

来源于酸热脂环酸杆菌的嗜酸性 α -淀粉酶的表达研究

Expression of Acidophilic α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*

袁铁铮¹, 姚 斌^{1*}, 罗会颖¹, 王亚茹¹, 伍宁丰², 范云六²

YUAN Tie-Zheng¹, YAO Bin^{1*}, LUO Hui-Ying¹, WANG Ya-Ru¹, WU Ning-Feng² and FAN Yun-Liu²

1. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

1. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

摘 要 从嗜酸耐热的酸热脂环酸杆菌 *Alicyclobacillus acidocaldarius* 中克隆到 α -淀粉酶的基因 (*amy*), 该基因全长 3903bp, 编码 1301 个氨基酸, 理论分子量约 140kD。将基因 *amy* 分别克隆到大肠杆菌 *E. coli* 表达载体 pET-22b(+) 和毕赤酵母 *P. pastoris* 表达载体 pPIC9a, 并在大肠杆菌和毕赤酵母中得到了表达, 表达产物具有淀粉酶的活性。对酵母中表达的酶蛋白 AMY 进行了纯化, 并初步研究了它的酶学性质, 它的作用最适 pH 3.2, 在 pH 2.5 ~ 4.6 范围内, 酶活性保留 50% 以上, 它的最适温度 65℃, 在 70℃ 下处理 30 min, 酶活性维持 50% 以上, 基本保留了天然酶蛋白的耐热性和嗜酸性。位于基因 *amy* 内部 +1174 ~ +3288bp 的基因片段 *amy'* 全长 2115bp, 编码 705 个氨基酸, 在 *E. coli* 表达后依然具有淀粉酶的活性。

关键词 嗜酸性 α -淀粉酶, 酸热脂环酸杆菌, 毕赤酵母, 基因表达

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0078-06

Abstract The α -amylase (EC 3.2.1.1) from the Gram-positive *Alicyclobacillus acidocaldarius* was one kind of thermoacidophilic enzyme, with optimal temperature and pH of 75℃ and 3, respectively. The nucleotide sequence of the gene *amy* was cloned by PCR. The gene *amy* was 3901bp long, comprising one open reading frame encoding a polypeptide of 1301 amino acids. The calculated molecular weight of the α -amylase AMY was about 140kD. The gene *amy* was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and *Pichia pastoris* respectively, and both of the cloned proteins had bioactivity. The activity of amylase expressed in *P. pastoris* was further testified by amylase activity staining. The α -amylase expressed in *P. pastoris* had been purified and characterized. The apparent molecular weight of that was about 160kD according to SDS-PAGE. The optimum of pH for the enzyme was pH 3.2 as the native enzyme was; but the optimum of temperature was 65℃ and a little lower than that of the native enzyme. Above 50% of relative activity remained after incubation for 30 minutes in 70℃. So the enzyme expressed by *P. pastoris* was also thermoacidophilic. Moreover some sequence was cloned by PCR, which ranged from +1174 bp to +3288 bp in the gene *amy*, encoding 705 amino acids with the calculated molecular weight of 79kD. The truncated gene *amy'* was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) induced by 1mmol/L IPTG, and the expressed enzyme also retained α -amylase activity.

Key words acidophilic α -amylase, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Pichia pastoris*, gene expression

Received: June 22, 2004; Accepted: August 12, 2004.

This work was supported by Grant from Chinese National Programs for High Technology Research and Development(863)(No. 2001AA214041).

* Corresponding author. Tel: 86-10-68975126; E-mail: yaobin@mail.caas.net.cn

国家高技术研究与发展计划(863 计划)项目资助(No. 2001AA214041)。

α -淀粉酶(1,4- α -D-葡萄糖苷水解酶, EC 3.2.1.1)能够以淀粉为底物,从淀粉糖链内部水解1,4- α -D-葡萄糖苷键。现已有多种 α -淀粉酶得到分离^[1],并进行了酶学性质研究和基因克隆、表达的工作,对其作用机理如热稳定性机理等也进行了较多的研究,但目前研究较多以及得到应用的 α -淀粉酶其最适pH都在pH5.0以上、在强酸性条件(pH2~4)下酶活性较低。嗜酸性 α -淀粉酶的研究较少,更未得以开发应用。开展嗜酸性 α -淀粉酶的研究,无论对了解其在极端酸性环境下作用的分子机制,还是开发有应用价值的新酶品种都是有意义的。

酸热脂环酸杆菌 *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Bacillus acidocaldarius*)是一种耐高温嗜酸性的极端微生物,是目前已经分离到的为数不多的能够分泌嗜酸性 α -淀粉酶的微生物之一^[2]。目前已经从 *B. acidocaldarius* Agnano101^[2]、104-1A^[3]和 A-2^[4]、*Bacillus* sp. 11-1S^[5]等菌株中分离到了几种 α -淀粉酶,这些 α -淀粉酶最适作用pH 3.5左右,最适温度70~75℃,分子量在50~70kD。而从 *A. acidocaldarius* ATCC27009^[6,7]分离到的一种嗜酸性 α -淀粉酶 AMY,分子量约为160kD,此酶具有 α -淀粉酶的活性,可能还有支链淀粉酶的活性,最适作用pH3.0,最适温度75℃,活性不依赖于Ca²⁺存在。该淀粉酶是一种糖蛋白,糖基化的形式是O-连接糖蛋白,糖基化位点可能位于N-端到Asp466或C-端大约100氨基酸残基。该 α -淀粉酶的基因 *amy* 全长3903bp,编码1301个氨基酸,蛋白质的理论分子量约140kD,该基因已经在大肠杆菌中获得表达,表达产物具有 α -淀粉酶的活性^[8]。

目前在毕赤酵母 *P. pastoris* 表达淀粉酶的报道还不多,还未见表达嗜酸性耐热 α -淀粉酶的报道。本研究报道在毕赤酵母 *P. pastoris* 中表达来源于 *A. acidocaldarius* 的嗜酸性 α -淀粉酶 AMY,以及表达的 α -淀粉酶的酶学性质,还报道了 α -淀粉酶的基因 *amy* 经截短后在大肠杆菌 *E. coli* 中的表达,证实表达后的蛋白依然具有淀粉酶活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及培养条件:嗜酸性耐热淀粉酶产生菌 *Alicyclobacillus acidocaldarius* 为本实验室保存。液体生长培养基为:2.5g/L (NH₄)₂SO₄, 0.2g/L MgSO₄·7H₂O, 3.0g/L KH₂PO₄, 0.25g/L CaCl₂, 5g/L 酵母提取物。接种前调节培养基pH3.5, 60℃静止培

养。大肠杆菌 *E. coli* JM109 和 BL21(BE3)、毕赤酵母 *P. pastoris* GS115 均为本实验室保存。

1.1.2 载体:大肠杆菌表达载体 pET-22b(+)购自 Novogen 公司,毕赤酵母质粒表达载体 pPIC9- α 为本实验室改造构建。

1.1.3 主要试剂:可溶性淀粉、IPTG、X-gal 购自 Sigma 公司,限制酶、连接酶、蛋白电泳分子量标准购自 Bio-lab 公司, Taq 酶购自 TaKaRa 公司,中分子量标准蛋白质和层析介质购自 Amersham Pharmacia 公司,低分子量标准蛋白质购自上海丽珠东风生物技术公司,其它试剂为国产分析纯。

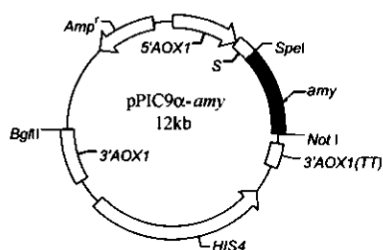
1.2 方法

1.2.1 α -淀粉酶活性测定:采用 Somogyi-Nelson 方法^[10]。 α -淀粉酶活性单位(IU)定义为:在60℃、pH3.5的条件下,每分钟 α -淀粉酶分解可溶性淀粉产生1 μ mol还原糖(以麦芽糖含量计)所需的酶量为一个活性单位。活性测定缓冲液为20mmol/L乙酸钠,5mmol/L CaCl₂和1mmol/L MgSO₄,用冰乙酸调至pH3.5。底物是用测定缓冲液溶解的浓度1%(W/V)可溶性淀粉溶液,反应时间10 min,反应体系2mL,含1mL底物和1mL稀释的酶液。

1.2.2 α -淀粉酶基因 *amy* 的克隆:提取 *Alicyclobacillus acidocaldarius* 总DNA为模板,根据 Koivula 等报道的序列合成3对引物^[7],分别是P1和P2、P5和P6、P7和P8,其序列为:P1:5' gatetagaactagtc-atggatgcacgigaagtgaca, P2:5' atacggcgcgt-cactttttgagagcgatagg, P5:5' tggagctcagcttgaagg, P6:5' cgtegacggcgtgtgtct, P7:5' acagtgtaatgaactacc, P8:5' tgcgctetgaaatccccg。分别进行PCR扩增,得到A、B、C三个片段,分别克隆到质粒pUC19,测序后再逐一拼接得到全长基因 *amy*,将 *amy* 克隆到表达载体 pET-22b(+)上。

1.2.3 *amy* 在大肠杆菌中的表达和 α -淀粉酶的释放:将质粒载体 pET-22b(+)和 pET-22b(+)-*amy* 分别转化到 *E. coli* BL21(DE3),诱导表达,诱导物 IPTG 的浓度为1mmol/L,30℃震荡培养3 h,5000g离心5 min收集菌体,用测定缓冲液洗涤菌体,重悬浮细胞,冰浴条件下超声波破碎细胞,直至悬浮液相对澄清,离心取上清,进行酶活性测定。

1.2.4 *amy* 在 *P. pastoris* 中的表达:将基因 *amy* 克隆到质粒表达载体 pPIC9- α ,酵母细胞的转化、重组酵母的筛选、重组酵母的诱导表达方法参考 Invitrogen 操作手册。构建的重组酵母表达载体结构示意图见图1。

图1 重组质粒 pPIC9 α -amy 结构示意图Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pPIC9 α -amy

1.2.5 α -淀粉酶的粗纯化:将含 α -淀粉酶的 *P. pastoris* 发酵液 5000g 离心 15 min, 使用超滤膜包 VIVA-FLOW 50(德国 Sartorius 公司)浓缩上清液并交换缓冲液, 再用阴离子交换树脂 HiTrap Q Sephrose XL 分离样品, 合并部分洗脱峰, 对 10mmol/L 乙酸充分透析, 然后冷冻干燥, 得到 α -淀粉酶样品。

1.2.6 α -淀粉酶酶学性质测定:分别在 pH 2.2、3.0、3.2、3.6、4.0、4.6、5.2 和 5.8 的条件下测定酶活性, 确定其作用的最适 pH。分别在 30℃、40℃、60℃、65℃、70℃、73℃、76℃、80℃ 和 90℃ 下测定其酶活性, 确定其作用的最适温度。 α -淀粉酶的热稳定性测定方法为: 酶分别在 70℃、80℃、90℃ 保温 2、5、10、15、20、30 min, 冰浴后在 60℃、pH3.5 的条件下测定酶活性。

1.2.7 淀粉酶活性染色:SDS-PAGE 电泳分离 α -淀粉酶 AMY, 在分离胶中含有 0.2% 的可溶性淀粉, 电泳完毕后用酶活性测定缓冲液室温振荡洗胶 1 h, 更换新鲜缓冲液后 37℃ 保温过夜, 将胶放入稀碘液中显色, 在蓝紫色背景下可显现酶蛋白降解淀粉形成的反白色条带。

1.2.8 对可溶性淀粉水解程度的测定:采用溶液中还原糖含量占干物质质量的百分率来测定 AMY 对淀粉的水解程度, 测定还原糖含量使用 Somogyi-Nelson 法定量。准确称取 2.000g 可溶性淀粉, 溶于 100mL 的酶活性测定缓冲液, 测定时取 20mL 淀粉溶液与 5mL α -淀粉酶 AMY 稀释液(总活性单位 8 u)混合, 60℃ 下保温, 每隔一段时间取样 0.5mL, 测定还原糖。另取 10mL 淀粉溶液, 于 100℃ 烘干 30 h, 恒重后测定干物质的质量。

1.2.9 基因片段 amy' 的克隆和表达:同样以 *Alicyclobacillus acidocaldarius* 总 DNA 为模板, 合成引物 P10: 5' gcaattcatgcaagcgtatgcacatg 和 P11: 5' gctctagactcgagtcacgtcaccacaaatggcacctt, 进行 PCR 得到核苷酸片段 amy', 克隆到质粒 pUC19 并进行序列测定, 将 amy' 克隆到质粒表达载体 pET-22b(+)。

amy' 的诱导表达和表达的重组蛋白的释放与 1.2.4 的方法相同。

1.2.10 在 *E. coli* 表达的外源基因表达产物释放后的稳定性:分别诱导表达克隆到 *E. coli* BL21(DE3) 的基因 amy 和基因片段 amy', 表达和表达重组蛋白的释放与 1.2.4 的方法相同, 5000g 离心 5 min 后取上清, 分别在 0℃ 和 30℃ 保温一定时间后测定上清液残留的酶活性。

2 结果与分析

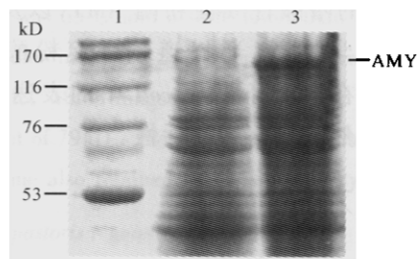
2.1 α -淀粉酶编码基因 amy 的克隆和基因片段 amy' 的克隆

克隆得到 α -淀粉酶编码基因 amy, 该基因全长 3901bp, 编码 1301 个氨基酸, 理论分子量约 140kD, 与 Koivula 等^[7]发表的核苷酸序列比较, 基因 amy 第 + 3556 位碱基由 G 变为 C, 导致氨基酸序列中 Ala1186 变成 Pro1186。

克隆到的基因片段 amy' 位于基因 amy 内部 + 1174 ~ + 3288bp, 全长 2115bp, 编码 705 个氨基酸, 理论分子量约 79kD。

2.2 在 *E. coli* 中表达 α -淀粉酶 AMY

α -淀粉酶编码基因 amy 插入到表达载体 pET-22b(+)上得到重组载体 pET-22b(+)-amy, 转化大肠杆菌后得到重组子, 诱导重组子, 诱导后的菌液经 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离, 出现一条分子量约为 140kD 的特异性条带(图 2), 与此酶的理论分子量相当。大肠杆菌培养上清液中没有检测到淀粉酶活性, 超声波破碎细胞后, 对照组的菌体破碎液上清中没有检测到淀粉酶活性, 含有重组质粒载体的菌体破碎液上清的淀粉酶活性为 0.04u/mL, 表明基因 amy 在大肠杆菌细胞内得到表达, 且表达酶蛋白具有生物学活性。

图2 α -淀粉酶基因 amy 在 *E. coli* 中表达的 SDS-PAGEFig. 2 SDS-PAGE analysis of α -amylase expressed in *E. coli*

1: Standard protein molecular weight; 2: *E. coli* with plasmid pET-22b(+); 3: *E. coli* with recombinant plasmid pET-22b(+)-amy.

2.3 在 *P. pastoris* 中表达 α -淀粉酶 AMY

重组毕赤酵母转化子经甲醇诱导 48h 后,测定诱导培养基中 α -淀粉酶活性,筛选到表达 α -淀粉酶的重组子,在摇床水平上,其中表达量最高的重组子分泌的 α -淀粉酶活性可以达到 0.3 u/mL 以上,比原菌株 *A. acidocaldarius* 的表达量 0.085 u/mL 提高 3 倍以上。培养液的 SDS-PAGE 结果表明,在 160kD 左右的位置上出现目的条带(图 3A),较理论分子量 大 20kD, α -淀粉酶活性染色结果表明(图 3B),在相应位置出现具有 α -淀粉酶活性的蛋白条带,证实 α -淀粉酶基因 *amy* 在 *P. pastoris* 中得到了表达和分泌,而且表达的蛋白具有生物学活性。

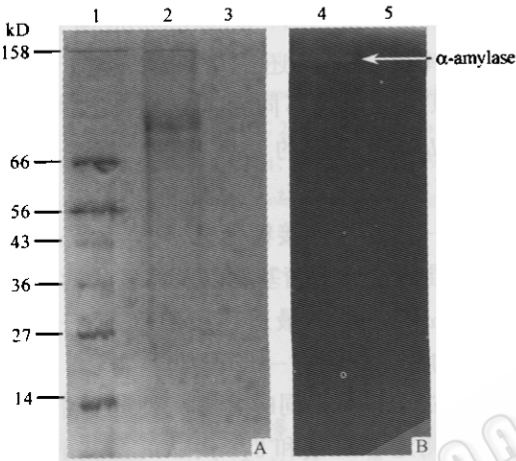


图 3 α -淀粉酶基因 *amy* 在毕赤酵母中表达的 SDS-PAGE(A)和活性染色(B)

Fig. 3 SDS-PAGE analysis(A) and activity staining(B) of α -amylase expressed in *P. pastoris*.

1: Standard protein molecular weight; 2 and 4: expression of α -amylase in recombinant *P. pastoris*; 3 and 5: Proteins secreted by host *P. pastoris* GS115.

2.4 α -淀粉酶 AMY 的纯化和部分酶学性质

从重组毕赤酵母诱导培养液中分离并纯化 α -淀粉酶,得到电泳级的纯品。对 α -淀粉酶的酶学性质的初步研究表明, *P. pastoris* 表达的 α -淀粉酶基本保持了天然酶蛋白的嗜酸性和耐热性。它的最适作用 pH 为 3.2,在 pH2.5 ~ 4.6 的范围内酶活性保留

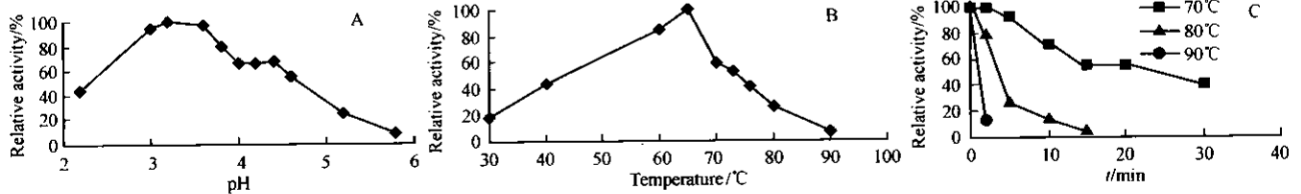


图 4 α -amylase AMY 作用最适 pH(A)、最适温度(B)和热稳定性(C)

Fig. 4 The optimal pH(A), the optimal temperature(B), and the thermostability(C) of α -amylase AMY

50% 以上(图 4A)。它的最适作用温度为 65°C (图 4B),具有较好的热稳定性,在 70°C 下处理 5min,酶活性维持在 90% 以上,延长保温至 30 min,酶活性依然保留 50% 以上(图 4C)。

2.5 α -淀粉酶 AMY 对可溶性淀粉的水解程度

α -淀粉酶 AMY 水解可溶性淀粉,间隔不同时间取样,测定产物中还原糖的含量。在温度为 60°C、底物可溶性淀粉为 0.5g 的情况下,8u 的酶作用 6 h 后,释放的还原糖占干物质总量的 50%,40 h 以后达到 95%,表明淀粉酶 AMY 基本能够彻底水解可溶性淀粉(图 5)。

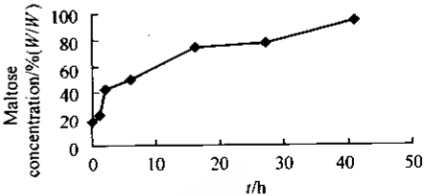


图 5 α -淀粉酶 AMY 水解淀粉释放还原糖占干物质的总量
Fig. 5 The portion of reducing sugar to solids in the hydrolyzed soluble starch

2.6 α -淀粉酶 AMY 的基因片段 *amy'* 在 *E. coli* 中表达

SDS-PAGE 结果(图 6)表明,表达的酶蛋白分子量约为 80kD,与它的蛋白理论分子量相当。大肠杆菌重组子经超声波破碎细胞后,破碎液上清中的淀粉酶活性为 0.11u/mL,而对照的菌体破碎液检测不到淀粉酶活性。这一结果表明,基因 *amy* 经截短后再表达依然具有淀粉酶活性。

2.7 *E. coli* 的外源基因表达产物释放后的稳定性

分别诱导表达克隆到 *E. coli* BL21(DE3)的基因 *amy* 和基因片段 *amy'*,分别在 0°C 和室温(30°C)下保温,测定表达产物残留的活性(图 7)。在 0°C 条件下保温,蛋白 AMY 酶活性的半衰期在 2 h 左右,蛋白 AMY'酶活性的半衰期在 1 h 左右。在 30°C 条件下保温,蛋白 AMY 酶活性的半衰期在 1 h 左右,蛋白 AMY'在 1 h 内丧失 80% 酶活性。

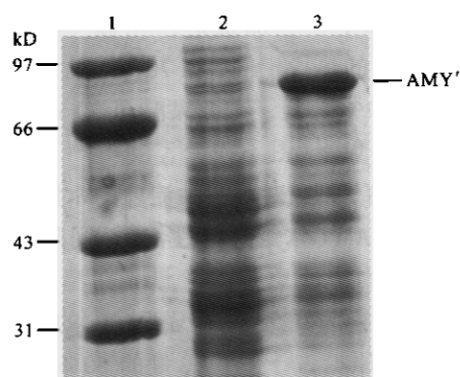


图6 *amy'* 在 *E. coli* 中表达的 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of *amy'* expressed in *E. coli*

1: standard protein molecular weight; 2: *E. coli* with plasmid pET-22b(+); 3: *E. coli* with recombinant plasmid pET-22b(+)-*amy'*.

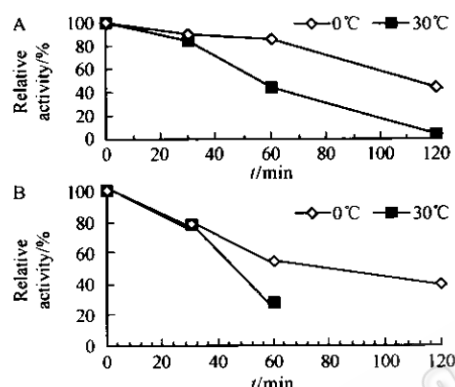


图7 *E. coli* 的外源基因表达产物 AMY(A) 和 AMY'(B) 释放后的稳定性

Fig. 7 Stability of the cloned protein AMY(A) and AMY'(B) after sonication in *E. coli*

3 讨论

P. pastoris 表达系统以其外源基因表达量高、产物易于后加工、发酵技术较成熟等优点倍受研究者的青睐,目前已经利用 *P. pastoris* 表达来源于植物、动物、细菌的 α -淀粉酶^[11,12],但是还未见在毕赤酵母中表达嗜酸性耐热 α -淀粉酶的报道。在本研究中,嗜酸性耐热 α -淀粉酶 AMY 在 *P. pastoris* 中的表达量虽然较原菌株 *A. acidocaldarius* 提高了 3 倍以上,但其表达量还是较低的,对于这种分子量大、性质特殊的极端酶,如何进一步提高其表达量,有待于进一步的研究。

在本研究中,在大肠杆菌中表达的 α -淀粉酶的表现分子量约 140kD,与理论分子量相当,而在 *P. pastoris* 中表达的 α -淀粉酶的表现分子量约为 160kD,大于理论分子量,可能是表达蛋白糖基化修

饰的结果。对该 α -淀粉酶的氨基酸序列分析表明它有 11 个潜在的 N-糖基化位点,一般在 *P. pastoris* 表达的的外源蛋白的糖链含有 8~14 个甘露糖,推测至少有一半的位点可能被糖基化。

本研究表明在大肠杆菌和毕赤酵母中表达的 α -淀粉酶作用的最适温度比较原酶的最适温度都有不同程度的下降。Matzke 等^[8]曾报道 α -淀粉酶 AMY 在 *E. coli* 中表达后其最适温度略有下降,本研究也得到类似的结果(数据未显示),推测原因可能是大肠杆菌表达的 AMY 未糖基化,而 *A. acidocaldarius* 分泌的 AMY 是一糖蛋白。本研究发现,在 *P. pastoris* 中表达的 AMY 虽然可能得到了糖基化修饰,且修饰后的蛋白分子量与 *A. acidocaldarius* 分泌的 AMY 相当,但其最适温度还是由原酶的 75°C 下降到 65°C,其原因可能是不同糖基化修饰方式造成的。*A. acidocaldarius* 分泌的 AMY 糖基化方式是 O-连接糖蛋白,而在 *P. pastoris* 中表达的外源蛋白的糖基化的形式一般是 N-连接糖蛋白,只有少数是 O-连接糖蛋白。推测蛋白的糖基化以及糖基化的方式可能是影响该 α -淀粉酶的最适作用温度的一个重要因素,确切的原因还需进一步研究。

A. acidocaldarius 同时分泌一种分子量 90kD 的 α -淀粉酶,测定了 N 端和 8 个内肽的氨基酸序列,其中 N 端氨基酸是“D-I-N-D-Y”,全部位于 AMY 肽链氨基酸序列内部,这表明它可能是 AMY 被切去部分氨基酸后形成的^[7]。 α -淀粉酶 AMY 的氨基酸序列相似性分析结果表明,保守的区域出现在肽链的中部,形成 α -淀粉酶特有的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶型结构域 A 以及结构域 B 和结构域 C^[13]可能并不涉及 N 端和 C 端的氨基酸,这些事实表明 α -淀粉酶 AMY 的部分序列可能对它的催化活性不是必需的。我们的实验表明,AMY 去掉 N 端 391aa 和 C 端 205aa 后在酸性条件下依然维持淀粉酶活性。AMY' 详细的酶学性质在进一步的研究之中。

淀粉酶嗜酸性的机理目前还缺乏研究。以往的研究发现,耐酸性淀粉酶中带负电和带正电的氨基酸残基较其它淀粉酶少 30%^[8],对此嗜酸性 α -淀粉酶 AMY 的氨基酸序列统计的结果表明,它带正电和带负电的氨基酸分别占氨基酸总数的 10% 和 5%,且蛋白质表面电荷密度相对较低,另外 AMY' 的氨基酸序列统计结果与这个结论也一致,这可能与它的嗜酸性有关,这一现象进一步的分子机理还需进行大量的研究工作。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Antje C. Springer Handbook of Enzymes, 2nd ed, New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003, pp. 1 - 39
- [2] Buonocore V, Caporale C, De Rosa M *et al.* Stable, inducible thermoacidophilic α -amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J of Bacteriol*, 1976, **128**(2): 515 - 521
- [3] Ingle MB, Erickson RJ. Bacterial α -amylases, *Adv Appl Microbiol*, 1978, **24**: 257 - 278
- [4] Kanno M. A *Bacillus acidocaldarius* α -amylase that is highly stable to heat under acidic conditions. *Agric Biol Chem*, 1986, **50**: 23 - 31
- [5] Uchino F. A thermophilic and unusually acidophilic amylase produced by a thermophilic acidophilic *Bacillus* sp. *Agric Biol Chem*, 1982, **46**(1): 7 - 13
- [6] Schwermann B, Pfau K, Liliensiek B *et al.* Purification, properties and structural aspects of a thermoacidophilic α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009. Insight into acidostability of proteins. *Eur J Biochem*, 1994, **226**(3): 981 - 991
- [7] Koivula TT, Hemila H, Pakkanen R *et al.* Cloning and sequencing of a gene encoding acidophilic amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J of Gen Microbiol*, 1993, **139**(Pt10): 2399 - 2407
- [8] Matzke J, Schwermann B, Bakker EP. Acidostable and acidophilic proteins: the example of the α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 1997, **118**(3): 475 - 479
- [9] Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem*, 1944, **153**(2): 375 - 380
- [10] Robert X, Gottschalk TE, Haser R *et al.* Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α -amylase isozyme 1 from barley seeds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002, **58**(Pt4): 683 - 686
- [11] Kato S, Ishibashi M, Tatsuda D *et al.* Efficient expression, purification and characterization of mouse salivary α -amylase secreted from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 2001, **18**(7): 643 - 655
- [12] Paifer E, Margolles E, Cremata J *et al.* Efficient expression and secretion of recombinant α -amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*, 1994, **10**(11): 1415 - 1419
- [13] Janecek S. α -amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol*, 1997, **67**(1): 67 - 97