

研究报告

蜡样芽胞杆菌 GXBC-3 三个普鲁兰酶基因的表达及其酶学特性

李美蓉^{1,2}, 汪小波^{1,2}, 黄英^{1,2}, 黄坚丽^{1,2}, 梁甲元^{1,2}, 黄日波^{1,2,3}, 杜丽琴^{1,2}, 韦宇拓^{1,2}

1 广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004

2 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004

3 广西科学院, 广西 南宁 530004

李美蓉, 汪小波, 黄英, 等. 蜡样芽胞杆菌 GXBC-3 三个普鲁兰酶基因的表达及其酶学特性. 生物工程学报, 2012, 28(4): 466-475.

Li MR, Wang XB, Huang Y, et al. Gene expression and characterisation of three pullulanases from *Bacillus cereus* GXBC-3. Chin J Biotech, 2012, 28(4): 466-475.

摘 要: 探索获得优良的新型普鲁兰酶基因, 丰富普鲁兰酶理论, 对实现普鲁兰酶国产化具有重要意义。分析 GenBank 数据库中蜡样芽胞杆菌假定 I 型、II 型普鲁兰酶基因序列, 从实验室保藏的蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* GXBC-3 中克隆得到 3 个普鲁兰酶基因 pulA、pulB、pulC, 并分别导入大肠杆菌进行胞内诱导表达。纯化重组酶酶学性质研究表明重组酶 PulA 能水解 α -1,6-和 α -1,4-糖苷键, 为 II 型普鲁兰酶, 以普鲁兰糖为底物时, 最适反应温度及 pH 分别为 40 °C 和 6.5, 比活力为 32.89 U/mg; 以可溶性淀粉为底物时, 最适反应温度及 pH 分别为 50 °C 和 7.0, 比活力为 25.71 U/mg。重组酶 PulB 和 PulC 二者均只能水解 α -1,6-糖苷键, 为 I 型普鲁兰酶, 以普鲁兰糖为底物时, 其最适反应温度及 pH 分别为 45 °C、7.0 和 45 °C、6.5, 比活力分别为 228.54 U/mg 和 229.65 U/mg。

关键词: 蜡样芽胞杆菌 GXBC-3, 普鲁兰酶, 克隆表达, 酶学特性

Received: November 9, 2011; **Accepted:** February 8, 2012

Supported by: Guangxi Science and Technology Development Program (No. 11107008-3).

Corresponding author: Yutuo Wei. Tel: +86-771-3270336; Fax: +86-771-3235706; E-mail: weiyutuo@gxu.edu.cn.

广西科学研究与技术开发计划 (No. 11107008-3) 资助。

Gene expression and characterisation of three pullulanases from *Bacillus cereus* GXBC-3

Meirong Li^{1,2}, Xiaobo Wang^{1,2}, Ying Huang^{1,2}, Jianli Huang^{1,2}, Jiayuan Liang^{1,2}, Ribo Huang^{1,2,3}, Liqin Du^{1,2}, and Yutuo Wei^{1,2}

1 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning 530004, Guangxi, China

3 Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530004, Guangxi, China

Abstract: Exploring excellent new pullulanase genes, and enriching pullulanase theory are of great importance to realize the industrialization of pullulanase. Three genes, *pulA*, *pulB* and *pulC*, encoding pullulanases, were cloned from *Bacillus cereus* GXBC-3 by bioinformatics analyzing the open reading frame in *Bacillus cereus*, annotated as putative I and II pullulanases in the GenBank database. Characteristics of these recombinant enzymes were inducible intracellularly expressed in *Escherichia coli*, the results showed PulA was typical II pullulanase. Recombinant PulA could hydrolyze α -1,4- and α -1,6-glycosidic bonds. Its specific activity was 32.89 U/mg with an optimum temperature of 40 °C and optimum pH 6.5 using pullulan as substrate. And for soluble starch substrate, its specific activity was 25.71 U/mg with an optimum temperature of 50 °C and optimum pH 7.0. PulB and PulC were I pullulanases and only hydrolyzed α -1,6-glycosidic bond. The specific activities, optimum temperature and optimum pH of PulB and PulC for pullulan substrate were 228.54 U/mg, 45 °C, 7.0 and 229.65 U/mg, 45 °C, 6.5, respectively.

Keywords: *Bacillus cereus* GXBC-3, pullulanase, cloning and expression, characteristics

普鲁兰酶 (Pullulanase) (EC3.2.1.41) 是能专一性分解普鲁兰糖 (Pullulan)、淀粉、支链淀粉和相应的低聚糖中侧支分支点的 α -1,6 糖苷键的一种异淀粉酶 (或称枝切淀粉酶), 能使支链淀粉型多糖的分支链脱离主链形成一系列链长不一的直链淀粉^[1]。而最近发现的新普鲁兰酶兼有糖苷水解酶和糖基转移酶催化活性, 能水解 α -1,6-和 α -1,4-糖苷键, 是一种多功能水解淀粉酶^[2], 将该酶与淀粉酶、糖化酶等配合使用, 能加速淀粉充分糖化, 提高淀粉质原料利用率、降低粮耗, 在淀粉加工、制糖工业及啤酒和酒精生成行业中有着重要的用途和良好的市场前景。目前国内普鲁兰酶研究仅限于实验室, 所筛选获得的菌种的性能还远不能满足工业需求, 国内

外工业用普鲁兰酶市场长期被国外大公司所垄断, 且价格昂贵, 因此探索获得优良的新型普鲁兰酶基因, 为实现普鲁兰酶国产化具有重要的意义。本研究从一株产中温中性普鲁兰酶的菌株 *Bacillus cereus* GXBC-3 中克隆获得了 *pulA*、*pulB* 和 *pulC* 3 个普鲁兰酶基因, 利用 pSE380 表达系统实现了其在大肠杆菌中的表达, 研究分析了重组酶的性质, 为该酶下一步研究应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

限制性内切酶 *Nco* I、*Pst* I、*Eco*R I、Prime

STAR HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司；金属镍亲和层析介质购自 Pharmacia 公司；麦芽糖、麦芽三糖为色谱纯，其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 菌株和质粒

蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* GXBC-3、宿主大肠杆菌 *Escherichia coli* XL10-Gold 菌株和表达载体 pSE380 由本实验室保藏。

1.2 方法

1.2.1 普鲁兰酶基因的克隆

根据 GenBank 数据库中已公布的 *Bacillus cereus* 假定的 I 型和 II 型普鲁兰酶基因序列，并进行了信号肽预测，设计引物 (表 1)，以 *Bacillus cereus* GXBC-3 总 DNA 为模板，用 Prime STAR HS DNA 聚合酶进行 PCR 扩增目的基因，PCR 退火温度 45 °C，延伸 2 min 40 s。

1.2.2 重组质粒的构建及目的蛋白的表达和纯化

将目的基因连接到表达载体 pSE380 上，经测序验证后，转化到 *E. coli* XL10-Gold 进行 IPTG 诱导表达，收集菌体在冰浴条件下超声波破胞，收集上清，使用金属镍亲和层析法进

行纯化，利用 SDS-PAGE 凝胶电泳来检测纯化效果。

1.2.3 酶活的测定

酶活性的测定采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂显色法^[3]，取 500 μL 不同浓度的葡萄糖溶液，加入 500 μL DNS，沸水浴 5 min。置于冰上冷却至室温后，稀释 3 倍，测可见光 OD₅₂₀ 值来绘制葡萄糖标准曲线。酶活的测定完全依据制作葡萄糖标准曲线的方法进行。酶的活力单位定义为在最适温度及最适 pH 条件下，按上述反应，每 min 生成 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活单位(1 U)。

1.2.4 重组酶含量及比活力测定

按照《蛋白质技术手册》中的 Bradford 测定方法^[4]来计算蛋白质浓度。根据国际酶学委员会规定比活力=活力 U/mg 蛋白。

1.2.5 HPLC 分析条件

色谱柱：Ultima Amino 100A 5u 柱 (4.6 mm×250 mm)；检测器：Alltech 2000ES 型蒸发光散射检测器；流动相：水相=65 : 35；流速：1 mL/min；柱温：28 °C。

表 1 普鲁兰基因引物序列

Table 1 Primer sequences of pullulanase genes

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward <i>pulA</i>	CT <u>ACCATGG</u> ACCACCACCACCACCACC <u>ACTTGAAAGTAAAACG</u> TCCAT
Reverse <i>pulA</i>	ATA <u>CTGCAGT</u> TAAATGATGATGATGATGGTGCATTATCGTCAATATATAC
Forward <i>pulB</i>	CT <u>ACCATGG</u> ATCACCATCATCATATCATGTTTCAAATTCGAAAACAAC
Reverse <i>pulB</i>	CTAG <u>AATTC</u> TTATTTAATCGGTTTCTCTG
Forward <i>pulC</i>	ACT <u>CCATGG</u> CCCACCATCATCATATCATGTGCAAATTACAAAAAGATT
Reverse <i>pulC</i>	GCCG <u>AATTC</u> TAAATGATGATGATATGGTGTTTAATCGGTTTTTCTG

Underlined for the restriction sites *Nco* I, *Pst* I and *Eco*R I; bold for His tag.

2 结果与分析

2.1 普鲁兰酶基因的克隆

取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1 所示, 泳道 1、2、3 分别为基因 *pulA* (2 124 bp)、*pulB* (2 478 bp) 和 *pulC* (2 484 bp)。在 Signal IP 和 TMpred serve 进行进行信号肽和疏水跨膜区预测, 发现 3 个基因均无信号肽, 为胞内分泌表达。

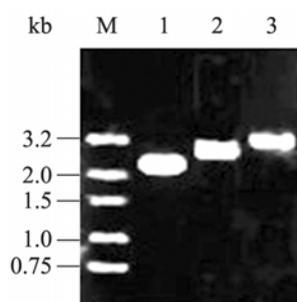


图 1 琼脂糖凝胶电泳分析普鲁兰酶基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR product of pullulanases gene. M: W2003 DNA marker; 1: *pulA*; 2: *pulB*; 3: *pulC*.

2.2 普鲁兰酶基因的表达与纯化

将构建好的基因工程菌按 2% 接种量于 LB (含 100 mg/L 的 Amp) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养至菌体浓度 OD_{600} 约 0.6, 用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床诱导表达 10 h 后, 收集菌体、破胞、收集上清, 用金属镍亲和层析法纯化目的蛋白, 取 20 μL 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。结果如图 2 所示, 图中泳道 3、5、7 分别表示为纯化重组普鲁兰酶 *PulA*、*PulB* 和 *PulC*, 其蛋白表达量和相对分子量见表 2。

2.3 重组酶酶学性质研究

2.3.1 重组酶底物特异性分析

用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液配制 1% 浓度的不同底物溶液与重组酶反应, 测绘底物-相对酶活力的曲线, 分析重组酶底物特异性。比较重组酶 *PulA*、*PulB* 和 *PulC* 对不同底物相对水解速度, 可得 3 种酶的最适底物均为普鲁兰糖, 经 HPLC 分析只产生麦芽三糖; 重组酶 *PulA* 还可水解可溶性淀粉产生麦芽糖和麦芽三糖的混合物; 而重组酶 *PulB* 和 *PulC* 不水解可溶性淀粉。综上可得, 重组酶 *PulA* 能水解 α -1,6-和 α -1,4-糖苷键, 为 II 型普鲁兰酶; 重组酶 *PulB* 和 *PulC* 只水解 α -1,6-糖苷键, 为 I 型普鲁兰酶。

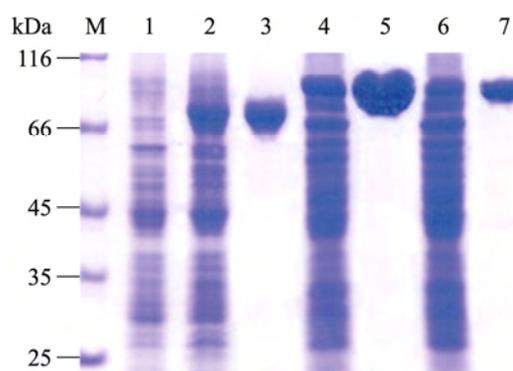


图 2 纯化后的重组普鲁兰酶 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant pullulanases. M: standard protein maker; 1: recombinant *E. coli* XL10-Gold containing pSE380; 2: recombinant *E. coli* XL10-Gold containing pSE380-*pulA*; 3: recombinant pullulanase *PulA* purified on nickel column; 4: recombinant *E. coli* XL10-Gold containing pSE380-*pulB*; 5: recombinant pullulanase *PulB* purified on nickel column; 6: recombinant *E. coli* XL10-Gold containing pSE380-*pulC*; 7: recombinant pullulanase *PulC* purified on nickel column.

2.3.2 重组酶最适温度及热稳定性

取 50 μL 稀释酶液与 450 μL 1% 普鲁兰糖/可溶性淀粉溶液在 15 $^{\circ}\text{C}$ ~70 $^{\circ}\text{C}$ 下每隔 5 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后测定酶活, 以酶活最高者作为 100%, 绘制温度-酶活力的影响曲线。重组酶 PulA 的普鲁兰酶和淀粉酶 (Amy A) 最适温度分别为 40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$, 重组普鲁兰酶 PulB 和 PulC 的最适温度均为 45 $^{\circ}\text{C}$ (图 3)。

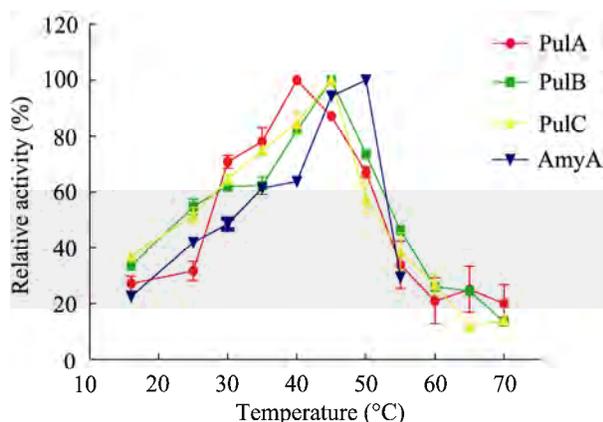


图 3 重组酶的最适温度

Fig. 3 Optimal temperature of recombinant enzymes.

在各温度梯度下, 将稀释酶液分别保温处理 30 min, 于最适温度下反应 10 min 后测定残余酶活力, 以未保温处理的酶活为 100%, 绘制温度-相对残余酶活力曲线。低于 40 $^{\circ}\text{C}$ 时, 3 种重组酶相对残余活力均高于 80%, 热稳定性较好; 高于 40 $^{\circ}\text{C}$ 时, 3 种重组酶相对残余活力均急剧下降, 热稳定性差 (图 4)。

2.3.3 重组酶最适 pH 及 pH 稳定性

取 50 μL 稀释酶液与 450 μL 1% 的普鲁兰糖/可溶性淀粉溶液在 pH 4.5~9.0 内, 每隔 0.5 个梯度, 于最适温度反应 10 min 后测定酶活, 以酶活最高者作为 100%, 绘制 pH-酶活力的影响曲

线。重组酶 PulA 的普鲁兰酶和淀粉酶 (AmyA) 最适 pH 分别为 6.5、7.0, 重组酶 PulB 和 PulC 的普鲁兰酶最适 pH 分别为 7.0、6.5 (图 5)。

用不同 pH 缓冲液稀释纯化重组酶, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 4 h, 于最适条件下反应测定残余酶活力, 以未经酸处理的酶活为 100%, 绘制 pH-相对残余酶活力曲线。3 种重组酶在 pH 5.5~8.0 范围内相对残余活力较高, pH 稳定性较好, 其中适度的 pH 条件对 PulC 有较弱激活作用 (图 6)。

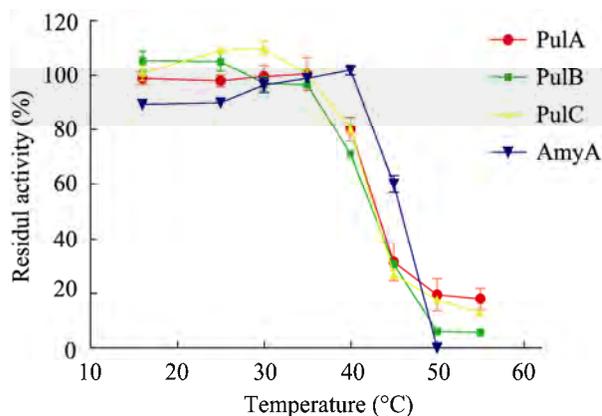


图 4 重组酶的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of recombinant enzymes.

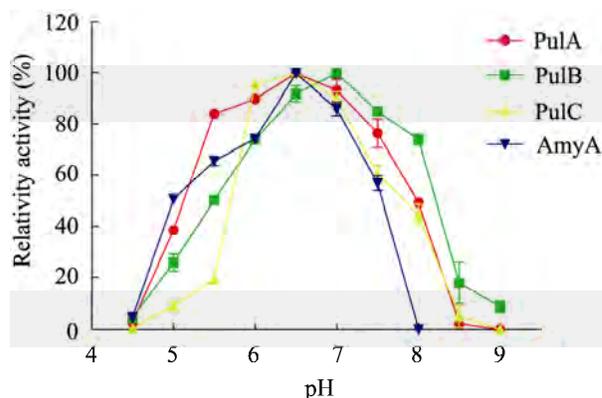


图 5 重组酶的最适 pH

Fig. 5 Optimal pH of recombinant enzymes.

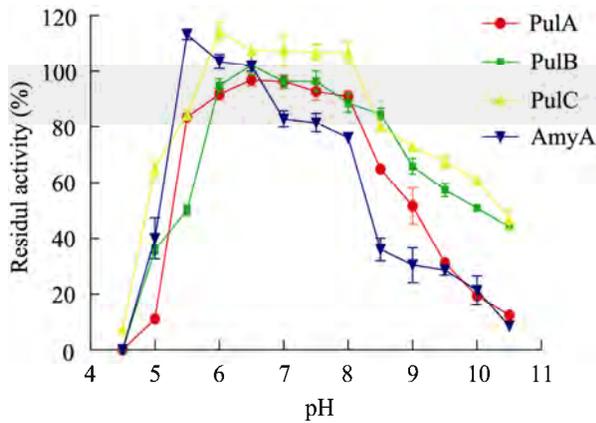


图 6 重组酶的 pH 稳定性

Fig. 6 pH stability of recombinant enzymes.

2.3.4 Ca^{2+} 对重组酶热稳定性的影响

将 Ca^{2+} 终浓度分别为 0~10 mmol/L 的稀释酶液于 4 °C 处理 12 h, 于 40 °C 保温 30 min, 在最适条件下反应后测绘 Ca^{2+} 浓度-相对酶活力曲线。在 2~10 mmol/L 范围内, Ca^{2+} 对重组酶 PulA、PulC 普鲁兰酶热稳定性有较明显抑制作用; 在 0~10 mmol/L 范围内, Ca^{2+} 对重组酶 PulA 淀粉酶 (AmyA) 与 PulB 普鲁兰酶热稳定性有较明显激活作用, 且分别在 2、4 mmol/L 时激活作用最强 (图 7)。

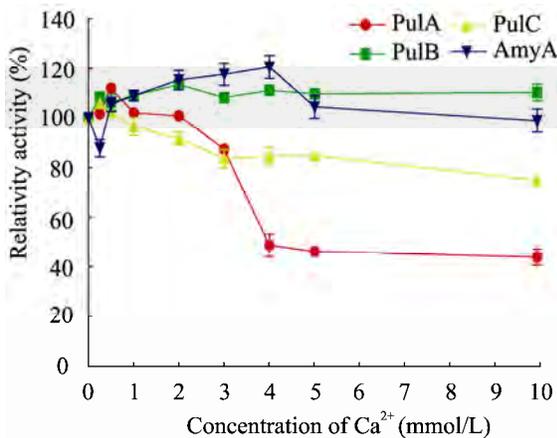


图 7 Ca^{2+} 对重组酶热稳定性的影响

Fig. 7 Effect of Ca^{2+} on thermal stability of recombinant enzymes.

2.3.5 EDTA 对重组酶活性的影响

将 EDTA 终浓度分别为 0~500 mmol/L 的稀释酶液于 4 °C 处理 12 h, 在最适条件下与底物反应后分别测绘 EDTA 浓度-相对酶活力曲线。在 10~40 mmol/L 内对重组酶 PulA 普鲁兰酶活性有较显著激活作用, 且激活作用随 EDTA 浓度增大而减弱; 在 50~500 mmol/L 内对重组酶 PulA 普鲁兰酶活性有较显著抑制作用, 且抑制作用随其浓度增大而增强。在 50~500 mmol/L 内对重组酶 PulB 普鲁兰酶活性有较显著抑制作用, 且抑制作用随其浓度增大而增强。在 10~500 mmol/L 内对重组酶 PulA 淀粉酶 (AmyA) 活性有较显著抑制作用, 且其抑制作用随浓度增大无明显改变 (图 8)。

2.3.6 金属离子对重组酶活性的影响

用终浓度为 2 mmol/L 的不同金属氯化物稀释酶液, 于 4 °C 处理 12 h, 在最适条件下与底物反应后分别测绘金属离子-相对酶活力曲线。 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 对重组酶 PulA 普鲁兰酶活性有显著激活作用, 而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对其有显著抑制作用; Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 对重组酶 PulB 普鲁兰酶活性有显著激活作用, 而 Fe^{2+} 对其有显著抑制作用; Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 对重组酶 PulC 普鲁兰酶活性有显著激活作用, 而 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对其有显著抑制作用; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{3+} 对重组酶 PulA 淀粉酶 (AmyA) 活性有显著激活作用, 而 Zn^{2+} 对其有微弱抑制作用 (图 9)。

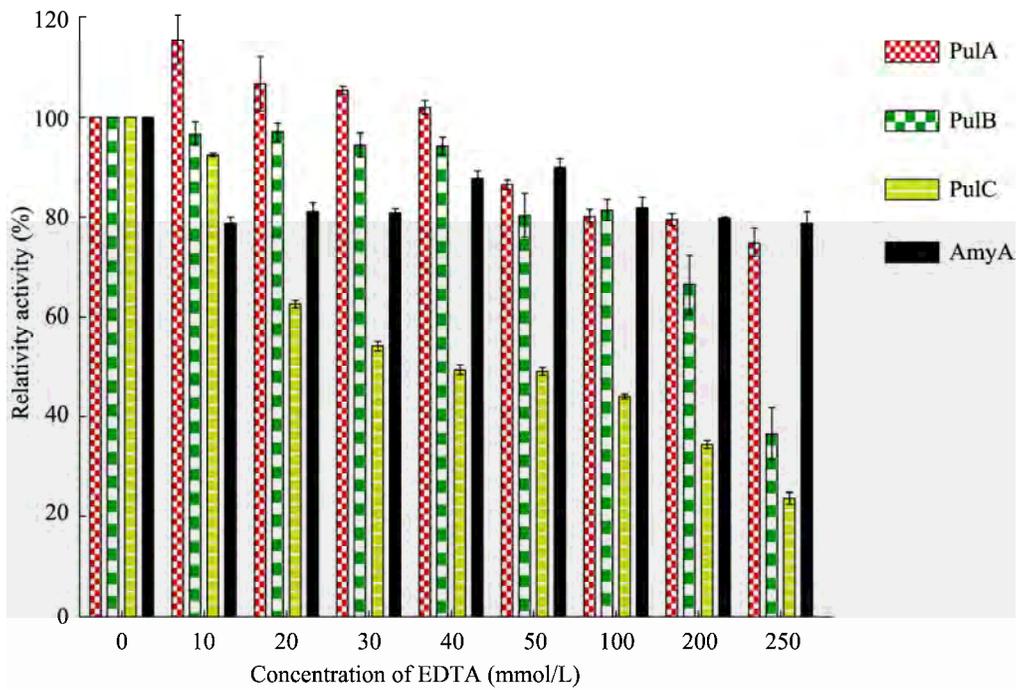


图 8 EDTA 对重组酶活性的影响

Fig. 8 Effect of EDTA on recombinant enzyme activities.

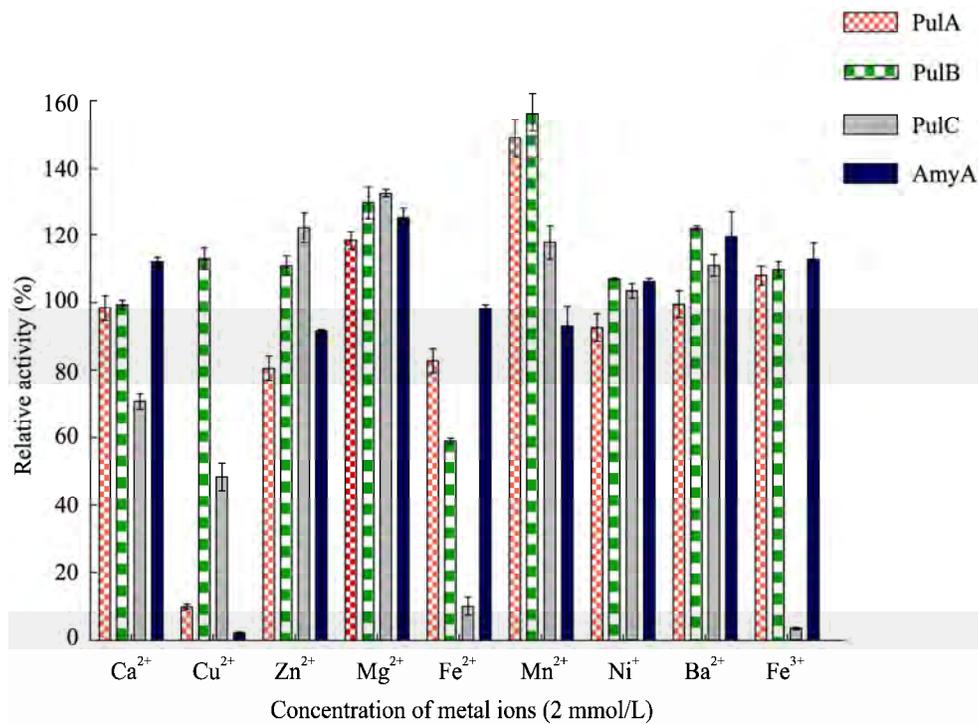


图 9 金属离子对重组酶活性的影响

Fig. 9 Effect of metal ions on recombinant enzyme activities.

2.4 重组酶比活力及 K_m 、 V_{max} 测定

按照 1.2.4 方法测定各重组酶比活力。在最适条件下取不同浓度的普鲁兰糖/可溶性淀粉 $[S]$ ，测得反应速度 V ，计算出 $1/V$ 与 $1/[S]$ ，通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求得各重组酶对普鲁兰糖/可溶性淀粉的 K_m 值和 V_{max} ，结果见表 2。

3 讨论

普鲁兰酶根据对底物的特异性一般可分为 I 型和 II 型普鲁兰酶，I 型普鲁兰酶又称脱支酶，特异性水解 α -1,6-糖苷键，形成麦芽三糖和线性的以 α -1,4-糖苷键连接的多聚物；II 型普鲁兰酶又称 amylo-pullulanase，既能水解 α -1,6-糖苷键，又能水解 α -1,4-糖苷键。不同来源的普鲁兰酶的分子量有很大差异，从 76~150 kDa 不等；但它们都含有几个保守区，包括细菌普鲁兰酶相关区域、普鲁兰酶 N-端区域及 α -淀粉酶亚家族等，使之形成特定的空间结构以行使其水解功能^[5]。本研究首次实现了在同一株 *Bacillus cereus* GXBC-3 中克隆并成功表达了 3 个、两种不同类

型的普鲁兰酶基因 *pulA*、*pulB* 和 *pulC*。其中 *pulA* 为 II 型普鲁兰酶基因，其表达的酶 PulA 能同时水解 α -1,6-和 α -1,4-糖苷键，它可能与来源于环状芽胞杆菌 *Bacillus circulans* F-2 的 II 型普鲁兰酶相似，其酶中心结构域含两个不同活性位点^[6]。*pulB* 和 *pulC* 为 I 型普鲁兰酶基因，其表达的酶 PulB 和 PulC 只水解 α -1,6-糖苷键。目前发现的大多数普鲁兰酶比活力较低，如比较来源其他 *Bacillus cereus* 的普鲁兰酶性质见表 3^[7-9]，这些普鲁兰酶活力较低；其他如来源环状芽胞杆菌 *Bacillus circulans* F-2^[6]、嗜碱芽胞杆菌 alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378^[10] 和嗜热芽胞杆菌 thermophilic *Bacillus* sp. AN-7^[11] 的 II 型普鲁兰酶比活力分别为 133.6 U/mg、83.1 U/mg 和 151.5 U/mg。而本研究中 II 型普鲁兰酶 PulB 和 PulC 的比活力均接近 230 U/mg，明显优于其他同类研究中发现的 II 型普鲁兰酶。

将 3 个普鲁兰酶在 SMART serve 进行功能结构域预测分析，发现其均隶属于淀粉酶 13 家族 (GH 13) 普鲁兰酶亚科，除含中心结构域 Aamy 外，均含一具脱枝功能的 N 端结构域 pfm

表 2 重组酶活力测定

Table 2 Activities of recombinant enzymes

Enzyme	Recombinant pSE380- <i>pulA</i>		Recombinant pSE380- <i>pulB</i>	Recombinant pSE380- <i>pulC</i>
	Pullulanase PulA	Amylase AmyA	Pullulanase PulB	Pullulanase PulC
Protein expression (g/L)	4.23		6.43	3.33
Molecular weight (kDa)	84.56		94.71	95.37
Specific activity (U/mg)	32.89	25.71	228.54	229.65
K_m (g/L)	0.33	2.63	1.17	1.96
V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$)	40.65	92.59	434.78	400.00

- CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D205–D210.
- [6] Kim CH, Kim YS. Substrate specificity and detailed characterization of a bifunctional amylase-pullulanase enzyme from *Bacillus circulans* F-2 having two different active sites on one polypeptide. *Eur J Biochem*, 1995, 227(3): 687–693.
- [7] Nair SU, Singhal RS, Kamat MY. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDTA-13. *Bioresour Technol*, 2007, 98(4): 856–859.
- [8] Ling HS, Ling TC, Mohamad R, et al. Characterization of pullulanase type II from *Bacillus cereus* H1.5. *Am J Biochem Biotechnol*, 2009, 5(4): 170–179.
- [9] Bakshi A, Patnaik PR, Gupta JK. Thermostable pullulanase from a mesophilic *Bacillus cereus* isolate and its mutant UV7.4. *Biotechnol Lett*, 1992, 14(8): 689–694.
- [10] Ara, K, Saeki K, Igarashi K, et al. Purification and characterization of an alkaline amylo-pullulanase with both α -1, 4 and α -1, 6 hydrolytic activity from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1243(3): 315–324.
- [11] Kunamneni A, Singh S. Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. AN-7. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(7): 1399–1404.
- [12] Machovič M, Janeček S. Domain evolution in the GH13 pullulanase subfamily with focus on the carbohydrate-binding module family 48. *Biologia*, 2008, 63(6): 1057–1068.
- [13] Kim JH, Sunako M, Ono H, et al. Characterization of the C-terminal truncated form of amylopullulanase from *Lactobacillus plantarum* L137. *J Biosci Bioeng*, 2009, 107(2): 124–129.
- [14] Lin HY, Chuang HH, Lin FP. Biochemical characterization of engineered amylopullulanase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E-implicating the nonnecessity of its 100 C-terminal amino acid residues. *Extremophiles*, 2008, 12(5): 641–650.
- [15] Ara K, Saeki K, Igarashi K, et al. Purification and characterization of an alkaline amylo-pullulanase with both α -1, 4 and α -1, 6 hydrolytic activity from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1243(3): 315–324.
- [16] Jiao Y L, Wang S J, Lji M S, et al. A GH57 family amylopullulanase from deep-sea *Thermococcus siculi*: expression of the gene and characterization of the recombinant enzyme. *Curr Microbiol*, 2011, 62(1): 222–228.