

# 嗜盐古菌 *Halorubrum* sp. CY 的分离、 鉴定及胞外淀粉酶特性初步研究

陈绍兴<sup>1\*</sup> 刘朝茂<sup>1</sup> 杨建<sup>1</sup> 刘晔<sup>1</sup> 邱成书<sup>1</sup> 谢志雄<sup>2</sup>

(1. 红河学院 生命科学与技术学院 云南 蒙自 661100)

(2. 武汉大学 生命科学学院 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 本研究从云南一平浪盐矿分离到一株产胞外淀粉酶的嗜盐古菌, 通过形态观察, 生理生化特性实验, 并结合 16S rRNA 序列分析, 初步鉴定为嗜盐古菌 *Halorubrum* 属, 命名为 *Halorubrum* sp. CY。另外对该菌产生的胞外淀粉酶的性质进行初步研究, 结果显示其胞外淀粉酶发挥最大活性的 pH 值和温度分别为 6.0 和 60°C,  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $SO_3^{2-}$  对胞外淀粉酶的活性有抑制作用, 而  $Mn^{2+}$  则有促进作用。

**关键词:** 嗜盐古菌, *Halorubrum*, 胞外淀粉酶, 分离鉴定

## Identification of *Halorubrum* sp. CY Strain and Primary Study on the Basic Characteristics of Extracellular Amylase

CHEN Shao-Xing<sup>1\*</sup> LIU Chao-Mao<sup>1</sup> YANG Jian<sup>1</sup> LIU Ye<sup>1</sup> QIU Cheng-Shu<sup>1</sup> XIE Zhi-Xiong<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Honghe University, Mengzi, Yunnan 661100, China)

(2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

**Abstract:** An extracellular amylase production extremely halophilic archaen was isolated from a salt ore of Yipinglang of Yunnan province. Based on the morphology, characteristics of biologic and chemical and analyzing of 16S rRNA sequence, the strain was identified as genus of *Halorubrum*, and named *Halorubrum* sp. CY. The rude characteristics of the extracellular amylase determined. It had optimal activity at pH 6.0 and 60°C.  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $SO_3^{2-}$  could promoted the activity of amylase and  $Mn^{2+}$  might inhibit the activity of extracellular amylase.

**Keywords:** Archaeon, *Halorubrum*, Extracellular amylase, Isolation and identification

嗜盐古菌是指在高盐浓度条件下生长的细菌<sup>[1]</sup>。其在盐浓度 15%~30% 的介质中能良好生长, 最适生长盐浓度为 20%~25%, 在饱和盐浓度中仍能生长<sup>[2]</sup>。极端嗜盐古菌生活于盐湖、盐田及盐腌制品的表面, 当盐浓度低于 10% 时则不能正常生长<sup>[3,4]</sup>。

淀粉酶可将淀粉水解成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖和其它的寡糖<sup>[5]</sup>。淀粉酶应用前景广泛, 已被应用于焙烤工业<sup>[6]</sup>、淀粉工业<sup>[7]</sup>、纺织退浆<sup>[8]</sup>、造纸<sup>[9]</sup>、清洁剂<sup>[10]</sup>、啤酒酿造<sup>[11]</sup>和酒精工业<sup>[12]</sup>等领域。极端嗜盐古菌产淀粉酶的报道不多。1970 年 Good

等<sup>[13]</sup>第一个报道了极端嗜盐古菌淀粉酶; 1996年詹谷宇等<sup>[14]</sup>报道了碱性嗜盐菌 *Halobacterium* sp. H2371 产生的淀粉酶; 2004年许晨等<sup>[15]</sup>人报道了嗜盐菌 *Haloflex mediterranei* R4 的胞外淀粉酶研究。

本研究从云南省一平浪盐矿采集盐矿样品, 用富集培养基从中分离出一株产胞外淀粉酶的极端嗜盐古菌。通过 16S rRNA 序列分析并结合生理生化特性研究, 可以确定为 *Halorubrum* 属, 因此命名为 *Halorubrum* sp. CY, 以下简称 CY。采用史永昶的改良法<sup>[16]</sup>研究 CY 所产胞外淀粉酶的最适反应 pH 值、温度、以及不同离子浓度及 EDTA 对该酶活性的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

分离自云南省一平浪矿区, 本实验室鉴定并保存。

### 1.2 培养基及培养条件

Offner<sup>[17]</sup>嗜盐菌富集培养基(g/L): NaCl 175, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 37, KCl 3.7, Tryptone 5, Yeast extract 3, Tris-Cl (1 mol/L, pH 7.2) 25 mL, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (10%) 5 mL, MnCl<sub>2</sub> (100 mmol/L) 17 μL。固体培养基加 2% 琼脂。1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

富集培养: 40°C、180 r/min, 培养 1 周。

### 1.3 形态观察及生理生化特性

嗜盐平板接种 *Halorubrum* sp. CY, 40°C 培养 1 周, 观察菌落形态。参照文献<sup>[18]</sup>对其生理生化特性进行研究。

### 1.4 16S rRNA 序列分析

引物设计参照文献<sup>[19]</sup>: F1: 5'-ATTCCGGTTGATCCTGC-3'; R1: 5'-TTTAAGTTTCATCCTTG-3'; F1/R1 扩增 1 bp~859 bp; F2: 5'-AACCGGATTAGATACCC-3'; R2: 5'-GTGATCCAGCCGCAGATTCC-3'; F2/R2 扩增 723 bp~1472 bp。PCR(DTC-PCR 仪由西安天隆科技提供)反应程序: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 2 min, 72°C 1 min; 30 个循环; 72°C 15 min。PCR 产物用 Tiangen 凝胶回收试剂盒回收, pMD-18T (购自 TaKaRa) 克隆, 测序结果拼接(上海生物工程有限公司)。将测得的序列在 NCBI 的核酸数据库中进行 Blast 搜索与其相似性最高的序列, 采用 MEGA 4.0 软件进行同源性分析和系统进化树的构建。

### 1.5 胞外淀粉酶活性的平板检测

从嗜盐固体平板上挑取 CY 菌株单个菌落, 接种

到含有 0.5% 可溶性淀粉的嗜盐固体培养基上, 40°C 倒置培养 1 周, 用 0.4 mol/L 卢戈氏碘液(KI-I<sub>2</sub>)喷洒, 观察透明直径的大小。

### 1.6 胞外淀粉酶活性测定

**1.6.1 淀粉酶活性测定方法:** 采用史永昶的改良法<sup>[16]</sup>, 反应体系为 5 mL 0.5% 淀粉中加入 0.5 mL 淀粉酶, 在 pH 6.0、60°C 下反应 5 min, 加 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mL 终止反应, 取 0.5 mL 反应液, 加入 5 mL 0.4 mmol/L 卢戈氏碘液(KI-I<sub>2</sub>)溶液显色, 620 nm 下测定光密度。1 个活力单位定义为 5 min 内水解 1 mg 淀粉的酶量。

**1.6.2 胞外淀粉酶最适 pH 值、温度测定:** 采用史永昶<sup>[16]</sup>和 Yoo<sup>[20]</sup>的方法, 根据文献提供的反应 pH 值, 温度不变, 重新设置 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 等 5 个 pH 值梯度; 另外, pH 值不变, 将温度设置为 35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C 等 9 个温度梯度, 分别测定相对的淀粉酶反应活性。

**1.6.3 金属离子及 EDTA 对初酶活性的影响:** 分别配制含有不同离子(Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、Fe<sup>3+</sup>)和 EDTA 浓度的 0.5% 淀粉溶液。配成 5 个浓度, 分别为 10 mmol/L、20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L 和 50 mmol/L; 采用上一步实验确定的最适 pH 值和温度, 测定金属离子和 EDTA 对淀粉酶初酶活性的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落形态观察

如图 1A 所示, CY 在嗜盐平板上的菌落呈典型的橙红色, 形态呈圆形, 凸起, 菌落表面湿润, 不透明, 有光泽, 容易挑起等特点。革兰氏染色<sup>[21]</sup>, 油镜

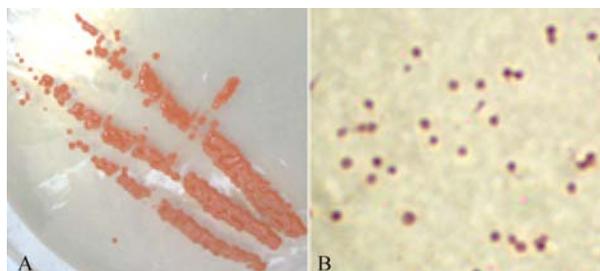


图 1 菌落形态观察

Fig. 1 Morphology of CY

注: A: 菌落形态; B: 革兰氏染色观察。

Note: A: Colony of CY; B: Gram staining.

显微观察,如图 1B 所示, CY 为革兰氏阴性,呈球形或椭圆形。从 CY 在嗜盐平板上的菌落形态结果,推测 *Halorubrum* sp. CY 没有鞭毛,不能运动。

## 2.2 生理生化特性

参照《伯杰氏细菌学鉴定手册》(第八版)第 7 部分(革兰氏阴性好氧杆菌和球菌), CY 与盐球菌属极端嗜盐古菌的特性很相近。如表 1 所示, *Halorubrum* sp. CY 最适生长的盐浓度、pH 值和温度分别为 19%~20%、7.0~7.2 和 38°C~40°C, 并且生长需要  $Mg^{2+}$ 。表 2 所示为 *Halorubrum* sp. CY 的详细生理生化特征。

## 2.3 16S rRNA 序列同源性分析

由于 16S rRNA 在不同生物间的高度保守性, 16S rRNA 序列同源性分析在细菌的鉴定中已被广泛的采用和接受。通过 PCR 扩增, 凝胶回收, pMD-18T 载体连接转化, 上海生工测序及序列拼接。获得 1470 bp 长度的 16S rRNA 序列, Blast

结果与 *Halorubrum* 属的 *Halorubrum litoreum* 的序列同源性达到 99%, 由此鉴定为 *Halorubrum*。并且

表 1 *Halorubrum* sp. CY 的基本特性  
Table 1 Basic characteristics of *Halorubrum* sp. CY

特征 Characteristics	范围 Range
最适生长 NaCl 浓度 Optimum NaCl concentration	19%~20%
生长 NaCl 范围 NaCl Range for growth	11%~34%
最适生长 pH 值 Optimum pH	7.0~7.2
生长 pH 值范围 pH range for growth	6.4~7.4
最适生长温度 Optimum temperature	38°C~40°C
生长温度范围 Temperature for growth	22°C~55°C
需求 $Mg^{2+}$ 浓度 $Mg^{2+}$ required concentration	0.005 mol/L

表 2 *Halorubrum* sp. CY 的生理生化特征

Table 2 Characteristics of physiology and chemistry of *Halorubrum* sp. CY

特征 Characteristics	结果 Results	特征 Characteristics	结果 Results
胞外蛋白酶活性 Extracellular protease	-	阿拉伯糖 D-Arabinose	-
脲酶 Urease	-	果糖 Fructose	+
氧化酶 Oxidase	+	甘氨酸 Glycine	+
过氧化氢酶 Catalase	+	丙氨酸 Alanine	+
硝酸盐还原 Reduction of nitrate	+ -	丝氨酸 Serine	+
土温-80 Hydrolysis of Tween-80	+	半胱氨酸 Cysteine	-
液化 Casein Hydrolysis of Casein	-	苏氨酸 Threonine	-
明胶液化 Hydrolysis of gelatin	-	缬氨酸 Valine	-
产酸 Production of acid	+ -	亮氨酸 Leucine	+
产气 Production of gas	+ -	异亮氨酸 Isoleucine	-
产 $H_2S$ Production of $H_2S$	+	苯丙氨酸 Phenylalanine	-
V-PV 实验 V-P Test	+	色氨酸 Tryptophan	-
厌氧生长 Anaerobic growth	-	酪氨酸 Tyrosine	+
添加 Arg 厌氧生长 Anaerobic growth with L-Arg	+	天冬氨酸 Aspartate	-
甘露糖 D-Mannose	-	天冬酰胺 Asparaginase	+
乳糖 Lactose	-	谷氨酸 Glutamate	-
葡萄糖 Glucose	+	谷氨酰胺 Glutamine	-
木糖 D-Xylose	-	赖氨酸 Lysine	+
半乳糖 D-Galactose	+	精氨酸 Arginine	-
核糖 D-Ribose	-	组氨酸 Histidine	-
麦芽糖 Maltose	+	甲硫氨酸 Methionine	-
蔗糖 Sucrose	+	脯氨酸 Proline	-

注: +: 阳性; + -: 阳性不显著; -: 阴性。

Notes: +: Positive; + -: Positive but not obviously; -: Negative.

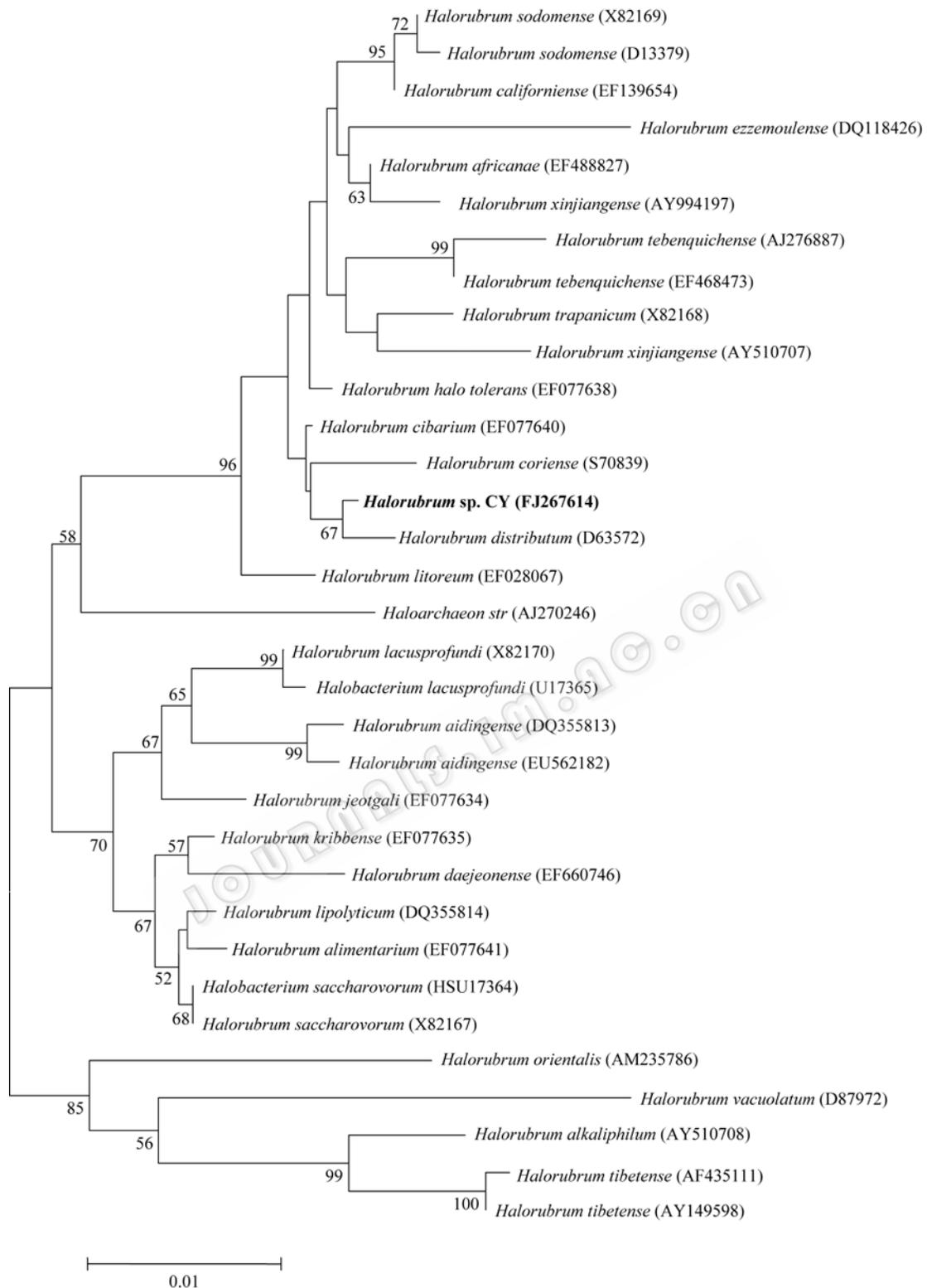


图 2 基于 16S rRNA 序列采用邻接法构建菌株 CY 和 *Halorubrum* 属相关菌株系统发育树状图

Fig. 2 Neighbor-joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among CY and other related *Halorubrum* strains based on 16S rRNA gene sequence

Note: The sequence data used were obtained from GenBank database (accession numbers are given in parentheses). Numerals on branches are the supporting percentage (>50%) by 1000 replicate. Bar, 1 nucleotide substitution per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.

已将 *Halorubrum* sp. CY 的 16S rRNA 序列提交给 GenBank 数据库, 其登录号为 FJ267614。

#### 2.4 系统发育树的构建

将 16S rRNA 基因序列利用 Blast 软件进行序列同源性比对, 结果表明, 其序列与 *Halorubrum litoreum* 和 *Halorubrum xinjiangense* 序列相似性最高, 同源性分别达到 99% 和 98%, 鉴定为 *Halorubrum*。显示同源采用 MEGA 4.0 软件的 Neighbor-joining 方法构建系统发育树, 除去 50% 以下可信度(图 2)。由图 2 可知, *Halorubrum* sp. CY 与 *Halorubrum distributum* 的亲缘关系最近, 而不是 *Halorubrum litoreum*, 这与 GenBank 比对的结果不同, 这是由于 Blast 比对时取的是序列的全长, 而 MEGA 4.0 软件做系统发育树时会去掉某些序列两端的片段, 使参与排序比对的片段长度相同<sup>[22]</sup>。16S rRNA 序列中作为鉴定依据的是其可变区, 因此删去序列两端保守区的一些小片段不会影响结果, 所以用 MEGA 4.0 软件做得系统发育树是可信的。

#### 2.5 胞外淀粉酶平板检测

参照文献[15], 检测 CY 产胞外淀粉酶的情况, 结果如图 3 所示。卢戈氏碘液喷洒于含 0.5% 可溶性淀粉的嗜盐固体平板上, 有淀粉存在的部分显示蓝色, 淀粉被降解的部分显示无色。在 *Halorubrum* sp. CY 周围有一个明显的无色透明圈, 这说明, 嗜盐古菌 CY 产生的胞外淀粉酶将菌落周围培养基中的淀粉降解, 无碘与淀粉反应, 故呈无色。从而说明极端嗜盐古菌 CY 可以产生胞外淀粉酶。菌落周围无色透明圈的直径反应了该菌产胞外淀粉酶的能力: 无色透明圈的直径越大, 说明产胞外淀粉酶的能力越强, 反之越小。

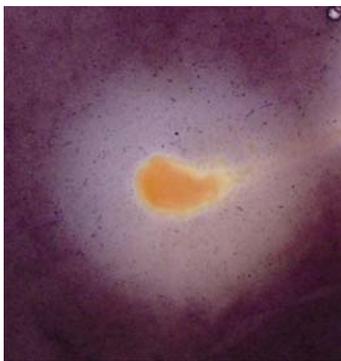


图 3 *Halorubrum* sp. CY 产胞外淀粉酶平板检测  
Fig. 3 Production of  $\alpha$ -amylase of *Halorubrum* sp. CY

#### 2.6 胞外淀粉酶最适 pH 值、温度

采用史永昶<sup>[16]</sup>和 Yoo<sup>[20]</sup>的方法, 结果如图 4 所示, 淀粉酶在环境 pH 值约为 6.0 时发挥最大酶活性; 如图 5 所示, 淀粉酶在温度为 60°C 时酶活力最大。*Halorubrum* sp. CY 的淀粉酶发挥最大活力的生理条件与其最适生长 pH 值及温度有较大的差异, 最适生长的 pH 值和温度范围分别为 6.4~7.2 和 38°C~40°C, 这种现象普遍存在, 这是酶自身的性质决定的, 与该酶的来源没有直接或必然的联系。

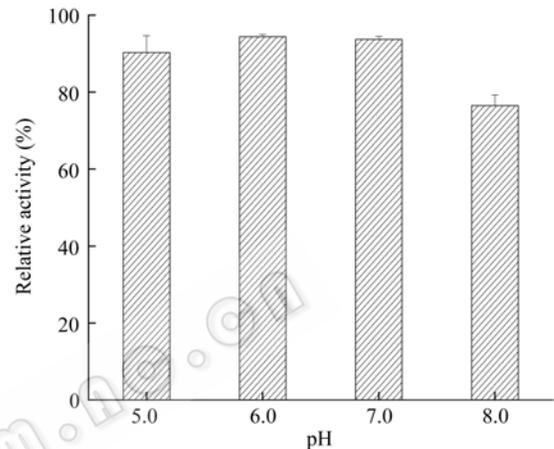


图 4 pH 值对胞外淀粉酶的影响  
Fig. 4 Influence of pH to amylase

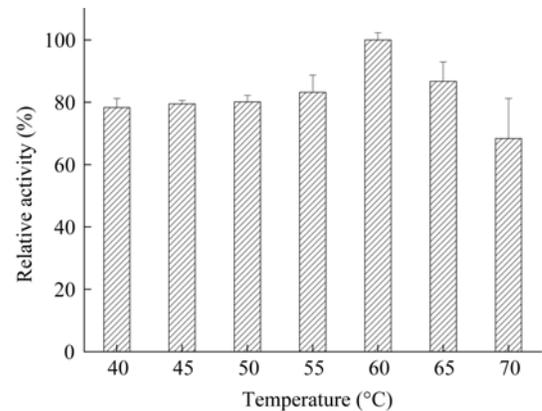


图 5 温度对胞外淀粉酶的影响  
Fig. 5 Influence of temperature to amylase

#### 2.7 金属离子和 EDTA 对淀粉酶活性的影响

将淀粉酶在 pH 值为 6.0、温度为 60°C 时显示的相对酶活力定义为 100%, 在不同浓度各种金属离子作用下, 如果该金属离子对酶活力有促进作用, 则酶活力可以超过 100%, 如果有抑制作用, 则相应的酶活力应小于 100%, 如果等于或接近 100% 则表

明该离子对淀粉酶的活力没有太大的影响。如图 6A 所示,  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $SO_3^{2-}$ 对淀粉酶的活性均有抑制作用, 其中以 $SO_3^{2-}$ 的抑制作用最强, 而 $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 和EDTA对淀粉酶的活性基本没有影响, 虽然从 10 mmol/L到 20 mmol/L有所差异, 但不影响整个曲线的大致取向(图 6B); 只有 $Mn^{2+}$ 可以促进淀粉酶的活性, 并且效果较为明显(图 6C)。

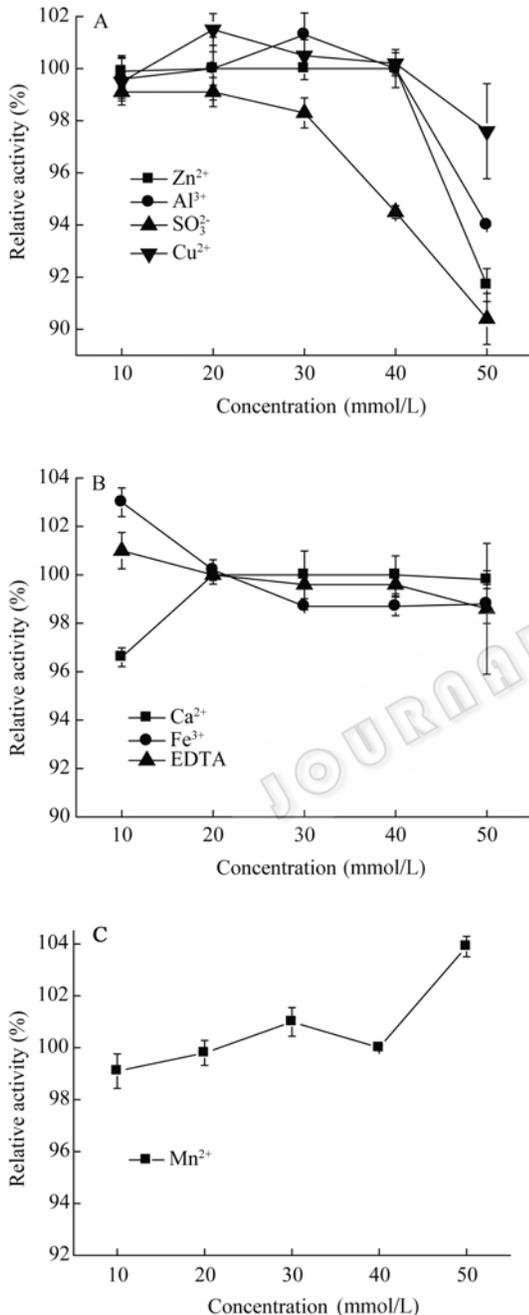


图 6 金属离子和 EDTA 对淀粉酶活性的影响

Fig. 6 Influence of metallic ion and EDTA to the activity of amylase

注: A: 抑制作用; B: 无明显作用; C: 促进作用。

Note: A: Inhibiting effect; B: No obvious effect; C: Positive effect.

### 3 讨论

本研究从云南一平浪盐矿分离到一株产胞外淀粉酶的极端嗜盐古菌, 16S rRNA 序列分析, 显示该菌与 *Halorubrum litoreum* 和 *Halorubrum xinjiangense* 序列相似性达到 99%和 98%, 结合形态观察及生理生化特性鉴定结果, 初步鉴定为嗜盐古菌 *Halorubrum*, 命名为 *Halorubrum* sp. CY。

*Halorubrum* sp. CY胞外淀粉酶发挥最大活性时的 pH 值与温度分别为 6.0 和 60°C, 这与已报道的 *Halobacterium halobium*胞外淀粉酶最大活性 pH 值与温度(6.4 和 55°C)<sup>[20]</sup>较为接近。据文献报道, 多数情况下,  $Al^{3+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $SO_3^{2-}$ 、 $Cu^{2+}$ 和 EDTA 对淀粉酶的活性具有抑制作用<sup>[23]</sup>, 而本研究结果显示, 除了  $Fe^{3+}$ 与 EDTA 对淀粉酶活性的抑制作用不明显外,  $Al^{3+}$ 、 $SO_3^{2-}$ 、 $Cu^{2+}$ 对淀粉酶的活性有较强的抑制作用, 特别是 $SO_3^{2-}$ 。另有文献报道 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 对淀粉酶的活性有激活作用<sup>[17]</sup>, 而本文研究结果显示,  $Ca^{2+}$ 离子浓度在低于 20 mmol/L 时有一定的激活作用, 当浓度超过 20 mmol/L 时不表现激活作用;  $Zn^{2+}$ 在浓度低于 40 mmol/L 时没有明显的激活功能, 在浓度超过 40 mmol/L 时表现抑制作用; 表现激活作用较明显、稳定的只有  $Mn^{2+}$ 。以上结果说明 *Halorubrum* sp. CY 的胞外淀粉酶与传统的淀粉酶在性质上有很大的相似性, 同时也存在一些新的性质。结构决定性质, 因此推测嗜盐古菌胞外淀粉酶与普通的淀粉酶在结构上存在着差异, 嗜盐古菌胞外淀粉酶在新的领域可能有较大的应用前景, 同时也为淀粉酶新作用机制的研究提供材料。

### 参考文献

- [1] 吕爱军, 胡 斌, 温洪宇, 等. 极端嗜盐菌的特性及其应用前景. 微生物学杂志, 2005, 25(2): 65-68.
- [2] 唐蜀昆, 李文均, 张永光, 等. 嗜盐放线菌生物学特性初步研究. 微生物学报, 2003, 30(4): 15-19.
- [3] 安立超, 严学亿, 胡 磊, 等. 嗜盐菌的特性与高盐废水生物处理的进展. 环境污染与防治, 2002, 24(5): 293-296.
- [4] 陈绍兴, 梁 敏, 费宗伟, 等. 测定极端嗜盐古菌保持完整细胞形态最低 NaCl 浓度研究方法探析. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1332-1334.
- [5] 田新玉, 马延和. 嗜碱菌碱性淀粉酶的研究. 微生物学

- 报, 1991, 31(5): 364-370.
- [6] 汪 钊, 郑裕国, 叶月恒. 真菌  $\alpha$ -淀粉酶应用于面包生产的研究. 食品科学, 1998, 7(19): 29-32.
- [7] Bayramoglu G, Yilmaz M, Arica MY. Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chemistry*, 2004, 4(84): 591-599.
- [8] 吕 晶, 陈水林. 酶及其在纺织加工中的应用. 纺织学报, 2002, 2(23): 155-157.
- [9] 罗志刚, 杨景峰, 罗发兴.  $\alpha$ -淀粉酶的性质及应用. 食品研究与开发, 2007, 28(8): 163-167.
- [10] Van Ee JH, van Rijswijk WC, Bollier M. Enzymatic automated dishwash detergents. *Chim Oggi*, 1992, 10(1): 21-24.
- [11] 汪建国. 酶制剂在酿造行业应用的研究及其发展前景. 中国酿造, 2004, 1(1): 1-4.
- [12] 马福强. 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶在酒精生产中的应用. 酿酒科技, 2001, 3(1): 42-43.
- [13] Good WA, Hartan PA. Properties of the Amylase from *Halobacterium halobium*. *Journal of Bacteriology*, 1970, 104(1): 601-603.
- [14] 詹谷宇, 党 永. 嗜盐菌碱性淀粉酶特性研究. 西安交通大学学报. 1996, 30(2): 94-99.
- [15] 许 晨, 王奕众, 崔寒冰, 等. 嗜盐菌 *Haloferax mediterranei* R4 胞外淀粉酶的研究. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(4): 32-35.
- [16] 史永昶, 姜涌明. 五种  $\alpha$ -淀粉酶测活方法的比较研究. 微生物学通报, 1996, 23(6): 371-373.
- [17] Offner S. Functional stuides of the *gvpACNO* operon of *Halobacterium salinarium* reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(5): 2071-2078.
- [18] Lingfei Hu, Hailian Pan, Yanfen Xue, et al. *Halorubrum luteum* sp. nov., isolated from Lake Chagannor, Inner Mongolia, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58(7): 1705-1708.
- [19] Kunio Ihara, Satoshi Watanabe, Takeshi Tamura. *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic archaea collected in Argentina. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(1): 73-77.
- [20] Yoo YJ, Hong J, Hatch RT. Comparison of  $\alpha$ -amylase activities from different assay methods. *Biotechnol Bioengineer*, 1987, 30(1): 147-151.
- [21] Dussault HP. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J Biol Chem*, 1955, 70(4): 484-485.
- [22] 刘 株, 华 颖, 江 波, 等. 一株纤维蛋白溶解酶产生菌的鉴定及其产酶条件初步研究. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1420-1425.
- [23] Mohsen FN, Dileep D, Deepti D, et al. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ - amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41(22): 349-354.

## 征订启事

## 2009 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量