

嗜热 α -淀粉酶热稳定性的决定因素及提高策略

Determinants factors and the strategies of improving thermostability of thermophilic α -amylase

李才明^{1,2,3} 陈双娣² 顾正彪^{1,2,3}

LI Cai-ming^{1,2,3} CHEN Shuang-di² GU Zheng-biao^{1,2,3}

洪雁^{1,2,3} 程力^{1,2,3} 李兆丰^{1,2,3}

HONG Yan^{1,2,3} CHENG Li^{1,2,3} LI Zhao-feng^{1,2,3}

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122;
3. 江南大学食品安全与质量控制协同创新中心, 江苏 无锡 214122)

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. State Key
Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 3. Collaborative
Innovation Center for Food Safety and Quality Control, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要: 阐明了嗜热 α -淀粉酶的微生物来源及性质, 分析了影响嗜热 α -淀粉酶热稳定性的 8 种因素, 提出采用物理法、化学法和生物法提高嗜热 α -淀粉酶热稳定性的策划, 为完善 α -淀粉酶的热稳定化技术提供了参考依据。

关键词: α -淀粉酶; 热稳定性; 决定因素; 提高策略

Abstract: This review clarified the microbial origin and properties of thermophilic α -amylase, and analyzed eight factors affecting their thermostability. The strategies to improve the thermostability of thermophilic α -amylase were proposed, which provided a reference for improving the thermostability technology of thermophilic α -amylase.

Keywords: α -amylase; thermostability; determinants; strategies to improve

酶是一种具有生物催化活性的蛋白质。通常, 在温度高于 50~60 °C 时, 酶蛋白会发生变性而失去相应的活性, 这种在高温下的不稳定性严重影响其应用^[1]。然而, 嗜热酶作为生物催化剂有着许多独到的优势, 包括: ① 稳定性提高, 贮存、运输成本降低; ② 反应效率提高; ③ 对反应的冷却系统

要求低, 利于能耗及成本的降低; ④ 在高的反应温度下, 能减少杂菌污染; ⑤ 在高温下, 反应体系黏度降低, 有利于传质。因此, 嗜热酶的开发已成为当今的研究热点。

嗜热 α -淀粉酶(α -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶, EC 3.2.1.1)是目前工业上最重要的酶制剂之一, 在食品、纺织、医药、造纸等工业中有着十分广泛的应用。作为一种淀粉内切酶, 其作用方式是随机切断淀粉或糖原分子内部的 α -1,4-糖苷键, 使淀粉黏度迅速下降, 生成葡萄糖、麦芽糖、低聚糖和可溶性糊精^[2-3]。因此, 在淀粉的酶转化工业应用中具有潜在的应用价值。一般地, 所有淀粉的酶转化都包括糊化、液化和糖化过程。首先, 通过加热淀粉水溶液可达到糊化的作用, 为了淀粉糊化后能够立即进行液化、糖化反应而避免过长的冷却时间, 就需要在较高温度下稳定性较好的淀粉酶。因此, 具有特殊耐热性的嗜热 α -淀粉酶被广泛地用来满足更高的温度要求, 进而促进整个淀粉加工业的发展。另外, 嗜热 α -淀粉酶作为嗜热酶的典型代表, 在嗜热酶的研究、开发及应用中扮演着重要的角色, 并有助于探索蛋白质达到极端热稳定性的相关机理。本文主要对嗜热 α -淀粉酶热稳定性的决定因素及其热稳定性提高策略进行全面的综述。

1 嗜热 α -淀粉酶的来源

嗜热 α -淀粉酶有多种来源, 包括植物、动物和微生物, 并在这些来源的碳水化合物代谢中扮演重要角色。尽管 α -淀粉酶分布广泛, 但微生物来源的, 尤其是真菌的和细菌的 α -淀粉酶因其成本、效率、一致性、对产品更少的时间/空间上的要求以及方便确定和优化工艺条件而应用于工业生

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(编号: BK20150146); 国家自然科学基金青年基金项目(编号: 31701645); 中国博士后科学基金面上项目(编号: 2015M570406); 江苏省“食品安全与质量控制协同创新中心”产业发展项目

作者简介: 李才明, 男, 江南大学副教授, 博士。

通信作者: 李兆丰(1979—), 男, 江南大学教授, 博士。

E-mail: zfli@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-05-04

产中^[4]。

在细菌中,芽孢杆菌被广泛应用于嗜热 α -淀粉酶的生产以满足工业的需求。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)被认为是嗜热 α -淀粉酶的优良生产者,也广泛应用于生产具有不同商业用途的酶。特别是古菌 α -淀粉酶与芽孢杆菌 α -淀粉酶相比具有极好的嗜热特性,表 1 列出了部分微生物来源的嗜热 α -淀粉酶。

表 1 嗜热 α -淀粉酶的微生物来源及性质

Table 1 Microbial origins and properties of thermophilic α -Amylase

来源	最适温度/℃	参考文献
<i>Aspergillus penicillioides</i>	80	[5]
<i>Bacillus laterosporus</i>	60	[6]
<i>Bacillus licheniformis</i>	100	[7~8]
<i>Bacillus megaterium</i>	93	[9]
<i>Bacillus methylophilus</i>	70	[10]
<i>Bacillus subtilis</i>	70	[11]
<i>Geobacillus sp.</i>	60~70	[12~13]
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	80	[14]
<i>Laceyella sacchari</i>	70	[15]
<i>Pyrococcus sp.</i>	95	[16]
<i>Rhodothermus marinus</i>	61	[17]
<i>Scytalidium thermophilum</i>	60	[18]
<i>Thermococcus sp.</i>	85	[19]

2 嗜热 α -淀粉酶热稳定性的决定因素

酶的热稳定性涉及到在高温条件下多肽链的化学特性和空间立体结构的变化,嗜热 α -淀粉酶可作为分析热稳定性的模型。有关嗜热 α -淀粉酶稳定性的研究不仅有助于对蛋白质稳定性机制的理解,还可以帮助开发适于工业生产中的耐热更稳定的酶。

通过同源序列比对,结合定点突变技术分析结构和稳定性方面的关系,揭示了一些导致嗜热 α -淀粉酶热稳定性高的因素,但并未得到单一的、普遍的机制,而是众多因素综合作用的结果。同时,热稳定性的分子机制随酶的不同也存在差异。然而,一些共有的特征都被认为是嗜热 α -淀粉酶热稳定的影响因素,主要包括:① 氨基酸的组成与分布,如嗜热 α -淀粉酶中的疏水性氨基酸通常高于中温蛋白酶,这些疏水性氨基酸能增加蛋白质的刚性和疏水性,从而提高嗜热 α -淀粉酶的耐热性^[20]。② 带电荷氨基酸与不带电荷氨基酸的比率,如相对于 Ala、Val、Ser、Thr、Asn,嗜热 α -淀粉酶中的 Tyr、Asp、Glu、Lys、Arg 含量偏高。③ 严格和紧凑的空间结构。空间结构紧凑,堆积密度增加,导致在一定温度下,嗜热 α -淀粉酶较同源嗜温蛋白酶有更低的热运动水平和更小的弹性。④ α -螺旋的稳定性^{[21]15-19}。嗜热 α -淀粉酶的 α -螺旋中一般缺少 β -分枝残基(Val、Ile、Thr),避免了 α -螺旋中的

蛋白质伸展到更广的区域,可能使嗜热蛋白质具有更强的刚性,从而较其嗜温同源体有更好的抗热能力^[20]。⑤ 氢键数目^[22-23]。较多的氢键数目,有利于氢键网络的加强,因而嗜热 α -淀粉酶表现出更好的耐热性。⑥ 更多的作用力,如离子相互作用、疏水相互作用、二硫键的数量、芳香基团的相互作用^{[21]20-41}。⑦ 金属离子结合位点的存在^[24]。来源于 *B. stearothermophilus* 的 Ca^{2+} - Na^{+} - Ca^{2+} 结合位点对其热稳定性有着重要作用^[25]。⑧ 去折叠熵值等。影响 α -淀粉酶热稳定性的主要因素还包括一些金属离子的存在与否、底物和其他稳定剂的情况等^[26]。

来源于 *B. licheniformis* 的嗜热 α -淀粉酶(BLA),是一个分子量约 58 kDa 的单体,存在一中心部位—— α/β 桶。作为其嗜温同源体,来源于 *B. amyloliquefaciens* 的 α -淀粉酶(BAA),有着与 BLA 近似的分子量。Khajeh 等^[27]对 BLA 和 BAA 进行了序列比对,发现二者存在很高的同源性,达 88%。SWISS-MODEL 结构模拟结果进一步表明,BAA 的 3D 结构与 BLA 极为类似,这 2 种 α -淀粉酶的二级结构组成成分也非常相似。通过 GETAREA 程序计算可获得表面和水解作用,比较结果发现,嗜热 BLA 的结构较嗜温 BAA 更灵活。特别地,结构域 B 的许多突变在一定程度上能够影响 BLA 的热稳定性,从而使其适应不同温度下的反应。

3 α -淀粉酶热稳定性的提高策略

α -淀粉酶热稳定性包括热力学稳定性和动力学稳定性。热力学稳定性是由酶的稳定态自由能(ΔG_{stab})和变性温度(T_m ,50%蛋白质去折叠时的温度)决定的。动力学稳定性通过在特定温度下酶的半衰期($t_{1/2}$)来描述^[28]。

嗜热 α -淀粉酶与普通嗜温酶相比,它们的碱基序列、酶的三级结构及催化机制相似度很高,但上述因素的微小差异导致了嗜热 α -淀粉酶较普通淀粉酶有更好热稳定性。这种差异的存在,为 α -淀粉酶热稳定性的提高奠定了基础。目前, α -淀粉酶的热稳定化技术按照原理可分为 3 种:物理法、化学法和生物法。

3.1 物理法

α -淀粉酶可以通过添加稳定剂来达到增强热稳定性的效果。酶体系中添加稳定剂后,其体系黏度会有所增加,体积排阻效应得到了提高,静电相互作用也会增强,这有利于改善酶所处的微环境,稳定酶的空间结构构象,最终酶的热稳定性往往也因此而提高。常用的稳定剂主要包括糖与多羟基化合物和盐 2 类。

糖与多羟基化合物,常用的有以下几种:淀粉、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇、纤维素、曲拉通等。在酶体系中加入此类物质,酶分子会因其周边渗透质的排斥而优先被水化,从而酶分子的稳定性得到增强。不同的稳定剂往往对酶有着不同的稳定效果。作者^[29]通过将 15% PEG1000 添加到来源于 *B. circulans* 的 α -淀粉酶中,发现能将 60℃的半衰期延长 6.5 倍。Yoon 等^[30]系统地研究了不同多羟基化合物(如曲拉通 X-100、聚乙二醇和聚乙烯醇)对猪胰腺 α -淀粉酶(PPA)、人类唾液 α -淀粉酶淀粉酶(HAS)、米曲霉 α -淀粉酶

淀粉酶(AOA)、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶(BAA)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶(BLA)这几种 α -淀粉酶热稳定性的影响,结果发现添加物及其添加量不同时,对不同酶的热稳定性影响结果也存在一定的差异。

盐类物质不同于糖或多羟基化合物,其对 α -淀粉酶的稳定原理是:盐的添加引起盐与酶分子非特异性结合现象的发生,减缓酶的变性,从而利于酶热稳定性的提高。其中有些盐类物质可作为酶的辅助因子在维持 α -淀粉酶的构象以及保持 α -淀粉酶的活性方面扮演着重要角色,例如有些金属离子结合位点(比如 Ca^{2+} 、 Na^{+} 等)。因此,对于那些结构中存在金属离子结合位点的 α -淀粉酶,往酶体系中加入相应的盐(比如 CaCl_2 、 NaCl 等),能对酶起到激活作用或增强其热稳定性。Yadav 等^[28]通过添加 10 mmol/L Ca^{2+} 能将变性温度 T_m 从 48 $^{\circ}\text{C}$ 提高至 71 $^{\circ}\text{C}$,大大增加了 α -淀粉酶的热稳定性。Maalej 等^[31]发现来源于 *Pseudomonas stutzeri* 的 α -淀粉酶在 50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h 后的残余活力只有约 20%,而加入 2 mmol/L Ca^{2+} 时,残余活力能保留 80%,说明 Ca^{2+} 对酶的稳定性的改善效果。

3.2 化学法

化学法主要利用的是化学试剂对酶的修饰作用。 α -淀粉酶可以通过加入一定的试剂对酶的特定基团修饰改造来改变 α -淀粉酶分子内的作用力,进而改变其结构、功能。化学修饰是 α -淀粉酶稳定的一个重要策略,在药物蛋白的修饰中扮演着重要角色,可以有效降低蛋白免疫特性,提高其抗蛋白酶的水解能力,增强热稳定性,从而可以达到延长半衰期的目的。Ismaya 等^[32]发现利用非极性的酸酐修饰 α -淀粉酶能将其稳定性提高 18 倍。化学修饰对酶热稳定性的影响往往有两方面,没有普遍的适用标准,需根据酶的特点来选择合适的试剂和修饰方法。另外,化学修饰会伴随酶损失,不同批次容易存在差异性^[33]。除此之外,化学修饰中所用试剂的安全性问题是在酶的改性方面所面临的最大考验之一。

另外,酶的固定化也是一种提高 α -淀粉酶热稳定性的有效策略,就是利用物理或/和化学方法将酶束缚或限制在某一区域,仍能保留酶特有的催化特征,并且能回收重复利用的一种技术^[34]。王华等^[35]以壳聚糖为载体,戊二醛交联共价固定 α -淀粉酶后,其酸碱稳定性和热稳定性均优于游离酶。Defaei 等^[36]通过离子相互作用将 α -淀粉酶固定在磁性纳米粒子上,最适温度从 45 $^{\circ}\text{C}$ 升至 55 $^{\circ}\text{C}$,稳定性得到很大提高,能重复使用 10 次以上。但由于其工艺技术比较复杂,成本偏高而难以得到广泛应用。

3.3 生物法

蛋白质工程是常见的一种生物手段, α -淀粉酶可以通过该方法来改变其氨基酸序列,从而改变结构或者构象,达到稳定性提高的效果。最初,蛋白质工程主要应用于 α -淀粉酶基因在菌株中的克隆表达^[12],最常规的做法是在合适的宿主细胞中克隆和表达出具有良好热稳定性的 α -淀粉酶基因。如魏涛等^[37]通过将来源于 *Solfolobus tokodaii* Strain 7 的高温 α -淀粉酶基因 ST0817 在大肠杆菌中克隆表达,获得具有

较强热稳定性和 pH 稳定性的 α -淀粉酶。除了克隆表达外, α -淀粉酶还采用分子生物学手段进行热稳定性的研究。 α -淀粉酶除了存在易筛选、负突变株的可用性等优点外,对 α -淀粉酶基因也有了深刻透彻的了解,加上其在微生物像枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)中发酵的成熟性,成为蛋白质中第一个采用分子生物学手段的研究对象。随着生物技术的不断发展,蛋白质工程已经成为研究的热点之一,一方面被用来研究以增强蛋白质如商品酶制剂的热稳定性,另外一方面也用于研究蛋白结构和功能之间的构效关系。蛋白质工程的技术策略主要有理性化设计和定向进化 2 种。

理性化设计作为 α -淀粉酶分子改造最常用的一种方法,有着良好的前景,对于任何形式的蛋白质工程都具有潜在的研究价值^[20]。一般通过以下 2 种方式进行:① 引入突变;② 通过非共价连接或形成二硫键将蛋白质表面的环进行固定。可以在蛋白质表面局部增加离子来连接非相邻部位,并且不会导致像包埋残基那样产生排斥的范德华力或者造成 α -淀粉酶构象不稳定而具有巨大的应用潜力。该技术需以相关 α -淀粉酶蛋白分子三维结构为前提,探索 α -淀粉酶蛋白结构与功能之间存在的关联性,接着进一步得到 α -淀粉酶蛋白分子中与功能相关的氨基酸,最后采用分子生物学手段(如定点或盒式突变)以实现定向改造酶蛋白的理化特性。曾静等^[38]通过分析来源于极端嗜热古生菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 的 α -淀粉酶 ApkA 的氨基酸序列,构建单突变体 ApkAdsA180K,与 D212 间形成离子键,于 90 $^{\circ}\text{C}$ 下的半衰期较 ApkAds 延长了 2 h。Li 等^[39]通过多重序列比对将来源于 *B. licheniformis* α -淀粉酶的位于 B 域长环内 187、188 位点及附近的 269 位点进行突变,构建了突变体 A269K/S187D/N188T,将其在 95 $^{\circ}\text{C}$ 的半衰期提高了 9 倍,催化效率也提高了 1.84 倍。但理性化设计需以酶蛋白分子的三维结构为基础,这要求直接测定其晶体结构或者采用生物分析软件进行结构模拟,一定程度上会增加该技术的难度,使过程也变得更加复杂和繁琐化。

定向进化又称非理性化设计,该技术的出现推动了蛋白质工程进入新的阶段。定向进化是指将自然演变的过程在试管中呈现,通过突变、重组使蛋白质的性质往最佳状态进化,以得到具有目标性质的变种体。相比于理性化设计,定向进化的区别在于通过人为模拟自然进化机制进行突变,最大特点在于该过程不需事先了解酶的空间结构和催化机制,可采用随机突变技术,并与快速高通量筛选方法相结合实现酶基因的体外改造。因此,定向进化是一种比定点突变更强大、更有潜力的工程方法。目前,2 种定向进化的方法已被开发:① 随机突变方法又称为 DNA 重组,是将含 DNA 的酶基因片段通过 PCR 技术导入到原基因中进行重新组装以得到完整的基因;② 易错 PCR 技术和 DNA 重组技术的结合,是在每一次易错 PCR 循环中筛选出所需要的特性基因,然后通过 DNA 重组技术获得最好的变体特征。Mabrouk 等^[23]通过易错 PCR 得到热稳定性更好的突变体 MA-A27,将 50 $^{\circ}\text{C}$ 的半衰期从 30 min 提升至 70 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 的半衰期从 13 min 提升至 25 min。除了提高酶的热稳定性外,该方法也

被广泛用于酶的其他特性改造,如改善酶的底物特异性、提高酶在溶剂中的活性或者提高嗜热酶在酸性条件下的温度等^[40-41]。但是定向进化技术还存在以下问题:随机性强,工作量大,费时,成功率低等。

不同行业对不同生理生化特性的 α -淀粉酶的需求促进了该酶的研究与发展。酶/蛋白质工程包括将所需的特性整合在适当的基因上,是实现这一目标的很有前途的技术手段。

4 展望

嗜热 α -淀粉酶不仅在蛋白质热力学稳定性的基本原理方面,而且在稳定性和催化效率之间的关系方面都激发着人们浓厚的研究兴趣。尽管 α -淀粉酶热稳定性的提高已有多重策略,但不可逆变性的过程尚且未知,细菌 α -淀粉酶稳定性方面也还存在许多问题。随着高稳定性芽孢杆菌 α -淀粉酶的开发,未来 α -淀粉酶工程很有可能由稳定性向pH活性以及底物特异性方向转变。由于对 α -淀粉酶领域持续不断的深入研究,这些理论和方法也将得到迅速发展,同时更好地应用于构建有着独特性质的 α -淀粉酶,如通过修饰酶的遗传特性或定点突变技术来获得更多能满足需要的嗜热 α -淀粉酶,同时将不同的酶热稳定性的提高策略进行有机的整合也将体现出其特有的优势,能够达到更理想的稳定效果,也有助于对机理的深入研究。

参考文献

- [1] 岳寿松, 边斐, 代运章, 等. 产蛋白酶和淀粉酶芽孢杆菌 SDYB-1 的分子鉴定及酶学性能研究[J]. 山东农业科学, 2015, 47(11): 54-59.
- [2] TAWIL G, VIKS-NIELSEN A, ROLLAND-SABAT A, et al. Hydrolysis of concentrated raw starch: A new very efficient α -amylase from *Anoxybacillus flavothermus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 46-52.
- [3] AHMADI-ABHARI S, WOORTMAN A J J, OUDHUIS A A C M, et al. The influence of amylose-LPC complex formation on the susceptibility of wheat starch to amylase[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(2): 436-440.
- [4] SUNDARRAM A. α -amylase production and applications: A review[J]. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2014, 2(4): 166-175.
- [5] ALI I, AKBAR A, ANWAR M, et al. Purification and characterization of a polyextremophilic α -amylase from an obligate halophilic *Aspergillus penicillioides* isolate and its potential for souse with detergents[J]. Biomed Research International, 2015, DOI: 10.1155/2015/245649.
- [6] KUMAR N M, KARTHIKEYAN S, JAYARAMAN G. Thermostable α -amylase enzyme production from *Bacillus latorosporus*: Statistical optimization, purification and characterization[J]. Biocatalysis & Agricultural Biotechnology, 2013, 2(1): 38-44.
- [7] SIDDIQUE F, HUSSAIN I, MAHMOOD M S, et al. Isolation and characterization of a highly thermostable α -amylase enzyme produced by *Bacillus licheniformis*[J]. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 2014, 51(2): 309-314.
- [8] WU Xiang-rong, WANG Yu-xia, TONG Ben-ding, et al. Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable α -amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 109: 329-337.
- [9] JANA M, MAITY C, SAMANTA S, et al. Salt-independent thermophilic α -amylase from *Bacillus megaterium* VUMB109: An efficacy testing for preparation of maltooligosaccharides[J]. Industrial Crops & Products, 2013, 41(1): 386-391.
- [10] XIE Fu-hong, QUAN Shu-jing, LIU De-hai, et al. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(1): 47-53.
- [11] EMTENANI S, ASOODEH A, EMTENANI S. Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant α -amylase from *Bacillus subtilis* DR8806 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 290-298.
- [12] LIN Yun, LIN Juan, WANG Guo-zeng, et al. Cloning, expression and characterization of the thermostable α -amylase gene from *Geobacillus sp.* WQJ-1 isolated from hot springs[J]. Journal of Fuzhou University, 2018, 46(1): 143-150.
- [13] JIANG Tao, CAI Meng-hao, HUANG Meng-meng, et al. Characterization of a thermostable raw-starch hydrolyzing α -amylase from deep-sea thermophile *Geobacillus sp.*[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 114: 15-22.
- [14] MEHTA D, SATYANARAYANA T. Biochemical and molecular characterization of recombinant acidic and thermostable raw-starch hydrolysing α -amylase from an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 85-86: 229-238.
- [15] SHUKLA R J, SINGH S P. Characteristics and thermodynamics of α -amylase from thermophilic actinobacterium, *Laceyella sacchari* TSI-2[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(12): 2128-2136.
- [16] JUNG J-H, SEO D-H, HOLDEN J F, et al. Maltose-forming α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus sp.* ST04[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(5): 2121-2131.
- [17] GOMES I, GOMES J, STEINER W. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: Production and partial characterization[J]. Bioresource Technology, 2003, 90(2): 207-214.
- [18] AQUINO A, JORGE J A, TERENCE H F, et al. Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(4): 323-328.
- [19] JEON E-J, JUNG J-H, SEO D-H, et al. Bioinformatic and biochemical analysis of a novel maltose-forming α -amylase of the GH57 family in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sp.* CL1 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 60: 9-15.

- [20] DENG Zhuang-mei, YANG Hai-quan, LI Jiang-hua, et al. Structure-based engineering of alkaline α -amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylolytica* for improved thermostability[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(9): 3 997-4 007.
- [21] 邓壮梅. 分子改造提高碱性淀粉酶热稳定性[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [22] DING Yan-rui, CAI Yu-jie, XU Wen-bo. The study on the relationship between hydrogen bond and protein thermostability[J]. Computers & Applied Chemistry, 2007, 24(5): 641-644.
- [23] BEN M S, AYADI D Z, BEN H H, et al. Thermostability improvement of maltogenic amylase MAUS149 by error prone PCR[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168(4): 601-606.
- [24] 曾静, 郭建军, 顾斌涛, 等. Ca^{2+} 结合位点对极端嗜热 α -淀粉酶 ApkA 高温活性及热稳定性的影响[J]. 现代食品科技, 2016(8): 90-95.
- [25] LI Zhu, DUAN Xu-guo, WU Jing. Improving the thermostability and enhancing the Ca^{2+} binding of the maltohexaose-forming α -amylase from *Bacillus stearothermophilus* [J]. Journal of Biotechnology, 2016, 222: 65-72.
- [26] HARADA K. Crystal structure of α -amylase from: Molecular insights into enzyme activity and thermostability [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78(6): 989-997.
- [27] KHAJEH K, SHOKRI M M, ASGHARI S M, et al. Acidic and proteolytic digestion of α -amylases from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*: Stability and flexibility analysis[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2006, 38(3): 422-428.
- [28] YADAV J K. A differential behavior of α -amylase, in terms of catalytic activity and thermal stability, in response to higher concentration CaCl_2 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(1): 146-152.
- [29] LI C, LI W, HOLLER T P, et al. Polyethylene glycols enhance the thermostability of β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* [J]. Food Chemistry, 2014, 164: 17-22.
- [30] YOON S H, ROBYT J F. Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(5): 556-562.
- [31] MAALEJ H, HMIDET N, GHORBEL-BELLAAJ O, et al. Purification and biochemical characterization of a detergent stable α -amylase from *Pseudomonas stutzeri* AS22[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013, 18(5): 878-887.
- [32] ISMAYA W T, HASAN K, KARDI I, et al. Chemical modification of *Saccharomycopsis fibuligera* R64 α -amylase to improve its stability against thermal, chelator, and proteolytic inactivation [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(1): 44-57.
- [33] 冯旭东, 吕波, 李春. 酶分子稳定性改造研究进展[J]. 化工学报, 2016, 67(1): 277-284.
- [34] 郑璐. 海藻酸钠固定化 α -淀粉酶的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 2-4.
- [35] 王华, 王莹, 詹长娟, 等. 壳聚糖小球共价固定化 α -淀粉酶的研究[J]. 食品工业, 2015, 36(2): 129-132.
- [36] DEFAEI M, TAHERI-KAFRANI A, MIROLIAEI M, et al. Improvement of stability and reusability of α -amylase immobilized on naringin functionalized magnetic nanoparticles: A robust nanobiocatalyst[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113(1): 354-360.
- [37] 魏涛, 孙浩, 申玉龙, 等. *Sulfolobus tokodaii* strain 7 高温酸性 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中克隆表达及其酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 13-17.
- [38] 曾静, 郭建军, 袁林. 定点突变提高极端嗜热 α -淀粉酶 ApkA 的高温活性和热稳定性[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 20-26.
- [39] LI Zhu, DUAN Xu-guo, CHEN Sheng, et al. Improving the reversibility of thermal denaturation and catalytic efficiency of *Bacillus licheniformis* α -amylase through stabilizing a long loop in domain B[J]. Plos One, 2017, 12(3): e0 173 187.
- [40] ZHU Wei-hua, CAO Yi, LI Wei, et al. The error-prone pcr of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* toward enhanced acid tolerance and higher specific activity[J]. Journal of Pure & Applied Microbiology, 2013, 7(3): 1 489-1 496.
- [41] XU Yan-jing, LIU Yi-han, FAN Shuai, et al. Enhancement of acid stability of alpha amylase from *Bacillus licheniformis* by error-prone PCR[J]. Advanced Materials Research, 2013, 774-776: 664-669.

中国油脂 (月刊)

国内邮发代号 52-129 国外发行代号 M5889

追踪学科发展动态 报道行业最新成果 关注油脂发展热点 共谋行业创新未来

<< 全国中文核心期刊 << 中国科技核心期刊
<< 中国科学引文数据库核心库期刊 << 中国核心学术期刊
<< 中国精品科技期刊 << 中国期刊方阵双效期刊
<< 第二届国家期刊奖百种重点期刊 << 第三届国家期刊奖百种重点期刊



<< 美国《化学文摘》(CA) 收录期刊
<< 俄罗斯《文摘杂志》(AJ) 收录期刊
<< 美国《剑桥科学文摘》(CSA) 收录期刊
<< 日本《科学技术文献速报》(CBST) 收录期刊
<< 英国《农业与生物科学研究中心文摘》(CABA) 收录期刊

主要栏目

专题论述/油脂加工/油脂化学/油脂深加工/油料资源/油脂营养/油脂安全/综合利用/检测分析/应用技术/生物工程等。

欢迎关注官方微信和微博



微信订阅号 新浪微博

各地邮局均可订阅, 我社常年办理邮购及逾期补订

大16开本 每本20元 全年240元

■ 银行转账: 开户单位: 西安中粮工程研究设计院有限公司

账号: 3700021709088100275 开户行: 工行西安市西关支行

地址: 陕西省西安市劳动路118号
电话: 029-88653157/88621360
E-mail: zyzzoil@163.com

邮编: 710082
传真: 029-88625310
网址: www.chinaoils.cn