

研究报告

巨大芽孢杆菌 β -淀粉酶基因的克隆、表达和酶学性质分析

吴襟, 张树政

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 从巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的全基因组 DNA 文库中筛选出一个 β -淀粉酶基因 *amyG*, 分析测定了其核苷酸序列并进行了诱导表达; 其中 *amyG* 编码的蛋白有 545 个氨基酸、分子量为 60.194 kD, 与已报道的巨大芽孢杆菌 DSM319 的 β -淀粉酶序列有着 94.5% 的同源性。经氨基酸序列比较分析发现, AmyG 从 N 末端到 C 末端依次由信号肽域、糖基水解酶催化功能域和淀粉结合域 3 个功能域组成。其中催化功能域里含有第 14 家族糖基水解酶常见的几个高度保守的酶催化活性区。经多步纯化, 重组酶的比活共提高了 7.4 倍, 获得凝胶电泳均一的蛋白样品; 经 SDS-PAGE 电泳测定, 酶 AmyG 的分子量为 57 kD。该酶的最适反应温度为 60°C, 最适反应 pH 为 7.0; 在温度不超过 60°C 时, 酶活较稳定; AmyG 能迅速降解淀粉生成麦芽糖, 属于外切 β -糖苷酶。

关键词: 巨大芽孢杆菌, β -淀粉酶, 基因克隆和表达, 酶学性质

Cloning, Expression and the Characterization of β -amylase from a *Bacillus megaterium* WS06

Jin Wu, and Shuzheng Zhang

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: A β -amylase gene (*amyG*) was cloned from a *Bacillus megaterium* WS06 and expressed in the *Escherichia coli*. Nucleotide sequence analysis showed the *amyG* gene is composed of 1638 bp (545 amino acid residues with a Mr of 60.194 kD). The AmyG shows 94.5% sequence homologies with β -amylase from *Bacillus megaterium* DSM319 and presents a normal β -amylase primary structure, constituted by three parts: the N-terminal signal sequence, the catalytic domain and the C-terminal starch binding domains. The deduced amino acid sequence revealed that several highly conserved regions of the glycosylhydrolase family 14. The *amyG* gene was overexpressed using the pET21a vector and *Escherichia coli* BL21(DE3). The recombinant enzyme was purified 7.4 fold to electrophoretic homogeneity and had a Mr of 57 kD (by SDS-PAGE). The enzyme was optimally active at pH 7.0 and 60°C and showed stability at the temperature below 60°C. This enzyme efficiently hydrolyzed starch to yield maltose from non-reducing chain ends by exo-cleavage mode.

Keywords: *Bacillus megaterium*, β -amylase, cloning and expression, characterization

β -淀粉酶(β -amylase, EC 3.2.1.2)能够从淀粉的非还原末端水解相隔的 α -1,4-葡萄糖苷键, 产生 β 旋

光性的麦芽糖, 最早发现于高等植物中, 在大麦、小麦、甘薯和大豆中含量较丰富^[1]。 β -淀粉酶在食品及

Received: April 12, 2008; Accepted: July 21, 2008

Supported by: the Knowledge Innovation Programs of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-SW-323).

Corresponding author: Jin Wu. Tel: +86-10-64807377; E-mail: wujinw5@yahoo.com.cn

中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-SW-323)资助。

饮料工业中有很大的应用价值, 长期以来植物来源的大麦 β -淀粉酶一直被广泛用于多个领域。例如, 在啤酒发酵业中部分代替大麦芽用于啤酒的生产, 在食品业中用于水解淀粉制造麦芽糖浆和饴糖等。自 1974 年 Higashihara 等人^[2]首次确定巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)胞外淀粉酶含有 β -淀粉酶以来, 相继发现了几种能够产生该酶的微生物, 这些菌株大都属于细菌, 如蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[3,4]、多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)^[1]、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)^[5]、高温放线菌(*Thermoactinomyces* sp.)^[6]和热硫梭菌(*Clostridium thermosulfurogenes*)^[7]等。与植物 β -淀粉酶相比, 微生物来源的 β -淀粉酶具有便于大规模工业化生产的优点, 因此筛选寻找理想的微生物 β -淀粉酶源成为淀粉酶应用研究领域中的一个重要目标。

本实验室过去从仔猪结肠内容物中分离出一株能利用生淀粉的革兰氏阳性芽孢杆菌 WS06, 并构建了其全基因组 DNA 文库^[8]。该菌的 16S rDNA 和巨大芽孢杆菌菌株 KL-197 以及菌株 MSFC 2-M6-R-1 的碱基序列都有 99% 的同源性, 进一步鉴定后确认为巨大芽孢杆菌。本研究报道了该菌编码的 β -淀粉酶的基因序列, 并和其他 β -淀粉酶基因序列进行了同源性比较分析; 通过蛋白结构和酶学性质的研究, 深入探讨了该 β -淀粉酶对淀粉底物的结合和水解机制。这为更好地了解肠道中淀粉大颗粒的微生物发酵过程提供了一些理论帮助, 同时也为今后 β -淀粉酶的蛋白质工程改造提供了良好基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

受体菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、BL21 (DE3)和质粒 pUC18 购自 Promega 公司; 质粒 pET-21a 购自 Novagen 公司。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶和核酸分子量标准购自上海申能博采公司; T4 DNA 连接酶和 *Taq* DNA 聚合酶分别购自北京经科公司和鼎国公司; 蛋白质分子量标准、牛血清白蛋白和麦芽寡糖购自美国 Sigma 公司; 其它化学试剂均为国产分析纯级。提纯试剂盒 Wizard PCR Preps DNA Purification System 购于

Promega 公司; LB 培养基和缓冲液, 按文献[8]和[9]配制。筛选培养基另添加有 0.5% 的淀粉。

1.3 方法

1.3.1 DNA 文库的构建、筛选和测序

B. megaterium WS06 基因组 DNA 文库的构建如文献[8]所述。将转化子接种到淀粉筛选培养基平板上, 碘熏法判定产淀粉酶活性, 分离在周围形成紫红色半透明晕环的菌落作为产 β -淀粉酶的阳性克隆。从克隆菌株中提取质粒, 进行电泳酶切分析比较。将阳性克隆送上海申能博彩公司进行测序。

1.3.2 序列分析和同源性比较

采用网上程序 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)和软件 DNASIS 2.5 分析完成; 信号肽序列用软件 Signal-P 3.0 分析预测^[10]。

1.3.3 蛋白质结构功能域的分析

结构功能域的分析是采用网上程序简单模块构架搜索工具 SMART(www.smart.emblheidelberg.de/)进行的。

1.3.4 基因的克隆

根据已获得的 β -淀粉酶阳性克隆的基因测序结果, 设计合成如下引物: 上游, 5'-GCGCATATGAAA CAGCTATGTAAA-3'; 下游, 5'-GCGCGGATCCAC CAATTATCTATATAAG-3'。上游引物 5'端含 *Nde* I 酶切位点, 下游引物 5'端含 *Hind* III 酶切位点。以 *B. megaterium* WS06 的染色体 DNA 为模板, 用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 反应条件为, 94°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环。电泳检测 PCR 扩增产物约 1.6 kb。将产物片段纯化、酶切、回收, 连接到表达载体 pET-21a 上, 转入大肠杆菌 BL21(DE3)的感受态细胞中, 经筛选后获得含有插入片段质粒的菌株 BL21(pETBG)。

1.3.5 酶活力的测定

取 0.9 mL 浓度为 0.55%(W/V), 用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)配制的淀粉溶液, 40°C 预热 5 min, 加入 0.1 mL 酶液后 40°C 保温反应 10 min, 用 DNS 法测定产生的还原糖量。一个酶活力单位定义为在上述反应条件下每分钟水解淀粉产生等价于 1 μ mol 麦芽糖的还原糖所需的酶量。

1.3.6 蛋白质测定和电泳分析

按 Bradford 方法^[11]和测定 A_{280} , 以牛血清白蛋

白绘制标准曲线。分子量的测定参照 Laemmli 的 SDS—PAGE 电泳方法^[12]。

1.3.7 酶水解淀粉产物的硅胶板薄层色谱分析法

按文献[13]的方法,展开剂为:正丁醇:乙酸:水=2:1:1,上行展开2次。

1.3.8 酶水解淀粉产物的高压液相色谱分析法

色谱柱, Suger-park-I 糖分析柱;检测器, 示差检测器;流动相, H₂O;流速: 0.7 mL/min, 柱温: 90°C。

1.3.9 酶水解淀粉产物的旋光度测定

将酶加入到 0.55%的可溶性淀粉溶液在中 40°C 一起保温反应,用 PERKIN-ELEMER 241 旋光仪在 589 nm 处测定反应液旋光度的变化;待 20 min 后旋光度变化较缓和时,快速加入 50%碳酸钠溶液终止反应,立刻观察记录反应液旋光度的变化。

2 结果

2.1 基因序列的测定及分析

对获得的测序结果经拼接后进行分析,发现其中质粒 pUC35 序列片段中存有一个完整的开放阅读框架(Open reading frame, ORF)。用 DNASIS 和 Signal-P 软件分析可知,该基因编码区全长 1638 bp,编码 545 个氨基酸,预计编码蛋白的分子量为 60.194 kD: 其中氨基酸序列 1~31 位为信号肽序列,32~545 位为结构编码区,成熟酶蛋白的分子量为 56.9 kD,等电点为 5.36;该基因 *amyG* 的 GenBank 登录号为 EF577268。在 ORF 中推测的起始密码子 ATG 上游相隔 6 bp 处有一个潜在的核糖体结合位点(Ribosome binding site, RBS)序列 GGAGG;相隔 44~68 bp 处有一个可能的启动子序列,即-35 区的 TTTATA 和-10 区的 TAAAAT,两者相隔 18 bp。在终止密码子 TAA 下游有 32 bp 长的发卡结构,是一个典型的不依赖于 ρ 因子的转录终止子^[14]。

2.2 AmyG 同源性比较和蛋白质结构功能域分析

通过 BLAST 程序对 AmyG 全序列进行分析比较,发现和已报道的 *B. megaterium* DSM319^[15] 和 *B. cereus*^[16]的 β -淀粉酶分别有着 94.5% 和 64.1%的序列同源性;对酶结构编码区进行蛋白质结构功能域的分析后发现, AmyG 氨基酸序列 44~442 位被预测为糖基水解酶(Glycosylhydrolase, GH) 的催化功能域,其中存在着第 14 家族 GH 中几个特有的高度保守序列区^[17], 如 Region I(₇₇TVDFWWG)、Region II(₁₁₅ISTHQCGGNVGDCCNVPLPSWV)、Region III(₁₉₈GPAGEIRYPSY)、Region IV(₃₅₉FTCLEM)、Region V(₃₉₆GENAL)、Region VI(₄₂₂GFTLLRFYD)等,这些序列对 β -淀粉酶的催化活性有着重要影响,如其中 Glu²⁰² 和 Glu³⁹⁷ 就可能是酶广义酸碱催化的关键功能基团^[18];此外 AmyG C 末端的氨基酸序列 449~544 位被推测为第 20 家族碳水化合物结合组件(Carbohydrate-binding module, CBM),即淀粉结合域(Starch-binding domain, SBD)^[19],这也与许多微生物 β -淀粉酶的 C 末端特征相符;这些结果都表明 *amyG* 可能是一个分泌型微生物 β -淀粉酶编码基因。

对 AmyG 和其它 β -淀粉酶氨基酸序列一起进行分类聚类计算,获得这些 β -淀粉酶之间的蛋白系统进化树,如图 2 所示。结果表明微生物与植物来源的 β -淀粉酶之间有着明显的差别;而在微生物来源的 β -淀粉酶中, AmyG 与 *B. polymyxa*、*B. circulans* 等芽孢菌产生的 β -淀粉酶也有着不小的区别。

2.3 表达质粒 pETBG 的检测

将含有 *amyG* 基因的表达菌株 BL21(pETBG)进行 37°C 的摇床简单培养和 IPTG 快速诱导后,离心收集菌体,超声破碎处理后测定酶活,其破碎上清液中含有非常明显的 β -淀粉酶酶活,说明 *amyG* 基因获得了很好的表达。

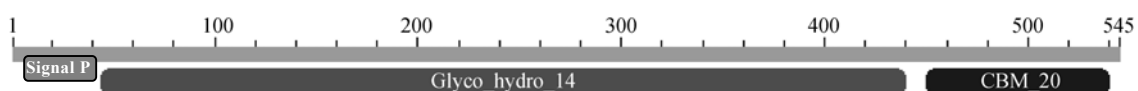


图 1 AmyG 蛋白质结构功能域的分析
Fig. 1 Architecture analysis of domains of AmyG

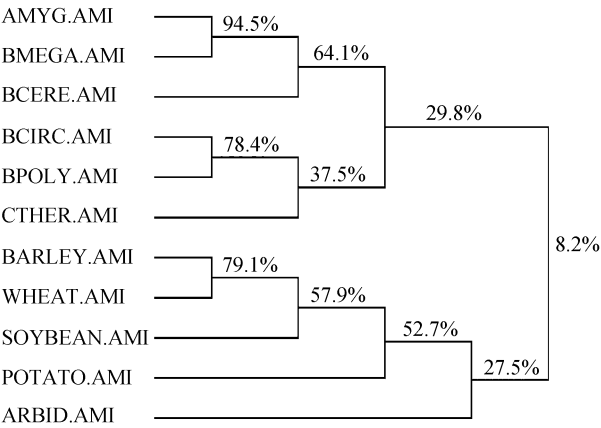


图 2 不同来源β-淀粉酶的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic trees of various β-amylase

Enzymatic sources: WHEAT, Wheat^[20]; ARBID, *Arabidopsis*^[21]; BARLEY, Barley^[22]; SOYBEAN, Soybean^[23]; POTATO, Sweet potato^[24]; AMYG, *Bacillus megaterium* WS06; BMEGA, *Bacillus megaterium* DSM319^[15]; BCERE, *Bacillus cereus*^[16]; BPOLY, *Bacillus polymyxa*^[25]; BCIRC, *Bacillus circulans*^[5]; CHER, *Clostridium thermosulfurogenes*^[7]

2.4 重组菌株的培养和诱导

将 *E. coli* BL21(pETBG)在 30°C 培养过夜, 按 5% 的接种量转接于 50 mL LB 培养基中, 37°C, 220 r/min 摇床振荡培养, 当菌体密度 OD_{600} 为 0.7 左右时, 加入 10 μL IPTG 溶液(20%)进行诱导并继续培养 6 h, 离心收集菌体沉淀, 悬于 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)中, 并通过超声处理破碎细胞。破碎液 12 000 r/min 离心 20 min 去掉沉淀, 收集上清液, 以此为原始酶液进行纯化。

2.5 酶的分离纯化

全部操作均在 4°C 进行。向粗酶液中边搅边缓慢加入硫酸铵至 30%饱和度, 静置 4 h 后, 10 000 r/min 离心 20 min 去沉淀; 上清液中继续加入硫酸铵至 80%饱和度, 静置 8 h 后, 10 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀。用少量 0.05 mol/L, Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)溶解沉淀后上 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子层析

柱(1.5 cm×8 cm), 收集穿透峰, 将所得酶液用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)透析过夜后进行浓缩; 将浓缩酶液再上 CM-Sepharose A-50 离子层析柱(1.5 cm×10 cm), 洗脱梯度: 0~1 mol/L NaCl, 洗脱速度 1.0 mL/min, 收集合并酶活峰后, 将所得酶液进行浓缩后上 Sephadex G-100 层析柱(2.6 cm×100 cm), 洗脱速度 0.5 mL/min, 收集合并酶活峰后进行浓缩, 并作 SDS-PAGE 电泳(8%分离胶)分析, 表明酶样品为一条带, 电泳结果见图 3。经过以上各步提纯, 最终β-淀粉酶 AmyG 的比活共提高了约 7.4 倍, 酶活回收率为 21.9%, 提纯结果列于表 1。

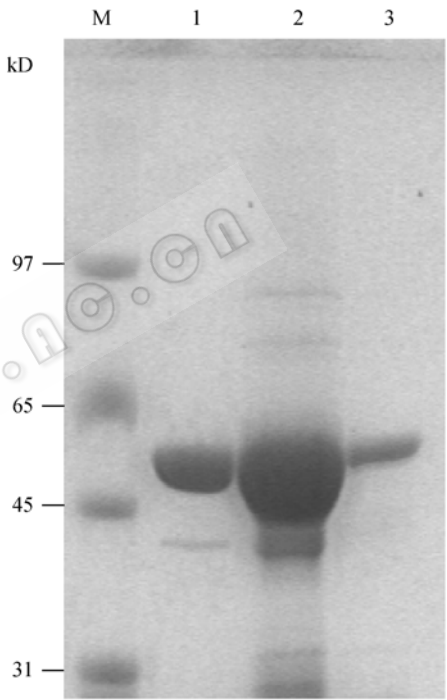


图 3 AmyG 表达和纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified AmyG from *E. coli* BL21 (pETBG)

M: molecular mass markers; 1: CM-Sephadex G-50 pool; 2: DEAE-Sepharose pool; 3: gel filtered enzyme

表 1 巨大芽孢杆菌 WS06 β-淀粉酶的分离纯化
Table 1 Purification of β-amylase of *Bacillus megaterium* WS06

Purification step	Total activity (u)	Total protein (mg)	Special activity (u/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Crude enzyme	19633	517.1	38.0	/	/
30%~80%(NH ₄) ₂ SO ₄	9956	173.8	57.3	1.51	50.7
DEAE-Sepharose FF	8501	53.3	159.5	4.20	43.3
CM-Sephadex A-50	4928	19.8	248.9	6.55	25.1
Sephadex G-100	4300	15.3	281.1	7.40	21.9

2.6 酶的基本性质

2.6.1 分子量的测定

用 8% 分离胶的 SDS-PAGE 测出 AmyG 的分子量为 57 kD(图 3)。

2.6.2 pH 和温度对酶活力和稳定性的影响

pH 7.0 时, 在不同温度条件下测定 AmyG 的活力, 获得温度-活力曲线; 将酶液在不同温度中分别保温 60 min 后, 测定各自残余酶活力, 以未保温的酶液活力为 100%, 获得温度-稳定性曲线; 表明结果, 酶最适反应温度为 60°C, 酶活力在不超过 60°C 时较为稳定。55°C 时, 在不同 pH 条件下测定 AmyG 的酶活力, 获得 pH-活力曲线; 将酶液在不同 pH 条件下分别保温 60 min, 各自测定残余酶活力, 以未处理的原酶液活力为 100%, 获得 pH-稳定性曲线; 结果显

示, AmyG 的最适反应 pH 为 7.0, 酶在 pH 3.0~10.0 之间一个较宽的范围内基本保持稳定。

2.7 β -淀粉酶水解产物的分析

向 4.5 mL 浓度 1.0%(W/V)的可溶性淀粉底物中加入 0.5 mL AmyG 酶液, 混匀后 40°C 保温反应不同的时间(6~72 h), 分别取样用硅胶板薄层色谱的方法分析, 结果如图 5 所示。可以看出在淀粉的水解初期, 产物主要为麦芽糖, 随着反应的进行, 麦芽糖浓度逐渐增加, 并有少量麦芽三糖、四糖的积累生成, 这表明酶对淀粉的水解是一个末端外切过程, 但难以水解麦芽三糖和四糖; 通过高压液相色谱的方法对酶水解淀粉 72 h 的终产物进行分析, 其中含有 90.5%的麦芽糖, 5.7%的麦芽三糖和 3.8%的麦芽四糖, 没有葡萄糖的生成。

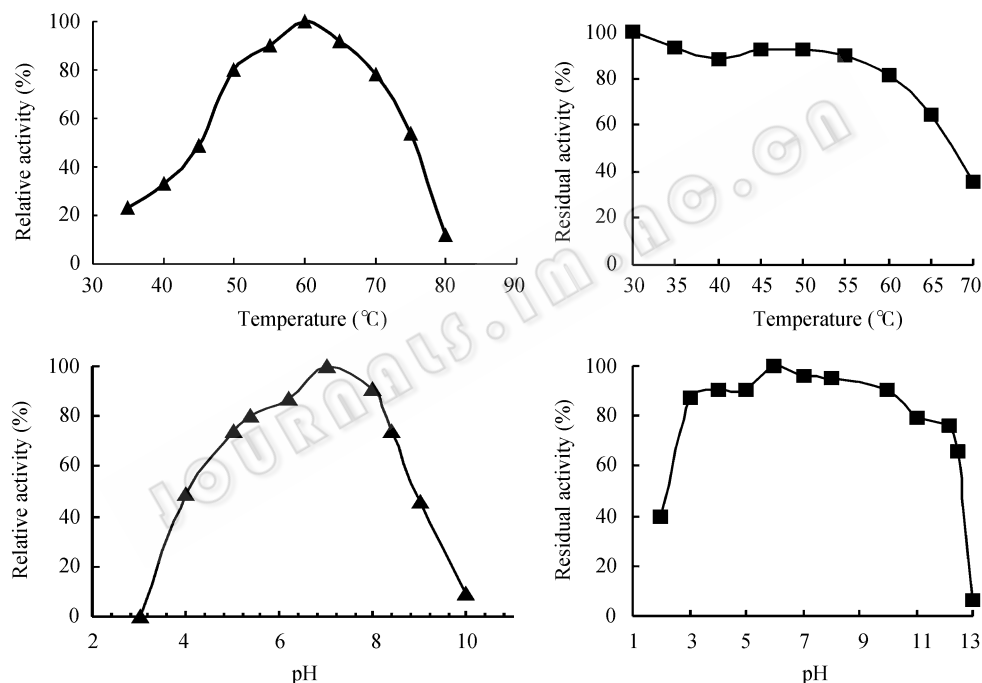


图 4 温度和 pH 对酶活力和稳定性的影响

Fig. 4 Effects of temperature and pH on activities and stabilities of AmyG

▲—▲: Enzyme activity, ■—■: Enzyme stability

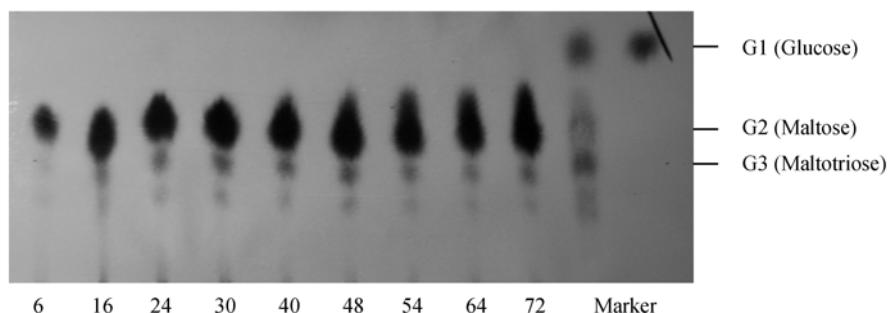


图 5 β -淀粉酶水解产物的硅胶板薄层色谱分析

Fig. 5 Thin Layer chromatogram of the hydrolyzed starch products

酶水解淀粉产物的旋光度测定结果显示随着水解的进行, 反应混合液旋光度从 0.88 逐渐下降到 0.78, 但在加入碳酸钠终止反应后, 旋光度突然上升至 0.85, 这表明酶的水解产物为 β -型的麦芽糖。

3 讨论

根据酶催化功能结构域的氨基酸序列同源性和结构相似性划分, 众多的糖基水解酶目前被分为 107 个家族, 其中 β -淀粉酶被归入为 14 家族糖基水解酶^[17]。根据来源的差异, β -淀粉酶又可分植物和微生物来源两大类。通过它们的结构和性质比较研究表明(见表 3): 大部分 β -淀粉酶均为分子量在 60 kD 左右的单体, 热稳定性都不太高, 最适催化 pH 范围一般在 5~7.5 之间; 酶催化功能结构域大小基本都为 400 个氨基酸左右, 其中含有许多 β -淀粉酶特有的高度保守序列区, 在进化上表现为较高的保守性。到目前为止, 已有大豆、大麦、甜薯和蜡状芽孢杆菌来源的 β -淀粉酶三维晶体结构得到了测定; 经比较后发现, 所有这些 β -淀粉酶的催化功能结构域都形成一个高度保守的 $(\beta/\alpha)_8$ 圆桶结构, 圆桶的隙口就是酶的催化活性中心^[18]。

虽然所有来源的 β -淀粉酶在许多催化性质上都表现出一定的相似性, 但与大部分植物 β -淀粉酶相比, 细菌 β -淀粉酶还是在最适 pH、等电点、比活和二硫键的数量上许多方面表现出明显的不同^[26]。而两者区别最大的是, 大部分细菌 β -淀粉酶形成的高级结构除一个催化功能结构域以外, 往往在 C 末端还含有一个或多个淀粉结合域(SBD); 通过 SBD, β -淀粉酶能紧密结合在淀粉固体颗粒表面, 使其催化

功能域更接近底物分子进行连续作用, 这十分有利于细菌对生淀粉大颗粒, 特别是对其中能够抵挡小肠淀粉酶消化的抗性淀粉颗粒的有效降解。植物 β -淀粉酶一般不具备这个特点。

淀粉在肠道中的消化是一个复杂的过程, 特别是一些生淀粉大颗粒分子的彻底降解往往需要肠道微生物的紧密参与和帮助。巨大芽孢杆菌 WS06 来源于猪结肠道内容物中, 发酵培养时能有效利用生淀粉进行生长。我们曾报道过该菌 α -淀粉酶 AmyF 的基因克隆表达和性质研究^[8]: AmyF 是一个液化型的淀粉水解内切酶, 酶的性质基本与 AmyG 相似; 它也能水解生淀粉生成一系列小片段的麦芽糊精和寡糖, 但不生成麦芽糖和葡萄糖; 而当 AmyF 和 AmyG 相互配合时, 能明显加快对生淀粉大颗粒的水解作用, 迅速生成了大量能被转运利用的麦芽糖分子。这预示着这两个淀粉酶可能在猪肠道内抗性淀粉的消化代谢中起着很重要的作用。

与其他已报道的芽孢菌 β -淀粉酶, 特别是和相似同源性很高的 *B. megaterium* DSM319 的 β -淀粉酶相比, AmyG 在 60°C 高温时有着更稳定高效的酶活, 其最佳催化 pH 为中性, pH 的稳定范围也比较广, 表明该酶有可能成为植物 β -淀粉酶制剂的一个良好替代品, 未来会在食品工业中得到推广应用。因为高温不仅可以增加淀粉的溶解性, 降低了反应液粘度, 而且能够显著减少杂菌的污染, 这对于淀粉糖产业的工艺控制和成本降低是十分有利的。当然我们也希望以后通过进一步的蛋白质工程技术, 把 AmyG 改造成性能更优异的 β -淀粉酶材料。

表 3 几种 β -淀粉酶的性质比较

Table 3 Comparison of enzymatic properties of β -amylases from various sources

Sources	M _w (kD)	Signal region	GH region	CBM region	Optimum temperature (°C)	Stable temperature (°C)	Optimum pH	Stable pH
AMYG	56.9	1-31	44-442	449-544	60	60	7.0	3.0~10.0
BMEGA	56.9	1-20	44-441	453-540	—	55	6.5	5.0~7.5
BCERE	57.9	1-30	44-441	453-545	40	50	7.0	6.0~9.0
BPOLY	69.9	1-35	44-441	464-548 574-658	45	50	7.5	4.0~9.0
CTHER	57.2	1-32	41-441	453-547	75	70	5.5	—
SOYBEAN	56.1	/	11-419	/	60-65	55	5.3	3.5~10.0
BARLEY	59.5	/	13-435	/	50-55	50	5.0~6.0	4.8~8.0

Enzymatic sources abbreviation: AMYG, *Bacillus megaterium* WS06; BMEGA, *Bacillus megaterium* DSM319^[15]; BCERE, *Bacillus cereus*^[16]; BPOLY, *Bacillus polymyxa*^[25]; CTHER, *Clostridium thermosulfurogenes*^[19]; SOYBEAN, Soybean^[23]; BARLEY, Barley^[22]

REFERENCES

- [1] Murao S, Ohyama K, Arai M. β -Amylases from *Bacillus polymyxa* no. 72. *Agric Biol Chem*, 1979, **43**: 719–726.
- [2] Higashihara M, Okada K. Studies on β -amylase of *Bacillus megaterium* strain no. 32. *Agric Biol Chem*, 1974, **38**: 1023–1027.
- [3] Nanmori T, Shinke R, Aoki K, *et al.* Purification and characterization of β -amylase from *Bacillus cereus* BQ 10-S1. *Agric Biol Chem*, 1983, **47**: 941–947.
- [4] Yamaguchi T, Matsumoto Y, Shirakawa M, *et al.* Cloning, sequencing, and expression of a β -amylase gene from *Bacillus cereus* var. *mycoides* and characterization of its products. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, **60**(8): 1255–1259.
- [5] Siggins KW. Molecular cloning and characterization of the β -amylase gene from *Bacillus circulans*. *Mol Microbiol*, 1987, **1**(1): 86–91.
- [6] Zhou BY, Wang Z, Kong DY, *et al.* Selection of high β -amylase producing strain and its fermentation condition. *Chin J Biotech*, 1994, **10**(3): 258–262.
周蓓芸, 王峥, 孔德育, 等. 热稳定酶高产菌株选育及发酵条件研究. *生物工程学报*, 1994, **10**(3): 258–262.
- [7] Kitamoto N, Yamagata H, Kato T, *et al.* Cloning and sequencing of the gene encoding thermostable β -amylase of *Clostridium thermosulfurogenes*. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 5848–5854.
- [8] Peng P, Wu J, Chen AC, *et al.* Cloning and expression of the α -amylase gene from a *Bacillus* sp. WS06, and characterization of the enzyme. *Chin Acta Microbiol Sin*, 2005, **45**(6): 876–880.
彭平, 吴襟, 程安春, 等. 芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的克隆、表达和酶学性质分析. *微生物学报*, 2005, **45**(6): 876–880.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd eds, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004, **340**(4): 783–795.
- [11] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [12] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**(5259): 680–685.
- [13] Hansen SA. The thin-layer chromatographic method for the identification of mono-, di-, and trisaccharides. *J Chromatogr*, 1975, **107**: 224–226.
- [14] Rosenberg M, Court D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu Rev Genet*, 1979, **13**: 319–353.
- [15] Lee JS, Wittchen KD, Stahl C, *et al.* Cloning, expression, and carbon catabolite repression of the *bamM* gene encoding β -amylase of *Bacillus megaterium* DSM319. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**(1-2): 205–211.
- [16] Nanmori T, Nagai M, Shimizu Y, *et al.* Cloning of the β -amylase gene from *Bacillus cereus* and characteristics of the primary structure of the enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(2): 623–627.
- [17] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on the amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1991, **280**(Pt2): 309–316.
- [18] Hirata A, Adachi M, Sekine A, *et al.* Structural and enzymatic analysis of soybean β -amylase mutants with increased pH optimum. *J Biol Chem*, 2004, **279**(8): 7287–7295.
- [19] Bourne Y, Henrissat B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, **11**(5): 593–600.
- [20] Wagner GB, Haeger KP, Ziegler P. Nucleotide sequence of a cDNA from wheat leaves encoding ubiquitous beta-amylase. *Plant Physiol*, 1996, **112**: 1735.
- [21] Lao NT, Schoneveld O, Mould RM, *et al.* An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase. *Plant J*, 1999, **20**(5): 519–527.
- [22] Erkkila MJ, Ahokas H. Special barley β -amylase allele in a Finnish landrace line HA52 with high grain enzyme activity. *Hereditas*, 2001, **134** (1): 91–95.
- [23] Totsuka A, Fukazawa C. Expression and mutation of soybean β -amylase in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1993, **214**(3): 787–794.
- [24] Yoshida N, Hayashi K, Nakamura K. A nuclear gene encoding β -amylase of sweet potato. *Gene*, 1992, **120**(2): 255–259.
- [25] Kawazu T, Nakanishi Y, Uozumi N, *et al.* Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for enzymatically active fragments of the *Bacillus polymyxa* β -amylase. *J Bacteriol*, 1987, **169**(4): 1564–1570.
- [26] Nomura K, Yoneda I, Nanmori T, *et al.* The role of SH and S-S groups in *Bacillus cereus* β -amylase. *J Biochem* (Tokyo), 1995, **118**(6): 1124–1130.