

评价芽孢杆菌脂肽产量及底物碳利用效率的新方法

王晶^{1,2}, 刘茗^{1,2}, 冯歌林^{1,2}, 方伟^{1,2}, 高竞^{1,2}, 梁辰飞^{1,2},
秦华^{1,2}, 陈俊辉^{1,2}, 徐秋芳^{1,2}

(1. 浙江农林大学 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 环境与资源学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 芽孢杆菌 *Bacillus* 代谢产生的脂肽类物质具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒等多种生物活性, 但芽孢杆菌脂肽产量普遍较低。探索高产量的培养条件是开发利用的重点, 而简单快速的产量评价方法则可大大提高条件探索的效率。以解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* WK1 为试验菌株, 首先通过含发酵液培养基对病原菌的抑制实验确定最佳培养时间, 然后设计初始 pH 值分别为 5, 6 和 7 的培养基生产脂肽物质, 通过测定发酵液酸沉降前后总有机碳的差值, 推算脂肽类物质粗提物的产量(差减法), 以传统的重量法为对照。结果表明: 试验所用的解淀粉芽孢杆菌 WK1 菌株的最佳发酵时间为 72 h。重量法与差减法所测得的不同处理脂肽物质产量差异规律相同, 从高到低依次为 pH 6, pH 7, pH 5, 两者的相关性系数为 0.563 2($n=9$), 但相同初始 pH 值条件下差减法所得的脂肽物质产量均高于重量法。初始 pH 值为 5 条件下脂肽物质合成效率和二氧化碳排放量均最低, 初始 pH 值为 6 与 pH 值为 7 条件下二氧化碳排放量相同, 为 $700 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 但初始 pH 值为 6 条件下产脂肽物质产量($1\ 228 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和脂肽物质合成效率($234 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)最高。可见, 差减法是评价脂肽产量的简单快速而有效的方法。图 4 表 2 参 23

关键词: 微生物学; 解淀粉芽孢杆菌; 脂肽类产量; 差减法; 重量法; 底物碳利用

中图分类号: S718.8

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2019)06-1182-08

A new evaluation method of lipopeptide production and substrate carbon utilization efficiency using the WK1 strain of *Bacillus amyloliquefaciens*

WANG Jing^{1,2}, LIU Ming^{1,2}, FENG Gelin^{1,2}, FANG Wei^{1,2}, GAO Jing^{1,2}, LIANG Chenfei^{1,2},
QIN Hua^{1,2}, CHEN Junhui^{1,2}, XU Qiufang^{1,2}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: The lipopeptide produced by *Bacillus amyloliquefaciens* has a variety of biological activities such as antibacterial, anti-tumor, and anti-virus; however, its production is generally very low. To explore better fermentation conditions so as to gain more lipopeptide with easy and fast evaluation methods for lipopeptide production that would greatly improve work efficiency, the yield of crude lipopeptide based on the difference of total organic carbon (TOC) in a liquid before and after lipopeptide separation was calculated using the acid deposition approach. First, optimal fermentation time for producing lipopeptide by pathogen inhibiting culture on plates containing a fermentation liquid was determined. Then, a liquid medium with pH 5, 6, and 7, for producing different concentrations of lipopeptide, was prepared. Also, CO₂ emission rates for microbial activity in the pH 6 and 7 treatments were measured. Results showed that 72 hours was the optimal fermentation time. The crude yield of lipopeptide calculated from the difference of TOC in liquid before and after lipopeptide sep-

收稿日期: 2018-11-14; 修回日期: 2019-04-02

基金项目: 浙江省省院合作林业科技项目(2017SY01); 浙江省科学技术重点研发计划项目(2015C02G4010091)

作者简介: 王晶, 从事芽孢杆菌性状及其代谢产物性质研究。E-mail: 1755816955@qq.com。通信作者: 徐秋芳, 教授, 博士, 从事土壤基本性质、土壤微生物及植物营养研究。E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

aration was positive compared to traditional weight methods with the coefficient being 0.563 2 ($n = 9$). For both methods, pH 6 > pH 7 > pH 5. However, for the same pH of the liquid medium, crude yield was lower with weight methods than the TOC difference methods. Lipopeptide production efficiency and CO₂ emissions rate with the WK1 strain were lowest for the pH 5 treatment. However, crude yield of lipopeptide (in a 1 228 mg·L⁻¹ medium) and lipopeptide production efficiency (in a 234 mg·kg⁻¹ OC medium) were highest at pH 6. Thus, the TOC difference method was an easy and fast method for lipopeptide production evaluation. [Ch, 4 fig, 2 tab. 23 ref.]

Key words: microbiology; *Bacillus amyloliquefaciens*; crude yield of lipopeptide; difference methods; weight methods; substrate carbon utilization efficiency

芽孢杆菌 *Bacillus* 是一类产生耐热、耐旱, 并且抗紫外线和有机溶剂的好氧细菌^[1], 具有在不同环境下定殖与繁殖的能力^[2], 同时具备抵抗真菌和病原细菌等方面的优点^[2-3]。芽孢杆菌是一种理想的生防菌, 所产生的拮抗物质主要有抗生素、细菌素、细胞壁降解酶、其他抗菌蛋白及挥发性等物质^[4], 其中脂肽类抗生素是一大类重要的拮抗物质^[5]。脂肽类抗生素理化性质稳定, 对高温、强酸和弱碱具有一定的耐受能力^[6], 对胰蛋白酶、蛋白酶 K 等多种蛋白酶不敏感^[7], 表明它是一类稳定态物质。同时脂肽类抗生素可以杀灭病原细菌、真菌和病毒, 是一类抑制肿瘤生长的生物活性物质^[8], 成为芽孢杆菌拮抗物质领域的研究重点。因此, 获得高产量的脂肽类抗生素是目前开发芽孢杆菌的主要目的, 芽孢杆菌的代谢活动受到多种因素影响, 如培养基、初始 pH 值、温度、接种量、发酵时间、通气量以及发酵工艺等^[9]。探索高产脂肽物质的最佳发酵条件需要进行大量的实验, 通过对不同温度、pH 值、接种量、通气等条件的试验得到优化组合。目前, 主要应用重量法和液相色谱法来衡量脂肽类产量高低。而脂肽类物质定量分析前需要把该物质从发酵液中分离出来, 有酸沉降法、超滤法、色谱法、液膜分离法、泡沫分离法、吸附法以及双水相法等分离方法^[10], 其中酸沉降法(浓盐酸沉淀法)使用最广。芽孢杆菌代谢产生的脂肽类物质产量较低, 大部分低于 1 000 mg·L⁻¹, 有的甚至不足 100 mg·L⁻¹^[11]。重量法灵敏度较低, 需要从较大的发酵液中分离脂肽类物质, 菌体分离(培养结束)和脂肽物质分离(酸沉降后)都需要进行离心, 多因素探索优化条件时离心的工作量非常大。液相色谱法虽然灵敏度和准确度均较高, 但需要昂贵的液相色谱仪器, 色谱测定条件的摸索也费时费工, 并且需要有标准样品才能进行绝对定量, 而目前市场上除了表面活性素(surfactin)外没有商品化的标准样品。在优化条件时, 不需要很高绝对产量的准确度, 主要是比较不同培养条件脂肽物质产量相对高低。因此, 简单、快捷的产量评测方法可提高工作效率。本研究试图通过测定不同初始 pH 值的培养基、发酵液酸沉降前后有机碳总量, 计算沉降前后有机碳的差值, 来推算发酵液中脂肽类粗提物含量, 探索一种简单、快捷评价脂肽类物质产量的方法。同时通过测定培养基、含菌体发酵液以及去菌体发酵液的有机碳含量, 来评价碳的利用效率。虽然获得脂肽类物质是发酵的最终目的, 但如果能探索到一种底物碳利用效率和脂肽物质产量双高的培养条件, 可节约原料成本以提高经济效益, 也可减少代谢过程中二氧化碳气体排放以保护大气环境。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* WK1, 菌种保藏号: CGMCC 11640, 由浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室在-70 °C 的条件下甘油冷冻保存。

1.2 培养基配方

参考庄国宏^[10]得到的解淀粉芽孢杆菌 GD 产脂肽类物质的优化培养基 Landy: 葡萄糖 10.0 g, L-谷氨酸 5.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, KH₂PO₄ 1.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.15 mg, MnSO₄ 5.00 mg, CuSO₄·5H₂O 0.16 mg, 蒸馏水 1 000 mL; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 去皮马铃薯 100 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH 值。

1.3 培养条件优化及抑制效果观察

已确定菌株 WK1 最佳接种量为 3%, 最佳培养温度为 37 °C^[11-12]。为了确定脂肽类物质最高产量的

发酵时间,将病原菌接种到含有发酵液的平板中,观察记录病原菌生长情况。具体方法如下:①菌株 WK1 种子液制备:选取菌株 WK1 的单菌落,接种于 pH 7 的 100 mL PDA 液体培养基中,在 37 °C、摇瓶转速为 180 r·min⁻¹ 条件下培养 14 h。②不同培养时间发酵液的制备:将 WK1 种子液按接种量 3%(V/V) 分别接种到装有 100 mL PDA 液体培养基的 6 个三角瓶中,37 °C,180 r·min⁻¹ 摇瓶培养,分别在 48, 60, 72 h 终止培养,获得不同培养时间的发酵液,将发酵液离心 15 min(6 000 r·min⁻¹) 去除菌体后得上清液。③含发酵液的培养基制备:分别吸取 100 mL 不同时间的发酵上清液与 PDA 液体培养基按 1:1 体积比混合,加入 5.0 g 琼脂,115 °C 灭菌 30 min 后制成 6 个厚薄均匀的培养基。④抑制效果观察:将病原菌葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 单菌落打饼分别接种到混合培养基中(打饼直径为 0.5 cm),放入 27 °C 的真菌培养箱培养。分别在第 1, 2, 3, 4, 5, 10 天时拍照,同时测量病原菌落直径,计算抑制率。抑制率=(对照病原菌菌落直径-处理病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径×100%。

1.4 发酵液 pH 值动态测定

每个处理设置 1 个培养基体积为 200 mL 的摇瓶,用于发酵液 pH 值的动态监测,培养条件同 1.3。分别于培养 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72 h 时取出 10 mL 发酵液,用酸度计测定 pH 值,采样过程在超净工作台,避免母体培养基污染。

1.5 脂肽物质产量测定

在已有研究基础上,设置初始 pH 值分别为 5, 6, 7 的 Landy 培养基,以获得不同产量的脂肽物质,比较不同方法,同时检测 pH 值对脂肽物质产量的影响。每处理设 3 个重复。培养基体积为 300 mL,接种 3%(V_{菌液}/V_{培养基}),37 °C,180 r·min⁻¹,摇瓶 72 h(从前期抑制试验得到的最佳培养时间)。摇瓶结束后,立即通过紫外灭菌以阻止芽孢杆菌继续生长繁殖,测量发酵液体积,将菌液全部离心,放到 4 °C 冰箱备用。

1.5.1 重量法 吸取 240 mL 去除菌体的发酵液于三角瓶中,缓慢滴加浓度为 6 mol·L⁻¹ 的盐酸,逐渐将溶液 pH 值调至 2 以沉淀脂肽类物质,置于 4 °C 冰箱过夜。准备 100 mL 离心管(质量为 W₀),分 3 次将液体转入 100 mL 的离心管,在 4 500 g 下离心 30 min,每次离心后的上清液收集一起,用于有机碳测定;同一样品的液体转入同一离心管收集脂肽粗提物沉淀,用 pH 值为 2 的盐酸洗涤沉淀 2 次,以除去水溶性杂质,而后将沉淀置于 -70 °C 冰箱充分冷冻,用冷冻干燥机去除水分后得脂肽类粗提物,取出放到真空干燥器内,等升至室温后称质量(W₁),W₁ 与 W₀ 的差值即为脂肽类粗提物的质量,计算得发酵液脂肽物质质量浓度。

1.5.2 差减法 脂肽类物质是芽孢杆菌代谢产生的同系物,虽然不是纯的有机化合物,但其含碳量变化不大。程敏等^[11]应用液质联用技术鉴定 WK1 的代谢产物主要为 C₁₄~C₁₇ 的芬芥素(fengycin),参考主要脂肽物质芬芥素的分子结构^[13]推算出 WK1 的代谢产物脂肽含碳率平均为 0.54。因此,通过测定发酵液酸沉降(方法与重量法相同)前后的总有机碳质量浓度,计算差值得到脂肽类粗提物质量。酸沉降前总有机碳测定,吸取 2 mL 去除菌体的发酵液,用去离子水稀释 13 倍,应用总有机碳分析仪(TOC-L CPN, 津岛)测定溶液中的有机碳质量浓度。酸沉降后溶液中总有机碳测定,吸取 2 mL 酸沉降析出脂肽物质后上清液,用去离子水稀释 13 倍,同样用 TOC 分析仪测定溶液中的有机碳质量浓度。由于调节酸度所用的盐酸体积很小,可以忽略不计,因此,脂肽物质产量(mg·L⁻¹)=(酸沉前有机碳质量浓度-酸沉降后有机碳质量浓度)/0.54。

1.5.3 底物碳利用效率 通过脂肽物质的合成效率和二氧化碳排放损失率来间接综合评价培养基中底物碳利用效率。单位底物碳合成的脂肽类物质越多越好,而在培养过程中微生物通过好氧呼吸排放二氧化碳则越少越好。脂肽物质合成效率(mg·kg⁻¹)=脂肽物质碳质量浓度/Landy 培养基初始碳质量浓度,统一用 TOC 分析仪测定。二氧化碳排放量(mg·kg⁻¹)=(Landy 培养基初始碳质量浓度-含菌体发酵液的碳质量浓度)/Landy 培养基初始碳质量浓度,统一用重铬酸钾法测定。

1.6 培养基和含菌体发酵液有机碳质量浓度测定

菌体发酵液是混浊的不透明液体,无法用 TOC 分析仪直接测定,因而采用重铬酸钾法测定含菌体发酵液有机碳质量浓度。72 h 培养结束后,分别吸取 2 mL 不同处理的含菌体发酵液于硬质试管进行消煮。为了计算发酵前后培养基中有机碳的损失量,同时用重铬酸钾法测定 Landy 培养基初始碳质量浓

度, 为 $5\ 769.55\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 最高产量的发酵时间确定

通过 WK1 对病原菌的抑制效果试验, 间接确定 WK1 产脂肽类物质最高产量的发酵时间为 72 h。对解淀粉芽孢杆菌 WK1 与病原菌的平板对峙培养发现, 代谢产物通过破坏菌丝和孢子细胞壁、细胞膜, 使细胞原生质泄露, 菌丝和孢子萎缩的方式抑制山核桃干腐病原菌 *Bacillus dothidea* 的生长^[11]。因此, 将除菌后发酵液直接混入培养基可间接衡量代谢物的产量, 通过发酵液对病原菌的抑制效果试验可确定最高产量的发酵时间。观察含有发酵液(48, 60, 72 h)培养基上病原菌的生长情况(图 1 和表 1)发现: 发酵液对病原菌生长均有抑制作用, 随着培养时间的增加抑制率逐渐增加, 1~5 d 内抑制率增速快, 抑制效果显著, 5~10 d 内增速变缓, 甚至 48 与 60 h 共 2 个处理在第 10 天出现下降。这是因为开始接种的是单菌落病原菌, 1 d 时间内繁殖的数量有限, 但随着时间的延长病原菌数量不断增加, 而代谢产物的脂肽浓度有限, 所以病原菌数量增加后抑制效果减弱。综合 1~10 d 的结果, WK1 的发酵时间越长抑制效果越好, 在 72 h 抑制率达到最高值, 效果最为显著, 培养 5 和 10 d 时的抑制率达到 83.3% 和 84.9%, 对于抗生素筛选的效果而言, 已经达到较强的水平。在解淀粉芽孢杆菌 HAB-7 的抑菌试验中, 经优化后最佳培养条件对芒果炭疽菌的抑制率达到 78.3%^[14]。大量研究表明^[15-17]: 解淀粉芽孢杆菌的最优发酵时间都在 72 h 以内, 且在本实验中 60 h 的抑制率已经达 80%, 继续增加发酵时间对抑制率的提升不大, 且会增加发酵成本。

表 1 不同时间 PDA 培养基内病原菌菌落直径平均值和抑制率

Table 1 Mean diameter and inhibition rate of pathogenic bacteria in PDA medium at different time

发酵时间/h	菌落直径/cm						
	1	2	3	4	5	6	10 d
ck	0.5(0.0)	1.0(0.0)	2.0(0.0)	3.5(0.0)	4.8(0.0)	5.8(0.0)	8.6(0.0)
48	0.5(0.0)	0.5(50.0)	0.5(75.0)	0.9(74.3)	1.0(79.2)	1.2(79.3)	2.1(75.6)
60	0.5(0.0)	0.5(50.0)	0.5(75.0)	0.9(74.3)	0.9(81.3)	1.0(82.75)	1.8(79.1)
72	0.5(0.0)	0.5(50.0)	0.5(75.0)	0.8(77.1)	0.8(83.3)	0.9(84.5)	1.3(84.9)

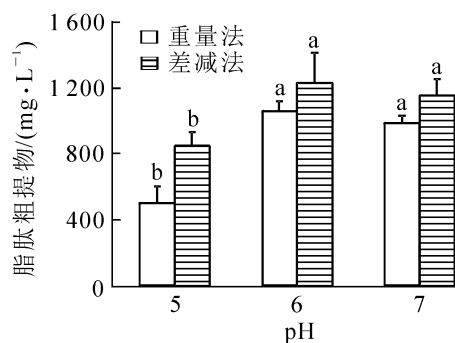
说明: 括号中为抑菌率(%)

2.2 重量法和差减法结果比较

初始 pH 值对发酵微生物的生长繁殖和代谢产物的合成有非常显著的影响。因此, 选择最适合的初始 pH 值对微生物的培养就显得尤为重要。重量法测得不同初始 pH 值的培养基在 72 h 后脂肽物质的产量从高到低依次为 pH 6, pH 7, pH 5(图 1), 初始 pH 值为 6 和 7 条件下的脂肽物质的产量显著大于 pH 5 处理($P < 0.05$), pH 值为 6 和 7 的发酵液酸沉降时沉淀明显比 pH 值为 5 的发酵液多, 说明培养基 pH 值为 5 时对脂肽物质的生成不利。差减法计算得到不同处理脂肽物质产量差异规律与重量法一致, 但产量比重量法高(图 1), 初始 pH 值为 5, 6, 7 处理的差减法测定结果分别比重量法高 69.9%, 15.8% 和 17.0%。这是因为 TOC 能检测到溶液有机碳的微小变化, 重量法则因为质量太少无法检测到微小变化, 因此差减法相比重量法更加灵敏。2 种方法的结果存在一定的相关性, 但由于重量法的灵敏度较低, 导致相关系数仅 $0.563\ 2(n=9)$ 。

随着微生物生长繁殖脂肽类物质不断积累, 微生物繁殖越多则代谢产量越多。pH 值为 5 时产量低的原因可能是因为酸性环境不利于 WK1 生长。整个发酵过程中初始 pH 值为 5 的发酵液 pH 值始终低于 6.0(图 2), 而初始 pH 值为 6 和 7 的发酵液 pH 值在前 24 h 急速下降, 之后快速回升, 到 48~56 h 恢复到初始水平, 之后继续上升, 最后达 8.14。发酵液 pH 值的下降主要是代谢过程中产生的有机酸引起的, 在最初的 24 h 培养基中的葡萄糖被快速分解产生大量的有机酸, 而之后这些有机酸又被微生物分解利用, 溶液中的有机酸慢慢减少。另外, 微生物的代谢过程产生氨, 随着发酵过程的进行氨浓度增加, pH 值逐渐回升。

初始 pH 值为 5 处理含菌体发酵液的总有机碳质量浓度明显高于 pH 6 和 pH 7 处理(图 3), 说明 pH



不同字母表示处理之间差异显著($P<0.05$)

图1 培养基不同初始 pH 值脂肽类物质的重量法和差减法结果比较

Figure 1 Comparison on lipopeptide production measured by weight methods and OC difference methods

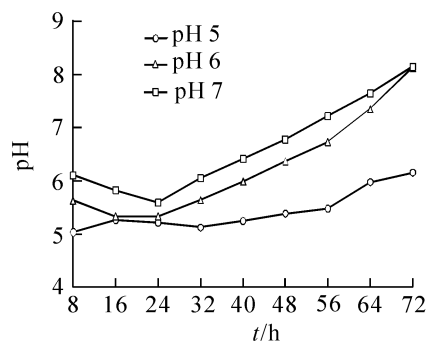


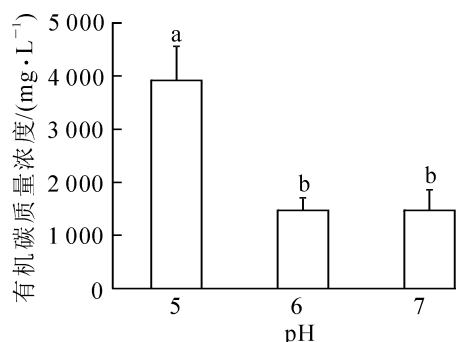
图2 不同初始 pH 值的 Landy 培养基内 pH 值随发酵时间的动态变化

Figure 2 Dynamics of liquid pH with increasing time of fermentation between different initial Landy medium pH

值为 5 条件下 WK1 代谢消耗最少,再次证明初始 pH 值为 5 处理不利于 WK1 生长。由于所有处理的初始有机碳质量浓度是相等的,微生物代谢越活跃,消耗的有机碳就越多。

2.3 培养基底物碳的利用效率评价

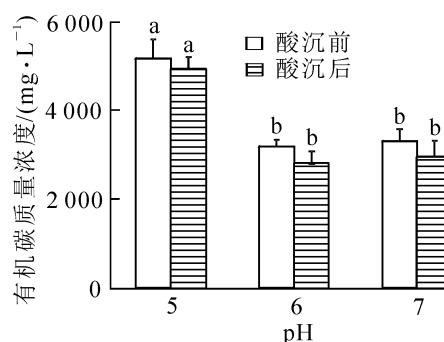
初始 pH 值为 5 的培养基中菌株 WK1 脂肽物质合成效率最低($162 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),排放的二氧化碳也最少($205 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),初始 pH 值为 6 和 7 的培养基中菌株 WK1 活动排放的二氧化碳相同,显著高于初始 pH 值为 5 的处理($P<0.05$),pH 6 培养基中菌株 WK1 脂肽物质合成效率高于 pH 7 培养基。Landy 培养基有机碳质量浓度理论值为 $5\,769.55 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,重铬酸钾法和 TOC 分析仪测得 Landy 培养基初始有机碳质量浓度分别为 $4\,933.30$ 和 $5\,252.43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,分别是理论值的 85.51%和 90.14%,说明 2 种方法均不能完全检测溶液中的全部有机碳。通过分析含菌体的发酵液有机碳质量浓度(图 3)以及酸沉降前后的总有机碳质量浓度(图 4)可知:初始 pH 值为 5 条件下有机碳质量浓度显著高于其他 2 个处理,说明 pH 值为 5 条件下的培养基中未被微生物同化利用的碳最高。综合图 1,图 3 和图 4 的结果得知:初始 pH 值为 5 条件微生物代谢利用的总碳、合成的脂肽类物质、排放的二氧化碳均为最少。



不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

图3 不同处理培养结束后溶液中有有机碳质量浓度比较

Figure 3 Comparison of organic carbon content in solution containing WK1 strains at the end of 72 h fermentation between treatments



不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

图4 不同处理发酵液酸沉降前后的总有机碳质量浓度结果比较

Figure 4 Comparison of total organic carbon in solution before and after lipopeptide being separated by acid deposition between treatments

由于重铬酸钾法和 TOC 法对同一溶液的测定结果存在差异,因此,计算差值时必须以同一种方法测定的结果计算。结果表明(表 2):初始 pH 值为 5 时培养基中菌株 WK1 脂肽物质合成效率最低($162 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),二氧化碳排放量也最少($205 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$);初始 pH 值为 6 和 7 的培养基中菌株 WK1 的二氧化碳排放量相同,显著高于初始 pH 值为 5 的处理($P<0.05$),但初始 pH 值为 6 的培养基中菌株 WK1 脂肽物质合成效率高于初始 pH 值为 7 处理,因此,初始 pH 值为 6 的培养基为最佳。由于初始 pH 值为 6

的处理二氧化碳排放量较高, 后期实验可探索初始 pH 5 和 pH 6 之间菌株 WK1 脂肽物质合成效率的变化, 有可能找到二氧化碳排放量较低, 但又不影响脂肽物质合成效率的 pH 值。

3 结论与讨论

解淀粉芽孢杆菌 WK1 获得较高产量脂肽物质的最佳培养时间为 72 h, 比许多已报道的芽孢杆菌长。不同细菌的生长速度不同, 最佳培养时间有差异, 而同样是芽孢杆菌, 生长速度也存在较大差异。车晓曦等^[18]得到解淀粉芽孢杆菌 SAB1 菌株最佳发酵时间为 26 h, 王帅等^[19]发现枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* G1 发酵 38 h 时脂肽产量最高, 洪鹏等^[20]发现解淀粉芽孢杆菌 HF-01 菌株培养 48 h 对柑橘绿霉病菌 *Penicillium digitatum* 拮抗效果最佳。相比而言, WK1 的生长速度相对较慢, 获得较高脂肽产量的发酵时间为 72 h, 与解淀粉芽孢杆菌 MH17 最优发酵时间相同^[21]。

初始 pH 值为 5 条件下微生物脂肽物质合成效率和二氧化碳排放量均最低, 初始 pH 值为 6 与 7 条件下二氧化碳排放量(700 mg·kg⁻¹)相同, 但 pH 值为 6 条件下脂肽物质产量(1 228 mg·L⁻¹ 培养基)和脂肽合成效率(234 mg·kg⁻¹)最高。由此可见: WK1 菌株最适初始 pH 值为 6, 而不同解淀粉芽孢杆菌菌株产脂肽最适初始 pH 值不同, 张雷^[22]对解淀粉芽孢杆菌菌株 15-1-1 的培养条件优化研究发现: 初始 pH 值为 7 时该菌株产脂肽物质产量以及培养液 *D*(600)值最大, 陈敏等^[23]在对解淀粉芽孢杆菌菌株 SC1150 发酵条件优化时发现最适初始 pH 值为 6.5。

重量法与差减法测定的不同处理的脂肽物质产量规律相同, 从高到低依次为 pH 6, pH 7, pH 5, 两者的相关系数为 0.563 2($n=9$), 但相同初始 pH 值条件下差减法所得的脂肽物质产量均高于重量法。可见, 差减法是评价脂肽产量的简单快速而有效的方法。

4 参考文献

- [1] 王晓彤, 金黎明, 宫小明, 等. 枯草芽孢杆菌产生的抗菌物质的研究进展[J]. 轻工科技, 2018, **34**(11): 14 - 15.
WANG Xiaotong, JIN Liming, GONG Xiaoming, *et al.* Research progress of antibacterial substances produced by *Bacillus subtilis* [J]. *Light Ind Sci Technol*, 2018, **34**(11): 14 - 15.
- [2] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, **33**(2): 97 - 103.
CHEN Zhongyi, ZHANG Jie, HUANG Dafang. Research progress on antimicrobial mechanism and genetic engineering of *Bacillus* for plant diseases biocontrol [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2003, **33**(2): 97 - 103.
- [3] 彭研, 陈相艳, 裴纪莹, 等. 生防芽孢杆菌的研究进展[J]. 山东农业科学, 2013, **45**(7): 138 - 140.
PENG Yan, CHEN Xiangyan, QIU Jiying, *et al.* Research progress on biocontrol *Bacillus* [J]. *Shandong Agric Sci*, 2013, **45**(7): 138 - 140.
- [4] 赵东洋. 解淀粉芽孢杆菌 SWB16 脂肽类代谢产物对球孢白僵菌的拮抗作用及发酵条件的初步优化[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
ZHAO Dongyang. *Antagonism of the Lipopeptide Metabolites Produced by Bacillus amyloliquefaciens Strain SWB16 against Beauveria bassiana and Preliminary Optimization of Its Fermentation* [D]. Chongqing: Southwest University, 2014.
- [5] 陆雅琴, 郭丽琼, 孙丽仪, 等. 芽孢杆菌 P6 产抗菌脂肽条件优化及发酵液性质研究[J]. 中国食品学报, 2018, **18**(11): 90 - 96.
LU Yaqin, GUO Liqiong, SUN Liyi, *et al.* Condition optimization of *Bacteria bacillus* P6 producing antibacterial lipid and study on its physical and chemical property [J]. *Chin J Food Sci*, 2018, **18**(11): 90 - 96.
- [6] 徐杨, 王楠, 李伟, 等. 海洋枯草芽孢杆菌 3512A 抗真菌脂肽的分离纯化及结构特性鉴定[J]. 中国生物防治, 2009, **25**(4): 328 - 333.
XU Yang, WANG Nan, LI Wei, *et al.* Purification and structural identifications of the antifungal lipopeptides produced

表 2 各处理二氧化碳排放量和脂肽物质合成效率

Table 2 CO₂ emission and produced lipopeptide from organic carbon medium

pH	二氧化碳排放量/(mg·kg ⁻¹)	脂肽物质合成效率/(mg·kg ⁻¹)
5	205 b	162 b
6	700 a	234 a
7	700 a	219 a

说明: 不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

- by marine bacterium *Bacillus subtilis* 3512A [J]. *Chin J Biol Control*, 2009, **25**(4): 328 – 333.
- [7] 龚国利, 王忠忠. 短短芽孢杆菌的鉴定及其抑菌物质的初步研究[J]. 陕西科技大学学报, 2017, **35**(4): 126 – 131.
- GONG Guoli, WANG Zhongzhong. Identification of *Brevibacillus brevis* and preliminary study on its antibacterial substances [J]. *J Shaanxi Univ Sci Technol*, 2017, **35**(4): 126 – 131.
- [8] ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol [J]. *Trends Microbiol*, 2008, **16**(3): 115 – 125.
- [9] 吴一晶, 林艺芬, 林河通, 等. 生防菌解淀粉芽孢杆菌研究进展[J]. 包装与食品机械, 2012, **30**(6): 49 – 52.
- WU Yijing, LIN Yifen, LIN Hetong, et al. Advances in the researches of biocontrol bacterial *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *Packag Food Mach*, 2012, **30**(6): 49 – 52.
- [10] 庄国宏. 产抗菌脂肽 GD 菌株筛选及脂肽分离、鉴定与应用研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
- ZHUANG Guohong. *Screening of GD Strain Producing Antimicrobial Lipopeptide and Studying on Its Separation, Identification and Application* [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2014.
- [11] 程敏, 徐秋芳. 解淀粉芽孢杆菌植物亚种 CGMCC 11640 对山核桃干腐病菌的抑制机制[J]. 浙江农林大学学报, 2017, **34**(2): 326 – 331.
- CHENG Min, XU Qiufang. Inhibitory mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CGMCC 11640 against *Botryosphaeria dothidea*, the pathogen of canker disease of *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2017, **34**(2): 326 – 331.
- [12] 艾嘉. 芽孢杆菌发酵液中抗菌脂肽的定量检测方法及应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- AI Jia. *Quantitative Detection Method and Application of Antibacterial Lipopeptide in Bacillus cereus Fermentation Broth* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.
- [13] 侯红漫, 靳艳, 金美芳, 等. 环脂肽类生物表面活性剂结构、功能及生物合成[J]. 微生物学通报, 2006, **33**(5): 122 – 128.
- HOU Hongman, JIN Yan, JIN Meifang, et al. Structure, function and biosynthesis of cyclic lipopeptidic biosurfactants [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2006, **33**(5): 122 – 128.
- [14] 刘文波, 熊燕红, 秦春秀, 等. 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)HAB-7 的培养基优化及抑菌活性[J]. 中国植保导刊, 2017, **37**(6): 5 – 13.
- LIU Wenbo, XIONG Yanhong, QIN Chunxiu, et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-7 and optimization of its culture medium [J]. *China Plant Prot*, 2017, **37**(6): 5 – 13.
- [15] 汪晶晶, 曹雪梅, 李欢, 等. 抗菌海洋解淀粉芽孢杆菌 GM-1-2 菌株摇瓶发酵培养基和发酵条件优化[J]. 江苏农业科学, 2018, **46**(8): 291 – 295.
- WANG Jingjing, CAO Xuemei, LI Huan, et al. Optimization of fermentation medium and fermentation conditions for antibacterial marine *Bacillus amyloliquefaciens* GM-1-2 strain shake flask [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2018, **46**(8): 291 – 295.
- [16] 杨冬静, 赵永强, 孙厚俊, 等. 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)XZ-1 发酵条件的优化[J]. 江西农业学报, 2017, **29**(10): 35 – 39.
- YANG Dongjing, ZHAO Yongqiang, SUN Houjun, et al. Optimization of fermentation conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-1 [J]. *Acta Agric Jiangxi*, 2017, **29**(10): 35 – 39.
- [17] 陈哲, 梁宏, 黄静, 等. 解淀粉芽孢杆菌 CM3 培养基及发酵条件优化[J]. 山西农业科学, 2016, **44**(11): 1577 – 1583.
- CHEN Zhe, LIANG Hong, HUANG Jing, et al. Optimization of culture medium and fermentation conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* CM3 [J]. *Shanxi Agric Sci*, 2016, **44**(11): 1577 – 1583.
- [18] 车晓曦, 李社增, 李校堃. 1 株解淀粉芽孢杆菌发酵培养基的设计及发酵条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2010, **38**(18): 9402 – 9405.
- CHE Xiaoxi, LI Shezeng, LI Xiaokun. Research on the design of the medium for the Amyloliquefacien *Bacillus* fermentation and optimization of its fermentation condition [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2010, **38**(18): 9402 – 9405.
- [19] 王帅, 高圣风, 高学文, 等. 枯草芽孢杆菌脂肽类抗生素发酵和提取条件[J]. 中国生物防治学报, 2007, **23**(4): 342 – 347.

- WANG Shuai, GAO Shengfeng, GAO Xuewen, *et al.* Fermentation optimization in lipopeptide productivity of *Bacillus subtilis* G1 [J]. *Chin J Biol Control*, 2007, **23**(4): 342 – 347.
- [20] 洪鹏, 安国栋, 胡美英, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HF-01 发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2013, **29**(4): 569 – 578.
- HONG Peng, AN Guodong, HU Meiyang, *et al.* Optimizing fermentation condition for *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 [J]. *Chin J Biol Control*, 2013, **29**(4): 569 – 578.
- [21] 卢彩鸽, 董红平, 张殿朋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 MH71 摇瓶发酵培养基及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2015, **31**(3): 369 – 377.
- LU Caige, DONG Hongping, ZHANG Dianpeng, *et al.* Detection of the genes encoding lipopeptide antibiotics and biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* MH71 [J]. *Chin J Biol Control*, 2015, **31**(3): 369 – 377.
- [22] 张雷. 解淀粉芽孢杆菌 15-1-1 发酵条件优化及对辣椒根腐病防治效果初探[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- ZHANG Lei. *Studies on Optimization of Fermentation Conditions and Biocontrol Effects Against Fusarium Solar of Bacillus amyloliquefaciens* 15-1-1 [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014.
- [23] 陈敏, 郭旭文, 李春远, 等. 解淀粉芽孢杆菌 SC1150 的抑菌活性及其液体发酵条件的优化[J]. 生态科学, 2015, **34**(3): 7 – 12.
- CHEN Min, GUO Xuwen, LI Chunyuan, *et al.* Studies on fungicidal activity and liquid fermentation optimization of *Bacillus amyloliquefaciens* strain SC1150 [J]. *Ecol Sci*, 2015, **34**(3): 7 – 12.

《浙江农林大学学报》2020 年征订启事

《浙江农林大学学报》主要报道森林培育学、森林经理学、经济林学、林木遗传育种、林业工程、植物保护学、植物学、土壤学、生态学、动物学、环境保护学、园林学和园艺学等学科的学术论文、问题讨论和研究简报等。供农林科技工作者、园林绿化和规划设计人员、环保工作者、大专院校师生、基层干部及科技信息人员参阅。双月刊, 大 16 开本, 每期 198 页。国内外公开发行人。ISSN 2095-0756, CN 33-1370/S。

《浙江农林大学学报》连续 8 次入选全国中文核心期刊, 入选中国科学引文数据库(CSCD)核心库(2019-2020)和武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)核心学术期刊等; 荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊奖, 首届浙江省优秀科技期刊二等奖, 第二届浙江省优秀科技期刊一等奖, 浙江省精品科技期刊, 首届和第二届全国优秀科技期刊三等奖, 全国高校优秀科技期刊一等奖等 30 多项奖项; 被《中国学术期刊(光盘版)》《中国期刊网》《万方数据(ChinaInfo)系统科技期刊群》“中国学术期刊综合评价数据库”“中国科技论文统计源期刊”, 俄罗斯《文摘杂志》(AJ), 美国剑桥科学文摘(CSA)5 种分文摘, 英国农业与生物科学研究文摘(CABi), 美国化学文摘(CA), 日本科学技术振兴机构中国文献数据库(JSTChina)等国内外近 30 家权威数据收录。

定价: 20.00 元/本, 全年 120.00 元/份。国内订户请向全国非邮发报刊联合发行部订阅, 地址: 300381 天津市大寺泉集北里别墅 17 号。电话: 022-23973378。E-mail: LHZD@public.tpt.tj.cn。也可直接向浙江农林大学学报编辑部汇款订购。邮汇: 311300 浙江省杭州市临安区武肃街 666 号浙江农林大学学报编辑部。电话: 0571-63732749。E-mail: zlx@zafu.edu.cn。银行汇款: 建行临安市支行营业部。账号: 33001617335050018761。户名: 浙江农林大学。

国外读者请向中国国际图书贸易集团有限公司办理订阅手续。地址: 100048 北京海淀区车公庄西路 35 号。

欢迎订阅, 欢迎投稿。