

文章编号:1008-1542(2020)05-0433-09

抗植物软腐病枯草芽孢杆菌的 高密度发酵优化

任玉文¹,任媛媛¹,刘雅祯²,卢天华¹,刘力强¹,周晓辉¹

(1.河北科技大学生物科学与工程学院 河北石家庄 050018;2.张家口市崇礼区农业农村局,河北张家口 076350)

摘要:为提高菌体产量,以益生菌枯草芽孢杆菌 Asr 作为发酵菌株,采用正交试验法和响应面法,对枯草芽孢杆菌 Asr 的发酵工艺进行了优化研究。结果表明,影响菌体产量最主要的3个因素为酵母浸粉、MgSO₄ 和 CaCl₂;最佳发酵培养基配方为蔗糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 8.65 g/L, K₂HPO₄ 3.0 g/L, MgSO₄ 0.27 g/L, CaCl₂ 0.53 g/L;最佳培养条件为温度 37 °C、初始 pH 值 7.0、接种量 10%、搅拌转速 250 r/min;应用优化配方及工艺,枯草芽孢杆菌 Asr 的最高产量达到 7.30×10⁸ cfu/mL,菌体产量较优化前提提高了 3.95 倍。研究结果可为后续菌体发酵罐的扩大培养提供技术支撑,对其他枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化研究提供借鉴。

关键词:发酵工程;枯草芽孢杆菌;发酵工艺;正交法;响应面法;优化

中图分类号:TS202.1 文献标识码:A doi:10.7535/hbkd.2020yx05007

Optimization of high-density fermentation for *Bacillus subtilis* resistant to plant soft rot

REN Yuwen¹, REN Yuanyuan¹, LIU Yazhen², LU Tianhua¹, LIU Liqiang¹, ZHOU Xiaohui¹

(1. School of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2. Agricultural and Rural Bureau of Chongli District in Zhangjiakou City, Zhangjiakou, Hebei 076350, China)

Abstract: In order to increase yield, take the *Bacillus subtilis* Asr as the expression strain, the fermentation process of *Bacillus subtilis* Asr was optimized by orthogonal test and response surface method. The results show that three main factors affecting bacterial yield are leaching yeast powder, MgSO₄ and CaCl₂. The best fermentation medium formulation is as following: sucrose 20 g/L, peptone 10 g/L, leaching yeast powder 8.65 g/L, K₂HPO₄ 3.0 g/L, MgSO₄ 0.27 g/L and CaCl₂ 0.53 g/L.

收稿日期:2020-06-19;修回日期:2020-09-10;责任编辑:王淑霞

基金项目:河北省科技计划重点专项(17223608D);河北省自然科学基金(C2018208168);河北省自然科学基金(C2020208020)

第一作者简介:任玉文(1994—),女,安徽阜阳人,硕士研究生,主要从事蛋白表达与纯化方面的研究。

通讯作者:周晓辉教授。E-mail:zhouxh2003@aliyun.com

任玉文,任媛媛,刘雅祯,等.抗植物软腐病枯草芽孢杆菌的高密度发酵优化[J].河北科技大学学报,2020,41(5):433-441.

REN Yuwen, REN Yuanyuan, LIU Yazhen, et al. Optimization of high-density fermentation for *Bacillus subtilis* resistant to plant soft rot [J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2020, 41(5): 433-441.

The optimal culture conditions are as following: 37 °C, initial pH 7.0, inoculum of 10% and stirring speed of 250 r/min. After the optimization, the highest yield of *Bacillus subtilis* Asr reaches 7.30×10^8 cfu/mL, which is 3.95 times higher than that before optimization. The study provides a technical reference for the subsequent bacterial scale-up culture in fermentor and the optimization of fermentation medium from other *Bacillus subtilis*.

Keywords: fermentation engineering; *Bacillus subtilis*; fermentation process; orthogonal method; response surface method; optimization

植物软腐病是由果胶杆菌属细菌引起的植物病害, 侵染植物组织或器官, 对中国农业生产造成了巨大危害^[1], 近年来由植物软腐病造成的农业损失数不胜数。如广东省的香蕉软腐病, 最高发病率可达 50%^[2]; 北京通州地区 2.5×10^7 m² 的芹菜软腐病, 使植株整体腐烂死亡, 造成绝产^[3]; 河北暴发的黄瓜软腐病, 区域发病率最高可达到 50%, 产量损失严重^[4]。目前对植物软腐病的防治方法有合理轮作、避免机械损伤、喷洒农药或植物水提液^[5-8]等, 这些方法不仅增加了人力消耗, 还会造成环境污染、危害人体健康。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)系芽孢杆菌属的一种, 广泛分布于土壤及腐败的有机物中, 适宜在枯草浸泡液中繁殖^[9-12]。枯草芽孢杆菌是一种优良的生防菌和食品级益生菌^[13-14], 具有很强的脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶等酶活性, 代谢旺盛, 对人畜无害, 不污染环境, 在食品、饲料和农业方面应用广泛^[15-17]。在其生长过程中分泌细菌素、脂肽类化合物、有机酸类物质等, 可有效抑制病原菌的生长或溶解病原菌^[18], 因此在天然食品防腐和田间防治等方面^[19]具有十分重要的意义。

在食品研究领域中, 可通过优化发酵培养基提高枯草芽孢杆菌野生型菌株产酶或抗菌肽的能力^[20-24]。本研究所用的枯草芽孢杆菌 Asr, 能够表达 CpxP 蛋白。经实验室前期研究发现, CpxP 蛋白对含有软腐病胡萝卜的抑菌率达到 44.89%, 对马铃薯切片的抑菌率达到 59.41%^[25]。枯草芽孢杆菌 Asr 是将益生菌和抗菌蛋白进行协同作用, 代替化学农药, 有效抑制植物软腐病的发生, 符合“健康食品、绿色食品”的生活理念。

目前有关枯草芽孢杆菌发酵培养基优化的研究有很多^[26-27]。用这些培养基发酵枯草芽孢杆菌 Asr, 菌体产量偏低, 最高产量仅为 1.85×10^8 cfu/mL。本文以枯草芽孢杆菌 Asr 作为发酵菌株, 通过对既定的发酵培养基进行正交试验和响应面试验, 以 OD₆₀₀ 值作为最终响应结果, 确定最佳发酵培养基配方。基于最佳发酵培养基配方, 在 3 L 小型发酵罐中通过单因素试验探究最佳发酵温度、初始 pH 值、接种量及搅拌转速, 进一步优化发酵工艺, 以提高发酵液中的菌体密度, 为其应用于食品业提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Asr; 河北科技大学蛋白质工程实验室保藏。

1.1.2 主要试剂及仪器

蔗糖: 天津市百世化工有限公司; 蛋白胨、酵母浸粉: 北京市奥博星生物技术有限责任公司; 磷酸氢二钾(K₂HPO₄): 天津市鼎盛鑫化工有限公司; 氯化钠(NaCl): 天津市永晟精细化工有限公司; 硫酸镁(MgSO₄): 天津市河东区红岩试剂厂。

电子天平 T1000: 常熟市双杰测试仪器厂; 分析天平 ME104/02: 梅特勒-托利多(上海)有限公司; 电子 pH 计 STARTER3100/F: 奥豪斯(上海)有限公司; 磁力搅拌器 HJ-4AS: 江苏省金坛市荣华仪器公司; 移液器: 大龙医疗设备有限公司; 冰箱 BCD-189WDPV: 海尔公司; 超低温冷冻储存箱 DW-HL100: 中科美菱低温科技有限责任公司; 单人单面垂直净化工作台 SW-CJ-1FD、立式压力蒸汽灭菌器 YXQ-30SII: 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 恒温培养振荡器 ZWYR-4912: 上海智城分析仪器制造有限公司; 紫外可见分光光度计 UV-5800(PC): 上海元析仪器有限公司; 显微镜 BA410E: 麦克奥迪实业集团有限公司; 3 L 5BG 发酵罐: 上海保兴生物设备工程有限公司。

1.1.3 培养基配方

平板琼脂培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5.0 g/L, NaCl 10 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 值 7.0 g/L, 121 °C 条件下灭菌 20 min。种子培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5.0 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值 7.0, 121 °C 条件

下灭菌 20 min。原始发酵培养基:蔗糖 20 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 10 g/L, K_2HPO_4 3.0 g/L, $CaCl_2$ 0.30 g/L, $MgSO_4$ 0.50 g/L,pH 值 7.0,121 °C 条件下灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养条件

平板培养条件:从-80 °C 冰箱取出保藏菌株,在固体平板上划线进行菌株活化,37 °C 过夜培养。种子培养条件:挑取平板上的单菌落接种到种子培养基中,装液量 50 mL/250 mL,180 r/min,37 °C 培养 16 h。发酵培养条件:按 5%(体积分数,下同)接种量将种子液接种到装液量 50 mL/250 mL 的发酵培养基中,180 r/min,37 °C 培养至稳定期。

1.2.2 测定指标和方法

取稳定期菌液,原始发酵培养基作为空白对照,使用紫外可见分光光度计测定 OD_{600} 值。将菌液稀释到合适倍数后涂布到平板琼脂培养基上,计算活菌数。

1.2.3 菌株生长曲线的测定

将培养好的种子液,按 5%的接种量接种于 50 mL/250 mL 的锥形瓶中,180 r/min,37 °C 培养。接种后每 2 h 取样 1 次,测定菌液的 OD_{600} 值,以未接种种子液的发酵培养基作为空白对照。

1.2.4 6 因素 2 水平正交试验

根据原始发酵培养基选择 6 个因素:蔗糖,蛋白胨,酵母浸粉, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ 和 $CaCl_2$,进行 6 因素 2 水平正交试验。依据 OD_{600} 值,做 3 个平行,通过极差大小进行数据分析,确定最优因素水平组合。

1.2.5 响应面试验

根据 6 因素 2 水平正交试验结果,选择极差最大的 3 种因素,设计 3 因素 3 水平的响应面试验(Box-Behnken),如表 1 所示。试验重复 3 次,以 OD_{600} 值为响应值,确定最优发酵培养基。

1.2.6 发酵条件的优化

在优化培养基配方的基础上,分别对枯草芽孢杆菌 Asr 的培养温度(28,31,34,37,40 °C)、初始 pH 值(6.0,6.5,7.0,7.5,8.0)、接种量(1%,3%,5%,10%,15%)、搅拌转速(100,150,200,250,300 r/min)4 个发酵条件进行 3 L 小型发酵罐单因素优化试验^[28],发酵时间为 14 h,以 OD_{600} 值和活菌数作为分析参考依据。

2 结果分析

2.1 生长曲线测定结果分析

菌株在原始发酵培养基中的生长曲线如图 1 所示。由图 1 可知,在 0~2 h 处于生长延滞期,菌体密度小;2~12 h 处于生长指数期,菌体密度上升极快,菌体数量急剧增多;在 12 h 时达到峰值;12~24 h 处于生长稳定期,菌群数量维持稳定。因此选取 12 h 作为正交试验、响应面试验的测试时间,此时枯草芽孢杆菌为对数生长末期,既可以保持高的细胞活力,又可以获得尽可能多的细胞数。

2.2 6 因素 2 水平正交试验结果分析

6 因素 2 水平正交试验设计及极差分析如表 2 所示,正交试验方差分析如表 3 所示。根据极差分析结果,各因素对 OD_{600} 值的影响顺序依次是:酵母浸粉> $MgSO_4$ > $CaCl_2$ >蔗糖> K_2HPO_4 >蛋白胨;根据方差分析,酵母浸

表 1 响应面试验设计

Tab.1 Response surface experimental design

因 素	3 水平下的 OD_{600} 值		
	-1	0	1
$\rho(\text{酵母浸粉}) / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	5.0	10.0	15.0
$\rho(\text{MgSO}_4) / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.10	0.30	0.50
$\rho(\text{CaCl}_2) / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.10	0.55	1.00

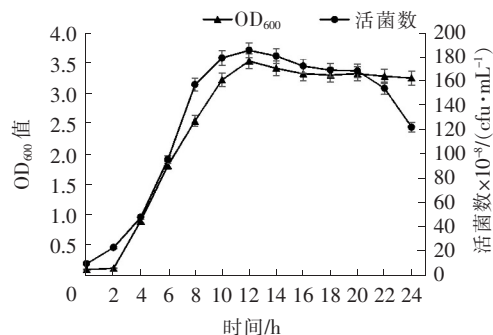


图 1 枯草芽孢杆菌 Asr 在原始发酵培养基中的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Bacillus subtilis* Asr in the original fermentation medium

表2 正交试验设计和极差分析

Tab.2 Orthogonal test design and range analysis

编号	因素						OD ₆₀₀ 值
	ρ (蔗糖)	ρ (蛋白胨)	ρ (酵母浸粉)	ρ (K ₂ HPO ₄)	ρ (CaCl ₂)	ρ (MgSO ₄)	
1	1(10)	1(10)	1(10)	1(3)	1(0.3)	1(0.3)	3.51
2	1	1	1	2(5)	2(0.5)	2(0.5)	3.78
3	1	2(20)	2(20)	1	1	2	2.91
4	1	2	2	2	2	1	3.46
5	2(20)	1	2	1	2	1	3.78
6	2	1	2	2	1	2	3.00
7	2	2	1	1	2	2	3.57
8	2	2	1	2	1	1	3.87
K ₁	3.415	3.517	3.683	3.442	3.322	3.385	—
K ₂	3.555	3.452	3.288	3.527	3.647	3.585	—
R	0.140	0.065	0.395	0.085	0.325	0.340	—

表3 正交试验方差分析

Tab.3 Analysis of variance in orthogonal experiments

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
蔗糖	0.039	1	0.487	非显著
蛋白胨	0.008	1	0.100	非显著
酵母浸粉	0.312	1	3.900	显著
K ₂ HPO ₄	0.014	1	0.175	非显著
CaCl ₂	0.211	1	2.637	显著
MgSO ₄	0.231	1	2.887	显著
误差	0.080	1	—	—

粉, MgSO₄, CaCl₂ 对 OD₆₀₀ 值具有显著影响。可以分别选择蔗糖、K₂HPO₄、蛋白胨的最好水平, 即蔗糖 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L, K₂HPO₄ 3 g/L, 通过响应面法重点考察酵母浸粉、CaCl₂ 和 MgSO₄ 3 个主要因素对菌株的影响。

2.3 响应面试验设计与结果分析

利用响应面软件 (Design Expert 8.0) 中的 Box-Behnken 设计以酵母浸粉、MgSO₄ 和 CaCl₂ 3 个因素为自变量的试验, 将 OD₆₀₀ 值作为响应值, 共有 17 个试验点, 每个试验点设 3 个平行。17 个试验点可分为 2 类: 一类是中心试验点, 中心试验点重复 5 次, 以估计试验误差^[29-31]; 另一类是非中心试验点, 共 12 个。试验设计及结果如表 4 所示。

根据响应面试验结果, 利用 Design Expert 8.0 软件对实验结果进行二元多项回归拟合, OD₆₀₀ 值对酵母浸粉(A)、MgSO₄(B)和 CaCl₂(C)的二元多项回归模拟方程为

表4 响应面试验设计及结果

Tab.4 Response surface test plan and response results

编号	酵母浸粉	MgSO ₄	CaCl ₂	OD ₆₀₀ 值
1	1	0	1	3.43
2	1	0	-1	3.43
3	-1	0	1	3.72
4	-1	0	-1	3.75
5	-1	-1	0	3.85
6	0	0	0	4.10
7	0	1	-1	3.64
8	0	0	0	4.03
9	1	-1	0	3.35
10	0	0	0	4.25
11	0	1	1	3.62
12	-1	1	0	3.75
13	0	0	0	4.14
14	1	1	0	3.11
15	0	-1	1	3.71
16	0	0	0	4.22
17	0	-1	-1	3.75

$$Y=4.15-0.21A-0.08B-0.011C-0.01A\times B+7.00A\times C+4.67B\times C-0.38A^2-0.28B^2-0.19C^2。$$

对回归模型进行方差分析,结果如表 5 所示。由表 5 可知,酵母浸粉和 $MgSO_4$ 对 OD_{600} 值均具有显著影响($P<0.05$),回归模型 P 值 <0.01 ,达到极显著水平,失拟项的 P 值 >0.05 ,为不显著水平。说明所构建的回归模型显著,能够真实反映试验情况。决定系数 $R^2=0.9635$,修正决定系数 $R^2=0.9166>0.9000$,说明回归模拟程度好。

表 5 回归模型的方差分析

Tab.5 Variance analysis of regression model

方差来源	自由度	平方和	均方差	F 值	P 值
模式	9	1.60	0.18	20.54	0.000 3**
A	1	0.34	0.34	39.24	0.000 4**
B	1	0.051	0.051	5.90	0.045 4*
C	1	0.95	0.95	0.12	0.742 6
AB	1	3.65	3.65	0.046	0.836 1
AC	1	2.05	2.05	0.026	0.876 6
BC	1	0.91	0.91	0.012	0.917 5
A^2	1	0.61	0.61	70.02	$<0.000 1^{**}$
B^2	1	0.34	0.34	38.68	0.000 4**
C^2	1	0.15	0.15	17.48	0.004 1**
残差	7	0.061	8.09	—	—
失拟项	3	0.030	0.010	1.34	0.379 7
纯误差	4	0.030	7.06	—	—
所有项	16	1.66	—	—	—

注: * 表示存在显著差异; ** 表示存在极显著差异。

为进一步研究相关变量因素之间的交互作用,确定最优点,利用软件分析二次回归模型,绘制了 3 个影响因素之间的响应面分析立体图和等高线图,如图 2 所示。图 2 中等高线均呈椭圆形,表明各因素的交互作用显著^[32],同时得到最佳培养基配方为酵母浸粉 8.65 g/L, $MgSO_4$ 0.27 g/L, $CaCl_2$ 0.53 g/L。经过 3 次重复试验, OD_{600} 值达到 4.18,相比培养基优化前,提高了 17%;菌数平均数从 1.85×10^8 cfu/mL 提高到 3.25×10^8 cfu/mL,提高到培养基优化前的 1.76 倍。

2.4 培养条件的优化

2.4.1 不同培养温度对菌株发酵产量的影响

低温和高温对枯草芽孢杆菌 Asr 的生长均有不同程度的影响,温度过高或过低都会延迟枯草芽孢杆菌的生长,降低生物合成量。在 28~40 °C 温度范围内,出现生长拐点,37 °C 时 OD_{600} 值最大(见图 3 a))。因此枯草芽孢杆菌 Asr 的最适宜发酵温度为 37 °C。

2.4.2 不同初始 pH 值对菌株发酵产量的影响

初始 pH 值高呈碱性,会破坏枯草芽孢杆菌细胞膜的电荷,从而降低枯草芽孢杆菌对营养物质的吸收及利用率;pH 值低呈酸性,会降低菌体细胞内多种酶的活性^[31]。初始 pH 值为 7.0 时,与其他初始 pH 值组 D_{600} 值存在较大差异;当培养液初始 pH 值为 7.5 时,发酵液 OD_{600} 值开始显著下降(见图 3 b))。因此,枯草芽孢杆菌 Asr 最适宜初始 pH 值为 7.0。

2.4.3 不同接种量对菌株发酵产量的影响

枯草芽孢杆菌接种量过大,会导致发酵液中初始菌浓度偏高,减小菌体扩增倍数,抑制菌体代谢生长,还会导致菌体溶氧量的竞争性抑制,降低菌体活性和生产效益;接种量过小,则会降低单位时间内的产量^[33];

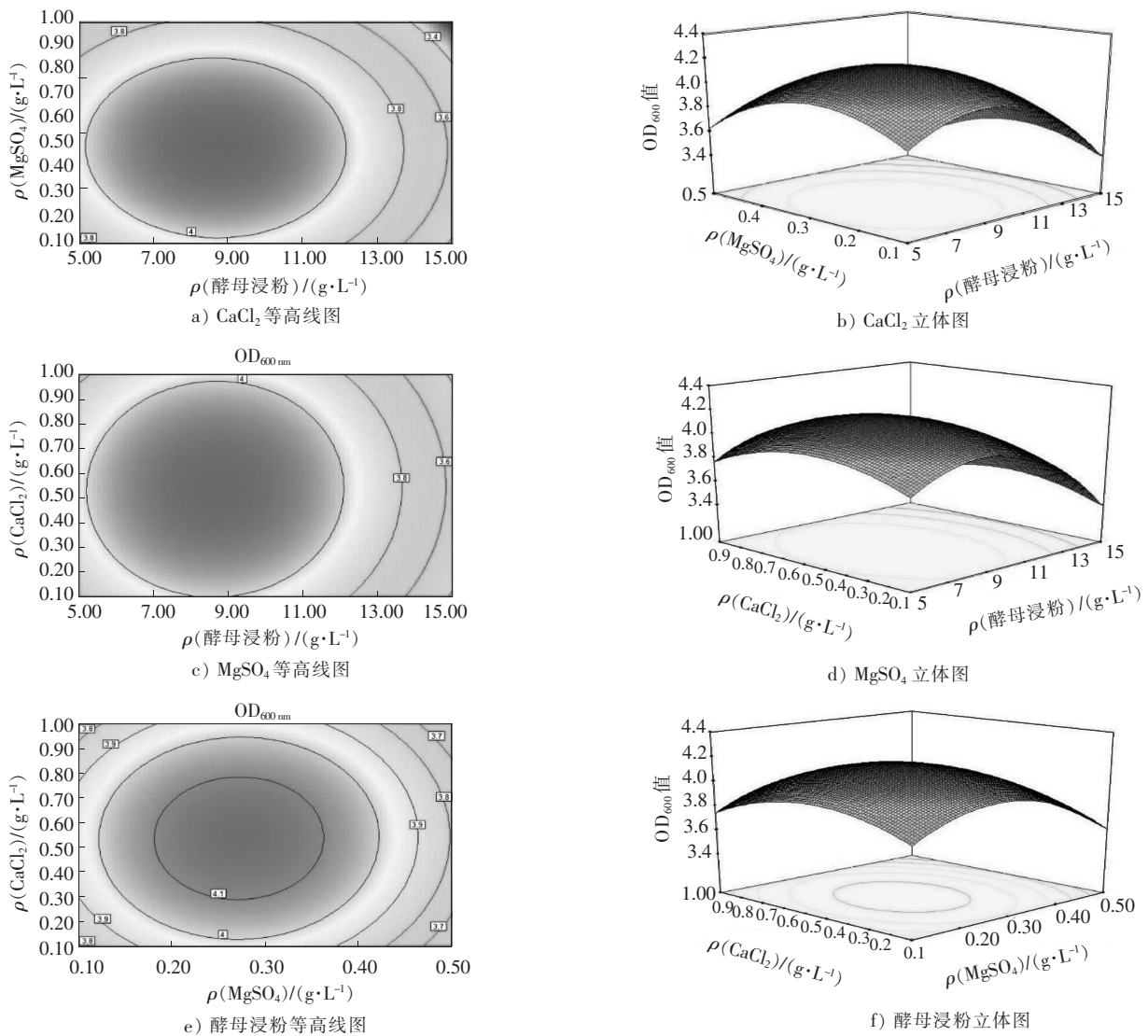


图2 CaCl_2 , MgSO_4 和酵母浸粉对 OD_{600} 值的影响

Fig.2 Effect of CaCl_2 , MgSO_4 and yeast extract on OD_{600}

当接种量为 10% 时, OD_{600} 值最大(见图 3 c))。因此得出, 枯草芽孢杆菌 *Asr* 最适宜接种量为 10%。

2.4.4 不同搅拌转速对菌株发酵产量的影响

搅拌转速的主要作用是调节培养基溶氧量, 满足枯草芽孢杆菌对氧气的需求。转速过快会造成培养基分层, 对菌体产生机械损伤, 造成菌体衰亡, 菌体数量减少; 转速过慢, 溶氧量不足, 培养基易形成沉淀, 不利于菌体的生长和繁殖^[33]。当搅拌转速达到 250 r/min 时, OD_{600} 值最大(见图 3 d))。因此, 枯草芽孢杆菌 *Asr* 的最适宜搅拌转速为 250 r/min。

3 结果与讨论

枯草芽孢杆菌 *Asr* 的菌体产量与培养基成分和发酵条件有关。本研究显示, 培养基成分中酵母浸粉对菌体产量的影响最大, 与已有文献的研究结果一致。可能是由于酵母浸粉中含有丰富的蛋白质等营养物质, 能够被菌株快速吸收, 从而促进菌株的生长繁殖。在发酵工业中, 接种量的大小直接影响活菌数量的增长, 较大的接种量可以使菌株快速生长繁殖, 增大菌株活力, 但过大的接种量会使菌株过早老化, 影响菌体产量^[34-35]。本研究得出枯草芽孢杆菌 *Asr* 的最佳接种量为 10%。

本研究采用的初始发酵培养基与大多数研究学者采用枯草芽孢杆菌发酵所用培养基成分一致^[26-27], 但对枯草芽孢杆菌 *Asr* 的发酵能力偏低, 因此前期试验对培养基成分中的无机盐进行了调整, 作为本研究的

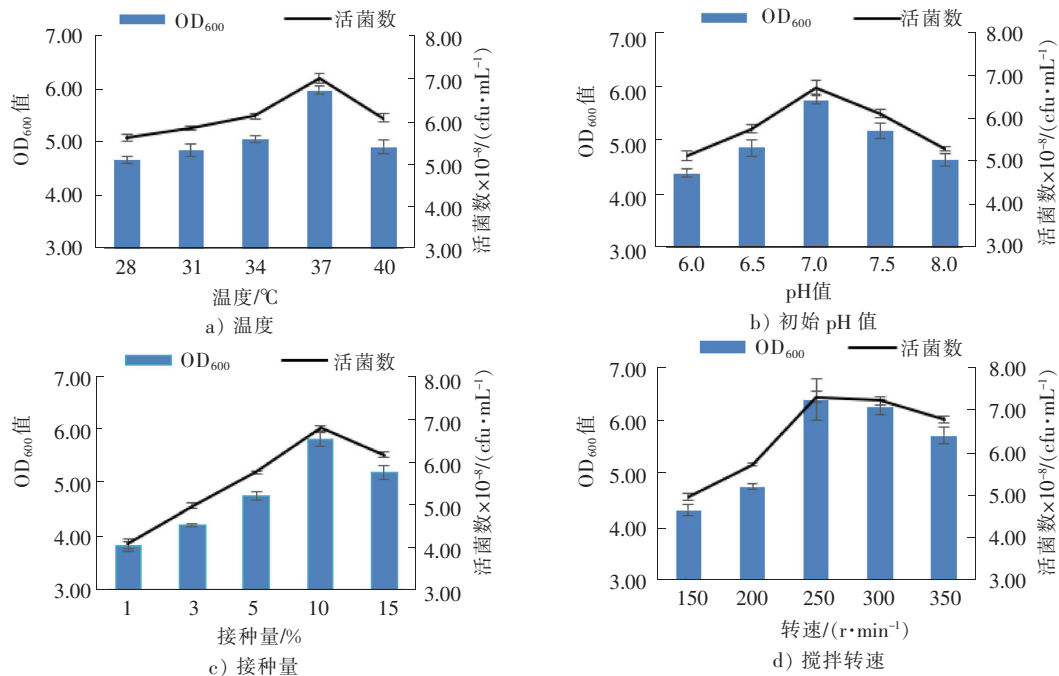


图 3 不同培养温度、初始 pH 值、接种量、搅拌转速对菌株发酵产量的影响

Fig.3 Effects of different culture temperature, initial pH, inoculum size and stirring speed on the fermentation yield of the strains

原始发酵培养基。采用正交试验、响应面试验对既定培养基的发酵工艺进行优化,提高了枯草芽孢杆菌 Asr 的菌体产量;得出最佳培养基配方为蔗糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 8.65 g/L, K₂HPO₄ 3.0 g/L, MgSO₄ 0.27 g/L, CaCl₂ 0.53 g/L;最佳培养条件为温度 37 °C、初始 pH 值 7.0、接种量 10%、搅拌转速 250 r/min。应用优化配方及工艺,枯草芽孢杆菌 Asr 菌株最高产量可达到 7.30×10^8 cfu/mL,菌体产量较优化前提高了 3.95 倍。研究结果可为后续发酵罐的扩大培养、提高菌体产量提供技术支持,也可为其他枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化研究提供借鉴。

本研究仅在摇瓶和 3 L 发酵罐条件下对枯草芽孢杆菌 Asr 菌株的发酵工艺进行了初步探索,对该菌的产芽孢量及发酵过程中抗菌蛋白的增加量尚有待作进一步的研究。后期还需在工厂 10 t 发酵罐进行放大试验,逐步实现产业化生产。

参考文献/References:

- [1] 王迪轩,谢梦纯.怎样识别与防治胡萝卜细菌性软腐病? [J].农药市场信息,2013(27): 44.
- [2] 蒲小明,林壁润,沈会芳,等.防控香蕉细菌性软腐病绿色药剂筛选[J].广东农业科学,2010,37(9): 44-45.
PU Xiaoming, LIN Birun, SHEN Huifang, et al. The chemical control of soft rot of banana caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) [J]. Guangdong Agricultural Science, 2010, 37(9): 44-45.
- [3] 晋知文,宋加伟,谢学文,等.芹菜细菌性软腐病病原的分离与鉴定[J].植物病理学报,2016,46(3): 304-312.
JIN Zhiwen, SONG Jiawei, XIE Xuewen, et al. Isolation and identification of the pathogen causing celery bacterial soft rot [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2016, 46(3): 304-312.
- [4] MENG X L, GHAI A L, SHI Y X, et al. Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China [J]. Plant Disease, 2017, 101(2): 279.
- [5] 代艳娜,刘青海,潘虎,等.大白菜软腐病登记农药及防治效果分析[J].农业与技术,2020,40(9): 15-19.
- [6] 贺理,陈洁,陈曦,等.四种植物水提液对胡萝卜软腐病菌的抑制效果研究[J].生物化工,2018,4(4): 40-43.
HE Li, CHEN Jie, CHEN Xi, et al. Preliminary study on the inhibitory effect of water extracts of several plant on carrot soft rot germs [J]. Biochemistry, 2018, 4(4): 40-43.
- [7] 韩凤英,杨慧,杨向黎,等.4种杀菌剂对白菜软腐病的田间防效[J].安徽农业科学,2018,46(20): 125-126.

- HAN Fengying, YANG Hui, YANG Xiangli, et al. Control effect of 4 kinds of fungicides against Chinese cabbage soft rot[J]. *Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(20): 125-126.
- [8] 石延霞, 孟姗姗, 陈璐, 等. 李宝聚博士门诊手记(七十一) 芹菜根腐类病害的病原菌鉴定及新型防治技术[J]. *中国蔬菜*, 2014(6): 71-73.
- [9] 丁明亮, 欧阳安然, 王望斐, 等. 枯草芽孢杆菌产凝乳酶发酵条件的优化[J]. *食品科学*, 2011, 32(3): 156-160.
DING Mingliang, OUYANG Anran, WANG Wangfei, et al. Optimizing the fermentation process for milk-clotting enzyme production by *Bacillus subtilis*[J]. *Food Science*, 2011, 32(3): 156-160.
- [10] 张武云, 殷辉, 周建波, 等. 枯草芽孢杆菌 LF17 生物学特性研究[J]. *中国农技推广*, 2019, 35(1): 80-83.
- [11] 叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 等. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(9): 1339-1346.
YE Yunfeng, LI Qiqin, YUAN Gaoqing, et al. Optimization of culture medium and fermentation conditions for high production of antimicrobial substance by *Bacillus subtilis* strain B47[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(9): 1339-1346.
- [12] 闫杨, 刘月静, 陈芳. 枯草芽孢杆菌的应用现状概述[J]. *生物学教学*, 2019, 44(2): 2-3.
- [13] KIERS J L, VANLAEKEN A E A, ROMBOUITS F M, et al. In vitro digestibility of bacillus fermented soya bean[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 60(2/3): 163-169.
- [14] DELPHINE D, KASS B H, VINCENT G, et al. In situ localization and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2008, 8(18): 3682-3691.
- [15] 袁蕊, 王学江, 李峰. 一株枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. *化学与生物工程*, 2019, 36(7): 35-38.
YUAN Rui, WANG Xuejiang, LI Feng. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* and its fermentation condition optimization[J]. *Chemistry and Bioengineering*, 2019, 36(7): 35-38.
- [16] DEEPAK V, KALISHWARALAL K, RAMKUMARPANDIAN S, et al. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(17): 8170-8174.
- [17] 宋立立, 张泽生. 枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶发酵条件的优化[J]. *饲料研究*, 2020, 43(4): 66-70.
SONG Lili, ZHANG Zesheng. Optimization of fermentation conditions for *Bacillus subtilis* to produce neutral protease[J]. *Feed Research*, 2020, 43(4): 66-70.
- [18] 聂利波, 李旺, 史敦胜, 等. 产纤维素酶枯草芽孢杆菌 Kpg 酶学性质研究及对麸皮纤维素含量的影响[J]. *家畜生态学报*, 2018, 39(12): 25-30.
NIE Libo, LI Wang, SHI Dunsheng, et al. Enzyme activity analysis of cellulase-producing *Bacillus subtilis* Kpg and its effect on the cellulose content in the bran[J]. *Acta Ecologicae Animalis Domesticae*, 2018, 39(12): 25-30.
- [19] 高兆建, 樊陈, 鞠民友, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌肽在食品防腐中的应用性研究[J]. *徐州工程学院学报(自然科学版)*, 2013, 28(2): 67-72.
GAO Zhaojian, FAN Chen, JU Minyou, et al. Study on applications of antimicrobial peptides from *Bacillus subtilis* in food preservation[J]. *Journal of Xuzhou Institute of Technology(Natural Science Edition)*, 2013, 28(2): 67-72.
- [20] 张雯, 倪莉, 陈雅静, 等. 枯草芽孢杆菌 BS08 对大黄鱼腐败菌的抑制及培养基优化[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(8): 102-109.
ZHANG Wen, NI Li, CHEN Yajing, et al. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* BS08 on spoilage bacteria isolated from *Pseudosciaena crocea* and optimization of fermentation medium for BS08[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(8): 102-109.
- [21] 卢超, 陈景鲜, 王国霞, 等. 枯草芽孢杆菌 L07 产中性蛋白酶发酵条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(16): 148-153.
LU Chao, CHEN Jingxian, WANG Guoxia, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of neutral protease by *Bacillus subtilis* L07[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2020, 46(16): 148-153.
- [22] 付云, 赵谋明, 庞一扬, 等. 源自螺旋藻渣枯草芽孢杆菌发酵抗菌肽 SP-AP-1 和 Iturin A 对金黄色葡萄球菌抑菌机制对比研究[J/OL]. *食品科学*, [2020-05-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200313.1703.050.html>.
FU Yun, ZHAO Mouming, PANG Yiyang, et al. Comparative study on the antibacterial mechanism of SP-AP-1 and Iturin A in the fermentation of *Bacillus subtilis* from spirulina residue against *Staphylococcus aureus*[J/OL]. *Food Science*, [2020-05-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200313.1703.050.html>.
- [23] 刘颖, 张彬彬, 孙冰玉, 等. 枯草芽孢杆菌高产中性蛋白酶发酵条件的优化[J]. *食品科学*, 2014, 35(13): 166-170.
LIU Ying, ZHANG Binbin, SUN Bingyu, et al. Optimization of fermentation conditions for production of neutral protease by *Bacillus subtilis* 10075[J]. *Food Science*, 2014, 35(13): 166-170.
- [24] 胡敏, 郝林, 贾丽艳. 枯草芽孢杆菌产细菌素发酵条件的优化[J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 198-202.
HU Min, HAO Lin, JIA Liyan, et al. Optimizing fermentation conditions for production of bacteriocin by *Bacillus subtilis* HJD.A32[J]. *Food Science*, 2014, 35(9): 198-202.
- [25] 苗兰天, 卢天华, 何晓亮, 等. 胡萝卜软腐果胶杆菌 CpxP 蛋白纯化及抑菌功能鉴定[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(5): 847-856.
MIAO Lantian, LU Tianhua, HE Xiaoliang, et al. Purification and bacteriostatic identification of CpxP protein from *Pectobacterium caroto-*

- vorum* subsp. *carotovorum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(5): 847-856.
- [26] 饶舜,周荣华,闵勇,等.枯草芽孢杆菌的发酵培养基优化研究[J].湖北农业科学,2018,57(21): 127-129.
RAO Ben,ZHOU Ronghua,MIN Yong, et al.Optimizing on fermentation conditions of *Bacillus subtilis* by response surface analysis methodology[J]. Hubei Agricultural Science, 2018, 57(21): 127-129.
- [27] 郭亚兰,周雨朦,吴斌,等.葡萄糖醛酸木聚糖酶在枯草芽孢杆菌中的表达及发酵条件优化[J].生物加工过程,2019,17(4): 379-384.
GUO Yalan,ZHOU Yumeng,WU Bin, et al.Expression of glucurono-xylanase in *Bacillus subtilis* and optimization of fermentation conditions[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(4): 379-384.
- [28] 丁伟,张明俐,史吉平,等.表达谷氨酸脱羧酶重组枯草芽孢杆菌的构建及其发酵条件的优化[J].食品工业科技,2015,36(23): 194-198.
DING Wei,ZHANG Mingli,SHI Jiping, et al.Construction of recombinant *Bacillus subtilis* expressing glutamate decarboxylase and the optimization of fermentation conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(23): 194-198.
- [29] VENKATESWARULU T C, PRABHAKAR K V, KUMAR R B. Optimization of nutritional components of medium by response surface methodology for enhanced production of lactase[J]. Biotechnology, 2017, 7(3): 1-9.
- [30] ZHAO Yan, LIANG Yingquan, LIU Lei, et al. Medium optimization for antifungal active substance production from *Streptomyces lydicus* using response surface methodology[J]. Transactions of Tianjin University, 2017, 23(1): 78-86.
- [31] WU Weijie, AHN B Y. Statistical optimization of medium components by response surface methodology to enhance menaquinone-7 (vitamin K₂) production by *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2018, 28(6): 902-908.
- [32] 邹高溪,赵春田,裘娟萍.生防枯草芽孢杆菌 210 发酵工艺优化[J].浙江农业学报,2017,29(5): 799-805.
ZOU Gaoxi,ZHAO Chuntian,QIU Juanping, et al.Optimization of fermentation technology of biocontrol bacterium *Bacillus subtilis* 210 by response surface analysis[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(5): 799-805.
- [33] 黄福佳,姜宁,张爱忠,等.枯草芽孢杆菌工程菌发酵技术的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2017(3): 63-67.
HUANG Fujia,JIANG Ning,ZHANG Aizhong, et al.Research progress of the fermentation technology of genetic engineering bacteria of *Bacillus subtilis*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017(3): 63-67.
- [34] 郭磊,吴鹤云,张成林,等.利用响应面法优化枯草芽孢杆菌产尿苷发酵培养基[J].食品与发酵工业,2015,41(6): 94-99.
GUO Lei,WU Heyun,ZHANG Chenglin, et al.Optimization of fermentation medium for uridine production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology[J]. Food and Fermentation Industry, 2015, 41(6): 94-99.
- [35] 李达,姜媛媛,周洋,等.饲用枯草芽孢杆菌高密度发酵培养基的优化[J].东北农业科学,2016,41(2): 104-108.
LI Da,JIANG Yuanyuan,ZHOU Yang, et al.Optimization of high density fermentation medium of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2016, 41(2): 104-108.