

Bacillomycin 高产菌株的紫外诱变 选育及其防治大米黄曲霉霉变的研究

孟攀攀,陆兆新,吕凤霞,赵海珍,张 充,别小妹*
(南京农业大学食品科学技术学院,江苏南京 210095)

摘 要:本研究以 *Bacillus subtilis fmbJ* 为出发菌株,通过紫外诱变选育高产抗菌肽 Bacillomycin 的菌株,并将 Bacillomycin 应用于防治大米黄曲霉霉变。结果表明,当紫外照射时间为 60 s 和 80 s 时,菌株致死率分别为 85.2% 和 86.8%,正突变率相对较高分别为 40.33% 和 44.87%。进一步采用紫外照射时间 60 s 和 80 s 进行诱变,经过筛选得到一株遗传性状稳定的高产 Bacillomycin 的菌株 UV60-4,产量高达 306.31 mg/L,是出发菌株产量的 1.32 倍。在温度为 37 °C、加水量为 6 mL、黄曲霉(3.3×10^3 cfu/mL)接种量为 500 μ L 的条件下,Bacillomycin 添加量达到 0.15 mg/g 时,可以有效抑制大米黄曲霉霉变。

关键词:紫外诱变,致死率,正突变率,防治,霉变

Study on screening a high-yield Bacillomycin strain by UV mutagenesis and its application in preventing rice mildew caused by *Aspergillus Flavus*

MENG Pan-pan, LU Zhao-xin, LV Feng-xia, ZHAO Hai-zhen, ZHANG Chong, BIE Xiao-mei*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Using *Bacillus subtilis fmbJ* as the starting strain, a mutant strain with high-yield Bacillomycin was acquired by UV mutagenesis, and Bacillomycin was applied to prevent rice from *Aspergillus Flavus* mildew. The results showed when the fmbJ strain was irradiated by UV for 60 s and 80 s, the fatality rate separately reached 85.2% and 86.8%, and the higher positive mutation rate was obtained which was 40.33% and 44.87% respectively. Under the UV irradiation time of 60 s and 80 s, a stable and high-yield strain UV60-4 was selected out with the maximum production of Bacillomycin up to 306.31 mg/L, which was 1.32 times of the starting strain. When the temperature was 37 °C, the addition of water was 6 mL, and the inoculation of *Aspergillus flavus* (3.3×10^3 cfu/mL) was 500 μ L, adding 0.15 mg/g Bacillomycin into rice can effectively inhibit mildew caused by *Aspergillus flavus*.

Key words: UV mutagenesis; fatality rate; positive mutation rate; prevent; mildew

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)19-0186-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.19.031

紫外诱变作为遗传育种的经典方法,在获得微生物高产菌方面尤其是枯草芽孢杆菌高产菌的选育方面^[1-2]取得了巨大成就。该技术主要阻碍正常碱基间的配对,导致细胞突变甚至死亡,具有设备简单、安全、易操作、诱变效率高等诸多优点,因而被广泛应用。

抗菌脂肽是由革兰氏阳性芽孢杆菌通过非核糖体合成途径产生的具有抗菌作用的脂肽类化合物,它具有广谱、高效、安全无毒、不易产生耐药性、易被生物降解等优点,在食品、医药、农业等领域被广泛应用^[3-5]。Bacillomycin 作为抗菌脂肽的一种,其碳链长度为 C₁₄~C₁₇,结构与 iturin 类似,与其它抗菌脂肽相比,它对真菌有着较强的抑制作用,目前在植物病

原菌的防治方面^[6-9]取得了一定的成就。

黄曲霉是一种常见的病原真菌,它可以依靠自身所产生的孢子侵染粮食作物及其种子等,导致其产量降低甚至产生疾病。它还可以污染使粮食及其制品,使其发生霉变,并且产生次生代谢产物黄曲霉毒素,使人畜致癌^[10-12],是国际癌症组织认可的一级致癌物质^[7]。目前,防治黄曲霉引起的粮食作物霉变所采取的物理以及化学等方法,效果并不明显且成本较高。因此,如何更好的防治粮食黄曲霉变成为国内外研究的一大热点。尽管已筛选出许多抗黄曲霉霉变的物质,但真正投入应用的却很少。据研究表明,Bacillomycin 对黄曲霉有很强的抑制作用,它是一种从微生物中得到并且已被鉴定的对黄曲霉有抑

收稿日期: 2015-01-12

作者简介: 孟攀攀(1989-),女,在读硕士研究生,研究方向:食品微生物,E-mail: mpan.pan@163.com。

* 通讯作者: 别小妹(1964-),女,博士,研究方向:食品生物技术和食品微生物,E-mail: bxm43@njau.edu.cn。

制作用的物质,且其抑制黄曲霉的抑菌机理已被研究清楚^[13],为防治黄曲霉所引起的粮食霉变提供了充分的理论与技术支持,因而在防治粮食黄曲霉霉变方面有着潜在的应用前景。

本研究利用实验室保藏的一株产 Bacillomycin 量不高的枯草芽孢杆菌为出发菌株,通过紫外诱变处理,选育出一株遗传性状稳定的高产抗菌肽 Bacillomycin 的菌株,并将其应用于防治大米黄曲霉霉变的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株:出发菌株:枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* fmbJ(CGMCC NO.0943) 南京农业大学食品科技学院酶工程实验室保藏;指示菌:黄曲霉菌 *Aspergillus flavus*(CICC 2062) 中国工业微生物菌种保藏管理中心。

培养基以及试剂:营养肉汤培养基(NA)^[14];营养琼脂培养基(NB)^[14];马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[14];Landy 培养基^[15];1%酚酞-乙醇溶液:1.0 g 酚酞,95% (v/v)乙醇 100 mL;0.01 mol/L KOH-95%乙醇溶液:先配制约 0.5 mol/L 氢氧化钾水溶液,即称取约 28 g 氢氧化钾溶于 100 mL 水中,再取 20 mL 0.05 mol/L 氢氧化钾水溶液用 95% (v/v)乙醇稀释至 1000 mL。

仪器:超净台 苏净集团安泰公司;OHAUS 2100 pH 计 美国 OHAUS 公司;高压蒸气灭菌锅 日本 TOMY 公司;Agilent 1100 series 高效液相色谱系统 美国 Agilent 公司;HYL-A 全温摇瓶柜 太仓市强乐实验设备有限公司;飞鸽牌系列离心机 上海安亭科学仪器厂;紫外灯 荷兰皇家飞利浦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌 fmbJ 的紫外诱变研究

1.2.1.1 菌体悬浮液的制备 将出发菌株接到 NB 斜面上 37 ℃ 培养 24 h,再从斜面上取一环接到 NA 培养基中,在 37 ℃、180 r/min 条件下培养 24 h 后以 5% 接种量接种到另一瓶新鲜灭菌的 NA 培养基中,再于 37 ℃、180 r/min 条件培养至对数生长末期,取菌液用血球计数板在显微镜下计数,调整细胞浓度为 10^8 个/mL。

1.2.1.2 紫外诱变 打开紫外灯预热 20 min,使紫外灯照射强度稳定。紫外灯照射强度为 15 W,照射距离为 30 cm。取直径为 60 mm 带有一曲别针的无菌平板,分别加入调整好菌浓度的菌悬液 3 mL。取平皿于磁力搅拌器上低速搅拌。照射 1 min 以杀死平皿盖上的微生物,再打开平皿盖,紫外照射 20、40、60、80、100 s。将经过照射的菌悬液,和未经照射的菌悬液在红光条件下分别用无菌生理盐水稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度。取 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液 0.1 mL 加于 NB 培养基中,用无菌玻璃棒涂布均匀,每个稀释度 3 个平行。未经紫外照射的作为对照。平板用黑布包好过夜放在培养箱中,37 ℃ 培养过夜。取平板数菌落数,计算致死率,致死率计

算公式如下:

$$\text{菌体致死率}(\%) = (1-A)/B \times 100$$

其中:A-紫外处理组平板上的菌落数;B-未经紫外照射的出发菌株平板上的菌落数。

1.2.1.3 高产 Bacillomycin 的突变菌株的初筛 挑取紫外诱变各个时间点的突变菌株接种于 Landy 培养基中,在 37 ℃、180 r/min 条件下发酵培养 52 h,5000 r/min 离心去除菌体,上清液用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 至 2.0,4 ℃ 放置过夜,5000 r/min 离心去除上清液,沉淀用甲醇溶解 ($V_{\text{发酵液}}:V_{\text{甲醇}} = 10:1$),过 0.22 μm 滤膜用琼脂扩散法对黄曲霉做抑菌实验。测量抑菌圈直径大小,计算菌株正突变率,正突变率的计算公式如下:

$$\text{正突变率}(\%) = C/D \times 100$$

其中:C-各个紫外照射时间抑菌圈直径比出发菌株大的菌株数;D-各个紫外照射时间所挑取的菌株数。

1.2.1.4 高产 Bacillomycin 的突变菌株的复筛 将初筛得到的高产 Bacillomycin 的菌株同 1.2.1.3 方法活化、发酵并处理发酵液,所得抗菌物质用甲醇溶解 ($V_{\text{发酵液}}:V_{\text{甲醇}} = 20:1$),过 0.22 μm 滤膜后 HPLC 检测所产生的 Bacillomycin 的量,其产量与峰面积的关系为:

$$Y = (7.6396X - 2.3575)/E$$

其中:Y-菌株紫外诱变产量,单位:mg/L;X-峰面积,单位:Am²;E-浓缩倍数。

1.2.1.5 高产 Bacillomycin 菌株遗传稳定性研究 将筛到的高产菌株在 NB 平板上传代 10 代后,将 10 代分别如 1.2.1.5 方法发酵并处理发酵液,过 0.22 μm 滤膜后 HPLC 检测所产生的 Bacillomycin 的量,产量计算方法同 1.2.1.5。

1.2.2 Bacillomycin 防治大米黄曲霉霉变的研究

1.2.2.1 大米黄曲霉霉变条件的模拟 温度条件的筛选:取大米样品 100 g 装入广口瓶,每瓶加入 6 mL 无菌水以及 3.3×10^3 cfu/mL 的黄曲霉孢子悬液 700 μL,用凡士林封口,分别放在 5、20、25、30、37、40 ℃ 的冰箱及恒温箱中模拟储藏。

水分以及黄曲霉接种量筛选:取大米样品 100 g 装入广口瓶,向大米样品里添加黄曲霉孢子悬液 (3.3×10^3 cfu/mL) 300、500、700 μL,并向各个黄曲霉孢子处理过的大米中加入一定的无菌水,使总体系含水量为 1、3、6 mL,共 9 个处理,每个处理 3 个平行,选取 1.2.2.1 结果所得到的最宜发霉温度条件进行储藏。

1.2.2.2 Bacillomycin 样品的制备 取高产 Bacillomycin 的突变菌株同 1.2.1.3 方法发酵菌株并处理发酵液,得到沉淀用水充分溶解,10000 r/min 离心去沉淀,最终配成浓度为 3 mg/mL 的 Bacillomycin 样液。

1.2.2.3 抗菌物质 Bacillomycin 处理大米 取 100 g 大米若干份,向其中加入 1.2.2.2 制备的 Bacillomycin 样品使其在大米中的含量为 0、0.03、0.09、0.15 mg/g,充分混匀,在模拟的大米易霉变条件下储藏。

1.2.2.4 抗菌物质处理后大米感官评定 取抗菌物质处理 15 d 后的大米观察其表现、色泽以及气味

变化。

1.2.2.5 抗菌物质处理后大米脂肪酸量的测定 每隔 5 d 取一定量的抗菌物质处理后大米,用 GB/T 15684-1995 方法测定其脂肪酸含量。

1.3 数据统计分析

本实验采用 EXCEL2007 软件进行数据分析和图表制作。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌 fmbJ 的紫外诱变研究

2.1.1 枯草芽孢杆菌 fmbJ 的紫外诱变致死曲线以及正突变率 以紫外照射时间为横坐标,以致死率以及正突变率为纵坐标,得到菌株紫外照射时间与致死率以及正突变率之间的关系如图 1 所示。

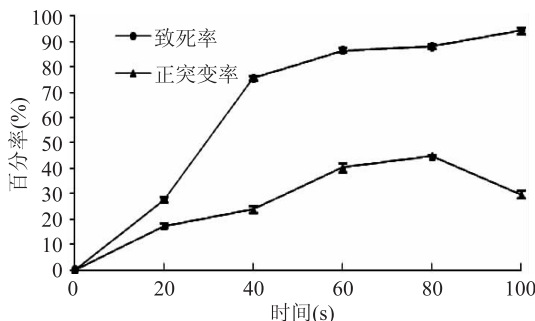


图1 枯草芽孢杆菌 fmbJ 菌紫外诱变致死率及正突变率

Fig.1 The fatality rate and positive mutation rate of *Bacillus subtilis* fmbJ under UV mutagenesis

由图 1 致死率曲线可以看出,随着紫外照射时间的增加,菌体致死率逐渐增高,呈正相关关系。在 0~40 s 时,菌体致死率急剧上升;在 40~80 s 时,菌体致死率增长速率减缓。由正突变率曲线可以看出,随着紫外照射时间的增长,菌体正突变率呈先升高后下降趋势。在 60 s 和 80 s 时,菌株致死率达到 85.2% 和 86.8%,正突变率相对较高为 40.33% 和 44.87%,因而选取 60 s 和 80 s 两个时间条件为紫外诱变的最佳条件。

2.1.2 高产 Bacillomycin 的突变菌株的筛选 进一步采用紫外照射时间 60 s 和 80 s 进行诱变,经过初筛,得到 4 株 Bacillomycin 产量明显提高的菌株,编号分别为 UV60-3、UV60-4、UV80-12、UV80-13。对四株菌进行复筛,其 Bacillomycin 产量如图 2 所示。

由图 2 可以看出,UV60-3、UV80-12、UV80-13 三株菌的 Bacillomycin 产量略高于对照出发菌株,产量提高不明显;菌株 UV60-4 的 Bacillomycin 产量较出发菌株有明显提高,高达 306.31 g/L,是出发菌株的 1.32 倍,有待进行遗传稳定性测定。

2.1.3 高产 Bacillomycin 菌株的遗传稳定性研究 将复筛得到的高产 Bacillomycin 的菌株 UV60-4 进行遗传稳定性测定,菌株传代 10 代所 Bbacillomycin 的

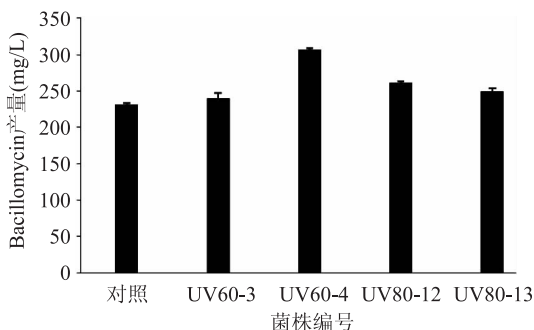


图2 紫外诱变后突变菌株的 Bacillomycin 产量

Fig.2 Bacillomycin yield of mutant strain by UV irradiation 量如图 3 所示。由图 3 可看出,菌株 UV60-4 产 Bacillomycin 量在十代之内稳定在一定范围内,且在误差范围内无明显差异,由此可以看出菌株 UV60-4 是一株遗传性状十分稳定的菌株。

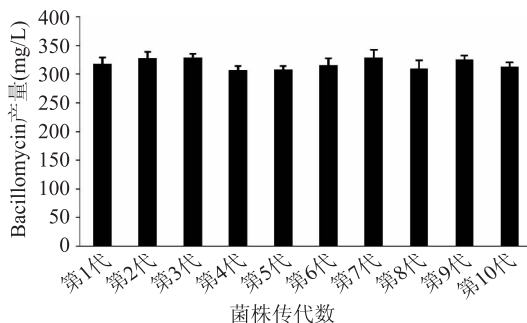


图3 Bacillomycin 高产菌株

Bacillus subtilis fmbJ UV60-4 的遗传稳定性

Fig.3 The genetic stability of high-yield Bacillomycin *Bacillus subtilis* fmbJ UV60-4

2.2 Bacillomycin 防治大米黄曲霉霉变的研究

2.2.1 大米黄曲霉霉变条件的模拟 在不同温度条件下,向大米中添加大量的黄曲霉孢子液和充分的水,在储藏期 30 d 以内以观察到大米感官观发生明显变化的时间(单位:d)为霉变指标来判断大米的霉变情况,所得结果如表 1 所示。

从表 1 可以看出,在储藏温度为 5 ℃ 和 20 ℃ 时,大米中虽然加入大量的黄霉菌,但由于环境温度过低,菌体新陈代谢变慢,生长受到抑制,无法大量繁殖,因而无法观测到大米感官发生了明显的变化,大米没有发生霉变;在储藏温度为 25 ℃ 及其以上时,各个温度储藏的大米均发生了霉变,感官发生了明显的变化,且随着储藏温度的升高(25~40 ℃),霉菌生长速度变快,大米感官开始发生显著变化的时间变短。在 37 ℃ 以及 40 ℃ 时,大米感官开始发生显著变化的时间分别为 7~8 d 以及 6~7 d,霉变速度较快,考虑到当地天气因素,环境温度 37 ℃ 较为常见,故选用 37 ℃ 为模拟大米霉变的温度条件。

以 37 ℃ 为模拟大米霉变的温度条件,对大米进

表 1 不同温度对大米霉变的影响

Table 1 Effect of different temperature on rice mildew

温度(℃)	5	20	25	30	37	40
大米感官开始发生显著变化的时间(d)	>30	>30	21~23	12~13	7~8	6~7

表3 大米感官评价
Table 3 The sensory appraisal of rice

黄曲霉的 接种量(μL)	Bacillomycin 添加量(mg/g)	评分	感官质量
500	0	0	大米大部分变形结块、严重霉变、肉眼可见霉菌菌丝体、有严重霉味
	0.03	2	大米有少量结块、色泽发灰、肉眼可见霉菌菌丝体、有霉味,碎粒较多
	0.09	4.5	大米色泽发黄、有一定的碎粒,表皮有严重裂纹、米粘性下降
	0.15	6.8	大米色泽略黄、有少量碎粒、米粒完整性较好、大米表皮略有裂纹、米粘性有所下降
0	0	6.5	大米色泽略黄、有少量碎粒、米粒完整性较好、大米表皮略有裂纹、米粘性有所下降

注:10 分为满分,评分标准:8~10 分好;6~8 分较好;4~6 分差;小于 4 分极差。

行黄曲霉接种量以及水分条件的筛选,所得结果如表 2 所示。

表2 不同水分以及黄曲霉接种量对大米霉变的影响
Table 2 Effect of different water content and inoculation ammount of Aspergillus flavus on rice mildew

霉变指标	体系总加水量 (mL)	黄曲霉接种量(μL)		
		300	500	700
大米感官开始	1	>30	>30	30
发生明显变化的	3	20~23	14~17	10~13
时间(d)	6	6~10	7~8	4~7

由表 2 可以看出,在 37 ℃ 条件下,随着大米中水分添加量的增加,大米感官开始发生明显变化的时间变短,大米霉变时间变短,当水分添加量达到 6 mL 时,环境水分极为充足,霉变时间最短;随着大米中黄曲霉接种量的增加,大米感官开始发生显著变化的时间变短,大米霉变时间变短。为了观测和测量大米霉变指标变化的需要,以 8 d 左右为大米表观开始发生明显变化的时间为宜,故选择加水量为 6 mL、黄曲霉(3.3×10^3 cfu/mL)接种量为 500 μL 为模拟大米霉变的条件。

综合表 1 和表 2 结果,最终选取温度为 37 ℃、加水量为 6 mL、黄曲霉(3.3×10^3 cfu/mL)接种量为 500 μL 这三个条件来模拟大米的黄曲霉霉变。

2.2.2 抗菌物质处理后大米感官评定 向大米中添加不同量的抗菌肽 Bacillomycin 储藏 15 d,然后对大米进行感官评定,所得结果如表 3 所示。

由表 3 可以看出,随着大米中 Bacillomycin 添加量的增多,大米霉变程度减轻。当黄曲霉的接种量为 500 μL 时,向大米中添加 0、0.03 mg/g 的 Bacillomycin 样品时,大米感官品质极差,发生严重霉变;向大米中添加 0.09 mg/g 的 Bacillomycin 时,大米感官有明显变化,发生了一定的霉变;在大米中添加 0.15 mg/g 的 Bacillomycin 时,大米仍然保持良好的性状,和无黄曲霉添加的空白组感官特性一致。因此,0.15 mg/g 的 Bacillomycin 的添加有效的抑制了大米黄曲霉霉变。

2.2.3 抗菌物质处理后大米脂肪酸量的测定 表 4 为添加不同量的 Bacillomycin 大米的脂肪酸值的变化情况。通常脂肪酸值越高,大米霉变程度越大^[16-18]。由表 4 可以看出,随着大米中 Bacillomycin 添加量的减少以及储藏时间的增加,大米脂肪酸值

变大,大米的黄曲霉霉变程度减小。在有黄曲霉侵染大米的情况下,当 Bacillomycin 添加量为 0、0.03 mg/g 时,随着储藏时间的增加,处理组与无黄曲霉接种的空白组相比脂肪酸值相差变大,霉变速度快,表明经过 15 d 储藏,添加浓度 0 mg/g 和 0.03 mg/g 对防止大米霉变没有效果。当 Bacillomycin 添加量为 0.09 mg/g 时,随着储藏时间的增加,处理组与无黄曲霉接种的空白组相比脂肪酸值依然差异显著,霉变速度较快,储藏 15 d 之后霉变程度较大,但霉变情况较添加量为 0 mg/g 时有一定的减缓,这说明 0.09 mg/g 的 Bacillomycin 的添加对大米黄曲霉霉变起到了一定的抑制作用。在 Bacillomycin 的添加量为 0.15 mg/g 时,随着储藏时间的增加,处理组和无黄曲霉接种的空白组相比脂肪酸值几乎没有差异,这说明 0.15 mg/g 的 Bacillomycin 的添加对大米黄曲霉霉变起到了有效的抑制作用。

表4 大米的脂肪酸含量变化
Table 4 Changes in fatty acid content of rice

黄曲霉接种量 (μL)	Bacillomycin 添加量(mg/g)	脂肪酸值(KOH/100 g 干基)		
		5 d	10 d	15 d
500	0	41.59	456.28	495.18
	0.03	37.40	378.49	442.82
	0.09	34.41	317.16	379.98
	0.15	31.42	44.89	61.34
0	0	23.94	53.86	62.84

3 结论

紫外诱变是工业微生物的选育高产菌株的传统方法,可以有效的提高菌株产量。本实验将出发菌株进行紫外诱变,通过初筛、复筛、遗产稳定性实验,最终获得一株稳定的、高产抗菌肽 Bacillomycin 的突变菌株 UV60-4,其产量为 306.31 mg/L,是出发菌株的 1.32 倍,实验结果初步证明了紫外诱变在提高工业微生物发酵过程中次级代谢产物的产量方面有显著作用。在温度为 37 ℃、加水量为 6 mL、的黄曲霉(3.3×10^3 cfu/mL)接种量为 500 μL 条件下,向大米中加入 Bacillomycin 量达到 0.15 mg/g 时,可以有效的抑制大米黄曲霉霉变,初步实现了 Bacillomycin 在防治粮食黄霉霉变方面的应用。

参考文献

[1] WANG Jing, ZHU Jianhua, UN Wei, et al. Screening for the (下转第 201 页)

1-(+)-lactic acid by an alkaliphilic marine microorganism[J].
Biotechnology Letters, 2011, 33(7):1429-1433.
[2] Wakai S, Yoshie T, Asai-Nakashima N, et al. 1-lactic acid
production from starch by simultaneous saccharification and
fermentation in a genetically engineered *Aspergillus oryzae* pure
culture[J]. Bioresource Technology, 2014, 173:376-383.
[3] Bonos E, Christaki E, Abraham A, et al. The influence of
mannan oligosaccharides, acidifiers and their combination on
caecal microflora of Japanese quail (*Coturnix japonica*) [J].
Anaerobe, 2011, 17(6):436-439.
[4] 史高峰, 王国英. L(+)-乳酸发酵与分离技术研究进展
[J]. 食品科学, 2007, 28(12):547-551.
[5] Naveena B J, Altaf M, Bhadrach K, et al. Production of L(+)
Lactic Acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Semi-Solid
State Fermentation Using Wheat Bran [J]. Original Scientific
Paper, 2004, 42(3):147-152.
[6] 李欣, 武俊瑞, 田甜, 等. 大庆自然发酵酸菜中乳酸菌的分
离鉴定及耐酸菌株初步筛选[J]. 食品科学, 2014(1):
150-154.

(上接第 189 页)

Strain Highly Producing Antagonistic Substance from *Bacillus*
subtilis B47 by UV Mutagenesis [J]. Agncultural Science &
Technology, 2008, 9(4):68-72.
[2] 许向华, 史军花, 郑鸿雁, 等. 紫外诱变枯草芽孢杆菌选育
葡萄糖-1-磷酸高产菌株[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(9):
21-23.
[3] Banat I M, Makkar R S, Cameotra S S. Potential commercial
applications of microbial surfactants [J]. Microbiology and
Biotechnology, 2000, 53:495-508.
[4] Ibrahim M, Banat, Andrea Franzett, et al. Microbial
biosurfactants production, applications and future potential [J].
Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87:427-444.
[5] 王东, 王雅玲, 孙立军. 纳豆菌抗菌脂肽固态发酵工艺优
化及其在对虾保鲜上的应用[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012:
29-33.
[6] Hiradate S, S Yoshida, H Sugie, et al. Mulberry anthracnose
antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2
[J]. Phytichemistry, 2002, 61:693-698.
[7] 罗楚平, 刘邨洲, 吴荷芳, 等. 脂肽类化合物 bacillomycin L
抗真菌活性及其对水稻病害的防治[J]. 中国生物防治学报,
2011, 21(1):76-81.
[8] Tanaka K, Ishihara A, Nakajima H. Isolation of anteiso-C-
17, iso-C-17, iso-C-16, and iso-C-15 Bacillomycin D from
Bacillus amyloliquefaciens SD-32 and Their Antifungal Activities
against Plant Pathogens [J]. Journal of Agricultural and Food,
2014, 62(7):1469-1476.
[9] Yuan Jun, Li Bing, Zhang Nan. Production of Bacillomycin-
and Macrolactin-Type Antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens*

[7] 全国饲料工业标准化委员会. GBT 23877-2009 中华人民
共和国国家标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
[8] Lu Z, Wei M, Yu L. Enhancement of pilot scale production of 1
(+)-lactic acid by fermentation coupled with separation using
membrane bioreactor [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(3):
410-415.
[9] 姜绍通, 吴学风, 潘丽军, 等. 米根霉菌丝球半连续发酵产
乳酸的工艺研究[J]. 农业机械学报, 2009(11):150-155.
[10] 王曦茁, 马建伟, 汪来发, 等. 厚垣普可尼亚菌液体发酵
动力学[J]. 林业科学, 2014(11):75-81.
[11] 胡文锋, 张春丽, 刘秉杰, 等. 植物乳杆菌 YSQ 规模化生
产的低成本培养基配方优化 [J]. 食品科学, 2012(7):
182-187.
[12] 张帅, 董基, 黄志明. 响应面法优化富铬灵芝发酵培养基
[J]. 食品科学, 2013(15):208-212.
[13] 王岁楼. 微生物比生长速率 μ 的含义 [J]. 郑州轻工业学
院学报, 1993(4):6-9.
[14] 姜勇. 米根霉和鼠李糖乳杆菌乳酸发酵工艺的研究[D].
青岛: 中国海洋大学, 2008.

NJN-6 for Suppressing Soilborne Plant Pathogens [J]. Journal of
Agricultural and Food, 2012, 60(12):2976-2981.
[10] Bluma RV, Etcheverry MG. Influence of *Bacillus* spp. isolated
from maize agroecosystem on growth and aflatoxin B1 production by
Aspergillus section Flavi [J]. Pest Management Science, 2006, 62:
242-251.
[11] Zhang Q, Li L, Zhu M, et al. Primary cutaneous aspergillosis
due to *Aspergillus flavus*: a case report [J]. Chinese Medical
Journal, 2005, 18(3):255-257.
[12] Oakley EJ, Schmitt F, Jost JP, et al. Some Naturally
Occurring Substances: Food items and Constituents, Heterocyclic
Aromatic Amines and mycotoxins [J]. IARC Scientific
Publication, 1993, 56(6):489-521.
[13] Gong Qingwei, Zhang Chong, Lu Fengxia, et al.
Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its
inhibition effects against *Aspergillus flavus* [J]. Food Control,
2014, 36(1):8-14.
[14] 李平兰, 贺雅非. 食品微生物学实验原理与技术[M]. 北
京: 中国农业出版社, 2005:263-265.
[15] 龚庆伟. 芽孢杆菌抗菌脂肽的分离纯化及 Bacillomycin D
抑制黄曲霉作用的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012:98.
[16] 周显青, 张玉荣. 储藏稻谷品质指标的变化及其差异性
[J]. 农业工程学报, 2008, 24(12):238-242.
[17] 杨晓蓉, 周建新, 姚明兰, 等. 不同储藏条件下稻谷脂肪
酸值变化和霉变相关性研究[J]. 粮食储藏, 2006, 35:49-52.
[18] 周建新, 鞠兴荣, 孙肖东, 等. 不同储藏条件下稻谷霉菌
区系演替的研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(5):133-136.