

Bacillus flexus β-淀粉酶低 pH 值突变体的构建及在麦芽糖制备中的应用

亓旭辉^{1,2}, 吴敬^{1,2}, 王蕾^{1,2}, 陈晟^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 工业上将 β-淀粉酶与其他淀粉水解酶进行复配可获得高纯度的麦芽糖浆。相对于目前常用的植物来源 β-淀粉酶, 微生物 β-淀粉酶具有生产工艺简单、不受原料限制、质量稳定、纯度高优势, 但其最适作用 pH 多为 6.0~8.0, 难以与其他淀粉水解酶(pH 多为 4.5~5.5)进行复配。本实验室前期获得的弯曲芽孢杆菌 β-淀粉酶其最适 pH 值为 7.0, 本研究在此 β-淀粉酶基础上构建 T47K, Y164K, L396K 三个突变体, 其最适 pH 由突变前的 7.0 分别下降为 6.0, 4.5, 5.5, 其中 L396K 的最适温度也由突变前的 50 °C 提高为 60 °C。以马铃薯淀粉(10% w/v)为底物进一步对 L396K 制备麦芽糖的转化条件进行探索与优化。结果表明, 在反应初始 pH 为 5.5, 温度 60 °C, β-淀粉酶加酶量为 100 U/g 干淀粉时麦芽糖最大转化率达到 80.2%, 符合高纯度麦芽糖浆的生产要求。

关键词: β-淀粉酶; 定点突变; 麦芽糖; 弯曲芽孢杆菌; 酶转化

中图分类号: Q 814.9 文章编号: 1673-1689(2019)10-0105-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.015

Construction of Lower Optimum pH Mutants of *Bacillus flexus* β-Amylase and Its Application in Maltose Production

QI Xuhui^{1,2}, WU Jing^{1,2}, WANG Lei^{1,2}, CHEN Sheng^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Beta-amylase and other starch hydrolases were complexed to produce high purity maltose syrup in industry. Compared with plant β-amylase, the microbial β-amylase has the advantages of high purity, little limitation with the raw materials, and the suitability for large-scale production. However, the optimum pH of the microbial β-amylase is 6.0~8.0, which is difficult to complex with other starch hydrolases. In the previous study, the optimum pH of *Bacillus flexus* β-amylase was 7.0.

收稿日期: 2017-03-16

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(31425020); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2015019-32); 江苏高校优秀科技创新团队项目(2015); 111 计划(111-2-06)。

* 通信作者: 陈 晟(1981—), 女, 博士, 副教授, 研究生导师, 主要从事基因工程和蛋白质工程研究。E-mail: chensheng@jiangnan.edu.cn

引用本文: 亓旭辉, 吴敬, 王蕾, 等. *Bacillus flexus* β-淀粉酶低 pH 值突变体的构建及在麦芽糖制备中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 105-110.

In the present study, three *B. flexus* β -amylase mutants T47K, Y164K, L396K were constructed and the optimal pH were changed from 7.0 to 6.0, 4.5 and 5.5 respectively. At the same time, the optimum temperature of L396K was increased from 50 °C to 60 °C. The production conditions of maltose using L396K β -amylase was also optimized. When using potato starch (10% w/v) as the substrate under the condition of pH 5.5 and temperature 60 °C, the yield of maltose reached 80.2%, which satisfied the production requirement of high purity maltose syrup.

Keywords: β -amylase, site-directed mutagenesis, maltose, *B. flexus*, enzyme conversion.

β -淀粉酶(β -amylase)又名麦芽糖苷酶、糖原淀粉酶,系统名为 α -1,4-葡聚糖-4-麦芽糖水解酶(α -1,4-Dglucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2)。 β -淀粉酶作用于淀粉时,能够从其非还原性末端依次切下麦芽糖,获得的产物为: β -麦芽糖、 β -极限糊精及非常少量的 β -葡萄糖^[1]。因此 β -淀粉酶广泛应用于食品加工、酿造、淀粉糖制备以及医药等工业生产领域,还可通过与其他淀粉水解酶如普鲁兰酶、麦芽糖淀粉酶等复配,应用于高纯度麦芽糖浆的生产。

β -淀粉酶首先被发现存在于高等植物中,如大豆,麦芽,大麦,马铃薯,玉米等^[2]。目前商品化的 β -淀粉酶主要来源于大麦、大豆、甘薯等粮食作物。由于植物提取 β -淀粉酶存在粮食消耗量大、纯度较低、质量不稳定、废水量大等缺点,利用微生物发酵生产 β -淀粉酶已成为研究热点。文献[3]率先从巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)中发现了细菌 β -淀粉酶后,陆续又有多种产 β -淀粉酶的微生物菌株被发现,包括蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[4-5],多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)^[2],环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)^[6]、热硫梭菌(*Clostridium thermosulfurogenes*)^[7]等。与植物 β -淀粉酶相比,微生物来源的 β -淀粉酶具有生产工艺简单、不受原料限制、质量稳定、纯度高、能水解生淀粉等优势,同时也更容易实现大规模、连续化的生产^[8]。

但是目前已报道的微生物 β -淀粉酶最适作用pH多为6.0~8.0,这一pH作用范围与常用的商品化普鲁兰酶、麦芽糖淀粉酶等其他淀粉水解酶作用的最适pH 4.5~5.5存在着很大的差距,难以适用于麦芽糖浆的工业生产^[9-10]。本研究前期从土壤中筛选得到一株产 β -淀粉酶的弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*),并将 β -淀粉酶基因克隆,构建了重组表达 β -淀粉酶的短小芽孢杆菌。前期研究中发现此重组 β -淀粉酶具有比活高,催化效果理想,表达量高的

特点。但是此重组酶最适pH为7.0,这一pH条件并不适用于工业应用,因此本研究将对其进行定点突变以降低其作用的最适pH值。突变结束后选取取得预期改变的突变体,进一步探究其在制备麦芽糖浆中的应用效果。以马铃薯淀粉为底物, α -淀粉酶进行液化之后,用 β -淀粉酶与普鲁兰酶复配生产麦芽糖,并对 β -淀粉酶的加酶量进行优化,以在获得高效生产麦芽糖浆的工艺的同时,降低其生产成本。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

用于重组质粒构建的克隆宿主 *E. coli* JM109 购于宝生物工程(大连)有限公司;表达宿主 *Bacillus choshinensis*, 带有源自于 *B. flexus* β -淀粉酶基因 β -amy 的重组短小芽孢杆菌 *B. choshinensis* pNCMO2/ β -amy 为本实验室保藏。

1.2 培养基

LB 培养基:蛋白胨 10,氯化钠 10,酵母粉 5 g/L。

TM 培养基:多聚蛋白胨 10,牛肉粉 10,酵母粉 10,FeSO₄·7H₂O 1.0,MnSO₄·4H₂O 1.0,ZnSO₄·7H₂O 0.5,CaCl₂ 2.0,葡萄糖(单独灭菌) 10 g/L。

1.3 酶和试剂

试剂:DNA 聚合酶以及限制性内切酶购自于宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖、核酸电泳分子量标准品以及其他配套产品购自于上海科晴生物技术有限公司;琼脂糖凝胶回收、PCR 纯化以及质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;氨苄霉素(Amp)和新霉素(Neo)购自于生工生物工程(上海)股份有限公司;聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒购自于碧云天生物技术(上海)有限公司。高温酸性 α -淀粉酶、普鲁兰酶购自于诺维信公司;麦芽糖购自阿拉丁试剂有限公司。其他试剂(除特殊说明外)均购自于国药集团化学试剂

有限公司。

1.4 突变体引物的设计及载体的构建

基于蛋白质结构来选择突变位点,以质粒 pNCMO2- β -amy 为模板,设计 PCR 引物(表 1),采用一步 PCR 法对 β -淀粉酶基因进行定点突变。

表 1 β -淀粉酶定点突变用引物

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis of β -amylase

引物名称	引物序列(5'-3')
T47K-F	ATGGGTTTT ACGCTGTGAA AGTAGATTTT TG
T47K-R	CCCACCA AAAATCTACT TTCACAGCGAAA
Y164K-F	TTATT CCAAAGGTTA AATTATCAGG GGG
Y164K-R	GCTGGTCCC CCTGATAATT TAACCTTTGG AAT
L396K-F	T G CGGGCTTTA CGCTTAAAAG ATTCTATGAT
L396K-R	AAC ATCATAGAAT CTTTTAAGCG TAAAGCC

表 1 中带有下划线的碱基为突变位点。PCR 反应体系 (50 μ L): ddH₂O 34.3 μ L, 5 \times PS Buffer 10 μ L, dNTP mixture 4 μ L, 质粒 DNA 模板 0.2 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, PrimerStar[®] HS DNA 聚合酶 0.5 μ L。PCR 程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C, 10 s; 55 $^{\circ}$ C, 10 s; 72 $^{\circ}$ C, 7 min 40 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保温。

将经过 Dpn I 处理的 PCR 产物转化至 *E. coli* JM109 中并涂布到含 30 μ g/mL Amp 的 LB 固体琼脂平板上。置于 37 $^{\circ}$ C 的条件下培养约 8~10 h。从中挑取乳白色、边缘光滑的单克隆体,接种到含有 30 μ g/mL Amp 的 LB 培养基中,并置于 37 $^{\circ}$ C 摇床中培养 8~10 h 后抽提质粒。将获得的突变质粒进行双酶切验证,验证正确后进一步送往上海生工生物有限公司进行测序验证。将测序验证正确的突变质粒通过电转化至表达宿主 *B. choshinensis* 中,从而得到含有突变基因的重组基因工程菌。

1.5 突变体的表达、纯化及 SDS-PAGE 电泳分析

验证正确的突变菌株以 1:1 的比例保存在 30% 的甘油管中,置于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中保存备用。使用时取 10 μ L 转接到含有 10 μ g/mL Neo 的 10 mL TM 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 10~12 h,然后以 5% 的接种量转接到含有 10 μ g/mL Neo 的 50 mL TM 培养基中,30 $^{\circ}$ C 继续摇瓶发酵 48 h。发酵结束后离心取上清,即可获得重组 β -淀粉酶的粗酶液。

利用凝胶柱 Superdex 200 10/300 GL 进行突变

体蛋白的分离纯化,这一过程是通过杂蛋白与目的蛋白的大小不同而进行的分离纯化,纯化后的突变体蛋白将用于进一步的酶学性质分析。

对粗酶液和纯化后的蛋白分别进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,蛋白电泳胶制备及后续详细步骤参考碧云天蛋白电泳试剂盒的说明来进行。

1.6 β -淀粉酶活力的测定

用 pH 5.5 的 Na₂HPO₄-C₄H₂O₇ 缓冲液 (0.05 mmol/L) 配制 2% 的可溶性淀粉溶液作为反应底物。分别吸取 500 μ L 底物和 400 μ L 缓冲液加入到洁净的 15 mL 具塞试管中,置于 60 $^{\circ}$ C 水浴锅中进行预热,10 min 后加入 100 μ L 稀释后的酶液并混匀,反应 10 min 后加入 800 μ L DNS 终止反应,沸水浴 5 min 显色并定容到 15 mL,在 540 nm 波长下测量吸光值。使用沸水中灭活的酶液做空白对照。

酶活单位定义:在上述条件下,每分钟产生 1 μ mol 麦芽糖所需要的酶量定义为一个酶活力单位^[2]。

1.7 突变体的酶学性质分析

对突变体酶的最适作用 pH 和作用温度分别进行探究已验证突变效果。将酶液分别用 pH 3~8 的 Na₂HPO₄-C₄H₂O₇ 缓冲液 (0.05 mmol/L) 进行稀释。以 2% 可溶性淀粉作为底物,在 50 $^{\circ}$ C 水浴锅中分别测定突变体在不同 pH 下的酶活,将最高酶活力定义为 100%,计算突变体在不同 pH 下的相对酶活。

以 2% 可溶性淀粉为底物,控制反应体系 pH 值为突变体各自最适 pH 值,并在 30~70 $^{\circ}$ C 温度范围内设立不同梯度分别测定重组 β -淀粉酶酶活,以确定各突变体最适反应温度。定义最高酶活力为 100%,计算不同温度下的测得的相对酶活。

1.8 突变体的应用

1.8.1 突变体和野生型的应用对比及优化 配制浓度为 10% (w/v) 的马铃薯淀粉溶液,以 12 U/g 底物的量加入 α -淀粉酶进行液化,保持淀粉溶液温度 90 $^{\circ}$ C 左右,快速搅拌 5~6 min,至淀粉溶液完全澄清。液化结束后用氢氧化钠和稀盐酸调节液化液 pH 至 5.5,分装至具塞三角瓶中,然后分别加入一定量的普鲁兰酶和 β -淀粉酶,这一过程中注意对液化液的保温以防止其老化。将具塞三角瓶置于 60 $^{\circ}$ C 水浴摇床中,150 r/min 反应 24 h。反应结束后煮沸样品以终止反应,按 1:1 的比例加入乙腈,静置 1~2 h 使长链糖沉淀,离心取上清,产物用 HPLC 进

行检测。

1.8.2 淀粉水解产物测定方法 β -淀粉酶水解淀粉的产物主要是麦芽糖,同时含有葡萄糖以及麦芽三糖等副产物,各种产物含量采用 HPLC 检测^[11]。色谱条件为:安捷伦 1260 HPLC 色谱仪,安捷伦自动进样器,色谱柱 Agilent ZORBAX NH2 (4.6×250 mm),示差检测器为安捷伦 G1362A;流动相采用 68%(v/v) 乙腈和蒸馏水的混合溶液,流速设定为 0.8 mL/min,柱温设为 35 °C。

1.8.3 麦芽糖转化率的计算

$$Y = \frac{M}{S} \times 100\% \quad (1)$$

式中:Y 为麦芽糖转化率,%;M 为产物中麦芽糖的质量,g;S 为底物淀粉的质量,g。

2 结果与讨论

2.1 突变体的构建

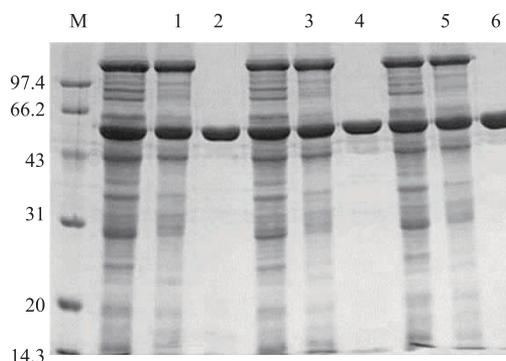
利用在线同源模拟网站 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>) 对重组 β -淀粉酶进行结构模拟,选取晶体结构已被解析并且氨基酸序列相似度最高的 β -淀粉酶为模板进行模拟。同源搜索比对发现来自 *B. cereus* 的 β -淀粉酶 (BCB)(PDB 登录号:1VEO.1.A)的氨基酸序列同源性较高(72.04%),因此选取 BCB 作为模板酶进行同源建模,模拟结构和模版 QMEAN 为 -0.81^[12]。根据重组 *B. cereus* β -淀粉酶三级结构确定其 Domain A 或 Domain A 和 Domain B 之间交界的狭缝及功能域 Domain B 内的 Loop 区。在此基础上根据序列信息及三级结构比对结果,找到 *B. flexus* 的 β -淀粉酶位于淀粉酶 Domain A 以及 Domain A 和 Domain B 之间交界的催化槽及催化关键氨基酸:作为亲核试剂的 E367 及作为酸碱试剂的 E172^[13]。根据序列及空间结构信息比对围绕在亲核试剂的 E367 周围氨基酸性质如带电荷、侧链基团大小、与其他氨基酸形成氢键的数量等进行分析,选定拟突变的氨基酸位点以及突变成目标氨基酸。通常在糖苷酶的作为亲核试剂的催化关键氨基酸附近引入碱性氨基酸通常可降低反应的最适 pH^[14-15]。选定 47、164 和 396 号位进行定点突变,引入碱性氨基酸 K,以期获得最适 pH 降低的突变体。

以 *B. choshinensis* /pNCM02/ β -amy 质粒为模板经过 PCR 获得含突变位点的目的片段,转化 *E.*

coli JM109,抗性筛选后得到阳性转化子,并测序验证,突变正确的质粒通过电转入 *B. choshinensis* 感受态细胞,验证成功后即得目标突变体,突变体在甘油管中 -80 °C 保藏备用。

2.2 突变体的表达与纯化

将突变体接种到 TM 培养基中,37 °C 培养 10-12 h 后按 5% 的接种量再次转接到 TM 培养基中,30 °C 继续摇瓶发酵 48 h。结束后离心取上清,即可获得粗酶液。SDS-PAGE 电泳结果如图 1 所示,由实验结果可知,三个突变体发酵上清在 57.6 kD 处都有可观的目的蛋白条带,其大小与理论的 β -淀粉酶分子量相符合,表明 β -淀粉酶在 *B. choshinensis* 中成功表达。将粗酶液通过凝胶柱 Superdex 200 10/300 GL 进行蛋白纯化,获得电泳纯蛋白(图 1),用于下一步实验。



M: 蛋白 Marker; 1:T47K 粗酶液;2:T47K 纯化后;3:Y164K 粗酶液;4:Y164K 纯化后;5:L396K 粗酶液;6:L396K 纯化后

图 1 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of mutants

2.3 突变体酶学性质分析

在 60 °C, pH5.5 的条件下测得野生型与突变体的 T47K, Y164K, L396K 比活力分别为 208.2, 93.3, 425.7 U/mg, 是野生型的 33.3%, 14.9%, 68.1 %。

将酶液分别用 pH 3~8 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$ 缓冲液(0.05 mmol/L)稀释至一定倍数。以 2% 可溶性淀粉作为底物,底物与缓冲液混合后在 50 °C 水浴锅中预热 10 min,然后分别在标准条件下测定这些突变体在不同 pH 条件下的酶活。以酶活最高者为 100% 计算,算出相对酶活,结果见图 2。实验结果显示, T47K, Y164K, L396K 三个突变体均取得预期改变,最适 pH 值均有降低,由野生型的 7.0 分别降为 6.0、4.5、5.5。此外也印证了 Y164 位点对 pH 影响的

文献报道^[16]。

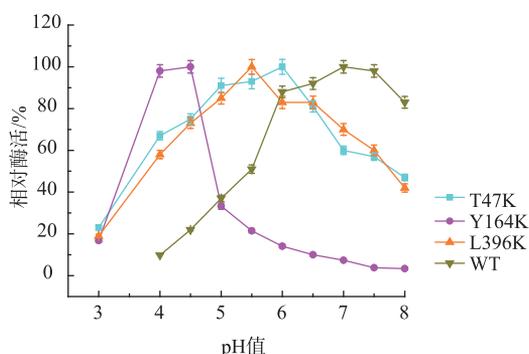


图2 pH对野生型及突变体酶活的影响

Fig. 2 Effect of pH on enzyme activity of the wild-type and mutants

在突变体最适的 pH 条件下,分别将稀释一定倍数的突变体酶液与 2% 的淀粉溶液相混合,然后分别在 35,40,45,50,55,60 °C 以及 65 °C 的水浴锅中保温 10 min。在标准条件下分别测定突变体在不同反应温度下的酶活。以酶活力最高者为 100% 计算出其他的相对活力,结果如图 3 所示。实验结果显示,T47K,Y164K,L396K 三个突变体的最适反应温度有较大的变化,分别为 55,45,60 °C。

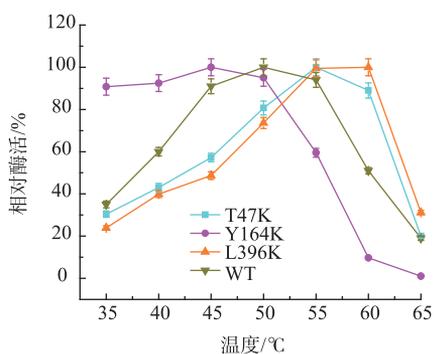


图3 温度对野生型及突变体酶活的影响

Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity of the wild-type and mutants

实验结果显示,T47K,Y164K,L396K 三个突变体的最适 pH 值均有降低,与此同时,最适反应温度也有所变化,相对于野生型最适温度 50 °C 来说,Y164K 最适温度降低到 45 °C,不利于应用于麦芽糖的生产。而 L396K 突变体最适 pH 降低到 5.5,满足了高纯度麦芽糖浆生产中常用以复配的普鲁兰酶、麦芽糖淀粉酶等淀粉酶作用条件。同时,该突变体最适温度升高为 60 °C,在麦芽糖生产的过程中,

反应温度的提高能够更好的避免反应过程中产生杂菌,同时,普鲁兰酶、麦芽糖淀粉酶等同样适用于这一温度^[10,17],因此这一性质的改变更适于麦芽糖的工业生产,我们将对这一突变体的应用进行进一步探究。

2.4 β -淀粉酶加量对麦芽糖产率的影响

为了初步探究在实际生产中突变体 L396K 和野生型的应用效果,配制 10% (w/v) 的马铃薯淀粉溶液,以 12 U/g 淀粉的量加入 α -淀粉酶液化至澄清。液化结束后分别加入 4 U/g 淀粉的普鲁兰酶以及不同浓度的 β -淀粉酶,这一过程中注意保温防止液化液冷却老化,然后在 pH5.5,60 °C 的条件下进行糖化反应。

实验结果如图 4 所示,当加酶量在 10~100 U/g 淀粉之间时,L396K β -淀粉酶糖化的一组麦芽糖产率要明显高于突变前野生型 β -淀粉酶,当突变体加酶量为 100 U/g 淀粉时,麦芽糖转化率基本恒定,为 80.2%,此最高值相对于突变前的最高值 77.5% 高 2%~3%。同时,这一麦芽糖含量满足高纯度麦芽糖浆的标准^[18]。

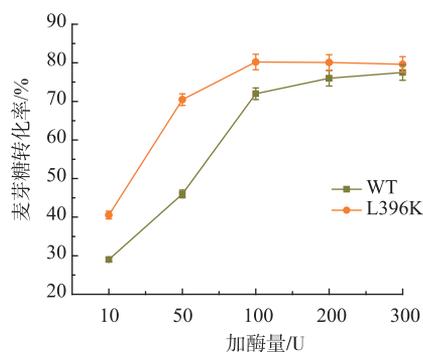


图4 野生型和突变体加酶量对麦芽糖转化率的影响

Fig. 4 Relationship between β -amylase enzyme dosage and maltose yield

3 结语

以重组短小芽孢杆菌 *B. choshinensis* / pNCMO2/ β -amy 菌株为基础,对 *B. flexus* 来源的 β -淀粉酶进行定点突变,并对突变体进行酶学定性。选择其中性质优良的突变体 L396K 对其制备麦芽糖的转化条件进行了优化。结果表明,在 pH 5.5,60 °C 的条件下, β -淀粉酶加酶量为 100 U/g 淀粉时达到麦芽糖产率的最大值,为 80.2%,此麦芽糖含量满足高纯度麦芽糖浆的标准。这一结果表明该

细菌来源的 β -淀粉酶满足工业生产应用的要求,而且相对于植物来源的 β -淀粉酶,该细菌来源的 β -

淀粉酶具有生产工艺简单,生产成本低,纯度高等优点,具有很大的应用前景。

参考文献:

- [1] FOGARTY W M, KELLEY C T. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases [M]. **New York: Academic Press**, 1980: 115-169.
- [2] MURAO S, OHYAMA K, ARAI M. β -Amylases from *Bacillus polymyxa* No. 72 [J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1979, 3(4): 719-726.
- [3] HIGASHIHARA M, OKADA S. Studies on β -amylase of *Bacillus megaterium* strain no. 32 [J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1974, 38(5): 1023-1029.
- [4] NANMORI T, SHINKE R, AOKI K, et al. Purification and characterization of β -amylase from *Bacillus cereus* BQ10-S1 Spo II [J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1983, 47(5): 941-947.
- [5] YAMAGUCHI T, MATSUMOTO Y, SHIRAKAWA M, et al. Cloning, sequencing, and expression of a β -amylase gene from *Bacillus cereus* var. *mycooides* and characterization of its products [J]. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1996, 60(8): 1255-1259.
- [6] SIGGENS K. Molecular cloning and characterization of the beta-amylase gene from *Bacillus circulans* [J]. **Molecular Microbiology**, 1987, 1(3): 86-91.
- [7] KITAMOYO N, YAMAGATA H, KATO T, et al. Cloning and sequencing of the gene encoding thermophilic beta-amylase of *Clostridium thermosulfurogenes*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1988, 170(12): 5848-5854.
- [8] DERDE L J, GOMAND S V, COURTIN C M, et al. Characterisation of three starch degrading enzymes: thermostable beta-amylase, maltotetraogenic and maltogenic alpha-amylases[J]. **Food Chemistry**, 2012, 135(2): 713-721.
- [9] CHANG Fan, XUE Wenjian, Ma Saijian, et al. Isolation and enzymatic properties of pullulanase producing strains hotspots of Guanzhong region[J]. **Journal of Science and Biotechnology**, 2014, 33(12): 1312-1318. (in Chinese)
- [10] 孙烨橙. 嗜热脂肪芽孢杆菌麦芽糖淀粉酶的分子改造及高效表达[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [11] MARTIN C, SMITH A M. Starch biosynthesis[J]. **Plant Cell**, 1995, 7(7): 971-985.
- [12] AKIRA H, MOTOYASU A, SHIGERU U, et al. Engineering of the pH optimum of *Bacillus cereus* beta-amylase: conversion of the pH optimum from a bacterial type to a higher-plant type[J]. **Biochemistry**, 2004, 43(39): 12523-12531.
- [13] AKIRA H, MOTOYASU A, ATSUSHI S, et al. Structural and enzymatic analysis of soybean beta-amylase mutants with increased pH optimum[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279(8): 7287-7295.
- [14] JENS E N, TORBEN V B, GERRIT V. The determinants of α -amylase pH-activity profiles[J]. **Protein Engineering**, 2001, 14(7): 5005-5012.
- [15] SUBARANA P, JEONG C, YOUNG J Y. Shifting the optimum pH of *Bacillus circulans* xylanase towards acidic side by introducing arginine[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2013, 18: 35-42.
- [16] ZHANG Xiaoyu, AI Zhilu, LI Mengqin, et al. Research and prospect of limit glucose enzymes [J]. **Chinese Food Additives**, 2004, 3: 32-35. (in Chinese)
- [17] 段绪果. 淀粉脱支酶的重组表达及分子改造[D]. 无锡: 江南大学, 2013
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会 中华人民共和国国家标准 (麦芽糖): GB/T 20883—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.