

真核 α -L-鼠李糖苷酶的 碳水化合物结合结构域功能架构分析

蔡雨晨, 曹博瀚, 巩建业, 李利君, 倪辉

(集美大学食品与生物工程学院, 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建厦门 361021)

摘要: 为了分析位于CAZy数据库的CBM67家族的真核 α -L-鼠李糖苷酶的CBM的功能, 利用ExPASy网站和MEGA 6.0软件进行CBM67家族的真核 α -L-鼠李糖苷酶的理化性质分析、进化树的构建, 发现CBM67家族的真核 α -L-鼠李糖苷酶可被分为三大类, 且大部分为疏水性蛋白, 氨基酸数量范围为239~377个, 分子量(Mr)范围为24540.58~40740.16 u, 等电点(pI)范围为3.93~8.74, 负电荷残基总数范围为20~29个, 正电荷残基总数范围6~33个, 原子总数范围为3415~5712, 亲水性平均系数范围为-0.077~0.377,; 通过ClustalX 2.0程序和Esript网站进行序列比对分析确定CBM67家族真核 α -L-鼠李糖苷酶CBM所在的氨基酸区域。采用Discovery Studio 2019软件进行同源建模和分子对接, 构建出由12个 β 折叠组成的 α -L-鼠李糖苷酶CBM三维结构, 与L-鼠李糖进行分子对接的结果表明CBM能够通过与底物产生强的氢键和范德华力来识别底物, 促进酶水解反应的发生。这有助于更好的理解CBM识别并结合底物的结构基础与共性规律, 从而为提高CBM的结合力提供理论指导。

关键词: α -L-鼠李糖苷酶; CBM理化性质分析; 进化树; 序列比对分析; 同源建模; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2020)01-156-162

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.1.022

Functional and Structural Analysis of Carbohydrate-binding Module of Eukaryotic α -L-rhamnosidase

CAI Yu-chen, CAO Bo-han, GONG Jian-ye, LI Li-jun, NI Hui

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering Technology of Fujian Province, Xiamen 361021, China)

Abstract: The analyses of the physicochemical properties and the construction of the phylogenetic tree for the eukaryotic α -L-rhamnosidase CBM were performed using ExPASy website and MEGA 6.0 software, in order to analyze the function of CBM in the CBM67 family of eukaryotic α -L-rhamnosidase located in the CAZy database. It was found that the eukaryotic α -L-rhamnosidase CBM can be divided into three major classes, and most are hydrophobic proteins, with the number of amino acids in the range of 239~377, molecular weight (Mr) in the range of 24540.58~40740.16 u, isoelectric point (pI) in the range of 3.93~8.74, total number of negatively charged residues in the range of 20~29, total number of positively charged residues in the range of 6~33, total number of atoms in the range of 3415~5712, and average hydrophilicity coefficient in the range of -0.077~0.377. The amino acid region of the eukaryotic α -L-rhamnosidase CBM in the CBM67 family was determined by sequence alignment analysis using the ClustalX 2.0 program and the Esript website. Using the Discovery Studio 2019 software for homology modeling and molecular docking, the three-dimensional structure of α -L-rhamnosidase CBM consisting of 12 β -sheets was constructed. The molecular docking with L-rhamnose revealed that CBM could recognize substrates through producing strong hydrogen bonds and van der Waals forces with L-rhamnose, to promote the occurrence of enzymatic hydrolysis. These results will help us understand better the structural basis and common approaches for CBM to recognize and bind to the substrate, thus, provide theoretical guidance for improving the binding of CBM.

Key words: α -L-rhamnosidase; CBM physicochemical properties analysis; phylogenetic tree; sequence alignment analysis; homology modeling; molecular docking

收稿日期: 2019-07-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1805235)

作者简介: 蔡雨晨 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学与食品生物技术

通讯作者: 李利君 (1973-), 女, 教授, 研究方向: 蛋白质工程

早在 1950 年, Reese 等人^[1]就认为传统意义上的纤维素酶将天然的纤维素水解需要分两步。后来, Gilkes 等人^[2]的研究发现了碳水化合物结合结构域 (Carbohydrate-binding module, CBM), CBM 是酶的一个独立结构域且能够自主折叠并发挥功能, 广泛存在于纤维素酶、半纤维素降解酶等水解酶中, 是一个没有催化活性的部位, 但在促进酶水解碳水化合物(尤其是不溶性碳水化合物)的过程中起着关键作用^[3]。据相关研究证实, 将 *Streptomyces olivaceoviridis* 木聚糖酶中的 CBM 去掉, 不溶性木聚糖就无法被水解, 但是可溶性木聚糖仍然可以被水解^[4]。故 CBM 只对酶水解不溶性底物发挥特殊作用, 辅助催化结构域 (catalytic domain, CD) 降解底物^[5,6]。研究发现有的 CBM 家族具有结合纤维晶体的表面, CBM 的带电氨基酸可以形成氢键, 并与氨基酸残基产生堆积效应, 促进与不溶性底物结合^[7]。CBM1 家族其中一个 CBM (PDB:4BMF) 只含 38 个氨基酸, 由于序列很短只能形成简单的蛋白三维结构, 但它能利用二硫键与纤维素相互作用, 提高复合物的稳定性^[8]。至 2019 年 5 月, CAZy 数据库根据 CBM 的氨基酸序列的差异性, 将其分为 81 个不同的家族 (<http://www.cazy.org/>)^[9]。CBM 具有底物结合特异性, 其来源和结构各不相同, 但都能提高酶的催化效率及稳定性^[10], 还有一些 CBM 可以结合细胞表面的多糖物质^[11], 是以碳水化合物结合结构域 (CBM) 的构架和功能越来越成为研究的热点。利用生物信息技术研究 CBM, 可以快速有效的得到 CBM 的进化关系、构架及功效等信息, 为酶改造方法的优化提供理论基础。

α -L-鼠李糖苷酶是一种糖苷水解酶, 它能有效水解柑橘类果汁的主要苦味物质柚皮苷; 在改善酿造酒及果汁香味, 提高果汁抗氧化性等方面也有重要用途^[12], 因此 α -L-鼠李糖苷酶在工业上具有非常大的潜在应用价值。 α -L-鼠李糖苷酶具有催化活性结构域 (Catalysis domain, CD) 部分和 CBM 部分。Fujimoto^[13]等人通过分析 *Streptomyces avermitilis* α -L-鼠李糖苷酶晶体结构 (PDB:3w5n) 中与 L-鼠李糖的结合区域从而确定了以 L-鼠李糖为结合目标的 CBM。目前有许多关于 α -L-鼠李糖苷酶 CD 部分的报道, 但真核 α -L-鼠李糖苷酶的 CBM 研究仅停留在序列水平, 尚需进一步的功能架构验证。本文拟结合计算生物与生物信息学分析真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM, 明确其结构特征及功能位点等特征, 为该酶的开发利用提供更多的参考价值。

1 材料与方

1.1 材料

进入 CAZy 数据库^[14] (<http://www.cazy.org/>), 获取 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶序列的 GenBank 号, 并进入 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 获取各序列详细信息。

1.2 实验方法

利用 ExPASy 网站 (<https://www.expasy.org/>) 的 ProtParam^[15]工具, 获得真菌 CBM67 家族每一条序列的蛋白质理化性质结果, 运用 ClustalX 2.0^[16]程序和 Esprict^[17]网站 (<http://esprict.ibcp.fr/>) 进行序列比对分析。采用 MEGA 6.0^[18]软件对得到的序列构建系统进化树。利用 Discovery Studio 2019^[19]软件, 分别进行建模及模型评价, 并利用 Chimera^[20]软件进行结构的叠合。将建立好的模型加氢去水, 添加预测的与 L-鼠李糖结合部位的活性位点球, 用已进行 Prepare Ligands 处理好的 L-鼠李糖配体分子与 CBM 模型通过几何和能量匹配进行 Dock Ligands (Cdocker) 分子对接, 并优化对接模式找到最好的构象。

模型评价采用 Verify Protein (Profiles-3d) 方法, Verify Protein 是加州大学洛杉矶分校 (UCLA) 的 David Eisenberg 教授开发的一种基于“穿线”法的模型评价程序。用来评估蛋白质序列在当前 3d 环境中的适合性, 它可用于评估理论模型的质量或检验实验结构的特性^[21]。Verify Score 是蛋白质中所有残留物分数的总和。这是衡量结构整体质量的一个重要指标; Verify Expected High Score 是基于蛋白质数据库中高分辨率结构的统计分析。Verify Expected Low Score 是 Verify Expected High Score 的 45%, 是表现这个序列是否具有严重错误折叠结构的数据。

Discovery Studio 2019 软件对接所采用的 Dock Ligands (Cdocker) 模块实质是 Cdocker 算法的一种实现。该程序可以将任意数量的配体与单个蛋白质受体进行精细对接。对接所产生的 -Cdocker Energy 和 -Cdocker Interaction Energy 的两个关于结合能的值用来评判对接结果的合理性, 两个分值的负值越大即能量越低分子对接越稳定对接结果越好。

2 结果与分析

2.1 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 序列登录号与氨基酸序列

CAZy 数据库将目前已知的 CBM 根据氨基酸差

异性划分为 81 个不同的家族, 主要根据它们所属的家族和不同的物种来源进行命名^[6]。水解酶中一般有 1 个或者多个 CBM, CBM 多以串连的方式出现在水解酶中, 通常从酶的 N 端开始命名, 例如 CBM2-1 是第 1 个 CBM, CBM2-2 是第 2 个 CBM, 以此类推。在当前 81 个 CBM 家族中包含 95621 种 CBM, 此外还有 300 余种 CBM 未进行分类^[7-9]。 α -L-鼠李糖苷酶来源的 CBM 被收录在 CBM67 家族中, 其蛋白质序列共计 422 条。对 CBM67 家族的序列进行统计 (表 1), 发现其中有 1 条来自古菌, 397 条来自细菌, 23 条来自真核生物, 还有 1 条没有分类; 在这其中具有晶体

结构的序列 2 条, 具有酶学表征的序列 3 条。其中真核的 23 条序列中有 11 条为重复序列, 12 条未重复序列有 11 条来自担子菌亚门, 剩余 1 条来自担子菌门。

表 1 CAZy 数据库中 CBM67 家族统计信息

Table 1 CBM67 family statistics in CAZy database

项目	古菌	细菌	真核
数量/条	1	397	23

2.2 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶序列理化性质结果

表 2 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶序列理化性质分析

Table 2 Physicochemical properties of CBM67 family eukaryotic α -L-rhamnosidase sequence

GenBank	氨基酸数量/个	分子量/u	pI	(Asp+Glu)	(Arg+Lys)	原子总数	亲水性平均系数
ADX07288.1	239	24540.58	3.93	20	6	3415	0.377
BAD16582.1	373	39224.07	5.51	27	22	5440	-0.005
BAD16580.1	373	39338.32	5.33	28	22	5472	0.032
BAD16579.1	373	39294.20	5.51	27	22	5455	0.013
BAD16583.1	373	39288.24	5.51	27	22	5460	0.023
BAD16581.1	373	39396.34	5.51	27	22	5469	0.019
AZM69085.1	377	39529.63	5.09	22	17	5523	0.193
AZM69084.1	377	40740.16	8.74	29	33	5712	-0.077
AZM69083.1	376	39539.09	7.63	27	28	5570	0.151
ADT89769.1	373	38984.27	5.33	22	18	5467	0.231
APD76300.1	377	39703.71	5.56	22	19	5534	0.158
ANC28062.1	374	38420.76	4.53	29	17	5357	0.039

对 CBM67 家族的真核 α -L-鼠李糖苷酶蛋白质序列理化性质分析发现, 这些序列的氨基酸数量范围为 239~377 个; 分子量(M_r)范围为 24540.58~ 40740.16 u; 理论等电点(pI)范围为 3.93~8.74; 负电荷残基总数 (Asp+Glu)范围为 20~29 个; 正电荷残基总数(Arg+Lys)范围 6~33 个; 原子总数范围为 3415~5712; Grand Average of Hydropathicity (GRAVY)亲水性平均系数范围为-0.077~0.377, 且大部分为疏水性蛋白(表 2)。

BAD 16582.1、BAD 16583.1、BAD 16579.1), 其亲缘关系都较近, 尤其是 BAD 16580.1、BAD 16581.1、BAD 16582.1、BAD 16583.1、BAD 16579.1 这 5 个成员的亲缘关系非常接近, 亲缘性都在 98% 以上, 说明 12 条成员整体同源性都较为相近, CBM 序列总体变异不大, 进化上比较保守。一般认为 Bootstrap 低于 50 时同源关系不可信, 但图中分支的 Bootstrap 最小值为 64 大于 50, 故可信度较高^[22]。

2.3 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶序列进化树

CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶序列的 Neighbor-Joining 进化树分析结果表明 (图 1), 这 12 条序列可大致被分为三大类, ANC 28062.1 和 ADX07288.1 为第一类, AZM 69084.1 为第二类, 独自为一体, 其余序列为第三类, 第三类所含的成员最多, 有 9 个成员 (APD 76300.1、AZM 69085.1、ADT 89769.1、AZM 69083.1、BAD 16580.1、BAD 16581.1、

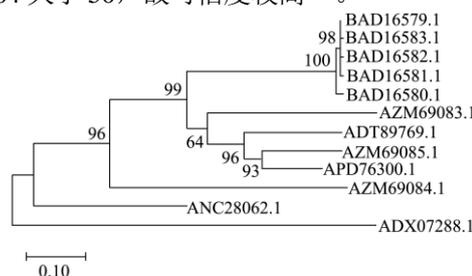


图 1 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶序列的 Neighbor-Joining 进化树

Fig.1 Neighbor-Joining phylogenetic tree of CBM67 family eukaryotic α -L-rhamnosidase sequence

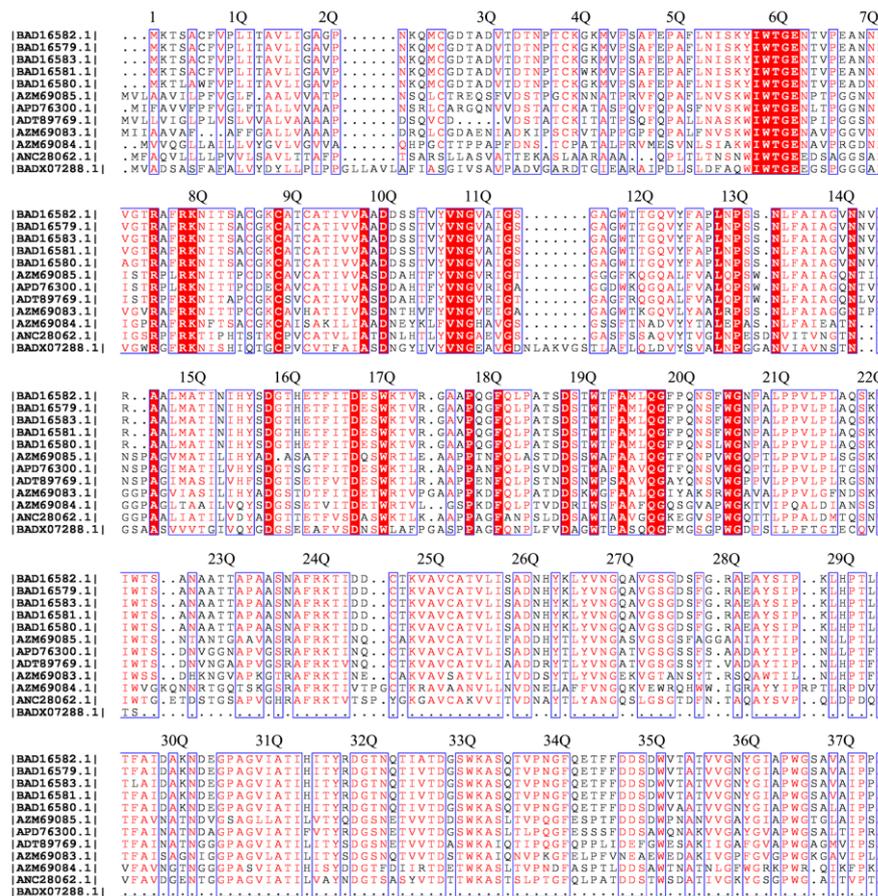


图 2 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶序列比对结果

Fig.2 CBM67 family eukaryotic α -L-rhamnosidase sequence alignment results

表 3 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 序列同源建模 Verify

Protein (Profiled-3D) 信息统计

Table 3 CBM67 family eukaryotic α -L-rhamnosidase CBM sequence homology modeling Verify Protein (Profiled-3D)

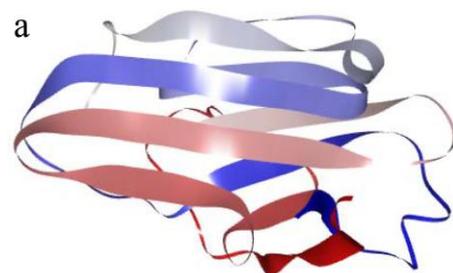
GenBank	Verify score	information statistics	
		Verify expected high score	Verify expected low score
ADX07288.1	76.33	108.56	48.85
BAD16582.1	91.32	170.03	76.51
BAD16580.1	113.07	170.03	76.51
BAD16579.1	87.58	170.03	76.51
BAD16583.1	88.83	170.03	76.51
BAD16581.1	99.00	170.03	76.51
AZM69085.1	91.50	171.86	77.34
AZM69084.1	78.13	171.86	77.34
AZM69083.1	104.01	171.40	77.13
ADT89769.1	91.69	170.03	76.51
APD76300.1	118.02	171.86	77.34
ANC28062.1	106.03	170.49	76.72

2.4 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶序列比

对结果

序列比对结果表明 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶的氨基酸序列较为保守, 在 C 端的氨基酸序列具有较高的相似性, N 端的氨基酸序列出现略微差异。且这 12 条序列亲缘关系较近, 氨基酸的含量相差不大 (都在 370 bp 左右), 暗示这些序列的 CBM 在二级结构及三级结构中也具有一定的同源性, 且 57~205 位点区域的保守性要远高于蛋白的其他区域 (图 2 中红色位点区域), 可认为是这 12 条序列的 CBM。

2.5 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 序列同源建模



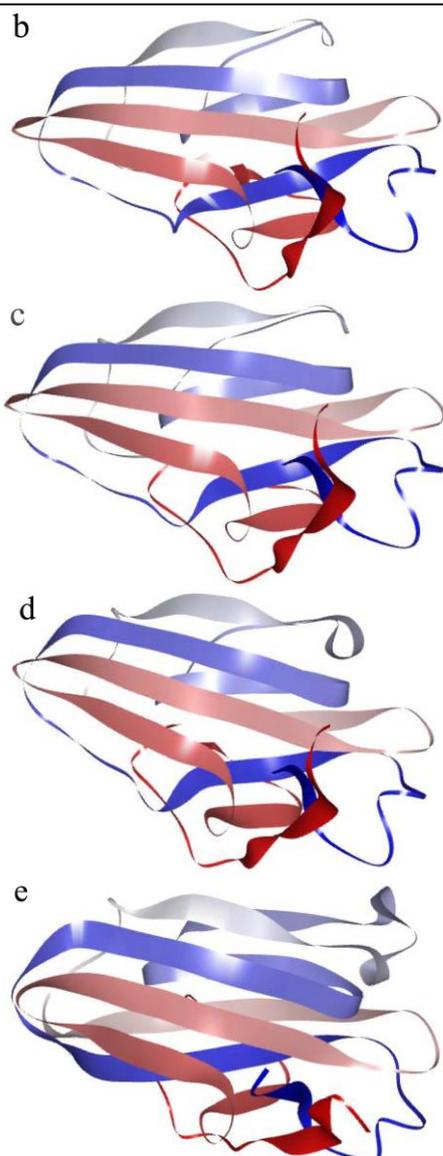


图3 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 三维蛋白预测结构和 3w5n 晶体蛋白 CBM 结构

Fig.3 CBM67 family eukaryotic α -L-rhamnosidase CBM three-dimensional protein prediction structure and 3w5n crystal protein CBM structure

注: a: BAD16582.1; b: BAD16580.1; c: BAD16579.1; d: BAD16583.1; e: 3w5n.

以 3w5n 晶体结构的 CBM 作为模板分别对 12 条

表 4 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 三维蛋白预测结构和 3w5n 晶体蛋白 CBM 结构叠合 RMSD 值

Fig.4 CBM67 family eukaryotic α -L-rhamnosidase CBM three-dimensional protein predicted structure and 3w5n crystal protein CBM structure superimposed RMSD value

项目	ADX 07288.1	BAD 16582.1	BAD 16580.1	BAD 16579.1	BAD 16583.1	BAD 16581.1	AZM 69085.1	AZM 69084.1	AZM 69083.1	ADT 89769.1	APD 76300.1	ANC 28062.1	3w5n
ADX07288.1													
BAD16582.1	17.36												
BAD16580.1	17.37	0.70											

CBM67 家族序列的 CBM 进行同源建模, 可以得到 12 个 CBM 蛋白模型。对 12 个 CBM 模型的 Verify Protein (Profiled-3D) 结果进行数据统计 (表 3) 并对其进行综合分析得到, 所有 Verify Score 均处于自己的 Verify Expected High Score 和 Verify Expected Low Score 两个值之间, 具有较大的可信度。并将建模得到的 12 个 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 三维蛋白预测结构模板进行比较, 发现结构非常相似, 基本由 β 折叠构成, 下面举例 4 个 CBM 结构和 3w5n 晶体蛋白进行对比展示 (图 3)。将 3w5n 的 CBM 晶体蛋白结构和 12 个 CBM67 家族模型进行了叠合对比 (图 4, 红色为 3w5n) 并计算对应的 RMSD 值 (表 4)。发现 CBM67 家族模型能够与晶体模板很好的重合, 12 个模型的三维结构高度相似, 活性位点区域叠合度较高, 且所有的 RMSD 值都比较小且差值较小, 因此可以认为最终获得的 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 蛋白的氨基酸结构位置合理, 模型可信度较高, 可用于后续分子对接模拟。

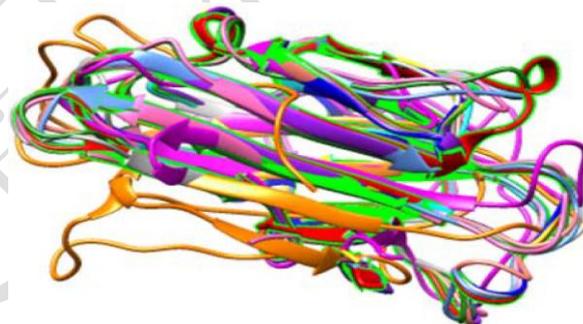


图 4 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 与晶体蛋白 3w5n 的 CBM 叠合图示

Fig.4 CBM67 family of eukaryotic α -L-rhamnosidase CBM and crystal protein 3w5n CBM superimposed icon

注: Red: 3w5n; Orange: ADX07288.1; Yellow: BAD 16582.1; Green: BAD16580.1; Cyan: BAD16579.1; Blue: BAD 16583.1; Purple: BAD16581.1; Hot Pink: AZM69085.1; Magenta: AZM69084.1; Gray: AZM69083.1; Dim Gray: ADT89769.1; Forest Green: APD76300.1; Cornflower Blue: ANC28062.1.

接上页

BAD16579.1	17.38	0.59	0.67									
BAD16583.1	17.37	0.50	0.62	0.47								
BAD16581.1	17.36	0.66	0.38	0.78	0.68							
AZM69085.1	17.87	7.17	7.18	7.14	7.17	7.18						
AZM69084.1	17.13	5.74	5.73	5.75	5.73	5.76	8.31					
AZM69083.1	17.72	4.32	4.37	4.37	4.36	4.36	5.42	6.44				
ADT89769.1	18.31	6.65	6.67	6.65	6.65	6.67	3.16	7.86	4.67			
APD76300.1	18.40	5.83	5.85	5.82	5.85	5.86	3.20	7.29	3.59	3.23		
ANC28062.1	17.71	3.28	3.30	3.27	3.32	3.33	5.96	5.60	3.36	5.33	4.24	
3w5n	14.30	13.79	13.81	13.79	13.79	13.80	10.27	14.19	12.42	10.03	11.21	12.91

2.6 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 分子对接结果

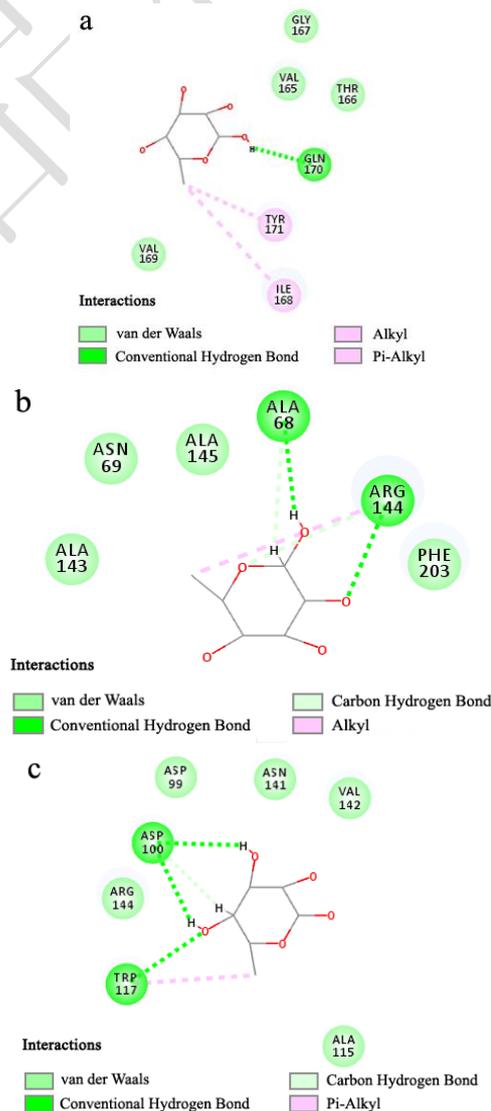
表 5 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 分子对接模型能量分析数据

Table 5 Energy analysis data of CBM67 family eukaryotic α -L-rhamnosidase CBM molecular docking model

GenBank	-Cdocker Energy/(kcal/mol)	-Cdocker Interaction Energy/(kcal/mol)
ADX07288.1	-7.20	15.01
BAD16582.1	-6.52	15.66
BAD16580.1	-5.71	17.02
BAD16579.1	-9.58	12.29
BAD16583.1	-9.71	12.73
BAD16581.1	-8.78	13.31
AZM69085.1	-4.49	18.04
AZM69084.1	-2.62	20.00
AZM69083.1	-11.90	10.03
ADT89769.1	-10.04	11.95
APD76300.1	-10.30	11.49
ANC28062.1	-5.19	17.03
AGN92963.1	-11.07	10.64

对 12 个 CBM 蛋白模型进行对接 (表 5), 得到的 -Cdocker Energy 的范围为 -11.9 到 -2.62, -Cdocker Interaction Energy 的范围为 10.03 到 20.00。说明以 L-鼠李糖配体作为底物时, 这 12 个蛋白模型都与配体有良好的结合效果, 获得了构象稳定的对接复合物, 可用于后续的对接结果分析中。选择结合能最小、结构最稳定的构象生成 12 个 2D 对接作用图, 选取 4 个 2D 对接作用图进行展示 (图 5), 结果表明 L-鼠李糖配体能够结合到 CBM 的活性空腔内, 且活性空腔内的 L-鼠李糖都能与 CBM 的 ASP、ALA、GLN、ASN 等氨基酸残基形成范德华力作用, 且 L-鼠李糖上的氧原子

的都能与 196、197 号 (以图 3 的氨基酸序列为基准) 有效结合位点附近的 CBM 氨基酸残基形成至少一个氢键。故推测 196、197 号氨基酸为提高 L-鼠李糖与 α -L-鼠李糖苷酶结合稳定性的功能位点。证明 CBM 通过与配体之间的各种作用力 (氢键和范德华力) 来提高复合物的稳定性, 进而提高酶分子对不溶性底物的亲和力以促进酶降解底物的催化活性的提升。



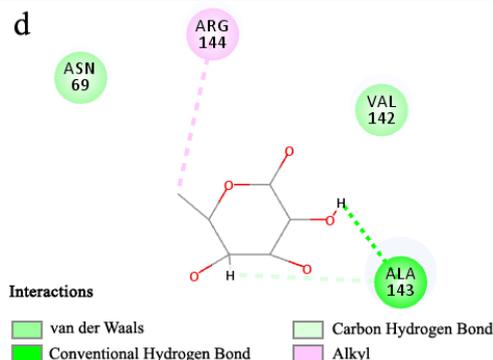


图5 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 分子对接 2D 结构

Fig.5 CBM67 family eukaryotic α -L-rhamnosidase CBM

molecular docking 2D structure

注: a: ADX07288.1; b: BAD16582.1; c: BAD16580.1; d: BAD16579.1。

3 结论

本文首先对 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶进行了构建系统进化树、多序列比对等方面的分析; 根据构建的系统进化树, 将这 12 条序列分成了三大类, 但三类之间的同源关系都较近; 分析多序列比对的结果确定 CBM 的氨基酸范围; 以 α -L-鼠李糖苷酶 3w5n 晶体结构的 CBM 为模板, 通过同源建模首次构建了 CBM67 家族的三维蛋白结构, 并选择最优的同源模型进行 Verify Protein (Profiles-3d) 验证, 结果表明模型具有合理性, 并发现 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 的蛋白结构基本由 β 折叠构成, 氨基酸数量较少, 结构简单; 将构建的 CBM 同源模型与 L-鼠李糖进行了分子对接模拟, 其对接结果在分子水平上揭示了 L-鼠李糖配体与 CBM 受体的结合作用方式。据此推测 CBM67 家族真核 α -L-鼠李糖苷酶 CBM 的作用机制是通过与 L-鼠李糖配体形成各种作用力提高复合物的稳定性以提高 GH78 家真核 α -L-鼠李糖苷酶的催化效率。

参考文献

- [1] Reese E T. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis [J]. Journal of Bacteriology, 1950, 59(4): 485-497
- [2] Gilkes N R, Warren R A, Miller R C, et al. Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(21): 10401-10407
- [3] Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Escalante L, et al. A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26

starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus* α -amylase [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(3): 341-346

- [4] Kaus K, Lary J W, Cole J L, et al. Glycan specificity of the *Vibrio vulnificus* hemolysin lectin outlines evolutionary history of membrane targeting by a toxin family [J]. Journal of Molecular Biology, 2014, 426(15): 2800-2812
- [5] Svensson B, Jespersen H, Sierks M R, et al. Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch-degrading enzymes [J]. Biochemical Journal, 1989, 264(1): 309-311
- [6] Gilkes N R, Henrissat B, Kilburn D G, et al. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: Sequence conservation, function, and enzyme families [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1991, 55(2): 303-315
- [7] Ponyi T, Szabó L, Nagy T, et al. Trp22, Trp24, and Tyr8 play a pivotal role in the binding of the family 10 cellulose-binding module from *Pseudomonas xylanase A* to insoluble ligands [J]. Biochemistry, 2000, 39(5): 985-991.
- [8] Mattinen M L, Linder M, Drakenberg T, et al. Solution structure of the cellulose-binding domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* and its interaction with cello-oligosaccharides [J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 256(2): 279-286
- [9] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 37(S1): 233-238
- [10] 周顺华. 碳水化合物结合结构域及其应用 [J]. 现代食品, 2016, 3(5): 113-115
ZHOU Shun-hua. Carbohydrate binding domain and its application [J]. Modern Food, 2016, 3(5): 113-115
- [11] 李恒, 唐双焱. 碳水化合物结合结构域研究进展 [J]. 微生物学报, 2017, 57(8): 1160-1167
LI Heng, TANG Shuang-yan. Research progress in carbohydrate binding domain [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(8): 1160-1167
- [12] Yadav V, Yadav P K, Yadav S, et al. α -L-Rhamnosidase: a review [J]. Process Biochemistry, 2010, 45(8): 1226-1235
- [13] Fujimoto Z, Jackson A, Michikawa M, et al. The Structure of a *Streptomyces avermitilis* α -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(17): 12376-12385

(下转第 168 页)

现代食品科技