

# 嗜热酶耐热机制及提高酶热稳定性的研究进展

吴穗洁<sup>1</sup>, 吴文林<sup>2</sup>, 刘斌<sup>3\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 泉州师范学院生物系, 福建 泉州 362000; 3. 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** 嗜热酶因其在高温条件下特殊的耐受及催化功能, 在工农业生产方面有着广阔的应用前景。本文从蛋白质一级结构、高级结构的特点和环境因素的影响几方面, 简要概述了近年来在耐热机理这一领域的研究进展, 并介绍了常用的有效提高酶稳定性的方法。

**关键词:** 嗜热酶; 耐热性; 耐热机制; 稳定性改造

**中图分类号:** Q939.129      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1673-0925(2006)04-0293-05

Advances in mechanisms of thermostability of thermozymes and strategies for thermostabilization

WU Suijie, WU Wenlin, LIU Bin

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 2. Department of Biological Sciences, Quanzhou Teachers College, Quanzhou, Fujian 362000, China; 3. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract:** Thermozymes have received increasing research interest due to their thermostability and optimal activity at high temperatures and potential application in various industrial processes and markets. This paper gives a brief overview of the advance in the mechanisms of thermostability encompassing the effects of the primary structure and advanced structure of the protein and some environmental factors. Moreover, some useful protein thermostability engineering methods were introduced.

**Key words:** thermozyme; thermostability; mechanism of thermostability; thermostability engineering

自1969年从美国黄石国家公园分离出第1个严格意义的水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*)嗜热菌以来, 已有超过70个属140种嗜热菌被发现, 包括矿泉古生菌界嗜热菌、宽广古生菌界嗜热菌、细菌域嗜热菌 (高温神袍菌、产水细杆菌、产芽孢高温菌、非芽孢高温菌)等<sup>[1]</sup>。理论及现实证据表明, 超嗜热菌 (hyperthermophile)可能是地球上形成的第一类生命形式<sup>[2]</sup>, 其高温、高压、低氧的生存环境与早期地质环境相似, 研究它对探索生命起源具有重要意义。

嗜热菌的代谢过程和特殊的生物学功能, 是由在极端条件下的酶和蛋白质的功能所决定的。从这些嗜热极端微生物中分离出来的酶具有极高的热稳定性、pH稳定性和耐受物理、化学变性剂的优良特性, 在工农业生产中具有巨大的应用价值, 引起了研究者广泛的关注和兴趣。与常温酶相比, 嗜热酶作为生物催化剂有许多优势<sup>[3]</sup>。(1)加快了动力学反应。(2)对反应的冷却系统要求降低, 因而降低了能耗, 既可降低成本, 又可减少冷却过程对环境造成的污染。(3)稳定性提高, 可在室温下分离、提纯和包装运输, 并长时间保持活性。(4)在嗜热酶催化反应的条件下 (大于60℃), 减少了杂菌的污染, 从而减少了细菌的代谢产物对产品的污染, 可提高产物的纯度, 简化提纯过程。(5)生化过程在高温下进行, 能改善底物如淀粉、纤维素、脂类的溶解性和可利用性, 降低有机化合物的黏度而利于物质的扩散和混合。(6)能耐受物理和化学变性剂 (表面活性剂、有机溶剂), 极端pH等。基于上述优点, 嗜热菌、超嗜热菌及其产生的嗜热酶在食品、化工、制药、能源开发和环境保护等领域具有广阔的应用前景。

同时, 嗜热酶还被生物学家、化学家、物理学家广泛作为一种模式来探索酶的进化、蛋白质热稳定性

收稿日期: 2006-08-19

作者简介: 吴穗洁 (1982-), 女, 硕士研究生。研究方向: 嗜热酶。

\* 通讯作者: 刘斌 (1969-), 男, 副教授。研究蛋白质方向: 嗜热微生物, 嗜热酶和高温病毒。

的分子机制、蛋白质结构与功能关系及极端环境条件下的生物催化机制。这些研究成果有助于进一步通过基因工程的手段改造获得具有独特生物学特性、更稳定高效的嗜热酶。

## 1 嗜热酶的耐热机制

决定嗜热的主要机制是蛋白质质的热稳定性。酶蛋白在氨基酸顺序排列成一级结构的基础上,通过疏水作用、氢键、盐键和静电作用等次级键再折叠成对活力发挥关键作用的二、三级结构。蛋白质空间构象上的微妙差异和外界微环境的影响,使得嗜热酶表现出比常温酶更强的热稳定性,更有利于其在高温条件下发挥催化功能。

### 1.1 蛋白质一级结构的热稳定性

嗜热酶的热稳定性是内在的。在蛋白质一级结构研究中,通过嗜热菌和常温菌蛋白质氨基酸组成的比较,发现嗜热菌蛋白质中 Ala、Pro、Arg、Glu 的含量均高于常温菌,而 Asn、Gln、Cys、Trp、Val、Ile、Thr 的含量显著低于常温菌。主要是因为 Ala 易于螺旋结构的形成<sup>[4]</sup>; Pro 由于其结构熵比其它氨基酸小而更易折叠,且一旦折叠则需要很高的能量才能解折叠,这样在不影响其高级结构的前提下,Pro 的替代可以提高整个蛋白质分子的热稳定性<sup>[5]</sup>; Arg 和 Glu 分别比带同种电荷的氨基酸有更大的侧链,侧链所提供的疏水作用及离子间相互作用有助于提高蛋白质的热稳定性<sup>[6]</sup>。但由于在螺旋排布中,有 C $\beta$  支链的氨基酸 (Val、Ile、Thr) 产生较大的构象张力<sup>[7]</sup>,在高温下蛋白质中 Asn 和 Glu 的脱氨作用<sup>[8]</sup>, Cys 和 Trp 的氧化降解作用导致非酶促不可逆反应 (不可逆修饰) 造成酶失活,所以这些不稳定氨基酸在嗜热酶中出现频率较低。

### 1.2 蛋白质天然构象的热稳定性

氨基酸的组成决定了嗜热酶的一级结构,尽管嗜热酶与同源常温酶具有较高的序列同源性 (40%—85%) 但构成蛋白质高级结构的非共价力 (疏水作用、氢键、离子键) 作用的不同,使嗜热酶在高温条件下更趋向于折叠形成具有高整体稳定性和催化活性的空间结构。应用 X 光晶体衍射和核磁共振技术对晶体结构进行分析,结果表明疏水作用是蛋白质折叠的主要驱动力,由于疏水作用形成一个蛋白质疏水核心,对蛋白质核心的紧密包裹有助于提高蛋白质的热稳定性<sup>[9]</sup>。另一方面,通过定点突变和结构比较证实,氢键在蛋白质的稳定性上起重要作用,在 RNase T1 的研究中,氢键能为酶构象的稳定提供 110 kcal·mol<sup>-1</sup> 的能量<sup>[10]</sup>。离子键并非对所有蛋白质的耐热性都有显著的贡献,但却是提高超嗜热酶 (其中疏水效应较小) 稳定性的重要机制。由于超嗜热酶中带电残基比率较高,特别是 Arg 的大量存在参与离子对形成,在蛋白质分子表面及亚基之间通过静电相互作用形成离子网状结构,维持蛋白质二级结构的稳定性,增强其刚性<sup>[11]</sup>。目前对嗜热酶结构的刚性与酶热稳定性相关性的研究表明,多数决定耐热性的因素与酶结构柔性的减少相联系,即嗜热酶比其同源常温酶的刚性更强,增加的刚性对保持其催化活性,防止其解折叠非常重要。与常温酶相比,嗜热酶更倾向于形成较长的  $\alpha$  螺旋结构和较短的表面环;并通过一系列疏水作用、氢键、离子键等非共价力的共同作用,使亚基之间发生相互作用形成寡聚体,表面环被锚定在相同或其它亚基的相邻区域,蛋白质的氨基端与羧基端包埋于疏水口袋中或形成彼此相互交织的结构,这些变化促进了嗜热酶的二级结构间和结构域间的相互作用,增加了蛋白质的紧密性而减少了其柔性,防止升温引起的终端区解链,在酶的高级结构的稳定性上起重要作用。

### 1.3 环境因素对嗜热酶热稳定性的影响

大多数嗜热酶有其固有的热稳定性,而一些嗜热菌胞内酶则通过细胞内环境因素 (盐离子浓度、底物、分子伴侣、压力、辅酶) 来提高酶的耐热性。与其它离子相比, K<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 通过影响水分子作用,和相邻残基形成离子键、配位键起到类似二硫键的桥连作用,从而稳定酶分子的三维结构<sup>[12]</sup>。某些底物分子也可以通过稳定酶分子的活性位点来使其适应高温环境<sup>[13]</sup>。当环境温度达到最高生长温度并接近胞内蛋白质与酶的变性温度时,分子伴侣通过重新折叠来保护其它蛋白质及酶的活性<sup>[14]</sup>。此外,应用超高压 (50 MPa 以上) 也可使酶结构紧凑,疏水作用更稳定<sup>[15]</sup>; 辅酶和一般的稳定因子 (甘油、乙二醇、山梨糖醇、环多磷酸盐、2,3-二磷酸甘油酸等) 也是一些重要的环境稳定因子。

不同的嗜热酶其耐热机制不同,存在明显的复杂性。对某一特定的酶而言,不同的耐热机制所起的作

用也不同,有的酶耐热机制单一,有的则是几种因素共同作用的结果。

## 2 提高嗜热酶耐热性的方法

酶的热稳定理论上限温度为  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[16]</sup>。若在大自然中无法发现,可以通过各种改造工程得到,从而满足高温条件下工业生产的特殊需要,为优化工艺流程开辟一条新的途径。

### 2.1 基因工程和蛋白质工程

近年来,基因工程技术和蛋白质工程技术的不断创新和完善,使极端嗜热酶的大规模生产和应用成为现实。应用这些方法有效提高了原有酶的产率,改善了酶的催化活性,增强了酶的稳定性,极大地拓宽了酶的应用。以下为常用技术。

**2.1.1 突变技术** 通过改变酶基因中个别核苷酸而产生新的酶一级结构,一级结构上氨基酸的不同在疏水作用、氢键、盐键等非共价力的影响下导致蛋白质高级空间构象的差异,从而使酶具有新的特性,更有利于人类利用。突变通常可分为随机突变和定点突变两种。随机突变通过理化诱变因子作用于活细胞使其基因自然突变,然后从突变体中筛选有用的个体,但该方法往往容易产生致死突变而使其应用相对具有局限性。相比之下,定点突变技术可以通过体外基因操作,对已知序列基因中任意指定位置的核苷酸进行有目的和有预见的置换、插入或删除来获得突变的酶基因。特别是随着结构生物学、计算机科学技术的发展和完善,积累了大量有关嗜热酶一级结构和高级结构的数据资料,为计算机辅助蛋白质设计提供了许多关于蛋白质柔性和刚性结构域的信息,通过软件在不同条件下模拟蛋白质三维空间构象,使得定点突变技术能够更有效、更有针对性地用于构建目的突变,增加蛋白质的内在稳定性。Mraibet et al<sup>[17]</sup>将 *Bacillus subtilis* 中 3 磷酸甘油醛脱氢酶的 281 位的 Glu 突变为 Arg 通过亚基间形成离子键使酶稳定性提高,结果半衰期由  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  下 19 min 延长到  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  下 198 min。Kirino et al<sup>[18]</sup>通过构建 3 异丙基苹果酸脱氢酶的突变体,同时将 Glu256 替换为 Leu, Met259 替换为 Val 结果表明,由于亚基间疏水相互作用,酶的二聚体结构在高温下更加稳定,对热的耐受性更强。

**2.1.2 定向分子进化技术** 由于对嗜热酶的嗜热机制和其三维结构的认知有限,加上突变技术只能改变酶蛋白质中有限的氨基酸残基,对酶功能的改造非常有限,使得突变技术在应用中存在很大局限性。相比较而言,定向分子进化技术的发展避免了这些制约因素,为获得新型酶提供了新的途径。运用基因嵌合酶、易错 PCR 和 DNA 体外随机拼接技术将同源基因进行 DNA 改组 (DNA Shuffling), 产生新的基因库,通过体外表达筛选具有优良特性的突变体。与 *B. subtilis* 本身固有的硝基酯酶相比,经过 5 轮易错 PCR 和 1 次 DNA 改组后得到的重组酶最适温度提高了  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 且任何温度下的催化活力都显著提高<sup>[19]</sup>。另外, *B. subtilis* 枯草杆菌蛋白酶 E 经过 1 轮易错 PCR 1 次 DNA 改组、外加 4 轮易错 PCR 后得到的酶,其最适温度提高了  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 酶活提高了 15 倍,  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  下半衰期延长了 200 倍<sup>[20]</sup>。

定向分子进化技术有着突变技术无法比拟的优点,它通过多代遗传将突变积累起来,可以大大改进和拓展酶的功能。同时研究结果还表明,该技术对于同一个酶而言,可以同时提高酶的催化活性和热稳定性。

**2.1.3 翻译后修饰** 目前,为了嗜热酶向产业化方向发展,人们利用基因工程技术在中温宿主如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中大量表达嗜热酶,避免了多数嗜热菌 (包括古菌) 因培养条件严格、生长缓慢、产酶量低,不利于分离纯化等不利因素。大多数来自嗜热菌和超嗜热菌的嗜热酶在 *E. coli* 中表达后仍保留了野生型酶的基本生化特性,包括正确的折叠方式、热稳定性和高温条件下的催化活力。但研究表明,少数来自超嗜热菌的蛋白质需要经过翻译后修饰 (如糖基化、赖氨酸甲基化) 或特定的分子伴侣的帮助才能形成稳定的空间构象,发挥其最佳催化功能。 *Sulfolobus solfataricus* 中的 5' 亚甲腺苷磷酸化酶依赖于形成一个含有 6 个亚基间二硫键的六聚复合体而发挥功能,在 *E. coli* 中形成错误的二硫键而导致热稳定性和催化功能显著降低<sup>[21]</sup>。可能是需要宿主体内特定的分子伴侣来协助完成正确的折叠。将 *Bacillus* 中的  $\beta$  葡聚糖酶分别在 *E. coli* 和芽殖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中进行表达,具有糖基化修饰的酶最适温度较高,在  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  下的动力学稳定性也明显提高<sup>[22]</sup>。在一些 *S. Sulfolobus* 的蛋白中还存在翻译后赖氨酸的甲基化修饰。将来源于 *S. acidocaldarius* 的 DNA 结合蛋白质 Sac7d 在 *E. coli* 中表达,得到的重组蛋白由于 Lys 位点缺少甲基化作用,在 pH 6.0 的条件下热稳定性下降,解折叠温度降低了  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[23]</sup>。

可见尽管多数嗜热酶在原核表达系统 ( $E. coli$ ) 中仍保持其本身一定的耐热性和催化活性, 但通过更换基因表达体系, 在酵母、真菌和嗜热菌中克隆、表达嗜热酶, 有助于蛋白质的翻译后修饰, 经翻译后修饰的酶在不改变蛋白质分子折叠方式和构象的同时, 可防止解折叠, 显著提高酶的热稳定性。

## 2.2 酶固定化

酶的固定化 (immobilization of enzymes) 是用固体材料将酶束缚或限制于一定区域内, 进行其特有的催化反应, 并可回收及重复使用的一类技术。依据酶的性质及用途, 在不影响其活性中心的前提下, 通过物理吸附或离子吸附的方法将酶蛋白固着于活性炭、几丁质、离子交换树脂等非水溶性载体上, 或用聚丙烯酰胺凝胶、卡拉胶、海藻酸盐等将酶包埋或微囊化处理, 借助重氮法、肽键法、烷基化、芳香化等方法使酶蛋白分子上的官能团和固相支持物表面上的反应基团之间通过共价键形成固定化酶。从而提高酶分子结构的稳定性, 消除逆性因子的作用, 保持其高效、专一的催化特性, 并可在生产中反复连续使用。α-葡聚糖苷酶经壳聚糖固定化后, 最适温度比游离酶提高了 5 °C, 且酸碱稳定性、热稳定性及贮存稳定性均有较大提高<sup>[24]</sup>。

## 2.3 化学修饰

利用化学手段将某些化学物质或基团结合到酶分子上, 通过增加酶蛋白的氢键、离子键和内部的疏水作用起到稳定酶的空间构象的作用。主要方法有以下几种。

2.3.1 酶功能基团的修饰 可采用甲基乙酰胺盐等单功能试剂与酶的表面基团进行反应, 或用乙基咪唑等化学修饰剂使酶的某些氨基酸残基乙基化、乙酰化来提高酶的稳定性。如用苯四酸酐酰化 α-胰凝乳蛋白酶表面的氨基, 形成亲水性更强的  $-NHCH_2COOH$  结果使酶抗不可逆热失活的稳定性在 60 °C 时提高了 1000 倍。

2.3.2 酶分子内或分子间交联 应用某些双功能试剂 (右旋糖苷溴化氰、羰二亚胺、戊二醛等) 两端的功能基团使酶分子内或分子间肽链的 2 个游离氨基发生交联而有助于酶蛋白更好地适应高温环境。

2.3.3 酶与高分子化合物结合 酶与高分子化合物 (聚乙二醇、聚乙烯醇等) 结合, 形成氢键, 有利于增大表面张力和溶液黏度, 减少蛋白质水解从而起到稳定酶的作用。将 PEG 6000 作为一种修饰剂与超氧化物歧化酶 (SOD) 相连, 在酶蛋白外围形成一个保护膜, 有效抵抗了热、酸、碱对酶的破坏, 使其在 70 °C 下 3 h 后的活性残余率达 65.7%, 比天然 SOD 提高了 37.2%<sup>[25]</sup>。

## 2.4 添加稳定剂

最近的研究发现, 嗜热菌和超嗜热菌细胞内所含的某些物质, 对提高酶在高温下的活性具有促进作用。研究人员从超高温菌 *Archaeoglobus fulgidus* 中提取出一种被称为 1, 1'-二甘油磷酸 (1, 1'-diglycerol phosphate) 的物质 (简称 DGP)<sup>[26]</sup>。它是一种蛋白质稳定剂, 可以极大地提高兔肌脱氢酶和面包酵母乙醇脱氢酶等常温酶类在 50 °C 高温下的活性。

## 3 展望

随着近几十年来对嗜热酶的研究日益深入, 科研人员发现了大量具有新特性、潜在应用价值的嗜热酶, 并对其耐热机制作了深入研究, 取得了显著成果, 为今后嗜热酶的改造、产业化提供了理论依据。但也存在诸多问题, 如多数嗜热酶仍未被发现; 基因工程中缺乏有效的以嗜热菌作为表达宿主的基因转移体系 (尤其是古菌); 嗜热酶的刚性和柔性对酶稳定性和催化活性的影响; 以及可用于嗜热酶改造的新方法、新技术仍有待于进一步探索。

随着酶工程研究和酶工程产业化, 以及生物信息学的不断发展, 尤其是现代生物技术、蛋白质工程、人工合成模拟酶技术、蛋白质全新设计概念、生物压印技术、酶的定向固定化技术、酶化学技术、非水酶学技术的日益成熟, 在体外对极端酶进行修饰和改造将成为可能, 从而更好地解决生物工程和化学工业中的棘手问题, 令嗜热酶的开发和应用呈现出更加诱人的前景。

## 参考文献:

[1] 和致中, 彭谦, 陈俊英. 高温菌生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.

- [ 2 ] SIETTER K Q Hyperthermophiles in the history of life [ J ]. *Ciba Found Symp* 1996 202: 1—10
- [ 3 ] 王顺民. 嗜热酶的研究及其在食品等相关工业的应用 [ J ]. *山西食品工业*, 2004 (3): 2—4
- [ 4 ] ARGOSP ROSSMANN MG GRAU UM et al Thermal stability and protein structure [ J ]. *Biochemistry* 1979 18 (25): 5698—5703
- [ 5 ] SRIRAPUNDH D VIELLE C ZEKUS J G Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity analysis by site directed mutagenesis [ J ]. *Protein Eng* 2000 13 (4): 259—265
- [ 6 ] BAISONG L GUOLIW PEITANG H A comparison of amino acid composition of protein from thermophiles and mesophiles [ J ]. *Acta Microbiologica Sinica* 1998 38 (1): 20—25
- [ 7 ] FACCHIANO AM COLONNA G RAGONE R Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study [ J ]. *Protein Eng* 1998 11 (9): 753—760
- [ 8 ] CHIKAWA J K CLARKE S A highly active protein repair enzyme from an extreme thermophile: the *L*-isocaproyl methyl transferase from *Thermotoga maritima* [ J ]. *Arch Biochem Biophys* 1998 358 (2): 222—231
- [ 9 ] DILL KA Dominant forces in protein folding [ J ]. *Biochemistry* 1990 29 (31): 7133—7155
- [ 10 ] SHIRLEY B A STANSSENS P HAHN U et al Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1 [ J ]. *Biochemistry* 1992 31 (3): 725—732
- [ 11 ] RAHMAN RNZA FUJWARA S NAKAMURA H et al Ion pairs involved in maintaining a thermostable structure of glutamate dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 248 (3): 920—926
- [ 12 ] BREITUNG J BORNER G SCHOLZ S et al Salt dependence kinetic properties and catalytic mechanism of *N*-formylmethanofuran tetrahydromethanopterin formyltransferase from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri* [ J ]. *Eur J Biochem* 1992 210 (3): 971—981
- [ 13 ] WILQUET V GASPARD JA VAN DE LANDE M et al Purification and characterization of recombinant *Thermotoga maritima* dihydrofolate reductase [ J ]. *Eur J Biochem* 1998 255 (3): 628—637
- [ 14 ] EVERLY C ALBERTO J Stressors stress and survival overview [ J ]. *Front Biosci* 2000 5: 780—786
- [ 15 ] MICHELS P C CLARK D S Pressure enhanced activity and stability of a hyperthermophilic protease from a deep sea methanogen [ J ]. *Appl Environ Microbiol* 1997 63 (10): 3985—3991
- [ 16 ] 吴军林, 林炜铁, 杨继国. 嗜高温酶的研究及应用 [ J ]. *广州食品工业科技*, 2002 19 (1): 60—62
- [ 17 ] MRABET N T VAN DEN BROECK A VAN DEN BRANDE J et al Arginine residues as stabilizing elements in proteins [ J ]. *Biochemistry* 1992 31: 2239—2253
- [ 18 ] KRNO H AOKIM AOSHIMA M et al Hydrophobic interaction at the subunit interface contributes to the thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extreme thermophile *Thermus thermophilus* [ J ]. *Eur J Biochem* 1994 220 (1): 275—281
- [ 19 ] GMER L GERSHENSON A FRESK GARD P et al Directed evolution of a thermostable esterase [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95 (22): 12809—12813
- [ 20 ] ZHAO H ARNOLD F H Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermolysin [ J ]. *Protein Eng* 1999 12 (1): 47—53
- [ 21 ] CACCIAPUOTIG FUSCO S CAIAZZO N et al Heterologous expression of 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the recombinant protein and involvement of disulfide bonds in thermophilicity and thermostability [ J ]. *Protein Expression Purif* 1999 16 (1): 125—135
- [ 22 ] OLSEN Q THOMSEN K K Improvement of bacterial  $\beta$ -glucanase thermostability by glycosylation [ J ]. *J Gen Microbiol* 1991 137 (3): 579—585
- [ 23 ] MCAFEE J G EDMONDSON S P DATTA P K et al Gene cloning expression and characterization of the Sac7 proteins from the hyperthermophile *Sulfolobus acidocaldarius* [ J ]. *Biochemistry* 1995 34 (31): 10063—10077
- [ 24 ] 岳振峰, 彭志英, 徐建祥, 等. 壳聚糖固定化  $\alpha$ -葡聚糖苷酶的性质研究 [ J ]. *食品与发酵工业*, 2001 27 (4): 20—24
- [ 25 ] 尹亮, 赵树进. 聚乙二醇修饰超氧化物歧化酶稳定性变化的研究 [ J ]. *生物技术*, 2003 13 (4): 29—30
- [ 26 ] LAMOSA P BURKE A PEISER R et al Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate: a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* [ J ]. *Appl Environ Microbiol* 2000 66 (5): 1974—1979