·大家专版·

彭惠,女,1979 年生。博士,教授,博士生导师,安徽大学生命科学与医学工程学院副院长,民盟安徽教育委员会副主任。安徽省学术和技术后备人选,安徽省杰出青年基金获得者,安徽大学“优秀人才计划”入选者。2001 年毕业于江南大学,获工学学士;2002 年至 2007 年,在江南大学获得发酵工程博士学位。2007 年至今在安徽大学生命科学与医学工程学院主要从事生物催化与微生物的研究。集中研究海洋源的糖苷水解酶,探索新的酶资源,研究其催化功能,设计这些酶在食品、医药方面新的催化工艺,并挖掘酶/微生物与环境之间的联系。发现了海洋源的糖苷水解酶新家族和海洋源的淀粉结合结构域(SBD)新家族;证明了 SBD 中特异性破坏淀粉结构的氨基酸位点的存在,拓宽了对碳水化合物活性酶中 SBD 的功能认知;设计改造了海洋源的淀粉酶,实现了未纯化的海洋微藻生淀粉的高效降解;利用超高热稳定性的酶简化了抗性淀粉的生产技术。主持国家自然科学基金项目 5 项、省部级科研项目 9 项、企业横向课题 3 项、省级教学项目 4 项以及省级精品课程 2 门。相关成果在 Marine Biotechnology、Journal of Agricultural and Food Chemistry、International Journal of Biological Macromolecules、Applied Microbiology and Biotechnology 等微生物与食品领域主流期刊上发表科研论文 30 余篇;授权发明专利 5 项。曾荣获全国第二届高校教师教学创新大赛三等奖。

淀粉结合结构域(SBD)在微生物环境适应与碳源竞争中的多功能角色

彭 惠*,付自建

(安徽大学 生命科学与医学工程学院,安徽 合肥 230601)

摘 要 淀粉结合结构域(Starch-binding domain, SBD)广泛分布于碳水化合物活性酶(CAZymes)的末端,是一个独立的非催化的结构域,也是淀粉颗粒自然降解过程中的重要功能模块。自然界中,SBD 可以特异性识别并结合淀粉颗粒或其他多糖,然后将酶的催化结构域引导到糖类物质的表面,显著提高了酶的水解效率。SBD 能以非水解的方式破坏淀粉颗粒的结构,还能广泛影响酶的多种催化特性,包括底物特异性、环境适应性(如热稳定性、耐盐性与适冷性)和寡聚化状态等。对 SBD 生理生化功能的深入研究有助于理解微生物在复杂生境中如何竞争碳源和适应环境。本文综述了 SBD 在陆地和海洋生态系统中的分布情况、SBD 与底物的作用机制以及 SBD 对宿主酶不同功能的影响。此外,总结了 SBD 功能的研究方法,包括结构域缺失、结合与破坏能力表征等技术。对 SBD 的深入研究,不仅拓宽了对自然界中微生物碳源竞争方式的认知,也为工业酶理性设计提供了新的改造思路。

关键词 淀粉结合结构域;淀粉降解;碳水化合物活性酶;碳源竞争;底物结合作用

中图分类号 Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2026)01-0001-13

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2026.01.001

The Multifunctional Role of Starch-Binding Domain in Microbial Adaptation and Carbon Source Competition

PENG Hui*, FU Zi-jian

(*School of Life Sciences and Medical Engineering, Anhui University, Hefei* 230601)

基金项目:国家自然科学基金项目(32170137)

作者简介:彭惠 女,教授,博士,博士生导师。研究方向为生物催化与微生物。Tel:0551-63861928,E-mail:penghui@ahu.edu.cn

* 通讯作者。

收稿日期:2026-01-05

Abstract The starch-binding domains (SBDs) are structurally and functionally independent non-catalytic protein module widely found in carbohydrate active enzymes (CAZymes), and they play an important role in the degradation process of raw starch in ecological environment. In nature, SBDs effectively lead the catalytic domain to the substrate surface by specifically binding to starch granules or other polysaccharides, significantly enhancing the hydrolytic efficiency of enzymes. In addition to the non-hydrolytic disruptive activity on the structure of starch granules, SBDs widely influence many catalytic properties of host enzymes, including substrate specificity, environmental adaptability (thermostability, salt tolerance, and cold adaptation), and oligomerization state. These roles demonstrate their adaptive function in helping host microorganisms to compete for carbon sources in complex habitats. Here, we summarized the distribution characteristics, functional mechanisms, and multiple effects of SBDs on host enzyme functions in terrestrial and marine ecosystems. The main experimental methods for studying SBD functions, including domain deletion, functional characterization of binding and disruption, are also introduced. A broader and deeper understanding of SBDs enhances our knowledge of microbial competition for carbon sources in natural environments, as well as provides novel approaches for the rational design of industrial enzymes.

Keywords starch-binding domain; starch degradation; carbohydrate active enzymes; carbon source competition; substrate binding

淀粉是自然界中最丰富的碳水化合物之一。绿色植物和绿藻通过光合作用合成淀粉作为自身重要的能量储存;同时这些淀粉作为营养元素,也支撑了高等动物和微生物的生命活动。因此,淀粉是自然界碳循环的关键载体之一。无论是在陆地还是海洋生态系统中,淀粉的每次合成与降解均对生态系统的能量流动与物质循环产生影响[1]。在淀粉降解过程中,微生物是不可替代的主导角色,其通过分泌一系列功能互补的淀粉水解相关酶,在土壤、水体(包括海洋)及动物肠道等生境中的微生物群落高效驱动着淀粉颗粒向低聚糖、单糖转化,随后通过细胞转运进入微生物胞内,或被同化利用,或彻底转化为CO_2[2]。值得注意的是,在微生物分泌的这些淀粉降解相关酶中,约有10%的酶含有一个特殊的功能模块,即淀粉结合结构域(Starch-binding domain, SBD)。SBD本身不直接参与糖苷键的水解,但它却是酶能高效识别并作用于复杂淀粉底物的关键所在[3-4]。SBD是一类通常附着于碳水化合物活性酶(Carbohydrate-Active Enzymes, CAZymes)催化结构域上的非催化性模块,它没有催化功能,其核心功能在于特异性识别并结合天然淀粉颗粒、相关多糖或其衍生物,从而将整个酶分子精准锚定于底物表面,极大地提高了局部催化浓度与反应效率[5]。SBD具有显著的序列与结构多样性,根据其进化关系被归类于碳水化合物结合模块(Carbohydrate-Binding Module, CBM)家族。截至2025年12月,CAZy数据库建立的107个CBM家族中有15个家族(CBM20、21、25、26、34、41、45、48、53、58、68、69、74、82和83)已被证实含有SBD[6-7](https://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html)。这些CBM家族的SBD广泛分布于细菌、古菌、真菌、植物及动物来源的酶中,其结合特性与功能在不同生物及生态环境中呈现出丰富的变异与适应性进化,构成了一个复杂而精巧的淀粉识别系统。本文综述了近年来SBD在微生物环境适应和碳源竞争中的功能研究,主要围绕SBD参与酶竞争性结合淀粉等多糖底物、对淀粉颗粒的结合与破坏以及对宿主酶多种酶学性质的影响等进行阐述。

1 天然淀粉生物降解的关键功能模块SBD

1.1 淀粉的自然分布

淀粉由直链淀粉和支链淀粉组成。直链淀粉是葡萄糖通过α-1,4-糖苷键连接而成的线性聚合物,是淀粉的骨架。支链淀粉是葡萄糖通过α-1,6-糖苷键在直链淀粉上形成一个个分支,分支上的葡萄糖链仍以α-1,4-糖苷键连接。因此,支链淀粉分子中直链和支链的空间排列决定了淀粉颗粒的结晶性质[8]。在陆地上,淀粉几乎完全由植物合成,不同植物中淀粉分支酶与去分支酶的活性不同,会导致淀粉颗粒形成不同的结晶

类型。大多数谷物源的淀粉(如大米、小麦、玉米)为 A 型结晶,根茎源的淀粉(如马铃薯、芋头、葛根)多为 B 型结晶,豆类源的淀粉(如豌豆、绿豆、扁豆)是 A 型与 B 型混合的 C 型结晶。不同晶型的淀粉有着明显不同的理化性质,因此微生物对它们的降解方式也有差异。淀粉颗粒内部结构复杂,质地坚硬,大小不同[9]。在结构上,淀粉颗粒由一层层的结晶区和无定型区交织而成。在不同植物源中,这二者的比例不同。同时,淀粉颗粒的形状和粒径也不同,其粒径通常分布在 0.1~200 μm 之间,粒径大小与分子结构特征(直链淀粉与支链淀粉的比例、分支链长度和分支度、孔隙率和结晶度)密切相关[10-11]。

在海洋环境中,淀粉等有机碳的主要来源与陆地系统存在显著差异。海洋中的淀粉主要由各种藻类合成,是海洋藻类主要的储存碳水化合物。在刚毛藻属(*Cladophora*)中淀粉储存于叶绿体内,在红藻如龙须菜属(*Gracilariopsis*)中淀粉则以颗粒形式存在于细胞质中。在石莼属(*Ulva*)等绿藻中淀粉颗粒则位于叶绿体的类囊体膜之间,这与高等植物相似[12-14]。然而,海洋源淀粉颗粒大小、结晶度等结构特征常与陆生淀粉不同[12]。当藻类细胞裂解或被捕食后,淀粉以颗粒或溶解态释放,并与蛋白质及其他结构多糖等有机物结合形成“海洋雪”等复合颗粒[15-16]。这类复合颗粒构成了海洋中的有机碳库,其后续转化主要依赖于微生物的降解。

1.2 淀粉在自然界中的降解

淀粉在自然界中的降解主要依赖于生物摄食和微生物分解两条途径。当淀粉被高等动物摄入后,A 型结晶的谷物淀粉通常比 B 型或 C 型结晶的淀粉更容易被消化道分泌的淀粉酶快速消化[10,17]。未被完全消化的残余淀粉(即抗性淀粉)进入结肠后,则由动物肠道共生微生物进一步协同降解[18]。因此,肠道微生物分泌的淀粉酶往往具备独特的催化特性。

与动物摄食相比,微生物的作用范围广、生物量大,因此微生物分解是淀粉自然降解的绝对优势力量。对土壤微生物群落的研究结果表明,淀粉颗粒进入土壤后被快速破坏的时间一般不超过 3 d。这一阶段,淀粉颗粒被降解为低聚糖或单糖。但是,这些产物在土壤中被彻底降解可能需要数周至一年的时间[19]。土壤是具有淀粉降解能力的微生物的大本营。微生物群落的组成随生境条件不同而动态变化。在多个宏基因组和宏转录组的研究中,根据森林土壤中淀粉酶类的编码基因或转录本的数据结果,细菌是淀粉降解的主要贡献者,子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)的真菌也有一定的贡献[20-21]。细菌同样是苔原土壤中最主要的淀粉降解者[22]。此外,对不同的微生物而言,淀粉引起的响应速度,即微生物的呼吸作用和生长繁殖情况存在明显的不同[2]。例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类诺卡氏菌属(*Nocardiodes*)和链霉菌属(*Streptomyces*)的微生物响应速度较快,而糖霉菌属(*Glycomyces*)、异翅菌属(*Isoptericola*)、菌丝生菌属(*Myceligenerans*)和原小单孢菌属(*Promicromonospora*)的微生物响应速度则相对迟缓,这说明不同种属的微生物在利用淀粉时存在明显的协作效应或生态位分化。在一些极端环境中,比如在极度干燥、微生物净呼吸极弱的土壤中,淀粉颗粒仍能在较短的时间内被破坏。这表明,即使土壤中的微生物无法良好地生长,但是只要存在微量的淀粉酶,淀粉就能被降解[2]。

海洋藻类能合成大量淀粉,然而关于海洋环境中藻源淀粉自然降解途径的研究相对有限[23]。尽管如此,已有大量研究表明沉积物美丽菌(*Formosa sediminum*)[24]、约卡西亚冷泉菌(*Locasia fonsfrigidae*)[25]、太平洋海纤菌(*Marinigracilibium pacificum*)[26]等多种海洋微生物能够降解淀粉,并且也有很多海洋来源的淀粉酶被报道,如 AmyZ1[27]、Hl-Amy[28]、AmyJM[29]、Amy63[30]、Alphaz[31],这表明海洋系统同样具备活跃的淀粉微生物降解途径。

1.3 SBD 在自然界淀粉类物质循环中的作用

无论是陆地植物来源还是海洋藻类来源的天然淀粉,自身均具有复杂的结晶颗粒结构;同时,在某些复杂自然环境中,例如海洋和动物肠道中,淀粉更常与其他物质形成结构混杂的复合物。因此,高效识别与完全降解这种复合物往往需要依赖多种功能互补的淀粉酶协同作用。这些酶主要包括内切型 α-淀粉酶(α-Amylase)、外切型 β-淀粉酶(β-Amylase)、葡萄糖淀粉酶(Glucoamylase)、α-葡萄糖苷酶(α-glucosidases)以及负责去除分支

的多个脱支酶,例如普鲁兰酶(Pullulanase)、异淀粉酶(Isoamylase)、淀粉普鲁兰酶(Amylopullulanase)[7]。此外,还有葡聚糖水双激酶(Glucan, Water Dikinase, GWD)、内切葡聚糖酶(Endoglucanase)、麦芽低聚糖淀粉酶(Maltooligosaccharide-Forming Amylases,MFA)等与淀粉等多糖相关的酶。这些酶中约10%都含有至少1个SBD[3,7](表1)。

表1 淀粉水解与修饰相关酶的SBD分布

Table 1 Distribution of SBDs in Starch Hydrolases and Modifying Enzymes

CBM家族	酶	来源生物	生物类别	参考文献
CBM20	β-淀粉酶	蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)	细菌	[32]
	β-环糊精葡萄糖基转移酶	芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)	细菌	[33]
	α-淀粉酶	嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)	细菌	[34]
	葡萄糖淀粉酶	黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)	真菌	[35]
CBM21	葡萄糖淀粉酶	少根根霉菌(*Rhizopus arrhizus*)	真菌	[36]
CBM25	α-淀粉酶	耐盐盐碱小杆菌(*Halalkalibacterium halodurans*)	细菌	[37]
CBM26	α-淀粉酶	直肠有益杆状菌(*Agathobacter rectalis*)	肠道细菌	[38]
	α-淀粉酶	耐盐盐碱小杆菌(*Halalkalibacterium halodurans*)	细菌	[37]
	普鲁兰酶	酒神瘤胃球菌(*Ruminococcus bromii*)	肠道细菌	[39]
CBM34	α-淀粉酶	普通高温放线菌(*Thermoactinomyces vulgaris*)	细菌	[40]
	α-葡萄糖苷酶	大肠埃希菌(*Escherichia coli*)	细菌	[41]
CBM41	普鲁兰酶	解鸟氨酸柔武氏菌(*Raoultella ornithinolytica*)	细菌	[42]
CBM45	葡聚糖水双激酶	马铃薯(*Solanum tuberosum*)	植物	[43]
CBM48	普鲁兰酶	嗜酸普鲁兰芽孢杆菌(*Bacillus acidopullulyticus*)	细菌	[44]
	α-淀粉酶/新普鲁兰酶	卵形拟杆菌(*Bacteroides ovatus*)	肠道细菌	[45]
	α-淀粉酶	光滑念珠菌(*Nakaseomyces glabratus*)	真菌	[46]
CBM53	淀粉合成酶	拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)	植物	[47]
CBM58	α-淀粉酶/新普鲁兰酶	多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)	肠道细菌	[48]
CBM68	普鲁兰酶	无氧芽孢杆菌(*Anoxybacillus* sp.)	细菌	[49]
CBM69	α-淀粉酶	潮滩发光杆菌(*Photobacterium gaetbulicola*)	海洋细菌	[50]
CBM74	α-淀粉酶	金黄微杆菌(*Microbacterium aurum*)	细菌	[51]
	α-淀粉酶	青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)	肠道细菌	[52]
CBM82	α-淀粉酶	直肠真杆菌(*Eubacterium rectale*)	肠道细菌	[38]
CBM83	α-淀粉酶	直肠真杆菌(*Eubacterium rectale*)	肠道细菌	[38]

SBD在自然界淀粉类物质的代谢循环中发挥着关键作用。SBD本身不具备催化活性,但其能够特异性识别并结合天然淀粉颗粒或相关多糖,帮助携带该结构域的酶或蛋白质定位至底物表面,从而提高降解、修饰或转运效率。在淀粉降解过程中,许多淀粉水解酶通过其SBD与未糊化的淀粉颗粒结合,使催化结构域更接近底物,显著增强了对天然淀粉的水解能力。大量的SBD均被证实能有效吸附玉米、小麦、大米、马铃薯等的淀粉颗粒,促进酶在颗粒表面形成孔隙,加速淀粉链的释放与降解[3,6]。这种结合不仅提升反应速率,还赋予酶在低温或低底物浓度下的高效催化特性,对微生物在自然环境中利用淀粉作为碳源具有重要意义。

SBD也参与淀粉的磷酸化、分支化及转运等修饰过程。例如,植物中的GWD和葡聚糖磷酸酶淀粉过量4蛋白(Glucan Phosphatase Starch-excess 4 Protein, SEX4)等蛋白质含有CBM45或CBM48家族SBD,能帮助SEX4定位至淀粉颗粒表面,进行磷酸化修饰,进而调控淀粉的降解速率与模式[43,53]。类似地,淀粉合成酶III(starch synthase III, SSIII)中的CBM53结构域通过与淀粉颗粒结合,促进链延伸与分支结构形成[47]。此外,SBD在人体肠道微生物的淀粉代谢中也起着

重要作用。例如,人肠道细菌直肠真杆菌(*Eubacterium rectale*)的表面锚定型 α-淀粉酶含有多重 SBD(包括 CBM26、CBM41、CBM82 等),使其能高效结合并降解宿主难以消化的抗性淀粉,影响肠道菌群组成与代谢健康[38]。

海洋绿藻金牛鸵球藻(*Ostreococcus tauri*)是一种很微小却非常重要的单细胞浮游植物,在温带、热带及近岸、外海等多种海洋环境中广泛存在,并占据特定生态位。与常见绿藻相比,其基因组中编码了多个拷贝的 GWD,且这些 GWD 均含有属于 CBM41 家族的 SBD。GWD 是触发淀粉降解起始过程的关键酶。目前,尚无文献进一步解释该藻基因组中为何存在多拷贝 GWD,以及其 SBD 在该过程中的具体功能[6,54]。但是,对人类肠道共生的拟杆菌属(*Bacteroides*)的部分菌株的类似研究,已经给出了具有参考价值的结果。拟杆菌属很多菌株的染色体上有一段紧密连锁的基因簇,即多基因多糖利用位点(Multi-gene Polysaccharide Utilization Loci,PULs)。PULs 是受到严格调控、共定位的基因簇,它们编码了复杂碳水化合物糖化所需的一系列酶和蛋白质,实现对某一种或一类结构相似的多糖的感知、捕获、切割、摄取并最终代谢。在 PULs 体系中,SBD 和一些 CBM 扮演“捕获”角色,通过结合多糖,将其固定在微生物菌体表面[55-56]。例如,多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)有数个非酶的外膜蛋白。这些外膜蛋白均含有多个能结合多糖的 SBD 或 CBM,进而增强菌体对糖类的竞争力[57]。这两个例子的共同点是海洋绿藻和肠道细菌为了提高捕获/利用多糖的能力,均采取了扩张基因数量的策略,或增加基因组上的拷贝数,或增加底物结合结构域的数量。

总之,SBD 通过其特异性的淀粉结合能力,在淀粉的合成、修饰、降解及跨膜转运等多个环节都起到定向或增效的作用,是自然界淀粉代谢网络中的重要功能模块。

2 SBD 与底物的作用

2.1 SBD 与底物的结合作用

SBD 对底物的识别与结合是其最核心的生物学功能。该功能使水溶性的酶分子能够特异性吸附并富集于底物分子,从而有效提高局域的酶浓度[6]。同时 SBD 的结合能力对酶解的贡献遵循 Sabatier 原则,即过弱或过强的结合作用都会降低酶解效率[7,58]。这种结合不是简单的非特异性吸附,而是通过 SBD 表面特定的芳香族氨基酸及极性氨基酸等残基与底物分子之间实现的精确分子识别。在绝大多数情况下,SBD 主要识别并结合以葡萄糖单元构成的糖链,其最典型的底物是淀粉。此外,少数 SBD 也具备结合其他类型糖类(如甘露聚糖、木聚糖)的能力。

2.1.1 *淀粉类底物* 淀粉类底物主要指以葡萄糖为主要成分,通过不同的糖苷键构成的多糖,包括直链淀粉、支链淀粉、葡聚糖、糖原、环糊精等。SBD 与这些底物的结合本质上都属于 SBD 与葡萄糖的结合,这种结合主要依赖于氨基酸和糖环之间的多种非共价作用力[59]。SBD 的结合位点主要是色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸和组氨酸等,这些芳香族残基的侧链可与底物糖环上的 CH 基团形成 CH-π 相互作用。这类作用属于典型的非极性相互作用,在 SBD 与底物的结合中发挥着重要作用[59],也被认为是导致 SBD 对不同链长底物亲和力差异的主要因素[60]。来源于食淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylovorus*)的 α-淀粉酶中的 SBD,其 W32L 突变导致芳香环结构缺失,从而使其淀粉结合能力完全丧失[61]。此外,淀粉糖链中的羟基等极性基团可与 SBD 结合位点内的极性氨基酸残基产生极性相互作用,其中氢键是最常见的形式,能显著增强糖链与 SBD 之间的亲和力[62]。虽然 SBD 与淀粉类底物的结合机制具有一定的普遍性,但是不同来源的 SBD 也会表现出不同的结合特征。肠道微生物来源的 SBD 为支撑消化道中多种糖的水解能力,能广谱结合直链淀粉、支链淀粉、葡聚糖、糖原、环糊精等各种多糖[51];植物来源的 SBD 偏好性结合直链淀粉[63];动物来源的 SBD 多偏好性结合糖原[64]。这种差异很可能是自然选择的结果,使得不同生物来源的 SBD 能够最优地识别和利用其生存环境中最主要的储存多糖。

2.1.2 *非淀粉类底物* 在极端或复杂的自然环境中,糖类营养物质往往极度匮乏。为了在这

种生境中最大化地竞争营养,栖息于此的微生物常演化出独特的生理生化适应机制,进而使酶蛋白也呈现出与众不同的催化特性。海洋作为一个典型的寡营养环境,已有大量研究证实,其中的微生物普遍通过多样化的进化适应策略来维持生存[65]。例如,从海洋细菌潮滩发光杆菌(*Photobacterium gaetbulicola*)中分离出的 SBD 即表现出广泛的底物结合谱,不仅能识别海藻淀粉,还可与木聚糖、昆布多糖、纤维素、红藻多糖、岩藻多糖、甘露聚糖等多种多糖结合(数据未发表)。类似地,来自美国黄石公园的假乙醇热厌氧杆状菌(*Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*) 39E 的淀粉普鲁兰酶 Tp39E 也包含一个 SBD。该 SBD 能够识别木聚糖,但不识别由葡萄糖通过 β-1,4-糖苷键连接形成的纤维素[66]。此外,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的淀粉合成酶 III 包含的 SBD 也具有明显的底物结合偏好性,其结合能力从强到弱依次为纤维素、木聚糖、果胶和淀粉[67]。该偏好性的形成原因有可能是因为酶处于细胞壁中,所以 SBD 优先识别细胞壁组分多糖,从而帮助酶在生理环境下更有效地发挥作用。另一项来自水牛瘤胃宏基因组文库的研究也提供了类似证据:一个内切葡聚糖酶所含的 CBM 具备广谱结合底物能力。该 CBM 不仅能强效结合淀粉、甲基纤维素、羟乙基纤维素和大麦葡聚糖,还可以弱结合木聚糖、羧甲基纤维素(CMC)及豆胶等多种多糖。这种广谱结合底物的特性,很可能源于瘤胃环境中存在复杂的多糖底物,酶分子需要具备相应的结构柔性以应对不同底物的结合需求[68]。

2.2 SBD 对淀粉底物的破坏作用

SBD 的另一项关键功能在于能够以非水解方式破坏淀粉颗粒的天然结构,从而促进后续的水解过程。这种破坏作用是全酶提升生淀粉水解效率的重要因素之一,其重要性甚至可能超过 SBD 与底物的结合能力。早期研究曾提出两种假说来解释 SBD 的破坏机制:一是 SBD 可通过扭转淀粉链使其解离,从而向催化结构域暴露更多结合位点;二是 SBD 能够特异性定位至淀粉颗粒中的非平行排列区域,这些区域结构较为松散,因而更易发生水解[69-70]。此外,Valk 等[51]发现来源于金黄微杆菌(*Microbacterium aurum*)B8.A 的 CBM74 能够扩大淀粉颗粒内部的孔隙结构,从而有效地辅助淀粉酶后续对生淀粉的降解。这一发现从物理结构改变的角度,揭示了 SBD 破坏淀粉结构的另一条可能路径。相较于对 SBD 结合能力的大量研究,其破坏功能的相关报道则明显偏少。1999 年,Southall 等首次通过实验证实 SBD 具备破坏淀粉颗粒结构的能力。该研究以黑曲霉来源的葡萄糖淀粉酶为对象,通过外源添加 SBD,观察缺失突变体对生淀粉颗粒催化速率的影响,间接验证破坏功能。数据显示,低浓度 SBD 时突变体的催化速率会上升,高浓度时突变体的催化速率会下降。这是因为低浓度 SBD 破坏淀粉结构,有助于酶解;但随着浓度增加,SBD 大量占据淀粉颗粒表面,反而阻碍酶与底物接触,导致催化速率下降[71]。

后续多项定点突变研究进一步表明,SBD 的破坏能力与其结合能力呈正相关:破坏能力减弱的突变体,其结合能力也相应降低,反之亦然[72]。原子力显微镜(Atomic Force Microscopy,AFM)观察也提示,SBD 与可溶性直链淀粉结合的同时,可能破坏其螺旋构象[72]。因此学术界长期认为,SBD 的破坏能力并非独立功能,而是其与淀粉链结合过程中迫使糖链构象打开伴随产生的效应。或许正是基于这一认知,后续针对 SBD 破坏能力的专门研究鲜有报道。2024 年,Fu 等对海洋细菌潮滩发光杆菌来源的 α-淀粉酶中 SBD_{PG} 的研究表明,两个非结合位点(K626、T618)可独立影响该结构域的破坏能力。研究发现,这两个位点的突变体在破坏淀粉颗粒的能力上发生显著改变,但其与淀粉底物的结合能力并未受到影响(图 1)[50]。该结果证明 SBD 的破坏能力并非结合效应的副产物,而是一种独立的功能。由于 SBD 的结合能力对生淀粉酶解的贡献遵循 Sabatier 原则,而破坏能力的增强则无此限制,因此 SBD 的破坏能力可以被视为一个更具潜力的蛋白质工程改造靶点。尽管如此,目前研究尚未阐明这种独立的破坏能力是 SBD 中的普遍现象,还是这个海洋源 SBD_{PG} 独有的现象。

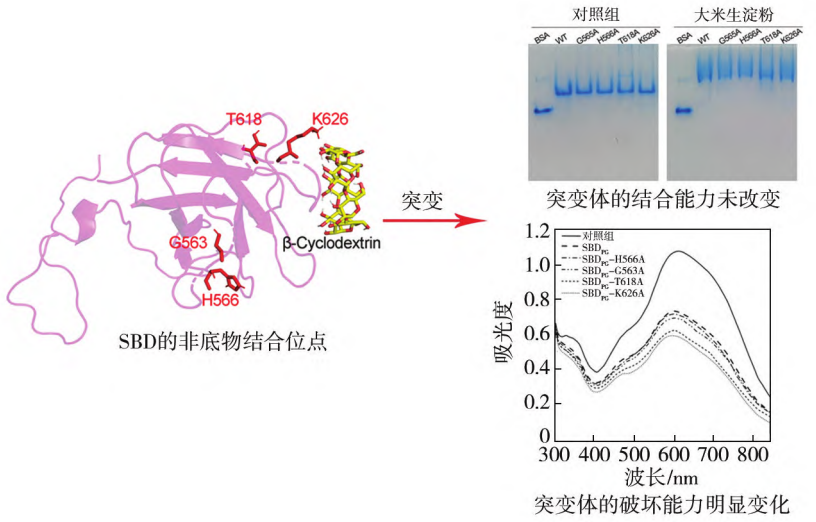


图 1 SBD 中非结合位点对其功能的影响[50]

Fig.1 Role of non-binding sites in the function of the SBD[50]

3 SBD 对酶催化特性的影响

随着对 SBD 研究的深入,其功能不仅局限于与底物发生作用进而影响酶的催化效率,SBD 还能够影响其所连接的碳水化合物活性酶的很多酶学特性,例如底物特异性、反应条件、稳定性和聚合度等。

3.1 SBD 影响酶的底物特异性

CBM69 家族属于海洋源的 SBD 家族,其中一个来自海洋淀粉酶 AmyP 的 SBD 表现出对底物特异性的影响。缺失 SBD 的突变体对糊化淀粉的水解效率(k_{cat}/K_m)下降 4.3 倍;但是对淀粉颗粒的水解效率仅下降 2.3 倍。这表明,SBD 能识别不同的底物,并且更多地参与了糊化(可溶性)淀粉的水解[73]。AmyP 来源于一个由海底沉积物构建的海洋宏基因组文库,其 SBD 偏好识别糊化淀粉的原因可能是糊化淀粉更类似它的天然底物。毕竟在黑暗寒冷的深海环境中,并没有淀粉类植物生长,海藻藻类淀粉的沉积也很少。

人类肠道微生物酒神瘤胃球菌(*Ruminococcus bromii*)来源的一个淀粉结合蛋白 Sas20 中也含有 SBD。它对可溶性淀粉和麦芽七糖的结合能力较强,但对环糊精的结合能力很弱。该特征主要是由于 SBD 的结构具有高度柔性,可能使蛋白 Sas20 能够采取不同的构象以便结合淀粉颗粒内具有不同特征的微结构区域,从而增强酒神瘤胃球菌水解膳食抗性淀粉的能力[74]。

很多 MFA 中含有 SBD。这类酶中的 SBD 处于结构的无序状态,没有晶体结构的准确信息,长期不清楚其具体功能[75]。来自降解糖噬糖菌(*Saccharophagus degradans*)的 MFA 具有一个属于 CBM20 家族的 SBD,被证明能够调节酶的产物特异性。移除该酶的 SBD 会导致酶的产物之一麦芽五糖的产量降低 3.5 倍;反之,将该 SBD 连接到来自巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的另一个 MFA 上,可提升其对麦芽五糖的特异性。结构分析与分子动力学模拟均表明,该 SBD 能促进对底物非还原末端的识别,并将底物链引导至催化结构域活性位点方向的凹槽末端[76]。

3.2 SBD 影响酶的反应条件

SBD 影响海洋淀粉酶的适冷性和耐盐性。来源于海洋细菌降解糖噬糖菌 2-40T 的淀粉酶 SdG5A 具有良好的适冷性和耐盐性。当它的 SBD 被截断后,SdG5A 在低温和高盐条件下的催化活性均显著降低。该 SBD 和 linker 区不仅负电荷密度和构象柔性高,能够产生静电排斥从而防止酶发生聚集,而且还富含酸性氨基酸残基,利于结合水合阳离子并维持稳定的水化层,从而提升海洋淀粉酶在低温或高盐环境中的水结合能力与水溶性[59,77]。对海洋古菌深海热液口热球菌(*Thermococcus siculi*)来源的普鲁兰酶也有类似报道[78-79]。由此可见,海洋源的 SBD 可能通过独特的结构特征(如负电荷密度高、构象柔性高),在酶适应海洋极端环境中扮演了重要角色。

在陆地源的酶中,SBD 也能显著影响酶的温度稳定性。来源于植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)S21 的 α-淀粉酶和嗜热地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans*)的 α-淀粉酶缺失 SBD 后,虽然最适反应温度都没改变,但是其中一个温度稳定性明显增强[80],另一个温度稳定性明显下降[81]。来源于食淀粉乳杆菌的淀粉酶 LaAmy 的热变性中点温度(Melting Temperature,Tm)为 61 ℃,缺失了 SBD 的突变体 Tm 显著下降为 28 ℃,降幅接近 55%[82]。以上研究均表明 SBD 在维持酶热稳定性方面具有重要作用。

3.3 SBD 影响酶的聚合度

在少数例子中,SBD 能作为结构模块直接影响酶蛋白的寡聚化状态,从而调控酶的稳定性与催化功能。例如,来源于嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)的普鲁兰酶 LaPul 能水解淀粉颗粒,具有一个隶属于 CBM41 家族的 SBD。全长 LaPul 为二聚体,而删除 SBD 后,LaPul 在溶液中由二聚体转变为单体[83]。栖热菌属(*Thermus*)来源的一个麦芽糖淀粉酶(Maltogenic Amylase)是二聚体,其 N 端的隶属于 CBM34 家族的 SBD 在二聚体形成中起关键作用。该 SBD 缺失后,麦芽糖淀粉酶不能维持二聚体而转变为单体[84]。这揭示了 SBD 功能的多维性,它是某些淀粉酶调控其高级结构与功能完整性的关键调控单元。

3.4 SBD 不影响或降低酶的催化效率

少数报道中,缺失 SBD 后,突变体的催化活性并没有发生显著改变。例如,源自芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)TS-23 的 α-淀粉酶及布氏热厌氧杆状菌(*Thermoanaerobacter brockii*)的淀粉普鲁兰酶被删除 SBD 后,突变体仍保持与野生型相同的催化效率[85-86]。可见,在特定酶中,SBD 并不是维持其生理生化功能所必需的结构域。这种现象也许可以从进化角度理解。SBD 在自然界中常采用水平基因转移(Horizontal Gene Transfer)的方式灵活适应其原始宿主的特定生态环境(如复杂多糖底物)[87]。但是随着环境变化,宿主的生理背景也随之改变,SBD 的功能就有可能变得无用,从而在实验条件下表现出“非必需”特性。这种“冗余”可能更加反映出其功能与特定生理/生态背景的紧密关联。对来源于极端嗜热细菌的一个淀粉普鲁兰酶中 SBD 的研究有新的发现,缺失 SBD 后并不影响该酶的生淀粉结合能力,但是缺失该 SBD 引起了紧邻的 X25 结构域(功能推测为候选的 CBM)的构象发生明显变化,该酶对可溶性淀粉和普鲁兰糖的催化效率均显著下降[88]。这一发现表明在复杂的多结构域酶中,SBD 还会与其他的结构域产生某种协同作用。

关于 SBD 降低酶催化效率的案例仅有零星报道。来源于暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)的 α-淀粉酶 AmyJ33r 只能水解糊化的淀粉,不能水解淀粉颗粒。AmyJ33r 具有 3 个结构域,其中 E 结构域是 SBD,该 SBD 被删除后,缺失体对淀粉的亲和力反而增加 1 倍,催化效率也提高 1.7 倍,这表明该 SBD 会阻碍酶与底物的结合[89]。考虑到全酶 AmyJ33r 并不能水解淀粉颗粒,SBD 在该酶中的存在似乎是进化中的冗余。

4 SBD 功能的研究方法

4.1 研究 SBD 对酶催化活性的影响

在探究 SBD 对酶催化活性影响的研究中,构建并比较全酶与结构域缺失突变体的催化功能变化是最常见且有效的研究方法。通过结构域序列分析、蛋白结构预测以及辅助蛋白进化分析等信息学手段通常能识别出潜在的 SBD。然后运用常规的基因工程技术即可获得 SBD 的缺失突变体。比较 SBD 的缺失突变体和野生型酶的酶学性质差异,能够推断出 SBD 的主要功能。来源于人类肠道共生菌多形拟杆菌和海洋宏基因文库的两个 α-淀粉酶、来源于嗜酸乳杆菌的普鲁兰酶、来源于土豆的 GWD 删除 SBD 后,虽然都保留了水解淀粉颗粒的能力,但是催化效率均大幅度下降[43,48,73,83]。这证明了 SBD 的主要作用是影响淀粉颗粒水解。

4.2 研究 SBD 的结合能力

亲和凝胶电泳(Affinity Gel Electrophoresis)是一种快速简便的定性方法。SBD 电泳时如果与凝胶中的底物分子发生结合作用,SBD 的迁移速率减缓,表现为蛋白条带滞后或拖尾;SBD 与底物的结合能力越大,这种条带滞后或拖尾的现象就越明显[68,90]。亲和凝胶电泳常用于测试 SBD 与可溶多糖之间的结合作用,但是近年来利用薄膜旋回法微粒化处理生淀粉颗粒后,也能利用该方法测定 SBD 与不可溶的生淀粉之间的结合作

用[50]。消耗结合等温线法(Depletion Binding Isotherm)是一种定量方法。该方法将淀粉颗粒与一系列不同浓度的 SBD 共同孵育,达到吸附平衡后离心,通过测定未被吸附的游离蛋白浓度和拟合 Langmuir 吸附模型,即可获得 K_d 值[91]。K_d 值代表亲和力,K_d 值越小,表明 SBD 与底物的结合越牢固。但是,当结合能力非常弱时,消耗结合等温线法将不再适用[92]。除上述方法外,SBD 与底物间的相互作用还可通过紫外差示光谱技术(UV Difference Spectroscopy)[93]、等温滴定量热法(Isothermal Titration Calorimetry, ITC)[94]以及表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)[83]、蛋白下拉实验(Pull-down assay)[95]等技术进行研究。虽然目前对 SBD 结合能力的研究都是围绕 SBD 与陆地植物源的淀粉或多糖展开,但是这些方法也适用于研究 SBD 与海洋源的淀粉或多糖间的相互作用。

4.3 研究 SBD 的破坏能力

由于直接观察淀粉或多糖分子水平的结构变化颇具挑战,因此研究人员发展了一系列间接但十分有效地表征 SBD 破坏能力的方法。通过直链淀粉-碘吸收光谱法(Starch-iodine Complex Absorption Spectrum)测定 SBD 对直链淀粉结构的破坏程度,属于半定量的方法。该方法通过监测加入 SBD 后直链淀粉-碘复合物溶液在 600 nm 处特征峰的变化,评估 SBD 对直链淀粉螺旋结构的破坏程度[72]。通过差示扫描量热法(Differential Scanning Calorimetry, DSC)研究淀粉颗粒相变行为,属于定性技术。通过 DSC 分析与 SBD 孵育前后生淀粉的热力学性质变化,关键是糊化焓(Gelatinisation Enthalpy, ΔH)值的变化,能够反映 SBD 对淀粉颗粒微结构的破坏[50]。除上述方法外,SBD 破坏淀粉结构的作用还可以通过测定缺失突变体的催化速率是否受到 SBD 的影响来间接验证[71]。AFM 能用于观测 SBD 与直链淀粉纤维的作用,但是当利用 AFM 观测 SBD 与淀粉颗粒相互作用时,却并未获得清晰的结果[72]。此外,Ngo 等[96]通过分子对接和分子动力学模拟了原子层面的 SBD 与直链淀粉底物模型之间的相互作用。从这些研究方法中可以看出,多种方法并不能直接测定 SBD 与天然淀粉之间的真实破坏作用。未来,发展能够原位观察 SBD 对天然淀粉颗粒结构破坏过程的技术,将极大地深化对 SBD 破坏机制的研究。

5 展 望

SBD 是从碳水化合物结合模块 CBM 中划分出的一个概念,特指能结合淀粉的 CBM。近十年,随着人们对 SBD 的深入研究,对 SBD 的功能认知已不再局限于与淀粉结合。SBD 广谱结合多种糖类的事实已经模糊了 SBD 和 CBM 的界限[66-68],SBD 能影响酶的催化功能发生多种变化则揭示了其功能的复杂性[81];SBD 能够破坏淀粉结构更表明其是驱动淀粉在自然环境中降解的关键功能模块[50]。展望未来,以下研究方向值得深入探索。首先,SBD 在复杂自然环境中的多功能性与生态适应性机制亟待揭示。大部分关于 SBD 的研究仅停留在测试其与纯化的生淀粉是否具有结合效应,很少有检测多种底物的报道。在自然环境中,含有淀粉的植物细胞或藻类细胞自然破碎后,淀粉常与蛋白质、脂质、其他多糖等形成复合颗粒,并不是纯淀粉的状态。已有报道发现海洋藻类和动物肠道微生物源的 SBD 能结合多种非淀粉类的底物,说明这些 SBD 在复杂环境中为了适应和竞争碳源,进化出了更复杂的底物结合机制[73]。SBD 的这种广谱结合机制是独特的,还是与 CBM 的结合机制类似,目前仍不清楚。此外,SBD 在复杂自然环境中的多功能性对生态学的意义均为一些基于酶学实验的推测,尚无直接证据。CBM69 家族是我们前期发现的海洋源的 SBD 家族,其成员具有广谱结合能力[73]。近期 Foldseek 的检索结果显示该家族在海洋中的分布比前期基于一级序列的分析结果要更为广泛,暗示了 CBM69 家族在海洋藻类淀粉的降解中可能具有更重要的生态位。为此,亟待通过更多环境宏基因组学、环境宏转录组学以及生态检测大数据分析等加以验证。其次,最新研究表明,一个海洋细菌源的 SBD 具有独立的破坏能力,而且 SBD 破坏能力的提高显著促进了淀粉酶的降解效率[50]。如果这种独立的破坏能力在 SBD 中普遍存在,那么意味着至少在海洋环境中,SBD 影响淀粉降解的机制有了新的研究方向。此外,这种独立破坏能力的机制尚不明确,亟待通过高分辨率成像技术(如冷冻电镜)、分子动力学模拟等技术

加以揭示。

总之,人们对 SBD 的功能认知已经从“单一的结合底物”转向“多功能影响模块”。SBD 在微生物的碳源利用和高精度的碳水化合物活性酶开发方面都表现出重要价值。随着高分辨率成像技术、环境代谢物的原位质谱分析和基于结构的泛基因组分析等技术的发展,SBD 的功能和机制将被进一步阐明。

参考文献:

[1] Wang Q, Zhang Q, Han Y, et al. Carbon cycle in the microbial ecosystems of biological soil crusts[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2022(171): 108729.

[2] Akeju T, Sheremet A, Smirnova AV, et al. Microbial starch degradation in arid soil: Community dynamics, environmental influences, and archaeological implications[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2025(209): 109882.

[3] Roy JK, Arumugam N, Ranjan B, et al. An overview of raw starch digesting enzymes and their applications in biofuel development[M]. Singapore: Springer Singapore, 2021: 49-85.

[4] Wang Y, Tian Y, Zhong Y, et al. Improved hydrolysis of granular starches by a psychrophilic α-amylase starch binding domain-fusion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023,71(23):9040-9050.

[5] Mareček F, Møller MS, Svensson B, et al. A putative novel starch-binding domain revealed by in silico analysis of the N-terminal domain in bacterial amylomaltases from the family GH77[J]. 3 Biotech, 2021, 11(5): 229.

[6] Janeček Š, Mareček F, Macgregor EA, et al. Starch-binding domains as CBM families-history, occurrence, structure, function and evolution[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(8): 107451.

[7] Zhang T, Tian D, Song WY, et al. Discovery, expression, modification, and application of raw starch-degrading enzymes: Current status and future perspectives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(47): 30068-30084.

[8] Apriyanto A, Compart J, Fettke J. A review of starch, a unique biopolymer-structure, metabolism and in planta modifications[J]. Plant Science, 2022(318): 111223.

[9] Chen ZG, Zhong HX, Chen M, et al. The fine structure of starch: A review[J]. npj Science of Food, 2025, 9(1): 50.

[10] Salimi M, Channab BE, El Idrissi A, et al. A comprehensive review on starch: Structure, modification, and applications in slow/controlled-release fertilizers in agriculture[J]. Carbohydrate Polymers, 2023(322): 121326.

[11] Rashwan AK, Younis HA, Abdelshafy AM, et al. Plant starch extraction, modification, and green applications: A review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2024, 22(5): 2483-2530.

[12] Prabhu M, Chemodanov A, Gottlieb R, et al. Starch from the sea: The green macroalga *Ulva ohnoi* as a potential source for sustainable starch production in the marine biorefinery[J]. Algal Research, 2019(37): 215-227.

[13] Otero P, Carpena M, Garcia-Oliveira P, et al. Seaweed polysaccharides: Emerging extraction technologies, chemical modifications and bioactive properties[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(13): 1901-1929.

[14] Tagliapietra BL, Borges LA, Ferreira NLB, et al. Seaweed as a potential new source for starch, produced in the sea: A short review[J]. Starch-Stärke, 2023, 75(1-2): 2200130.

[15] Arnosti C, Wietz M, Brinkhoff T, et al. The biogeochemistry of marine polysaccharides: Sources, inventories, and bacterial drivers of the carbohydrate cycle[J]. Annual Review of Marine Science, 2021(13): 81-108.

[16] Dittmar T, Lennartz ST, Buck-Wiese H, et al. Enigmatic persistence of dissolved organic matter in the ocean[J]. Nature Reviews Earth & Environment, 2021, 2(8): 570-583.

[17] Bello-Perez LA, Flores-Silva PC, Agama-Acevedo E, et al. Starch digestibility: Past, present, and future[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(14): 5009-5016.

[18] Cerqueira FM, Photenhauer AL, Pollet RM, et al. Starch digestion by gut bacteria: Crowdsourcing for carbs[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(2): 95-108.

[19] Haslam M. The decomposition of starch grains in soils: Implications for archaeological residue analyses[J]. Journal of Archaeological Science, 2004, 31(12): 1715-1734.

[20] Cong J, Yang Y, Liu X, et al. Analyses of soil microbial community compositions and functional genes reveal potential consequences of natural forest succession[J]. Scientific Reports, 2015(5): 10007.

[21] Žifčáková L, Větrovský T, Lombard V, et al. Feed in summer, rest in winter: Microbial carbon utilization in forest topsoil[J]. Microbiome, 2017, 5(1): 122.

[22] Rinnan R, Bååth E. Differential utilization of carbon substrates by bacteria and fungi in tundra soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3611-3620.

[23] Paine ER, Schmid M, Boyd PW, et al. Rate and fate of dissolved organic carbon release by seaweeds: A missing link in the coastal ocean carbon cycle[J]. Journal of Phycology, 2021, 57(5): 1375-1391.

[24] Han B, Kim M, Lee KE, et al. *Formosa sediminum* sp. nov., a starch-degrading bacterium isolated from marine sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(3): 2008-2015.

[25] Zhang J, Zhang Y, Liu R, et al. *Iocasia fonsfrigidae* NS-1 gen. nov., sp. nov., a novel deep-sea bacterium possessing diverse carbohydrate metabolic pathways[J]. Frontiers in Microbiology, 2021(12): 725159.

[26] Jiang Z, Li Y, Zhang D. *Marinigracilibium pacificum* gen. nov., sp. nov., a starch-degrading bacterium isolated from tropical western Pacific[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2023, 116(2): 185-192.

[27] Fang W, Xue S, Deng P, et al. AmyZ1: A novel α-amylase from marine bacterium *Pontibacillus* sp. ZY with high activity toward raw starches[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 95.

[28] Wu X, Ruan Y, Chen T, et al. First echinoderm alpha-amylase from a tropical sea cucumber (*Holothuria leucospilota*): Molecular cloning, tissue distribution, cellular localization and functional production in a heterogenous *E. coli* system with codon optimization[J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0239044.

[29] Radzlin N, Mohamad Ali MS, Goh KM, et al. Exploring a novel GH13_5 α-amylase from *Jeotgalibacillus malaysiensis* D5(T) for raw starch hydrolysis[J]. AMB Express, 2024, 14(1): 71.

[30] Sun Y, Liu G, Liu G, et al. The novel amylase function of the carboxyl terminal domain of Amy63[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2023(671): 10-17.

[31] Liu F, Zheng X, Liao W, et al. Heterologouse expression and biochemical characterization of a new α-amylase from *Nocardiopsis aegyptia* HDN19-252 of antarctic animal origin[J]. Marine Drugs, 2025, 23(4): 159.

[32] Hirata A, Mikami B. Structural insight into sugar-binding modes of microbial β-amylase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024(733): 150695.

[33] Ishii N, Haga K, Yamane K, et al. Crystal structure of asparagine 233-replaced cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011 determined at 1.9 Å resolution[J]. Journal of Molecular Recognition, 2000, 13(1): 35-43.

[34] Dauter Z, Dauter M, Brzozowski AM, et al. X-ray structure of novamyl, the five-domain "maltogenic" α-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: Maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution[J]. Biochemistry, 1999, 38(26): 8385-8392.

[35] Suyama Y, Muraki N, Kusunoki M, et al. Crystal structure of the starch-binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*[J]. Acta Crystallographica Section F, 2017, 73(10): 550-554.

[36] Chu CH, Li KM, Lin SW, et al. Crystal structures of starch binding domain from *Rhizopus oryzae*glucoamylase in complex with isomaltooligosaccharide: Insights into polysaccharide binding mechanism of CBM21 family[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2014, 82(6): 1079-1085.

[37] Boraston AB, Healey M, Klassen J, et al. A structural and functional analysis of α-glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(1): 587-598.

[38] Cockburn DW, Suh C, Medina KP, et al. Novel carbohydrate binding modules in the surface anchored α-amylase of *Eubacterium rectale* provide a molecular rationale for the range of starches used by this organism in the human gut[J]. Molecular Microbiology, 2018, 107(2): 249-264.

[39] Wimmer BH, Morañs S, Amit I, et al. Spatial constraints drive amylosome-mediated resistant starch degradation by *Ruminococcus bromii* in the human colon[J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 10763.

[40] Ohtaki A, Iguchi A, Mizuno M, et al. Mutual conversion of substrate specificities of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α-amylasesTVAI and TVAII by site-directed mutagenesis[J]. Carbohydrate Research, 2003, 338(15): 1553-1558.

[41] Ahn WC, An Y, Song KM, et al. Dimeric architecture of maltodextrin glucosidase (MalZ) provides insights into the substrate recognition and hydrolysis mechanism[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022(586): 49-54.

[42] East A, Mechaly AE, Huysmans Gerard HM, et al. Structural basis of pullulanase membrane binding and secretion revealed by X-ray crystallography, molecular dynamics and biochemical analysis[J]. Structure, 2016, 24(1): 92-104.

[43] Mikkelsen R, Suszkiewicz K, Blennow A. A novel type carbohydrate-binding module identified in α-glucan, water dikinases is specific for regulated plastidial starch metabolism[J]. Biochemistry, 2006, 45(14): 4674-4682.

[44] Turkenburg JP, Brzozowski AM, Svendsen A, et al. Structure of a pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2009, 76(2): 516-519.

[45] Brown HA, Deveaux AL, Juliano BR, et al. BoGH13ASus from *Bacteroides ovatus* represents a novel α-amylase used for *Bacteroides* starch breakdown in the human gut[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2023, 80(8): 232.

[46] Conchou L, Martin J, Gonçalves IR, et al. The *Candida glabrata* glycogen branching enzyme structure reveals unique features of branching enzymes of the *Saccharomycetaceae phylum*[J]. Glycobiology, 2022, 32(4): 343-355.

[47] Valdez HA, Busi MV, Wayllace NZ, et al. Role of the N-terminal starch-binding domains in the kinetic properties of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*[J]. Biochemistry, 2008, 47(9): 3026-3032.

[48] Koropatkin NM, Smith TJ. SusG: A unique cell-membrane-aassociated α-amylase from a prominent human gut symbiont targets complex starch molecules[J]. Structure, 2010, 18(2): 200-215.

[49] Xu J, Ren F, Huang CH, et al. Functional and structural studies of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. LM18-11[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2014, 82(9): 1685-1693.

[50] Fu Z, Zhang Z, Chu M, et al. A starch-binding domain of α-amylase (AmyPG) disrupts the structure of raw starch[J].

International Journal of Biological Macromolecules, 2024 (257): 128673.

[51] Valk V, Lammerts Van ueren A, van der Kaaij RM, et al. Carbohydrate-binding module 74 is a novel starch-binding domain associated with large and multidomain α-amylase enzymes [J]. The FEBS Journal, 2016, 283(12): 2354-2368.

[52] Jung DH, Seo DH, Kim YJ, et al. The presence of resistant starch-degrading amylases in *Bifidobacterium adolescentis* of the human gut[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020(161): 389-397.

[53] Schreier TB, Umhang M, Lee SK, et al. Like SEX4 1 acts as a β-amylase-binding scaffold on starch granules during starch degradation[J]. The Plant Cell, 2019, 31(9): 2169-2186.

[54] Mahlow S, Orzechowski S, Fettke J. Starch phosphorylation: Insights and perspectives[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(14): 2753-2764.

[55] Grondin JM, Tamura K, Déjean G, et al. Polysaccharide utilization loci: Fueling microbial communities[J]. Journal of Bacteriology, 2017, 199(15): :e00860-e00816.

[56] Tamura K, Foley MH, Gardill BR, et al. Surface glycan-binding proteins are essential for cereal beta-glucan utilization by the human gut symbiont *Bacteroides ovatus*[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019, 76(21): 4319-4340.

[57] Cameron EA, Kwiatkowski KJ, Lee BH, et al. Multifunctional nutrient-binding proteins adapt human symbiotic bacteria for glycan competition in the gut by separately promoting enhanced sensing and catalysis [J]. mBio, 2014, 5(5): e01441-e01414.

[58] Wang Y, Tian Y, Rennison AP, et al. Applying the Sabatier principle to decipher the surface-structure-dependent catalysis of different starch granules by pullulanase [J]. JACS Au, 2025, 5(1): 55-60.

[59] You Y, Kong H, Li C, et al. Carbohydrate binding modules: Compact yet potent accessories in the specific substrate binding and performance evolution of carbohydrate-active enzymes[J]. Biotechnology Advances, 2024(73): 108365.

[60] Ribeiro DO, Viegas A, Pires VMR, et al. Molecular basis for the preferential recognition of β1,3-1,4-glucans by the family 11 carbohydrate-binding module from *Clostridium thermocellum* [J]. The FEBS Journal, 2020, 287(13): 2723-2743.

[61] 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 and Biotechnology, 2009, 36(3): 341-346.

[62] Shi Q, Abdel-Hamid AM, Sun Z, et al. Carbohydrate-binding modules facilitate the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Releasing reducing sugars and dissociative lignin available for producing biofuels and chemicals [J]. Biotechnology Advances, 2023(65): 108126.

[63] Valdez HA, Peralta DA, Wayllace NZ, et al. Preferential binding of SBD from *Arabidopsis thaliana* SSIII to polysaccharides: Study of amino acid residues involved[J]. Starch-Stärke, 2011, 63(8): 451-460.

[64] Raththagala M, Brewer MK, Parker MW, et al. Structural mechanism of laforin function in glycogen dephosphorylation and lafora disease[J]. Molecular Cell, 2015, 57(2): 261-272.

[65] Mcarthur JV. Bacteria in oligotrophic environments: Starvation-survival lifestyle[J]. Ecology, 1998(79): 1473-1475.

[66] Oh IN, Jane JL, Wang K, et al. Novel characteristics of a carbohydrate-binding module 20 from *Hyperthermophilic bacterium* [J]. Extremophiles, 2015, 19(2): 363-371.

[67] Grisolia MJ, Peralta DA, Valdez HA, et al. The targeting of starch binding domains from starch synthase III to the cell wall alters cell wall composition and properties[J]. Plant Molecular Biology, 2017, 93(1-2): 121-135.

[68] Duan CJ, Feng YL, Cao QL, et al. Identification of a novel family of carbohydrate-binding modules with broad ligand specificity[J]. Scientific Reports, 2016(6): 19392.

[69] Sorimachi K, Le Gal-Coëffet MF, Williamson G, et al. Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to beta-cyclodextrin [J]. Structure, 1997, 5(5): 647-661.

[70] Williamson MP, Le Gal-Coëffet MF, Sorimachi K, et al. Function of conserved tryptophans in the *Aspergillus niger* glucoamylase 1 starch binding domain [J]. Biochemistry, 1997, 36(24): 7535-7539.

[71] Southall SM, Simpson PJ, Gilbert HJ, et al. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch [J]. FEBS Letters, 1999, 447(1): 58-60.

[72] Jiang TY, Ci YP, Chou WI, et al. Two unique ligand-binding clamps of *Rhizopus oryzae* starch binding domain for helical structure disruption of amylose[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41131.

[73] Peng H, Zheng Y, Chen M, et al. A starch-binding domain identified in α-amylase (AmyP) represents a new family of carbohydrate-binding modules that contribute to enzymatic hydrolysis of soluble starch[J]. The FEBS Journal, 2014, 588(7): 1161-1167.

[74] Cerqueira FM, Photenhauer AL, Doden HL, et al. Sas20 is a highly flexible starch-binding protein in the *Ruminococcus bromii* cell-surface amylosome[J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(5): 101896.

[75] Han X, Ding N, Ban X, et al. Fusion of maltooligosaccharide-forming amylases from two origins for the improvement of maltopentaose synthesis [J]. Food Research International, 2021, 150(Pt A): 110735.

[76] Ding N, Zhao B, Han X, et al. Starch-binding domain modulates the specificity of maltopentaose production at moderate

temperatures[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(29): 9057-9065.

[77] Ding N, Zhao B, Ban X, et al. Carbohydrate-binding module and linker allow cold adaptation and salt tolerance of maltopentaose-forming amylase from marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40 (T)[J]. Frontiers in Microbiology, 2021(12): 708480.

[78] Wu X, Dou B, Wang B, et al. Improved stability and hydrolysates of hyperthermophilic GH57 type II pullulanase from the deep-sea archaeon *Thermococcus siculi* HJ21 by truncation[J]. Catalysts, 2023, 13(3): 453.

[79] Soma M. Thermostable amylopullulanases: Sources and applications[J]. Industrial Biotechnology, 2024, 20(6): 268-278.

[80] Kanpiengjai A, Nguyen TH, Haltrich D, et al. Expression and comparative characterization of complete and C-terminally truncated forms of saccharifying α-amylase from *Lactobacillus plantarum* S21[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017(103): 1294-1301.

[81] Zeng J, Guo J, Tu Y, et al. Functional study of C-terminal domain of the thermoacidophilic raw starch-hydrolyzing α-amylase Gt-amy[J]. Food Science and Biotechnology, 2020, 29(3): 409-418.

[82] Herrera C, Guillén D, Manterola AM, et al. More is not always better. Multiple carbohydrate-binding domains for efficient starch hydrolysis[J]. Food Bioscience, 2024(62): 105306.

[83] Wang Y, Svensson B, Henrissat B, et al. Functional roles of N-terminal domains in pullulanase from human gut *Lactobacillus acidophilus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(48): 18898-18908.

[84] Kim TJ, Nguyen VD, Lee HS, et al. Modulation of the multisubstrate specificity of *Thermus* maltogenic amylase by truncation of the N-terminal domain and by a salt-induced shift of the monomer/dimer equilibrium[J]. Biochemistry, 2001, 40(47): 14182-14190.

[85] Lo HF, Lin LL, Chiang WY, et al. Deletion analysis of the C-terminal region of the alpha-amylase of *Bacillus* sp. strain TS-23[J]. Archives of Microbiology, 2002, 178(2): 115-123.

[86] Mumcu H, Kayrav A, isleyen ND, et al. Cloning and characterization of thermostable amylopullulanase TbbApu and its C-terminal truncated variants with enhanced activity in organic solvents[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023(164): 110176.

[87] Chang H, Bai J, Zhang H, et al. Origin and evolution of the main starch biosynthetic enzymes[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8(3): 462-468.

[88] Kayrav A, Mumcu H, Durmus N, et al. Revealing the role of the X25 domains through the characterization of truncated variants of amylopullulanase enzyme from *Thermoanaerobacter brockii*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 270(Pt 2): 132404.

[89] Hernández-Heredia S, Peña-Castro JM, Aguilar-Uscanga MG, et al. AmyJ33, a truncated amylase with improved catalytic properties[J]. Biotechnology Letters, 2022, 44(12): 1447-1463.

[90] Liberato MV, Campos BM, Tomazetto G, et al. Unique properties of a *Dictyostelium discoideum* carbohydrate-binding module expand our understanding of CBM-ligand interactions[J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(5): 101891.

[91] Alafnan S, Awotunde A, Glatz G, et al. Langmuir adsorption isotherm in unconventional resources: Applicability and limitations[J]. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2021(207): 109172.

[92] Glaring MA, Baumann MJ, Hachem MA, et al. Starch-binding domains in the CBM45 family-low-affinity domains from glucan, water dikinase and α-amylase involved in plastidial starch metabolism[J]. The FEBS Journal, 2011, 278(7): 1175-1185.

[93] Boraston AB, Chiu P, Warren RA, et al. Specificity and affinity of substrate binding by a family 17 carbohydrate-binding module from *Clostridium cellulovorans* cellulase 5A[J]. Biochemistry, 2000, 39(36): 11129-11136.

[94] Brust H, Orzechowski S, Fettke J. Starch and glycogen analyses: Methods and techniques[J]. Biomolecules, 2020, 10(7): 1020.

[95] Pickles IB, Chen Y, Moroz O, et al. Precision activity-based α-amylase probes for dissection and annotation of linear and branched-chain starch-degrading enzymes[J]. Angewandte Chemie, 2025, 137(5): e202415219.

[96] Ngo ST, Tran-Le PD, Ho GT, et al. Interaction of carbohydrate binding module 20 with starch substrates[J]. RSC Advances, 2019, 9(43): 24833-24842.