

深海高温淀粉普鲁兰酶异源表达及酶活分析

焦豫良¹, 王淑军^{1*}, 吕明生¹, 房耀维¹, 刘姝¹

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 深海热液口厌氧古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 中的高温淀粉普鲁兰酶进行分子进化树系分析, 并在大肠杆菌中通过 pMal-c2x 载体表达并纯化其 N 端催化结构域。通过融合表达, 在 N 端催化结构域的 N 端融合有麦芽糖结合蛋白 MalE。对该融合蛋白的 α -淀粉酶和普鲁兰酶活性进行了实验分析。融合蛋白的两种酶活的最适温度均为 100 °C, 淀粉酶和普鲁兰酶活性的最适 pH 值分别为 5 和 6, 比活力分别为 6.5 和 11.5 U/mg。结果表明, 高温淀粉普鲁兰酶的 α -淀粉酶活性相对较弱, 其 C 端 578 个氨基酸构成的区域非两种酶活性所必需的结构。本研究中获得的高温淀粉普鲁兰酶融合蛋白在工业酶法制糖中可以进一步和高温 α -淀粉酶配合使用。

关键词: 高温淀粉普鲁兰酶; 异源表达; 酶活分析

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2011)05-0133-06

1 引言

工业制糖中淀粉水解为葡萄糖包括液化和糖化两个步骤。液化步骤主要为 α -淀粉酶水解直链 α -1, 4 糖苷键, 最适酶促水解条件为 pH6.0, 95 ~ 105 °C, 淀粉溶液在高温下形成凝胶结构, 由高聚糖水解为低聚糖^[1-3]。糖化步骤最适酶促条件为 pH4.5, 60 ~ 62 °C, 主要由淀粉糖化酶类水解残留的支链 α -1, 6 糖苷键和进一步水解直链 α -1, 4 糖苷键, 最终形成葡萄糖浆^[4-6]。淀粉普鲁兰酶(E. C. 3.2.1.1/41)能够同时水解 α -1, 4 和 α -1, 6 糖苷键, 在淀粉糖化中可以提高糖化率^[7-9]。而耐高温的淀粉普鲁兰酶(thermostable amylopullulanase, TAPU)能在高温的液化条件下同时进行糖化作用, 消除温度差变化, 从而提高生产效率和降低生产成本。

本研究通过统计分析 GenBank 中登录的淀粉普鲁兰酶氨基酸序列及其实验证明的酶活性, 将淀粉普鲁兰酶分为 3 类, 本实验中的淀粉普鲁兰酶

(TsiApu)属于 TAPU。深海热液口来源的高温酶类是海洋酶科学中的一个研究热点。TAPU 的耐热机理、分子进化以及三维结构目前还不清楚, 工业化应用也在研究之中。积极筛选和研究 TAPU, 能促进高温酶学机制研究和工业化应用。虽然 TAPU 在工业化应用中有一定前景, 但是由于极端微生物培养条件限制, 不能获得高产菌株。通过基因克隆和异源表达是大量获得酶蛋白的一个重要研究方向。本研究即通过原核表达出高温淀粉普鲁兰酶蛋白的 N 端催化功能区, 并对其融合蛋白的酶活性进行了实验分析。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

2.1.1 菌种和表达系统

厌氧古菌 *Thermococcus siculi* 菌株 HJ21 分离自深海热液口沉积物中, 保存在本室、原核表达载体 pMal-c2x 和蛋白纯化淀粉树脂均为 NEB 产品。

收稿日期: 2010-12-30; 修订日期: 2011-03-11。

基金项目: 国家自然科学基金项目(40746030); 江苏省高校自然科学研究重大项目(09KJA170001)。

作者简介: 焦豫良(1980—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为海洋功能基因。E-mail: laioni1980@126.com

* 通信作者: 王淑军, 博士, 教授。E-mail: shujunwang86@163.com

表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)菌株为 Novagen 公司产品。

2.1.2 酶、试剂和试剂盒

所有 PCR 试剂、各种 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等工具酶为 Takara 产品, *Thermococcus siculi* 菌株 HJ21 的总 DNA 提取试剂盒 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 为 Takara 公司产品。透析袋(MWCO: 100kDa)为 Spectrum Laboratories 产品。普鲁兰糖和可溶性淀粉购自 Sigma 公司,其他化学试剂均为国产分析纯。

2.1.3 培养基及培养条件

宿主菌的培养使用 LB 培养基(每升液体 LB 培养基含有 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母粉、10 g 氯化钠;固体 LB 培养基含有 2% 琼脂), 37 °C 培养。 *Thermococcus siculi* HJ21 的培养按用自行设计的厌氧培养装置,培养基为改良的 YPS 培养基, 88 °C 培养在充氮气的密封瓶中^[2]。

2.1.4 引物合成

APUF: GCGAATTCATGAGGCGGGTGGT-TGCCCTAC(斜体为 *EcoR* I 识别位点); APUR: GCGTCGACTCAGCGCCTCCTTCTGAGGAGG(斜体为 *Sal* I 识别位点)

2.2 方法

2.2.1 淀粉普鲁兰酶分子进化分析

收集 GenBank 中登录的,并具有实验研究报道的淀粉普鲁兰酶氨基酸序列。通过 Mega 5 软件进行分子进化分析,构建树系图。根据树系图对淀粉普鲁兰酶进行聚类,并推断出 TsiApu 基因(GenBank 登录号 EU849120)编码的淀粉普鲁兰酶的家系和类别。

2.2.2 TAPU TsiApu 基因克隆

本课题组在之前的研究中利用简并 PCR 的方法从 *Thermococcus siculi* HJ21 基因组 DNA 中扩增得到高温淀粉普鲁兰酶基因,并将其序列提交到 GenBank(登录号 EU849120)^[10]。利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 CDD 软件(conserved domain database)分析 EU849120 序列。根据软件分析结果,针对其 N 端催化功能区设计正向引物 APUF 和反向引物 APUR,并分别加上 *EcoR* I 和 *Sal* I 识别位点。

Thermococcus siculi HJ21 中的总 DNA 的提取采用 TaKaRa 公司的试剂盒 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 进行提取。抽提的总

DNA 作为 PCR 反应的模板。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min,一个循环;94 °C 30 s,65 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 7 min,一个终延伸循环。PCR 反应产物电泳检测,将目的条带切下,用胶回收试剂盒纯化回收。对纯化的片段用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切,然后和经同样双酶切的表达载体 pMal-c2x 连接。

通过氯化钙法制备 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。上述连接产物通过转化入大肠杆菌细胞中,菌体涂布于 LB 琼脂固体平板上(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$),37 °C 培养 12 h。利用引物 APUF 和 APUR 进行菌落 PCR 筛选出重组克隆。然后抽提重组质粒送上海生工测序验证。

2.3.3 高温淀粉普鲁兰酶表达

以 1 : 100 比例转接经鉴定的阳性克隆于 LB 液体培养基(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$),37 °C 于 180 r/m 摇床培养。培养至细胞密度 OD600 约为 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/dm³,进行重组蛋白的诱导表达。提高转速至 250 r/min 摇床继续培养 3 h,然后于 5 000 r/min,4 °C 离心 10 min,收集菌体。菌体用 PBS(pH 7.2)洗涤 2 次,然后如上步骤操作离心收集菌体。

2.3.4 蛋白纯化和电泳分析

对收集的菌体在冰浴条件下进行超声破碎(300 W,间隙超声 3 min),于 15 000 r/min,4 °C 离心 30 min,收集上清。取上清蛋白液 20 mL,以小于 1 mL/min 的流速上直链淀粉树脂柱。然后用 12 倍柱体积以上的柱缓冲液洗脱杂蛋白,流速 1 mL/min。再用含 10 mmol/dm³ 麦芽糖的柱缓冲液洗脱下重组蛋白,用核酸蛋白检测仪在 280 nm 检测,收集洗脱峰。

纯化蛋白用 20 mmol/dm³ 乙酸钠缓冲液透析(pH 6.0),每 100 μL 分装一管,贮存于 -80 °C 备用。用 SDS-PAGE 分析纯化蛋白,浓缩胶浓度为 6%,分离胶浓度为 15%,电压为 15 V/cm,电泳至溴酚蓝到达分离胶底部停止电泳,考马斯亮蓝法染色。中等分子量蛋白标准(MM0900)购自南京金斯瑞生物科技有限公司。

2.3.5 酶学性质分析

融合淀粉普鲁兰酶(MTsiApuN)的 α -淀粉酶和普鲁兰酶活性分别通过测定水解 1% 普鲁兰和 1% 可溶淀粉中释放的还原糖的量进行分析。标准酶解条件为: 100 °C, pH 5.0(淀粉酶活性测定)和 pH6.0(普鲁兰酶活性测定),20 mmol/dm³ 乙酸钠

缓冲液中反应 15 min。一个酶活单位定义为在标准酶解条件和合适还原糖的标准曲线下每分钟释放 $1 \mu\text{mol}$ 还原糖所需的酶量。普鲁兰酶的活性测定中用麦芽三糖绘制标准曲线,淀粉酶活性测定中用葡萄糖绘制标准曲线。

2.3.6 最适温度和 pH 测定

MTsiApuN 的两种酶活性的最适温度和 pH 值测定中,温度选择 $70 \sim 120 \text{ }^\circ\text{C}$ (共 11 个温度值),反应缓冲液为 50 mmol/dm^3 柠檬酸缓冲液 (pH 3.0~6.0), 50 mmol/dm^3 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0~8.0) 和 50 mmol/dm^3 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0~9.0)。分别在一定温度和 pH 下测定两种酶活力,确定两种酶活力的最适温度和 pH 值。

2.3.7 酶的热和 pH 稳定性实验

MTsiApuN 在 $80, 90, 100, 110 \text{ }^\circ\text{C}$ 下分别保温 5 h, 每 1 h 吸取 $200 \mu\text{l}$ 酶液保存于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用分析。在淀粉酶活性和普鲁兰酶活性的最适温度和 pH 值条件下测定残余相对总酶活(两种酶活之和)。未经过热处理的酶的活性定为 100% 相对活性。将 MTsiApuN 蛋白冻干粉溶解在梯度 Britton-Robinson 缓冲液 (pH 4.0~9.0) 中^[11], 总酶活最适温度下 ($100 \text{ }^\circ\text{C}$) 保温 4 h, 然后用 20 mM 乙酸钠缓冲液透析

(pH 6.0), 在两种酶活性的最佳 pH 和温度下测定相对酶活力。

3 结果与分析

3.1 淀粉普鲁兰酶分子进化分析

通过 Mega 5 软件对比各条淀粉普鲁兰酶的氨基酸序列, 共 2 058 个氨基酸位点, 其中可比较氨基酸位点为 $n=1 145$ 。选择邻接法计算发现淀粉普鲁兰酶形成 3 个大的聚类(图 1), 选择 Bootstrapping 法检验树系关系, 重复 1000 次计算分支的准确性, 分支上自展值用百分率表示。其中一支是常温淀粉普鲁兰酶(MAPU), 即 LplApu 来自于 *Lactobacillus plantarum* L137 的 MAPU^[12], 另外两支均为 TAPU。根据在线的数据库 CAZY(carbohydrate-Active Enzymes; <http://afmb.cnrs.mrs.fr/CAZY/>)^[13] 对糖苷水解酶的分类可知其中一支 TAPU 属于 GH13 家族, 另外一支 TAPU 属于 GH57 家族。本研究中的淀粉普鲁兰酶 TsiApu 即属于 GH57 家族 TAPU。分析可知, 目前 TAPU 来源微生物主要为耐高温古菌 *Thermococcus* 和 *Pyrococcus* 两属, 以及耐高温细菌 *Thermoanaerobacter* 属。

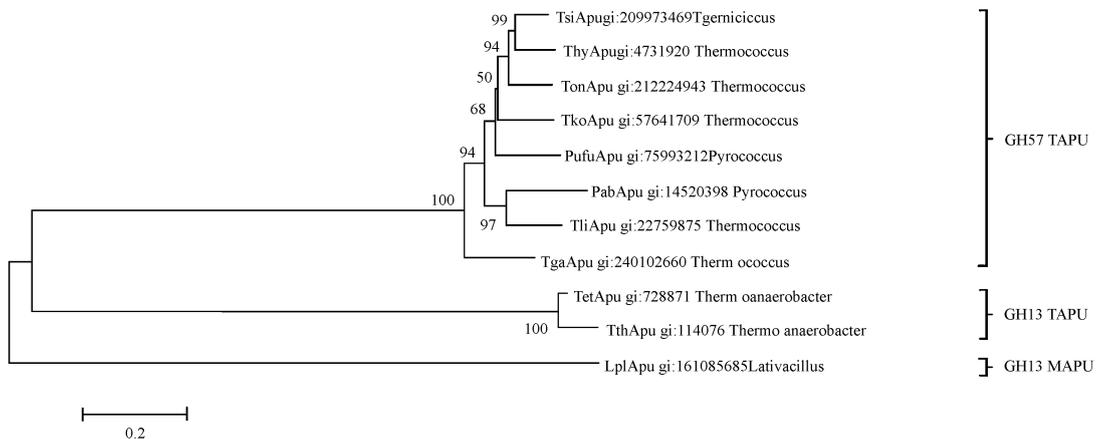


图 1 淀粉普鲁兰酶分子进化树系分析

3.2 高温淀粉普鲁兰酶 TsiApu 结构域分析

在线软件分析结果如图 2 示。TsiApu 蛋白由 1351 个氨基酸组成, 其 N 端多结构域与保守的蛋白聚簇 COG1449(α -淀粉酶/ α -甘露糖苷酶) 同源性较高 (E 值 7.96×10^{-104})。其 C 端多结构域与保守的蛋白聚

簇 COG4945 (膜结合蛋白) 同源性较高 (E 值 2.21×10^{-64})。由于 C 末端膜结合蛋白对应的多结构域不直接构成淀粉普鲁兰酶活性, 本研究中仅克隆其 N 端的水解酶功能结构域 TsiApuN (与图 2 COG1449 相对应, 共 773 个氨基酸) 并进行异源表达。

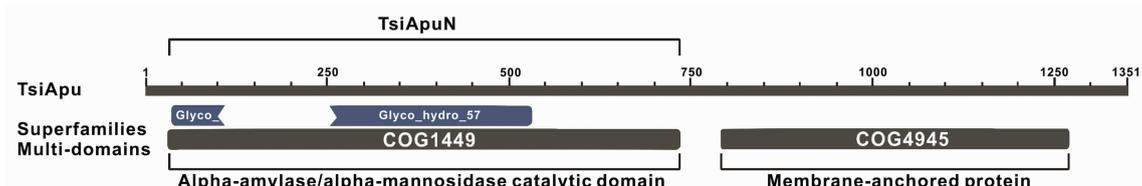


图2 高温淀粉普鲁兰酶 TsiApuN 多结构域

3.3 融合蛋白 MTsiApuN 蛋白的表达纯化

TsiApuN 蛋白的理论分子量约为 89 kDa, 在其 N 端与 pMal-c2x 载体上的麦芽糖结合蛋白 (MalE) 融合, 形成的融合蛋白 (MTsiApuN) 理论分子量约为 131 kDa。SDS-PAGE 分析表明表达的融合蛋白 MTsiApuN 分子量与理论相符 (如图 3)。纯化的 MTsiApuN 蛋白浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 。

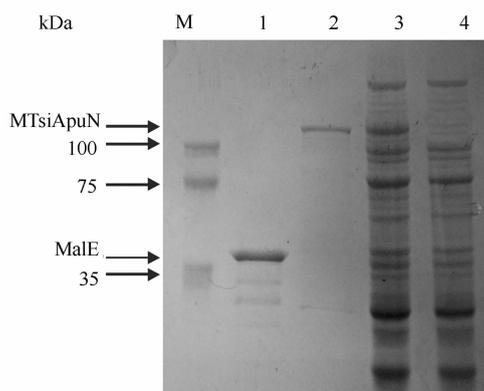


图3 MTsiApuN 蛋白表达和纯化的 SDS-PAGE 电泳分析

M: 分子量标记; 1: MalE 蛋白; 2: 纯化的 MTsiApuN 融合蛋白; 3: 经诱导表达的宿主菌 *E. coli* BL21 细胞粗提物; 4: 未经诱导表达的宿主菌 *E. coli* BL21 细胞粗提物

3.4 MTsiApuN 酶活性测定

3.4.1 α -淀粉酶和普鲁兰酶活性最适温度、最适 pH

MTsiApuN 的淀粉酶和普鲁兰酶活性最适温度均为 100°C (图 4a)。淀粉酶和普鲁兰酶活性最适 pH 值分别为 5.0 和 6.0 (图 4b)。70~ 100°C 间普鲁兰酶活性高于淀粉酶活性, $100\sim 120^\circ\text{C}$ 之间二者酶活接近, 120°C 时二者的相对酶活均为 0%。

3.4.2 MTsiApuN 的热稳定性和 pH 稳定性

MTsiApuN 中两种酶活力的热稳定性相同, 在 $80, 90, 100, 110^\circ\text{C}$ 下保温 1 h 后, 相对总酶活力分别为 99%, 95%, 89%, 56%。在以上各温度保温 5 h 后, 相对酶活分别为 86%, 75%, 57%, 0% (如图 5a 所示)。MTsiApuN 在 100°C , pH4~9 共 11 个 pH 值下保温 4 h 后分别在 100°C , pH 5.0 条件下测定淀粉酶相对酶活和 100°C , pH6.0 条件下测定普鲁兰酶相对酶活。在 pH5.5 保温 4 h 后淀粉酶相对酶活为最大值 95%, 在 pH 6.5 保温 4 h 后普鲁兰酶酶活为最大值 92%。在 pH 5.5~6.5 之间, 两种酶活性的相对酶活均在 50% 以上。和 TAPU ThyApu (*Thermococcus hydrothermalis*) 的酶性质相比, MTsiApuN 具有较高的 α -淀粉酶活力, 如表 1 示。

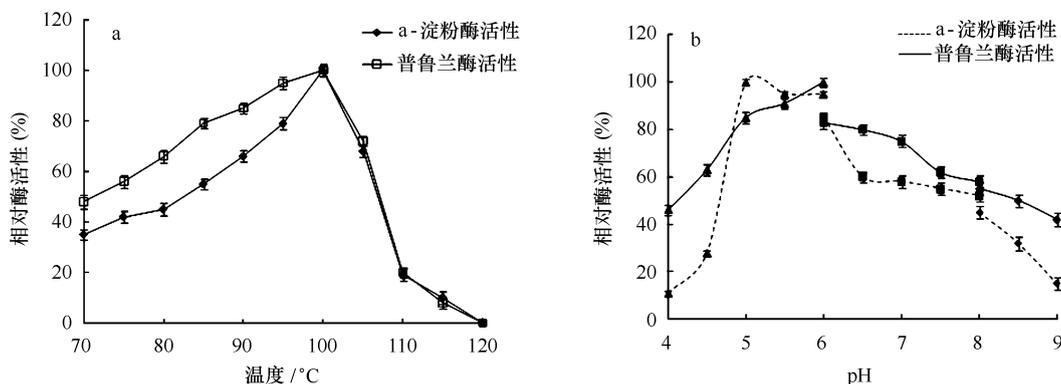


图4 融合蛋白 MTsiApuN 两种酶活性的最适温度和最适 pH

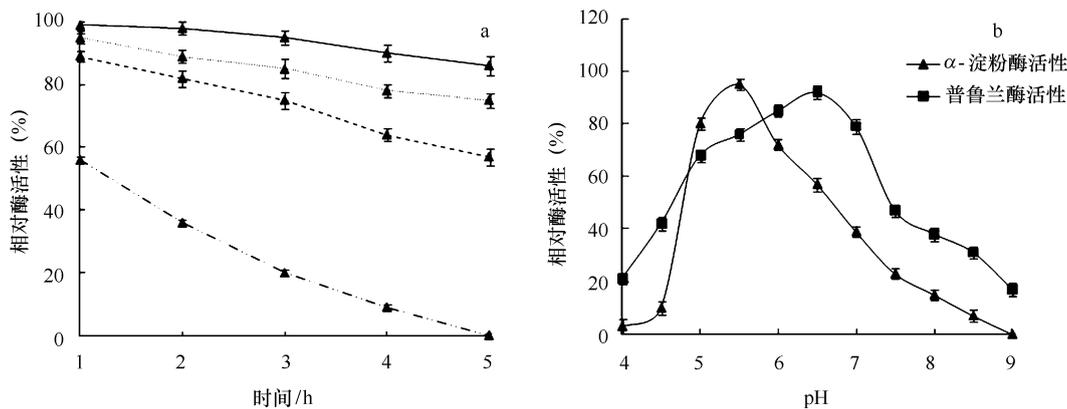


图5 融合蛋白 MTsiApuN 两种酶活性的热稳定性和 pH 稳定性

a 中:—为 80 °C,···为 90 °C,--为 100 °C,-·-·-为 110 °C

表1 MTsiApuN 和 ThyApu(*Thermococcus hydrothermalis*)^[7] 酶性质的比较

酶性质	MTsiApuN	ThyApu
普鲁兰酶比活力/ $U \cdot mg^{-1}$	11.5	10.5
α -淀粉酶比活力/ $U \cdot mg^{-1}$	6.5	1.6
α -淀粉酶最适温度/ $^{\circ}C$	100	105
普鲁兰酶最适温度/ $^{\circ}C$	100	105
α -淀粉酶最适 pH	5	5
普鲁兰酶最适 pH	6	4.75
Ca^{2+} 浓度/ $mmol \cdot dm^{-3}$	0	0.09

4 讨论

TAPU 的研究到现在不足 20 a,但是和其它淀粉水解酶相比,TAPU 在工业应用中具有很强优越性。第一个报道的 GH57 家族 TAPU 发现于 1997 年,来自于嗜热古菌 *Pyrococcus furiosus*^[14]。由于极端微生物分离困难等原因,导致 TAPU 的研究相对缓慢且不够深入。国内相关研究则更鲜见报道。

该研究将嗜热古菌 *Thermococcus siculi* 菌株 HJ21 中的 TAPU 成功在大肠杆菌中进行表达。虽

然只表达出其 N 端的催化结构域,但是具有良好的耐热性和耐 pH 范围,为进一步进行工业化应用打下基础。同时也表明 TsiApu 的 C 端 578 个氨基酸构成的区域对于其两种酶活性并非必需结构,这和 Lin 等对来自于 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E 的 TAPU 的研究结果类似^[15]。本室还利用 pMal-c2x 和 pET-22b(+) 表达系统尝试在 *E. coli* BL21 及 DH5 α 菌株中进行 TsiApu 全酶的表达,但是未能成功,原因不明。相似的是,Kang 等也只表达出了 PfuApu 的 N 端区域,同样未能在大肠杆菌中表达出全酶^[16]。由于 TsiApu 是分泌性酶,根据图 2 中的同源结构域聚类分析,推测 C 端结构域可能和 TAPU 在细胞膜上的结合能力相关。

图 3 电泳分析表明 MTsiApuN 蛋白是存在于细胞内的融合蛋白,说明 TsiApuN 的信号肽序列没有被切除。这可能是由于其 N 端融合有麦芽糖结合蛋白 MalE,同时 C 端结构域缺失导致。融合蛋白 MTsiApuN 仍具有热稳定性,说明其热稳定性也可能不依赖于全酶的 C 端区域。通过表达若干 C 端区域逐渐缩短的 TAPU,并对它们的热稳定性和酶活性进行比较,可以进一步确定其热稳定性和序列之间的关系,为通过基因工程的方法提高 TAPU 热稳定性提供依据。

参考文献:

- [1] HORVÁTHOVÁ V, GODÁNY A, ŠTURDÍK E, et al. α -Amylase from *Thermococcus hydrothermalis*: Re-cloning aimed at the improved expression and hydrolysis of corn starch[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(6): 1300—1305.
- [2] WANG S, LU Z, LU M, et al. Identification of archaeon-producing hyperthermophilic alpha-amylase and characterization of the alpha-amylase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(4): 605—614.
- [3] BEN-MESSAOUD E, BEN-AMMAR Y, MELLOULI L, et al. Thermostable pullulanase type I from new isolated *Bacillus thermoleovorans*

- US105: cloning, sequencing and expression of the gene in *E. coli*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(6): 827—832.
- [4] LEVEQUE E, JANE ČEK Š, HAYE B, et al. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(1): 3-14.
- [5] TANIGUCHI H, HONNDA Y. Amylases. *Encyclopedia of Microbiology*[M]. Third Edition. San Diego, USA: Academic Press, 2009: 159-173.
- [6] HORVÁTHOVÁ V, GODÁNY A, ŠTURDIK E, et al. α -amylase from *Thermococcus hydrothermalis*: Re-cloning aimed at the improved expression and hydrolysis of corn starch[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(6): 1300—1305.
- [7] ERRA-PUJADA M, CHANG-PI-HIN F, DEBEIRE P, et al. Purification and properties of the catalytic domain of the thermostable pullulanase type II from *Thermococcus hydrothermalis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(16): 1273—1277.
- [8] HORVÁTHOVÁ V, JANE ČEK Š, ŠTURDIK E. Amylolytic Enzymes: Molecular Aspects of Their Properties[J]. *General Physiology and Biophysics*, 2001, 20(1): 7—32.
- [9] ZONA R, CHANG-PI-HIN F, ODOHUE M J, et al. Bioinformatics of the glycoside hydrolase family 57 and identification of catalytic residues in amylopullulanase from *Thermococcus hydrothermalis*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(14): 2863—2872.
- [10] 王淑军, 吕明生, 李华钟, 等. 深海古菌 *Thermococcus siculi* HJ21 高温普鲁兰酶基因的克隆及表达[J]. *食品科学*, 2010, 31(19): 309—312
- [11] MONGAY F C, MARTIN V C. Preparation d'un tampon universel de force ionique 0,3 M[J]. *Talanta*, 1977, 24(12): 747—748.
- [12] KIM JH, SUNAKO M, ONO H. Characterization of Gene Encoding Amylopullulanase from Plant-Originated Lactic Acid Bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(5): 449—459.
- [13] CANTAREL B L, COUTINHO P M, RANCUREL C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue): D233—238.
- [14] DONG G, VIEILLE C, ZEIKUS J G. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3577—3584.
- [15] LIN H Y, CHUANG H H, LIN F P. Biochemical characterization of engineered amylopullulanase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E-implicating the non-necessity of its 100 C-terminal amino acid residues[J]. *Extremophiles*, 2008, 12(5): 641—650.
- [16] KANG S, VIEILLE C, ZEIKUS J G. Identification of *Pyrococcus furiosus* amylopullulanase catalytic residues[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 66(4): 408—413.

Heterologous expression of a deep-sea thermostable amylopullulanase and enzymatic activity analysis of the fusion protein

JIAO Yu-liang¹, WANG Shu-jun¹, LU Ming-sheng¹, FANG Yao-wei¹, LIU Shu¹

(1. College of Food Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Molecular phylogenetic tree analysis on a thermostable amylopullulanase in an Archaeon strain *Thermococcus siculi* HJ21 isolated from a deep-sea hydrothermal vents was performed based on experimental enzymatic analysis and amino acid sequences of amylopullulanases deposited in GenBank. The N-terminal catalytic region of the amylopullulanase was heterologously expressed in *E. coli* through pMal-c2x expression system, resulting a fusion protein in which there is a maltose binding protein fused to the N-terminus of the N-terminal catalytic region of the amylopullulanase. Alpha-amylase and pullulanase activities of the fusion protein were experimentally analyzed. The optimal temperatures of the two activities were both at 100 °C. The optimal pHs of amylase and pullulanase activities were at 5 and 6 respectively. The specific activities of the amylase and pullulanase activities were 6.5 and 11.5 U/mg respectively. The results showed that α -amylase activity was lower than pullulanase activity and the C-terminal region of the thermostable amylopullulanase was non-necessary for the enzymatic activities. The thermostable amylopullulanase fusion protein obtained in this study could be further used for combination with thermostable amylases in the sugar industry.

Key words: thermostable amylopullulanase; heterologous expression; enzymatic analysis