

芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的克隆、表达和酶学性质分析

彭 平^{1,2} 吴 襟^{1*} 程安春² 高启禹^{1,3} 张树政¹

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 四川农业大学 雅安 6250143) (³ 甘肃农业大学 兰州 730070)

摘 要 在仔猪结肠内容物中分离出一株能利用淀粉的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. WS06, 构建了全基因组 DNA 文库, 从中筛选出 α -淀粉酶基因 *amyF*, 分析测定了其核苷酸序列并进行了表达, 其中 *amyF* 编码的蛋白有 526 个氨基酸、分子量为 58.6kD, 它与已报道的 *Bacillus megaterium* 的 α -淀粉酶序列有 93% 的同源性。经过氨基酸序列比较分析还发现, AmyF 含有淀粉酶家族中 4 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 22.2 倍, 获得凝胶电泳均一的蛋白样品, 经 SDS-PAGE 检测, AmyF 酶分子量为 57kD。该酶的最适反应温度为 55℃ ~ 60℃, 酶的最适反应 pH 为 7.0, 在温度不超过 55℃ 时, 酶活较稳定; AmyF 能迅速降解淀粉生成麦芽寡糖, 属于内切糖苷酶。

关键词 芽孢杆菌 α -淀粉酶 基因克隆和表达 酶学性质

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)06-0876-05

淀粉是高等植物体内碳水化合物主要储藏形式, 广泛存在于谷物、豆类的种子和果实中^[1]。淀粉酶也就是降解淀粉的一类酶, 在生物体的糖类代谢过程中起着非常重要的作用。根据蛋白质氨基酸序列的同源相似性, 大部分淀粉酶都归属于糖苷水解酶 13 家族, 即 α -淀粉酶家族^[2]。目前发现的常见淀粉酶类根据其作用方式可概括为以下几类: 内切淀粉酶, 如 α -淀粉酶、 α -麦芽糖淀粉酶等; 外切淀粉酶: 如 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶等; 脱支淀粉酶: 如异淀粉酶、普鲁兰酶、新普鲁兰酶等; 转移酶: 如环状糊精葡萄糖转移酶、寡糖基转移酶等。事实上, 由于酶来源的广泛性和多样性, 其产物的“糖谱”类型也极丰富多样。内切淀粉酶中最常见的是 α -淀粉酶(α -Amylase), 即 α -1, 4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶(α -1, 4-glucan-4-glucanohydrolase, EC. 3.2.1.1), 能水解淀粉分子内部 α -1, 4-葡萄糖苷键, 水解产物常有糊精、麦芽寡糖、麦芽糖和葡萄糖等^[3]。 α -淀粉酶是目前世界上最早生产、产量最大的工业酶制剂品种之一, 在食品、纺织、医药和饲料等工业中都有非常重要的应用。

本文利用微生物厌氧培养技术, 在仔猪结肠内容物中分离出一株能利用淀粉的细菌, 初步鉴定为芽孢杆菌 *Bacillus* sp. WS06。本文报道了该菌编码的 α -淀粉酶的基因序列, 并和其它微生物来源的 α -

淀粉酶的基因序列进行同源性比较分析, 通过酶学性质研究, 深入探讨了该 α -淀粉酶对淀粉的水解机制, 为更好地了解淀粉在动物肠道中的降解过程提供了一些理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 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。

1.1.2 试剂 限制性内切酶和核酸分子量标准购自上海申博采公司; T4 DNA 连接酶购自北京经科公司; Taq DNA 聚合酶购自鼎国公司; 蛋白质分子量标准、淀粉天青、牛血清白蛋白和麦芽寡糖购自 Sigma 公司; 其它化学试剂均为国产分析纯。提纯试剂盒 Wizard PCR Preps DNA Purification System 购于 Promega 公司, 含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基用于细菌的培养, 按文献^[4] 配制。筛选培养基另添加有 0.4% 的显色剂淀粉天青。不同 pH 值的缓冲液体系如下: pH2.0 ~ 2.2 的 KCl-HCl 缓冲液; pH3.0 的 Gly-HCl 缓冲液; pH4.0 ~ 5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液; pH6.0 ~ 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液; pH9.0 ~ 10.0 的 Gly-NaOH 缓冲液; pH11.0 的 Na₂HPO₄-NaOH 缓冲液; pH12.0 ~ 13.0 的 KCl-NaOH 缓冲液。

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-323)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62652018; E-mail: wujinw5@yahoo.com.cn

作者简介: 彭 平(1980-), 女, 四川内江人, 预防兽医专业硕士。E-mail: pengping02@163.com

收稿日期: 2005-03-14, 修回日期: 2005-07-29

1.2 DNA 的提取和纯化

基因组 DNA 提取、纯化 ,以及质粒的提取参见文献 [4]。

1.3 DNA 文库的构建和筛选

参照文献 [5] 的方法 ,将 *Bacillus* sp. WS06 的基因组 DNA 用 *Sau*3A I 部分酶切后 ,回收得到 3~8kb 的 DNA 消化片段 ;用 *Bam*H I 酶切并脱磷的 pUC18 质粒连接 ,转化 *E. coli* DH5 α ,在含 Amp 的 LB 琼脂平板上进行克隆质粒的初步挑选和分离 ,获得 *Bacillus* sp. WS06 的基因组 DNA 的随机基因文库。将获得的阳性转化子接种在筛选培养基琼脂平板上 ,分离在周围形成透明晕环的菌落作为产淀粉酶的阳性克隆。从该克隆菌株中提取质粒 ,进行酶切分析。

1.4 基因测序及蛋白序列分析和同源性比较

将确定含有插入片段的阳性克隆送上海申能博彩公司进行测序 ,测序结果的拼接由 DNASIS 2.5 软件完成。蛋白序列分析和同源性比较采用网上程序 BLAST([www. ncbi. nlm. nih. gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) 和 软件 DNASIS 2.5 分析完成。

1.5 基因的克隆

根据 *amyF* 基因测序结果 ,设计合成如下引物 :上游引物 :5'-AGACATATGAAACAGCTATGTAAAA-3' ;下游引物 :5'-TGAAAGCTTACTCCCTTTTTCAGT-3' ,上游引物 5' 端含 *Nde* I 位点 ,下游引物 5' 端含 *Hind* III 位点。以 *Bacillus* sp. WS06 的染色体 DNA 为模板 ,用高保真的 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增 ,扩增条件 :94 $^{\circ}$ C 1min ,48 $^{\circ}$ C 1min ,72 $^{\circ}$ C 2min ,30 个循环。电泳检测 PCR 扩增产物约 1.6kb。扩增产物大小与预期结果相符。将以上片段纯化、酶切 ,与载体 pET-21a 相连后 ,转入受体菌大肠杆菌 BL21 中 ,用酶切检测的方法筛选出含重组质粒的菌株。

1.6 酶活力的测定

用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 配制淀粉浓度为 0.5% (W/V) 的底物溶液 ,采用 FuWa 的实验室微量比色法 [6] 测定。一个酶活力单位定义为 60 $^{\circ}$ C 下 1 分钟液化 1 μ g 可溶性淀粉所需的酶量。

1.7 蛋白质测定和电泳分析

按 Bradford 方法 [7] 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 [8] 的 SDS-PAGE 方法。

1.8 酶水解产物的硅胶板薄层色谱分析法

按文献 [9] 的方法 ,展开剂为正丁醇:乙酸:水 = 2:1:1 ,上行展开 2 次。显色剂为 4g 二苯胺和 4mL

苯胺溶于 200mL 丙酮和 20mL 85% 磷酸的混合液。硅胶板浸泡显色剂后 ,在红外烤箱 (500W) 中 90 $^{\circ}$ C 烘 10~15min 可见层析结果。

2 结果和讨论

2.1 基因组文库的筛选

从已构建的 *Bacillus* sp. WS06 的全基因组文库中通过筛选 ,获得两个阳性克隆菌株 pUC40(DH5 α) 和 pUC50(DH5 α) ,对它们提取质粒并进行酶切电泳分析 ,发现两个质粒分别含有 4.1kb 和 5.2kb 的插入片段。将其中的 pUC 40(DH5 α) 送上海申能博彩公司测序。

2.2 基因序列的测定及分析

测序结果经拼接后发现其中含有一个 1.6kb 的开放阅读框架。用 DNASIS 软件分析可知 ,该 *amyF* 基因编码区全长 1581bp ,编码 526 个氨基酸 ,预计蛋白分子量为 58.6kD ,等电点为 6.36 ,GenBank 登记号为 AY961096。

2.3 *amyF* 的同源性比较

通过 BLASTP 程序对 *amyF* 基因编码的蛋白序列进行分析比较 ,发现与已报道的 *Bacillus megaterium* [10] 和 *Bacillus polymyxa* [11] 的 α -淀粉酶序列有着很高的同源性 ,同源性分别为 93% 和 53% ,通过对该蛋白序列进行氨基酸序列比较分析后发现 ,*amyF* 中存在着 α -淀粉酶家族中 4 个特有的高度保守的 α -淀粉酶催化活性区 [12] ,即 Region I (142 DLVNH) Region II (234 DGFRDLAALH) Region III (279 EVWD) Region IV (3415 FLTNDH) 。这些都表明 *amyF* 可能是一个 α -淀粉酶编码基因。

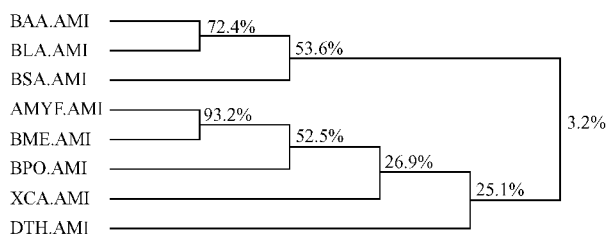


图 1 微生物淀粉酶的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic trees of microbial amylase

Enzyme abbreviation : AMYF , *Bacillus* sp. WS06 α -amylase ; BME , *Bacillus megaterium* [10] ; BPO , *Bacillus polymyxa* α -amylase [11] ; XCA , *Xanthomonas campestris* α -amylase [13] ; DTH , *Dictyoglomus thermophilum* α -amylase [14] ; BLA , *Bacillus licheniformis* α -amylase [15] ; BAA , *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase [16] ; BSA , *Bacillus stearothermophilus* α -amylase [17] .

对 *amyF* 和几种已报道的微生物 α -淀粉酶的氨基酸序列一起进行分类聚类计算,获得这些微生物淀粉酶类的蛋白系统进化树(图 1)。结果表明 AmyF 与常见的几种微生物的 α -淀粉酶如 BLA、BAA、BSA 等有明显的差别,而与 *Bacillus megaterium* 和 *Bacillus polymyxa* 等的 α -淀粉酶,如 BME 和 BPO 有着很高的相似性,应归于专门一类。

2.4 表达质粒 pETAF 的检测

通过酶切检测方法筛选出含重组质粒的菌株 BL2K(pETAF),将该菌株进行 37℃ 的摇床培养和 IPTG 诱导后,离心收集菌体和上清,处理后分别测定酶活,并以含空质粒 pET-21a 的菌株裂解液为相应空白对照,测得菌体破碎液和上清中都含有明显的 α -淀粉酶活力,说明 *amyF* 基因获得了稳定的表达。

2.5 重组菌株的培养和诱导

E. coli BL2K(pETAF)接种于装有 3mL LB 培养基的试管中,37℃、220r/min 摇床振荡培养 16h 后转入装有 50mL LB 培养基的三角瓶中,37℃、220r/min 摇床振荡培养,当瓶中培养液的菌体密度 OD_{600} 为 0.7 左右时,加入 10 μ L IPTG 溶液(20%)并继续在 37℃ 条件下诱导培养 4h。培养结束后 6000r/min 离心 15min 获得上清,以上清为粗酶液进行纯化。

2.6 酶的分离纯化

全部操作均在 4℃ 进行。将粗酶液置于冰浴中缓慢加入硫酸铵至 40% 饱和度,4℃ 静置 8h 后,10000r/min 离心 20min 去沉淀。上清液加到预先经含 40% 饱和度硫酸铵的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)平衡好的 Octyl-sepharose CL-4B 疏水柱层析柱上端(1.5 \times 10cm),先用同样缓冲液充分洗脱,再用含 40%~0% 饱和度硫酸铵的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)梯度洗脱,流速 0.6mL/min,分步收集,分别测定酶活力和 A_{280} 并收集酶活峰,将所得酶液用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)透析过夜后进行浓缩。酶液上预先经同样缓冲液平衡好的

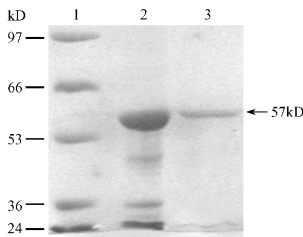


图 2 AmyF 表达和纯化的 SDS-PAGE 分析
Fig.2 SDS-PAGE of the purified AmyF from *E. coli* BL2K(pETAF)
M. Molecular mass markers; 1. Crude enzyme; 2. Purified AmyF.

Sephadex G-100 层析柱(2.6 \times 100cm)顶端,用相同缓冲液洗脱,流速每管 0.5mL/min,分步收集,分别测定酶活力和 A_{280} 并收集酶活峰。浓缩酶液后作 SDS-PAGE(8% 分离胶)分析显示为一条带(图 2)。经过以上各步提纯,最终淀粉酶 AmyF 的比活共提高了约 22.2 倍,酶活回收率为 54.9%(表 1)。

表 1 α -淀粉酶(Amy F)的分离纯化

Table 1 Purification of α -amylase (Amy F)					
Purification step	Total activity /U	Total protein /mg	Special activity \angle U/mg	Purification fold	Recovery /%
Crude enzyme	1035.6	116.0	8.9	1.0	100.0
40%(NH ₄) ₂ SO ₄	880.1	84.2	10.5	1.2	84.5
Octyl-Sepharose CL-4B	743.0	13.9	58.3	6.6	71.7
Sephadex G-100	568.7	2.88	197.5	22.2	54.9

2.7 酶的基本性质

2.7.1 分子量的测定:用 8% 分离胶的 SDS-PAGE 测出 AmyF 的分子量为 57kD。

2.7.2 化学试剂对酶活力的影响 20mmol/L 的各种金属盐离子、柠檬酸盐离子、EDTA 和 SDS 溶液分别与 1% 淀粉底物溶液等体积混合后,以之为底物各自加入 AmyF 测定酶相对活力,以正常条件下测定的酶液活力为 100%。从表 2 结果可以看出,金属离子 Cu²⁺、Fe³⁺、Fe²⁺、Zn²⁺ 对酶活有显著抑制作用,Mg²⁺、Mn²⁺ 有微弱的抑制作用,K⁺、Ca²⁺ 和表面活性剂 SDS 有微弱的激活作用,而其他一些离子如 Na⁺、Li⁺ 则对酶活影响不大。实验还证明,金属螯合剂 EDTA 和柠檬酸盐离子对酶就有很强的抑制作用,推测 AmyF 可能属于金属酶,并且受到了糖类代谢三羧酸循环中重要产物柠檬酸的反馈抑制。

表 2 化学试剂对酶活力的影响

Table 2 Effects of chemical reagents on amylase activity			
Reagents	Relative activity/ %	Reagents	Relative activity/ %
None	100	Mn ²⁺	90.1
Na ⁺	104.1	Fe ²⁺	0
Li ⁺	106.8	Zn ²⁺	0
Mg ²⁺	87.3	Fe ³⁺	0
Ca ²⁺	126.7	Cu ²⁺	0
K ⁺	110.4	SDS	126.4
EDTA	16.0	Citrate	45.5

2.7.3 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 AmyF 的活力,获得温度-活力曲线,酶的最适反应温度为 55℃~60℃。50℃ 时,在不同 pH 条件下测定 AmyF 的酶活力,获

得 pH-活力曲线 ,酶的最适反应 pH 为 7.0。将酶液在不同温度中分别保温 60min 后 ,各自测定残余酶活力 ,以未保温的酶液活力为 100% ,获得温度-稳定性曲线 ;结果表明 ,酶活力在不超过 55℃ 时较为稳定。将酶液在不同 pH 条件下分别在 50℃ 保温 60min ,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 ,AmyF 能在较宽的 pH 范围内(pH 3 ~ 12)保持稳定。这说明该酶可以在 pH 变化较大的消化道中保持稳定并在中性的肠道环境有效地降解淀粉。

2.8 酶的水解性质

2.8.1 不同淀粉底物酶解速度比较 :用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)配制底物浓度为 1.0% (W/V)的各种淀粉溶液 ,向 0.5mL 淀粉糖底物中加入 0.5mL AmyF 酶液 ,混匀后 30℃ 保温 10min ,DNS 法测定溶液中还原糖的生成速度 ,以可溶性淀粉的水解速度为 100% ,计算酶对其他底物的水解速度。由表 3 的结果可以看出 ,AmyF 对大部分来源的淀粉均有较好的水解效果 ,但对右旋葡聚糖和环状糊精没有水解活性。这表明 AmyF 不能水解除 α -1,4-葡萄糖苷键以外的其他葡萄糖苷键。

表 3 不同淀粉底物酶解速度的比较

Table 3 Relative initial speed from the enzymatic hydrolyzate of different starch substrates

Substrate	Relative initial speed/ %	Substrate	Relative initial speed/ %
Soluble starch	100	Amylopectin	166
Starch (corn)	104	Dextran	0
Starch (sweet potato)	195	α -Cyclodextrin	0
Starch (rice)	94	Starch (bean)	178

2.8.2 α -淀粉酶水解产物的分析 :用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)配制底物浓度为 1.0%(W/V)的可溶性淀粉溶液 ,向 0.5mL 淀粉底物中加入 0.5mL AmyF 酶液 ,混匀后 30℃ 保温反应不同的时间 ,分别取样用碘液^[18]和硅胶板薄层色谱的方法分析(图 3)。在碘色反应过程中 ,水解产物与碘呈色反应显示 ,由起初的深蓝色逐渐变浅 ,缓慢到紫红色 ,至最终的无色 ,而从图 3 可以看出 ,起初淀粉的水解产物是一系列分子量大小各异的麦芽寡糖 ,随着反应的进行 ,大分子的寡糖逐渐减少 ,小分子的寡糖逐渐增加 ,这表明其对淀粉的水解是一个渐变的内切过程 ;从图中还可以看出 ,淀粉水解的终产物主要为麦芽三糖 ,少量的麦芽四糖和五糖 ,微量的六糖、七糖等 ,产物中不含有葡萄糖和麦芽糖 ,表明该酶是一个液

化型的淀粉水解内切酶^[19]。此外该酶对能抵抗一般淀粉酶降解的抗性淀粉和直链淀粉含量较高的豆类淀粉都有理想的水解作用 ,表明该酶可能在猪结肠中抗性淀粉的消化和代谢过程中起重要作用。

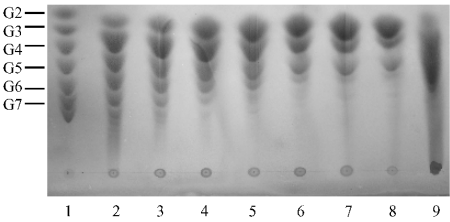


图 3 α -淀粉酶水解产物的硅胶板薄层色谱分析

Fig.3 Thin layer chromatogram of the enzymatic hydrolyzate of starch
1. Standard sugars(G2-G8); 2. 1h ; 3. 2h ; 4. 4h ; 5. 6h ; 6. 12h ; 7. 24h ; 8. 48h ; 9. Resist starch.

参 考 文 献

[1] Vihinen M , Mantsäli P. Microbial amylolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* , 1989 **24** :329 - 418.
[2] Henrisset B. A classification of glycosyl hydrolases based on the amino acid sequence similarities. *Biochem J* , 1991 **280** :309 - 316.
[3] Nielsen J E , Borchert T V. Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochim Biophys Acta* , 2000 **1543** :253 - 274.
[4] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. 分子克隆实验指南 . 金冬雁 ,等译 .第二版 .北京 :科学出版社 ,1993.
[5] Lin L L , Hsu W H , Chu W S. A gene encoding for an alpha-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli* . *J Appl Microbiol* ,1997 **82** :325 - 334.
[6] Fuwa H. Analytical method of amylases activity. *J Biochem* , 1954 , **41** :583 - 603.
[7] Bradford M M. 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.
[8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* , 1970 **227** :680 - 685.
[9] Hansen S A. The thin-layer chromatographic method for the identification of mono- , di- , and trisaccharides. *J Chromatogr* , 1975 **107** :224 - 226.
[10] Metz R J , Allen L N , Cao T M , et al. Nucleotide sequence of an amylase gene from *Bacillus megaterium* . *Nucleic Acids Res* , 1988 , **16** :5203.
[11] Yebra M J , Blasco A , Sanz P. Expression and secretion of *Bacillus polymyxa* neopullulanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* , 1999 **170** :41 - 49.
[12] Matsuura Y , Kusunoki M , Harada W , et al. Structure of possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem* , 1984 , **95** :697 - 702.
[13] Abe J , Shibata Y , Fujisue M. Expression of periplasmic alpha-amylase of *Xanthomonas campestris* K-11151 in *Escherichia coli* and its ac

- [14] Horinouchi S, Fukusumi S, Ohshima T, *et al.* Cloning and expression in *Escherichia coli* of two additional amylase genes of a strictly anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*, and their nucleotide sequences with extremely low guanine-plus-cytosine contents. *Eur J Biochem*, 1988, **176** 243 – 253.
- [15] Saito N. A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch Biochem Biophys*, 1973, **155** 290 – 298.
- [16] Nakajima R, Imanaka T, Aiba S, *et al.* Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, **23** 355 – 360.
- [17] Manning G B, Campbell L L. Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem*, 1961, **236** 2952 – 2957.
- [18] 张树政主编. 酶制剂工业. 北京:科学出版社, 1984, 484 – 486.
- [19] Yamamoto T. Bacterial α -amylase (liquefying- and saccharifying types) of *Bacillus subtilis* and related bacteria. Handbook of amylases and related enzymes. Oxford : Pergamon Press, 1988, 40 – 45.

Cloning and expression of the α -amylase gene from a *Bacillus* sp. WS06 , and characterization of the enzyme

PENG Ping^{1 2} WU Jin^{1*} CHENG An-chun² GAO Qi-yu^{1 3} ZHANG Shu-zheng¹

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² Sichuan Agriculture University, Ya 'an 6250143, China) (³ Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China)

Abstract : A *Bacillus* sp. WS06, which produces an extracellular α -amylase, was isolated from the cecum in a piglet. An *amyF* gene from this *Bacillus* strain was cloned and its nucleotide sequence was determined. An open reading frame composed of 1581 bases, which encodes 526 amino acid residues was found. The *amyF* gene shows high sequence homologies with other microbial amylase genes, such as *Bacillus megaterium* and *Bacillus polymyxa* (93% and 53% identity). The deduced amino acid sequence revealed that four highly conserved regions of the α -amylase family. The *amyF* gene was overexpressed using the pET21a vector and *Escherichia coli* BL21(DE3). The recombinant enzyme was purified 22.2 fold to electrophoretic homogeneity and had a molecular mass of 57kD (by SDS-PAGE). The enzyme was optimally active at pH 7 and 55 ~ 60°C and showed stability at the temperature below 55°C. This enzyme efficiently hydrolyzed various types of starch to yield a series of malto-oligosaccharides by endo-cleavage mode.

Key words : *Bacillus*, α -amylase, Cloning and Expression, Characterization

Foundation item :Knowledge Innovation Programs of Chinese Academy of Sciences (KSCX2-SW-323)

* Corresponding author. Tel 86-10-62652018 ; E-mail :wujinw5@yahoo.com.cn

Received date :03-14-2005