

文章编号: 1673-1689(2011)01-0131-07

Bacillus sp. CBB272 脱枝酶的酶学性质

李由然, 赵献春, 王正祥, 石贵阳*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 脱枝酶是淀粉加工过程中水解其 1,6-糖苷键的水解酶, 为淀粉彻底糖化所必需。作者从高温菌 *Bacillus* sp. CBB272 的培养液中, 经过盐析、凝胶过滤层析、弱阴离子交换层析以及强阴离子交换层析联用的方法, 纯化出一种新型脱枝酶。该酶在 SDS-PAGE 上的相对分子质量约为 70 000, 最适作用温度为 70 °C, 最适作用 pH 为 6.0。该酶在 30~70 °C、pH 4.5~9.0 之间具有优良的稳定性。该酶在 50 °C 和 pH 6.0 下水解支链淀粉的 K_m 、 V_{max} 分别为 4.0324 mg/mL 和 0.1841 mg/(min·mL)。研究了不同金属离子对该酶活性和热稳定性的影响, 发现 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等金属离子对于该酶具有显著的激活效果, 并且 Ca^{2+} 对该酶的热稳定性具有很好的提升作用。

关键词: 脱枝酶; 纯化; 酶学性质

中图分类号: Q 819

文献标识码: A

Biochemical Properties of Debranching Enzyme from *Bacillus* sp. CBB272

LI You-ran, ZHAO Xian-chun, WANG Zheng-xiang, SHI Gui-yang*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Debranching enzymes are essential for starch saccharification processes with their activity for cleavage of 1,6-glucoside linkage in starch molecules. In this study, a novel debranching enzyme from the thermophilic *Bacillus* sp. CBB272 was purified using the combination of ammonium sulfate precipitation, weak ion-exchange and strong ion-exchange. The purified enzyme possessed the relative molecular weight of 70 kD on SDS-PAGE. The enzyme exhibited the maximal activity at 70 °C and pH 6.0 with excellent stabilities at a temperature range from 30 °C to 70 °C and pHs from 4.5 to 9.0. At pH 6.0 and 50 °C its K_m and V_{max} for amylopectin were 4.0324 mg/mL and 0.1841 mg/(min·mL), respectively. The enzyme was strongly activated by Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} and Ca^{2+} significantly increased its thermostability.

Key words: debranching enzyme, purification, biochemical properties

不同植物合成的淀粉中直链淀粉(amylose)和支链淀粉(amylopectin)的比例不同。工业上使用

的谷物淀粉中, 支链淀粉质量分数约占 75%。 α -1,6-糖苷键在支链淀粉中每 20~25 个葡萄糖残基就

收稿日期: 2009-11-18

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA020204); 国家自然科学基金国际合作项目(2008GR0918)。

* 通信作者: 石贵阳(1963-), 男, 浙江绍兴人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程研究。

Email: gyshi@jiangnan.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

出现一个,因此支链淀粉中含有大量的 α -1,6-糖苷键^[1]。提高支链淀粉的利用率在许多产业中能够带来巨大的经济价值^[2]。能够水解淀粉中 α -1,6-糖苷键的酶统称为脱枝酶,包括 α -1,6-糖苷酶、普鲁兰酶、糖原水解酶、异淀粉酶等^[3]。在淀粉加工中,脱枝酶常常与其他淀粉酶如 α -淀粉酶、糖化酶等协同使用,使淀粉糖化完全。因此,脱枝酶广泛应用于发酵工业,可显著提高原料的利用率,降低粮耗,提高产品质量及开发新的产品^[4]。尤其在需求日益增长的酒精工业中,原料占总生产成本的70%,提高原料的利用率可直接降低燃料酒精的生产成本^[5]。

国际上对于脱枝酶的研究起步相对较晚^[6]。在过去的十几年中,人们从为数不多的微生物中鉴定并纯化了脱枝酶,这些微生物主要有 *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus deramificans*, *Bacillus naganoensis*, *Desulfurococcus mucosus*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas amyloclavus*, *Bacillus amyloclavus* 及 *Flavobacterium odoratum* 等。其中的 *B. acidocaldarius*, *B. deramificans* 脱枝酶已通过基因重组菌实现工业化生产。我国所使用的脱枝酶几乎全部来自外国公司。因此,找寻新的脱枝酶,降低其生产成本并寻找一条国产化生产途径,对我国淀粉水解酶制剂及其淀粉为原料的工业体系健康发展具有重要意义。为此,作者报道了一种来源于高温菌 *Bacillus* sp. CBB272 脱枝酶的酶学性质,研究结果显示此酶为一种全新的脱枝酶。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种: *Bacillus* sp. CBB272: 购自江南大学中国高校工业微生物资源与信息中心。

种子培养基(质量分数): 支链淀粉(0.2%), KH_2PO_4 (0.015%), Na_2HPO_4 (0.01%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05%), NaCl (0.1%), 蛋白胨(0.5%), pH 7.0。

发酵培养基(质量分数): 将种子培养基中的支链淀粉(0.2%) 换为糯米淀粉(1%), pH 7.0。

主要试剂: 牛血清蛋白(BSA); 糖原(Sigma); 支链淀粉(Sigma); N, N'-亚甲基双丙烯酰胺(Sigma); 其余试剂均为市售国产试剂。

1.2 粗酶液的制备

将 *Bacillus* sp. CBB272 接种于 250 mL 三角瓶(装液量 50 mL), 37 °C 200 r/min 培养 12 h; 再将

此培养液以 10% 的接种量接于 500 mL 三角瓶(装液量 150 mL), 37 °C 200 r/min 培养 12 h。再以 10% 接种量接种 15 L 机械搅拌全自动型发酵罐(工作体积为 9 L), 搅拌转速 200 r/min, 通气量 3 L/min, 温度 37 °C, 共发酵 36 h。收集发酵液(约 9 L), 经 8 000 r/min 离心 15 min 除菌, 再用 10 000 超滤膜超滤浓缩, 制备成 1 L 浓缩酶液, 用于后续脱枝酶分离纯化。

1.3 酶的分离和纯化

用 30% 饱和度的硫酸铵沉淀浓缩发酵液, 上清再用 80% 饱和度的硫酸铵沉淀其中的脱枝酶。将盐析沉淀复溶的酶液过 0.45 μm 微滤膜除杂质, 上样 2 mL 至 Sephacryl S-100 色谱柱进行层析分离, 收集活性组分。色谱条件: Sephacryl S-100 色谱柱, D 1.6 cm $\times$ 80 cm; 缓冲液, 0.15 mol/L NaCl -20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.2; 流量, 0.5 mL/min。将凝胶过滤层析收集的活性组分透析除盐, 用聚乙二醇浓缩, 取 2 mL 上 DEAE FF 层析柱, 进行离子交换层析, 收集活性组分。色谱条件: DEAE FF 色谱柱, D 1.6 cm $\times$ 20 cm; 缓冲液, 0~1 mol/L NaCl +20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.2 线性梯度洗脱; 流量, 2 mL/min。将 DEAE 离子交换层析收集的活性组分透析脱盐, 用聚乙二醇浓缩, 取 2 mL 上 Mono D 4.6 cm $\times$ 100 cm PE 层析柱, 进行离子交换层析, 收集活性组分。色谱条件: Mono D 4.6 cm $\times$ 100 cm PE 色谱柱, D 0.46 cm $\times$ 10 cm; 缓冲液, 0~1 mol/L NaCl +20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.2 线性梯度洗脱; 流量, 1 mL/min。

1.4 脱枝酶酶活的测定

在 25 mL 的比色管中加入 250 μL 上清酶液和 250 μL 质量分数 1% 支链淀粉溶液, 在 45 °C 的水浴中反应 1 h, 取出 100 μL 反应液, 加入 5 mL 0.01 mol/L 的稀碘液后迅速测定 $A_{620\text{nm}}$, 以未反应的酶液和底物混合物做为空白^[7]。酶活定义: 在 45 °C 条件下作用 30 min, 每分钟生成直链淀粉造成 620 nm 下吸光值增加 0.01 的酶活定义为一个酶活单位。蛋白质含量测定采用 Bradford 染料结合法^[8], 用牛血清蛋白作标准。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE 方法依照 Laemmli^[9] 完成。

1.6 脱枝酶酶学性质分析

1.6.1 温度 为了确定酶的最适反应温度, 将酶与底物在 pH 6.0 及不同温度即 30~80 °C 条件下, 反应 1 h 后分别测定酶活力。在酶活相对稳定的

pH 6.0 下,使酶在不同温度下保温 1 h,按上述方法测定酶活力,以未保温(4℃保存)的酶活力为 100%,确定酶的温度稳定性。

1.6.2 pH 值 用不同 pH 值的乙酸钠缓冲液及 Tris-HCl 缓冲液配置底物,将酶与底物反应 1 h 分别测定酶活力。将酶在不同的 pH 值下保温 1 h,分别测定残留酶活,与未保温的酶活力相比,计算百分比,确定酶的 pH 稳定性。

1.6.3 离子 在相同体系中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的金属离子,包括一价离子 K^+ 和 Na^+ ,二价离子 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} ,三价离子 Fe^{3+} 以及 EDTA 和柠檬酸盐测定酶活力。以未加离子条件下测定的酶活力为 100%,其余酶活力与之相比,确定离子对酶活力的影响。

将酶在不同的离子环境下保温 1 h,分别测定残留酶活,与未保温的酶活力相比,计算百分比,确定金属离子对酶热稳定性的影响。

1.6.4 酶动力学常数的测定 以支链淀粉为底物,取用 50 mmol/L pH 6.0 的 HAc-NaAc 缓冲液配制的质量浓度分别为 2、3、4、5、6、8、10 mg/mL 的底物溶液 250 μ L,加入 250 μ L 酶液,于 50℃反应后用 DNS 法测定酶解产物中还原糖的量,从而得到不同底物浓度时的初速度值。采用 Lineweaver-Burk^[10] 双倒数作图法,得出该酶在上述底物时的 K_m 和 V_{max} 值。

以 Amylopectin 为底物,分别以 3 种不同浓度的 Fe^{3+} 对淀粉脱枝酶的抑制实验。实验方法同上。

2 结果与讨论

2.1 *Bacillus* sp. 生产淀粉脱枝酶生产菌株的发酵过程

Bacillus sp. CBB272 在 15 L 发酵罐中的产酶进程见图 1。菌体生长 10 h 后进入稳定期,酶活迅速提高,表明该菌株发酵产淀粉脱枝酶是在细胞生长进入稳定期之后才开始的。发酵至 22 h,菌体的生长呈停滞态势,而此时的酶活也逐步稳定在一定的水平。

2.2 淀粉脱枝酶的分离纯化

Bacillus sp. CBB272 发酵液经硫酸铵沉淀、HiPrep 16/10 Sephacryl S-100 凝胶过滤层析、HiPrep 16/10 DEAE FF 弱阴离子交换层析、Mono Q 强阴离子交换层析等纯化步骤后,脱枝酶纯化了 369.21 倍,活性回收率为 19.2%,纯化结果汇总于表 1。SDS-PAGE 显示纯化后的脱枝酶为单一条带

(图 2),相对分子量约为 70 000。

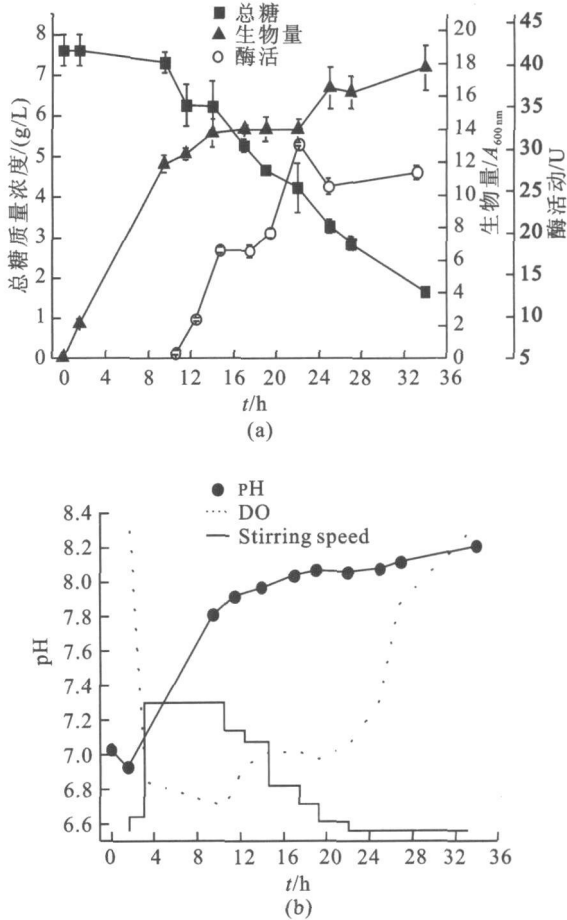
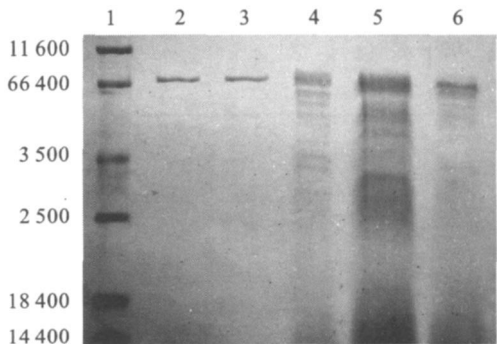


图 1 产脱枝酶菌株 *Bacillus* sp. CBB272 发酵过程
Fig. 1 Time-course of debranching enzyme produced by *Bacillus* sp. CBB272



第 1 道: 低相对分子量 Marker; 第 2 道, 第 3 道: Mono Q 离子交换层析活性组分; 第 4 道: Sephacryl S-100 凝胶过滤活性组分; 第 5 道: 硫酸铵沉淀活性组分; 第 6 道: DEAE 离子交换层析活性组分
图 2 脱枝酶分离纯化凝胶电泳图谱

图 2 SDS-PAGE profile of debranching enzyme purification

表 1 *Bacillus* sp. CBB272 脱枝酶分离纯化

Tab. 1 Purification of *Bacillus* sp. CBB272 debranching enzyme

纯化步骤	总酶活/ U	总蛋白质质量/mg	比酶活/ (U/ mg)	纯化倍数	得率/ %
Crude extract	1 499. 74	84. 73	17. 7	1	100
Ammonium sulfate precipitation	1 042. 32	17. 02	61. 242	3. 46	69. 5
Sephacryl S-100	979. 33	14. 08	69. 561	3. 93	65. 3
HiPrep 16/ 10 DEAE FF	527. 01	0. 35	1 513. 35	85. 5	35. 14
Mono Q 4. 6/ 100 PE	287. 95	0. 04	6 535. 017	369. 21	19. 2

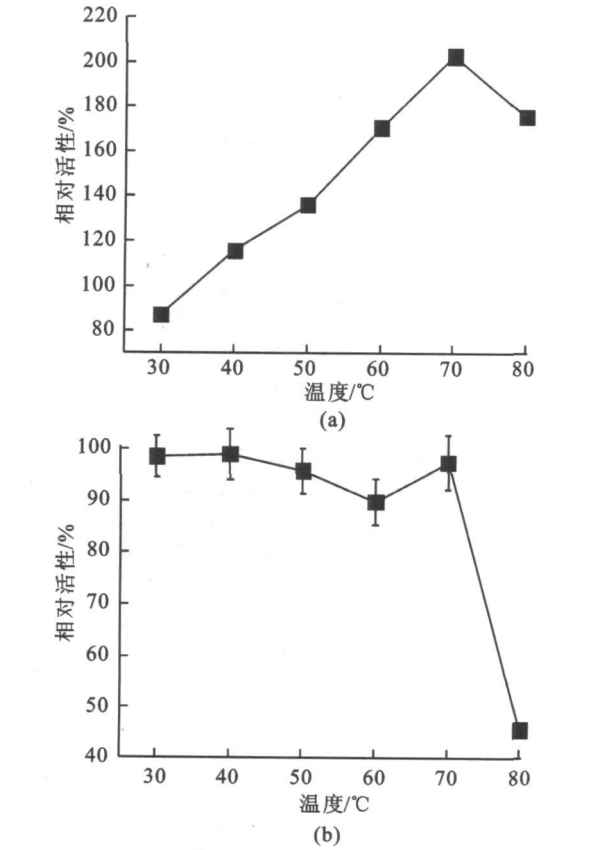
2 3 脱枝酶的性质

2 3 1 温度对酶活力和酶稳定性的影响 为了测定酶的最适作用温度, 将分离纯化的脱枝酶与底物支链淀粉在不同温度条件下反应 1 h, 得到温度-酶活力曲线。如图 3(a) 所示, 该脱枝酶的最适作用温度为 70 ℃, 在 80 ℃下的催化效率只比其最适反应温度下的催化效率降低了 14%。

将酶液在不同温度下分别保温 1 h, 测定残余酶活力, 以未处理的原酶液活力为 100%, 得到温度-稳定性曲线。如图 3(b) 所示, 随着温度升高, 酶的稳定性下降不明显, 当温度达到 70 ℃时, 保温 1 h 后仍能残留 90% 以上的酶活, 表明该酶具有较好的耐热性。

2 3 2 pH 对酶活力和酶稳定性的影响 为了测定酶的最适作用 pH, 将分离纯化的脱枝酶与底物支链淀粉在不同 pH 条件下反应 1 h, 得到 pH-酶活力曲线。如图 4(a) 所示, 该脱枝酶的最适作用 pH 为 6 0, 在 pH 6 0~ 9 0 的范围内能够保持较高的催化活性, 当 pH 降至 5 0 时的酶活开始快速下降, pH 4 0 处的酶活几乎全部丧失。

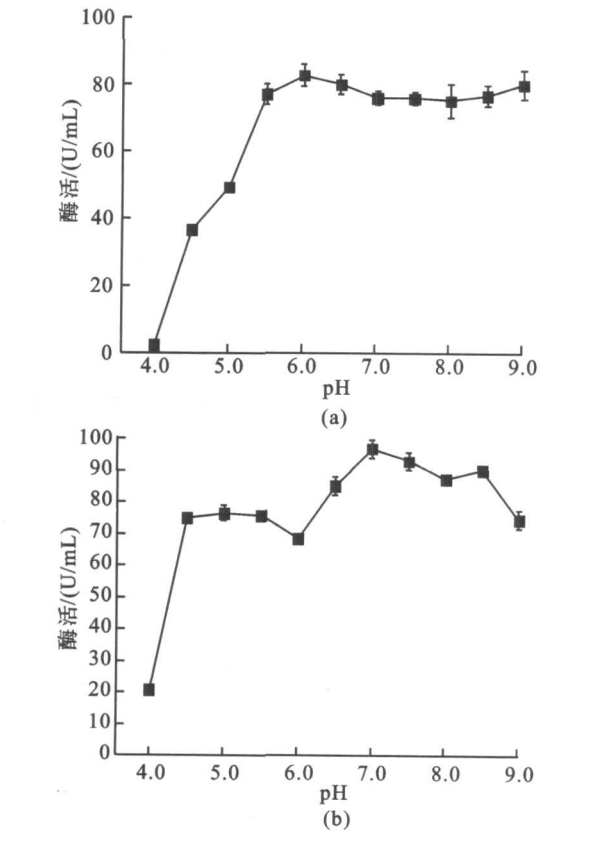
将酶液在不同 pH 下分别保温 1 h, 测定残余酶活力, 以未处理的原酶液活力为 100%, 得到 pH-稳定性曲线。如图 4(b) 所示, 该酶在 pH 值在 6 5~ 9 0 的范围内酶活较稳定, 而在 pH 值低于 4 5 时残余酶活急剧下降, 提示在该 pH 条件下可能失去酶活性构象。



(a) Activity versus temperature; (b) Thermostability

图 3 温度对脱枝酶酶活力和稳定性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the activity and stability of purified enzyme



(a) Activity versus pH; (b) Stability on different pH

图 4 pH 对脱枝酶酶活力和稳定性的影响

Fig. 4 Effects of pH on the activity and stability of purified enzyme

2.3.3 离子对酶活力的影响 45 ℃, pH 6.0 的条件下, 分别向酶液中加入终浓度为 10 mmol/L 的各种金属离子, 测定脱枝酶的酶活力, 以未处理的原酶液活力为 100%, 得到金属离子-酶活图。如图 5 所示, 在实验浓度下, 金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Co^{2+} 对该酶具有激活作用, 其中 Mn^{2+} 作用效果最显著; Zn^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Fe^{3+} 对该酶具有抑制作用, 其中 Fe^{3+} 抑制作用最强, 超过 80%。该酶对 EDTA 负离子和柠檬酸盐的敏感性较低。

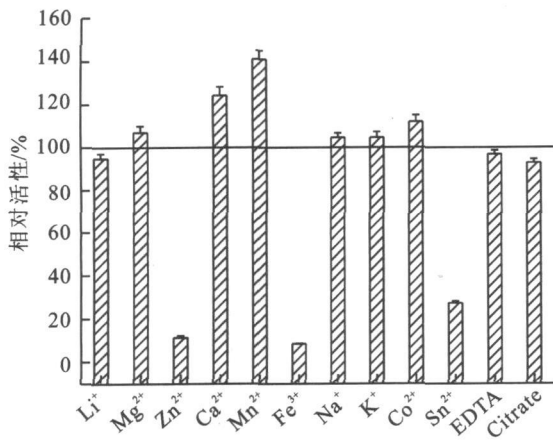


图 5 金属离子和化合物对酶活力的影响

Fig. 5 Effects of metal ions and chemicals on the activity of the purified enzyme

2.3.4 离子对酶热稳定性的影响 选用了 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 3 种金属离子添加至酶液中, 在 50~ 80 ℃下保温 1h 后测定残余酶活, 以未添加金属离子在各温度下保温后酶液酶活力为 100%。如图 6 所示, Ca^{2+} 对于高温下保持酶的稳定性作用明显, 而 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 虽然在 50 ℃时对酶表现出激活作用, 随着温度升高, 不仅对酶的热稳定性没有正影响, 而且使该酶的稳定性降低。说明这两种金属离子只对酶有激活作用, 而没有保护作用。

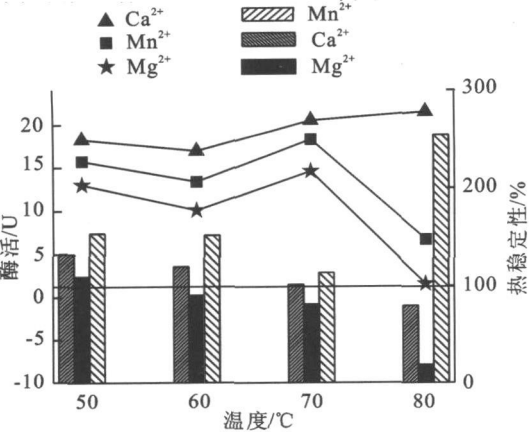


图 6 金属离子对酶热稳定性的影响

Fig. 6 Effects of metal ions on the thermostability of purified enzyme

2.3.5 酶动力学性质 酶的动力学常数的测定: 米式常数 K_m 是酶的特征常数之一, 它只与酶的特性有关, 而与酶的浓度无关, K_m 值的物理意义是当酶反应速度达到最大反应速度一半时的底物浓度。 K_m 值的大小可以反映出淀粉脱枝酶对底物的亲和力的大小, K_m 值越小, 酶与底物的亲和力越大。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 求得以 Amylopectin 为底物的酶动力学参数 K_m 和 V_{max} 值, 结果见图 7。

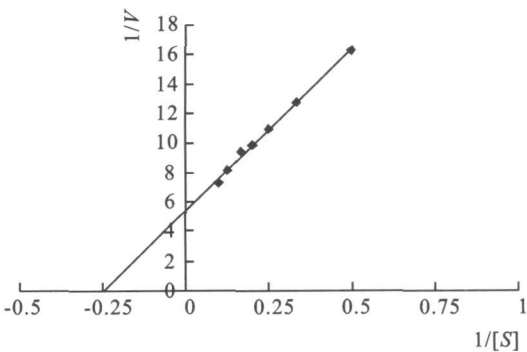


图 7 底物为 Amylopectin 时脱枝酶的动力学曲线

Fig. 7 Kinetic curve of debranching enzyme hydrolyzing amylopectin

当以 Amylopectin 为底物时, 根据 Lineweaver-Burk 双倒数方程 $y = 21.928x + 5.4316$ ($R^2 = 0.9949$), 该淀粉脱枝酶的 K_m 值为 4.032 4 mg/mL, 最大反应速度 V_{max} 值为 0.184 1 mg/(min · mL)。

酶的抑制动力学: 以 Amylopectin 为底物, 分别以 3 种不同浓度的 Fe^{3+} 对淀粉脱枝酶的抑制实验。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 求得以 Amylopectin 为底物时 Fe^{3+} 对淀粉脱枝酶的抑制动力学曲线。结果见图。

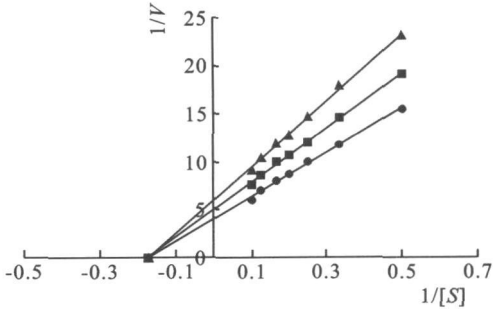


图 8 Fe^{3+} 对淀粉脱枝酶的抑制动力学曲线

Fig. 8 Kinetic curve of debranching enzyme inhibited by Fe^{3+}

由图可以看出, 无论有无抑制剂的存在, 3 条曲线都交于横轴上的同一点, 即 K_m 值都是相同的, 同时, V_{max} 值与抑制剂的存在与否有关。反应速度随着抑制剂浓度的增加而降低。因此, 在淀粉脱枝酶

催化反应过程中, Fe^{3+} 只改变反应速度, 不改变米氏常数, 说明 Fe^{3+} 对淀粉脱枝酶的抑制属于典型的非竞争性抑制类型, 即底物(支链淀粉)和抑制剂与淀粉脱枝酶络合时是在酶的不同部位结合的。

2.3.6 酶的底物特异性 配制质量分数均为 1% 的可溶性淀粉, 支链淀粉, 糖原, 麦芽糊精, 玉米淀粉, 糯米淀粉和普鲁兰糖作为酶的作用底物, 于 45℃ 反应 10 min, 标准条件下测定酶活。

表 2 酶的底物特异性

Tab. 2 Enzyme activity on various substrates		
底 物	酶活力/(U/mL)	相对活性/%
糖原	5.14	100.00
支链淀粉	4.23	82.30
糯米淀粉	3.78	73.54
玉米淀粉	3.72	72.37
可溶性淀粉	3.5	68.09
麦芽糊精	2.8	54.47
普鲁兰糖	2.24	43.6

由表 2 可以看出, 糖原最接近该淀粉脱枝酶的天然底物, 其次为支链淀粉。对于糯米淀粉, 玉米淀粉, 可溶性淀粉等底物的酶活力, 由于其支链淀粉的含量差异而不同。

2.3.7 酶水解产物分析 以支链淀粉作为底物进行酶解反应, 用 HPLC 对水解产物进行分析, 结果如图 9。

由图 9 可以看出, 反应液中主要含有麦芽糖和葡萄糖两种糖, 他们的来源为脱枝酶水解支链淀粉反应生成和酶液及支链淀粉溶液中残留, 通过分析两种糖含量的比例关系研究酶水解产物组成, 该脱枝酶水解支链淀粉主要生成麦芽糖。

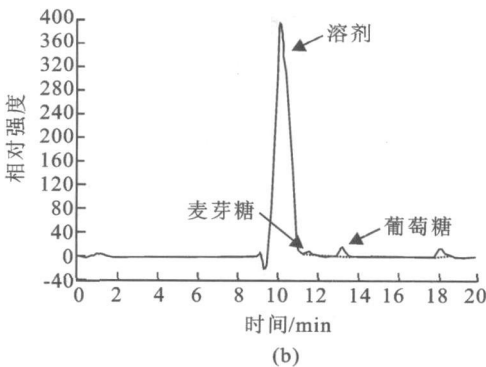
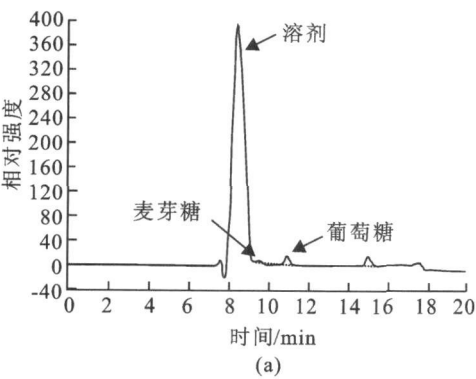


图 9 酶水解产物的 HPLC 图谱

Fig. 9 Chromatogram of hydrolysis products

3 结 语

由于在淀粉工业中, 将脱枝酶与糖化酶协同作用可极大地加速糖化过程, 提高糖化率; 与 β -淀粉酶联合作用则可大幅度提高麦芽糖得率, 因此近年来, 各国相继开展了对于脱枝酶的研究。作者首次报道了来源于 *Bacillus* sp. CBB272 的脱枝酶分离纯化和性质研究。对 *Bacillus* sp. CBB272 发酵液经 4 步纯化得到电泳纯脱枝酶, 该酶比活力为 6 535. 017 U/mg, 大大高于其他一些来自于细菌的脱枝酶。国外已报道的脱枝酶, 最适作用温度一般在 30~ 60℃^[11-13], 而嗜热细菌 *Thermoanaerobacter* sp. 所产的脱枝酶最适作用温度高达 75℃。作者研究的 *Bacillus* sp. CBB272 所产脱枝酶在 60~ 80℃ 之间有较高的酶活力; 当温度达到 70℃ 时, 保温 1 h 后仍能残留 90% 以上的酶活, 表明该酶具有较强的耐热性。与已实现工业生产的耐热厌氧菌 *F. pennavorans* 所产的脱枝酶相比^[14], 作者研究脱枝酶的作用 pH 范围 6.5-9.0 较前者更宽。另外, 与已有研究报道不同, 本研究获得的脱枝酶的作用底物较宽泛, 对来源于糖原、淀粉、普鲁兰皆具有活性。作者获得的脱枝酶可能为一全新的酶, 有关其编码基因的克隆等正在研究中。

参考文献(References):

[1] Hasnain H, Alexandra M, Robert S, et al. Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 133- 149.

[2] Harada T. Debranching enzyme and its industrial significance in the production of sugars from starch[J]. *Biotechnol Gen Eng Rev*, 1984, 1: 29- 63.

- [3] Jinn T L, Hwai S L. Production enhancement of *Pseudomonas amyloclavata* debranching enzyme[J]. **Bioprocess Eng**, 1996, 15: 139– 144.
- [4] Tsuei Y F, Wen C T, Ching J Y, et al. Characterization of the thermophilic debranching enzyme from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092[J]. **J Mol Catalysis B: Enzymatic**, 2005, 33: 99– 107.
- [5] Byron C H, Hung L. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation[J]. **Biotechnol Advances**, 2007, 25: 425– 441.
- [6] Akiko K, Naoko F, Kyuya H, et al. The starch- debranching enzymes debranching enzyme and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm[J]. **Plant Physiol**, 1999, 121: 399– 409.
- [7] Urlaub H, Wober G, identification of isoamylase, a glycogen-debranching enzyme, from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. **FEBS Lett**, 1975: 1– 4.
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. **Anal Biochem**, 1976, 72: 248– 254.
- [9] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. **Nature**, 1970, 227: 680– 685.
- [10] Lineweaver, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants[J]. **J American Chem Soc**, 1934, 56: 658– 666.
- [11] Ara K, Saeki K, and Ito S. Purification and characterization of an alkaline debranching enzyme from an alkalophilic strain of *Bacillus*[J]. **J Gen Microbiol**, 1993, 139: 781– 786.
- [12] Gastro G, Garcia G, Sineriz F. Extracellular debranching enzyme produced by *Bacillus circulans* MIR-137[J]. **J Appl Bacteriol**, 1992, 73: 520– 523.
- [13] Harada T, Misaki A, Akai H, et al. Characterization of *Pseudomonas debranching* enzyme by its actions on amylopectin and glycogen: comparison with *Aerobacter pullulanase*[J]. **Biochem Biophys Acta**, 1972, 268: 497– 505.
- [14] Bertoldo C, Duffner F, Jorgensen P L. Pullulanase type I from *Fervidobacterium pennavorans* Ven5: cloning, sequencing, and expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1999, 65: 2084– 91.

《食品与生物技术学报》征稿、征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为 CSCD 核心期刊、全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外 10 余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》,双月刊,A4(大 16K)开本,160 页,全年 6 期,每册定价 15.00 元,邮发代号:28– 79,全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部