

文章编号: 1008-1542(2025)01-0100-08

产 CpxP 蛋白枯草芽孢杆菌的发酵优化及中试生产

董荣荣¹, 张 焕¹, 于欣然¹, 刘 浩², 周晓辉¹

(1. 河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018;

2. 河北科技大学资产与实验室管理处, 河北石家庄 050018)

摘要: 为获得产 CpxP 蛋白枯草芽孢杆菌 ZY1 液体发酵的最佳条件并制备微生态菌剂, 采用单因素试验与响应面实验对 ZY1 进行发酵工艺优化研究。结果表明: 摇瓶发酵培养基最佳碳源、氮源、无机盐分别为淀粉、豆粕、NaCl; 最优培养基配方为淀粉 2.12 g/L、豆粕 5.90 g/L、NaCl 5.21 g/L, 活菌数达到 9.63×10^8 CFU/mL, 比培养基优化前提高了 11.04 倍; 摇瓶发酵条件最佳初始 pH 值、温度、转速、接种量分别为 7.0、37 °C、200 r/min、2%, 活菌数达 1.05×10^9 CFU/mL, 比培养基优化后提高了 9.0%; 按 10% 接种量基于 5 t 发酵罐体系进行菌剂中试生产过程中, ZY1 活菌数达到 1.05×10^{11} CFU/mL, 比摇瓶优化后提高了 100 倍; 发酵结束时芽孢率达到 90%, 经喷雾干燥制备出菌剂 1 012 kg, 成品检测活菌数为 8.5×10^9 CFU/g。研究结果可为进一步开展 CpxP 蛋白在动物细菌性腹泻病生物防治功能方面的研究提供基础材料。

关键词: 蛋白质工程; CpxP 蛋白; 枯草芽孢杆菌; 发酵优化; 响应面; 中试生产

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

DOI: 10.7535/hbkd.2025yx01011

Fermentation optimization and pilot production of *Bacillus subtilis* ZY1 producing CpxP

DONG Rongrong¹, ZHANG Huan¹, YU Xinran¹, LIU Hao², ZHOU Xiaohui¹

(1. School of Food and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China;

2. Department of Asset and Laboratory Management, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: In order to obtain the optimal conditions for liquid fermentation of *Bacillus subtilis* ZY1 producing CpxP protein and prepare microecological bactericides, the fermentation process of *Bacillus subtilis* ZY1 was optimized by single factor test and response surface test. The results show that the optimal carbon source, nitrogen source and inorganic salt of fermentation medium are starch, soybean meal and NaCl, respectively. The optimal medium formulation is starch at 2.12 g/L, soybean

收稿日期: 2024-05-22; 修回日期: 2024-08-12; 责任编辑: 张士莹

基金项目: 国家药典委员会科研项目(2021Y04); 河北省自然科学基金生物医药联合基金重点项目(C2020208020); 河北省农业科技成果转化资金项目(202460101030040)

第一作者简介: 董荣荣(1998—), 女, 河南濮阳人, 硕士研究生, 主要从事 CpxP 蛋白在畜禽养殖中细菌性腹泻病防治功能方面的研究。

通信作者: 刘浩。E-mail: 390051387@qq.com

周晓辉, 教授。E-mail: zhouxh2003@aliyun.com

董荣荣, 张焕, 于欣然, 等. 产 CpxP 蛋白枯草芽孢杆菌的发酵优化及中试生产[J]. 河北科技大学学报, 2025, 46(1): 100-107.

DONG Rongrong, ZHANG Huan, YU Xinran, et al. Fermentation optimization and pilot production of *Bacillus subtilis* ZY1 producing CpxP[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2025, 46(1): 100-107.

meal at 5.90 g/L, and NaCl at 5.21 g/L, with a viable bacteria count of 9.63×10^8 CFU/mL, which is 11.04 times higher than that before the medium optimization. The optimum initial pH value, temperature, rotation speed and inoculation amount for shake flask fermentation are 7.0, 37 °C, 200 r/min and 2%, respectively. The viable bacteria number is 1.05×10^9 CFU/mL, which is 9.0% higher than that of optimized medium. During the pilot production process of the microecological bactericides based on 5 t fermentation tank system with 10% inoculated quantity, the count of viable ZY1 bacteria reaches 1.05×10^{11} CFU/mL, which is 100 times higher than that after shaker optimization. When the spore rate reaches 90% at the end of fermentation, 1 012 kg bactericides are prepared by spray drying, and the count of viable bactericide is 8.5×10^9 CFU/g. The research results can provide basic materials for further research on the biocontrol function of CpxP protein in animal bacterial diarrhea disease.

Keywords: protein engineering; CpxP protein; *Bacillus subtilis*; optimization of fermentation; response surface; pilot production

细菌性腹泻病是动物养殖中的常见疾病,对畜牧业造成较大经济损失^[1]。大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌和非伤寒杆菌等革兰氏阴性菌是引起细菌性腹泻的主要致病菌,通过引起肠道微生物菌群失衡,造成消化道代谢紊乱,导致腹泻甚至死亡。抗生素、中草药以及生物制剂等是细菌性腹泻病的常用防治手段^[2-5]。虽然抗生素治疗效果显著,但长期使用会产生多重耐药性,中国农业农村部已于 2020 年颁布退出所有促生长类药物饲料添加剂(除中药外)在动物源性食品中的使用^[6]。中草药虽然可以调节动物肠道菌群,缓解细菌性腹泻,但存在提取困难、成分复杂等问题^[7-11]。因此,生物防治成为当前防治细菌性腹泻病的研究热点。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, BS)属于芽孢杆菌属革兰氏阳性菌,具有可分泌抗菌肽、黏蛋白、有机酸等多种活性代谢产物的益生特性,常被用于畜禽及田间病害的生物防治。但 BS 功效及作用随菌株的不同而异^[12-15]。基于 BS 菌株不产生内毒素、可稳定表达外源蛋白、抗逆性强和广谱抗性等优点^[15],并针对以上 BS 单一菌株功能特异性弱、代谢产物作用机制不明确等问题,本文研究开发了具有协同抗菌作用的 ZY1 菌株,其既有 BS 特性,又拥有分泌抑制革兰氏阴性菌抗菌蛋白 CpxP 的特性。课题组前期对大肠杆菌 MG1655 标准株系进行了深入研究,发现过度表达 CpxP 蛋白会显著削弱其游动能力,暗示 CpxP 在大肠杆菌纤毛形成过程中起到抑制作用,降低了侵染能力与致病性^[16-18]。经过多序列比对和分子生物学分析,结果显示,CpxP 在蛋白水平上与志贺氏菌和沙门氏菌具有较高的同源性,可能对治疗革兰氏阴性菌引起的细菌性腹泻病具有普遍适用性。但由于 CpxP 蛋白稳定性较差、不易保存,因而 ZY1 的菌体产量偏低,仅为 8.0×10^7 CFU/mL。而微生物蛋白表达水平与合适的发酵条件息息相关,通过优化发酵培养基与发酵条件,可以充分发挥菌株的生产潜能,提高菌体产量,增加蛋白表达量,降低工业化生产成本^[19]。本研究利用枯草芽孢杆菌 ZY1 作为表达系统分泌 CpxP 蛋白,通过单因素试验和响应面实验优化发酵培养基及发酵条件^[20],利用大罐发酵技术制得高纯度高活性固体菌剂。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 ZY1,河北科技大学蛋白质工程实验室筛选并保存。

1.1.2 主要试剂

葡萄糖,北京索莱宝科技有限公司提供;蛋白胨、酵母浸粉、糊精、尿素、豆粕、豆饼粉,河北民得富生物技术有限公司提供;蔗糖、淀粉、甘油、尿素、硫酸铵、NaCl、MnSO₄、CaCO₃、KCl、MgSO₄、ZnSO₄,天津科百奥生物试剂有限公司提供。

1.1.3 仪器与设备

ZHWY-2102C 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司提供;D-1 型自动蒸汽灭菌锅,北京发恩科贸有限公司提供;HH-2 数显恒温水浴锅,金坛市杰瑞尔电器有限公司提供;JJ200 精密电子天平,常熟双杰测试仪器厂提供;EL204 型分析天平,上海民桥精密科学仪器有限公司提供;SW-CJ-2FD 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司提供;SPX-250B-II 生化培养箱,上海贺德实验设备有限公司提供;100 L、5 t

发酵罐,沧州旺发生物技术研究所有限公司提供;LPG离心喷雾干燥机,沧州旺发生物技术研究所有限公司提供。

1.1.4 培养基配方

LB固体培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂 15 g/L,pH值为7.0。LB液体培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,氯化钠 10 g/L,pH值为7.0。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化

将实验室低温保藏的枯草芽孢杆菌 ZY1 在 LB 固体培养基上划线活化菌株,于 37 °C 恒温培养箱中过夜培养。挑取固体培养基上的单菌落,接种至装液量 100 mL/250 mL 的液体培养基中,于 180 r/min、37 °C 过夜培养。按 2% 接种量将种子液接种至装液量 100 mL/250 mL 的液体培养基中,于 180 r/min、37 °C 培养至稳定期。

1.2.2 发酵培养基优化

在培养基中分别选取淀粉、糊精、甘油、葡萄糖、蔗糖作为唯一碳源,确定枯草芽孢杆菌 ZY1 的最佳碳源;分别选取蛋白胨、豆粕、尿素、酵母浸粉、硫酸铵作为唯一氮源,确定最佳氮源;分别选取 $MnSO_4$ 、 $NaCl$ 、 $CaCO_3$ 、 KCl 、 $ZnSO_4$ 、 $MgSO_4$ 作为不同无机盐种类,确定最佳无机盐;在最佳碳源、氮源、无机盐的基础上对培养基中的其他因素进一步优化。选择淀粉、豆粕、 $NaCl$ 的添加量均为 0~12.5 g/L,考察 3 个因素对枯草芽孢杆菌 ZY1 活菌数的影响,实验重复 3 次,取平均值。发酵条件均为 37 °C、180 r/min、36 h。

1.2.3 响应面实验

根据单因素试验结果,采用 Design-Expert 11 软件,依据 Box-Behnken 实验设计原理,选取淀粉(A)、豆粕(B)、 $NaCl$ (C)作为自变量,以活菌数(Y)作为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面实验进行发酵培养基优化。Box-Behnken 实验设计因素与水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验因素与水平
Tab.1 Factors and levels of Box-Behnken tests design

因素	实验水平		
	-1	0	1
淀粉(A)	0	2.5	5
豆粕(B)	2.5	5.0	7.5
$NaCl$ (C)	2.5	5.0	7.5

1.2.4 发酵条件优化

在确定发酵培养基中淀粉为碳源、豆粕为氮源、 $NaCl$ 为无机盐的基础上,分别对 ZY1 初始 pH 值(5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0)、培养温度(28、31、34、37、40、43 °C)、接种量(1%、2%、3%、4%、5%)、转速(160、180、200、220、240、260、280 r/min)4 个发酵条件进行单因素发酵优化试验,发酵时间为 36 h,以活菌数为评价指标,实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5 中试生产

以 100 L 发酵罐为种子罐,50% 装液量,采用火圈接种法接种后进行 ZY1 种子液培养。发酵罐参数设定温度为 37 °C,电机转数初始 6 h 为 120 r/min,随后为 150 r/min,罐体压力为 0.05 MPa。将培养后的种子液通过调节管路按 10% 接种量接种至 5 t 发酵罐中。基于摇瓶优化后的培养基,在 5 t 发酵罐中添加酵母膏、玉米浆干粉、硫酸锰等物质进行菌剂中试生产,发酵结束后采用 LPG 离心喷雾干燥机制备菌剂。

1.2.6 数据统计

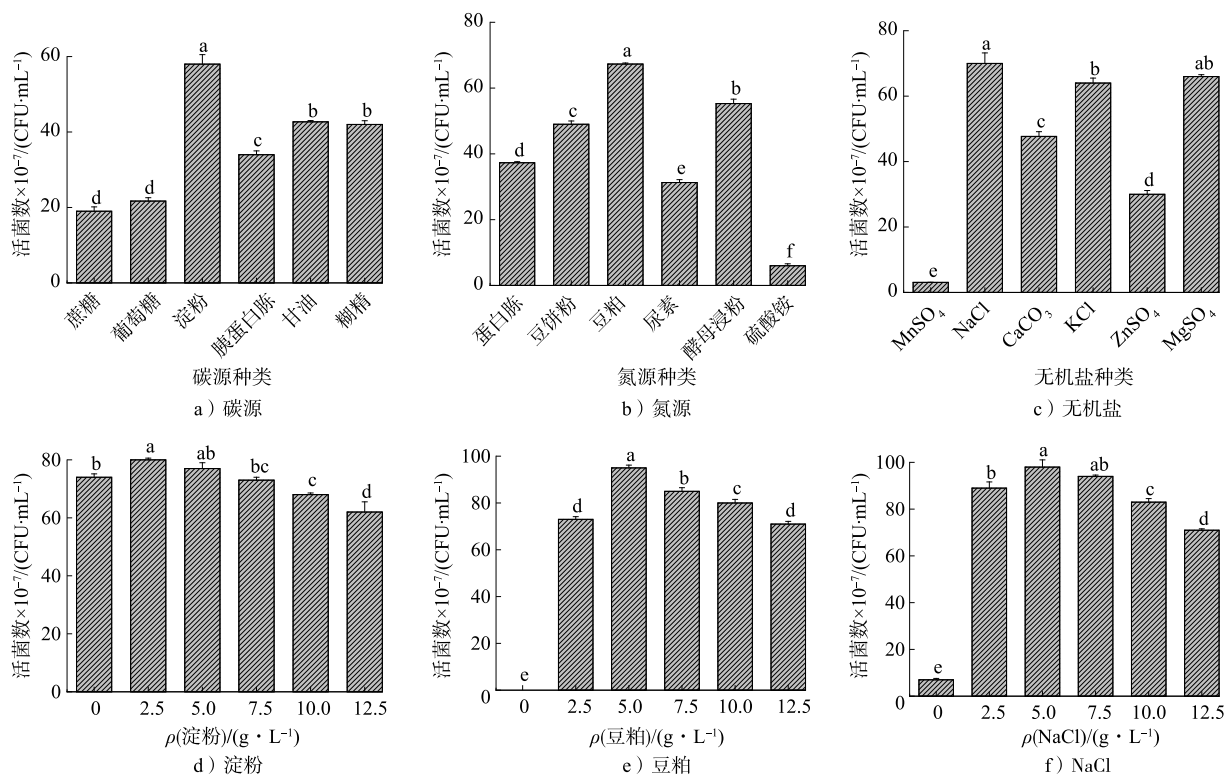
采用 Origin 2018、Design Expert 11.0 软件处理数据,用 SPSS 26 软件 ANOVA 检验程序进行单因素方差分析,结果以“平均数±标准误差”表示, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基优化

2.1.1 碳源及添加量对发酵的影响

碳源是微生物代谢活动所需能量的主要来源。菌株对碳源的利用情况可以反馈其生长代谢情况,详见图 1。由图 1 a)可知,当碳源为淀粉时,活菌数最高为 5.80×10^8 CFU/mL,较培养基优化前提升了 6.25 倍,与其他碳源相比,均有显著差异($P < 0.05$),因此得出最佳碳源为淀粉。由图 1 d)可知,活菌数随淀粉添加量的增加先上升后下降,当添加量为 2.5 g/L 时,活菌数最高为 8.00×10^8 CFU/mL,与 5 g/L 添加量时无显著差异,但均显著高于其他添加量时的 ZY1 活菌数。因此,淀粉最佳添加量为 2.5 g/L。



注:图中不同小写字母代表组间具有显著差异($P < 0.05$)。

图 1 碳源、氮源及无机盐对 ZY1 发酵的影响

Fig. 1 Effects of carbon source, nitrogen source and inorganic salt on fermentation of ZY1

2.1.2 氮源及添加量对发酵的影响

氮源能提供微生物生长所需要的核苷酸、维生素与矿物质元素。图 1 b) 表明,当氮源为豆粕时,活菌数为 6.73×10^8 CFU/mL,均显著高于其他氮源培养时的活菌数($P < 0.05$)。因此,最佳氮源为豆粕。由图 1 e) 可知,未添加豆粕时,活菌数为 0,说明微生物无氮源不生长。随着豆粕含量的增加,活菌数先增加后下降,添加量为 5.0 g/L 时,活菌数均显著高于其他添加量($P < 0.05$),达到 9.50×10^8 CFU/mL。因此,豆粕最佳添加量为 5.0 g/L。

2.1.3 无机盐种类及添加量对发酵的影响

无机盐作为微生物生长的必要营养物质,参与微生物的各种代谢途径及细胞构成。由图 1 c) 可知,当无机盐为 NaCl 时,ZY1 菌体产量均显著高于其余组($MgSO_4$ 除外)($P < 0.05$)。因此,最佳无机盐为 NaCl。由图 1 f) 可知,添加量为 5.0 g/L 时,活菌数最大为 9.80×10^8 CFU/mL,与 7.5 g/L 相比无显著差异,与其他添加量相比均具有显著性($P < 0.05$)。因此,NaCl 最佳添加量为 5.0 g/L。

2.2 响应面优化分析

在单因素试验基础上,使用 Design Expert 11 软件中 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平实验。选取淀粉(A)、豆粕(B)、NaCl(C)添加量为自变量,活菌数(Y)为响应值,设计出 17 种实验方案,测定每组实验条件下 ZY1 活菌数,Box-Behnken 实验设计及结果见表 2,回归模型方差分析见表 3。

应用 Design Expert 11 软件得到以

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果

Tab. 2 Design and results of Box-Behnken test

序号	A/(g·L ⁻¹)	B/(g·L ⁻¹)	C/(g·L ⁻¹)	活菌数 $\times 10^7$ /(CFU·mL ⁻¹)
1	0	0	0	96.3
2	0	-1	1	85.3
3	1	-1	0	83.3
4	0	0	0	97.3
5	0	0	0	97.0
6	0	0	0	96.0
7	0	0	0	97.0
8	1	0	-1	83.3
9	0	1	1	92.0
10	1	1	0	87.3
11	0	-1	-1	83.0
12	-1	-1	0	87.0
13	1	0	1	86.0
14	-1	0	-1	87.0
15	-1	0	1	87.0
16	0	1	-1	89.3
17	-1	1	0	92.0

表 3 回归模型方差分析

Tab. 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	440.17	9	48.91	61.57	<0.000 1
A	21.45	1	21.45	27.00	0.001 3
B	60.50	1	60.50	76.16	<0.000 1
C	7.41	1	7.41	9.33	0.018 5
AB	0.25	1	0.25	0.31	0.592 3
AC	1.82	1	1.82	2.29	0.173 6
BC	0.04	1	0.04	0.05	0.828 9
A ²	124.95	1	124.95	157.30	<0.000 1
B ²	63.14	1	63.14	79.49	<0.000 1
C ²	124.95	1	124.95	157.30	<0.000 1
残差	5.56	7	0.79	—	—
失拟项	4.37	3	1.46	4.91	0.079 2
纯误差	1.19	4	0.30	—	—
所有项	445.74	16	—	—	—

注: $P < 0.05$ 表示存在显著差异; $P < 0.01$ 表示存在极显著差异。

活菌数为响应值的二元多项回归方程: $Y = 86.72 - 1.64A + 2.75B + 0.96C - 0.25AB + 0.68AC + 0.1BC - 5.45A^2 - 3.87B^2 - 5.45C^2$ 。回归模型方差分析如表 3 所示,二次回归模型 $P = 0.000 1$,差异极显著;失拟项 $P = 0.079 2$,差异不显著,说明无异常数据,模型建立成功。响应面相关系数(R^2)为 0.987 5,回归方程校正决定系数为 0.971 5,均大于 0.95,说明拟合程度较好,预测值与实际值高度相关,可应用于 ZY1 发酵活菌数理论预测。此外,方差分析结果显示,A 与 B 对活菌数影响极显著($P < 0.01$),C 对活菌数影响显著($P < 0.05$),各因素对活菌数影响程度为 $B > A > C$ 。

为更直观了解 2 种变量之间的交互作用及各因素交互作用对 ZY1 活菌数的影响,运用 Design Expert 11 软件基于二次回归方程模拟绘制影响活菌数的等高线和三维图,结果如图 2 所示,其中淀粉、豆粕、NaCl 3 个因素均存在极值点。对二次多项回归方程求导,获得最佳培养基配方为淀粉质量浓度为 2.12 g/L、豆粕质量浓度为 5.90 g/L、NaCl 质量浓度为 5.21 g/L,在此配下发酵活菌数的预测值最高达 9.74×10^8 CFU/mL。为了验证响应面模型的准确性,在上述最佳培养基配方条件下进行 6 次平行实验。经发酵实验结果验证,得到 ZY1 活菌数平均值为 9.63×10^8 CFU/mL,与预测值接近,说明预测结果可信。

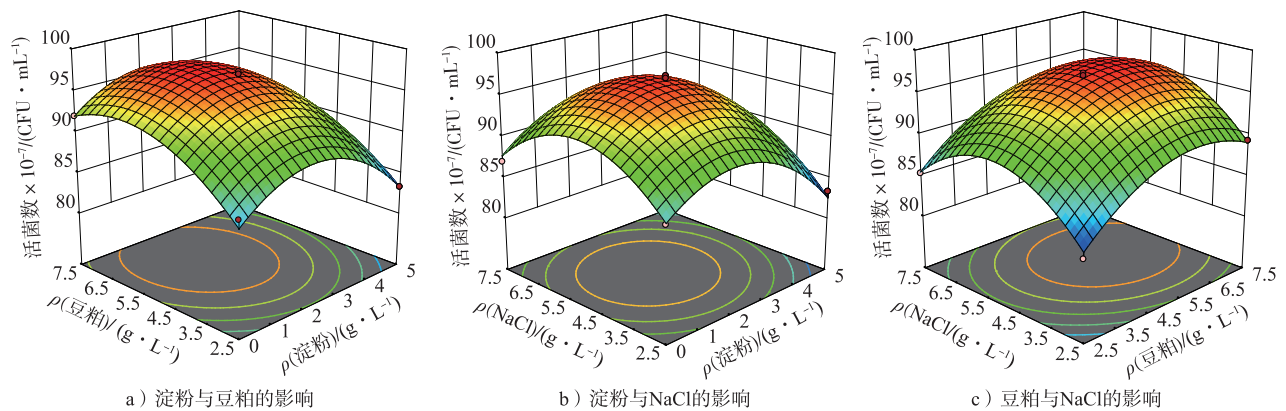


图 2 各因素交互作用对 ZY1 活菌数的影响

Fig. 2 Effects of the interaction of various factors on ZY1 viable bacteria count

2.3 发酵条件优化

2.3.1 初始 pH 值对发酵的影响

微生物菌株生长受 pH 值的影响较大。通常情况下,微生物处于自己的耐受 pH 值时,可以正常生长繁殖,但生长速度及活性会下降。由图 3 a)可知,活菌数随 pH 值的升高先上升后下降,当 pH 值为 7.0 时活菌数最多,达到 9.80×10^8 CFU/mL,与 pH 值为 7.5 时相比无显著差异,与其他 pH 值相比均有显著差异($P < 0.05$)。因此,最佳初始 pH 值为 7.0。

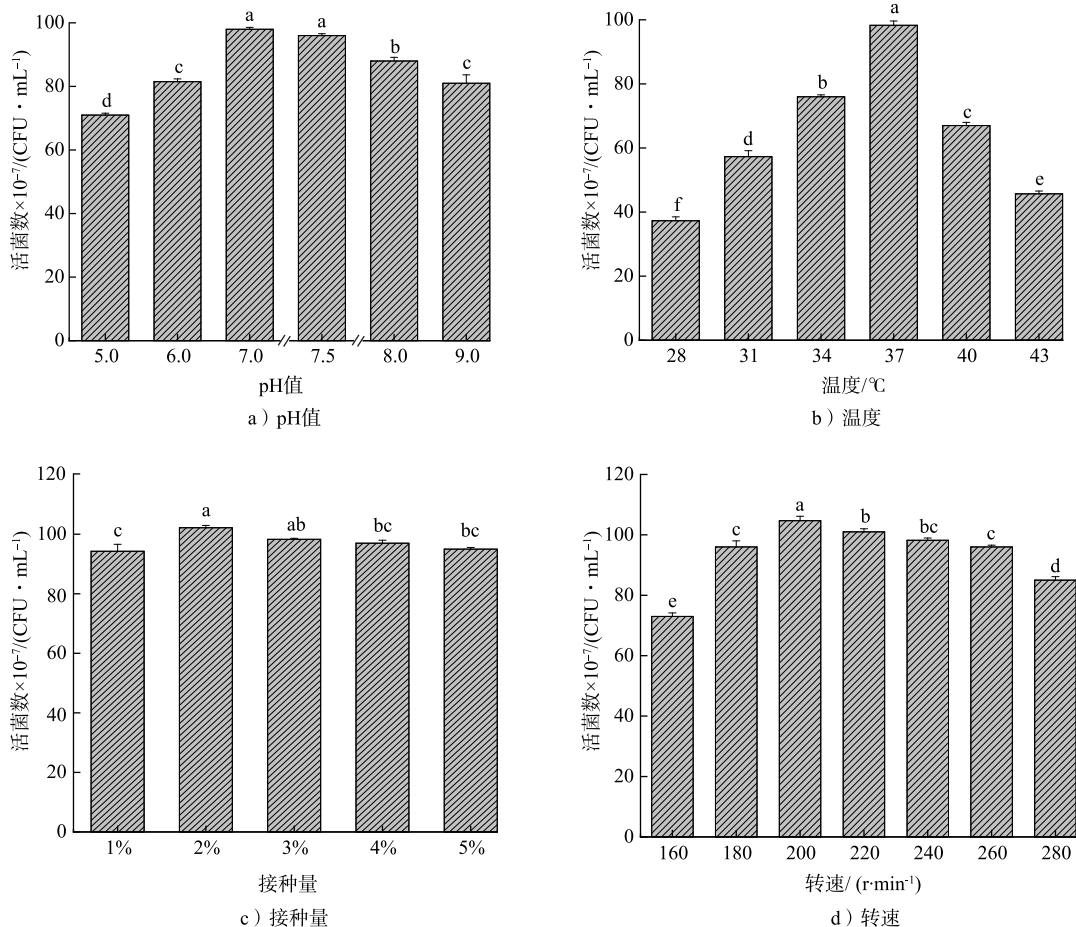


图 3 pH 值、温度、接种量及转速对 ZY1 发酵的影响

Fig. 3 Effects of pH, temperature, inoculation amount and rotational speed on fermentation of ZY1

2.3.2 培养温度对发酵的影响

微生物在生长繁殖时随环境温度的变化而变化。温度过高或者过低,均会对微生物的生长繁殖产生影响。由图 3 b)可知,温度为 37 °C 时,活菌数最高为 9.83×10^8 CFU/mL,与其他温度相比均有显著差异 ($P < 0.05$),且活菌数随温度的升高先增加后减少。因此,最佳培养温度为 37 °C。

2.3.3 接种量对发酵的影响

在发酵过程中,菌种接种量是影响微生物生长速度的重要因素。适宜的接种量可以促进菌种的生长繁殖,提高发酵效率。由图 3 c)可知,当接种量为 2% 时,活菌数为 1.02×10^9 CFU/mL,与 3% 接种量相比无显著差异。因此,种子液最佳接种量为 2%。

2.3.4 转速对发酵的影响

在摇床发酵中,转速通过影响溶液的溶氧对菌株发酵产生影响。由图 3 d)可知,当转速为 200 r/min 时,活菌数最高,达到 1.05×10^9 CFU/mL,与其他转速相比,均有显著差异 ($P < 0.05$),且活菌数随转速的增加先上升后下降。因此,最佳转速为 200 r/min。

2.4 中试生产

对枯草芽孢杆菌 ZY1 进行 5 t 中试扩大生产,发酵过程中参数检测结果见图 4。由图可知,5 t 发酵罐培养时,6~28 h 为对数生长期,32 h 时活菌数最大为 1.05×10^{11} CFU/mL,比摇瓶优化后提高了 100 倍。在 12~20 h 时受菌株快速生长代谢产生的乙酸、丁酸等短链脂肪酸影响,pH 值呈现缓慢下降趋势,20 h 后 pH 值稳定上升,可

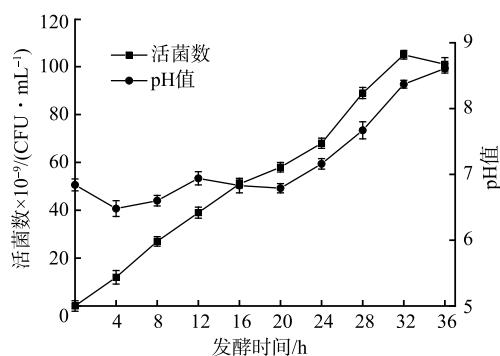


图 4 ZY1 中试发酵过程中参数检测

Fig. 4 Parameter detection of ZY1 in pilot fermentation process

能与菌株代谢活动减弱及芽孢产生有关^[15]。发酵至 36 h 时,芽孢率约为 75%,此时活菌数为 1.01×10^{11} CFU/mL。由于菌株放大生产的可行性及稳定性较好,因而活菌数均达到预期值,发酵罐回凉结束后芽孢率达到 90%时,可用于喷雾干燥。改变管路将发酵液转入预混罐,5 t 发酵罐中发酵液流入的预混罐中加入 30%氢钙,调整预混罐转速为 80 r/min,混匀罐内物料,经喷雾干燥可得到 1 012 kg 制剂。微生物检测参考标准 GB/T 26428—2010,经平板活菌计数验证,得到活菌数为 8.50×10^9 CFU/g。文献[21]对枯草芽孢杆菌进行液态发酵培养、鼓风干燥后,所得芽孢产量为 4.80×10^9 CFU/g。与之相比,虽然本文枯草芽孢杆菌的活性较高,但仍可借鉴其干燥方式获得更高的 ZY1 活性及芽孢数。文献[22]在对枯草芽孢杆菌 Y31 培养基和固态发酵条件优化后,Y31 活菌数达到了 2.40×10^{10} CFU/g,远高于本文 ZY1 活性。其原因一是菌株不同,二是发酵方式不同^[23]。

3 结 语

以课题组前期筛选得到的一株产 CpxP 蛋白的菌株 *Bacillus subtilis* ZY1 为出发菌株进行液体发酵优化及中试生产,得出以下结论:1)培养基优化结果为淀粉 2.12 g/L、豆粕 5.90 g/L、NaCl 5.21 g/L;2)发酵条件优化结果为初始 pH 值为 7.0、温度为 37 ℃、接种量为 2%、转速为 200 r/min;3)5 t 发酵罐中试生产过程中菌株 ZY1 活菌数达到 1.05×10^{11} CFU/mL;4)发酵液经喷雾干燥制备出 1 012 kg 菌粉,成品检测后得到活菌数为 8.50×10^9 CFU/g。

本文发酵方式与干燥方式的不同可能损失了菌体产量和蛋白产量,因此,未来拟结合固态发酵与鼓风干燥方式提高 ZY1 的活菌数及芽孢数,为进一步开展 CpxP 蛋白在动物细菌性腹泻病生物防治功能方面的研究提供优良制剂。

参考文献/References:

- [1] DU Wenjuan, WANG Xianghuang, XU Le, et al. Research advances in intestinal diseases and related diarrhea in animal production[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023. DOI: 10.3389/fvets.2023.1201231.
- [2] KOTLOFF K L. Bacterial diarrhoea[J]. *Current Opinion in Pediatrics*, 2022, 34(2): 147-155.
- [3] LI Yunxia, XIA Siting, JIANG Xiaohan, et al. Gut microbiota and diarrhea: An updated review[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.625210.
- [4] YUE Shousong, LI Zhentian, HU Fuli, et al. Curing piglets from diarrhea and preparation of a healthy microbiome with *Bacillus* treatment for industrial animal breeding[J]. *Scientific Reports*, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-75207-1.
- [5] SU Weifa, GONG Tao, JIANG Zipeng, et al. The role of probiotics in alleviating postweaning diarrhea in piglets from the perspective of intestinal barriers[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.883107.
- [6] WANG Jie, XIA Siqi, FAN Huimei, et al. Microbiomics revealed the disturbance of intestinal balance in rabbits with diarrhea caused by stopping the use of an antibiotic Diet[J]. *Microorganisms*, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10050841.
- [7] LUO Zhenye, LIU Changshun, HU Yannan, et al. Gegen qinlian decoction restores the intestinal barrier in bacterial diarrhea piglets by promoting *Lactobacillus* growth and inhibiting the TLR2/MyD88/NF- κ B pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113719.
- [8] MIN Suji, KIM H, YAMBE N, et al. Ameliorative effects of Korean-red-ginseng-derived polysaccharide on Antibiotic-Associated diarrhea [J]. *Polymers*, 2024. DOI: 10.3390/polym16020231.
- [9] ZHANG Qing, ZHANG Xu, WANG Qing, et al. Dioscoreae rhizoma starch improves chronic diarrhea by regulating the gut microbiotas and fecal metabolome in rats[J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, 11(10): 6271-6287.
- [10] 程鑫怡, 邹君彪, 冷董碧, 等. 畜禽腹泻病因及中草药防治腹泻机制研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2021(3): 52-57.
CHENG Xinyi, ZOU Junbiao, LENG Dongbi, et al. Advances in the research on the etiology of diarrhea in livestock and poultry and the mechanism of Chinese herbal medicine to control diarrhea[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2021(3): 52-57.
- [11] XUE Hong, MEI Chunfeng, WANG Fengyun, et al. Relationship among Chinese herb polysaccharide (CHP), gut microbiota, and chronic diarrhea and impact of CHP on chronic diarrhea[J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, 11(10): 5837-5855.
- [12] 何振虎, 项黎丽. 枯草芽孢杆菌对育肥羊生长性能、抗氧化及免疫机能的影响[J]. *中国饲料*, 2023(16): 21-24.
HE Zhenhu, XIANG Lili. Effect of *Bacillus subtilis* on growth performance, antioxidant and immune function of fattening sheep[J]. *China Feed*, 2023(16): 21-24.
- [13] 赵佳霓, 岳淑英, 罗正, 等. 枯草芽孢杆菌 PB6 制剂对产蛋后期蛋鸡生产性能、蛋品质、抗氧化能力和肠道菌群的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2024, 60(6): 298-302.

- [14] 谷清义,王妍佳,李梦楠,等. 枯草芽孢杆菌 BSCY-1 对黄瓜种子萌发和幼苗生长特性的影响[J]. 北方园艺,2024(10):17-23.
GU Qingyi,WANG Yanjia,LI Mengnan,et al. Effect of a *Bacillus subtilis* BSCY-1 on the seed germination and seeding growth and physiological characteristics of cucumber[J]. Northern Horticulture,2024(10):17-23.
- [15] GAO Yang,HUO Xingchen,WANG Zhensheng,et al. Oral administration of *Bacillus subtilis* subunit vaccine significantly enhances the immune protection of grass carp against GCRV-II infection[J]. Viruses,2021. DOI: 10.3390/v14010030.
- [16] TSCHAUNER K,HÖRNSCHEMEYER P,MÜLLER V S,et al. Dynamic interaction between the CpxA sensor kinase and the periplasmic accessory protein CpxP mediates signal recognition in *E. coli*[J]. PloS One,2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0107383.
- [17] HE Xiaoliang,REN Yuwen,MENG Wanli,et al. Knocking out analysis of the CpxP gene using crispr/Cas9 in *Escherichia coli* MG1655 [J]. AMB Express,2020. DOI: 10.1186/s13568-020-01099-z.
- [18] 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 carotovorum* subsp. *carotovorum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology,2019,35(5):847-856.
- [19] ZHANG Yu,NIE Yao,ZHOU Xia,et al. Enhancement of pullulanase production from recombinant *Bacillus subtilis* by optimization of feeding strategy and fermentation conditions[J]. AMB Express,2020. DOI: 10.1186/s13568-020-0948-5.
- [20] 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.
- [21] 张关锋,杨泰,宋先凡,等. 枯草芽孢杆菌的生理功能及其在畜禽生产中的应用[J]. 中国畜牧兽医,2024,51(4):1511-1519.
ZHANG Guanfeng,YANG Tai,SONG Xianfan,et al. Physiological functions of *Bacillus subtilis* and its application in livestock and poultry production[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2024,51(4):1511-1519.
- [22] 赵甜宇,潘朝阳,张朝辉,等. 固态枯草芽孢杆菌菌剂的制备工艺研究[J]. 食品工业科技,2020,41(19):104-111.
ZHAO Tianyu,PAN Chaoyang,ZHANG Chaohui,et al. Study on the preparation technology of solid *Bacillus subtilis*[J]. Science and Technology of Food Industry,2020,41(19):104-111.
- [23] 卢龙娣. 鸡源性益生菌芽孢杆菌的筛选鉴定、固体发酵的优化及其应用效果的研究[D]. 福州:福建师范大学,2010.
LU Longdi. Studies on Screening, Identification, Solid-state Fermentation Optimization and Application Effect of *Bacillus* from Chicken Intestines[D]. Fuzhou:Fujian Normal University,2010.