

余振,徐玉荣,吴哲宽,等. $\alpha$ -淀粉酶产生菌的筛选鉴定及Ba8a蛋白的酶学特性[J].华中农业大学学报,2025,44(4):143-149.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.04.014

## $\alpha$ -淀粉酶产生菌的筛选鉴定及Ba8a蛋白的酶学特性

余振<sup>1</sup>,徐玉荣<sup>2</sup>,吴哲宽<sup>1</sup>,张静怡<sup>2</sup>,张小宇<sup>2</sup>,  
俸婷<sup>2</sup>,程国军<sup>2</sup>,李晓华<sup>2</sup>,饶雄飞<sup>1</sup>

1. 湖北省烟草科学研究院,武汉 430030; 2. 中南民族大学生命科学学院/  
微生物资源与利用湖北省工程技术研究中心,武汉 430074

**摘要** 为解决农作物秸秆降解的问题,采用选择性培养基从牛胃秸秆发酵物中筛选获得1株高产 $\alpha$ -淀粉酶的菌株,命名为SCUEC8菌株。通过对SCUEC8菌株进行形态学观察和生理生化特性分析,根据16S rDNA序列构建系统进化树,鉴定该菌为枯草芽孢杆菌。以SCUEC8菌株的总DNA为模板扩增 $\alpha$ -淀粉酶基因ba8a,构建pET28a(+)ba8a重组质粒,转化大肠杆菌BL21菌株进行异源表达,进一步研究Ba8a蛋白酶学特性。结果显示,ba8a基因大小为1434 bp,Ba8a蛋白分子质量为52.9 ku;在pH 5.0、反应温度45℃条件下,Ba8a蛋白相对酶活性较高;Mn<sup>2+</sup>对Ba8a蛋白酶活性具有较高促进作用,Cu<sup>2+</sup>对Ba8a蛋白酶活性具有较高抑制作用;在pH 6.0、反应温度0℃条件下,Ba8a蛋白较稳定。结果表明,枯草芽孢杆菌SCUEC8菌株具有 $\alpha$ -淀粉酶活性,有助于提高农作物秸秆的降解率。

**关键词**  $\alpha$ -淀粉酶;枯草芽孢杆菌SCUEC8菌株;ba8a基因;酶学特性

**中图分类号** S476.1    **文献标识码** A    **文章编号** 1000-2421(2025)04-0143-07

淀粉酶是主要的水解酶,可水解淀粉分子中存在的糖苷键产生糊精和寡糖<sup>[1]</sup>,按水解淀粉方式可以将淀粉酶分为 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和异淀粉酶4类<sup>[2]</sup>。微生物合成的 $\alpha$ -淀粉酶从真菌和细菌中提取,广泛应用于工业、农业和畜牧业等<sup>[3-6]</sup>。然而,动物饲料中含有高浓度的可溶性低聚糖如棉子糖和水苏糖等,在动物肠道中不能被彻底消化<sup>[7-8]</sup>,这些未消化完全的糖进入动物肠道后会促进有害菌群的增长<sup>[9]</sup>,严重危害动物健康,降低动物饲料的饲用效率<sup>[10]</sup>。 $\alpha$ -淀粉酶作为饲料添加剂可以通过破坏特定的化学键和降解宿主酶不能消化的饲料成分来提高饲料吸收率并增加淀粉的可用性<sup>[11-12]</sup>。研究表明在家禽饲料中添加淀粉酶和木聚糖酶不仅可以提高总还原糖浓度并提高养分的利用率<sup>[13-14]</sup>,还可以减少病原体数量,增加有益菌改善肠道状态<sup>[15-17]</sup>。

本研究从牛胃中分离筛选得到1株具有较高淀

粉降解能力的菌株,命名为SCUEC8菌株,经鉴定为枯草芽孢杆菌,以SCUEC8菌株的总DNA为模板,对其内切葡聚糖酶基因进行克隆和异源表达,研究不同温度、pH和金属离子对 $\alpha$ -酶蛋白生物活性的影响,旨在为饲料工业中 $\alpha$ -淀粉酶的应用提供新的候选菌株和酶蛋白。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

样品采集于湖南省长沙县养殖场健康牛胃秸秆发酵物,用于分离菌株;*E. coli* BL21(DE3)大肠杆菌为表达菌株,购自Stratagene公司;pET28a(+)表达载体,购自Invitrogen公司。

### 1.2 培养基、试剂

LB培养基:NaCl 10.0 g,胰蛋白胨10.0 g,酵母浸粉5.0 g,dH<sub>2</sub>O 1 000 mL,pH 7.0。

收稿日期:2024-09-25

基金项目:中国烟草总公司“雪茄烟叶开发与应用重大专项”揭榜挂帅项目(中烟办2022[111]号,110202201039(XJ-10));国家自然科学基金项目(31070087,32372809);湖北省大学生创新创业训练计划项目(SCX2024066)

余振,E-mail:304226690@qq.com

通信作者:饶雄飞,E-mail:raoxiongfei@163.com;李晓华,E-mail:lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

LA培养基:NaCl 10.0 g,胰蛋白胨 10.0 g,酵母浸粉 5.0 g,dH<sub>2</sub>O 1 000 mL,琼脂 18.0 g,pH 7.0。

淀粉液体培养基:可溶性淀粉 10.0 g,牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 5.0 g,H<sub>2</sub>O 1 000.0 mL,pH 7.0~7.2。

淀粉固体培养基:可溶性淀粉 10.0 g,牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂 15.0 g,H<sub>2</sub>O 1 000 mL,pH 7.0~7.2。

DNS (3, 5-dinitrosalicylic acid) 试剂:准确称取 DNS 2.5 g,溶于 50 mL 的 NaOH(2 mol/L) 中,再加入 75.2 g 酒石酸钾钠和 100 mL 蒸馏水,微热溶解后定容到 500 mL,保存于棕色瓶中。

### 1.3 产淀粉酶微生物的筛选与鉴定

将牛胃秸秆发酵物接种到淀粉液体培养基中,37 °C、180 r/min,富集培养 24 h,取富集培养液 1 mL,10×稀释涂布于淀粉固体培养基中,37 °C 培养 24 h,多次分离纯化挑取单菌落。用牛津杯法测定淀粉降解圈大小。

将筛选得到的菌株划线接种后,37 °C 培养 12 h,在显微镜下观察菌落的特征。按照文献[18]的方法对菌株进行生理生化特性鉴定。提取菌株基因组 DNA,用 16S rDNA 通用引物扩增,引物为:16S rDNA-F: AGAGTTGATCCTGGCTCAG, 16S rDNA-R :GGTTACCTTGTTACGACTT, PCR 产物由武汉擎科生物有限公司进行测序,用 BLAST 对 16S rDNA 序列比对分析,MEGA11.0 构建系统进化树。

### 1.4 *ba8a* 基因的克隆

提取 SCUEC8 菌株的基因组 DNA 为模板,对 *ba8a* 基因进行 PCR 扩增,引物为:*ba8a*-F: CGCGGATCCATGTTGCAAAACGATTCAAAAC,*ba8a*-R: CCCAAGCTTCATTGAAAGAATGT-GTTACACCTG(下划线为 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点)。扩增的 PCR 产物由武汉擎科生物有限公司进行测序。纯化 *ba8a* 基因 PCR 产物,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后与载体 pET28a(+)连接,构建重组质粒 pET28a(+) - *ba8a*。将重组质粒 pET28a(+) - *ba8a* 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)获得重组菌株。

### 1.5 Ba8a 蛋白的生物信息学分析

使用 Phyre2 (<https://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>)、Esprift 3.0 (<https://esprift.ibcp.fr/ESPrift/ESPrift/>)、Clustal Omega (<http://www.clustal.org/ome>)

ga/)、Protein Data Bank (<https://www.wwpdb.org/>)、Prosite (<https://prosite.expasy.org/>)、Predict Protein (<https://predictprotein.org/>) 等软件,对 Ba8a 蛋白进行同源性比较及生物学特性、二级结构特征预测。

### 1.6 Ba8a 蛋白的诱导表达

将活化后的重组表达菌株,以 1% 接种量接种到 150 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基,于 37 °C、180 r/min 培养至 *D*<sub>600 nm</sub> 为 0.6~0.8,在 150 mL 的菌液中加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,25 °C 下诱导表达 20 h。将菌液转移到 50 mL 无菌离心管中,于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用预冷的 Lysis buffer 洗涤沉淀表面,弃去洗涤液,再加入 4 mL 的预冷 Lysis buffer 重悬菌体,在低温下超声破碎 15 min(超声 1 s,间隔 2 s),在 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,分别收集全菌液、上清、沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳检测。

### 1.7 Ba8a 蛋白纯化

利用质粒 pET28a(+) 携带 His 标签,His 能与 Ni<sup>2+</sup>结合的特点,采用 Ni-NTA His·Bind Resin 纯化树脂纯化粗酶液,操作步骤参照文献[19]。

### 1.8 Ba8a 蛋白的生物活性测定

酶活性的测定采用 DNS 显色法,在 1 mL Ba8a 蛋白溶液中,加入 1 mL 1% 可溶性淀粉溶液,40 °C 水浴反应 10 min,加 3 mL DNS 试剂摇匀,沸水浴 10 min,取出冷却,5 000 r/min 离心 5 min,取上清测 *D*<sub>540 nm</sub> 值,以煮沸失活的粗酶液为对照。 $\alpha$ -淀粉酶酶活单位定义:每分钟催化可溶性淀粉水解产生 1 μg 麦芽糖所需要的酶量定义为 1 个  $\alpha$ -淀粉酶酶活单位(1 U)。

### 1.9 Ba8a 蛋白酶活性特征

以温度、pH 和金属离子作为影响因素,改变其中一种因素,其余条件不变,测定各因素对 Ba8a 蛋白生物活性的影响。培养温度分别设置为 30、40、45、50、55、60、65、70、80 °C。pH 值设置为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0。分别添加 0.025 mmol/L 的 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Li<sup>+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 金属离子,测定 Ba8a 蛋白生物活性。

将 Ba8a 蛋白分别置于 0、20、37、45、55、65 °C 恒温水浴锅中,每 30 min 取样,分别测定 Ba8a 蛋白生物活性,计算不同温度下 Ba8a 蛋白热稳定性。将 Ba8a 蛋白置于 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0 缓冲液中,每 30 min 取样,分别测定 Ba8a 蛋白生物活性,计算不同 pH 下

Ba8a蛋白的pH稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 产 $\alpha$ -淀粉酶菌株的筛选与鉴定

从牛胃桔秆发酵物中分离纯化得到11株具有  $\alpha$ -

淀粉酶活性的菌株,  $\alpha$ -淀粉酶降解活性测定结果(表1)显示, 淀粉降解圈直径在14.17~32.67 mm, A2菌株淀粉降解圈直径最小, A8菌株淀粉降解圈直径最大, 将A8菌株命名为SCUEC8。

表1 11个菌株淀粉降解圈大小

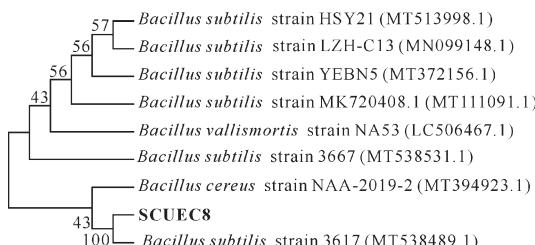
Table 1 Diameter of cellulose degradation circle of 11 strains

菌株 Strain	降解圈直径 Diameter of degradation zone	菌株 Strain	降解圈直径 Diameter of degradation zone	菌株 Strain	降解圈直径 Diameter of degradation zone
A1	26.37±2.30	A5	29.27±0.83	A9	25.60±1.40
A2	14.17±0.85	A6	22.93±1.36	A10	27.20±0.92
A3	17.83±0.80	A7	26.13±1.60	A11	27.07±0.12
A4	16.77±0.51	A8	32.67±1.89		

### 2.2 $\alpha$ -淀粉酶产生菌SCUEC8菌株的鉴定

SCUEC8菌株菌落呈米白色, 菌落扁平, 近圆形, 边缘不规则, 易挑取, 无色素产生。SCUEC8菌株革兰氏染色呈阳性。水解淀粉试验为阳性, 甲基红试验为阴性。

提取菌株SCUEC8基因组DNA作为模板, 用引物16S rDNA-R和16S rDNA-F扩增16S rDNA序列, BLAST序列比对分析, 用MEGA11.0构建系统进化树。结果如图1所示, SCUEC8菌株与 *Bacillus subtilis* 属的多株菌株具有较高的相似性, 其中与 *Bacillus subtilis* strain 3617(MT538984.1)菌株相似性高达100%。结合菌落特征和生理生化特性, 初步鉴定菌株SCUEC8为枯草芽孢杆菌。



Bootstrap值为1 000。Bootstrap value is 1 000。

图1 基于16S rDNA的SCUEC8菌株的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the SCUEC8 based on 16S rDNA sequences

### 2.3 *ba8a*基因的克隆与功能分析

以SCUEC8菌株的DNA作为模板, 使用 *ba8a*-F和 *ba8a*-R引物扩增 *ba8a*基因, 测序结果显示, *ba8a*基因大小为1 434 bp。对 *ba8a*基因的氨基酸序列进行同源性分析发现, Ba8a蛋白与来自枯草芽孢杆菌的1BAG蛋白和1UA7蛋白( $\alpha$ -淀粉酶)的同源性均为98.82%, 与来自芽孢杆菌属的3DC0蛋白( $\alpha$ -淀粉酶)的同源性为94.08%(图2A)。生物信息学分析结

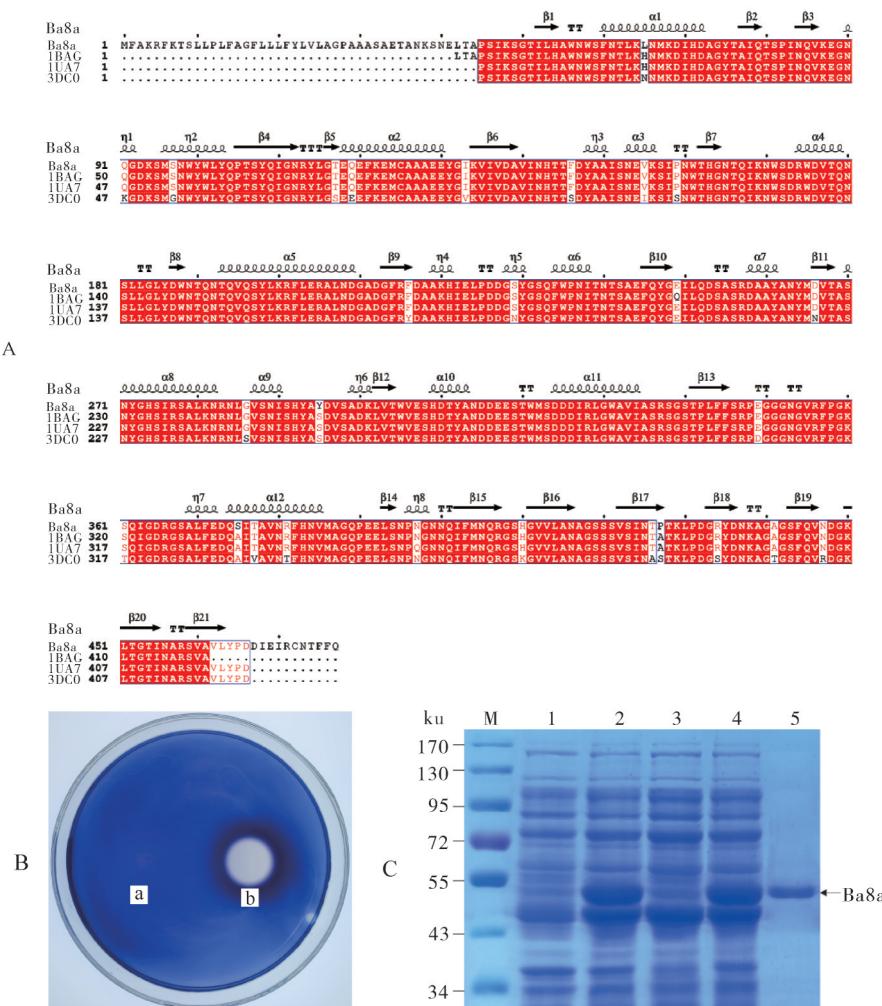
果显示, Ba8a蛋白由477个氨基酸组成, 分子质量为52.90 ku, pI为5.26, 有52个带负电的氨基酸残基和39个带正电的氨基酸残基, 平均亲水系数为-0.473。带负电的氨基酸数量多于带正电的氨基酸数量, 表明Ba8a蛋白为酸性蛋白。二级结构分析结果显示,  $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的比例分别为26%、16.14%。

将 *ba8a*基因插入到pET28a(+)质粒中构建重组质粒pET28a(+) - *ba8a*, 转入大肠杆菌BL21(DE3)菌株中进行表达, 以含质粒pET28a(+)菌株的BL21(DE3)菌株为对照, 牛津杯法测定重组菌生物学活性(图2B), 含质粒pET28a(+) - *ba8a*的 *E. coli* BL21(DE3)菌株有降解圈, 结果表明 *ba8a*基因为淀粉降解基因, 而对照菌株没有淀粉降解圈。在IPTG浓度为0.5 mmol/L、25℃的条件下, 对pET28a(+) - *ba8a*重组质粒转化的大肠杆菌诱导表达20 h, 获得Ba8a蛋白(图2C)。Ba8a蛋白的分子质量约为52.90 ku, 与预测的大小一致。

### 2.4 不同反应温度、pH和金属离子对Ba8a蛋白生物活性的影响

在pH 7.0的条件下, 测定不同温度对Ba8a蛋白生物活性的影响, 结果如图3A所示, Ba8a蛋白的酶活性在30~45℃随着温度的升高而逐渐升高, 在45℃时, Ba8a蛋白的相对酶活性达到了峰值(100%), 在45~80℃温度范围内, Ba8a蛋白的相对酶活性随着温度的升高而降低。结果表明Ba8a蛋白生物活性的较适反应温度为45℃。

在45℃的温度条件下, 测定不同pH对Ba8a蛋白生物活性的影响, 结果如图3B所示, Ba8a蛋白的酶活性在pH 3.0~5.0范围内随pH的增加而增加, Ba8a蛋白的酶活性在pH 5.0~11.0范围内随pH的增加而下降。结果表明Ba8a蛋白生物活性的较适



A: Ba8a蛋白的同源性分析结果,通过Phyre2在线预测Ba8a蛋白的二级结构,α-螺旋占26%,β-折叠占16.14%。B: Ba8a蛋白的生物活性验证,a:含有pET28a(+)质粒E. coli BL21(DE3)菌株;b:pET28a(+) -ba8a重组菌。C:Ba8a蛋白SDS-PAGE分析。M:蛋白质Marker;1:含质粒pET28a(+)的E. coli BL21(DE3)菌株裂解混合液;2:pET28a(+) -ba8a重组质粒混合液;3:pET28a(+) -ba8a重组质粒的上清液;4:pET28a(+) -ba8a重组质粒的沉淀;5:纯化Ba8a蛋白。A: Alignment analysis based on the amino acid sequence of the Ba8a protein. The secondary structure of Ba8a protein was predicted online by Phyre2,  $\alpha$ -helix accounts for 26%,  $\beta$ -strand accounts for 16.14%. B: Bioactivity determination of Ba8a protein. a: *E. coli* BL21(DE3) strain containing plasmid pET28a(+); b: *E. coli* BL21(DE3) strain containing pET28a(+) -ba8a. C: SDS-PAGE analysis of the Ba8a protein. Lanes: M: Protein marker; 1: Mixture of the lysed *E. coli* BL21 (DE3) carrying the vector plasmid pET28a; 2: Mixture of the lysed *E. coli* BL21 (DE3) carrying the recombinant plasmid pET28a-ba8a; 3: Supernatant of the lysed *E. coli* BL21(DE3) containing the recombinant plasmid pET28a-ba8a; 4: Precipitate of lysed *E. coli* BL21(DE3) containing the recombinant plasmid pET28a-ba8a; 5: Purified protein Ba8a.

图2 Ba8a蛋白的表达与分析

Fig.2 Expression and bioinformatic analysis of the Ba8a protein

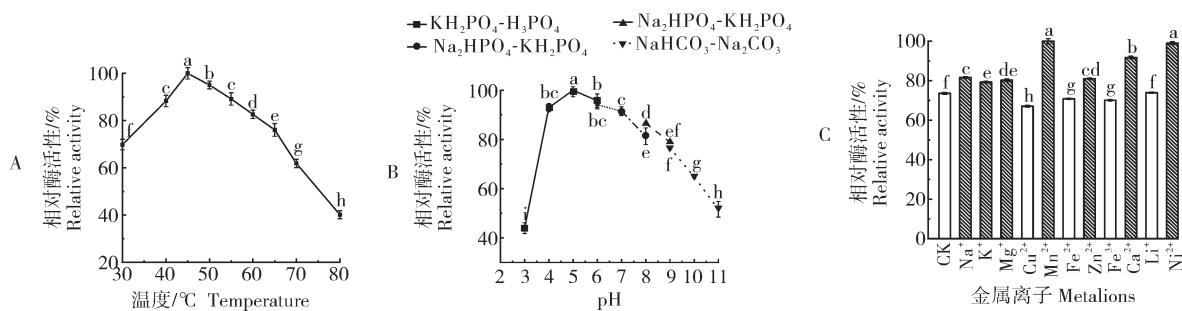
反应pH为5.0。

在pH 7.0、45 °C条件下,测定不同金属离子对Ba8a蛋白生物活性的影响,结果(图3B)显示,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 对Ba8a蛋白酶活性均有不同程度的抑制作用,相对酶活性分别为67.09%、70.85%、69.94%,其中  $\text{Cu}^{2+}$ 对Ba8a蛋白酶活性抑制作用最强;而  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 对Ba8a蛋白酶活性均有不同程度的促进作用,相对酶活性分别

为81.61%、79.31%、80.25%、100%、80.97%、91.80%、99.01%。结果表明,  $\text{Mn}^{2+}$ 对Ba8a蛋白酶活性具有较强的促进作用。

## 2.5 Ba8a蛋白的pH稳定性和热稳定性

在0、20、37、45、55、65 °C条件下,将Ba8a蛋白恒温水浴处理2 h,测定Ba8a蛋白生物活性,结果(图4A)显示,0 °C时,在0~120 min,随着时间的推移,相对酶活性从100%降至93.76%。当贮存温度分别为



图中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。Different lower letters in the figure indicate significantly different at 0.05 level.

图3 不同反应温度(A)、pH(B)和金属离子(C)对Ba8a蛋白生物活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature (A), pH (B) and metal ions (C) on the enzymatic activity of the Ba8a protein

20、37、45、55、65 °C时,在0~120 min,Ba8a蛋白相对酶活性分别下降至70.97%、66.24%、46.15%、35.81%、10.51%。结果表明Ba8a蛋白在0 °C较稳定。

在pH为4.0、5.0、6.0、7.0条件下,将Ba8a蛋白恒温水浴处理2 h,测定Ba8a蛋白生物活性。结果如图4B所示:在0~120 min范围内,随着时间的推移,

Ba8a蛋白在pH 4.0、5.0、6.0、7.0缓冲液的反应条件下,相对酶活性随时间的推移而减少;处理60 min时,Ba8a蛋白相对酶活性分别降低为57.75%、69.76%、86.96%、81.85%;处理120 min时,Ba8a蛋白相对酶活性分别逐渐降低到48.75%、56.03%、74.63%和69.25%。结果表明,Ba8a蛋白在pH 6.0较稳定。

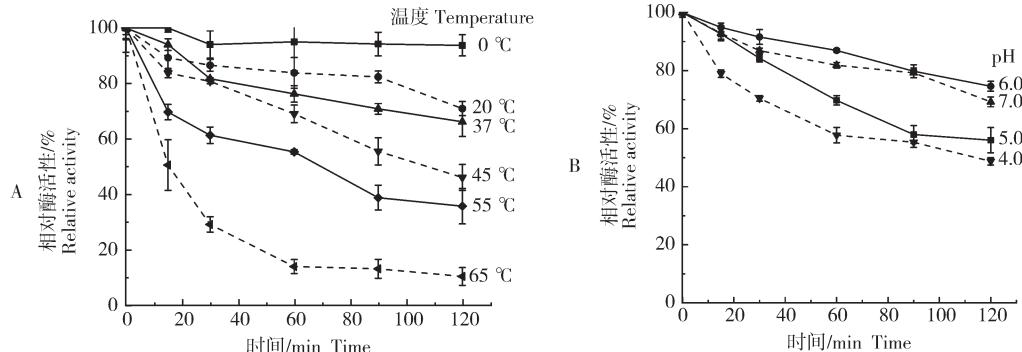


图4 Ba8a蛋白的热稳定性(A)和pH(B)稳定性

Fig. 4 Effects of temperatures (A) and pH (B) on the Ba8a protein stability

### 3 讨 论

$\alpha$ -淀粉酶在改善饲料品质,提高动物肠道对淀粉的吸收利用方面具有重要价值,Motahar等<sup>[20]</sup>、Ramlucken等<sup>[21-22]</sup>报道,在补充饲料中使用稳定酶可通过增加总还原糖浓度来提高养分利用率,表明 $\alpha$ -淀粉酶对于动物饲料的生物降解具有极好的潜力。本研究从牛胃秸秆发酵物中筛选获得1株高产 $\alpha$ -淀粉酶的枯草芽孢杆菌SCUEC8菌株,并以SCUEC8菌株的总DNA为模板,扩增获得 $\alpha$ -淀粉酶基因ba8a,大小为1 434 bp,Ba8a蛋白分子质量为52.9 ku;在pH 5.0、45 °C条件下,Ba8a蛋白相对酶活性较高;Mn<sup>2+</sup>对Ba8a蛋白酶活性具有较高促进作用,Cu<sup>2+</sup>对Ba8a蛋白酶活性具有较高抑制作用;在pH 6.0、0 °C条件下,

Ba8a蛋白较稳定。

目前已经报道的 $\alpha$ -淀粉酶Amy486蛋白催化的最适pH值为7.5、最适温度为35 °C,Amy486蛋白在pH 7.5条件下较稳定<sup>[23]</sup>。Fjamy2蛋白最适反应温度为40 °C、最适pH值为5.0,Ca<sup>2+</sup>对Fjamy2蛋白酶活有促进作用,Mn<sup>2+</sup>对Fjamy2蛋白酶活有抑制作用<sup>[24]</sup>。AmyL蛋白最适反应温度为45 °C、最适反应pH值为6.0,Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>能提高淀粉酶AmyL的稳定性<sup>[25]</sup>。TdAmyA的最适反应温度为50 °C、最适反应pH值为6.5<sup>[26]</sup>。Amy3淀粉酶的最适温度为55 °C、最适pH值为5.5,在pH 5.0~5.5、0~4 °C条件下稳定性最高。巨型芽孢杆菌产 $\alpha$ -淀粉酶在最适温度35 °C、最适pH 6.0、淀粉最适质量浓度40 g/L条件下产淀粉酶最高(101.44 U/mL)<sup>[27]</sup>。Ba8a蛋白与目

前已经报道的 $\alpha$ -淀粉酶蛋白相比,Ba8a蛋白催化最适pH较低,具有耐酸性,最适反应温度较低,稳定性较好,表明枯草芽孢杆菌SCUEC8菌株在动物饲料中有良好应用前景。

## 参考文献 References

- [1] FAROOQ M A, ALI S, HASSAN A, et al. Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: a review [J]. *Archives of microbiology*, 2021, 203(4): 1281-1292.
- [2] JUJJAVARAPU S E, DHAGAT S. Evolutionary trends in industrial production of  $\alpha$ -amylase [J]. *Recent patents on biotechnology*, 2019, 13(1): 4-18.
- [3] SINDHU R, BINOD P, MADHAVAN A, et al. Molecular improvements in microbial  $\alpha$ -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency [J]. *Bioresource technology*, 2017, 245 (Pt B): 1740-1748.
- [4] DOU S H, CHI N Y, ZHOU X S, et al. Molecular cloning, expression, and biochemical characterization of a novel cold-active  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. dsh19-1 [J]. *Extremophiles*, 2018, 22(5): 739-749.
- [5] XU Q R, CAO Y, LI X, et al. Purification and characterization of a novel intracellular  $\alpha$ -amylase with a wide variety of substrates hydrolysis and transglycosylation activity from *Paenibacillus* sp. SSG-1 [J]. *Protein expression and purification*, 2018, 144: 62-70.
- [6] AL-JOHANI N B, AL-SEENI M N, AHMED Y M. Optimization of alkaline  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis* [J]. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*, 2016, 14(1): 288-301.
- [7] GOPINATH S C B, ANBU P, ARSHAD M K, et al. Biotechnological processes in microbial amylase production [J/OL]. *BioMed research international*, 2017: 1272193 [2024-09-25]. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>.
- [8] KIZHAKEDATHIL M P, SUBATHRA D C. Acid stable  $\alpha$ -amylase from *Pseudomonas balearica* VITPS19: production, purification and characterization [J/OL]. *Biotechnology reports*, 2021, 30: e00603 [2024-09-25]. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00603>.
- [9] ARABACI N, ARIKAN B. Isolation and characterization of a cold-active, alkaline, detergent stable  $\alpha$ -amylase from a novel bacterium *Bacillus subtilis* N8 [J]. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 2018, 48(5): 419-426.
- [10] SIMAIR A A, QURESHI A S, KHUSHK I, et al. Production and partial characterization of  $\alpha$ -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications [J/OL]. *BioMed research international*, 2017: 9173040 [2024-09-25]. <https://doi.org/10.1155/2017/9173040>.
- [11] WANG S H, JEYASEELAN J, LIU Y, et al. Characterization and optimization of amylase production in Wang LB, a high amylase-producing strain of *Bacillus* [J]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2016, 180(1): 136-151.
- [12] SALMAN T, KAMAL M, AHMED M, et al. Medium optimization for the production of amylase by *Bacillus subtilis* RM16 in shake-flask fermentation [J]. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 2016, 29(2): 439-444.
- [13] DASH B K, RAHMAN M M, SARKER P K. Molecular identification of a newly isolated *Bacillus subtilis* BI19 and optimization of production conditions for enhanced production of extracellular amylase [J/OL]. *BioMed research international*, 2015, 2015: 859805 [2024-09-25]. <https://doi.org/10.1155/2015/859805>.
- [14] ALEEM B, RASHID M H, ZEB N, et al. Random mutagenesis of super koji (*Aspergillus oryzae*): improvement in production and thermal stability of  $\alpha$ -amylases for maltose syrup production [J/OL]. *BMC microbiology*, 2018, 18(1): 200 [2024-09-25]. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1345-y>.
- [15] OJHA S K, SINGH P K, MISHRA S, et al. Response surface methodology based optimization and scale-up production of amylase from a novel bacterial strain, *Bacillus aryabhatai* KI-IT BE-1 [J/OL]. *Biotechnology reports*, 2020, 27: e00506 [2024-09-25]. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00506>.
- [16] ADERIBIGBE A, COWIESON A, SORBARA J O, et al. Intestinal starch and energy digestibility in broiler chickens fed diets supplemented with  $\alpha$ -amylase [J]. *Poultry science*, 2020, 99 (11): 5907-5914.
- [17] SCHRAMM V G, MASSUQUETTO A, BASSI L S, et al. Exogenous  $\alpha$ -amylase improves the digestibility of corn and corn-soybean meal diets for broilers [J/OL]. *Poultry science*, 2021, 100 (4): 101019 [2024-09-25]. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101019>.
- [18] 东秀珠, 周宇光, 朱红惠, 等. 常见细菌与古菌系统分类鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2023: 129-163. DONG X Z, ZHOU Y G, ZHU H H, et al. *Handbook for the systematic classification and identification of common bacteria and archaea* [M]. Beijing: Science Press, 2023: 129-163 (in Chinese).
- [19] 姚家成, 夏珍珍, 黄粤, 等. 根瘤土壤杆菌SCUEC1菌株尼古丁降解代谢中 $agnH$ 基因的克隆表达与纯化 [J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(2): 81-87. YAO J C, XIA Z Z, HUANG Y, et al. Cloning, expression and purification of  $agnH$  gene in nicotine degradation and metabolism of *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1 strain [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(2): 81-87 (in Chinese with English abstract).
- [20] MOTAHER S F S, KHATIBI A, SALAMI M, et al. A novel metagenome-derived thermostable and poultry feed compatible  $\alpha$ -amylase with enhanced biodegradation properties [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2020, 164: 2124-2133.
- [21] RAMLUCKEN U, ROETS Y, RAMCHURAN S O, et al.

- Isolation, selection and evaluation of *Bacillus* spp. as potential multi-mode probiotics for poultry [J]. Journal of general and applied microbiology, 2020, 66(4):228-238.
- [22] RAMLUCKEN U, RAMCHURAN S O, MOONSAMY G, et al. Production and stability of a multi-strain *Bacillus* based probiotic product for commercial use in poultry [J/OL]. Biotechnology reports, 2021, 29: e00575 [2024-09-25]. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00575>.
- [23] 陈新,高欢欢,汪斌,等.生淀粉水解  $\alpha$ -淀粉酶 Amy486 的重组表达和性质分析 [J].生物学杂志,2024,41(2):16-24. CHEN X, GAO H H, WANG B, et al. Recombinant expression and biochemical characterization of the raw starch digesting  $\alpha$ -amylase Amy486 [J]. Journal of biology, 2024, 41(2): 16-24 (in Chinese with English abstract).
- [24] 丁梦瑶,谢会芳,杨江科.约氏黄杆菌 HSL13 中新型  $\alpha$ -淀粉酶的表达及酶学性质初探 [J].生物技术,2020,30(6):525-530. DING M Y, XIE H F, YANG J K. Expression of novel  $\alpha$ -amylase and study of enzymatic properties from *Flavobacterium* *johsoniae* HSL13 [J]. Biotechnology, 2020, 30(6): 525-530 (in Chinese with English abstract).
- [25] 赵海燕,宋晨斌,刘正亚,等.来源于 *Laceyella* sp. 的  $\alpha$ -淀粉酶基因克隆、重组表达及酶学性质研究 [J].生物技术通报,2020,36(8):23-33. ZHAO H Y, SONG C B, LIU Z Y, et al. Cloning, recombinant expression and enzymatic properties of  $\alpha$ -amylase gene from *Laceyella* sp. [J]. Biotechnology bulletin, 2020, 36(8):23-33 (in Chinese with English abstract).
- [26] WANG Y C, ZHAO N, MA J W, et al. High-level expression of a novel  $\alpha$ -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production [J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 127: 683-692.
- [27] BHATT K, LAL S, SRINIVASAN R, et al. Molecular analysis of *Bacillus velezensis* KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase [J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 164:3332-3339.

## Isolation and identification of $\alpha$ -amylase producing bacteria and enzymatic characteristics of Ba8a protein

YU Zhen<sup>1</sup>, XU Yurong<sup>2</sup>, WU Zhekuan<sup>1</sup>, ZHANG Jingyi<sup>2</sup>,  
ZHANG Xiaoyu<sup>2</sup>, FENG Ting<sup>2</sup>, CHENG Guojun<sup>2</sup>, LI Xiaohua<sup>2</sup>, RAO Xiongfei<sup>1</sup>

1. Hubei Academy of Tobacco Sciences, Wuhan 430030, China;

2. College of Life Sciences/Hubei Provincial Engineering and Technology Center for Resources and Utilization of Microbiology, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China

**Abstract** A high-yield strain of  $\alpha$ -amylase, named as SCUEC8 strain, was isolated from fermented straw in bovine stomach with selective culture medium to solve the problem of decomposing crop straw. The strain isolated was identified as *Bacillus subtilis* based on the morphological observation and physiological and biochemical characteristics combined with comparative analysis of 16S rDNA sequence. The genomic DNA of SCUEC8 strain was used as template to amplify the *ba8a* gene of  $\alpha$ -amylase by PCR. The recombinant plasmid pET28a (+)-*ba8a* was constructed and transformed into the *E. coli* BL21 strain for heterologous expression to further analyze the enzymatic characteristics of Ba8a protein expressed. The results showed that the length of *ba8a* gene was 1 434 bp, and the molecular weight of the Ba8a protein was 52.9 ku. The relative enzyme activity of Ba8a protein was relatively high with pH 5.0 and a reaction temperature of 45 °C.  $Mn^{2+}$  had a higher effect on promoting the enzyme activity of Ba8a protein, while  $Cu^{2+}$  had a higher effect on inhibiting the enzyme activity of Ba8a protein. Ba8a protein was relatively stable at pH 6.0 and temperature 0 °C. It is indicated that the *Bacillus subtilis* SCUEC8 strain has the activity of  $\alpha$ -amylase, which helps to improve the degradation rate of crop straw.

**Keywords**  $\alpha$ -amylase; *Bacillus subtilis* SCUEC8 strain; *ba8a* gene; enzymatic characteristics

(责任编辑:张志钰)