

N^+ 离子注入诱变选育耐酸性 α -淀粉酶高产菌株

蔡兴旺, 杜连祥, 路福平

(天津科技大学 生物工程学院 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要: 本工作研究低能 N^+ 离子注入中温 α -淀粉酶产生菌 BF7658 的诱变方法。经不同注量的 N^+ 离子注入实验后, 得出 N^+ 离子最佳注量为 $1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, 并筛选获得 1 株耐酸性 α -淀粉酶产量较高的枯草芽孢杆菌突变株。该突变株所产 α -淀粉酶的酶活可达 207 U/mL, 遗传稳定性较好。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 耐酸性中温 α -淀粉酶; 离子注入

中图分类号: S603.6; Q319

文献标志码: A

文章编号: 1000-6931(2011)04-0467-07

Breeding of High Yield Strain Producing Acid-Stable α -Amylase by N^+ Ion Beam Irradiation

CAI Xing-wang, DU Lian-xiang, LU Fu-ping

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* BF7658, which produces medium-temperature α -amylase, was implanted with N^+ ion beam to breed mutants. Under the optimal fluence of $1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, a mutant TCCC 11525 producing the acid-stable and medium-temperature α -amylase was obtained. The activity of the mutagenised enzyme is 207 U/mL.

Key words: *Bacillus subtilis*; acid-stable and medium-temperature α -amylase; ion beam implantation

在我国酿酒等工业的淀粉原料加工过程中, 大多要经过液化和糖化两个阶段, 其中所使用的酶分别为 α -淀粉酶和糖化酶。两种酶的作用 pH 分别约为 6.5 和 4.5, 在两个阶段衔接中加入大量的化学试剂进行酸度调节, 并需在最终产品的获取过程中进行产物纯化。这种工艺流程复杂, 成本高。如能在淀粉加工过程中使用酸性 α -淀粉酶, 使淀粉液化和糖化在同一 pH 下进行, 将对简化淀粉的加工工艺、提高收

得率、降低消耗、增加效益和节约工业用粮起到重要作用。

国内对耐酸性 α -淀粉酶的研究较少, 江南大学生物工程学院在淀粉厂周围酸性土壤中筛选了一株能产生较高酶活耐酸性 α -淀粉酶的嗜热芽孢杆菌^[1]; 四川大学的研究者通过工程技术获得了能产生具有较高酶活的耐酸性 α -淀粉酶的白曲霉工程菌株, 并通过其培养条件的优化, 分离纯化得到了粗酶^[2-3]。但耐酸性

α -淀粉酶的工业化开发在国内尚属空白。因此,研究和开发耐酸性 α -淀粉酶具有重要意义。

离子束育种是1986年由中国科学院等离子体物理研究所开创的一种生物品种改良新技术。经过近20年的发展,该技术已成功地应用于小麦、玉米、番茄、甜菜等多种农作物的品种改良和高产抗生素、酶制剂、氨基酸等微生物的诱变育种中^[4]。由于离子注入具有能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷的中和与交换联合作用等多重效应^[5],因此,离子束诱变育种作为一种新的诱变技术,其诱变效果更加明显^[6]。

本文以目前我国生产的中温中性 α -淀粉酶的菌株枯草芽孢杆菌 BF7658 为出发菌株,采用低能 N^+ 离子注入诱变技术对其进行诱变处理,以研究低能氮离子注入对 BF7658 的诱变效应,并筛选高产耐酸性中温 α -淀粉酶的突变株^[7]。进而进行氮离子注入突变机理分析。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)BF7658,天津科技大学应用微生物实验室提供。

1.2 培养基

初筛培养基:可溶性淀粉 20 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g,琼脂 16~20 g,加水至 1 000 mL, pH=4.0~5.0。

斜面培养基:土豆 200 g,去皮切块,加 1 000 mL 水,文火煮沸 1 h,取其清液,加入 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g,琼脂 20 g, pH 自然,定容至 1 000 mL。

种子培养基:可溶性淀粉 20 g, NaCl 5 g, 蛋白胨 10 g,加水至 1 000 mL。

发酵培养基:玉米粉 90 g,豆饼粉 50 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 8 g, $(NH_4)_2SO_4$ 4 g,无水 $CaCl_2$ 2 g,加水至 1 000 mL。

1.3 菌株培养

取一环斜面培养物,接入装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,于 37 °C 下 160 r/min 振荡培养 14~15 h,然后,以 4% 的接种量接入装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,于 37 °C、160 r/min 下振荡培养 36 h。

1.4 N^+ 离子注入诱变方法

将 BF7658 培养至对数生长期,取 0.1 mL

适当稀释的菌悬液(含 $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL)均匀涂布于无菌培养皿中,用无菌风吹干。离子注入能量为 30 keV,低能离子注入机(TNV-RU UI10.512)靶室真空度 10^{-3} Pa,以 5 s 脉冲式注入,间隔 15 s,单次注量 1×10^{14} cm⁻²。分别采用(5~200) $\times 10^{14}$ cm⁻² 注量进行处理,在每个注量下设置 1 个真空对照培养皿。将经 N^+ 离子注入处理过的培养皿和真空对照的培养皿上的菌体用无菌水洗去,适当稀释后,涂布于初筛培养基平板上,于 37 °C 下培养 48 h 后计数,计算存活率。存活率的计算公式为:注入处理平皿活菌数/真空对照平皿活菌数 $\times 100\%$ 。

1.5 突变株筛选

将 N^+ 离子注入后长出的菌株平行点接在两个初筛培养基平板上,在 37 °C 下培养 48 h。用碘液熏蒸法处理其中 1 个平板,在另一平板上对应挑选透明圈较大的菌株进行摇瓶复筛。

取初筛得到的透明圈较大的单菌落转接于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,于 37 °C、160 r/min 下振荡培养 14~15 h。以 4% 的接种量将培养液转接于装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,于 37 °C、160 r/min 下振荡培养 36 h。将发酵液在 4 °C 下离心(6 000 r/min, 10 min),取上清液,此即粗酶液。测定粗酶液在 pH=5.0 下的 α -淀粉酶活力,选择活力较高的菌株。

1.6 淀粉酶活力测定

根据 QB/T 1803—93^[8] 方法对淀粉酶活力进行测定。

吸取可溶性淀粉溶液 20.0 mL 于试管中,加入缓冲液 5.00 mL,摇匀后,于(60.0 \pm 0.2) °C 恒温水浴中预热 5 min。加入稀释好的待测酶液 1.00 mL,立刻计时,摇匀,准确反应 5 min。立即吸取反应液 1.00 mL 于稀碘液 5.00 mL 中,摇匀,并以稀碘液作空白,于 660 nm 波长下,用 10 mm 比色皿迅速测定其吸光度 A 。根据其吸光度查表 A1^[8],求得待测酶液的浓度 c 。 $X = cn$,其中: X 为样品的酶活力, U/mL; c 为测试酶液的浓度, U/mL; n 为样品的稀释倍数。

1.7 目的基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 中已报道的枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶基因序列,使用 Oligo 6.0 软件设计合成

如下引物:正向引物(P1):5'-GTTGGATCC-CCTTTGCGGTAGT-3';反向引物(P2):5'-CTGGAATTC TCATTGAAAGAATGTGT-TAC-3'。分别以枯草芽孢杆菌 BF7658 和 TCCC 11525 基因组 DNA 为模板进行目的片段的 PCR 扩增。PCR 反应体系为: d₂ H₂ O 17 μL, Buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, 模板 1 μL, 引物 P1 1 μL, 引物 P2 1 μL, Taq 酶 0.5 μL, 总反应体积 25 μL。PCR 反应条件为: 1) 94 °C, 5 min; 2) 94 °C, 30 s; 3) 55 °C, 30 s; 4) 72 °C, 2 min; 5) 回到步骤 2), 34 次; 6) 72 °C, 7 min。PCR 结束后, 取 15 μL PCR 反应产物, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析和回收。将扩增产物克隆到 PUC19 载体中进行测序。

2 结果与讨论

2.1 N⁺ 离子注入效应

1) N⁺ 离子注入对 BF7658 存活率的影响

以 30 keV N⁺ 离子, 在 (5~200) × 10¹⁴ cm⁻² 注量范围内对枯草芽孢杆菌 BF7658 进行离子注入, 测定不同注量下的菌体存活率, 结果如图 1 所示。

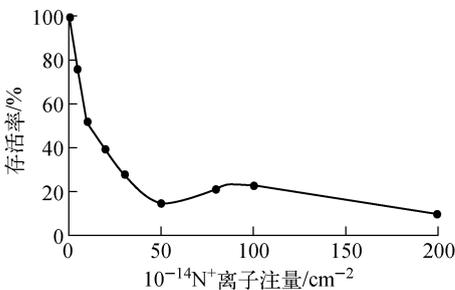


图 1 N⁺ 离子注入对菌株 BF7658 存活率的影响

Fig. 1 Survival rate of BF7658 strain at different fluences

由图 1 可知, 随 N⁺ 离子注量的增加, 菌株存活率曲线呈现较明显的先降后升再降的“马鞍型”变化。小注量注入时, 菌株存活率较高, 随着注量增加, 存活率下降, 当注量增至 5 × 10¹⁵ cm⁻² 时, 存活率降为 16%; 之后, 注量继续增加, 存活率开始上升, 当注量达到 1 × 10¹⁶ cm⁻² 时, 存活率回升到 22%; 而注量增为 2 × 10¹⁶ cm⁻² 时, 菌株存活率又降至仅为 9%。出现这种现象的原因可能是低剂量 N⁺ 离子及

能量沉积所产生的大量自由基导致 DNA 和生物膜等其他生物分子的损伤, 从而造成存活率下降; 注量继续增加时, 由于连续注入电荷的堆积产生很强的库仑力, 从而对被注入细胞形成一“保护屏障”, 阻碍后续注入离子对细胞的损伤, 从而达到对细胞的保护作用, 且大量堆积的电荷可形成一弱电场, 这种电场的刺激效应可激活细胞内的各种修复酶, 从而提高了损伤修复的效率, 此外, 在中等离子注量下所产生的质量沉积效应也可生成新的产物, 这些产物能与细胞内的 DNA 和蛋白质等生物大分子竞争自由基, 从而减轻自由基对细胞的损伤作用, 使得菌株存活率有所回升; 随着离子注量的进一步增加, 能量沉积和动量传递所造成的 DNA 和生物膜等其他生物大分子的严重损伤已超出了其所具有的修复能力, 且大量堆积的电荷达到一定的临界值后会产生库仑爆炸, 其形成的“保护屏障”作用也不复存在, 从而使存活率再次下降^[9-10]。

2) N⁺ 离子注入对 BF7658 突变率的影响

采用不同的 N⁺ 离子注量对 BF7658 进行诱变处理, 分别随机挑取 100 个单菌落进行摇瓶发酵, 测定其粗酶液在不同 pH 下的 α-淀粉酶活力。酶的最适作用 pH 为 5.0 (比出发菌株低 1 个 pH) 或低于 5.0 的单菌落为正突变; 酶的最适作用 pH 为 7.0 (比出发菌株高 1 个 pH) 或高于 7.0 的单菌落为负突变; 酶的最适作用 pH 接近 6.0 为未突变。各处理注量下的突变率如图 2 所示。

由图 2 可看出, 当注量为 (5~10) × 10¹⁵ cm⁻² 时, 正突变率 (16.7%~23.1%) 较高, 同时负突变率 (12.8%~20.4%) 也较高, 而该注量范围恰好对应图 1 中的“马鞍区”。该结果也与文献

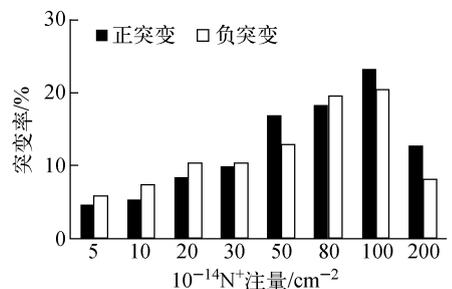


图 2 不同注量下的突变率

Fig. 2 Mutation rate at different fluences

[11]报道的在“马鞍”区域菌株最易发生突变的结果相一致。

2.2 高产耐酸 α -淀粉酶突变株的筛选及突变株性能

挑取诱变处理后产生透明圈的 800 株菌株进行摇瓶复筛,最终筛选得到 1 株耐酸性中温 α -淀粉酶产量较高的突变株,编号为 TCCC 11525 (N^+ 离子注量为 $1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$),如图 3a 所示。

由图 3a 可看出,突变株 TCCC 11525 从

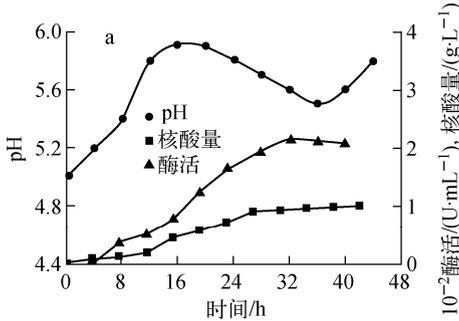


图 3 突变株 TCCC 11525 性能

Fig. 3 Fermentation curves of mutation strain TCCC 11525 in flask

a——发酵过程曲线;b——BF7658 与 TCCC 11525 的 α -淀粉酶的相对酶活

出发菌株 BF7658 所产 α -淀粉酶的最适作用 pH 为 6.0(该 pH 下测得发酵液的酶活为 313 U/mL,以该值为 100%),属中性 α -淀粉酶,该酶在 pH=5.0、4.5 和 4.0 条件下的相对酶活分别为 86%、37% 和 20%;突变株 TCCC 11525 所产 α -淀粉酶的最适作用 pH 为 5.0,较 BF7658 的最适作用 pH 低 1 个单位,属酸性 α -淀粉酶(pH=5.0 下测得发酵液的酶活为 207 U/mL,以该值为 100%),该酶在 pH=4.5 和 4.0 条件下的相对酶活分别为 61% 和 38%,说明突变株 TCCC 11525 所产的酸性 α -淀粉酶对低 pH 具有较好的耐受性。

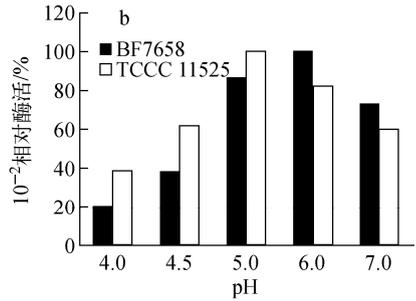
将突变株 TCCC 11525 在斜面上连续传代 7 次,将不同传代次数的菌株在最适条件下进行摇瓶发酵(每代作 5 个平行样),测定发酵液在 pH=5.0 条件下的 α -淀粉酶活力。TCCC 11525 各代摇瓶发酵酸性 α -淀粉酶的酶活基本稳定在 (207 ± 10) U/mL 范围内,说明该菌株遗传稳定性较好。

2.3 α -淀粉酶基因的 PCR 扩增

取 15 μ L PCR 反应产物上样,用 1% 琼脂

8 h 开始进入对数生长期, α -淀粉酶的酶活随菌体量的增加而增强,尤其是在对数期中后期(20~28 h),菌株开始大量产酶;32 h 后进入稳定期,此时菌株产酶速率开始下降;当培养 36 h 时,培养基中 α -淀粉酶的酶活达到最大值 207 U/mL。

测定出发菌株 BF7658 和突变株 TCCC 11525 所产 α -淀粉酶的最适作用 pH 和在偏酸条件下的相对酶活,结果如图 3b 所示。



糖凝胶电泳进行检测,结果示于图 4。从图 4 可看出,在约 1.4 kbp 处获得了 1 条具有明显特异性的条带,扩增所得的目的片段 *amy1* 与 *amy2* 与预期结果相符。

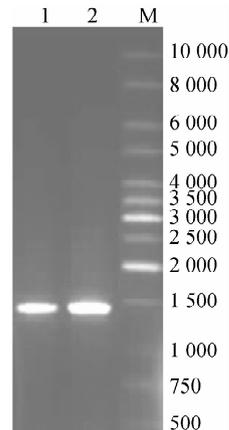


图 4 BF7658 和 TCCC 11525 α -淀粉酶基因的 PCR 产物

Fig. 4 PCR products of α -amylase gene of strain BF7658 and TCCC 11525

M——1 kb DNA ladder; 1——BF7658 的 PCR 产物(*amy1*); 2——TCCC 11525 的 PCR 产物(*amy2*)

对两菌株基因组 DNA 的 PCR 产物进行切胶回收,并以 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。由图 5 可见,回收得到的目的片段 *amy1* 和 *amy2* 的大小与预期结果相符,其纯度也较好。

2.4 重组质粒 pUC-*amy1* 和 pUC-*amy2* 的构建及转化

将 PCR 扩增得到的目的基因 *amy1* 及 *amy2* 进行纯化后,分别用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切,酶切产物再经纯化后,用琼脂糖凝胶电泳检测。同时利用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 将质粒 pUC19 进行双酶切、纯化,最后采用连接试剂盒将目的基因和质粒在 16 °C 连接过夜,构建成重组质粒 pUC-*amy1* 及 pUC-*amy2*(图 6)。

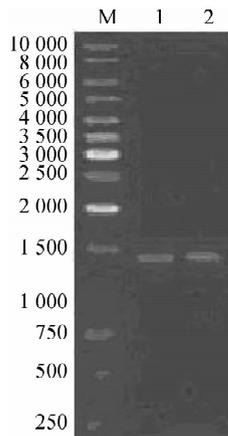


图 5 PCR 产物回收片段电泳图谱

Fig. 5 Electrophoresis of PCR products purification
M—1 kb DNA ladder; 1—*amy1*; 2—*amy2*

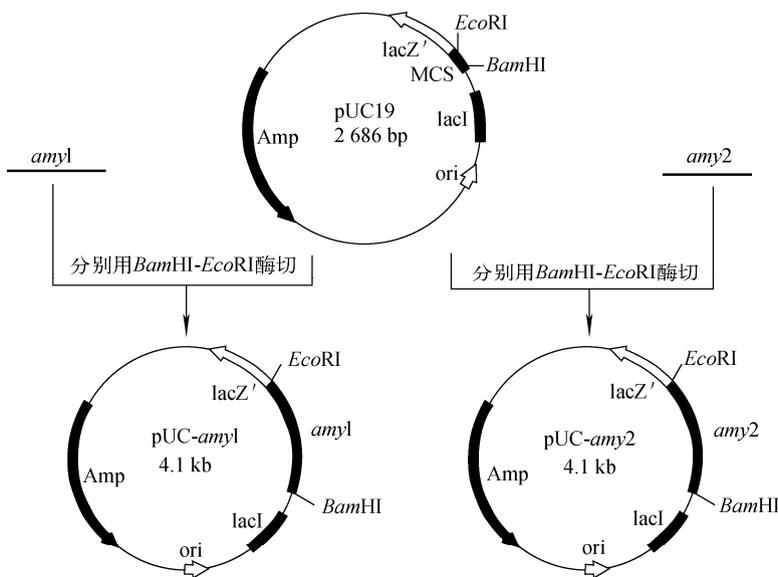


图 6 重组质粒 pUC-*amy1* 及 pUC-*amy2* 的构建示意图

Fig. 6 Sketch of recombinant plasmids construction

2.5 BF7658 和 TCCC 11525 α-淀粉酶基因序列的测定及分析

对包含淀粉酶基因的重组子 pUC-*amy1*/JM109 和 pUC19-*amy2*/JM109 分别进行核苷酸序列测定,由测序结果可知,所得 α-淀粉酶基因全长为 1 431 bp,共编码 477 个氨基酸,其中,信号肽为 41 个氨基酸,成熟肽为 436 个氨基酸。由比对结果可知,两个菌株 α-淀粉酶基因的信号肽序列无差别,说明这一区域非常保守,成熟肽序列部分有 3 个碱基发生突变。利用 DNAMAN 序列分析软件对诱变前后的 α-淀

粉酶成熟肽氨基酸序列进行比对分析,由比对结果可知:成熟肽序列部分突变的 3 个碱基导致了 3 个氨基酸发生突变,分别为 Lys→Thr (93 位)、Ser→Ala (247 位)、Asn→Tyr (359 位),这些突变可能导致 α-淀粉酶耐酸性的提高。本实验为 α-淀粉酶的耐酸机制的揭示提供一定的实验基础。

3 讨论

采用低能 N⁺ 离子注入中温中性 α-淀粉酶产生菌 BF7658,以选育耐酸性中温 α-淀粉酶

的突变株。实验获知, BF7658 的存活率与 N^+ 离子注量间呈现典型的“马鞍型”曲线, 且“马鞍区”对应剂量下所产生的突变率较高, 说明 N^+ 离子束这种诱变因子不同于紫外线或 γ 射线的诱变机制, 且对枯草芽孢杆菌 BF7658 有明显的诱变效应。

采用最佳注量 ($1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$) 对 BF7658 进行 N^+ 离子注入诱变处理, 最终获得 1 株较高分泌耐酸性中温 α -淀粉酶的突变株, 编号 TCCC 11525。该突变株所产 α -淀粉酶的最适

作用 pH 为 5.0, 较出发菌株 BF7658 低 1 个单位, 其产耐酸性中温 α -淀粉酶的酶活可达 (207 ± 10) U/mL, 遗传稳定性较好。实验表明, N^+ 离子注入技术能够应用于耐酸性 α -淀粉酶产生菌的诱变育种中。

对 α -淀粉酶耐酸机制进行了初步探讨(图 7)。由图 7 可知, Lys \rightarrow Thr(93 位)(图 7a, d) 发生在蛋白质的内部, Ser \rightarrow Ala(247 位)(图 7b, e)、Asn \rightarrow Tyr(359 位)(图 7c, f) 分布在蛋白质的表面。

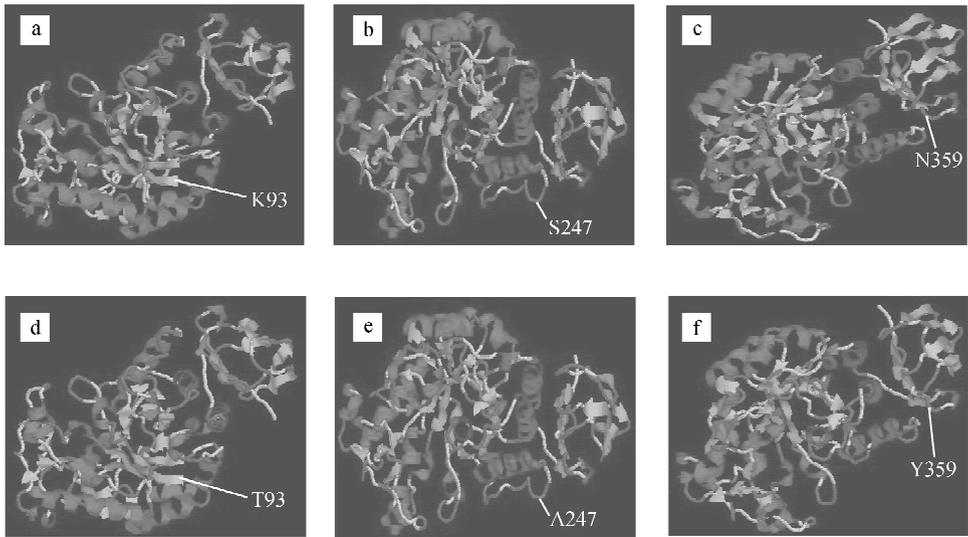


图 7 突变位点在 α -淀粉酶三维结构中的位置

Fig. 7 Position of point mutation in α -amylase

a, b, c——BF7658 α -淀粉酶; d, e, f——TCCC 11525 α -淀粉酶

1) Lys \rightarrow Thr(93 位)

对球状蛋白质形成疏水区和亲水区而言, 亲水区多在蛋白质分子表面, 由很多亲水侧链组成; 疏水区多在分子内部, 由疏水侧链集中构成, 疏水区常形成一些“洞穴”或“口袋”, 某些辅基则镶嵌其中。Thr 的疏水性明显大于 Lys, 分布在蛋白质的内部, 可提高蛋白质的稳定性。另外, 如果酶蛋白中的酸性和碱性氨基酸的含量较低, 则带电量较小, pH 的变化对酶活的影响不大, 可使蛋白更加稳定^[12]。Lys 为碱性氨基酸, 用中性氨基酸 Thr 代替, 可能是 α -淀粉酶具有酸稳定特性的原因。同时通过研究, α -淀粉酶的活性与活性位点有一定关系^[13], 将带正电荷的 Lys 替换为不带电荷的 Thr, 且位于活性位点附近, 之间的空间阻挡较小, 减少了

对活性位点的影响, 对 α -淀粉酶活力的提高较有帮助。

2) Ser \rightarrow Ala(247 位)

用非极性氨基酸 Ala 替代极性氨基酸 Ser, 减少该位点与周围氨基酸的电荷作用, 可能会提高 α -淀粉酶的稳定性。

3) Asn \rightarrow Tyr(359 位)

359 位是形成 β 折叠的第 1 个氨基酸, Tyr 形成 β 折叠的倾向性明显高于 Asn, 有利于蛋白质的稳定。同时研究表明, 近 C-末端的突变对蛋白质的稳定性作用更大^[13]。

参考文献:

- [1] 张丽平, 徐岩. 酸性 α -淀粉酶产生菌的选育的初步研究[J]. 工业微生物, 2002, 32(4): 11-14.

- ZHANG Liping, XU Yan. Selection and breeding of the strain for production of acid ALPA-amylase[J]. Industrial Microbiology, 2002, 32(4): 11-14(in Chinese).
- [2] 刘春莉, 张文学, 杨瑞. 新型耐酸性 α -淀粉酶液态发酵条件的研究[J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2003, 35(1): 63-65.
- LIU Chunli, ZHANG Wenxue, YANG Rui. Production of a novel acid-resistant α -amylase in liquid culture[J]. Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition, 2003, 35(1): 63-65(in Chinese).
- [3] 张文学, 杨瑞, 胡承. 白曲耐酸性 α -淀粉酶的分离和纯化[J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2002, 34(2): 51-56.
- ZHANG Wenxue, YANG Rui, HU Cheng. Separation and purification of acid stable α -amylase from white *qu*[J]. Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition, 2002, 34(2): 51-56(in Chinese).
- [4] 虞龙, 张宁. 离子注入微生物诱变育种的研究与应用进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(2): 80-83.
- YU Long, ZHANG Ning. Advance in research and application of microbial mutation breeding by ion implantation[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(2): 80-83(in Chinese).
- [5] 陈恒雷, 吕杰, 曾宪贤. 离子束诱变育种研究及应用进展[J]. 种子, 2005, 24(6): 45-47.
- CHEN Henglei, LV Jie, ZENG Xianxian. Advances in research and application of mutation breeding with ion beam implantation[J]. Seed, 2005, 24(6): 45-47(in Chinese).
- [6] YU Zengliang. The role of radiation in the cringing and evolution of life [M]. Japan: Kyoto University Press, 2000: 175.
- [7] 戚薇, 王海燕, 王建玲, 等. 氮离子注入选育耐酸性 α -淀粉酶产生菌诱变效应的研究[J]. 天津科技大学学报, 2007, 22(3): 6-8.
- QI Wei, WANG Haiyan, WANG Jianling, et al. Study on mutagenic effects of breeding acid-stable alpha-amylase-producing strain induced by N⁺ ion implantation[J]. Journal of Tianjing University of Science & Technology, 2007, 22(3): 6-8 (in Chinese).
- [8] QB/T 1803—1993 工业酶制剂通用试验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1993.
- [9] 陈宇, 林梓鑫, 张峰, 等. 离子注入微生物的生物效应研究[J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23(6): 415-419.
- CHEN Yu, LIN Zixin, ZHANG Feng, et al. Study on the biological effect of microorganisms by ion beam implantation[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 1998, 23(6): 415-419(in Chinese).
- [10] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 241-246.
- [11] 宋道军, 姚建铭, 邵春林, 等. 离子注入微生物产生“马鞍型”存活曲线的可能作用机制[J]. 核技术, 1999, 22(3): 129-232.
- SONG Daojun, YAO Jianming, SHAO Chunlin, et al. A possible mechanism of dose related survival of microorganism implanted by N⁺ ions[J]. Nuclear Techniques, 1999, 22(3): 129-232 (in Chinese).
- [12] MATZKE J, SCHWERMANN B, BAKKER E P. Acidostable and acidophilic proteins: The example of the α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology A, 1997, 118(3): 475-479.
- [13] 缪可嘉, 张大龙, 马延和, 等. 利用随机突变探讨影响 α -淀粉酶催化活性的氨基酸位点[J]. 食品工业科技, 2007, 28(10): 63-69.
- MIU Kejia, ZHANG Dalong, MA Yanhe, et al. Study on amino acid sites of α -amylase activity by random mutagenesis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(10): 63-69 (in Chinese).