

一株产 α -淀粉酶芽孢杆菌的分离 及产酶条件的优化*

依妮皮姑丽·麦麦提依明, 艾麦尔江·麦提库尔班, 阿依安·布胡达西,
迪力木拉提·木合塔尔, 迪丽拜尔·托乎提
(新疆师范大学生命科学学院极端环境微生物多样性实验室, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 以筛选与鉴定尉犁县黑湖产淀粉酶细菌, 并对筛选出的细菌进行产酶条件优化为研究目的, 从43株细菌中筛选出淀粉酶高产菌株 HM-22, 并对其进行了菌株形态学鉴定、16S rDNA 分子鉴定以及产酶条件优化。从尉犁县黑湖采样的30个水、土和泥样样品中分离筛选43株细菌, 从中筛选出14株产淀粉酶的菌株, 采用 Yoo 改良法对产透明圈较大的菌株进行酶活力测定, 从中筛选出了一株产酶活性较高的菌株 HM-22。经革兰氏染色、菌落形态观察、生理生化检测和16S rDNA 序列比对鉴定该菌与 *Bacillus tequilensis* 的相似性为99.8%, 属于芽孢杆菌属。对菌株 HM-22 产酶条件进行初步优化确定其产酶的最佳条件是: 该菌产淀粉酶最适温度为40℃, 最适碳源为可溶性淀粉, 最适氮源为牛肉膏, 最适反应 pH 为6.0, 最适产酶培养时间为24 h。优化后菌株 HM-22 的酶活力从最初的的酶活力 122.45 U/mL 达到 147.53 U/mL, 酶活力提高了17%。该研究为从新疆盐湖细菌中筛选淀粉酶活力较高的菌种资源及应用提供了理论依据和参考。

关键词: 尉犁县黑湖; 芽孢杆菌; α -淀粉酶; 酶活力测定; 产酶条件优化

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2017) 04-0126-07

Isolation of an α -amylase producing *Bacillus* and optimization of its fermentation conditions

MEMETIMIN Henipigul, METQURBAN Emerjan, BUGHDASH Ayan,
MUHTAR Dilmurat, TOHTY Dilbar

(School of Life Science, Xinjing Normal University, Urumqi 830054, China)

Abstract: The purpose of the study is to screen and identify amylase producing bacteria in the Black Lake in Yuli county, and to optimize the conditions of enzyme production. A high amylase producing strain HM-22 was screened from 43 strains of bacteria, has carried out morphological identification, molecular identification of 16S rDNA and optimization of enzyme production conditions were carried out. 43 strains of bacteria were isolated from 30 water, soil and mud samples in the Black Lake in Yuli County, and 14 strains producing amylase were screened out. The enzyme activity was determined by Yoo method, a strain with high enzyme activity was obtained and named as HM-22. By gram staining, colony morphology observation, physiological and biochemical tests, 16S rDNA sequence alignment and the similarity of *Bacillus tequilensis* was 99.8%, belonging to the genus *Bacillus*. The optimization of enzyme

* 收稿日期: 2016-09-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31260002)

作者简介: 依妮皮姑丽·麦麦提依明 (1988年生), 女; 研究方向: 极端环境微生物; E-mail: 13669958015@163.com

通信作者: 迪丽拜尔·托乎提 (1960年生), 女; 研究方向: 极端环境微生物; E-mail: dilbar.th@163.com

production conditions of strain HM-22 was determined and the best condition for producing the enzyme is: the optimum temperature of amylase production was 40 °C, the optimal carbon source is soluble starch, the optimal nitrogen source was beef extract, the optimum reaction pH was 6.0, the optimum culture time was 24 h. After optimization, the enzyme activity of strain HM-22 reached 147.53 U/mL from the initial activity of 122.45 U/mL, enzyme activity increased by 17%. The study provides a theoretical basis and reference for the screening of strains with high amylase activity in Xinjiang salt lake bacteria

Key words: Black Lake in Yuli County; *Bacillus*; alpha-amylase; enzyme activity determination; optimization of enzyme production conditions

α -淀粉酶能分解淀粉为糊精、低聚糖和单糖类^[1]。 α -淀粉酶广泛存在于动物、植物和微生物中^[2],在工业生产中的应用很广泛^[3],是最早用于工业生产并且迄今仍用途最广、产量最大的酶制剂之一^[4],在洗涤剂工业、医药卫生、粮食加工、食品工业、酿造、发酵和纺织品工业等行业中都有非常重要的应用^[5-6]。1894年,从真菌中鉴定和分离出淀粉酶,并用于酶制剂和添加剂中。之后,淀粉酶得到了广泛的应用,并吸引了研究人员的关注^[7]。微生物优选为淀粉酶的生产者,原因是与其他生产者植物和动物相比,其有易处理、易培养和成本少的优点^[8-9]。自然界有许多微生物都能够产淀粉酶,如根霉、曲霉、芽孢杆菌等^[10]。目前,已报道的能够产生淀粉酶的微生物种属有不动杆菌属 *Acinetobacter*、微球菌属 *Micrococcus*、黄隐球酵母 *Cryptococcus flavus*、盐单胞菌属 *Halomonas meridiana*、青霉菌属 *Penicillium*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、链霉菌属 *Streptomyces*、假单胞菌属 *Pseudomonas* 和杆菌属 *Bacillus* 等^[11-13]。淀粉酶的生产主要依靠微生物发酵,国外的研究已经达到了产 α -淀粉酶的调控基因的水平,还研究了与这些相关的基因克隆及转导,转化等技术。把芽孢杆菌重组体的基因引入生产用的菌株体内,使 α -淀粉酶的产量提高了几十倍到几百倍,为选育高产 α -淀粉酶菌株奠定了很好的基础。目前投入商业化生产的 α -淀粉酶生产菌株几乎都是从自然界分离得到的野生型菌株,因此不断从自然界中分离淀粉酶产生菌,探索并优化其最佳产酶条件有重要意义^[14]。为从新疆盐湖细菌中筛选并获得淀粉酶活力较高的菌种资源,并为其应用提供理论依据和参考,我们从新疆尉犁县黑湖采集的水、土和泥样中分离产淀粉酶的菌株,通过酶活力测定,筛选出较高活性的菌株,并进行分类鉴定,利用液体发酵法对产 α -淀粉酶培养基发酵条件进行优化研究,对其酶学特性进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 样品来源

采样地点为新疆尉犁县黑湖(86°47'40"E、41°14'09"N至86°52'10.7"E、41°13'11.7"N)。以湖心为出发点,围绕湖心按不同距离东、南、西、北方向不同深度取表层下10、20、40、60 cm深度水样、土样和泥样,水样pH为5.26~6.90,湖心周边土样pH为6.5~6.9,泥样pH为6.0~6.9,盐度为25%~28%,样品点海拔高度为853~855 m。样品装入无菌试样袋密封,保存温度4 °C。

1.2 培养基

分离和保藏培养基:可溶性淀粉2 g、酵母膏5 g、蛋白胨10 g、氯化钠10 g、蒸馏水1 000 mL,pH 7.0~7.2,固体加入15~20 g琼脂,1×10⁵ Pa灭菌30 min。

发酵培养基:可溶性淀粉2 g、酵母膏5 g、蛋白胨10 g、氯化钠10 g、蒸馏水1 000 mL,pH 7.0~7.2,1×10⁵ Pa灭菌30 min。

1.3 实验方法

1.3.1 产淀粉酶菌株的筛选 将活化的菌株点样于分离和保藏培养基平板上,4 °C恒温培养24 h左右,加入Lugol氏碘液,菌落周围出现水解透明圈的为淀粉酶阳性。牛津杯法进行复筛,即取适量菌株上清液于牛津杯淀粉酶筛选平板上,加入Lugol氏碘液,用游标卡尺测定透明圈大小。

1.3.2 菌株培养和淀粉酶的提取 以5%的接种量接种到50 mL发酵培养基中,转速180 r/min,温度37 °C,摇床培养20 h,8 000 r/min,离心15 min,取上清液为淀粉酶粗提液。

1.3.3 淀粉酶活性的测定 发酵液于4 °C、8 000 r/min冷冻离心20 min,取上清液即为粗酶液。采用Yoo改良法^[15]测定 α -淀粉酶酶活力:取1 mg/mL可溶性淀粉溶液5 mL,在37 °C水浴中预热10 min,加入1 mL磷酸氢二钾-柠檬酸缓冲液(pH 7.0),加入经适当稀释的粗酶液1 mL,37 °C

水浴振荡, 精确反应 5 min 后, 用 0.1 mol/L 硫酸 5 mL 终止反应。取 1 mL 反应液与 5 mL 稀碘液显色, 在 620 nm 处测定光密度。以 1 mL 水替 1 mL 反应液为空白, 以不加酶液 (加同体积的缓冲液) 的管为对照。酶活力根据以下公式计算:

$$\text{酶活力 (U)} = (R_0 - R) \times 50 \times D/R_0$$

式中 R_0 , R 分别表示对照液和反应液的吸光度, D 为酶的稀释倍数。酶活定义为在 37 °C, pH 值 7.0 条件下, 5 min 内水解 1 mg 淀粉的酶量为一个活力单位。

1.3.4 形态学鉴定 通过光学显微镜对菌体形态进行观察。将菌株划线接种于分离和保藏培养基平板上, 37 °C 培养 1 d, 观察单菌落的形状、大小、透明度、颜色、边缘和表面特征。

1.3.5 菌株生理生化鉴定 参照《伯杰细菌鉴定手册》^[16] 和《常见细菌系统鉴定手册》^[17] 对筛选出的淀粉酶活力高的菌株进行形态学描述和生理生化鉴定。生理生化鉴定中, 分别对目的菌株进行硝酸盐还原试验, 淀粉水解试验, 酪蛋白水解试验, 酯酶水解试验, 过氧化氢酶水解实验, 耐高温实验, 产 H_2S 实验, 营养型测定实验, 明胶液化, 触酶实验, 柠檬酸盐实验, 运动性检测等实验, 每个实验重复 3 次。

1.3.6 16S r DNA 的鉴定和构建系统发育树 利用传统的 CTAB 法^[18] 提取 DNA。提取分离出的菌株基因组 DNA 为模板, 使用细菌通用引物 27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'), 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'), 以目的菌株的基因组 DNA 为模板, 对该菌株 16S r DNA 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为 50 μ L 反应体系, 其中, 预变性 94 °C 45 s, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 15 s, 30 个循环, 延伸 72 °C 10 min。PCR 产物由上海生工生物工程技术有限公司纯化和测序。将获得的序列提交至 EzTaxon - e 数据库进行相似度比较 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) (Kim et al., 2012)。通过 ClustalW1.6 软件包进行多序列匹配排列 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw1.6/>)。采用 MEGA 6.06 软件构建系统发育树。根据相关软件删除序列匹配排列中的插入和缺失, 根据“Kimura 双参数”方式, 通过序列数据计算进化距离。选择邻近连接法 (Neighbour - Joining) 对系统进化树进行估算, 通过 1 000 次取样确定。

1.3.7 液体发酵培养基的优化

1) 最适培养时间。菌株活化后, 以 5% 的接

种量接种在发酵培养基中, 转速 180 r/min, 温度为 37 °C, 恒温摇床培养 12、16、20、24、28、32、36 h 后, 制备粗酶液, 然后用 Yoo 改良法测定每个时间段的 α -淀粉酶活力, 研究培养时间对酶活力的影响并确定最适的培养时间。

2) 最适 pH 值。菌株活化后, 以 5% 的接种量分别接种到发酵培养基中, 转速 180 r/min, 温度为 37 °C, 恒温摇床培养 24 h, 在 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的条件下用 Yoo 改良法测定不同反应系统 pH 的 α -淀粉酶活力, 研究反应系统 pH 对酶活力的影响并确定最适 pH。

3) 最适温度。菌株活化后, 以 5% 的接种量分别接种到发酵培养基中, 转速 180 r/min, 温度为 37 °C, 恒温摇床培养 24 h, 在温度 30、35、40、45、50 °C 的条件下用 Yoo 改良法测定不同反应系统温度的 α -淀粉酶活力, 研究反应系统温度对酶活力的影响并确定最适温度。

4) 最佳碳源。菌株活化后, 以 5% 的接种量接种到碳源分别为可溶性淀粉、糊精、葡萄糖和蔗糖的发酵培养基中, 转速 180 r/min, 温度 37 °C, 恒温摇床培养 24 h 后, 制备粗酶液, 用 Yoo 改良法测定每个不同碳源培养的菌株的 α -淀粉酶活力, 测定培养基碳源对酶活力的影响并确定最佳碳源。

5) 最佳氮源。菌株活化后, 以 5% 的接种量接种到碳源分别为牛肉膏、明胶、尿素和硫酸铵的发酵培养基中, 转速 180 r/min, 温度为 37 °C, 恒温摇床培养 24 h 后, 制备粗酶液, 用 Yoo 改良法测定每个不同氮源培养的菌株的 α -淀粉酶活力, 测定培养基氮源对酶活力的影响并确定最佳氮源。

2 结果与分析

2.1 产淀粉酶菌株的筛选

通过菌株产透明圈初筛, 从 43 株细菌中筛选获得 14 株产淀粉酶菌株。其中 HM - 2、HM - 22、HM - 31 的水解圈直径大于 2 cm, 确定为复筛菌株。通过 3 次测酶活力, HM - 2、HM - 22 和 HM - 31 的平均酶活力分别为 119.32、122.45 和 106.49 U · mL⁻¹, 可见, 菌株 HM - 22 的 α -淀粉酶酶活力最高。

2.2 菌株的形态学观察及生理生化鉴定

光学显微镜下, 菌株 HM - 22 呈短杆状, 端圆, 单个排列。平板划线培养 1 d 后, 菌落呈扁形、直径 0.2 ~ 0.3 cm、表面干、边缘不完整、稍有隆起、颜色为乳白色、不透明、革兰氏阳性菌。菌株 HM - 22 形态学观察和生理生化鉴定, 见表 1 和表 2。

表 1 菌株 HM-22 的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of HM-22

菌株	形状	边缘	湿度	隆起	颜色	革兰氏染色	菌状
HM-22	不规则形	不完整	干	凸透镜状	乳白色	阳性	杆状

表 2 菌株 HM-22 的生理生化实验结果

Table 2 Physiological and biochemical tests of HM-22

菌株	运动型	H ₂ S	过氧化氢酶	硝酸盐还原	柠檬酸盐试验	触酶	耐高温	对氧需求	明胶液化	酪蛋白水解	淀粉水解	吐温 20	吐温 80
HM-22	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
标准菌株	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+

2.3 16S r DNA 序列测定

使用细菌通用引物对 HM-22 的 16S r DNA 序列进行测序，PCR 扩增得到约 1.5 kb 的 16S r DNA 片段，将获得的序列提交至 EzTaxon-e 数据库 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) (Kim et al., 2012)，调出相似性最高相关菌株的 16S rDNA 序列，与芽孢杆菌的同源性为 99.8%，其中与菌株 *Bacillus tequilensis* (AYTO01000043) 的相似性最

高。将菌株 HM-22 的 16S r DNA 序列与 GenBank 数据库中部分细菌 16S r DNA 序列，通过 ClustalW1.6 软件包进行多序列匹配排列，应用 MEGA6.06 软件构建系统发育树 (图 1)。结果显示，菌株 HM-22 (KX866452) 与芽孢杆菌属中的细菌有较近的亲缘关系，结合形态学、生理生化及分子鉴定结果初步确定该菌为芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis*。

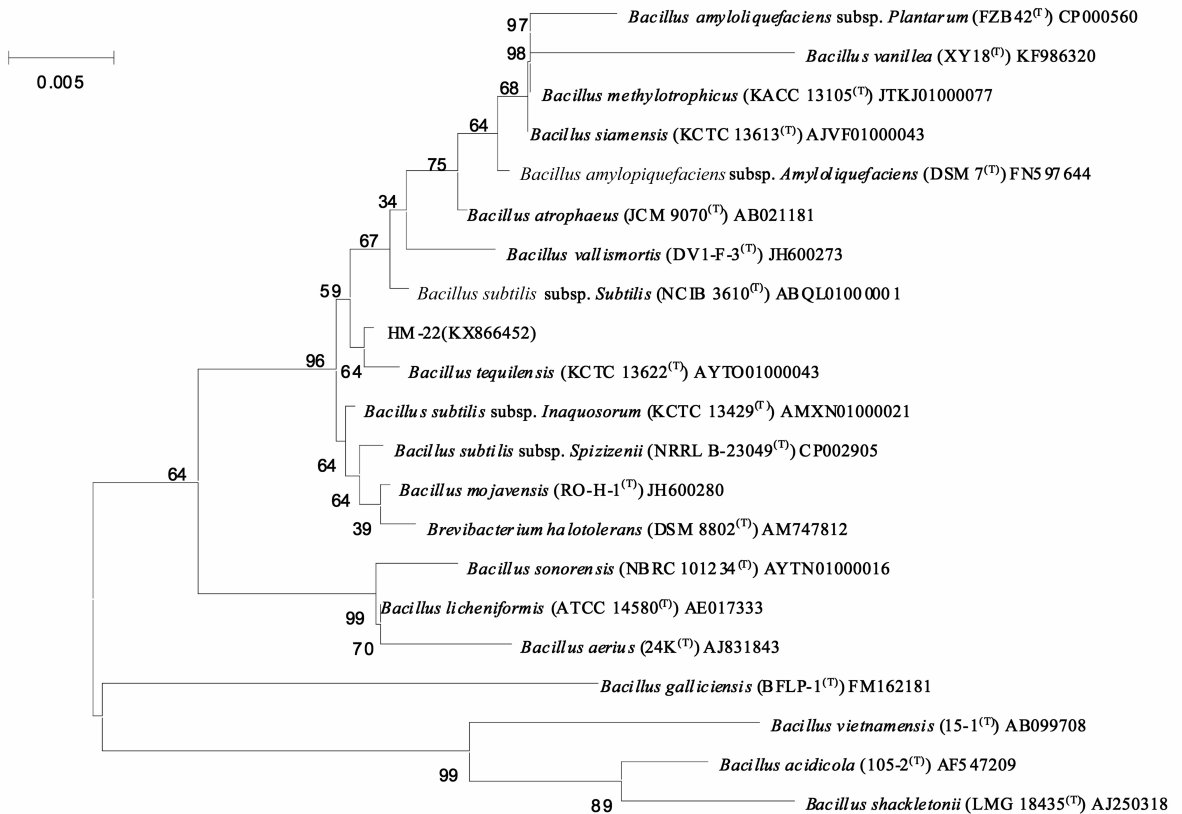


图 1 菌株 HM-22 的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain HM-22

2.4 培养条件的优化

2.4.1 最佳产酶时间的确定 菌株 HM-22 在发酵培养基中培养后,用 Yoo 改良法分别在 12、16、20、24、28、32、36 h 时测定 α -淀粉酶活力,结果见图 2。由图 2 可以看出,培养时间为 24 h 时酶活力最高,为 147.53 U/mL,菌株 HM-22 的最佳培养时间为 24 h。

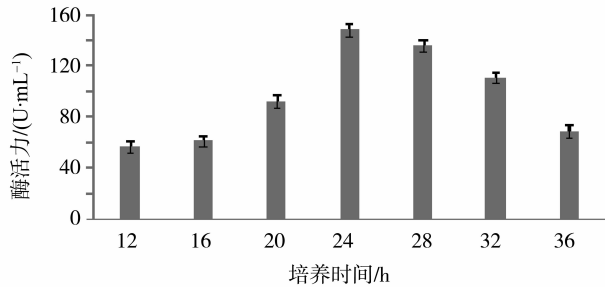


图 2 菌株 HM-22 淀粉酶最佳产酶时间的确定结果
Fig. 2 The determination of optimal time in producing amylase by Bacterium HM-22

2.4.2 最适 pH 值 把反应系统的缓冲液 pH 分别调为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 接种菌株 HM-22 后,用 Yoo 改良法分别测定 α -淀粉酶活力,结果见图 3。由图 3 可看出,pH 为 6.0 时,菌株 HM-22 的酶活力达到最高值,为 147.53 U/mL。当 pH >6 时,酶活力明显降低。可见,该菌株对 pH 值有一定的耐受范围,但较强的碱性环境不利于菌株产淀粉酶,酶活力的最适 pH 为 6.0。

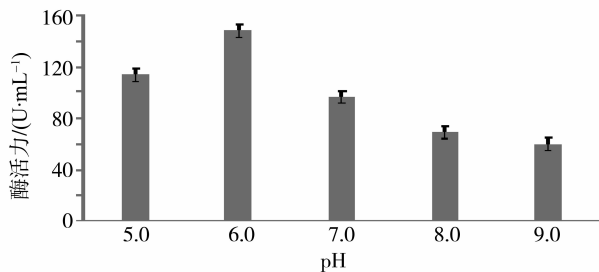


图 3 培养基初始 pH 值对菌株 HM-22 产酶能力的影响
Fig. 3 The impact of initial pH on Bacterium HM-22 in producing amylase

2.4.3 最适温度 将测定酶活力反应系统的温度分别调到 30、35、40、45、50 °C 用 Yoo 改良法分别测定 α -淀粉酶活力,结果见图 4。由图 4 可看出,温度为 40 °C 时菌株 HM-22 α -淀粉酶活力达到最高值,为 147.53 U/mL。随着温度的升高酶活力逐渐降低,50 °C 时淀粉酶活性基本上失活,

酶活力非常低,由此可以确定菌株 HM-22 α -淀粉酶活力的最适温度为 40 °C。

2.4.4 最适碳源 改变菌株的碳源,分别把可溶性淀粉、糊精、葡萄糖和蔗糖作为碳源培养菌株 24 h 后用 Yoo 改良法测定 α -淀粉酶活力,结果见图 5。由图 5 可看出,以可溶性淀粉为碳源时菌株 HM-22 的 α -淀粉酶活力最高,为 135.35 U/mL;以糊精作碳源时,菌株 HM-22 的 α -淀粉酶活力下降为 109.24 U/mL;以葡萄糖为碳源时,菌株 HM-22 的酶活力为 65.1 U/mL;以蔗糖为碳源时,菌株 HM-22 的 α -淀粉酶活力为 121.82 U/mL。实验结果显示,可能是由于可溶性淀粉是淀粉酶的底物,能够诱导淀粉酶的合成,导致菌株 HM-22 的最佳碳源是可溶性淀粉。

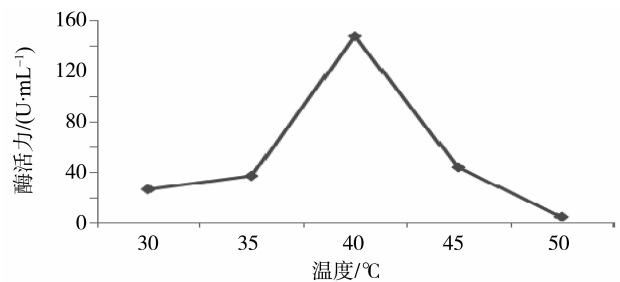


图 4 培养温度对菌株 HM-22 产酶活力的影响
Fig. 4 The impact of culture temperature on Bacterium HM-22 in producing amylase

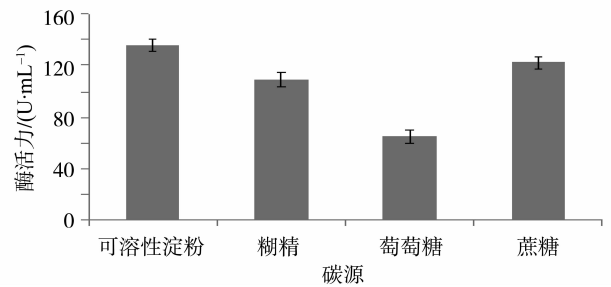


图 5 碳源对菌株 HM-22 产酶能力的影响
Fig. 5 The impact of carbon source on Bacterium HM-22 in producing amylase

2.4.5 最适氮源 改变菌株的氮源,分别把牛肉膏、明胶、尿素和硫酸铵作为氮源培养菌株 24 h 后用 Yoo 改良法测定 α -淀粉酶活力,结果见图 6。由图 6 可看出,以牛肉膏为氮源时菌株 HM-22 的 α -淀粉酶活力最高,为 132.54 U/mL,以明胶作氮源时菌株 HM-22 的 α -淀粉酶活力下降为 96.39 U/mL,以尿素为氮源时菌株 HM-22 的 α -淀粉酶活力为 39.92 U/mL,以硫酸铵为氮源时菌

株 HM-22 的酶活力为 46.18 U/mL。牛肉膏为氮源时酶活性最强,究其原因,是牛肉膏中含有生长因子,有利于菌体的生长,故菌株 HM-22 的最佳氮源是牛肉膏。

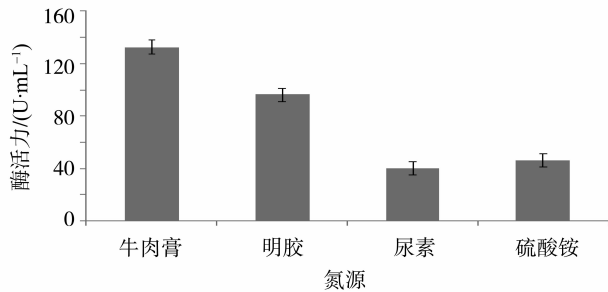


图6 氮源对菌株 HM-22 产酶能力的影响

Fig. 6 The impact of nitrogen source on Bacterium HM-22 in producing amylase

3 结果与讨论

本研究从新疆尉犁县黑湖采样的 30 个土样、水样和泥样样品中分离筛选出 43 株细菌,通过产淀粉酶透明圈大小初筛和牛津杯复筛从中筛选出 14 株产淀粉酶的菌株,采用 Yoo 改良法对产透明圈较大的菌株进行酶活力测定,并筛选出了一株产酶活性较高的菌株 HM-22。经形态学、生理生化和 16S r DNA 分子鉴定 HM-22 (KX866452) 与 *Bacillus tequilensis* 的相似性为 99.8%,初步鉴定为芽孢杆菌属。对菌株 HM-22 产酶条件进行优化后得到最佳产酶条件:产淀粉酶最适温度为 40 °C,最适碳源为可溶性淀粉,最适氮源为牛肉膏,最适反应 pH 为 6.0,最适产酶培养时间为 24 h。优化后 HM-22 菌株的酶活力达 147.53 U/mL,提高了 17%。该菌株如果再进一步进行诱变处理和重组表达^[24],酶活力还有提升的空间。

目前,不少芽孢杆菌应用到工业、农业、医学、环境修复等各个领域,对人类与社会做出了巨大的贡献^[19-20]。据文献报道,芽孢杆菌在抗癌试验中具有转化产生多个转化产物的特性,其中有些转化产物可以抑制人恶性胶质瘤细胞和人乳腺细胞^[21],有些芽孢杆菌在生防功能方面也突显重要的功能^[22]。水解淀粉芽孢杆菌在自然界中分布十分广泛^[23]。虽然很多研究者从芽孢杆菌中分离出产淀粉酶菌株并进行了性质研究,但远远不能满足工业生产对产酶菌株需求和酶性质的要求。产淀粉酶菌种资源探索备受瞩目,有更多的具有高活性的具应用价值的产淀粉酶微生物被不断分离,其各类功能和活性物质必定会进一步阐明,其应用前景更

加广阔。为从新疆盐湖细菌中筛选获得淀粉酶活力较高的菌种资源,并为其应用提供理论依据和参考,本研究从新疆尉犁县黑湖采集的水、土和泥样中分离出产淀粉酶的菌株,通过酶活力测定,筛选出较高活性的菌株,进行分类鉴定,利用液体发酵法对产 α -淀粉酶培养基发酵条件进行优化研究,并对其酶学特性进行了初步探讨。从该地区芽孢杆菌中分离的淀粉酶优化的最佳条件在氮源、碳源、pH、酶的反应温度以及产酶最佳时间等方面,和已报到的产酶条件相比,有一定的相似性和个别差异^[14,24],该研究为淀粉酶产生的不同优化最佳条件提供重要参数。

参考文献:

- [1] RAMESHKUMAR A, SIVASUDHA T. Optimization of nutritional constitute for enhanced α -amylase production by solid state fermentation technology [J]. International Journal of Microbiological Research, 2011, 2 (2): 143-148.
- [2] SETHI BIJAY K, JANA ARIJIT, NANDA PRATIVA K, et al. Production of α -amylase by aspergillus terreus NCFT 4269.10 using pearl millet and its structural characterization [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:1-13.
- [3] 岳寿松, 边斐, 代运章, 等. 产蛋白酶和淀粉酶芽孢杆菌 SDYB-1 的分子鉴定及酶学性能研究 [J]. 山东农业科学, 2015, 11:54-59.
YUE Shousong, BIAN Fei, DAI Yunzhang, et al. Molecular identification of protease and amylase secreting *Bacillus subtilis* SDYB-1 and characterizations of enzymes [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2015, 11:54-59.
- [4] 陈约慧, 陈颖聪, 刘冬冬, 等. 一株高产淀粉酶的解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其产酶条件优化 [J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(6):505-510.
CHEN Yuehui, CHEN Yingcong, LIU Dongdong, et al. Isolation and identification of a wild amylase-producing bacterium and optimization of its fermentable conditions [J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(6):505-510.
- [5] 陈相达, 戴慧慧, 刘燕, 等. 一株高产淀粉酶枯草芽孢杆菌的筛选、鉴定及产酶条件的优化 [J]. 温州医科大学学报, 2011, 41(1):40-43.
CHEN Xiangda, DAI Huihui, LIU Yan, et al. Screening and identification of a wild *Bacillus subtilis* with high amylase activity and optimization of its enzyme-producing conditions [J]. Journal of Wenzhou Medical College, 2011, 41(1):40-43.
- [6] POHL S, HARWOOD C R. Heterologous protein secretion by *bacillus species* from the cradle to the grave. [J]. Advances in Applied Microbiology, 2010, 73(10):1-25.

- [7] RAUL D, BISWAS T, MUKHOPADHYAY S, et al. Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) using solid state fermentation [J]. *Biochemistry Research International*, 2014 (2): 1-5.
- [8] RAJAGOPALAN G, KRISHNAN C. α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis*, KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(8):3044-3050.
- [9] REDDY N S, NIMMAGADDA A, RAO K R S S. An overview of the microbial α -amylase family [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2004, 2(12):645-648.
- [10] 库米拉·马吉提, 王伟, 张晓燕, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌发酵产低温淀粉酶的工艺条件 [J]. *新疆农业大学学报*, 2012, 35(6):478-483.
KUMILA Majiti, WANG Wei, ZHANG Xiaoyan, et al. Optimization of cold temperature amylase of *Bacillus subtilis* by response surfas [J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2012, 35(6):478-483.
- [11] 陈吉刚, 张蓉蓉, 杨季芳, 等. 北冰洋产淀粉酶海洋细菌的筛选与鉴定及其产酶条件的优化 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(1):53-55.
CHEN J G, ZHANG R R, YANG J F, et al. Screening and identification of amylase producing strain from Arctic Sea [J]. *Journal of Anhui Agri*, 2011, 39(1):53-55.
- [12] PLOSS T N, REILMAN E, MONTEFERRANTE C G, et al. Homogeneity and heterogeneity in amylase production by *Bacillus subtilis* under different growth conditions [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1):1-16.
- [13] CHAI K P, OTHMAN N F B, TEH A H, et al. Crystal structure of *Anoxybacillus* α -amylase provides insights into maltose binding of a new glycosyl hydrolase subclass [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 1-10
- [14] 阙祖俊, 刘赵玲, 李文婷, 等. 一株 α -淀粉酶生产菌的分离鉴定及其产酶条件优化 [J]. *浙江万里学院学报*, 2010, 23(5):83-89.
QUE Zujun, LI Wenting, LIU Zhaoling, et al. Isolation and identification of an α -amylase-producing bacteria strain and optimization of its fermentation conditions [J]. *Journal of Zhejiang Wanli University*, 2010, 23(5):83-89.
- [15] 李力. 高淀粉酶蛋白酶活力枯草芽孢杆菌的选育及酶基因阳性克隆的筛选 [D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2009.
LI Li. Breeding of *Bacillus subtilis* with high-activity of amylase, protease and screening of positive clones of enzyme genes [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2009.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG X Z, CAI M Y. The identification manual of systematic bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [17] 布坎南, 吉本斯. 伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
BUCHANAN R E, GIBBONS N E. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984.
- [18] del SAL G, MANFIOLETTI G, SCHNEIDER C. A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(20):9878.
- [19] 王晓阁. 枯草芽孢杆菌研究进展与展望 [J]. *中山大学研究生学刊(自然科学)*, 2012(3):14-23.
WANG Xiaoge. Research progress and prospect of *Bacillus subtilis* [J]. Sun Yat-Sen University: *Journal of The Graduates(Natural Sciences, Medicine)*, 2012(3): 14-23.
- [20] 刘国红, 林乃铨, 林营志, 等. 芽孢杆菌分类与应用研究进展 [C] // 兰州: 第三届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会, 2011:238.
LIU Guohong, LIN Naiquan, LIN Yingzhi, et al. Advances in taxonomy and application of genus *Bacillus* [C] // Lanzhou: The 3rd National Conference of Microbial Resources-Platform Services, 2011:238.
- [21] 黄捷, 杨国新, 金东伟, 等. 巨大芽孢杆菌转化雷帕霉素的研究 [C] // 兰州: 第三届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会, 2011: 268.
HUANG Jie, YANG Guoxin, JIN Dongwei, et al. Rapamycin by *Bacillus megaterium* [C] // Lanzhou: The 3rd National Conference of Microbial Resources-Platform Services, 2011:268.
- [22] 刘贯锋, 朱育菁, 刘国红, 等. 芽孢杆菌分类学特征及其生防功能菌株的筛选 [C] // 兰州: 第三届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会, 2011:242.
LIU Guanfeng, ZHOU Yujing, LIU Guowei, et al. Taxonomic characteristics of *Bacillus* genus and screening of biocontrol strains [C]. Lanzhou: The 3rd National Conference of Microbial Resources-Platform Services, 2011: 242.
- [23] 马晓梅, 赵辉. 淀粉酶产生菌 MSP13 筛选及其产酶条件初步优化 [J]. *食品科学*, 2015, 36(11):177-181.
MA Xiaomei, ZHAO Hui. Screening of amylase-producing strain MSP13 and optimization of fermentation conditions. [J] *Food Science*, 2015, 36(11):177-181.
- [24] 胡博, 刘逸寒, 路福平, 等. 枯草芽孢杆菌工程菌产耐酸性高温 α -淀粉酶发酵条件的优化 [J]. *天津科技大学学报*, 2012, 6(27):1-6.
HU Bo, LIU Yihan, LU Fuping, et al. Optimization of fermentation conditions for acid-resistant and heat-stable α -amylase production with engineered strain *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 2012, 6(27):1-6.