

# 耐酸耐高温 $\alpha$ - 淀粉酶及其菌种选育研究进展

尹 伊<sup>1</sup>, 屈建航<sup>1</sup>, 李海峰<sup>1</sup>, 焦国宝<sup>2</sup>, 丁长河<sup>1</sup>, 屈凌波<sup>1</sup>, 刘仲敏<sup>2</sup>

(1. 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450000;

2. 河南仰韶生化工程有限公司, 河南 浞池 472400)

**摘要:**耐酸耐高温  $\alpha$  - 淀粉酶能在高温与低 pH 下水解淀粉, 是重要的新型工业酶制剂。概述了耐酸耐高温  $\alpha$  - 淀粉酶的热稳定性、pH 稳定性及金属离子对其的影响, 阐述了产酶菌种的主要来源现状, 并重点对耐酸耐高温  $\alpha$  - 淀粉酶诱变育种的复合诱变、基因工程定点突变等菌种选育和古菌的相关研究进行了综述。

**关键词:**耐酸耐高温  $\alpha$  - 淀粉酶; 酶学性质; 菌种; 选育; 基因工程

**中图分类号:** TQ 925<sup>+</sup>.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007 - 7561 (2015) 05 - 0101 - 05

## Research progress in the acid - resistant thermostable $\alpha$ - amylase and strain breeding

YIN Yi<sup>1</sup>, QU Jian - hang<sup>1</sup>, LI Hai - feng<sup>1</sup>, JIAO Guo - bao<sup>2</sup>,

DING Chang - he<sup>1</sup>, QU Ling - bo<sup>1</sup>, LIU Zhong - min<sup>2</sup>

(1. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou Henan 450000;

2. Henan Yangshao Biochemical Engineering Company, Mianchi Henan 472400)

**Abstract:** The acid - resistant and thermostable  $\alpha$  - amylases is one of the important industrial enzyme preparation, which can hydrolyze starch under high temperature and low pH. The influence of thermal stability, pH stability and metal ions on the acid - resistant and thermostable  $\alpha$  - amylases was outlined. The main strain resources were summarized. The research progress in strain improvement and archaea, including compound mutation of mutation breeding and gene engineering site - directed mutagenesis, was discussed.

**Key words:** acid - resistant thermostable  $\alpha$  - amylase; enzymatic properties; strain; breeding; genetic engineering

淀粉是自然界中仅次于纤维素的第二大多糖储备物质, 是许多食品与非食品行业的重要组成部分<sup>[1]</sup>。直到 19 世纪之前, 淀粉水解使用的是稀盐酸的酸水解法<sup>[2]</sup>, 但因该法的糖含量较低且产生一些不必要的化合物, 现在几乎完全被酶水解法取代。

$\alpha$  - 淀粉酶, 即  $\alpha$  - 1, 4 - 葡聚糖水解酶, 普遍分布在动物、植物和微生物中, 能随机作用于淀粉、糖原、寡糖或多聚糖分子内部的  $\alpha$  - 1, 4 - 糖苷键, 将淀粉水解成糊精、麦芽糖、低聚糖和葡萄糖等一系列

小分子物质<sup>[3-5]</sup>。

世界酶市场呈现一种高速增长现象<sup>[6]</sup>, 2005 年世界酶市场在 30 亿美元左右, 2009 年在 51 亿美元, 2010 年已增长至 58 亿美元, 同时预计 2020 年将达到 100 亿美元以上<sup>[7-8]</sup>, 其中淀粉酶产业约占 30% 左右。 $\alpha$  - 淀粉酶是最早实现工业化生产并且是迄今为止用途最广、产量最大的酶制剂品种, 几乎占淀粉酶制剂总产量的 50% 以上<sup>[9]</sup>。特别是微生物产  $\alpha$  - 淀粉酶已广泛应用于食品、饮料、制药、纺织等行业<sup>[9-11]</sup>。

耐高温  $\alpha$  - 淀粉酶广泛应用于工业生产, 如洗涤剂产业、纺织业、酿酒与烘焙行业<sup>[12]</sup>。这些产业在淀粉加工时往往需要在较高的温度下进行, 耐高

收稿日期: 2015 - 06 - 01

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2013AA102101); 国家自然科学基金面上基金项目 (31370147); 河南省高校科技创新团队支持计划 (15IRTSTHN019); 河南省高校青年骨干教师资助计划 (2013GGJS - 077)

作者简介: 尹伊, 1990 年出生, 男, 河南洛阳人, 研究生。

通讯作者: 屈建航, 女, 河南南阳人, 博士。

温 $\alpha$ -淀粉酶最直接的效应就是减少了冷却步骤,降低能源消耗和成本<sup>[13]</sup>。其次,在高温环境下许多杂菌的生长受到抑制,降低了生产过程中的污染<sup>[14]</sup>。耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的开发对淀粉加工行业有巨大的经济效益<sup>[15]</sup>。

目前使用的 $\alpha$ -淀粉酶最适温度在95℃左右,pH在5.8~6.8之间,而工业生产过程中自然淀粉浆的pH在3.2~4.5之间,因此 $\alpha$ -淀粉酶不能适应低pH的生产过程<sup>[3]</sup>。为了调整其作用pH,往往需要将淀粉浆的pH从3.2~4.5调至5.8~6.2,且需添加 $\text{Ca}^{2+}$ 作为稳定剂<sup>[1]</sup>。而下一个糖化步骤的pH在4.2~4.5,同样需要调节pH。这一系列的调节使得工艺流程变得复杂,增加生产成本。耐酸性 $\alpha$ -淀粉酶的使用,可以使淀粉浆液化糖化的步骤省去调节pH与脱去 $\text{Ca}^{2+}$ 的进一步纯化,简化工艺流程,降低生产成本。

基于普通 $\alpha$ -淀粉酶往往存在热稳定差与pH不适应工业生产等问题,目前研究者着重研究耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶,使更利于工业生产<sup>[16]</sup>,对于节约能源、降低成本等有重要意义。

## 1 耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶酶学性质

### 1.1 最适反应温度及热稳定性

耐热性是 $\alpha$ -淀粉酶的一个重要特点, $\alpha$ -淀粉酶的最适温度范围在45~115℃之间,耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶最适反应温度在90~95℃,热稳定性在90℃以上,但也有耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶最适反应温度在60℃以上<sup>[17]</sup>。现阶段工业应用中使用的 $\alpha$ -淀粉酶,所需反应条件往往需在酸性环境下温度达到90℃以上,如酒精生产中高温蒸煮的淀粉糊化温度就在120~135℃<sup>[18]</sup>,这就要求耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶在高温下必须仍有较高的酶活力。耐热性良好的 $\alpha$ -淀粉酶可以节约大量冷却水,同时由于高温下发酵液粘稠度降低可以减少动力消耗,且高温下多数不耐热杂菌得到抑制,减少污染。

### 1.2 最适反应pH及稳定性

$\alpha$ -淀粉酶的pH适用范围十分广泛,pH在2.0~12.0之间<sup>[19]</sup>。大多数 $\alpha$ -淀粉酶的最适pH在酸性或近中性,耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶其最适pH在4.0~5.0,且在较大pH值范围内稳定,如日本研究者得到的*Aspergillus niger*生产的 $\alpha$ -淀粉酶在pH 1.8时,仍残余58%的酶活力<sup>[20]</sup>。工业生产中pH环境往往在3.0~5.0之间,耐酸耐高温 $\alpha$ -淀

粉酶在其pH环境下应有较高酶活力。

### 1.3 金属离子对酶活力的影响

不同金属离子与稳定剂会对酶的热稳定性产生影响。沈微等<sup>[21]</sup>研究得出钙离子、镁离子、钴离子对*Bacillus amyloliquefaciens*所产 $\alpha$ -淀粉酶酶活有强烈激活作用,钾离子、锰离子、铁离子对酶活影响不大,EDTA对 $\alpha$ -淀粉酶有部分的抑制作用,且 $\text{Ca}^{2+}$ 对 $\alpha$ -淀粉酶的热稳定性有着显著影响,研究表明一定浓度的 $\text{Ca}^{2+}$ 能显著提高酶的热稳定性<sup>[22]</sup>。

工业上多数的耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶需要 $\text{Ca}^{2+}$ 来稳定活性,但是部分工业生产中需要排除 $\text{Ca}^{2+}$ ,因此对不依赖 $\text{Ca}^{2+}$ 的耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的研究是十分必要的。目前已有耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶不需要 $\text{Ca}^{2+}$ 来增加稳定性<sup>[23]</sup>。

## 2 耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的微生物来源

### 2.1 耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的微生物来源

不同的 $\alpha$ -淀粉酶来自不同的植物、动物、微生物。微生物由于其生物多样性以及基因操作使得酶更易于积累,现在利用微生物发酵富集生产已经逐渐替代了传统从复杂真核细胞中提取 $\alpha$ -淀粉酶的方法<sup>[24]</sup>,已经成为工业 $\alpha$ -淀粉酶生产的重点。

目前,工业生产中 $\alpha$ -淀粉酶主要来自芽孢杆菌与曲霉。生产 $\alpha$ -淀粉酶的真菌多为常温真菌,且大多为曲霉,如*Aspergillus oryzae*<sup>[25]</sup>、*Aspergillus niger*<sup>[26]</sup>、*Aspergillus usamii*<sup>[27]</sup>。芽孢杆菌属(*Bacillus*)已知有48个种能产生淀粉酶,嗜热芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)<sup>[28]</sup>和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)<sup>[29]</sup>产生的耐热 $\alpha$ -淀粉酶已经广泛用于工业生产。另外也包含一些古菌(*Thermococcus profundus*、*Thermococcus siculi*)<sup>[30]</sup>。上述菌种大多从发酵废液、海底火山口处、酒糟或富含淀粉的土样中分离,由于自然界分离出的多数野生菌株产酶能力较低,且酶活不高,故不能直接用于工业生产。

### 2.2 耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶产生菌

微生物本质上生长条件十分广泛,在极端的温度、压力、盐度与pH下都可以生长<sup>[31]</sup>,但是产生耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的微生物较少,直到上世纪60年代以后才开始使用耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶<sup>[7]</sup>。

真菌来源的工业应用耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶主要来自于黑曲霉<sup>[32]</sup>。目前,产耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶细菌主要为酸热脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*

acidocaldarius)<sup>[33]</sup>,但也有一部分来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)<sup>[34]</sup>与放线菌(*Nocardopsis* sp.)<sup>[35]</sup>产耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶。现阶段研究最多的是将耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因克隆到其他菌种中,国外已成功将地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)<sup>[36]</sup>中耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因提取并在枯草芽孢杆菌中表达,重组菌产的 $\alpha$ -淀粉酶有良好的耐酸耐热性,广泛应用于食品与酿造工业。

近些年极端环境下分离出的产耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶菌株已是研究的主流方向。刘洋等<sup>[37]</sup>从长白山温泉口处筛选出一株酸性 $\alpha$ -淀粉酶产生菌,其在最适条件(pH 4.5、70℃)下酶活力达到最高。权淑静等<sup>[38]</sup>从酿造大曲中筛选的产酸性 $\alpha$ -淀粉酶菌株最适pH为3.6,且在pH 3.0~5.0之间有良好的酸稳定性。姚婷<sup>[30]</sup>得到的嗜嗜热古菌*Thermococcus siculi* HJ21产生的 $\alpha$ -淀粉酶,最适反应pH为4.5,且在80、90、100℃都保有较高活性。可以看出一些极端环境是筛选耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶菌株的理想来源。

自然筛选的野生菌株产的 $\alpha$ -淀粉酶往往没有较好的耐酸耐热性,大多数耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶菌株是由野生菌株经诱变育种、基因工程育种等得到,如耐受温度在95℃以上的耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因主要从极端嗜热古菌*Pyrococcus furiosus*<sup>[34]</sup>中分离得到。

### 3 耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶菌种选育

#### 3.1 诱变育种

自然筛选出的产耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶菌种有着产酶量低、酶活低等缺点,所以现阶段多采用诱变育种进一步筛选高产菌株,一般分为物理诱变与化学诱变。化学诱变剂包括烷化剂、天然碱基类似物亚硝酸和硫酸二乙酯等。传统的物理诱变育种已经较成熟,包括使用紫外线、激光、x-射线和 $\gamma$ -线等,黄伟等<sup>[39]</sup>通过紫外诱变对一株产酸性 $\alpha$ -淀粉酶黑曲霉(*Aspergillus niger*)进行选育,得到三株酶活有较大提高的突变菌株,其酸性 $\alpha$ -淀粉酶酶活力分别为184.66、162.73、167.31 U/mL,比出发菌株分别提高了54.9%、38.1%和42.0%。

化学与物理诱变复合使用,有助于得到更为理想的菌株。胡欣洁等<sup>[40]</sup>对一株产 $\alpha$ -淀粉酶野生假丝酵母菌进行紫外(UV)与硫酸二乙酯(DES)的复合诱变,得到一株突变菌,产酶能力是原来的近5

倍。钱萍<sup>[41]</sup>对一株黑曲霉进行紫外与硫酸二乙酯诱变,使其在pH 4.0、75℃下发酵,酶活比原菌株提高了10倍,且在85℃仍有较高酶活。戚薇等<sup>[42]</sup>通过将氮离子注入一株产 $\alpha$ -淀粉酶枯草芽孢杆菌,筛选到最适作用pH为5.0的突变菌株,较出发菌株的最适作用pH偏低一个单位。Alexandr等<sup>[43]</sup>对产酸性 $\alpha$ -淀粉酶的嗜中温芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) 406进行诱变,使其耐热性有很大提高,与工业耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶十分接近,且该菌株在75℃降解淀粉的能力也大大提高。可见物理和化学诱变对耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶菌株的选育具有重要作用。但是诱变育种也有诸多缺陷,菌株经长期自然选择基因较为稳定,诱变剂诱变效果单一且无法多次使用,诱变剂量的选择步骤复杂,微生物复杂的基因修复机制等使得诱变在微生物育种中有一定的局限。

#### 3.2 基因工程育种

随着分子生物学的迅速发展,定点突变等技术可以实现对基因的精确改造,从而获得理想的蛋白表达效果<sup>[44]</sup>,具有周期短、效率高的优点,能够从理性设计的角度达到菌种优化的目的<sup>[45]</sup>。 $\alpha$ -淀粉酶的热稳定性、耐酸性与蛋白质一级结构、氨基酸间的作用有着密切关系,为基因工程育种提供了条件。Yang等<sup>[46]</sup>通过定向诱变和动力学分析研究,在对极端嗜热厌氧古菌*Pyrococcus furiosus*的发酵研究中发现4个关键氨基酸残基(His414、Gly415、Met439和Asp440)对耐高温 $\alpha$ -淀粉酶底物识别、转糖苷作用起着重要作用,这是从蛋白质的一级结构方面对耐高温 $\alpha$ -淀粉酶功能进行的研究。

利用基因工程手段得到高产耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶,越来越受到国内外学者的青睐。Richardson等<sup>[47]</sup>对一株嗜热球菌属的 $\alpha$ -淀粉酶基因,用定向进化方法得到一个基因突变体BD5088,将其在荧光假单胞菌中进行表达,所得耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶最适pH为4.5,最适温度为95℃,且活性不依赖于Ca<sup>2+</sup>。胡博等<sup>[48]</sup>利用基因工程手段获得的产耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌工程菌株pWB-am-yd/WB600中表达,通过发酵条件优化耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶的酶活力达到3980 U/mL。

毕赤酵母表达体系所具有的种种优势,使各种食品工业用酶也相继在其中进行表达<sup>[9]</sup>。郭建强等<sup>[49]</sup>将克隆得到的极端嗜热厌氧古菌*Pyrococcus furiosus*的耐酸耐高温 $\alpha$ -淀粉酶结构基因连接表

达载体后,转化至毕赤酵母 GS115 得到重组菌,所产  $\alpha$ -淀粉酶最适反应温度为 90 ~ 100 °C,最适反应 pH 4.5 ~ 5.5,在 100 °C 条件下热处理 5 h,仍具有 60% 以上的酶活力,由于 *Pyrococcus furiosus* 生长温度在 100 °C 左右,所以极难在工业上应用,因此将该基因克隆并构建能够应用于工业生产的菌株十分有意义。

古菌的研究是目前耐酸耐高温  $\alpha$ -淀粉酶研究的新方向。李瑛<sup>[50]</sup>以嗜嗜热古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 基因组为模板 PCR 扩增得到不含信号肽的  $\alpha$ -淀粉酶结构基因,并构建了酵母分泌表达重组质粒 pINA1317-amy,筛选出活力较高的菌株 G7-5,最适作用温度为 90 °C,最适作用 pH 为 5.0,产生的  $\alpha$ -淀粉酶具有较强的热稳定性,且热稳定性不依赖  $\text{Ca}^{2+}$ 。古菌因为具有天然的环境抗逆性,其表达产物在高温、低 pH 环境下有天然优势,所以对其的开发研究对工业生产有一定的促进意义。

分子技术的应用对于探究耐酸耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的作用机理、创建优良产酶菌株,特别是提高菌株产酶能力有着重要作用。但多数研究仍停留在实验室阶段,真正运用于工业生产还需要进一步研究。

#### 4 小结

$\alpha$ -淀粉酶是世界酶制剂产业的重要部分,且我国淀粉资源十分丰富,对  $\alpha$ -淀粉酶的需求极大。耐酸耐高温  $\alpha$ -淀粉酶最佳反应条件在 90 °C 以上、pH 在 4.0 ~ 5.0 之间,能够适应工业生产中的高温偏酸环境,提高工业生产效率。我国目前缺乏自主知识产权的耐酸耐高温  $\alpha$ -淀粉酶,且菌种较为单一。优良菌株的筛选、诱变育种尤其是基因工程定向育种,使其产  $\alpha$ -淀粉酶有良好的耐高温和 pH 环境,并减弱其对  $\text{Ca}^{2+}$  的依赖性,是当前及今后该领域的努力方向。

#### 参考文献:

[1] Sharma A, Satyanarayana T. Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: characteristics, genetic engineering and applications [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(2): 201-211.

[2] Pandey A, Nigam P, Soccol C R, et al. Advances in microbial amylases [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 31(2): 135-152.

[3] Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri K M, et al.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources - an overview on recent developments [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 44(2): 173-184.

[4] 田美玲,杜木英,张甫生.  $\alpha$ -淀粉酶的改性技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(9): 363-367.

[5] Hiteshi K, Gupta R. Thermal adaptation of  $\alpha$ -amylases: a review [J]. *Extremophiles*, 2014, 18(6): 937-944.

[6] Hashemi M, Shojaosadati S A, Razavi S H, et al. The efficiency of temperature-shift strategy to improve the production of alpha-amylase by *Bacillus* sp. in a solid-state fermentation system [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, 5(3): 1093-1099.

[7] Sanchez S, Demain A L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance [J]. *Organic Process Research & Development*, 2011, 15(1): 224-230.

[8] 段钢. 工业酶与工业过程[J]. *生物产业技术*, 2014, 2: 25-30.

[9] 孟宪梅,杜承,秦亚楠. 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的分子生物学研究进展[J]. *吉林工商学院学报*, 2010, 26(5): 41-43.

[10] 姚清,陈建华. 新型  $\alpha$ -淀粉酶的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2013, 20(6): 557-559.

[11] 王建玲,陈志鑫,刘逸寒,等. 产耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶菌株的分离、鉴定、酶学特性研究及发酵培养基的优化[J]. *生物技术通报*, 2014, 31(4): 159-163.

[12] Herale R, Sukumaran U K, Kadeppagari R K, et al. Evidence for the improvement of thermostability of the maltogenic  $\alpha$ -amylase of *Aspergillus niger* by negative pressure [J]. *Starch - Starke*, 2012, 64(8): 646-651.

[13] Fincan S A, Enez B. Production, purification, and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* [J]. *Starch - Starke*, 2014, 66(10): 182-189.

[14] 石方方,焦国宝,丁长河,等. 耐酸耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2014, 125(4): 171-176.

[15] Peixoto S C, Jorge J A, Terenzi H F, et al. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases [J]. *International Microbiology*, 2003, 6(4): 269-273.

[16] Pandey S, Singh S P. Organic solvent tolerance of an  $\alpha$ -amylase from haloalkaliphilic bacteria as a function of pH, temperature, and salt concentrations [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(9): 1747-1757.

[17] 林必博. 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的研究进展[J]. *发酵科技通讯*, 2011, 40(4): 41-43.

[18] 鲁峰林,陈铁,张耀玺. 双酶法与高温蒸煮工艺对酒精生产成本的影响[J]. *酿酒科技*, 2007, 159(9): 70-71.

[19] Vihinen M, Mantsila P. Microbial amylolytic enzymes [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1989, 24(4): 329-418 [17] Van der Maarel M J, Van der Veen B, Uitdehaag J C, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family [J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 94(2): 137-155.

[20] Lim W J, Hong S Y, An C L, et al. Construction of minimum size cellulase (Cel5Z) from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 by removal of the C-terminal region [J]. *Applied Microbiology and Bi-*

- otechnology, 2005, 68(1): 46-52.
- [21] 刘洋,沈微,石贵阳,等. 中温 $\alpha$ -淀粉酶的酶学性质研究[J]. 食品科学,2008,29(9):373-377.
- [22] Mollania N, Khajeh K, Hosseinkhani S, et al. Purification and characterization of a thermostable phytate resistant  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. LH8 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(1): 27-36.
- [23] Asoodeh A, Chamani J, Lagzian M. A novel thermostable, acidophilic  $\alpha$ -amylase from a new thermophilic "*Bacillus* sp. Ferdowsicus" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran; Purification and biochemical characterization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(3): 289-297.
- [24] Van der Maarel MJ, Van der Veen B, Uitdehaag JC, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family [J]. Journal of Biotechnology, 2002, 94(2): 137-155.
- [25] Bhella R S, Altosaar I. Purification and some properties of the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus awamori* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1985, 31(2): 149-153.
- [26] Okolo B N, Ezeogu L I, Mba C N. Production of raw starch digesting amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1995, 69(1): 109-115.
- [27] Yabuki M, Ono N, Hoshino K, et al. Rapid induction of  $\alpha$ -amylase by nongrowing mycelia of *Aspergillus oryzae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 34(1): 1-6.
- [28] Bénédictie V S, Bram P, Kristof B, et al. Combined impact of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic alpha-amylase and surfactants on starch pasting and gelation properties [J]. Food Chemistry, 2013, 139(15): 1113-1120.
- [29] Hmidet N, Bayouhd A, Berrin J G, et al. Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of *amyN* gene in *Escherichia coli* [J]. Process Biochemistry, 2008, 43(5): 499-510.
- [30] 姚婷. 嗜嗜热古菌 *Thermococcus sicuti* HJ21 高温酸性 $\alpha$ -淀粉酶基因的定向改造[D]. 无锡:江南大学,2011.
- [31] Kumar L, Awasthi G, Singh B. Extremophiles: a novel source of industrially important enzymes [J]. Biotechnology, 2011, 10(2): 121-135.
- [32] 袁明雪,黄象南,翁海波,等. 耐酸耐热 $\alpha$ -淀粉酶高产菌株选育的初步研究[J]. 生物技术,2008,18(2):20-23.
- [33] Yingguo Bai, Huoqing Huang, Kun Meng, et al. Identification of an acidic  $\alpha$ -amylase from *Alicyclobacillus* sp. A4 and assessment of its application in the starch industry [J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1473-1478.
- [34] 盛嘉元. 脂环酸芽孢杆菌产耐酸耐高温淀粉酶及酶学性质研究[D]. 南京:南京理工大学,2009.
- [35] Samrat C, Sougata J, Arijit G, et al. Gellan gum microspheres containing a novel  $\alpha$ -amylase from marine *Nocardioopsis* sp. strain B2 for immobilization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70(8): 292-299.
- [36] Soshina N, Mrinalini N. Engineering a repression-free catabolite-enhanced expression system for a thermophilic alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* MSG [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168(3): 394-402.
- [37] 刘洋,王一琰,白黎婧,等. 一株酸性淀粉酶产生菌的分离鉴定及其酶学性质研究[J]. 食品工业科技,2014,35(4):174-178.
- [38] 权淑静,解复红,马焕,等. 一株产酸性 $\alpha$ -淀粉酶菌株的筛选及酶学性质研究[J]. 中国酿造,2014,33(5):104-108.
- [39] 黄伟,刘永乐,王发祥,等. 原生质诱变选育高产酸性 $\alpha$ -淀粉酶黑曲霉菌株[J]. 食品工业科技,2014,35(3):160-162.
- [40] 胡欣洁,李凇,王忠彦,等. 耐酸性 $\alpha$ -淀粉酶产生菌的选育[J]. 酿酒科技,2014,121(5):39-41.
- [41] 钱萍. 酸性淀粉酶菌株的诱变选育及酶学性质研究[J]. 食品工业科技,2012,33(11):183-186.
- [42] 戚薇,王海燕,王建玲,等. 氮离子注入选育耐酸性 $\alpha$ -淀粉酶产生菌诱变效应的研究[J]. 天津科技大学学报,2007,22(3):6-18.
- [43] Kachan A V, Evtushenkov A N. Thermostable mutant variants of *Bacillus* sp. 406  $\alpha$ -amylase generated by site-directed mutagenesis [J]. Central European Journal of Biology, 2013, 8(4): 346-356.
- [44] 封棣,孟青青,王玉海,等.  $\alpha$ -淀粉酶的基因改造与菌种选育研究进展[J]. 食品工业科技,2014,34(15):381-385.
- [45] Sharma A, Satyanarayana T. High maltose-forming,  $\text{Ca}^{2+}$ -independent and acid stable  $\alpha$ -amylase from a novel acidophilic bacterium, *Bacillus acidicola* [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(10): 1503-1507.
- [46] Yang S J, Min B C, Kim Y W, et al. Changes in the catalytic properties of *Pyrococcus furiosus* thermostable amylase by mutagenesis of the substrate binding sites [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(17): 5607-5612.
- [47] Richardson T H, Tan X, Frey G, et al. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable  $\alpha$ -amylase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(29): 26501-26507.
- [48] 胡博,刘逸寒,徐艳静,等. 枯草芽孢杆菌工程菌产耐酸性高温 $\alpha$ -淀粉酶发酵条件的优化[J]. 天津科技大学学报,2012,27(6):1-6.
- [49] 郭建强,李运敏,岳丽丽,等. 超耐热酸性 $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆及其在酵母细胞中的表达[J]. 生物工程学报,2006,22(2):237-243.
- [50] 李瑛. 嗜嗜热古菌 *Thermococcus sicuti* HJ21 高温酸性 $\alpha$ -淀粉酶基因的分泌表达及应用研究[D]. 无锡:江南大学,2012. ☉