

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(1):21–28; 4 January 2011
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

GH57 家族高温淀粉普鲁兰酶的结构与功能分析

焦豫良, 王淑军*, 吕明生

淮海工学院海洋学院, 连云港 222005

摘要: 淀粉普鲁兰酶(E. C. 3. 2. 1. 1/41)同时具有淀粉酶(E. C. 3. 2. 1. 1)和普鲁兰酶(E. C. 3. 2. 1. 41)的功能,属于糖苷水解酶 GH13 和 GH57 家族。由于淀粉普鲁兰酶可以同时水解 α -1, 4 和 α -1, 6 糖苷键,在淀粉糖化工业中具有降低生产成本、提高生产效率和提高糖化率的作用。其中高温淀粉普鲁兰酶由于能够在淀粉工业液化条件下同时催化淀粉的液化和糖化反应,因此在淀粉糖化工业中更具有应用价值。另外,淀粉普鲁兰酶的双功能催化机制对酶学研究中也具有重要价值。该文就近年高温淀粉普鲁兰酶的结构及功能研究最新成果做以总结分析。

关键词: 高温淀粉普鲁兰酶, 糖苷水解酶, GH57 家族

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0021-08

淀粉(starch)是自然界含量丰富的高分子聚糖,是各种生物的重要能量来源。大多数用于生产葡萄糖的淀粉由两类不同的成分构成,即直链淀粉(amylose)和支链淀粉(amylopectin),分别占总量的 5%–30% 和 70%–95%^[1–2]。直链淀粉由葡萄糖通过 α -1, 4 糖苷键连成线性糖链,而支链淀粉则是在直链淀粉的基础上通过 α -1, 6 糖苷键连接有分支糖链。工业生产中,淀粉首先经过 α -淀粉酶(α -amylase)水解,淀粉内部的 α -1, 4 糖苷键被随机切断,但是 α -1, 6 糖苷键以及其附近的 α -1, 4 糖苷键却不能够被水解^[3–4]。淀粉溶液在高温下形成凝胶结构,经 α -淀粉酶作用后,淀粉由高聚糖水解为低聚糖,如麦芽低聚糖(maltooligosaccharide)等。该过程中由于淀粉溶液流动性增强,故称为液化步骤,其最适酶促水解条件为 pH6. 0, 95℃–105℃^[4–5]。液化步骤产生的低聚糖随后在 β -淀粉酶(β -amylase)、葡萄糖淀粉酶(glucosylase)和普鲁兰酶

(pullulanase)、以及异淀粉酶(isoamylase)作用下,残留的支链 α -1, 6 糖苷键和直链 α -1, 4 糖苷键被进一步水解,最终形成葡萄糖浆。故该过程称为糖化步骤,其最适酶促条件为 pH4. 5, 60℃–62℃^[3, 6]。

β -淀粉酶从糖链的非还原末端顺次水解隔一个 α -1, 4 糖苷键,生成麦芽糖^[7];葡萄糖淀粉酶从糖链的非还原末端顺次水解一个 α -1, 4 糖苷键,生成葡萄糖单位,也能够水解糖链分支点的 α -1, 6 糖苷键,但是水解能力很差^[8];普鲁兰酶能水解分支点的 α -1, 6 糖苷键,从而切下整个侧枝^[2];异淀粉酶也可水解分支点的 α -1, 6 糖苷键,但是不能水解由 2–3 个葡萄糖残基构成的侧枝^[9]。

在酶法工业制糖中,由于液化和糖化步骤的温度差变化,以及液化过程中使用了多种水解酶,这些因素使得淀粉制糖的生产成本增加,同时降低了生产效率。因此,如果能够获得一种在液化条件下具有较强的水解 α -1, 4 和 α -1, 6 糖苷键能力的酶,则

基金项目: 国家自然科学基金(40746030);江苏省教育厅自然科学基金(08KJB550001)

* 通信作者。Tel: +86-518-85895427; Fax: +86-518-85895429; E-mail: shujunwang86@163.com

作者简介: 焦豫良(1980–),男,陕西人,讲师,博士,研究方向为海洋功能基因。E-mail: laioni1980@126.com

收稿日期: 2010-05-25; **修回日期:** 2010-06-24

可以大大降低生产成本。淀粉普鲁兰酶 (amylopullulanase, APU)能够同时切断 α -1,4 和 α -1,6 糖苷键,在淀粉酶解制糖工业中有很大应用优势。高温淀粉普鲁兰酶 (thermostable amylopullulanase, TAPU)由于能够在高温的液化条件下进行糖化作用,可使淀粉制糖的糖化和液化过程合二为一,大大降低生产成本,提高生产效率,和普鲁兰酶相比有很大优势,在淀粉水解酶研究中已成为一个新的热点。国外对于 TAPU 的研究较多,而国内较少,本文就目前关于高温淀粉普鲁兰酶的相关研究内容做以介绍。

1 淀粉普鲁兰酶分类

淀粉水解酶类 (amylolytic enzymes)能水解淀粉的所有类型糖苷键,属于糖苷水解酶类 (glycoside hydrolases)。不同淀粉水解酶在结构和催化机制上有很大不同^[10],基于蛋白序列和结构相似性,可以将其细分为糖苷水解酶 (GH) 的若干个家族^[11],如 α -淀粉酶属于 GH13 家族, β -淀粉酶属于 GH14 家族,葡萄糖淀粉酶属于 GH15 家族等 (表 1)。基于这种分类方法已建立在线的数据库 CAZy (carbohydrate-Active enZymes; <http://afmb.cnrsmrs.fr/CAZY/>)^[11],其中糖苷水解酶类已经具有 118 个家族 (截止 2010 年 6 月)。

表 1 若干水解淀粉的糖苷水解酶家族

Table 1 Several starch-hydrolyzing glycoside hydrolase families

Enzyme	Enzyme Commission Number	GH Family
α -amylase	3. 2. 1. 1	13/57
β -amylase	3. 2. 1. 2	14
glucoamylase	3. 2. 1. 3	15
α -glucosidase	3. 2. 1. 20	4/13/31/63
pullulanase	3. 2. 1. 41	13
amylopullulanase	3. 2. 1. 1/41	13/57
isoamylase	3. 2. 1. 68	13

淀粉普鲁兰酶根据其耐热性,可以分为两大类:高温淀粉普鲁兰酶 (TAPU) 和常温淀粉普鲁兰酶 (mesophilic amylopullulanase)。据统计目前已发现的 TAPU,可被两个糖苷水解酶家族涵盖,即 GH57 和 GH13 家族。例如来自于 *Thermococcus hydrothermalis* 的高温淀粉普鲁兰酶 ThyApu 属于 GH57 家族^[12]。而来自于 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E 的高温淀粉普鲁兰酶 TetApu 则属于 GH13 家族^[13]。来源微生物主要为古菌和细菌,古

菌中为最常被分离的耐高温古菌 *Thermococcus* 和 *Pyrococcus* 两属,细菌中为耐高温细菌 *Thermoanaerobacter* 属。常温淀粉普鲁兰酶则主要来自于 GH13 家族,例如来自于 *Lactobacillus plantarum* L137 的中温淀粉普鲁兰酶 LplApu 属于 GH13 家族^[14]。

目前已发现的 GH57 家族糖苷水解酶,包括淀粉普鲁兰酶,全部是高温酶^[15]。GH57 家族蛋白的耐高温性能的工业价值和酶学机制一直吸引着研究者的目光。GH57 家族的第一个成员被发现于 1988 年,即来自于嗜热细菌 *Dictyoglomus thermophilum* 的一种高温 α -淀粉酶^[16]。该家族目前已经具有 100 多个成员,而对于它们的耐热机制以及催化机制仍知之甚少。众所周知,酶蛋白的三维空间结构信息对于分析酶的催化中心以及反应机制具有重要价值,而 GH57 家族成员的 3D 结构目前还不甚了解。目前已确定 3D 结构的 GH57 家族酶蛋白只有来自于 *Thermococcus litoralis* 的 4- α -葡聚糖转移酶^[17]和来自于 *Thermotoga maritima* 中的 AmyC 酶 (一种 α -

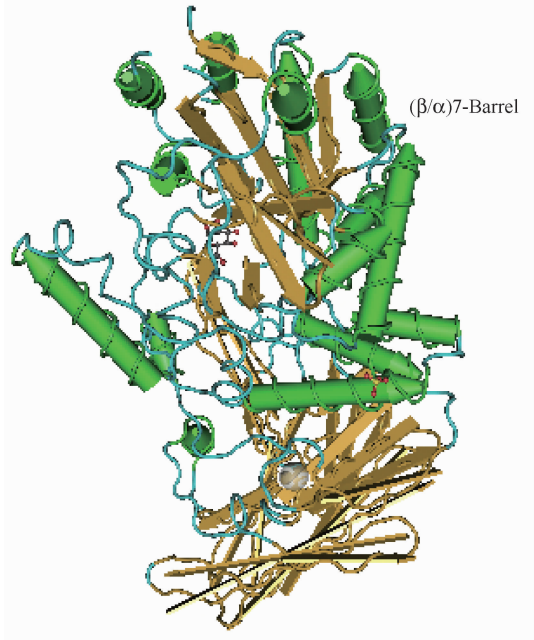


图 1 来源于 *Thermococcus litoralis* 的 4- α -葡聚糖转移酶的 3D 结构

Fig. 1 Three-dimensional structure of GH57 4- α -glucanotransferase (from *Thermococcus litoralis*). The data is from the Protein Data Bank (PDB, ID: 1K1W). The structure is viewed with a visualization tool Cn3D 4.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>).

淀粉酶)^[18],它们的 3D 结构均显示具有一个 (β/α)₇ 桶形折叠 (barrel fold) 结构,是一个不完整的 TIM 桶 [图 1,源于 PDB (ID: 1K1W)]. TIM 桶结构是迄今各种酶蛋白中最常见的三级折叠,最早发现于磷酸丙糖异构酶的结构中^[19],由 (β/α)₈ 构成,即 8 个平行的 β 折叠形成内部 β 桶,外部被 8 个 α 螺旋围绕, β 折叠和 α 螺旋交替排列并通过环区相连。GH13 家族的酶研究较为深入,该家族目前已具有 2000 多个成员,显示出 30 多种酶的特异性,它们都具有有一些相似点^[4]: (1) 在 β 折叠 4、 β 折叠 5 和 β 折叠 7 中分别有天冬氨酸、谷氨酸和天冬氨酸; (2) 保留反应机制 (retaining reaction mechanism),即糖苷键水解后产生的异头碳羟基仍然是原糖苷键中的构型; (3) 均具有 TIM 桶结构,例如 α -淀粉酶。

2 高温淀粉普鲁兰酶功能研究

Mathupala 等^[20]以哺乳动物糖原为底物,研究了来自于 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E 的

GH13 家族高温淀粉普鲁兰酶 TetApu 水解 α -1,4 和 α -1,6 糖苷键的酶活力,水解产物通过纸色谱法和 C¹³核磁共振谱法进行了分析。纸色谱分析表明糖原的水解产物为葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖和麦芽四糖,核磁共振谱进一步证实淀粉普鲁兰酶可以有效水解糖原中的 α -1,4 糖苷键,属于液化型的淀粉酶活性,即 α -淀粉酶活性,并且可以有效水解糖原中所有分支点的 α -1,6 糖苷键。Imamura 等^[21]研究了来自于 *Thermococcus litoralis* 的 4- α -葡聚糖转移酶的 3D 结构,发现其催化中心氨基酸 Glu123 和 Asp214 的空间距离小于 7Å,由此证实 GH57 家族酶类也采取保留机制水解 α -糖苷键。对于 TAPU 的酶学性质研究报道不多,作者统计了 PubMed 数据库中文献报道 (截止 2010 年 6 月),结果如表 2 显示。从表中可以看出,TAPU 的两种酶活性的最适作用温度大约在 80 - 105℃ 之间,最适 pH 值在 5 - 6 之间,均符合淀粉液化条件,能够与 α -淀粉酶相互配合使用,在工业淀粉糖化生产中有很高应用潜力。

表 2 若干高温淀粉普鲁兰酶活性质

Table 2 Enzymatic properties of several thermostable amylopullulanases							
Enzyme	Microorganism	T _{opt} (°C)	pH _{opt}	Pullulanse activity	α-Amylase activity	<i>c</i> (Ca ²⁺) / (mmol/L)	Reference
PfuApu holoenzyme	<i>Pyrococcus furiosus</i>	T _a = T _{pul} = 105	pH _a = pH _{pul} = 6	194 (U/mg)	26 (U/mg)	0. 5	[22]
PfuApu N-terminal region	<i>Pyrococcus furiosus</i>	T _a = T _{apu} = 105	pH _a = pH _{pul} = 6	133 (U/mg)	88 (U/mg)	0. 5	[23]
PwoApu holoenzyme	<i>Pyrococcus woesei</i>	T _a = T _{pul} = 100	pH _a = pH _{pul} = 6	35 (U/mg)	15 (U/mg)	0. 5	[23]
ThyApu N-terminal region	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	T _a = T _{pul} = 105	pH _{pul} = 5. 75 pH _a = 5	25 (U/mg)	7. 2 (U/mg)	0. 09	[24]
TetApuR855 holoenzyme	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 39E	T _a = 80 ; T _{pul} = 75	pH _a = pH _{pul} = 6	16 (Km , mg/ml)	6 (Km , mg/ml)	5	[13]

T_{opt}, optimal temperature; pH_{opt}, optimal pH; subscripts a and apu stand for amylase activity and pullulanase activity respectively.

2.1 高温淀粉普鲁兰酶的 N 端功能区研究

目前已发现的 TAPU 以 GH57 家族为多,包括 ThyApu (*Thermococcus hydrothermalis*)^[24]、PfuApu (*Pyrococcus furiosus*)^[22]、PabApu (*Pyrococcus abyssi*)^[25]、TonApu (*Thermococcus onnurineus*)^[26]、TgaApu (*Thermococcus gammatolerans*)^[27]、TkoApu (*Thermococcus kodakarensis*)^[28]、TliApu (*Thermococcus litoralis*)^[29] 等。GH13 家族报道较少,主要有 TetApu (*Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E)^[13]、TthApu (*Thermoanaerobacter*

thermohydrosulfuricus)^[30] 等。我们根据 GenBank 中已报道的 TAPU 序列进行多重序列比对发现 GH57 家族酶高度保守,尤其是在 N 端部分 (图 2)。GH57 家族 TAPU 与 GH13 家族的酶在氨基酸序列上相比有很大不同,序列相似性很低。我们通过比对 GH57 家族 TAPU 的氨基酸序列,并通过在线的数据库,例如 NCBI conserved domain database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 和 InterProScan program (www.ebi.ac.uk/InterProScan/) 等进行结构域分析,可以预测酶蛋白

由两个不同的功能区构成,即 N 端的糖苷键水解催化功能区 and C 端的质膜结合和底物结合功能区(图 3)。运用 SignalP 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析未成熟的高温普鲁兰酶,发现其 N 端包括一个约 25 个氨基酸的信号肽序列。通过蛋白质测序比较分析发现成熟的酶在转移到细胞外过程中信号肽被切掉。信号肽序列之后为 800 个氨基酸左右的糖苷水解酶功能区。Zona 等^[12] 比对了 59 条 GH57 家族的糖苷水解酶序列,从中发现了 5 个保守模序(motif)。我们将 GH57 家族淀粉普鲁兰酶氨基酸序列进行比对,以 ThyApu 成熟酶 (*Thermococcus hydrothermalis*) 的氨基酸序列编号,这 5 个保守模序分别为 15_HQP (模序 I), 236_GNVEVT (模序 II), 288_WAAESA (模序 III), 382_NYDGSLVYV (模序 IV), 以及 539_AEASDWFWW (模序 V), 见图 2 所示。

通过和其它糖苷水解酶保守区域及活性位点氨基酸比较分析,Zona 等^[12] 认为来自于 *Thermococcus hydrothermalis* 的 GH57 高温淀粉普鲁兰酶 ThyApu 的活性位点氨基酸为位于第 4 个保守区的 Glu291 和位于第 5 个保守区的 Asp394,前者是亲核体,后者是质子供体。进一步通过实验研究发现这两个氨基酸对于淀粉酶活性和普鲁兰酶活性都是必不可少的,并认为淀粉普鲁兰酶的两种酶功能极可能共用了一个催化活性中心。Kang 等^[22] 在对来自于

Pyrococcus furiosus 的 GH57 高温淀粉普鲁兰酶 PfuApu 的研究中认为第 5 个保守区的 Glu396 也是一个亲核体,同上述的 Glu291 和 Asp394 共同构成了一个三联催化体。Mathupala 等^[31] 发现来自于 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E 的 GH13 家族高温淀粉普鲁兰酶 TetApu 有类似的催化三联体, Asp597、Glu626 和 Asp703 构成了一个催化三联体,但是这个活性中心的位置不同于 GH57 家族 TAPU,而是位于类似于 GH57 家族第 4 和第 5 个保守模序之间的位置。

目前发现的 GH57 家族淀粉普鲁兰酶氨基酸长度平均在 1300 个氨基酸左右,但是大部分区域对于酶的活性和热稳定性不是必需的。通过基因工程或蛋白质工程将 N 端功能区或 C 端功能区缩短,对缩短的功能区进行酶活性和热稳定性的分析,则可以逐渐确定出必需的功能区域。Erra-Pujada 等^[24] 克隆了 GH57 高温淀粉普鲁兰酶 ThyApu 基因,编码 1339 个氨基酸,将其 N 端区域克隆并在大肠杆菌表达,纯化后获得 827 个氨基酸的蛋白。酶学实验结果表明该蛋白具有 α -淀粉酶活性和普鲁兰酶活性,同时具有很好的耐热性,证明了糖苷酶水解功能区确实位于 N 端区域,而 C 端区域对于酶活性并非必需。与此类似,在 Lin 等^[13] 对于 GH13 家族高温淀粉普鲁兰酶 TetApu 的研究中,通过比较 C 端缺失酶和全酶的活性发现其 C 端的 100 个氨基酸对与酶

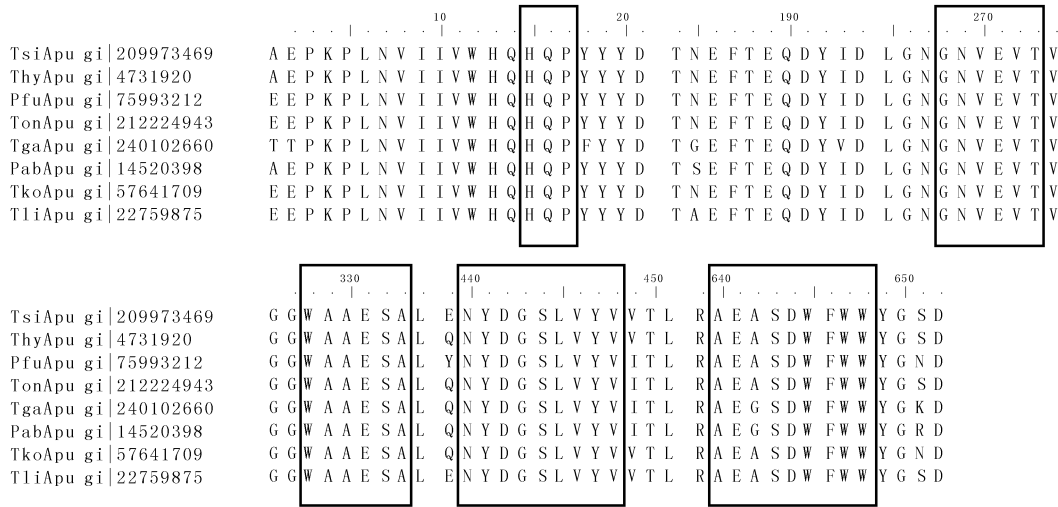


图 2 GH57 家族淀粉普鲁兰酶 N 端保守模序

Fig.2 N-terminal conserved motifs of the GH57 family amylomannanases. The five conserved motifs in GH57 family amylomannanases are outlined with rectangles; gi, GenBank accession number; TsiApu, the amino acid sequence deduced from an amylomannanase gene cloned in our work.

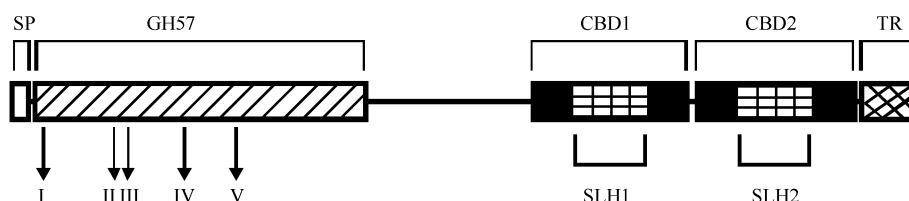


图3 GH57 家族淀粉普鲁兰酶多结构域模式结构

Fig. 3 Multidomain pattern of GH57 family amylopullulanase. SP, signal peptide; GH57, a glycoside hydrolase family 57 conserved domain; CBD1 and CBD2, carbohydrate binding domains (CBDs); TR, a Thr-rich region; I - V, five conserved motifs; SLH1 and SLH2, two repeated surface layer homologs.

活性没有显著性影响。

2.2 高温淀粉普鲁兰酶的 C 端功能区研究

目前的实验研究多集中在 N 端的糖苷水解酶催化位点的研究中, C 端的实验研究较少, 主要通过生物信息学进行分析。根据结构域分析可知, C 端区域包括两个序列相似的重叠区域, 即两个碳水化合物结合结构域 (Carbohydrate binding domain, CBD), 若干 CBD 构成碳水化合物结合模块 (module), 即 CBM。根据 CBM 氨基酸序列相似性可将其分为 59 个家族 (截止 2010 年 6 月), 不同家族的 CBD 对底物结合特异性不同, 例如结合淀粉的 CBD 属于 20 家族^[32]。CBD 具有碳水化合物结合功能, 在各种水解酶中广泛存在, 例如木聚糖酶、 α -淀粉酶等。CBD 不具有催化活性, 但是可以促进不溶解的底物微粒表面与催化中心相互作用, 从而提高水解效率^[32]。本课题组从深海热液口古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 中克隆到一个高温淀粉普鲁兰酶 TsiApu 的基因 (GenBank 登录号 EU849120), 编码 1351 个氨基酸。通过 InterProScan 软件对其编码的氨基酸序列进行分析, 发现与常见 TAPU 不同的是其 C 端具有 CBD9-like 结构域, 而目前研究发现 CBD9 结构域更易于结合纤维素、木聚糖等。TAPU 中的两个重复的 CBD 结构域长度为 200 个氨基酸左右, 其中均还具有一个约 100 个氨基酸的 S-layer (surface layer) 同源区域 (SLH), 该结构域广泛存在于各种微生物胞外多糖水解酶中。存在于 TAPU 中的 SLH 可能通过和肽聚糖, 或者是 SLH 之间的相互作用将酶蛋白连接在细胞膜表面, 而其催化活性中心暴露于培养基中, 催化底物的水解^[33]。有的研究中淀粉普鲁兰酶存在于菌株培养液中, 这可能是由于由于培养条件的影响使得菌株表面的 SLH 连接点改变或丢失, 进而导致连接在细胞表面的酶释放到培养液中。紧邻 CBD 之后是

一个约 50 个氨基酸的富含 Thr 的区域, 该区域通常为密集的 O-糖基或磷酸基化区域^[34, 35]。GH57 和 GH13 家族 TAPU 的结构区别主要存在于 C 端区域。GH13 家族 TAPU 的 C 端区域具有一些独特的结构域, 例如 AmyC 结构域和 III 型纤维连接蛋白 (fibronectin) 等, 前者是一种 GH57 家族的 α -淀粉酶结构域, 对淀粉普鲁兰酶和底物之间的空间定向起作用, 后者辅助结合于酶和多糖底物之间起固定作用^[13, 18]。本课题组表达并纯化出高温淀粉普鲁兰酶 TsiApu 的 N 端功能区, 长度为 773 个氨基酸 (其 C 端 578 氨基酸缺失), 测定了 N 端区域酶活性, 同时测定菌株发酵产生的全酶纯化蛋白的酶活性, 通过比较二者发现 N 端区域的酶活性与全酶相当, 但是耐热性不及全酶, 推测 C 端区域除了上述功能外可能还促进酶的热稳定性。

3 问题和展望

3.1 GH57 家族 TAPU 全酶基因的克隆

GH57 家族 APU 的氨基酸序列长度多在 1000 - 1400 个残基, 其新基因的克隆有一定困难。但是由于它们具有共同的保守模序, 可以针对这些模序设计简并引物 (consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer)^[36], 进行 PCR 扩增获得酶基因的片段, 然后通过基因组步移或者是建基因组文库的方法获得全长基因序列。本课题组即通过对 GH57 家族淀粉普鲁兰酶的保守模序 QHQPYYY 和 EFTEQDY 设计上下游简并引物 (图 2), 通过 PCR 扩增以及对扩增片段两端进行基因组步移从深海热液口古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 中克隆到一个新的 TAPU 基因。

3.2 GH57 家族 TAPU 的全酶异源表达

GH57 家族 TAPU 的全酶基因多在 4 kb 左右, 在常规原核表达载体容量之内 (< 10 kb), 理论上能够克隆表达。Erra-Pujada 等^[24]试图在大肠杆菌表

达 ThyApu (*Thermococcus hydrothermalis*) 全酶蛋白, 结果却失败, 只克隆表达了其 N 端区域并具有酶活性。Kang 等^[22] 在研究 PfuApu 时, 同样未能在大肠杆菌中表达出全酶, 也只表达出了 N 端区域。对本课题组获得的 TAPU 基因所编码的蛋白 TsiApu 进行氨基酸序列分析, 发现其具有 GH57 家族的保守模序(图 2)。有趣的是, 该基因通过 pMal-c2x 表达系统(NEB)在 *E. coli* BL21 中进行表达研究时也遇到了和上述相同的现象。由于 TAPU 的 N 端结构域蛋白的酶活性或耐热性可能不及全酶, 如何高效异源表达 TAPU 蛋白仍是一个需要解决的技术问题。

3.3 TAPU 酶学机制的研究

目前常见的多功能酶主要有葡萄糖基酶(glycosylase; E. C. 3. 2)和肽酶(peptidase; E. C. 3. 4), 通常采用一个催化中心执行一种酶功能的机制。例如 Palackal 等^[37] 报道一种多功能糖苷水解酶同时具有 GH26 家族和 GH5 家族的结构域, 前者赋予该酶甘露聚糖酶活性, 后者赋予该酶木聚糖酶和葡聚糖酶活性。TAPU 的两种水解酶活性之所以能够共用一个催化中心, 可能与催化中心对底物的结构专一性相关, 但是这种专一性由什么因素决定仍有待研究。通过比较研究这个双功能催化中心与单独的催化中心在空间结构、电荷分布等化学性质上的异同点能够使淀粉普鲁兰酶的催化机制得到阐明。此外, GH57 家族 TAPU 的耐热机制研究还不够深入, 目前多通过生物信息学分析进行预测, 尚未见相关实验研究。而通过研究耐热机制或酶活性之间的关系, 对于酶学研究和工业应用都具有很大的意义。

3.4 GH57 家族 TAPU 工业应用研究

众所周知, 普鲁兰酶目前已较成熟地应用于葡萄糖浆、高麦芽糖浆生产中^[37]。虽然在酶法淀粉糖化工业中 GH57 家族 TAPU 比普鲁兰酶有很大优势, 但是对于淀粉普鲁兰酶的应用研究还不足, 这可能和目前发现的 GH57 家族 TAPU 数量少有关, 导致其学术研究和工业应用发展相对缓慢, 积极分离和研究新的 GH57 家族 TAPU 将促进其工业化应用。另外, 由表 2 可以看出, 目前已知的高温淀粉普鲁兰酶的 α -淀粉酶活性相对较弱。研究中除分离筛选具有高 α -淀粉酶活性的 TAPU 之外, 将 TAPU 和酶促条件相近的高温 α -淀粉酶配合使用也将具有一定应用性。本课题组从 *Thermococcus sicuti* HJ21 菌株中克隆并表达高温淀粉普鲁兰酶 N 端功

能区域之外, 在之前的研究中还从该菌株中克隆了高温 α -淀粉酶基因并鉴定了该酶的酶学性质^[5], 我们将对二者的配合使用进行深入研究。

参考文献

- [1] Gomes I, Gomes J, Steiner W. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresource Technology*, 2003, 90 (2): 207-214.
- [2] Ben-Messaoud E, Ben-Ammar Y, Mellouli L, Bejar S. Thermostable pullulanase type I from new isolated *Bacillus thermoleovorans* US105: cloning, sequencing and expression of the gene in *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31 (6): 827-832.
- [3] Leveque E, Janeček Š, Haye B, Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26 (1): 3-14.
- [4] Horváthová V, Godány A, Šturdík E, Janeček Š. α -Amylase from *Thermococcus hydrothermalis*: Re-cloning aimed at the improved expression and hydrolysis of corn starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39 (6): 1300-1305.
- [5] Wang S, Lu Z, Lu M, Qin S, Liu H, Deng X, Lin Q, Chen J. Identification of archaeon-producing hyperthermophilic α -amylase and characterization of the α -amylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80 (4): 605-614.
- [6] Taniguchi H, Honnda Y. Amylases. *Encyclopedia of Microbiology*. Third Edition. San Diego, USA: Academic Press, 2009: 159-173.
- [7] Lin KH, Fu HY, Chan CH, Lo HF, Shih MC, Chang YM, O. Chen LF. Generation and analyses of the transgenic potatoes expressing heterologous thermostable β -amylase. *Plant Science*, 2008, 174 (6): 649-657.
- [8] Aleshin AE, Feng PH, Honzatko RB, Reilly PJ. Crystal structure and evolution of a prokaryotic glucoamylase. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 327 (1): 61-73.
- [9] Park HS, Park JT, Kang HK, Cha H, Kim DS, Kim JW, Park KH. TreX from *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092 displays isoamylase and 4- α -glucanotransferase activities. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71 (5): 1348-1352.
- [10] Horváthová V, Janeček Š, Šturdík E. Amylolytic Enzymes: Molecular Aspects of Their Properties. *General Physiology and Biophysics*, 2001, 20 (1): 7-32.
- [11] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active

- EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (Database issue): D233-238.
- [12] Zona R, Chang-Pi-Hin F, O'Donohue MJ, Janeček Š. Bioinformatics of the glycoside hydrolase family 57 and identification of catalytic residues in amylopullulanase from *Thermococcus hydrothermalis*. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271 (14): 2863-2872.
- [13] Lin HY, Chuang HH, Lin FP. Biochemical characterization of engineered amylopullulanase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E-implicating the non-necessity of its 100 C-terminal amino acid residues. *Extremophiles*, 2008, 12 (5): 641-650.
- [14] Kim JH, Sunako M, Ono H. Characterization of Gene Encoding Amylopullulanase from Plant-Originated Lactic Acid Bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106 (5): 449-459.
- [15] Janeček Š. Amylolytic families of glycoside hydrolases: focus on the family GH57. *Biologia Bratislava*, 2005, 60 (16): 177-184.
- [16] Fukusumi S, Kamizono A, Horinouchi S, Beppu T. Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable amylase gene from an anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*. *European Journal of Biochemistry*, 1988, 174 (1): 15-21.
- [17] Roujeinikova A, Raasch C, Sedelnikova S, Liebl W, Rice DW. Crystal Structure of *Thermotoga maritima* 4- α -Glucanotransferase and its Acarbose Complex: Implications for Substrate Specificity and Catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 321 (1), 149-162.
- [18] Dickmanns A, Ballschmiter M, Liebl W, Ficner R. Structure of the novel α -amylase AmyC from *Thermotoga maritima*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 2006, 62 (Pt3): 262-270.
- [19] Banner DW, Bloomer A, Petsko GA, Phillips DC, Wilson IA. Atomic coordinates for triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1976, 72 (1): 146-155.
- [20] Mathupalal SP, Park JH, Zeikus JG. Evidence for α -1,6 and α -1,4-glucosidic bond cleavage in highly branched glycogen by amylopullulanase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Biotechnology Letters*, 1994, 16 (12): 1311-1316.
- [21] Imamura H, Fushinobu S, Yamamoto M, Kumasaka T, Jeon BS, Wakagi T, Matsuzawa H. Crystal structures of 4- α -glucanotransferase from *Thermococcus litoralis* and its complex with an inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (21): 19378-19386.
- [22] Kang S, Vieille C, Zeikus JG. Identification of *Pyrococcus furiosus* amylopullulanase catalytic residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 66 (4): 408-413.
- [23] Dong G, Vieille C, Zeikus JG. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (9): 3577-3584.
- [24] Erra-Pujada M, Chang-Pi-Hin F, Debeire P, Duchiron F, O'Donohue MJ. Purification and properties of the catalytic domain of the thermostable pullulanase type II from *Thermococcus hydrothermalis*. *Biotechnology Letters*, 2001, 23 (16): 1273-1277.
- [25] Cohen GN, Barbe V, Flament D, Galperin M, Heilig R, Lecompte O, Poch O, Prieur D, Quérellou J, Ripp R, Thierry JC, Van der Oost J, Weissenbach J, Zivanovic Y, Forterre P. An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 47 (6): 1495-1512.
- [26] Lee HS, Kang SG, Bae SS, Lim JK, Cho Y, Kim YJ, Jeon JH, Cha SS, Kwon KK, Kim HT, Park CJ, Lee HW, Kim SI, Chun J, Colwell RR, Kim SJ, Lee JH. The complete genome sequence of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals a mixed heterotrophic and carboxydutrophic metabolism. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (22): 7491-7499.
- [27] Zivanovic Y, Armengaud J, Lagorce A, Leplat C, Guérin P, Dutertre M, Anthouard V, Forterre P, Wincker P, Confalonieri F. Genome analysis and genome-wide proteomics of *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the Archaea. *Genome Biology*, 2009, 10 (6): R70.
- [28] Fukui T, Atomi H, Kanai T, Matsumi R, Fujiwara S, Imanaka T. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus*. *Genome Research*, 2005, 15 (3): 352-363.
- [29] Imamura H, Jeon BS, Wakagi T. Molecular evolution of the ATPase subunit of three archaeal sugar ABC transporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 319 (1): 230-234.
- [30] Mathupala SP, Saha BC, Zeikus JG. Substrate competition and specificity at the active site of amylopullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990, 166 (1): 126-132.
- [31] Mathupala SP, Lowe SE, Podkovyrov SM, Zeikus JG. Sequencing of the amylopullulanase (apu) gene of

- Thermoanaerobacter ethanolicus 39E, and identification of the active site by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(22):16332-16344.
- [32] Christiansen C, Abou Hachem M, Janežek V, Viksø - Nielsen A, Blennow A, Svensson B. The carbohydrate-binding module family 20-diversity, structure, and function. *The FEBS Journal*, 2009, 276(18):5006-5029.
- [33] Francoleon DR, Boonthueung P, Yang Y, Kin U, Ytterberg AJ, Denny PA, Denny PC, Loo JA, Gunsalus RP, Loo RR. S-layer, surface-accessible, and concanavalin A binding proteins of *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei*. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(4):1972-1982.
- [34] Semimaru T, Goto M, Furukawa K, Hayashida S. Functional analysis of the threonine- and serine-rich Gp-1 domain of glucoamylase I from *Aspergillus awamori* var. *Kawachi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(8):2885 - 2890.
- [35] Clark K, Middelbeek J, Morrice NA, Figdor CG, Lasonder E, van Leeuwen FN. Massive autophosphorylation of the Ser/Thr-rich domain controls protein kinase activity of TRPM6 and TRPM7. *PLoS One*, 2008, 3(3):e1876.
- [36] Rose TM. CODEHOP-mediated PCR-a powerful technique for the identification and characterization of viral genomes. *Virology Journal*, 2005, 2: 20.
- [37] Palackal N, Lyon CS, Zaidi S, Luginbühl P, Dupree P, Goubet F, Macomber JL, Short JM, Hazlewood GP, Robertson DE, Steer BA. A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(1): 113-124.
- [38] Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. Maltotriose syrup preparation from pullulan using pullulanase. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(2):401-407.

Structural and functional analysis of GH57 family thermostable amylopullulanase-A review

Yuliang Jiao, Shujun Wang*, Mingsheng Lv

College of Marine Sciences, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China

Abstract: Amylopullulanase (E. C. 3. 2. 1. 1/41) has the enzymatic activities of both α -amylase (E. C. 3. 2. 1. 1) and pullulanase (E. C. 3. 2. 1. 41), and is classified into the glycoside hydrolase 13 and 57 families. Amylopullulanase can hydrolyze both the α -1,4 and α -1,6 glucosidic bonds and is valuable for decreasing cost, increasing both efficiency and dextrose equivalent in starch processing industry. Thermostable amylopullulanase is more valuable in starch saccharification industry due to its capability to catalyze both the liquefaction and saccharification processes under the industrial starch liquefaction condition. In addition, the special bifunctional catalytic mechanism of amylopullulanase is also of great value in enzymology research. The present review focuses on the structure and function of amylopullulanases and provides a brief overview on the latest studies.

Keywords: Thermostable amylopullulanase, Glycoside hydrolase, GH57 family

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40746030) and by the Jiangsu Provincial Education Department Fund for Natural Science (08KJB550001)

* Corresponding author. Tel: +86-518-85895427; Fax: +86-518-85895429; E-mail: shujunwang86@163.com

Received: 25 May 2010/ Revised: 24 June 2010