doi: 10.13413/j.cnki.jdxblxb.2023325

麦芽糖酶-葡萄糖淀粉酶 D246A 异源表达及性质表征

高雨晴, 董钢印, 张洪瑞, 马占山, 方 丽, 詹冬玲
(吉林农业大学 食品科学与工程学院, 长春 130118;
吉林农业大学 生物质活性成分研究与高附加值农产品实验室, 长春 130118)

摘要: 以大型真菌灵芝中的麦芽糖酶-葡萄糖淀粉酶(MGAM)为研究对象, 采用同源序列比对、同源模建、底物对接和定点突变等方法成功构建酶活力显著降低的突变体 D246A. 酶学性质表征结果表明: 最适反应温度由野生型(wild type, WT)的 65 ℃减少至 60 ℃, 突变体耐热能力下降; 最适 pH 值由 WT 的 6.0 升高至 7.0, 有利于工程菌生长; 半衰期由 WT 的 2.0 h 下降至 1.5 h, 酶稳定性降低. 酶动力学结果表明: 突变体 D246A 酶动力学曲线符合 Michaelis 方程, 与 WT 相比, K_m 值变大, 表明酶与底物亲和力下降; V_{max} 约降低至原来的 1/4.

关键词: 定点突变; 异源表达; 性质表征; 麦芽糖酶-葡萄糖淀粉酶
中图分类号: Q556 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2024)03-0742-08

Heterologous Expression and Property Characterization of Maltase-Glucoamylase D246A

GAO Yuqing, DONG Gangyin, ZHANG Hongrui, MA Zhanshan, FANG Li, ZHAN Dongling
(*College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun* 130118, *China*;
Laboratory of Biomass Active Ingredient Research and High Value of Agricultural Products, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, *China*)

Abstract: The maltase-glucoamylase (MGAM) from the large fungus *Ganoderma lucidum* as the research object, and a mutant D246A with significantly reduced enzyme activity was successfully constructed by using methods such as homologous sequence alignment, homologous modeling, substrate docking, and site-specific mutation. The characterization results of enzymatic properties show that the optimal reaction temperature decreases from 65 ℃ for wild type (WT) to 60 ℃, and the heat tolerance of the mutant decreases. The optimal pH value increases from 6.0 for WT to 7.0, which is beneficial for the growth of engineering bacteria. The half-life decreases from 2.0 h for WT to 1.5 h, the stability of enzyme decreases. The enzyme kinetics results show that the enzyme kinetics curve of mutant D246A conforms to the Michaelis equation, and compared with the WT, the K_m value increases, indicating a decrease in affinity of enzyme and substrate. V_{max} decreases to 1/4 of its original value.

收稿日期: 2023-07-28.

第一作者简介: 高雨晴(1996—), 女, 汉族, 硕士, 从事生物大分子空间结构改造的研究, E-mail: 1571624810@qq.com.
通信作者简介: 方 丽(1981—), 女, 汉族, 硕士, 高级实验师, 从事酶分子改造的研究, E-mail: fangli1014@126.com; 詹冬玲(1977—), 女, 汉族, 博士, 副教授, 从事食品生物化学的研究, E-mail: zdlgale@126.com.

基金项目: 吉林省自然科学基金(批准号: 20230101262JC).

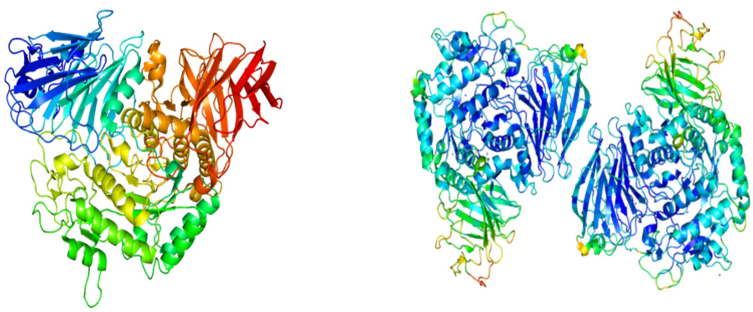
Keywords：site-specific mutation；heterologous expression；property characterization；maltase-glucoamylase

0　引　言

麦芽糖酶-葡萄糖淀粉酶(maltase-glucoamylase，MGAM；EC 3.2.1.20 和 EC 3.2.1.3)，也称为 MG 或 MGA，是一种 α-葡萄糖苷水解酶消化酶，属于糖苷水解酶家族 31 的成员(GH31)[1]. MGAM 是一种小肠膜结合酶，它能水解包含 α-1,4 糖苷键的葡萄糖低聚物或糊精，并在血液中释放葡萄糖，对人体内葡萄糖的生成起关键作用[2-3]. 调节 MGAM 活性在控制餐后高血糖中起重要作用，对 2 型糖尿病的治疗具有深远意义[4-5].

目前对 MGAM 的研究主要集中在外源化合物或植物提取物对 MGAM 抑制效果的影响方面. Mehrban 等[6]选择四嘧啶稠杂环化合物与 MGAM-C/N 结合，对接评估表明，这些配体与 MGAM-C/N 的结合特性几乎与阿卡波糖(α-葡萄糖苷酶抑制剂药物)相似，分别在 MGAM C-末端与 Tyr 1251 和 MGAM N-末端与 Arg 526 建立了氢键，增强了配体与 MGAM-C/N 的亲和能力. 刘伟[7]报道了鸡血藤、五倍子、丹参和青果提取物均能显著抑制 α-葡萄糖苷酶活性，抑制作用均明显强于阿卡波糖. 以上研究结果为开发安全有效的 α-葡萄糖苷酶抑制剂提供了理论依据.

目前，MGAM-N 和 MGAM-C 末端晶体结构均已被解析(图 1)，但对 MGAM-N/C 自身结构改造的研究较少，且目前对 MGAM 的研究多集中于人和动物. 本文以大型真菌灵芝中的 MGAM 为研究对象，结合生物信息学方法，通过与底物对硝基苯基-β-*D*-吡喃半乳糖苷(pNPG)对接，选择关键氨基酸残基进行定点突变，并对突变体进行酶学性质表征，通过对 D246 位点考察底物对 MGAM 的影响，研究其对酶活力的影响及在灵芝代谢中的作用，为研制新型 α-葡萄糖苷酶抑制剂提供一种新思路，为帮助治疗 2 型糖尿病提供理论依据.



(A) MGAM-N　　(B) MGAM-C

图 1　MGAM-N/C 末端结构

Fig. 1　Terminal structure of MGAM-N/C

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　菌株、质粒与培养基

灵芝购自农业农村部食用菌加工技术集成科研基地；重组大肠杆菌菌株(pET-15b-MGAM)、表达宿主(*Escherichia coli*)BL21(DE3)和质粒 pET-15b 均由吉林农业大学生物质活性成分研究与农产品高值化实验室保存.

LB 培养基：质量分数分别为 0.5%的酵母提取物、1%的胰蛋白胨、1%的氯化钠和 2%的琼脂粉.

1.1.2　试　剂

Ni SepharoseTM6 Fast Flow 购自美国 General Electric 公司；核酸电泳 Marker(DL2000，DL15000)和预染彩虹蛋白 Marker (10 000～190 000)购自大连美仑生物技术有限公司；质粒小提试剂

盒和DNA胶回收试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)和氨苄青霉素(Amp)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司.

1.2 仪器与设备

梯度PCR仪(SureCycler 8800型，美国Agilent公司)；蛋白电泳仪(DYY-11型，拓赫机电科技(上海)有限公司)；琼脂糖凝胶呈像仪(WFH-201BJ型，美国GE公司)；多功能酶标仪(FLUOstar Omega型，德国BMG公司)；电泳仪电源(SE260型，美国GE Healthcare Bio-Sciences AB公司)；蛋白印迹半干转膜仪(Trans-Blot SDCell型，美国BIO-RAD公司)；超声波细胞破碎仪(JY88-Ⅱ型，江苏天翎仪器有限公司).

1.3 方 法

1.3.1 重要残基位点的确定

利用NCBI数据库中Protein Blast程序进行同源蛋白晶体搜索，利用SWISS-MODEL在线服务器(https://swissmodel.expasy.org/interactive#sequence)对MGAM进行同源模建，利用SAVES v5.0服务器(http://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/?job=315211)对MGAM三维结构模型进行评分，利用软件COACH-D在线服务(http://yanglab.nankai.edu.cn/COACH-D/)对结合位点底物pNPG进行预测，利用Auto Dock进行对接，确定酶与底物结合区域的重要残基位点，选取密切相关的保守残基位点进行定点突变.

1.3.2 突变体引物设计

利用CE Design软件进行D246位点引物设计，由长春库美生物进行合成，引物序列为

F：5′-ACGAACTGGGCCCGCGCCGCCGCCGAC-3′；

R：5′-GCGCGGGCCCAGTTCGTCTGGATGGTAC-3′.

1.3.3 突变体的构建

以实验室保存且构建成功的重组质粒pET-15b-MGAM为模板，在D246A引物作用下进行突变PCR，条件为：94 ℃预变性1 min；94 ℃变性1 min，56 ℃退火1 min，72 ℃延伸10 min(以上3步循环18次)；72 ℃保温10 min. 将PCR产物进行质量分数为1%的核酸电泳验证.

1.3.4 目的基因诱导表达及分离纯化

将突变重组菌株以1%的接种量接入含有氨苄青霉素的LB培养基中培养，加入终浓度1 mmol/L的IPTG进行诱导表达. 诱导结束后进行高速低温离心，弃上清液，菌体重悬，经超声破碎后再次收集的上清液即为粗酶液. 粗酶液经Ni-NTA亲和层析，用不同浓度咪唑进行洗脱，收集纯化[8].

1.3.5 SDS-PAGE电泳

按文献[9]对MGAM粗酶液和纯化液进行SDS-PAGE电泳验证.

1.3.6 酶活力测定

野生型(WT)和突变体(D246A)的酶活力测定方法参考文献[10]，每个样品测定3次平行.

1.3.7 酶学性质分析

1) 最适温度. 以浓度为0.01 mol/L硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷(pNPG)为底物，分别在不同温度(30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80 ℃)下反应10 min，测定酶活. 最高酶活定义为100%，计算相对酶活，每个温度测定3次平行，根据相对酶活确定重组酶的最适温度.

2) 最适pH值. 以pNPG为底物，加入不同pH值的缓冲液(pH=4.5,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,9.0,9.5,10.0)，在最适温度下反应10 min，最高酶活定义为100%，计算相对酶活，每个pH测定3次平行，确定重组酶的最适pH值.

3) 稳定性. 取适量纯酶液在最适温度、最适反应pH值下，采用同样方法测定重组酶的酶活. 将0时刻的酶活定义为100%，之后每隔0.5 h测定一次，计算相对酶活，共测量8次.

1.3.8 数据处理

每组实验重复测定3次，用SPSS19.0软件进行统计学数据分析，用Origin 2021软件做图.

2　结果与分析

2.1　关键残基位点的确定

MGAM 模型的评分结果如图 2 所示. 由图 2(A)可见，经多重序列比对，MGAM 与 α-葡萄糖苷酶蛋白 PBD 3W37 同源性达 36.44%，同源性 30%以上即可用于建模，所以采用 SWISS-MODEL 进行初始三维建模. 由图 2(B)可见，MGAM 模型经 QMEAN 评分为 0.64，说明模型与模板蛋白的匹配度符合标准.

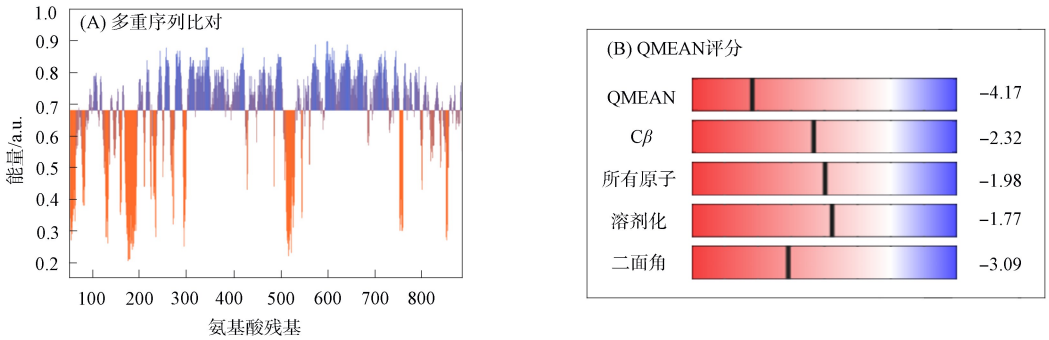


图 2　多重序列比对(A)及 MGAM 模型的评分结果(B)

Fig. 2　Multiple sequence alignment (A) and scoring results of MGAM model (B)

通过 Autodock 4.2 程序将底物 pNPG 和酶进行分子对接，其最优构象能量图如图 3 所示. 由图 3 可见，得到的最优构象能量为－22.61 kJ/mol. 将活性中心的残基 T270，D246，S272，E728，R746，P752 通过 FoldX 进行丙氨酸扫描计算，发现 D246 的能量变化最大，推测其可能对酶的活力变化有重大作用. 图 4 为酶与底物对接平面图. 由图 4 可见，酶与底物分子对接后，在底物结合口袋的周围有多个重要残基位点，其中 Ile676 和 Ser675 与底物之间有 1 个氢键连接，Asp246 与底物之间有 3 个氢键连接.

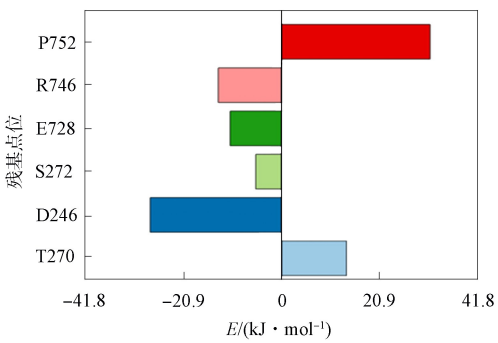


图 3　底物与酶分子对接最优构象能量图

Fig. 3　Optimal conformational energy diagram of substrate enzyme molecule docking

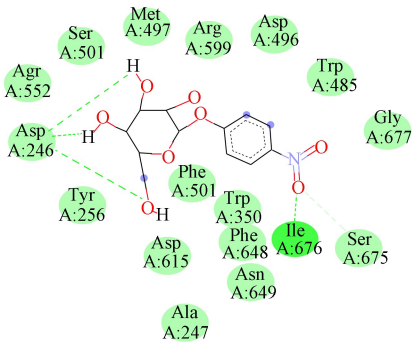


图 4　酶与底物对接平面图

Fig. 4　Plan view of enzyme-substrate interface docking

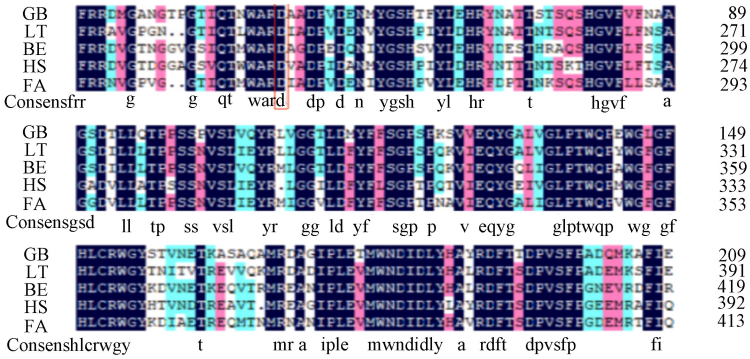
图 5 为部分同源序列比对结果. 由图 5 可见：Phe266，Arg267，Arg268，Ala243，Arg245，Asp246，Asp249 和 Pro250 等残基位点均为绝对保守位点；相比于突变为 Ser 和 Lys，Asp246 突变为 Ala 更稳定，能量更低. 因此，选取绝对保守且与 pNPG 密切相关的关键残基位点 D246A 进行单一定点突变.

2.2　全质粒 PCR 获得突变体 D246A

全质粒 PCR 结果如图 6 所示. 由图 6 可见，条带 1，2，3，4 在 8 000～9 000 bp 有明显的条带，WT 和 D246A 核酸的相对分子质量与预期一致，经测序表明突变成功，证明全质粒 PCR 实验成功.

2.3　SDS-PAGE 验证

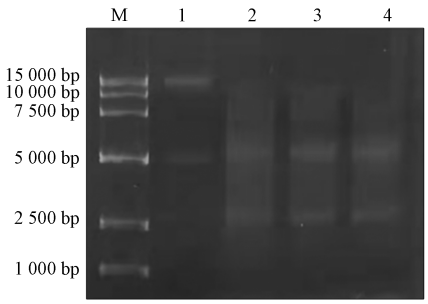
SDS-PAGE 验证结果如图 7 所示. 由图 7 可见，条带 4 为粗酶液电泳结果，条带 2，3 为经过 Ni 柱分离纯化的纯化液电泳结果. 结果表明，在约 90 000 处出现纯化酶的目的条带，即 MGAM 蛋白诱导表达、分离纯化成功.



GB: *Ganoderma boninense* (100%); LT: *Lentinus tigrinus ALCF2SS-7* (49.13%); BE: *Brazilian edible mushroom* (45.46%); FA: *Flammula alnicola* (46.83%); HS: *Heliocybe sulcata* (45.51%).

图5 部分同源序列比对结果

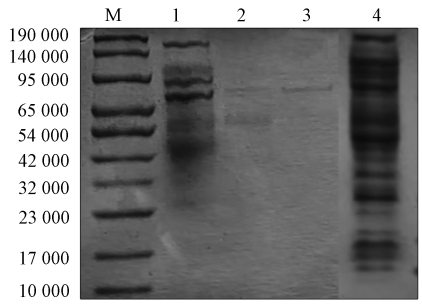
Fig. 5 Partial homologous sequence alignment result



M: Marker; 1: WT 粗酶液; 2~4: D246A.

图6 全质粒 PCR 结果

Fig. 6 Results of whole plasmid PCR



M: Marker; 1,4: MGAM 粗酶液; 2,3: D246A.

图7 MGAM 粗酶液的 SDS-PAGE 蛋白电泳图

Fig. 7 Protein electrophoresis of SDS-PAGE of MGAM crude enzymes

2.4 野生型和突变体的酶学性质表征

2.4.1 温度和 pH 值对酶活力的影响

温度和 pH 值对 WT 和 D246A 酶活力的影响如图 8 所示. 由图 8(A)可见，随着温度的升高，WT 和 D246A 的空间构象逐渐形成，酶的活性逐渐变高. 当温度为 60 ℃时，D246A 的空间构象达到最佳状态，但 WT 的相对酶活力未达到 100%. 当温度为 65 ℃时，WT 的空间构象达到最佳状态. 通过二者对比发现进行定点突变之后酶的最适温度没有比 WT 高，即 D246A 的嗜热能力并未增强. 由图 8(B)可见，WT 的最适 pH 值为 6.0，D246A 的最适 pH 值为 7.0，此时酶的空间构象达到最佳状态. 通过二者对比发现进行定点突变后酶的最适 pH 值变大. 最适 pH 值增大有利于工程菌生长.

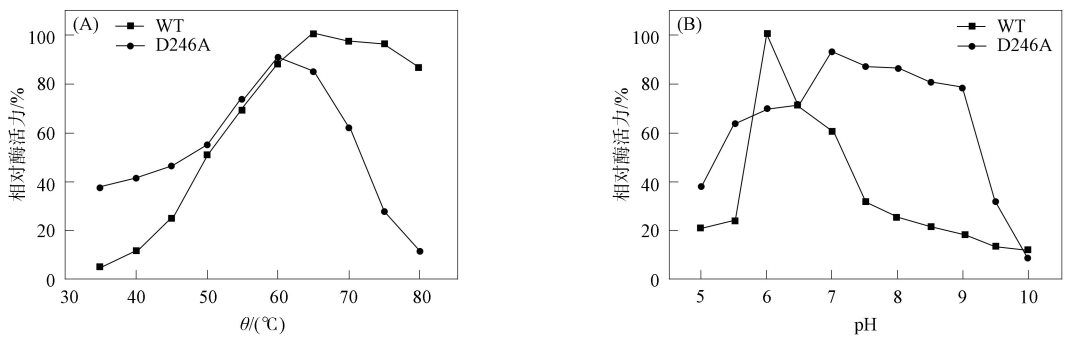


图8 温度(A)和 pH 值(B)对 WT 和 D246A 酶活力的影响

Fig. 8 Effects of temperature (A) and pH value (B) on enzyme activity of WT and D246A

2.4.2 酶的稳定性

WT 和 D246A 的稳定性如图 9 所示. 由图 9 可见，在最适温度和最适 pH 值的条件下，在 0.5 h

时，WT 和 D246A 相对酶的活力均可达 60%以上，在 1 h 后，D246A 的相对酶活力降到 50%以下，但此时 WT 的相对酶活力仍在 60%以上. 可见，D246A 不如 WT 的热稳定性好.

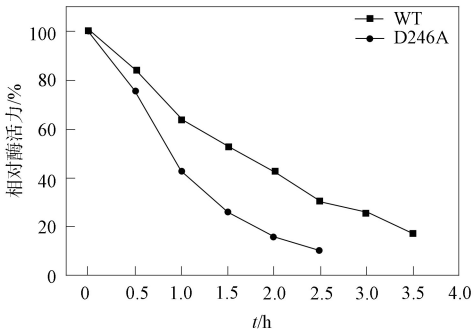


图 9　WT 和 D246A 的稳定性

Fig. 9　Stability of WT and D246A

2.4.3　金属离子对 WT 和 D246A 相对酶活力的影响

金属离子对 WT 和 D246A 相对酶活力的影响分别列于表 1 和表 2. 由表 1 和表 2 可见，Na^+ 和 K^+ 对 WT 和 D246A 的酶活力均有抑制作用. 中低浓度的 Cu^{2+} 对 WT 和 D246A 的酶活力有明显的激活作用，而当 $c(Cu^{2+})=10$ mmol/L 时，Cu^{2+} 对 D246A 呈抑制作用. Al^{3+} 和 Fe^{3+} 对 WT 和 D246A 的酶活力均无激活作用，且低浓度大于高浓度时的抑制作用.

表 1　金属离子对 WT 相对酶活力的影响

Table 1　Effects of metal ions on relative enzyme activity of WT　%

金属离子	c/(mmol·L^{-1})			
	1	2	5	10
Na^+	78.42±1.56	69.84±1.77	68.26±0.89	79.84±1.71
K^+	70.23±1.57	74.52±1.86	69.62±0.99	69.47±1.21
Cu^{2+}	102.12±1.25	161.23±3.12	170.23±2.87	171.23±2.35
Mg^{2+}	78.82±0.89	75.15±1.32	77.24±1.51	77.65±2.37
Al^{3+}	69.44±0.54	71.82±1.37	85.65±1.89	92.83±2.24
Fe^{3+}	87.33±1.25	88.91±1.68	93.82±1.97	98.46±2.23

表 2　金属离子对 D246A 相对酶活力的影响

Table 2　Effects of metal ions on relative enzyme activity of D246A　%

金属离子	c/(mmol·L^{-1})			
	1	2	5	10
Na^+	78.42±1.38	69.89±1.27	68.24±1.02	79.93±1.54
K^+	70.26±0.87	70.35±1.15	68.62±1.69	69.44±1.98
Cu^{2+}	102.74±1.41	164.54±2.45	170.46±2.68	84.28±1.34
Mg^{2+}	81.78±1.28	74.32±0.91	77.27±0.42	77.62±0.83
Al^{3+}	69.43±0.64	73.18±1.08	85.65±2.56	91.65±1.44
Fe^{3+}	87.32±1.07	89.93±0.59	92.84±1.48	98.44±1.33

2.4.4　有机溶剂对 WT 和 D246A 相对酶活力的影响

有机溶剂对 WT 和 D246A 相对酶活力的影响分别列于表 3 和表 4. 由表 3 和表 4 可见，不同浓度有机溶剂对 WT 和 D246A 的相对酶活力产生不同影响. 当甲醇浓度为 5，10 mmol/L 时，对 D246A 呈抑制作用，但对 WT 呈激活作用. 当 DMSO 浓度为 5，10，15 mmol/L 时，对 WT 和 D246A 均呈激活作用，且对 WT 的激活作用更大. 当乙醇浓度为 5 mmol/L 时，对 WT 和 D246A 均呈抑制作用，而浓度为 10 mmol/L 时，对 WT 和 D246A 均呈激活作用. 当丙三醇浓度为 5，10 mmol/L 时，对 WT 呈激活作用，而对 D246A 呈抑制作用.

表 3　有机溶剂对 WT 相对酶活力的影响

Table 3　Effects of organic solvents on relative enzyme activity of WT　%

有机溶剂	c/(mmol·L^{-1})			
	5	10	15	25
甲醇	104.32±1.63	106.32±1.28	10.47±0.45	54.95±0.68
乙醇	84.26±1.35	110.52±1.58	96.62±1.33	60.32±0.83
DMSO	112.45±0.69	118.23±1.85	125.59±1.57	74.65±0.81
丙三醇	107.62±1.42	113.32±1.66	118.64±0.94	94.26±0.88

表4 有机溶剂对D246A相对酶活力的影响

Table 4 Effects of organic solvents on relative enzyme activity of D246A %

有机溶剂	c/(mmol·L^{-1})			
	5	10	15	25
甲醇	98.23±1.22	96.83±1.83	97.75±0.83	100.72±0.45
乙醇	98.06±0.61	103.14±0.83	110.44±1.49	110.84±1.56
DMSO	100.75±0.76	104.32±1.23	101.53±1.34	101.96±1.89
丙三醇	98.84±1.54	99.28±0.83	102.35±1.24	99.62±0.44

2.5 WT和D246A的动力学分析

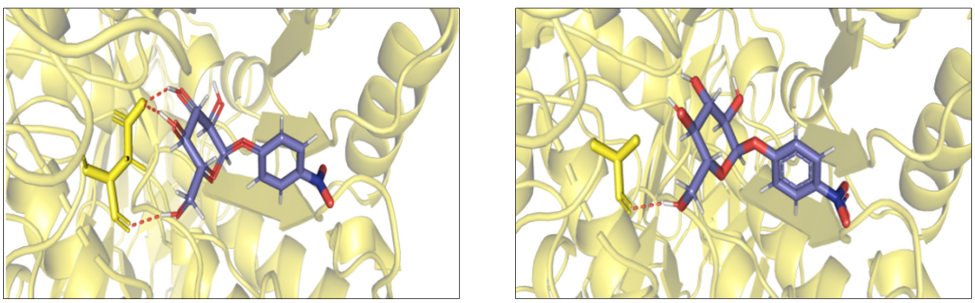
WT和D246A的动力学参数列于表5. 由表5可见，与WT相比，D246A的K_m变大，酶对底物的亲和力降低，V_{max}约降至其1/4.

表5 WT和D246A的动力学参数

Table 5 Kinetic parameters of WT and D246A

菌株类型	V_{max}/(μmol·(mL·min)$^{-1}$)	K_m
WT	6.47	1.13
D246A	1.68	1.29

图10为酶与底物结合的示意图，其中图10(A)为WT的第246位点Asp与底物结合位点图，图10(B)为D246A的第246位点Ala与底物结合位点图. 由图10可见，第246位点由极性带负电的天冬氨酸突变为非极性的丙氨酸后，酶与底物结合紧密度发生改变. WT与底物之间由3个氢键连接变为1个氢键连接，D246A与底物结合时氢键数目减少. 这可能因为该点主要参与底物结合，影响了结合口袋的形状，单点氨基酸的改变，使得与底物结合不牢固，空间构象发生变化，新的空间构象不利于酶对底物的亲核进攻，从而使酶活力下降.



(A) WT与底物结合 (B) D246A与底物结合

图10 酶与底物结合示意图

Fig. 10 Schematic diagram of enzyme-substrate binding

综上所述，本文利用生物信息学方法，确定了MGAM的重要位点D246，并对其进行定点突变，获得突变体D246A. 对野生型和突变体进行酶学性质表征的结果表明：突变体D246A较WT最适反应温度下降，最适反应pH值升高，稳定性下降，酶活力下降，即突变获得成功；突变体D246A比WT的K_m大，V_{max}约降至其1/4，即突变体对底物的亲和力下降，可能是因为突变体与底物结合时氢键数目减少，与底物结合不牢固，新的空间构象不利于酶对底物的亲核进攻所致. 以上研究结果为MGAM的筛选和工业化应用提供了理论依据.

参 考 文 献

[1] REN L M, CAO X F, GENG P, et al. Study of the Inhibition of Two Human Maltase-Glucoamylases Catalytic Domains by Different Alpha-Glucosidase Inhibitors [J]. Carbohydr Res, 2011, 346(17): 2688-2692.

[2] JONES K, SIM L, MOHAN S, et al. Mapping the Intestinal Alpha-Glucogenic Enzyme Specificities of Starch Digesting Maltase-Glucoamylase and Sucrase-Isomaltase [J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19(13): 3929-3934.

[3] QUEZADA-ALVILLO R, SIM L, AO Z H, et al. Luminal Starch Substrate "Brake" on Maltase-Glucoamylase

Activity Is Located within the Glucoamylase Subunit[1-3] [J]. J Nutr, 2008, 138: 685-692.

[4] NICHOLS B L, QUEZADA-CALVILLO R, ROBAYO-TORRES C C, et al. Mucosal Maltase-Glucoamylase Plays a Crucial Role in Starch Digestion and Prandial Glucose Homeostasis of Mice[1-3] [J]. J Nutr, 2009, 139: 684-690.

[5] MEHRABAN M H, MOTOVALI-BASHI M, GHASEMI Y. MiR-26a and miR-26b Downregulate the Expression of Sucrase-Isomaltase Enzyme: A New Chapter in Diabetes Treatment [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(1): 192-197.

[6] MEHRBAN M H, MANSOURIAN M, AHRARI S, et al. Maltase-Glucoamylase Inhibition Potency and Cytotoxicity of Pyrimidine-Fused Compounds: An *in silico* and *in vitro* Approach [J]. Comput Biol Chem, 2019, 82: 25-36.

[7] 刘伟. 中药提取物抑制 α-葡萄糖苷酶的活性研究 [J]. 黑龙江医药, 2009, 22(3): 288-289. (LIU W. Studies on the Activity of Herbal Extracts in Inhibiting Alpha-Glucosidase [J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2009, 22(3): 288-289.)

[8] 王丰，刘进元. N 末端缺失萝卜谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶的表达、纯化及结构预测 [J]. 吉林大学学报(理学版), 2008, 46(1): 148-153. (WANG F, LIU J Y. Expression, Purification of a Recombinant N-Terminal 32 Amino Acids Deletion Radish PHGPx [J]. Journal of Jilin University (Science Edition), 2008, 46(1): 148-153.)

[9] 高云娜，韩彩静，詹冬玲，等. 北京棒杆菌天冬氨酸激酶 M372I-T379S 双突变体的构建及其酶学性质 [J]. 吉林大学学报(理学版), 2019, 57(5): 1267-1274. (GAO Y N, HAN C J, ZHAN D L, et al. Construction and Enzymatic Properties of Double Mutant M372I-T379S of Aspartokinase from *Corynebacterium pekinense* [J]. Journal of Jilin University (Science Edition), 2019, 57(5): 1267-1274.)

[10] 温艳云. 三种木糖苷酶的重组表达及其酶学性质研究 [D]. 长春：东北师范大学, 2020. (WEN Y Y. Recombinant Expression and Characterization of Three Novel Xylosidases [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2020.)

(责任编辑：单　凝)