

车建美, 刘波, 马桂美, 等. 响应面法优化短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质超声波提取工艺 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (11): 1090-1096.

CHE J-M, LIU B, MA G-M, et al. Optimization on Ultrasonic Disruption for Extracting Intracellular Metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX Using Response Surface Methodology [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30 (11): 1090-1096.

## 响应面法优化短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质超声波提取工艺

车建美<sup>1</sup>, 刘波<sup>1\*</sup>, 马桂美<sup>2</sup>, 刘国红<sup>1</sup>, 唐建阳<sup>1</sup>

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建 福州 350002)

**摘要:** 为提取短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 的胞内代谢物质, 利用超声波破碎其细胞, 对胞内代谢物质进行优化提取。在超声波输出功率、超声时间以及料液比进行单因素试验的基础上, 利用 Design-expert 进行试验设计, 响应面优化得到胞内代谢物质的最佳提取工艺。单因素试验结果表明, 当超声时间为 30 min 时, 获得的胞内代谢物质较多, 胞内代谢物质得率为  $11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 超声波功率为 100 W 时, 所得胞内代谢物质得率最高, 为  $9.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 料液比 1:25 时所得胞内代谢物质得率最高, 为  $12.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。进一步通过响应面优化发现, 超声时间、超声功率、料液比 3 个因素对胞内代谢物质得率的影响程度依次为: 料液比 > 超声破碎时间 > 超声功率。最佳超声波提取方法为: 超声功率为 318.68 W, 超声时间为 10 min, 料液比为 1:25, 在此条件下提取的胞内代谢物质得率为  $12.9878 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

**关键词:** 超声波破碎; 短短芽孢杆菌; 响应面法; 提取

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

### Optimization on Ultrasonic Disruption for Extracting Intracellular Metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX Using Response Surface Methodology

CHE Jian-mei<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1\*</sup>, MA Gui-mei<sup>2</sup>, LIU Guo-hong<sup>1</sup>, TANG Jian-yang<sup>1</sup>

(1. Agricultural Bio-Resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract:** Ultrasound was applied to rupture the cells of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX to facilitate extraction of the intracellular metabolites produced by the bacteria. Effect of ultrasonic power, treatment time, and cell/liquid ratio were studied in a single-factor experiment. Optimum conditions of the extraction were determined using a design-expert program and the response surface method. The single-factor experiment showed that, when the ultrasonic treatment time was 30 min, the greatest recovery rate on the intracellular metabolites, i. e.,  $11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , could be obtained; when 100 W of ultrasound power was applied, the highest extraction rate of  $9.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  was achieved; and, when a cell/liquid ratio was 1:25 implemented, the highest yield of  $12.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  could be reached. Then, the process was optimization by using the response surface method to show that the effects were cell/liquid ratio > ultrasonic application time > ultrasonic power, and the optimal conditions for the ultrasonic disruption were: an application of ultrasonic power at 318.68 W, a total treatment time of 10 min, and a cell/liquid ratio of 1:25. As a result, a yield of the intracellular metabolites from the extraction at  $12.9878 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$

收稿日期: 2015-10-8 初稿; 2015-10-29 修改稿

作者简介: 车建美 (1977-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 微生物生物技术、微生物保鲜 (E-mail: chejm2002@163.com)

\* 通讯作者: 刘波 (1957-), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 微生物生物技术与农业生物药物 (E-mail: fzliubo@163.com)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370059); 福建省自然科学基金项目 (2014J06012); 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2014R1018-13); 福建省农业科学院青年英才计划项目 (YC2015-7); 福建省种业创新与产业化工程项目 (2014S1477-1-3)

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  was achieved.

**Key words:** ultrasonic disruption; *Brevibacillus brevis*; response surface method; metabolite extraction

短短芽胞杆菌 *Brevibacillus brevis* 是从芽胞杆菌属分立出的一个独立的属, 该属细菌细胞呈杆状,  $(0.7 \sim 0.9) \mu\text{m} \times (3 \sim 5) \mu\text{m}$ , 革兰氏阳性或可变, 以周生鞭毛运动, 在膨大孢囊内含椭圆形芽孢, 菌落平整、光滑, 无可溶色素<sup>[1-2]</sup>。短短芽胞杆菌具有分泌蛋白能力强、胞外蛋白酶活性低等优点, 是分泌表达蛋白较理想的宿主<sup>[3-4]</sup>。另外, 其在环保、生防、化工、食品等方面也得到了很好的应用。如可作用于原油, 通过氧化过程将高碳原油烃降解成低碳烃, 提高原油的采收率<sup>[5]</sup>; 可抑制尖孢镰刀菌、香蕉枯萎病菌、棉花立枯病菌、黄萎病菌、炭疽病等的生长<sup>[6-8]</sup>; 可诱导烟草的系统抗性, 增强烟草的抗病能力<sup>[9]</sup>。随着短短芽胞杆菌功能的发掘, 其应用范围也越来越广。

微生物代谢组学是指全面分析细胞生长或生产周期某一时刻细胞内和细胞外的所有低分子量代谢物, 它在发酵控制、代谢控制及菌种改良方面的应用取得较好的效果<sup>[10-16]</sup>。胞内代谢物的分析不仅在代谢组学研究, 如内在酶动力学或代谢调节中起到关键的作用, 而且对代谢工程研究也非常重要<sup>[11-12,14]</sup>。细胞壁破碎方法对胞内代谢物质的获取至关重要, 目前广泛采用的细胞壁破碎方法有高速珠磨法、高速匀浆法、化学渗透法、酶学法、微波细胞破碎、超声波细胞破碎等, 各种方法都有其适用范围和优缺点<sup>[17]</sup>。超声波通过对介质的空化作用及力学、热学和生物学等特殊效应, 能显著提高提取量或浸出速度 2—10 倍, 且副产物较少<sup>[18]</sup>, 从而利于细胞破碎。超声波破碎法在大肠杆菌<sup>[19]</sup>、蜡样芽胞杆菌<sup>[20]</sup>、瑞士乳杆菌<sup>[21]</sup>等胞内蛋白或酶提取方面应用广泛。短短芽胞杆菌为革兰氏阳性菌, 其细胞壁较厚, 肽聚糖网状结构较致密, 破碎具有一定的难度, 关于短短芽胞杆菌胞内代谢物质提取方法的优化目前尚未见报道。

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 是本课题组自行分离的生物防治菌株, 该菌对大丽轮枝菌、黑白轮枝菌、真菌轮枝霉、胶孢炭疽菌、桃褐腐丛梗孢和青枯雷尔氏菌等多种病原菌显示出较强的拮抗活性<sup>[6]</sup>。本研究探讨短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 细胞壁破碎条件优化, 对超声波功率、超声时间及料液比等单因素条件进行摸索, 利用 design-expert 软件进行响应面的设计, 以所得胞内代谢物质重量为响应值, 所得数据利用相关软件进行分析, 得出

回归方程系数及最优破碎条件, 以期为短短芽胞杆菌胞内代谢物质的获得和分析奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 由本课题组自行分离并保存。LB 液体培养基: 1% 胰蛋白胨、0.5% 牛肉浸膏、0.5% NaCl, pH7.0—7.2。JY92-2D 超声波细胞破碎机购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 菌体的收集** 将活化后的短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 转接到 20 mL LB 液体培养基中, 30°C 170  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  过夜培养, 制备种子液; 将种子液按 1% 接种量转接到发酵罐中, 30°C, 发酵 48 h, 6 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 弃上清, 收集菌体; 采用蒸馏水洗涤菌体 4 次, 离心后获得的菌体用于超声波破碎试验。

**1.2.2 短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质超声波破碎单因素条件的摸索**

(1) 超声破碎时间对胞内代谢物质提取的影响。菌体和水 (料液比) 1:15 (g:mL), 超声功率为 500 W, 超声破碎总时间分别设置为 10、20、30、40、50 min。试验重复 3 次。

(2) 超声功率对胞内代谢物质提取的影响。料液比 1:15 (g:mL), 超声破碎时间 30 min, 超声波功率分别是 100、300、500、700、900 W。试验重复 3 次。

(3) 料液比对胞内代谢物质提取的影响。超声破碎时间 30 min, 超声功率为 500 W, 料液比 (g:mL) 设置为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25。试验重复 3 次。

依据以上设置的条件进行细胞破碎, 利用 10 mL 等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 40°C 旋转蒸发, 获得胞内代谢物质。胞内代谢物质重量 = 旋转蒸发瓶总重量 - 旋转蒸发瓶空瓶重量。

**1.2.3 短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质提取的响应面试验设计** 以获得的胞内代谢物质重量为选择标准, 选出较优单因素条件进行响应面设计, 进而获得最优破碎条件。

### 1.3 显著性检验

数值采用平均值±标准差表示, 所有数据采用

Microsoft Excel 2003 和 SPSS 进行统计分析, 差异显著性则用 Duncan 氏法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 超声时间对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质提取的影响

超声时间长短对胞内代谢物质的获取影响不显著。从获取量来说, 当超声时间为 30 min 时, 获得的胞内代谢物质较多, 胞内代谢物质得率为  $11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 超声时间为 10~30 min 时, 胞内代谢物质得率随超声时间的增加而增加, 即随超声时间的延长, 细胞破碎越充分, 致使较多胞内代谢物质释放; 而超声时间为 30~50 min 时, 胞内代谢物质得率随超声时间的增加而减少, 说明超声波功率过大, 对胞内代谢物质的获得反而不利 (图 1)。

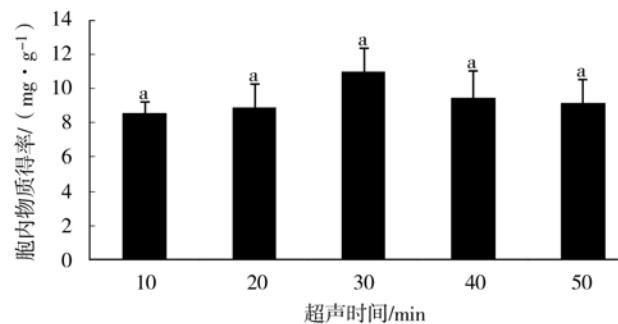


图 1 不同超声时间对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质得率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic treatment time on yield of intracellular metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX

注: 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

### 2.2 超声波功率对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质提取的影响

超声波功率对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质提取影响不显著。超声波功率为 100 W 时, 所得胞内代谢物质得率最高, 为  $9.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 超声波功率大于等于 300 W 时, 所提取胞内代谢物质得率相差不大, 分别为  $8.56$ 、 $8.44$ 、 $8.78$ 、 $8.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (图 2)。

### 2.3 料液比对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质提取的影响

短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质得率随料液比的降低而增加 (图 3), 料液比 1:10 时, 胞内代谢物质得率最低, 料液比 1:25 时所得胞内代谢物质得率最高, 为  $12.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。料液比 1:15 和 1:20 时, 胞内代谢物质得率基本相

同, 即料液比为 1:15 和 1:20 时, 细胞壁破碎效果比较稳定。由此推断, 料液比 1:25 为胞内代谢物质提取的适当浓度。

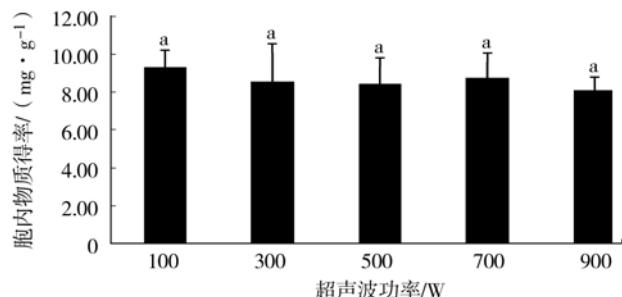


图 2 不同超声波功率对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质得率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasound power on yield of intracellular metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX

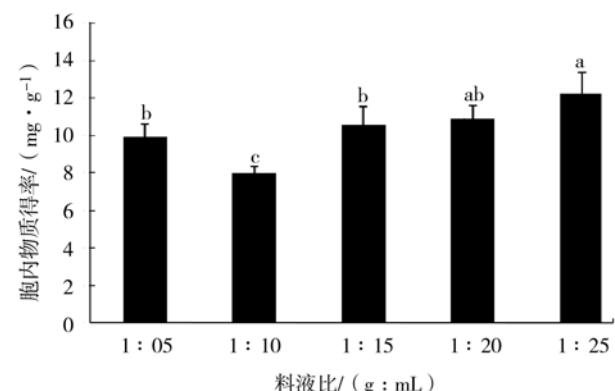


图 3 不同料液比对短短芽孢杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质得率的影响

Fig. 3 Effect of cell/liquid ratio on yield of intracellular metabolites of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX

### 2.4 响应面法优化胞内代谢物质提取的条件

**2.4.1 响应面试设计** 以单因素试验结果为基础, 进行响应面试设计, 选取超声破碎时间、超声波功率和料液比作为 3 个主要影响因素, 采用 3 因素 3 水平响应面分析法 (表 1), 应用统计软件 Design-expert 设计试验并进行结果分析 (表 2)。

表 1 3 因素和 3 水平的取值

Table 1 Three factors and 3 level values

因子	水平		
	-1	0	1
超声时间/min	10	30	50
超声功率/W	100	500	900
料液比/(g : mL)	1:25	1:20	1:15

表 2 试验矩阵及结果  
Table 2 Test sheet and result

试验号	超声时间 /min	超声功率 /W	料液比 /(g : mL)	得率 / $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
1	30	500	1 : 20	11.30
2	50	500	1 : 25	4.02
3	10	100	1 : 20	1.83
4	10	500	1 : 15	4.92
5	30	500	1 : 20	11.30
6	30	500	1 : 20	11.30
7	50	500	1 : 15	6.53
8	50	900	1 : 20	2.89
9	50	900	1 : 20	2.89
10	30	900	1 : 15	4.74
11	30	100	1 : 15	4.13
12	10	500	1 : 25	15.57
13	30	500	1 : 20	11.30
14	30	100	1 : 25	15.59
15	10	900	1 : 20	5.77
16	30	500	1 : 20	11.30
17	50	100	1 : 20	2.50

**2.4.2 二次回归模型的建立** 利用 Design-Expert 软件对表 2 中的数据进行多元回归拟合, 以短短芽孢杆菌胞内代谢物质得率 (Y) 为响应值, 超声波功率 (A)、超声破碎时间 (B) 和料液比 (C) 为试验因子, 进行二次多项回归模型的拟合, 二次多项回归模型为:

$$Y = 11.30 - 1.33A - 1.52B - 1.86C - 4.85A^2 - 3.20B^2 - 0.34C^2 - 0.89AB + 4.05AC + 3.29BC$$

式中, Y 为胞内代谢物质得率; A、B、C 分别代表超声波功率、超声时间和料液比。该模型  $R^2 = 0.9724$ , 表明该模型的拟合程度较好, 可以解释 97.24% 响应值变化。

**2.4.3 回归模型方差分析** 回归模型的方差分析结果显示, 超声时间、超声功率、料液比 3 个因素在细胞破碎过程中均起作用, 对胞内代谢物质得率的影响程度依次为: 料液比 > 超声破碎时间 > 超声功率, 超声功率与料液比间的交互作用较明显, 超声破碎时间与料液比的交互作用较显著, 仅超声功率与超声破碎时间的交互作用不显著 (表 3)。

**2.4.4 响应面的分析** 通过拟合方程所作的响应面立体分析图显示, 料液比与超声时间、料液比与超声功率的交互作用较显著 (图 4), 而超声破碎时间与超声功率的交互作用不显著。以单因素条件

摸索为基础, 应用响应面试验设计软件, 设计并分析得到最优细胞破碎条件为: 超声功率为 318.68 W, 超声时间为 10 min, 料液比为 1 : 25, 理论预测得率为  $13.3586 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 根据预测最优条件进行验证, 得率为  $12.9878 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 仅偏差  $0.3707 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 模拟程度较好。

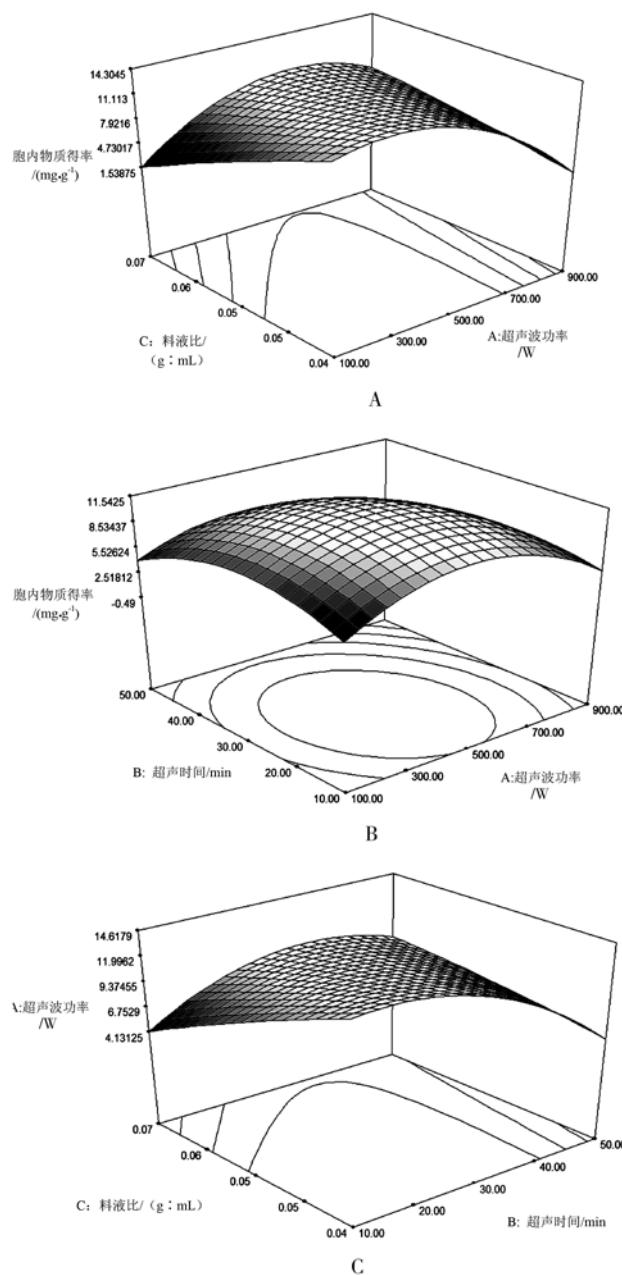


图 4 试验因素交互影响胞内代谢物质得率的响应曲面图  
Fig. 4 3D response surface diagram on metabolite yields by interacted experimental factors

注: A 为超声波功率和料液比对胞内代谢物质得率的影响; B 为超声波功率和超声时间对胞内代谢物质得率的影响; C 为超声波时间和料液比对胞内代谢物质得率的影响。

表3 回归模型的方差分析  
Table 3 Variance analysis for regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	324.40	9	36.04	4.64	0.0276
A	14.18	1	14.18	1.83	0.2186
B	18.45	1	18.45	2.38	0.1670
C	27.60	1	27.60	3.56	0.1013
A <sup>2</sup>	98.99	1	98.99	12.75	0.0091
B <sup>2</sup>	43.22	1	43.22	5.57	0.0504
C <sup>2</sup>	0.48	1	0.48	0.061	0.8115
AB	3.15	1	3.15	0.41	0.5443
AC	65.61	1	65.61	8.45	0.0227
BC	43.30	1	43.30	5.58	0.0502
残差	54.33	7	7.76	—	—
失拟项	54.33	3	18.11	—	—
纯误差	0.000	4	0.000	—	—
总和	378.73	16	—	—	—

### 3 讨论与结论

细胞破碎手段很多, 主要可分为机械法和非机械法<sup>[22]</sup>。机械法包括匀浆法、研磨法、超声波法等; 非机械法包括渗透法、酶溶法和冻溶法等。超声波具有成本低、操作简单、不需要太高的输出功率且不要求精良的设备和技术培训, 十分适合实验室规模的细胞破碎<sup>[23-24]</sup>。超声波有强烈的生物学效应, 进行超声波处理时, 超声波的高频震动与微生物细胞的振动不协调, 造成细胞周围环境局部真空, 使细胞膜产生空穴作用, 从而使之破碎<sup>[25-26]</sup>。超声波破碎的效率取决于声频、声能、处理时间、细胞浓度及细胞类型等。超声波破碎时间、功率和料液比对细胞壁破碎的效果均具有一定影响。

石荣莲等<sup>[27]</sup>通过单因素试验和正交试验得出重组大肠杆菌的最佳破碎条件为: 菌液浓度 40 mg·mL<sup>-1</sup>, 菌液体积 50 mL, 超声波工作时间 4 s, 间歇时间 8 s, 超声波破碎强度 50%, 总工作时间 6 min, NaCl 浓度为 0.15 mol·L<sup>-1</sup>。在该条件下获得褐藻胶裂解酶粗酶液的酶活为 21 U·mL<sup>-1</sup>。李聚海等<sup>[28]</sup>系统研究了利用超声波法提取时输出功率、工作总时间、水添加量等因素对根癌土壤杆菌细胞破碎和辅酶 Q10 提取效果的影响。超声波提取辅酶 Q10 的最佳工艺条件为: 输出功率 500 W, 工作总时间 12 min, 水添加量 45

mL·g<sup>-1</sup>。本研究探讨了不同超声波功率、不同超声时间和不同料液比单因素对短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 细胞壁破碎的影响, 结果表明, 当超声波功率为 100 W、超声时间为 30 min、料液比为 1:25 时, 胞内代谢物质得率最高。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 细胞壁破碎超声波功率低于蜡样芽胞杆菌(超声波功率为 600 W)和大肠杆菌(超声波功率为 480 W), 超声波总时间和料液比则高于蜡样芽胞杆菌和大肠杆菌<sup>[19-20]</sup>, 因此推测, 不同菌株超声波破碎条件不同, 很可能与菌株细胞壁厚度不同有很大关系。

响应面是一种统计学软件, 在优化生物过程中应用广泛, 本研究利用该软件进行合理的试验设计, 利用试验所得数据, 建立多元二次回归方程, 以拟合因素与响应值间的函数关系, 建立连续变量曲面模型, 以评价因素间的相互作用, 进而确定最佳水平范围。该方法在发酵工艺研究中应用广泛, 如徐慧等<sup>[29]</sup>利用该方法优化枯草芽胞杆菌 3-羟基丁酮发酵培养基; 张宇光等<sup>[30]</sup>用于优化短杆菌素的发酵; 王海平等<sup>[31]</sup>用于优化樱桃果酒的发酵。响应面优化也已广泛应用于细胞破碎及胞内物的提取的工艺优化中<sup>[32-34]</sup>; 如李芳亮等<sup>[35]</sup>利用该方法优化沙棘叶中水溶性多糖提取条件; 于帅等<sup>[36]</sup>优化板栗仁中多酚物质提取条件。张强等<sup>[37]</sup>为提取醋酸钙不动杆菌的 PAHs 降解酶。在对超声输出功率、工作/间隔时间、菌体稀释倍数以及超声时间进行单因素试验的基础上, 利用 Box-Behnke 中心组合试验设计, 响应面法优化得到多环芳烃降解酶的最佳提取工艺。

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 胞内代谢物质提取对于后续的生理生化分析影响巨大, 但关于短短芽胞杆菌细胞破碎条件优化的研究未见报道。本研究采用响应面法对细胞破碎条件进行优化, 发现对胞内代谢物质得率的影响程度依次为: 料液比>超声破碎时间>超声功率。获得最优细胞破碎最优条件是: 超声功率 318.68 W, 超声时间 10 min, 料液比 1:25, 预测得率为 13.358 6 mg·g<sup>-1</sup>, 根据预测最优条件进行验证, 得率为 12.987 8 mg·g<sup>-1</sup>, 仅偏差 0.370 7 mg·g<sup>-1</sup>, 拟合程度较好。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 细胞壁破碎条件优化结果与利用超声波破碎醋酸钙不动杆菌细胞提取多环芳烃降解酶结果相似, 张强等<sup>[37]</sup>利用 Box-Behnke 中心组合实验设计, 响应面法优化得到多环芳烃降解酶的最佳提取工艺为: 工作/间隔时间为 2 s/2 s、超声功率 320 W、总超声时间 17

min、稀释倍数 12.5, 在此条件下提取的酶活力为 190.48 U·g<sup>-1</sup>。

随着生物工程技术的发展, 短短芽孢杆菌的应用变得越来越广, 而找到其有效的破碎方法, 具有非常重要的理论和实践意义。本研究优化得出的超声波破碎条件对其他革兰氏阳性菌细胞内代谢物质的提取有一定的指导意义, 在低功率、短时超声条件下能得到较多的胞内代谢物质, 但材料以及试验目的的改变, 比如革兰氏阴性菌及动植物细胞的提取, 将会导致破碎最佳参数的较大差异。

### 参考文献:

- [1] COOK R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens [J]. Annual Review of Phytopathology, 1993, 31: 53—80.
- [2] COOK R J, BRUCKART W L, COULSON J R, et al. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation [J]. Biological Control, 1996, (7): 333—351.
- [3] TAKAGI H, MIYAUCHI A, KADOWAKI K, et al. Potential use of *Bacillus brevis*HPD31 for the production of foreign proteins [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53: 2279—2280.
- [4] YAMAGATA H, NAKAHAMA K, SUZUKI Y, et al. Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1989, 86: 3589—3593.
- [5] 郭万奎, 侯兆伟, 石梅, 等. 短短芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌采油机理及其在大庆特低渗透油藏的应用 [J]. 石油勘探与开发, 2007, 34 (1): 73—78.
- [6] CHE J M, LIU B, RUAN C Q, et al. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX[J]. Crop Protection, 2015, 67: 178—183.
- [7] 郝晓娟, 刘波, 谢关林, 等. 短短芽孢杆菌 JK-2 菌株对番茄枯萎病的抑菌作用及其小区防效 [J]. 中国生物防治, 2007, 23 (3): 233—236.
- [8] 陈莉, 缪卫国, 刘海洋, 等. 短短芽孢杆菌 A57 对棉花主要病原真菌的拮抗机理 [J]. 西北农业学报, 2008, 17 (4): 149—155.
- [9] 易有金, 尹华群, 罗宽. 烟草内生短短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效 [J]. 植物病理学报, 2007, 37 (3): 301—306.
- [10] THEOBALD U, MAILINGER W, BALTES M, et al. In vivo analysis of metabolic dynamic in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observation [J]. Biotechnol Bioeng, 1997, 55: 305—316.
- [11] GLASSBROOK N, RYALS J. A systematic approach to biochemical prowl [J]. Curr Opin Plant Biol, 2001, (4): 186—190.
- [12] KADERBHAJ NN, BROADHURST DI, ELLIS DI, et al. Functional Genomics via Metabolic Footprinting: Monitoring Metabolite Secretion by *Escherichia coli* Tryptophan Metabolism Mutants Using FT-IR and Direct Injection Electrospray Mass Spectrometry [J]. Comp Funct Genom, 2003, (4): 376—391.
- [13] FIEHN. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes [J]. Plant Mol Biol, 2002, 48: 155—171.
- [14] STITT M, FERNIE A R. From measurements of metabolites to metabolomics: an ‘on the fly’ perspective illustrated by recent studies of carbon-nitrogen interactions [J]. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14: 136—144.
- [15] DALLUGE J J, SMITH S, SACHEZ-RIERA F, et al. Potential of fermentation profiling via rapid measurement of amino acid metabolism by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1043: 3—7.
- [16] VILLAS-BOAS S G, MOXLEY J F, KESSON M, et al. High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts [J]. Biochem J, 2005, 388: 669—677.
- [17] 曾敏, 谢为天, 潘丽媚, 等. 鼠李糖乳杆菌细胞破碎方法的比较及其肽聚糖含量的测定 [J]. 饲料工业, 2010, 31 (8): 31—33.
- [18] 黄占旺, 上官新晨, 沈勇根, 等. 鲤鱼精蛋白的提取与抗菌稳定性研究 [J]. 农业工程学报, 2005, 21 (2): 165—168.
- [19] 吴蕾, 雷鸣, 洪建辉, 等. 超声破碎重组大肠杆菌释放包含体的过程研究 [J]. 化学工业与工程, 2002, 19 (6): 422—425.
- [20] 江学斌, 陈颖恒, 冯燕平, 等. 蜡样芽孢杆菌的破碎条件及对 SOD 活性的影响 [J]. 广东化工, 2010, 37 (5): 78—79, 122.
- [21] 郭宇星, 潘道东. 超声波破碎法提取瑞士乳杆菌氨肽酶条件的优化 [J]. 食品科学, 2008, 29 (8): 140—144.
- [22] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994.
- [23] FELIU J X, CUBARSI R, VILLAVERDE A. Optimized secretion of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells [J]. Biotechnol Bioeng, 1998, 58: 536—540.
- [24] OZBEK B, TILGEN K O. The stability of enzymes after sonication [J]. Process Biochem, 2000, 35: 1037—1043.
- [25] 邓洁, 程龙, 刘谊, 等. 根肿 (*Plasmodiophorabrassicae*) 休眠孢子的纯化和超声波破碎方法研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12 (2): 269—272.
- [26] 赵瑞香, 王大红, 牛生洋, 等. 超声波细胞破碎法检测嗜酸乳杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶活力的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27 (1): 47—50.
- [27] 石荣莲, 汪立平, 刘玉佩. 重组褐藻胶裂解酶基因工程菌超声波破碎条件研究 [J]. 湖南农业科学, 2010, (21): 98—101, 104.
- [28] 李聚海, 岳田利, 袁亚宏. 辅酶 Q<sub>10</sub>超声波破碎法提取工艺条件研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2007, 35 (5): 207—211.
- [29] 徐慧, 贾士儒, 刘建军. 响应面法优化枯草芽孢杆菌 3-羟基丁酮发培养基 [J]. 中国酿造, 2011, (8): 133—137.

- [30] 张宇光, 姜鹭, 任发政, 等. 响应面法优化短杆菌素的发酵 [J]. 农产品加工学刊, 2011, (9): 8—12.
- [31] 王海平, 黄和升, 郭雷. 响应面法优化樱桃果酒发酵 [J]. 中国酿造, 2011, (9): 75—79.
- [32] 吴克刚, 杨连生, 黄通旺. 超声波破碎 *Thraustochytrium* 提取脂质的研究 [J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22 (4): 31—34.
- [33] GAETE- GARRETÓN L, VARGAS-HERNÁNDEZ Y, CARES-PACHECO MG, et al. Ultrasonically enhanced extraction of bioactive principles from *Quillaja Saponaria Molina* [J]. Ultrasonics, 2011, 51 (5): 581—585.
- [34] 张荆, 童群义. 超声波破碎提取 D-甘露糖异构酶条件的研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 30 (10): 247—249.
- [35] 李芳亮, 王锐, 孙磊, 等. 响应面法优化超声波提取沙棘叶水溶性多糖工艺研究 [J]. 广东农业科学, 2011, (12): 101—104.
- [36] 于帅, 杜彬, 杨越冬, 等. 用响应面法优化微波辅助提取板栗仁中多酚物质 [J]. 经济林研究, 2011, 29 (3): 8—16.
- [37] 张强, 迟建国, 邱维忠, 等. 醋酸钙不动杆菌 PAHs 降解酶的超声波提取优化 [J]. 中国农学通报, 2014, 30 (17): 180—185.

(责任编辑: 林海清)