蛋白质序列只有 30 个氨基酸的差异,但是对支链淀粉的水解作用方式却有别于 ThMA,ThMA 等环糊精水解酶对环糊精等环状分子的水解能力最强,对支链淀粉的水解能力最弱^[13];而 cds1-3 对支链淀粉的作用能力很强。对 cds1-3 的蛋白质结构分析表明,cds1-3 和 ThMA 蛋白质的差异主要在蛋白质的中段位置,该位置远离底物结合区域,而与环糊精水解酶的底物通道聚集位置相近^[16]。针对该区域进行有目的分子改造将可以提高环糊精水解酶对支链淀粉的识别能力,进而提高其水解效率,为开拓新的支链淀粉水解酶及其应用提供理论研究基础。环糊精水解酶 cds1-3 的鉴定,以及对其大分子底物水解功能有关的关键氨基酸进行分析,为揭示大分子底物,特别是支链淀粉底物的水解作用方式提供了一个新的切入点。

参考文献:

[1] Bijttebier A, Goesaert H, Delcour J A. Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes; Structural analysis of the residual amylopectin population [J]. Carbohydr Res, 2010, 345(2): 235-242.

[2] van der Maarel M J, van der Veen B, Uitdehaag J C, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family [J]. J Biotechnol, 2002, 94(2): 137-155.

[3] Goesaert H, Bijttebier A, Delcour J A. Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: Level of inner chain attack as an important analytical differentiation criterion [J]. Carbohydr Res, 2010, 345(3): 397-401.

[4] Rajdevi K P, Yogeewaran G. Cooperativity and substrate specificity of an alkaline amylase and neopullulanase complex of *Micrococcus halobius* OR-1 [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2001, 90(3): 233-249.

[5] Ryan S M, Fitzgerald G F, van Sinderen D. Screening for and identification of starch-, amylopectin-, and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(8): 5289-5296.

[6] Jiao Y L, Wang S J, Lv M S, et al. A GH57 family amylopullulanase from deep-sea *Thermococcus siculi*: Expression of the gene and characterization of the recombinant enzyme [J]. Curr Microbiol, 2011, 62(1): 222-228.

[7] Kamasaka H, Sugimoto K, Takata H, et al. *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase selective hydrolysis of amylose to maltose in the presence of amylopectin [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(4): 1658-1664.

[8] Park K H, Kim T J, Cheong T K, et al. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the alpha-amylase family [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1478(2): 165-185.

(下转第 43 页 Continue from page 43)

ence and Technology, 2013, 6: 25-28.

- [10] 阮振华, 许宏贤, 段钢. 甘薯生料酒酒精发酵[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 6-9.
Run Z H, Xu H X, Du G. No-cook process for sweet potato ethanol production [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(9): 6-9.
- [11] 秦艳, 申乃坤, 莫勇生, 等. 黄浆水与木薯粉混合发酵高浓度乙醇的发酵研究[J]. 广西科学, 2012, 19(2): 249-252.
Qin Y, Shen N K, Mo Y S, et al. The techniques for fermenting high-concentration ethanol from mixing yellow serofluid and cassava [J]. Guangxi Sciences, 2012, 19(2): 249-252.
- [12] 许宏贤, 段钢. 温度对超高浓度酒精生料发酵体系的影响[J]. 生物工程学报, 2010, 26(3): 330-334.
Xu H X, Duan G. Effect of temperature on the no cook, very high gravity ethanol fermentation process [J]. China Journal of Biotechnology, 2010, 26(3): 330-334.
- [13] 申乃坤, 王青艳, 黄日波, 等. 响应面法优化耐高温酵母生产高浓度乙醇[J]. 生物工程学报, 2010, 26(1): 42-47.
Shen N K, Wang Q Y, Huang R B, et al. Enhancing ethanol production by using thermophilic yeast by response surface methodology [J]. China Journal of Biotechnology, 2010, 26(1): 42-47.
- [14] Rasmus D, Sven P, Lisbeth O. Characterization of very

high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2005, 68: 622-629.

- [15] Wang L S, Ge X Y, Zhang W G. Improvement of ethanol yield from raw corn flour by *Rhizopus* sp. [J]. World Journal Microbiology Biotechnology, 2007, 23: 461-465.
- [16] Tao F, Miao J Y, Shi G Y, et al. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 183-187.
- [17] Azma M, Mohamed M S, Mohamed R, et al. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology [J]. Biochemical Engineering Journal, 2011, 53: 187-195.
- [18] 申乃坤, 王青艳, 秦艳, 等. 木薯粉与甘蔗汁混合发酵生产高浓度乙醇[J]. 生物工程学报, 2010, 26(9): 1-7.
Shen N K, Wang Q Y, Qin Y, et al. Enhancing ethanol production by using thermophilic yeast by response surface methodology [J]. China Journal of Biotechnology, 2010, 26(9): 1-7.

(责任编辑: 米慧芝)

(上接第 36 页 Continue on page 36)

- [9] Ohtaki A, Iguchi A, Mizuno M, et al. Mutual conversion of substrate specificities of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylases TVA I and TVA II by site-directed mutagenesis [J]. Carbohydr Res, 2003, 338(15): 1553-1558.
- [10] Lee H S, Kim M S, Cho H S, et al. Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other [J]. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21891-21897.
- [11] Choi J H, Lee H, Kim Y W, et al. Characterization of a novel debranching enzyme from *Nostoc punctiforme* possessing a high specificity for long branched chains [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378(2): 224-229.
- [12] Song H N, Jung T Y, Park J T, et al. Structural rationale for the short branched substrate specificity of the glycogen debranching enzyme GlgX [J]. Proteins, 2010, 78(8): 1847-1855.
- [13] Oh S W, Jang M U, Jeong C K, et al. Modulation of hydrolysis and transglycosylation activity of *Thermus maltogenic* amylase by combinatorial saturation muta-

genesis [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(8): 1401-1407.

- [14] 杜丽琴, 庞浩, 胡媛媛, 等. 蔗糖富集环境土壤微生物宏基因组分析及蔗糖水解相关酶基因克隆 [J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3): 403-407.
Du L Q, Pang H, Hu Y Y, et al. Metagenomic analysis of microbes from sucrose-enriched environment and cloning of sucrose hydrolase genes [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2010, 16(3): 403-407.
- [15] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [16] 闭海, 莫莉, 郭媛, 等. 环糊精水解酶底物运输通道的动态结构分析 [J]. 广西科学, 2014, 21(1): 12-16.
Bi H, Mo L, Guo Y, et al. Dynamic structural study on substrate transport channels of cyclodextrin hydrolase [J]. Guangxi Sciences, 2014, 21(1): 12-16.

(责任编辑: 陆雁)