蜡样芽孢杆菌高密度发酵条件与过程的优化

胥聆铭[1,2]，朱 莉[3]，詹晓北[*1,2]，高泽鑫[1,2]，尹忠伟[1,2]

（1. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2.江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；3. 无锡格莱克斯生物科技有限公司，江苏 无锡 214125）

摘要：蜡样芽孢杆菌的生物量对其生物功能具有重要影响。为了提高蜡样芽孢杆菌的产量与芽孢率，通过单因素实验筛选出最适宜其生长的碳源与氮源，分别为质量比 1:1 复配的葡萄糖与水溶性淀粉和质量比 1:1 复配的大豆蛋白胨与酵母提取物。在此基础上，于 7 L 发酵罐中探究流加方式、pH、搅拌转速和通气量等因素对其生物量及芽孢率的影响。最优发酵条件为：在 0~9 h 之间，转速 250 r/min，通气量 3 L/min，pH 恒定 6.5；9~18 h 时，转速升高至 350 r/min，通气量升高至 4.5 L/min，并以 0.45 mL/min 流量补加培养基浓缩液；18 h 时，转速降低至 150 r/min，通气量降低至 2.25 L/min，pH 调高至 7.5，停止补料至发酵结束。基于以上发酵策略，在 18 h 时，蜡样芽孢杆菌活菌数达 2.2×10^{10} CFU/mL，是未优化前的 4.88 倍；发酵结束时，芽孢率超过 90%。本研究结果为蜡样芽孢杆菌的工业化应用提供了一定基础。

关键词：蜡样芽孢杆菌；发酵策略；发酵优化；高密度发酵

中图分类号：Q 815　**文章编号**：1673-1689(2023)08-0046-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.08.006

Optimization of High Cell Density Fermentation Conditions and Process of *Bacillus cereus*

XU Lingming[1,2]，*ZHU Li*[3]，*ZHAN Xiaobei*[*1,2]，*GAO Zexin*[1,2]，*YIN Zhongwei*[1,2]

(1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3.Wuxi Glyco Biotechnology Co., Ltd., Wuxi 214125, China)

Abstract: The biomass of *Bacillus cereus* has an important effect on its biological function. In order to increase the yield and spore rate of *Bacillus cereus*, the optimum carbon and nitrogen source were screened by single factor experiment. The optimal carbon source was 1:1 (mass ratio) mixed glucose and water-soluble starch, and the optimal nitrogen source was 1:1(mass ratio) mixed soybean peptone and yeast extract. The effects of feeding method, pH, stirring speed and ventilatory capacity on the biomass and spore rate were studied in a 7 L bioreactor. The optimal fermentation conditions were as follows: in 0~9 h, the stirring speed, aeration ratio and pH were 250 r/min, 3 L/min and 6.5, respectively; in 9~18 h, the stirring speed and ventilatory capacity were 350 r/min and 4.5 L/min, respectively and the concentrated medium was added at a flow rate of 0.45 mL/min; at 18 h, the

收稿日期：2021-07-19

基金项目：国家“十三五”重点研发计划项目(2017YFD0400302)。

* **通信作者**：詹晓北(1962—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物反应器关键技术研究。E-mail：xbzhan@yahoo.com

stirring speed, ventilatory capacity and pH were changed to 150 r/min, 2.25 L/min and 7.5 respectively, and the feeding was stopped till the end of fermentation. Based on the above fermentation strategies, the number of viable *Bacillus cereus* reached 2.2×10^{10} CFU/mL at 18 h, which was 4.88 times of that before the optimization. At the end of fermentation, the spore rate was over 90%. This study provided basis for the industrial applications of *Bacillus cereus*.

Keywords: *Bacillus cereus*, fermentation strategy, fermentation optimization, high cell density fermentation

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种常见的革兰氏阳性菌,能够产生芽孢,具有较强的抗逆性[1]。其在自然界中广泛分布于水、土壤、空气中,且与大多数动植物具有密切的共生关系[2]。

近年来,生物防治在农业与环境保护方面都成了研究热点,越来越多的人利用微生物处理动植物疾病与环境问题[3]。蜡样芽孢杆菌凭借其优异性质吸引了许多研究者的兴趣,李生樟等利用蜡样芽孢杆菌拮抗水稻条斑病,表明蜡样芽孢杆菌能够抑制水稻条斑病菌的生长,限制条斑病症状的扩展[4]。此外,蜡样芽孢杆菌在代谢物合成[5-7]、益生菌剂制备[8-9]、废水处理[10]、土壤修复[11]等方面都有良好的表现。于平等利用蜡样芽孢杆菌高密度发酵生产新型中性蛋白酶,获得了酶活力为 702.21 U/mL 的中性蛋白酶[12]。综上所述,蜡样芽孢杆菌是一种很有前景的微生物菌株,可以广泛应用于农业、食品、医药等领域。

目前关于提高蜡样芽孢杆菌产量的报道相对较少[13],已有报道的蜡样芽孢杆菌产量最高只有 1.2×10^{10} CFU/mL[14],不足以满足工业化生产的需求。通常认为发酵条件优化是影响生物过程中细菌生长与芽孢形成的关键因素[15]。因此可以对蜡样芽孢杆菌的发酵条件与过程进行优化,以提高其产量,满足工业化需求。

高密度发酵(High Cell-Density Culture,HCDC)又称高密度培养,是一种相较于常规培养够显著提高产物产量的培养技术[16],对降低生产成本与工业化扩大生产具有重要意义。刘开放等利用高密度发酵技术对布拉酵母培养工艺进行优化,摇瓶阶段酵母产量达 8.21 g/L,比优化前提高 1.39 倍,于 50 L 发酵罐进行扩大培养,酵母产量达到 51.21 g/L[17]。因此利用高密度发酵技术培养蜡样芽孢杆菌来促进其工业化生产切实可行。此外,蜡样芽孢杆菌的芽孢具有多种优良特性,在利用高密度发酵技术提高蜡样芽孢杆菌产量的同时,也需提高其芽孢率,以最大化利用蜡样芽孢杆菌。

作者以 *Bacillus cereus* ATCC 14579 为实验菌株,通过单因素实验对蜡样芽孢杆菌培养基成分进行优化,获得最适宜蜡样芽孢杆菌生长的碳源与氮源。在此基础上,于 7 L 发酵罐进行深层扩大培养,探究最佳发酵调控策略,以期提高蜡样芽孢杆菌产量与芽孢率,为其工业化生产和应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*):编号 ATCC 14579,来源于作者所在实验室保藏的菌种。

1.2 主要仪器与设备

尼康 TI-S-EJOY 型倒置显微镜:日本 Nikon 公司产品;英诺聚 Enology Y15 型全自动葡萄酒分析仪:西班牙 Biosystems 公司产品;Eppendorf New Brunswick BioFlo/CelliGen115 型全自动发酵罐:美国 Eppendorf 公司产品。

1.3 培养基

LB 培养基(组分 g/L):胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10;pH 7.0。

NA 固体培养基(组分 g/L):胰蛋白胨 10,牛肉浸粉 3,氯化钠 5,琼脂 20;pH 7.3。

种子培养基(组分 g/L):胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,葡萄糖 10;pH 7.0。

1.4 主要试剂

酵母粉:购自 Oxoid 公司;其他试剂:均为国产分析纯,购自国药化学试剂有限公司。

1.5 单因素实验

1)蜡样芽孢杆菌活化培养　将实验室保存的蜡样芽孢杆菌转接到 NA 固体培养基中,于 30 ℃的恒温培养箱中培养 24 h,传代 2 次后置于 4 ℃保存。

2)种子液制备　用接种环挑取 1 环活化 2 次

后的菌苔,接入种子培养基,于 30 ℃、200 r/min 条件下培养 14~16 h,获得种子液。

3)250 mL 摇瓶中营养物质筛选　在 LB 培养基基础上,通过单因素实验,探究不同碳源、氮源对蜡样芽孢杆菌生长情况的影响,通过测定各因素下发酵液 OD_{600} 与活菌数来判断菌体生长情况,采用双染色法监控芽孢形成情况。

1.6　深层高密度发酵扩大培养

根据摇瓶阶段优化的培养基配方与发酵条件,在 7 L 发酵罐上进行扩大培养,初始装液量为 3 L,将蜡样芽孢杆菌种子液按体积分数 10%接种至发酵培养基。初始培养基(组分 g/L):葡萄糖 12.5,水溶性淀粉 12.5,大豆蛋白胨 10,酵母提取物 10,$MgSO_4·7H_2O$ 3,$(NH_4)_2SO_4$ 3,$MnCl_2$ 0.2;初始通气量为 3 L/min,搅拌转速为 250 r/min,温度 30 ℃,初始 pH 恒定为 6.5,在发酵过程中流加碳源和氮源,改变转速与通气量,自动流加 2 mol/L NaOH 与 1 mol/L 磷酸调控 pH。发酵过程中以泡敌消泡,每隔 3 h 取一次样,测定 OD_{600}、pH、活菌数与芽孢数。

1.6.1　补料分批发酵

1)间歇流加碳源　当培养基中残糖质量浓度低于 5 g/L 时开始流加碳源,流加液为 75 mL 200 g/L 葡萄糖与 200 g/L 水溶性淀粉混合液,每隔 3 h 测定一次残糖质量浓度。

2)间歇流加碳氮源　当培养基中残糖质量浓度低于 5 g/L 时开始流加碳源与氮源,流加液中碳源为 75 mL 200 g/L 葡萄糖与 200 g/L 水溶性淀粉混合溶液,氮源为 75 mL 100 g/L 酵母提取物与 100 g/L 大豆蛋白胨混合溶液,每隔 3 h 测定 1 次残糖与残留伯胺氮质量浓度。

3)恒速流加碳氮源　当培养基中残糖质量浓度低于 5 g/L 时开始流加碳源与氮源,流加液中碳源为 200 g/L 葡萄糖与 200 g/L 水溶性淀粉混合液,氮源为 100 g/L 酵母提取物与 100 g/L 大豆蛋白胨混合液。碳源与氮源流加速率为 0.45 mL/min。

1.6.2　分段 pH 调控

0~18 h 时恒定 pH 为 6.5,18 h 时将 pH 调至 7.5,直至整个发酵过程结束。

1.6.3　分段搅拌转速与通气量调控

0~9 h 保持搅拌转速为 250 r/min,通气量为 3 L/min;9~18 h 调高搅拌转速与通气量至 350 r/min 与 4.5 L/min,18 h 时将搅拌转速与通气量调至 150 r/min 与 2.25 L/min,直至发酵结束。

1.7　检测方法

1.7.1　菌体质量浓度测定

发酵液的菌体质量浓度采用比浊法(OD_{600})测定。

1.7.2　pH 测定

取一定量发酵液,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液于 pH 计上测定 pH。

1.7.3　活菌与芽孢计数

参见 GB 4789.14—2014[18],芽孢率 Y 通过芽孢数 A 和活菌数 B 计算,公式如下:

$$Y=\frac{A}{B}\times 100\%$$

1.7.4　芽孢形成过程监控

取样后涂片,干燥固定,滴加孔雀绿染液盖满菌膜,置于酒精灯上加热 5 min,倾去染液,待玻片冷却至室温后,用细水流冲洗玻片,再用番红复染 1~2 min 后,倾去染液,干燥后,显微镜镜检。

1.7.5　残糖质量浓度

采用蒽铜-硫酸比色法测定发酵液中残糖质量浓度[19]。

1.7.6　伯胺氮质量浓度

取一定量发酵液,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,使用英诺聚 Enology Y15 型全自动葡萄酒分析仪测定发酵液中伯胺氮质量浓度。

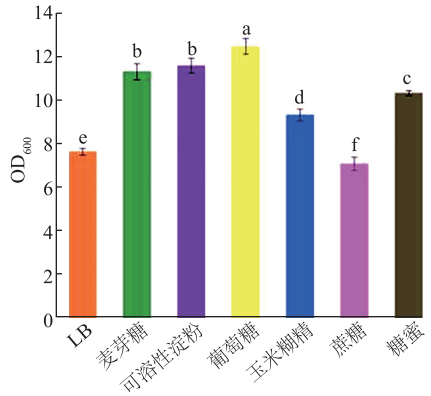
1.8　数据处理

以上每个实验重复 3 次。采用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行统计分析 Origin 2021 制图。

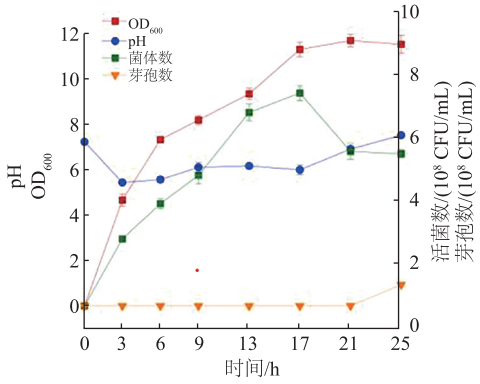
2　结果与分析

2.1　碳源对蜡样芽孢杆菌生长的影响

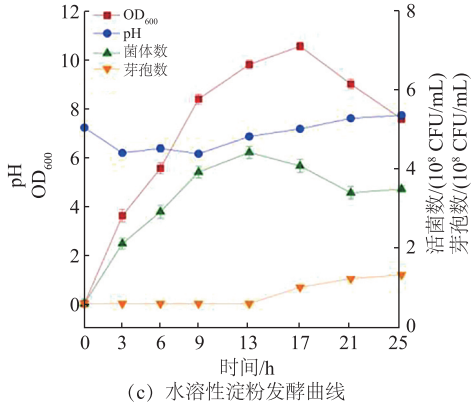
在 LB 培养基的基础上,分别以葡萄糖(10 g/L)和相同质量浓度的水溶性淀粉、麦芽糖、玉米糊精、糖蜜和蔗糖为碳源,探究不同碳源对菌体生长的影响,实验结果如图 1(a)所示。以 10 g/L 葡萄糖和 10 g/L 水溶性淀粉为碳源,菌体生长情况最好。分别测定这 2 种发酵液中的活菌数、芽孢数、pH 与 OD_{600} 的变化情况,实验结果如图 1(b)、(c)所示。以葡萄糖为碳源,菌体生长情况最好,以水溶性淀粉为碳源,芽孢最早出现。基于上述结果,选择将葡萄糖与水溶性淀粉进行复配,复配结果如图 1(d)所示。当葡萄糖与水溶性淀粉的质量比为 1:1 时,发酵液 OD_{600} 最高。且葡萄糖与水溶性淀粉价格低廉,以葡萄糖和水溶性淀粉为碳源,不仅能获得较高产量与芽孢率,还能大大降低生产成本,故以质量比 1:1 葡萄糖与水溶性淀粉为碳源。



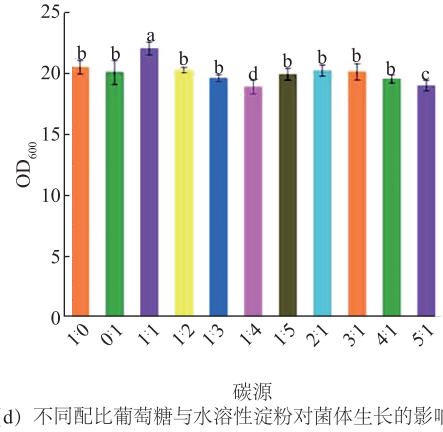
(a) 不同碳源对菌体生长影响



(b) 葡萄糖发酵曲线



(c) 水溶性淀粉发酵曲线



(d) 不同配比葡萄糖与水溶性淀粉对菌体生长的影响

图 1　碳源对蜡样芽孢杆菌生长的影响

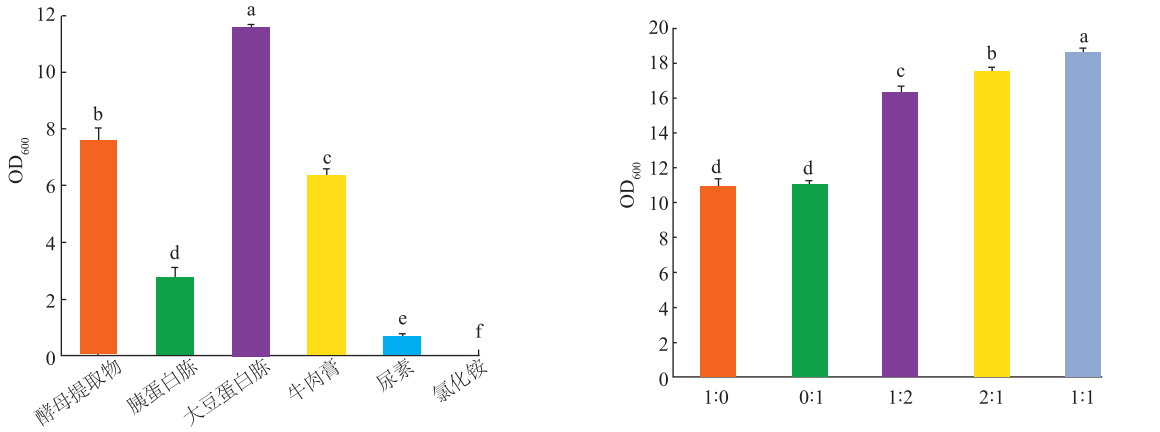
Fig. 1　Effect of carbon source on the growth of *Bacillus cereus*

2.2　氮源对蜡样芽孢杆菌生长的影响

氮源对菌体生长具有重要影响,蛋白质是细胞结构的组成成分,也是菌体生长不可或缺的营养物质。分别以酵母提取物(10 g/L)与等质量浓度的胰蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉膏、尿素与氯化铵为氮源,探究不同氮源对菌体生长的影响。实验结果如图 2(a),以大豆蛋白胨与酵母提取物为氮源,菌体生长情况最好。代书玲等的报道中发现,复配氮源比单一氮源更有利于菌体生长[10],因此进一步探究了氮源复配比例对菌体生长的影响。如图 2 (b)所示,当大豆蛋白胨与酵母提取物的添加质量比为 1:1 时,发酵液 OD_{600} 最高,菌体生长情况最好。酵母提取物来源于微生物,大豆蛋白胨来源于植物,以二者为共同氮源,能提供更丰富的营养物质,有利于菌体的生长。故选择质量比为 1:1 的酵母提取物与大豆蛋白胨为氮源。

2.3　发酵罐深层扩大培养

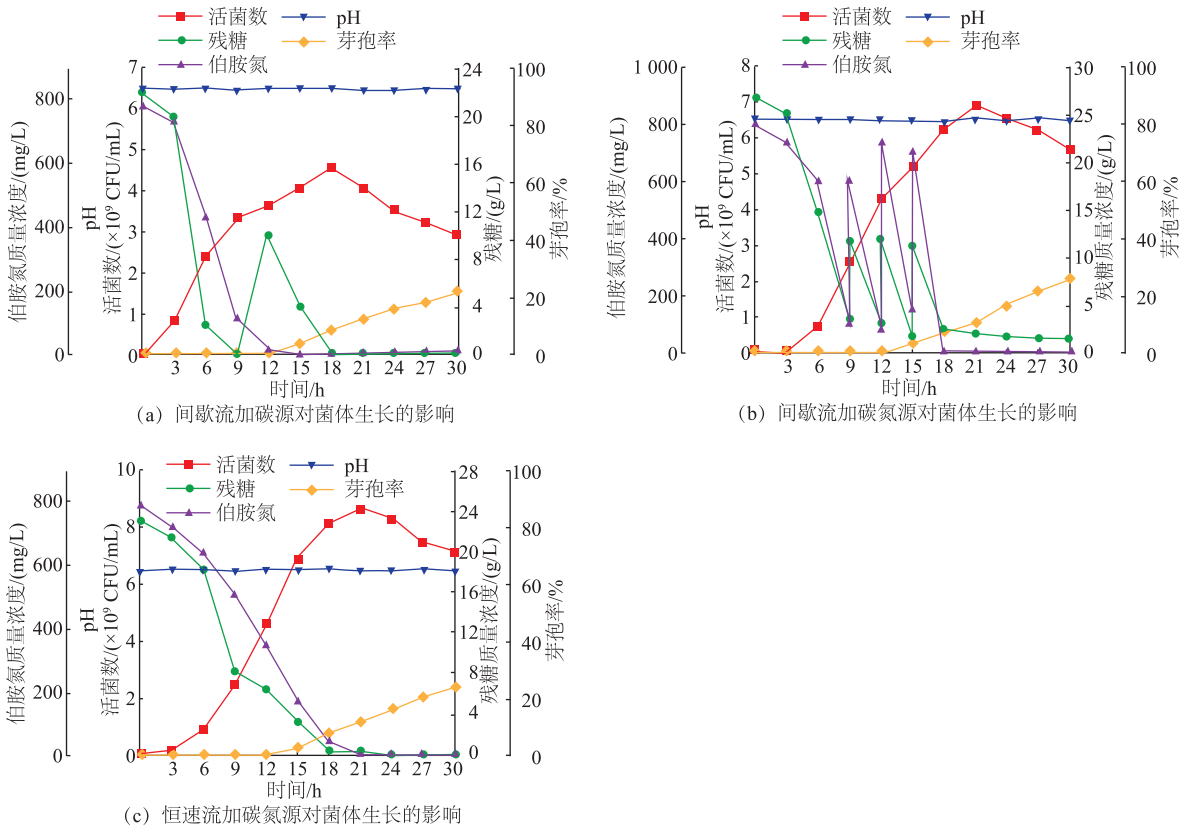
2.3.1　流加策略的影响　补料分批发酵是通过间歇或连续补加一定量新鲜培养基,排出废料,使菌体能在生长阶段获得足够的营养物质并减缓菌种老化,可以让菌体保持较高且较稳定的生长速率,从而获得高产物产量[20-22]。目前补加单一营养物质的补料分批发酵策略较常见,邹孟琳等通过连续流加葡萄糖,获得了较高产量丁酸梭菌及芽孢[23]。但补加单一营养物质,可能导致发酵液中部分营养物质过剩,使菌体产生过多代谢副产物,不利于菌体生长发育。刘景阳等通过全营养流加,获得了较高产量的谷氨酸[24]。杨文革等也通过流加多种营养物质,获得了高产量的蜡样芽孢杆菌[25]。作者在此基础上稍加修改,探究间歇流加碳源、间歇流加碳氮源与恒速流加碳氮源 3 种策略对蜡样芽孢杆菌生长及芽孢形成情况的影响。间歇流加碳源结果见图 3(a),发酵液中氮源在9~12 h 时耗尽,由于缺乏氮源,菌体的生长速率减缓。同时流加碳氮源结果如图 3(b)所示,菌体生长速率在整个对数生长阶段未出现明显减缓,表明同时流加碳氮源有利于菌体的快速生长繁殖。如图 3(c)所示,恒速流加碳氮源后发酵液中活菌数明显增多,但芽孢率没有显著提



(a) 不同氮源对菌体生长情况的影响　(b) 不同配比酵母提取物与大豆蛋白胨对菌体生长的影响

图 2　氮源对蜡样芽孢杆菌生长的影响

Fig. 2　Effect of nitrogen source on the growth of *Bacillus cereus*



(a) 间歇流加碳源对菌体生长的影响　(b) 间歇流加碳氮源对菌体生长的影响

(c) 恒速流加碳氮源对菌体生长的影响

图 3　不同流加方式对蜡样芽孢杆菌生长的影响

Fig. 3　Effect of different feeding methods on the growth of *Bacillus cereus*

升,考虑到恒速流加策略更加简单易操作,因而选择以恒速流加方式,同时流加碳氮源作为蜡样芽孢杆菌高密度发酵的流加策略。

2.3.2　分段 pH 的影响　通过摇瓶阶段的实验发现,pH 会影响蜡样芽孢杆菌的生长与芽孢形成产生,弱酸性条件适合菌体生长,弱碱性条件适合芽孢形成,这与 Hue 等的研究结果[26]相符合。故在 7 L 发酵罐扩大培养阶段,将恒速流加碳氮源流加策略与分段 pH 调控策略相结合,在菌体生长达到稳定期前,使用弱酸性环境(pH 6.5)进行培养,促进其生

长,待菌体生长进入稳定期后,将发酵液 pH 调至弱碱性环境(pH 7.5)进行培养,促使其转变为芽孢,实验结果见图 4。18 h 菌体生长达到稳定期后,将发酵液 pH 从弱酸性调至弱碱性,与恒定弱酸性条件相比,发酵液中活菌数无较大差异,但分段 pH 调控后芽孢率得到了较大提升,故恒速流加碳氮源与两段 pH 调控相结合策略有利于菌体生长及芽孢形成。

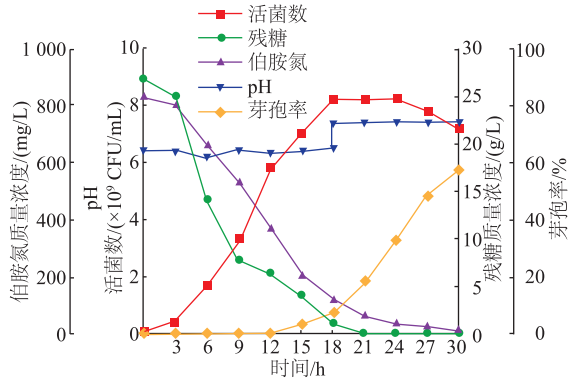


图 4 分段 pH 调控策略结果

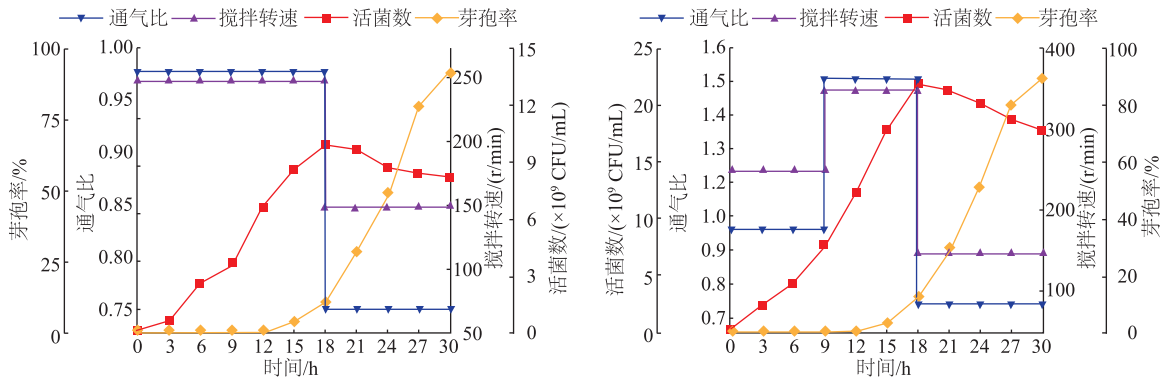
Fig. 4 Results of segmented pH control strategy

2.3.3 分段搅拌转速与通气量调控策略 溶氧对蜡样芽孢杆菌的生长具有重要影响[27-28],低溶氧条件不利于菌体生长,并会促使其转变为芽孢[29-30]。发酵罐中的溶氧一般由改变通气量与搅拌转速调控[31]。故以分段 pH 与恒速流加碳氮源为基础,在菌体生长进入稳定期(18 h)时,通过降低搅拌转速与通气量考察低溶氧对芽孢率的影响,结果见图 5(a)。在菌体生长达到稳定期后,将搅拌转速与通气量从 250 r/min 与 3 L/min 降低至 150 r/min 与 2.25 L/min。因而芽孢率从(58.0±0.5)%升至 90.0%以上,表明此种溶氧调控方式能够显著提高芽孢率。

在发酵过程中发现,菌体生长进入对数生长期中期后,发酵液变黏稠,氧气传递速率下降,溶氧快速减少,因而考虑在此时加大搅拌转速与通气量,对发酵液进行充分搅拌,增加发酵液中溶氧,以促进菌体的生长繁殖。结果如图 5(b)所示,在 9 h 时调高搅拌转速与通气量至 350 r/min 与 4.5 L/min;18 h 时,按照图 5(a)策略调低搅拌转速与通气量,以此得到三段搅拌转速与通气量调控策略。在此调控策略下,发酵液中活菌数得到了较大提升,最终达到 2.2×10^{10} CFU/mL。

2.4 芽孢率镜检分析

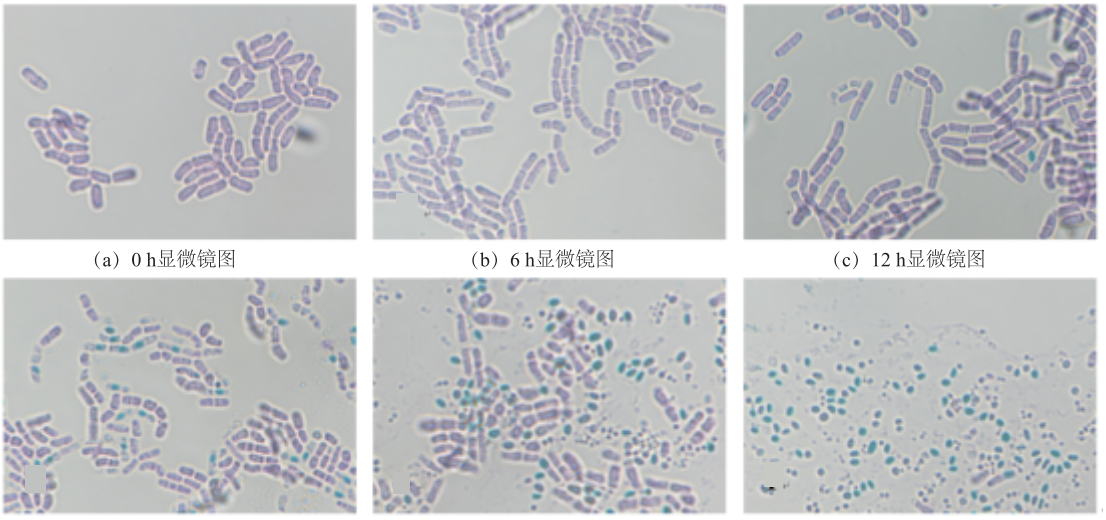
芽孢是细菌的休眠体,一般为内生孢子,在恶劣环境下,细菌形成芽孢,待到条件适宜时,再重新萌发为细菌。在前面的实验中,通过分段 pH、分段搅拌转速与通气量调控,发酵结束时发酵液内的蜡样芽孢杆菌芽孢率超过 90.0%。图 6 为实验过程中所观察到的芽孢形成过程图,实验中所使用的染色方法为双染色法,即利用菌体与芽孢对染液的亲和力不同,将菌体染为红色,芽孢染为绿色,以便于观察区分。从图 6 中可以看出,到 12 h 开始有菌体转变为芽孢,到 18 h 芽孢开始逐渐增多,但此时主要还处于芽孢形成阶段,芽孢作为内生孢子,还未脱离菌体。18 h 后进行的一系列调控使发酵液中的芽孢率开始快速上升,到 24 h 时芽孢率达到 50%以上;到 30 h 时发酵液中芽孢率达 90.0%以上。以上结果表明本实验所使用的发酵调控策略能有效提升芽孢率。



(a) 两段溶氧调控策略对菌体生长与芽孢形成的影响 (b) 三段溶氧调控策略对菌体生长与芽孢形成的影响

图 5 分段搅拌转速与通气量调控策略

Fig. 5 Control strategy of segmented stirring speed and ventilation ratio



(a) 0 h显微镜图 (b) 6 h显微镜图 (c) 12 h显微镜图
(d) 18 h显微镜图 (e) 24 h显微镜图 (f) 30 h显微镜图

图 6 蜡样芽孢杆菌芽孢形成过程(×100)

Fig. 6 *Bacillus cereus* spore formation process(×100)

3 结 语

作者通过摇瓶阶段的研究,筛选出最利于蜡样芽孢杆菌生长的碳源为葡萄糖与相同质量浓度的水溶性淀粉,氮源为大豆蛋白胨与相同质量浓度的酵母提取物。通过 7 L 发酵罐扩大培养,分别探究了流加方式、pH 与溶氧对蜡样芽孢杆菌生长情况和芽孢率的影响。结果表明,0~9 h 恒定搅拌,转速、通气量与 pH 分别为 250 r/min、3 L/min 与 6.5;9 h 时以 0.45 mL/min 速率流加碳氮源, 并提高搅拌转速至 350 r/min, 通气量为 4.5 L/min;18 h 时停止流加碳氮源,调高 pH 至 7.5,搅拌转速与通气量分别降至 150 r/min 与 2.25 L/min。在此调控策略下,18 h 时蜡样芽孢杆菌的活菌数达到 2.2×10^{10} CFU/mL,是未优化前的 4.8 倍, 发酵结束时, 芽孢率超过 90.0%。

利用流加碳氮源与分段 pH、搅拌转速与通气量调控相结合策略对蜡样芽孢杆菌进行高密度发酵,是本研究的一个创新点,实验结果也表明此调控策略确实有效,与未优化结果相比,蜡样芽孢杆菌生物量与芽孢率均有了较大提高,研究结果为蜡样芽孢杆菌工业化生产提供了新思路。

参考文献:

[1] 程国富,郑自强,卫春会,等. 蜡样芽孢杆菌与酿酒酵母混菌发酵效果探究[J]. 酿酒科技,2021,42(3):53-59.
[2] 李霞. 蜡样芽孢杆菌调控番茄根系分泌物对南方根结线虫的作用[D]. 南京:南京师范大学,2019.
[3] 尹艳楠,谈家金,李梦伟,等. 蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株防治松材线虫病研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(3):152-158.
[4] 李生樟,刘昭,杨瑞环,等. 一株拮抗水稻条斑病菌的蜡样芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(7):127-136.
[5] 钟小廷. 产细菌素蜡样芽孢杆菌的筛选、鉴定及培养基优化[D]. 成都:西华大学,2014.
[6] 代书玲,陈国,宗琪. 蜡样芽孢杆菌产磷脂酶 D 发酵条件优化[J]. 中国酿造,2019,38(11):140-144.
[7] 李晔. 蜡样芽孢杆菌胶原酶的分离纯化及其在毕赤酵母中表达的研究[D]. 天津:天津商业大学,2016.
[8] 汪梅珍. 蜡样芽孢杆菌活菌片联合中医推拿治疗肠绞痛患儿的效果[J]. 医疗装备,2021,34(10):71-73.
[9] 葛全兴. 微生态制剂在养猪生产中的应用[J]. 现代畜牧科技,2021,49(3):46-47.
[10] JIA F,YI Z,JIN Q,et al. *Bacillus cereus* liquid fertilizer was produced from *Agaricus bisporus* industrial wastewater[J]. **Journal of Biotechnology**,2021,327(2):74 - 85.
[11] 焦仕林. 蜡样芽孢杆菌 Cr4-1 对六价铬污染土壤的修复及其土壤微生态影响[D]. 武汉:华中科技大学,2016.

[12] 于平,吴赟婷,杨柳贞,等. 蜡样芽孢杆菌高产新型中性蛋白酶发酵条件的优化[J]. 中国食品学报,2020,20(1):109-117.
[13] 朱海云,马瑜,柯杨,等. 抗猕猴桃细菌性溃疡病蜡样芽孢杆菌 MA23 培养基及发酵条件优化[J]. 中国农学通报,2021,37(7):112-118.
[14] 闫洪雪,李丽,刘露,等. 一株蜡样芽孢杆菌 B-21 的发酵优化[J]. 山东农业科学,2016,48(3):62-65.
[15] LASSOO R, MAHARAJH D, GORGENS J, et al. High-density spore production of a *B. cereus* aquaculture biological agent by nutrient supplementation[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2009,83(1):59-66.
[16] 李娜,杨江华,韦宇拓. 植物乳杆菌 ZJ316 高密度发酵条件优化[J]. 中国酿造,2021,40(5):43-48.
[17] 刘开放,席志文,黄林娜,等. 布拉酵母高密度发酵培养基及发酵工艺优化[J]. 食品科学,2019,40(8):56-62.
[18] 国家卫生与计划生育委员会. 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验:GB 4789.14—2014[S]. 北京:中国标准出版社,2014.
[19] 蒋方程,李傲然,何静仁,等. 不同品种山药的营养成分分析及其水提物的体外抗氧化能力研究[J]. 食品工业科技,2018,39(4):6-11.
[20] 蒋予箭,黄炳文,李婷. 补料发酵法生产玫瑰醋工艺优化及风味分析[J]. 农业工程学报,2019,35(15):304-311.
[21] FENG S,WANG,WEN M,et al. Simultaneous optimization of feeding rate and operation parameters for fed-batch fermentation processes[J]. **Biotechnology Progress**,1999,15(5):949-952.
[22] YAN Q,DU G,CHEN J. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*[J]. **Process Biochemistry**,2003,39(3):387-391.
[23] 邹孟琳,高麒笙,薛梦涵,等. 丁酸梭菌清液发酵高密度培养工艺研究[J]. 饲料工业,2021,42(11):53-59.
[24] 刘景阳,刘云鹏,徐庆阳. 谷氨酸全营养流加发酵新工艺[J] .食品与发酵工业,2021,47(7):14-20.
[25] 杨文革,胡永红,李玲. 一种蜡样芽孢杆菌及其多阶段发酵方法. 中国:102093974A[P]. 2011-06-15.
[26] HUE,NGUYEN,THI,et al. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2008,80(1):107-114.
[27] FRAVEL. Commercialization and implementation of biocontrol[J]. **Annual Review of Phytopathology**,2005,43(1):337-359.
[28] POSADA U,LUISA,ROMERO T,et al. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production[J]. **Bioprocess & Biosystems Engineering**,2015,38(10):1879-1888.
[29] 王云,刘松,冯岳,等. *L*- 天冬酰胺酶的补料分批发酵[J]. 食品与生物技术学报,2020,39(3):1-8.
[30] 刘春红. 5 株有益芽孢杆菌工业化生产发酵工艺优化研究[D]. 北京:中国农业大学,2016.
[31] 李佳伟,刘龙,李江华,等. 两阶段搅拌转速控制策略发酵生产柠檬酸[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(2):131-136.