

## 研究报告

## 一株柠檬内生细菌 Z10 的分离鉴定及其抑菌活性的发酵条件优化

钱程, 叶景, Khadija EI Galai, 张琴\*, 高梦蝶, 杨新宇, 喻艳玲, 唐松

安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000

钱程, 叶景, Khadija EI Galai, 张琴, 高梦蝶, 杨新宇, 喻艳玲, 唐松. 一株柠檬内生细菌 Z10 的分离鉴定及其抑菌活性的发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1641-1658.

QIAN Cheng, YE Jing, Khadija EI Galai, ZHANG Qin, GAO Mengdie, YANG Xinyu, YU Yanling, TANG Song. Isolation, identification, and fermentation condition optimization for antimicrobial activity of an endophytic bacterial strain Z10 from lemon[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1641-1658.

**摘要:**【背景】近年来,从植物内生菌的发酵产物中挖掘抑菌活性成分已成为寻找新型生物活性成分的重要途径。【目的】寻找新的具有高效抗菌活性的植物内生菌,并探究其产生抗菌活性物质的最优发酵条件和抑菌机制。【方法】利用组织分离法和划线法从柠檬皮和籽核中分离内生菌株,按照滤纸片和牛津杯法筛选对病原菌具有较强抑制作用的菌株,通过形态观察和 16S rRNA 基因序列分析确定活性菌株的分类地位,基于微孔板法检测活性菌株发酵液提取液(B02c)的抑菌效果,以单因素试验和响应面试验设计对发酵条件进行优化,并通过碘化丙啶/SYTO-9 探针标记结合流式细胞术检测 B02c 对检定菌细胞膜的影响。【结果】从柠檬籽核中筛选出一株对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)具有显著抑制作用的菌株 Z10,鉴定为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.);菌株 Z10 的最佳发酵条件为柑橘皮渣添加量 1.6 g/100 mL、pH 6.8、接种量 10.0%、转速 172 r/min、培养时间 36 h,优化后 B02c 的抑菌率达到 84.36%,较优化前提升 16.36%;B02c 对金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)为 3.125 mg/mL,其能够破坏金黄色葡萄球菌细胞膜的完整性。【结论】柠檬内生菌 Z10 在优化发酵条件后获得的 B02c 对金黄色葡萄球菌具有良好的抑菌效果,在新型、高效的天然抑菌活性物质筛选及其工业化生产中具有一定应用前景。

**关键词:** 分离鉴定; 芽孢杆菌; 内生菌; 抑菌机制; 发酵优化

资助项目: 安徽省重点研究与开发项目(201904a07020003); 安徽省自然科学基金(2108085MB34); 安徽省工业微生物分子育种工程实验室开放基金(ELMB-02)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Anhui Province (201904a07020003), the Natural Science Foundation of Anhui Province (2108085MB34), and the Open Fund of Anhui Engineering Laboratory for Industrial Microbiology Molecular Breeding (ELMB-02).

\*Corresponding author. E-mail: jhtabszq@163.com

Received: 2023-09-01; Accepted: 2023-11-14; Published online: 2024-01-08

# Isolation, identification, and fermentation condition optimization for antimicrobial activity of an endophytic bacterial strain Z10 from lemon

QIAN Cheng, YE Jing, Khadija EI Galai, ZHANG Qin<sup>\*</sup>, GAO Mengdie, YANG Xinyu, YU Yanling, TANG Song

College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

**Abstract:** [Background] In recent years, mining antimicrobial components from the fermentation products of endophytes has become an important way to discover new bioactive components. [Objective] To find new endophytes with high antimicrobial activity, explore the optimum fermentation conditions for the production of bioactive components, and decipher their antimicrobial mechanisms. [Methods] The endophytes were isolated from lemon peels and seeds by tissue culture and streaking method. The strains with strong inhibitory effects on pathogenic microorganisms were screened by filter paper and Oxford cup methods and then identified by morphological observation and 16S rRNA gene sequencing. The antimicrobial effect of the fermentation liquid extract (B02c) of the active strain was examined by the microplate method. Single factor tests and response surface experiment were carried out to optimize the fermentation conditions. Propidium iodide/SYTO-9 probe marking combined with flow cytometry were employed to measure the effect of B02c on the cell membrane of the tested strains. [Results] A strain Z10 with significant inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* was isolated from lemon seeds and identified as *Bacillus* sp. The optimal fermentation conditions of strain Z10 were as follows: addition of orange peel residue at 1.6 g/100 mL, pH 6.8, inoculum amount of 10.0%, rotation speed of 172 r/min, and culture for 36 h. After optimization, the obtained B02c showed the inhibition rate reaching 84.36%, increased by 16.36% compared with that of the fermentation liquid obtained at the original conditions. B02c showed the MIC of 3.125 mg/mL against *S. aureus* and destroyed the cell membrane integrity of *S. aureus* at this dose. [Conclusion] B02c of the lemon endophyte Z10 under optimized fermentation conditions demonstrates a strong inhibitory effect on *S. aureus*, serving the screening and industrial production of new and efficient natural bioactive substances.

**Keywords:** isolation and identification; *Bacillus* sp.; endophyte; antimicrobial mechanism; fermentation condition optimization

植物内生菌是指生活在健康植物体内,与宿主植物相互影响、协同进化,逐渐形成和谐共生种间关系的微生物<sup>[1-2]</sup>。研究表明,植物内生菌可以产生与宿主相同或相似的化学结构特殊、活性多样的次级代谢产物<sup>[3]</sup>,已成为寻找新型生物

活性成分的重要新资源<sup>[4]</sup>。柠檬,别称柠果、益母果,芸香科柑橘属,富含多种重要天然活性成分,主要有类黄酮和柠檬苦素类具有不同抗氧化活性的有效成分,是具有极高应用价值的传统药用植物。研究发现,类黄酮和柠檬苦素类化

合物在柠檬中的分布并不均匀,主要存在于柠檬的果皮和籽核,其中柠檬果皮的类黄酮含量高于籽核,而籽核中的柠檬苦素类化合物含量则更为丰富<sup>[5]</sup>。研究表明,类黄酮和柠檬苦素类化合物对很多微生物都具有程度不等的抑制活性<sup>[6-7]</sup>,因此从柠檬的果皮和籽核中分离得到的内生菌极有可能具有类似的生物活性。然而,目前国内外关于柠檬内生菌的研究十分稀少,仅见冯瑞章等<sup>[8]</sup>从柠檬汁中筛选出多株具有降低胆固醇效果的酵母菌和乳酸杆菌;Kaur 等<sup>[9]</sup>从柠檬叶片中分离得到一株草酸青霉,具有良好的抗氧化活性和基因保护的潜力。鲜见从柠檬籽核中分离内生菌并研究其抑菌活性和发酵优化的相关报道。因此,分离研究其中的抑菌活性菌株并优化活性物质产生的发酵条件,对拮抗微生物资源的开发利用及其工业化应用均具有重要意义。

柑橘皮渣作为柑橘加工业的主要副产物,富含果胶、纤维素、类黄酮、精油、色素及多种矿物质和维生素,具有较高的综合利用价值<sup>[10]</sup>。但其利用率低和污染环境等问题的日益突出,已成为限制柑橘产业持续发展的主要瓶颈<sup>[11]</sup>。目前,柑橘皮渣的综合利用更多倾向于单一活性成分的提取分离,这往往需要消耗大量的原材料和有机溶剂,得率低的同时还会导致资源浪费和环境污染<sup>[12]</sup>。生物转化是一种既经济又环保的柑橘皮渣处理方式,不仅能利用柑橘皮渣中的有效物质,还可以通过微生物转化得到抑菌物质以及乙醇、沼气等高附加值产品<sup>[13]</sup>。

本研究以柠檬果皮与籽核为实验材料,在筛选对常见病原菌具有拮抗作用的柠檬内生菌的同时探究活性内生菌的最优发酵条件,并进一步检测不同浓度的发酵液提取液对病原菌细胞膜的影响,以期为病原菌抑菌机制的研究提供实践依据,为筛选新型、天然抑菌活性物质提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

新鲜柠檬购于安徽工程大学超市;柑橘皮渣:60℃下烘干柑橘皮(于安徽工程大学超市购买的新鲜柑橘果皮)并粉碎过40–80目筛备用;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) CICC 24067 和白色念珠菌(*Candida albicans*) CMCC 98001 由安徽工程大学微生物实验室保藏。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母浸粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.5, 琼脂粉 15.0。

沙保氏培养基(g/L):葡萄糖 40.0,蛋白胨 10.0,琼脂粉 15.0。

初筛培养基:营养琼脂培养基(NA, g/L):牛肉膏 3.0,胰蛋白胨 10.0,氯化钠 5.0, pH 7.5, 琼脂粉 15.0;酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD, g/L):酵母粉 10.0,蛋白胨 20.0,葡萄糖 20.0, pH 自然,琼脂粉 15.0;马铃薯葡萄糖培养基(PDA, g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂粉 15.0, pH 自然;柠檬皮提取液培养基:柠檬皮提取液 100 mL (5.0 g 柠檬皮切碎,加 100 mL 纯水煮沸 20 min),添加纯水至 1 000 mL,琼脂粉 15.0 g, pH 自然,110℃灭菌 30 min;柠檬籽提取液培养基:柠檬籽提取液 100 mL (5.0 g 柠檬籽磨细,加 100 mL 纯水煮沸 20 min),添加纯水至 1 000 mL,琼脂粉 15.0 g, pH 自然,110℃灭菌 30 min。

柑橘皮提取液复筛培养基:柑橘皮提取液 100 mL (5.0 g 柑橘皮切碎,加 100 mL 纯水煮沸 20 min),添加纯水至 1 000 mL,琼脂粉 15.0 g, pH 自然,110℃灭菌 30 min。

种子液体培养基(g/L):柑橘皮粉 5.0,葡萄

糖 20.0, 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0, pH 7.5, 121 °C 灭菌 20 min。

发酵液体培养基(g/L): 柑橘皮粉 20.0, 葡萄糖 10.0, 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0, pH 7.5, 121 °C 灭菌 20 min。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 无水乙醇、次氯酸钠、氯化钠、正丁醇、乙酸乙酯、二甲基亚砷(DMSO)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)和 SYTO-9, 上海麦克林生化科技有限公司。各化学试剂均为分析纯。

立式高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 超净工作台, 浙江孚夏医疗科技有限公司; 电热鼓风恒温干燥箱、培养箱和电子天平, 上海力辰科技有限公司; 紫外可见分光光度计和酶标仪, 上海美普达仪器有限公司; PCR 仪和电泳仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 高速离心机, 湖南湘仪实验仪器开发有限公司; 流式细胞仪, 贝克曼库尔特有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 内生菌的分离与纯化

采用组织块分离培养法<sup>[14]</sup>对柠檬内生菌进行分离。新鲜柠檬用流水冲洗表面 2 min 后自然风干。在超净工作台中依次用 75%乙醇溶液和 3%次氯酸钠溶液对柠檬果实进行表面灭菌并用无菌水冲洗 3–5 次, 取最后一次冲洗的无菌水涂板作为空白对照。采用无菌刀将柠檬果皮切块(5 mm×5 mm), 于无菌研钵中将籽核充分研磨, 分别接种于 NA、PDA、YPD 和柠檬皮(籽)提取液固体培养基表面, NA 培养基于 28 °C 恒温培养 2–3 d, PDA 和 YPD 培养基于 37 °C 恒温培养(24±2) h。待菌落长出后, 挑取

单菌落, 以划线分离法接种至柑橘皮提取液复筛培养基, 37 °C 恒温培养 18–24 h。纯化分离 3 代及以上, 得到的纯菌株在 4 °C 保藏备用。

### 1.2.2 病原菌悬液的制备

将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和表皮葡萄球菌接种于 LB 固体培养基表面活化, 将白色念珠菌接种于沙保氏固体培养基表面活化, 分别挑取单菌落接种于 50 mL 对应的液体培养基, 在 37 °C、180 r/min 恒温摇床中培养至对数期(约 12–14 h)后, 4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体沉淀。用液体培养基调节菌体浓度约为  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL, 即制得病原菌悬液, 备用。

### 1.2.3 内生菌发酵液提取液(B02c)的制备

参照王永刚等<sup>[15]</sup>的方法并稍作改进。挑取活化好的内生细菌单菌落接种于种子液体培养基, 37 °C、180 r/min 振荡培养约 12 h,  $OD_{600}$  约为 1.2; 进一步按 10%接种量接种于发酵液体培养基(100 mL/250 mL), 37 °C、160 r/min 振荡培养约 24 h 后将发酵液 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液分别加入等体积的正丁醇溶液(充分振荡 3–5 min)萃取 3 次, 合并萃取液, 于 60 °C 减压浓缩至干燥, 用 2 mL DMSO 溶解, 即得 B02c。将样品用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后置于 4 °C 冰箱备用。

### 1.2.4 抑菌活性试验

采用滤纸片法和牛津杯双层平板法开展 B02c 的抗菌谱研究。滤纸片法<sup>[16]</sup>: 将无菌 6 mm 圆形滤纸片分别置于已过滤除菌的 B02c 和 DMSO 溶液中, 4 °C 浸泡过夜; 次日取出在超净台中风干, 用无菌镊子夹取风干后的滤纸片缓慢平铺于已接种病原菌的固体平板上, 倒置培养。牛津杯双层平板法参考文献<sup>[17]</sup>制备: 处理组牛津杯每皿加入 200 μL B02c, 正置培养, 并以等量 DMSO 为空白对照, 在 37 °C 恒温培养箱静置培养 24 h 后, 观察其抑菌效果, 用十字交叉法测定抑菌圈直径并记录。

针对抗菌效果最强的内生菌采用微孔板法检测其抗菌活性:选择金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)为指示菌,将 180  $\mu\text{L}$  1.2.2 制备的菌悬液接种至 96 孔板的每一个微孔中,再吸取 18  $\mu\text{L}$  B02c 加入上述各孔中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 18–24 h 后测定  $OD_{620}$  吸光值。以 DMSO 作为阴性对照。通过酶标仪测定 620 nm 处的吸光值,记录每孔  $OD_{620}$ ,并计算抑菌率<sup>[18]</sup>。

$$\text{抑菌率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{菌液样品 } OD \text{ 值}}{\text{阴性对照 } OD \text{ 值}}\right) \times 100。$$

### 1.2.5 活性菌株的鉴定

形态学鉴定:采用平板划线法将保藏的活性菌株接种于固体培养基表面,待长出单菌落后观察菌落形态特征并进行初步判断,挑取活化后的单菌落进行革兰氏染色,在光学显微镜下对培养 24–48 h 后的菌落进行显微形态特征的观察。

分子生物学鉴定:对抑菌活性最强的菌株进行分子鉴定,采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取总 DNA,以 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYT ACCTTGTTACGACTT-3')为引物。PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): 2 $\times$ Taq Plus PCR Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA (88.8 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  90 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

将测序成功的序列在 NCBI 和 EzBioCloud 数据库搜索比对,下载相似度较高的序列,使用 MEGA 7.0 软件采用 NJ 法(neighbor-joining method)进行聚类分析,构建系统发育树进行物种鉴定<sup>[19]</sup>。

### 1.2.6 发酵条件优化

通过 96 微孔板法检测不同发酵条件下菌株发酵液提取液对 *S. aureus* 的抑菌率,逐步确定最佳发酵参数。(1) 柑橘皮渣添加量:以初始发酵培养基为基础,分别添加不同质量浓度的柑橘皮渣 0.0、10.0、20.0、30.0、40.0 和 50.0 g/L, 160 r/min (100 mL/250 mL)培养 24 h, 确定最佳柑橘皮渣添加量;(2) 初始 pH 值:调整培养基初始 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 160 r/min 培养 24 h, 确定最佳 pH 值;(3) 接种量:将种子液分别以 2.5%、5.0%、7.5%、10.0%、12.5%和 15.0% (体积分数)接入发酵培养基中, 160 r/min 培养 24 h, 确定最佳接种量;(4) 发酵时间:分别培养 12、24、36、48、60 和 72 h 后, 采用稀释涂布平板法进行活菌计数, 96 微孔板法测定抑菌活性, 确定最佳发酵时间;(5) 转速:设置摇床转速分别为 90、120、150、180、210 和 240 r/min, 以确定最佳发酵转速。

### 1.2.7 响应面优化试验

根据单因素试验结果,选取柑橘皮渣添加量、pH、接种量和转速为因素,以 B02c 对金黄色葡萄球菌的抑菌率为响应值,采用 Design-Expert 12 软件的 Box-Behnken 功能设计四因素三水平响应面试验,因素水平设计见表 1。

表 1 响应面法因素水平设计

Table 1 Factors and levels of response surface design

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
A 柑橘皮渣添加量 Addition of orange peel residue (g/100 mL)	0.0	1.0	2.0
B pH	5.0	7.0	9.0
C 接种量 Inoculum amount (%)	5.0	10.0	15.0
D 转速 Rotation speed (r/min)	120	180	240

### 1.2.8 抑菌验证试验

以响应面试验获得的最适发酵条件进行抑菌验证试验,重复5次,将试验得到的最优抑菌率与预测值进行比较,并与优化前的原始培养条件进行比较验证。

### 1.2.9 最小抑制浓度的测定

采用二倍稀释法<sup>[20]</sup>测定菌株 Z10 的 B02c 对 *S. aureus* 的最小抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。在 96 孔板中先加入 100  $\mu$ L LB 液体培养基,将 100  $\mu$ L 浓度为 200 mg/mL 的 B02c 溶液加入第 1 个孔中,吸打混匀后取 100  $\mu$ L 加入第 2 个孔,依次重复,直至最后一个孔混匀后吸取 100  $\mu$ L 液体弃去,再在各孔中分别加入 100  $\mu$ L 生长对数期的 *S. aureus* 菌悬液,最终实验组浓度为 100.000–0.781 mg/mL。以 100  $\mu$ L LB 液体培养基作为阴性对照,放入 37  $^{\circ}$ C 生化培养箱培养 24 h,用酶标仪测量其  $OD_{600}$ ,以被抑制的最低抑菌浓度作为 MIC。

### 1.2.10 时间-生长曲线的测定

参照宁亚维等<sup>[20]</sup>的时间-生长抑制曲线测定方法。取 1.2.2 制备的 *S. aureus* 菌悬液 100  $\mu$ L 与浓度为 1 MIC、2 MIC 的 B02c 在 96 孔板中等体积混合,使终浓度为 0.5 MIC 和 1 MIC,以菌悬液与无菌生理盐水各 100  $\mu$ L 作为空白对照,37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 24 h,每间隔 2 h 测定一次  $OD_{600}$ ,并绘制时间-生长曲线。

### 1.2.11 B02c 对金黄色葡萄球菌细胞膜完整性的影响

参照饶苇等<sup>[21]</sup>的 PI 染色法并稍作修改。用 0.9%生理盐水分别将 B02c 配成质量浓度为 4 MIC、2 MIC 和 1 MIC 的溶液,每个浓度取 500  $\mu$ L 与对数生长期的 *S. aureus* 菌悬液在 2 mL 的离心管中等体积混合,使提取液终浓度为 2 MIC、1 MIC 和 0.5 MIC,以生理盐水作为空白对照,37  $^{\circ}$ C 恒温培养 4 h。将菌液于

4 000 r/min 离心 15 min 后弃上清,用 0.9%生理盐水重悬洗涤 3 次去除上清,黑暗条件下向菌体沉淀中加入 PI 和 SYTO-9 染料各 100  $\mu$ L,混匀后 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。重悬后制片用荧光显微镜观察,并用流式细胞仪进行分析。

## 1.3 数据处理

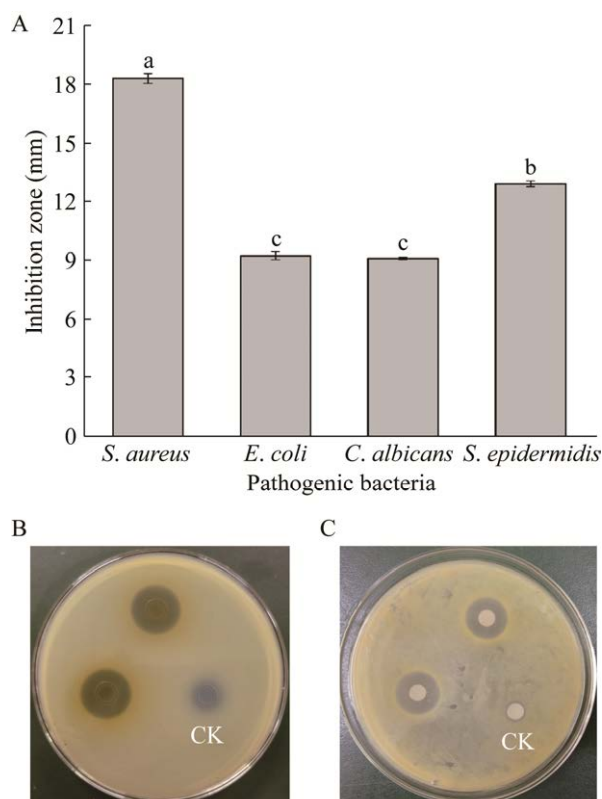
每个试验进行 3 次重复,采用 Excel 2022 对试验数据进行整理,采用 Origin 2022 制作图表,采用 IBM SPSS 27 对试验数据进行统计及差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 柠檬内生菌的分离与抑菌活性检测

从健康柠檬的果皮和籽核中共分离内生菌 83 株,其中内生细菌 54 株、内生真菌 29 株,细菌在各种培养基中均可分离。内生菌在柠檬果皮(48 株)中分布较多,编号为 P1–P48,而在籽核(35 株)中分布较少,编号为 Z1–Z35。以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌和表皮葡萄球菌为指示菌,通过滤纸片法和牛津杯双层平板法探究分离纯化的各内生菌发酵液提取液(B02c)的抗菌活性。结果显示,一株从柠檬籽核中分离的内生细菌 Z10 的 B02c 抑菌效果最显著,并且对 4 种病原菌均有抑制作用(图 1A),对革兰氏阳性菌 *S. epidermidis* 和 *S. aureus* 的抑制效果较好,其中对 *S. aureus* 的抑制作用最为突出。

如图 1B、1C 所示,与对照组相比,处理组周围均有明显透明抑菌圈形成,说明 B02c 在琼脂培养基上有良好的扩散性,并能够有效抑制 *S. aureus* 的生长,抑菌圈直径为  $(18.21 \pm 0.36)$  mm,抑菌率约为 65.59%。因此选择 *S. aureus* 为靶标菌进行后续试验,进一步探究菌株 Z10 的抑菌活性。



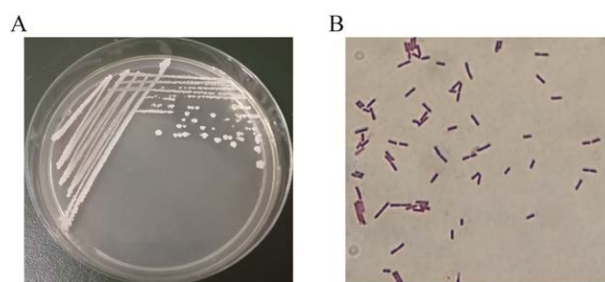
**图 1 活性菌株 Z10 的抑菌效果** A: 菌株 Z10 对 4 种病原菌的抑制作用. 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ). 下同. B 和 C: Z10 对金黄色葡萄球菌的牛津杯和滤纸片试验. CK 为空白对照

Figure 1 The inhibitory effect of active strain Z10. A: The inhibitory effect of active strain Z10 on four pathogens. Different lowercase letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ). The same below. B and C: Oxford cup and filter paper test for Z10 against *S. aureus*. CK is a blank control.

## 2.2 活性菌株 Z10 的鉴定结果

如图 2A 所示, 活性菌株 Z10 在 LB 固体培养基上培养 24 h 后, 菌落呈乳白色、圆形、隆起、表面干燥有褶皱、边缘不整齐、不透明。如图 2B 所示, 经革兰氏染色镜检发现, 菌株 Z10 呈紫色杆状, 证明菌株 Z10 为革兰氏阳性菌。

将菌株 Z10 的 16S rRNA 基因序列提交至 NCBI 数据库, 获得登录号为 OR056372, 进一步进行比对分析, 采用 MEGA 7.0 软件进行聚



**图 2 菌株 Z10 的形态学特征** A: LB 培养基上的菌落形态. B: 革兰氏染色形态

Figure 2 Morphological characteristics of strain Z10. A: Colony morphology on LB culture medium. B: Gram staining morphology.

类分析<sup>[22-23]</sup>并构建系统发育树(图 3), 结果表明, 菌株 Z10 的 16S rRNA 基因序列与 *Bacillus subtilis* strain SCZ30 (MW391600.1)和 *Bacillus subtilis* strain WCM6 (OQ747983.1)的相似性为 99%且位于同一分支。结合形态特征和 16S rRNA 基因序列, 确定菌株 Z10 为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。

## 2.3 发酵条件优化结果

柑橘皮渣在活性菌株 Z10 发酵过程中具有非常重要的作用, 不仅为菌体生长提供能量, 还能直接影响活性代谢产物的产生。如图 4A 所示, 柑橘皮渣添加量从 0.0 g/100 mL 增加到 1.0 g/100 mL, B02c 的抑菌率有明显提升, 说明添加柑橘皮渣有利于抑菌活性物质的产生; 当添加量超过 1.0 g/100 mL 时, 抑菌率开始降低, 可能是因为随着柑橘皮渣质量浓度的提升, 发酵液的黏稠度增加、溶氧量降低, 阻碍了菌体的生长及活性代谢产物的合成。此结论与文献[24]的结论相似。当添加量为 1.0 g/100 mL 时抑菌率达到最高, 为  $72.5\% \pm 0.83\%$ 。即最优柑橘皮渣添加量为 1.0 g/100 mL。

如图 4B 所示, 随着初始 pH 的升高, 抑菌率呈现先上升后下降的趋势, 可能是由于 pH 值



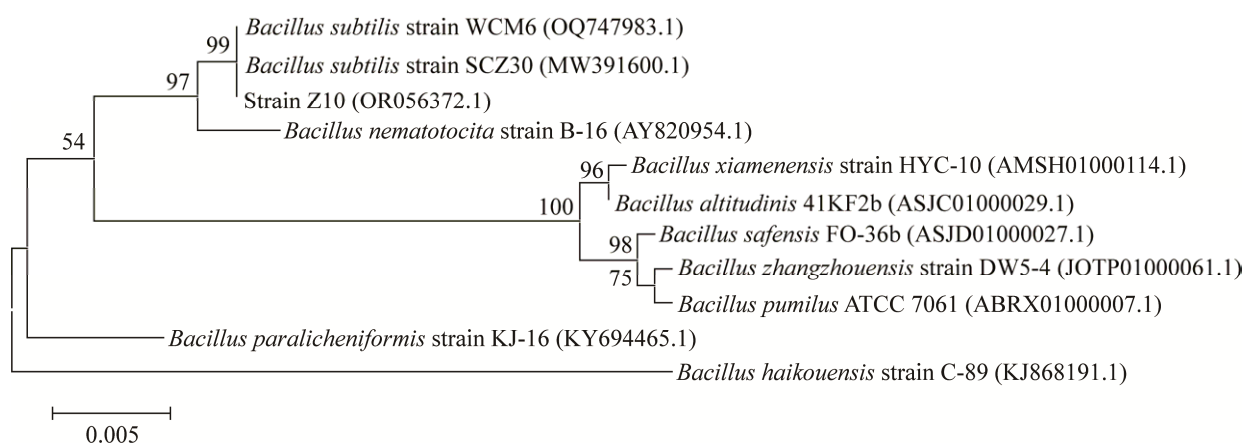


图3 菌株 Z10 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内表示 GenBank 登录号; Bootstrap 设置为 1 000; 分支点上的数字表示 bootstrap 的支持率; 标尺表示 0.005 的序列差异

Figure 3 Phylogenetic tree construction based on 16S rRNA gene sequence of strain Z10. The parentheses represent the GenBank accession number; Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate the support rate for bootstrap; Ruler represents 0.005 of sequence.

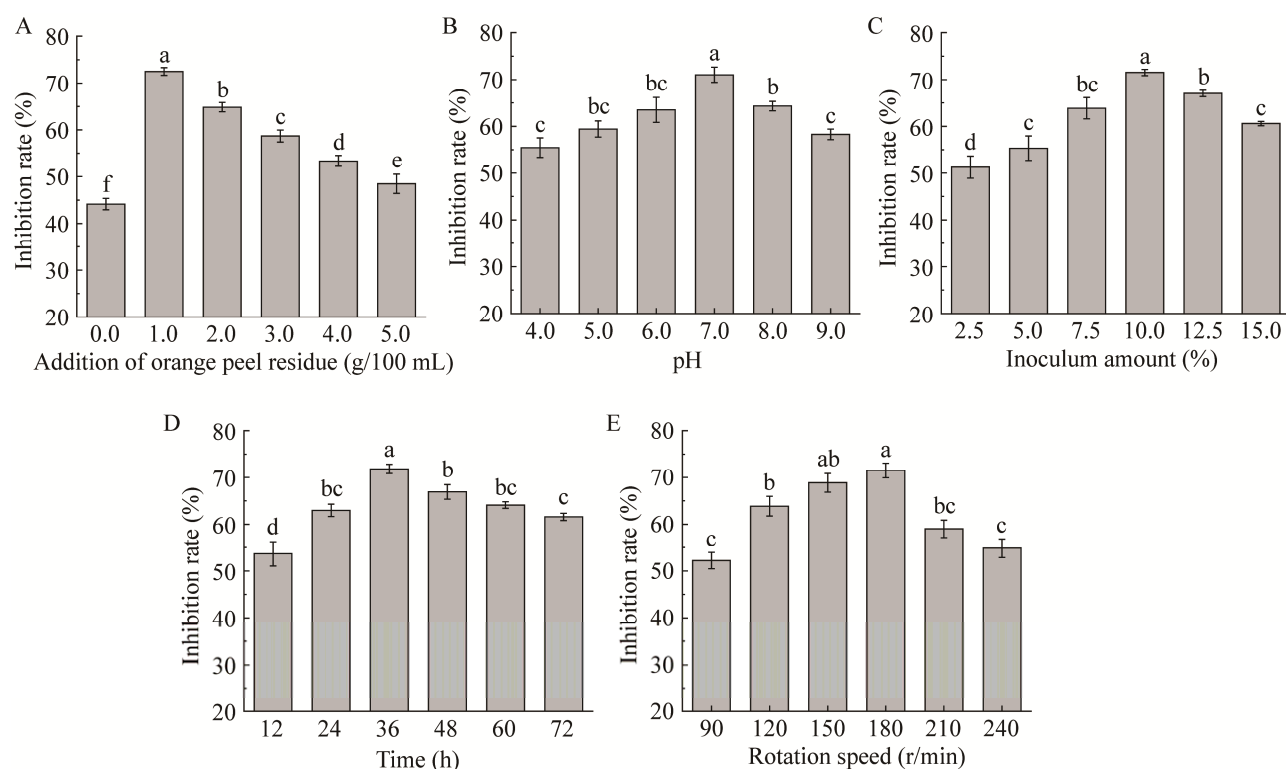


图4 不同发酵条件对 B02c 抑菌率的影响 A: 柑橘皮渣添加量. B: pH. C: 接种量. D: 发酵时间. E: 转速

Figure 4 The effect of different fermentation conditions on the antimicrobial activity of B02c. A: Addition of orange peel residue. B: pH. C: Inoculum amount. D: Fermentation time. E: Rotation speed.



的改变导致活性物质代谢过程中相关酶活性的变化。当初始 pH 7.0 时, 抑菌率达到最高, 说明该 pH 值为菌株 Z10 的最适生长 pH。即确定最优初始 pH 值为 7.0。

菌体接种量直接影响 B02c 的抑菌率。如图 4C 所示: 当接种量小于 10.0% 时, B02c 的抑菌率较低, 可能是因为接种量过低, 导致发酵缓慢、周期长, 抑菌活性物质的合成效率低。当接种量为 10.0% 时抑菌率最高; 当菌体接种量大于 10.0% 时, 抑菌率呈下降趋势。因为接种量过高时往往会使菌体生长过快, 培养液黏度增加, 造成溶氧不足。即确定最优接种量为 10.0%。

由图 4D、4E 可知: 36 h 为较适宜的内生菌抑菌活性物质的产生与积累时期, 即最佳发酵时间为 36 h; 当转速为 180 r/min 时, 抑菌率达到最高, 所以最佳转速控制为 180 r/min。

## 2.4 响应面试验结果

为进一步提高菌株 Z10 的 B02c 的抑菌率, 利用 Box-Behnken 设计法对筛选出的 4 个因素进行优化, 试验设计及结果见表 2。各因素经过回归拟合, 得到二次回归方程:

$$\text{抑菌率}(\%) = 86.58 + 11.65A - 0.79B + 0.0592C - 0.9133D - 0.3925AB + 0.58AC - 0.2AD + 0.05BC + 1.43BD + 0.3875CD - 24.56A^2 - 8.97B^2 - 14.78C^2 - 9.04D^2。$$

从表 3 可以看出, 模型的  $F$  值为 77.59,  $P$  值小于 0.000 1, 该二次项模型高度显著; 失拟项  $P=0.2196 > 0.05$ , 说明模型失拟项是不显著的, 可以较好地拟合试验数据。模型相关系数  $R^2=0.9873$ ,  $R^2_{\text{Adj}}=0.9745$ , 表明模型相关度很好, 对响应值的拟合度较高, 该回归方程能较好地反映响应值的变化<sup>[25]</sup>。由方差分析可知, 柑橘皮渣添加量( $P<0.0001$ )对抑菌率影响显著。

从图 5 可知, 等高线图均为近似圆形, 表明各个因素之间的交互作用均不显著; 当多个因素

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Design and results of response surface test

Test No.	因素水平 Factor levels				抑菌率 Inhibition rate (%)
	A 柑橘皮渣添加量 Addition of orange peel residue (g/100 mL)	B pH	C 接种量 Inoculum amount (%)	D 转速 Rotation speed (r/min)	
1	0.0	5.0	10.0	180	41.08
2	2.0	5.0	10.0	180	63.47
3	0.0	9.0	10.0	180	40.41
4	2.0	9.0	10.0	180	61.23
5	1.0	7.0	5.0	120	62.26
6	1.0	7.0	15.0	120	63.37
7	1.0	7.0	5.0	240	58.38
8	1.0	7.0	15.0	240	61.04
9	0.0	7.0	10.0	120	40.97
10	2.0	7.0	10.0	120	65.72
11	0.0	7.0	10.0	240	39.58
12	2.0	7.0	10.0	240	63.53
13	1.0	5.0	5.0	180	64.28
14	1.0	9.0	5.0	180	61.01
15	1.0	5.0	15.0	180	63.48
16	1.0	9.0	15.0	180	60.41
17	0.0	7.0	5.0	180	38.27
18	2.0	7.0	5.0	180	61.06
19	0.0	7.0	15.0	180	36.28
20	2.0	7.0	15.0	180	61.39
21	1.0	5.0	10.0	120	72.37
22	1.0	9.0	10.0	120	69.40
23	1.0	5.0	10.0	240	68.93
24	1.0	9.0	10.0	240	71.67
25	1.0	7.0	10.0	180	85.75
26	1.0	7.0	10.0	180	84.26
27	1.0	7.0	10.0	180	87.58
28	1.0	7.0	10.0	180	88.83
29	1.0	7.0	10.0	180	86.46

交互作用时, 三维曲面图可直观看出响应值的变化趋势, 随着 pH、柑橘皮渣添加量、接种量和转速的增加, 抑菌率呈现先上升后下降的趋势。通过比较各因素的  $F$  值可知, 各因素对抑菌率

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	显著性 Significance
模型 Model	6 353.720 0	14	453.840 0	77.590 0	<0.000 1	Significant
<i>A</i>	1 628.900 0	1	1 628.900 0	278.470 0	<0.000 1	**
<i>B</i>	7.490 0	1	7.490 0	1.280 0	0.276 9	
<i>C</i>	0.042 0	1	0.042 0	0.007 2	0.933 7	
<i>D</i>	10.010 0	1	10.010 0	1.710 0	0.211 9	
<i>AB</i>	0.616 2	1	0.616 2	0.105 3	0.750 3	
<i>AC</i>	1.350 0	1	1.350 0	0.230 0	0.638 9	
<i>AD</i>	0.160 0	1	0.160 0	0.027 4	0.871 0	
<i>BC</i>	0.010 0	1	0.010 0	0.001 7	0.967 6	
<i>BD</i>	8.150 0	1	8.150 0	1.390 0	0.257 5	
<i>CD</i>	0.600 6	1	0.600 6	0.102 7	0.753 4	
<i>A</i> <sup>2</sup>	3 913.830 0	1	3 913.830 0	669.090 0	<0.000 1	**
<i>B</i> <sup>2</sup>	521.920 0	1	521.920 0	89.220 0	<0.000 1	**
<i>C</i> <sup>2</sup>	1 417.700 0	1	1 417.700 0	242.360 0	<0.000 1	**
<i>D</i> <sup>2</sup>	529.510 0	1	529.510 0	90.520 0	<0.000 1	**
残差 Residual	81.890 0	14	5.850 0			
失拟项 Lack of fit	69.750 0	10	6.970 0	2.300 0	0.219 6	Not significant
纯误差 Pure error	12.150 0	4	3.040 0			
总和 Total	6 435.610 0	28				

\*\*:  $P < 0.01$ .

的影响大小顺序为：柑橘皮渣添加量(*A*)>转速(*D*)>pH(*B*)>接种量(*C*)，与回归结果分析相一致。

通过试验优化并结合实际操作，影响抑菌率的各因素最优值分别为柑橘皮渣添加量 1.6 g/100 mL、pH 6.8、接种量 10.0%和转速 172 r/min，此条件下抑菌率的理论值为 84.81%。为验证响应曲面所得结果的可靠性，进行 5 次最佳工艺验证试验，所得抑菌率实际值为 84.36%，与理论值相对误差仅为 0.53%，极为相近，并且通过优化后的 B02c 对金黄色葡萄球菌的抑菌率提高 16.36%。进而证明此模型可用于菌株 Z10 的 B02c 抑菌率的发酵条件优化。

## 2.5 菌株 Z10 的 B02c 对金黄色葡萄球菌 MIC 的测定结果

通过最佳发酵工艺制得质量浓度为 200 mg/mL

的 B02c 原液。最小抑制浓度可以反映 B02c 对金黄色葡萄球菌的抑制活性，B02c 浓度低于或等于 1.563 mg/mL 时，液体浑浊，*S. aureus* 有明显生长现象；当浓度高于或等于 3.125 mg/mL 时液体澄清，*S. aureus* 未见生长，因此菌株 Z10 的 B02c 对金黄色葡萄球菌的 MIC 确定为 3.125 mg/mL。

## 2.6 菌株 Z10 的 B02c 对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

如图 6 所示，与无 B02c 添加的对照组相比，0.5 MIC、1 MIC 的浓度处理对 *S. aureus* 均有抑制作用且呈浓度依赖性。在 0.5 MIC 处理组中，B02c 明显延缓了 *S. aureus* 的生长速度；而 1 MIC 处理组则完全抑制了 *S. aureus* 的生长繁殖，作用 24 h 后 *S. aureus* 处于生长停滞期状态， $OD_{600}$  与 0 h 相比基本保持不变。

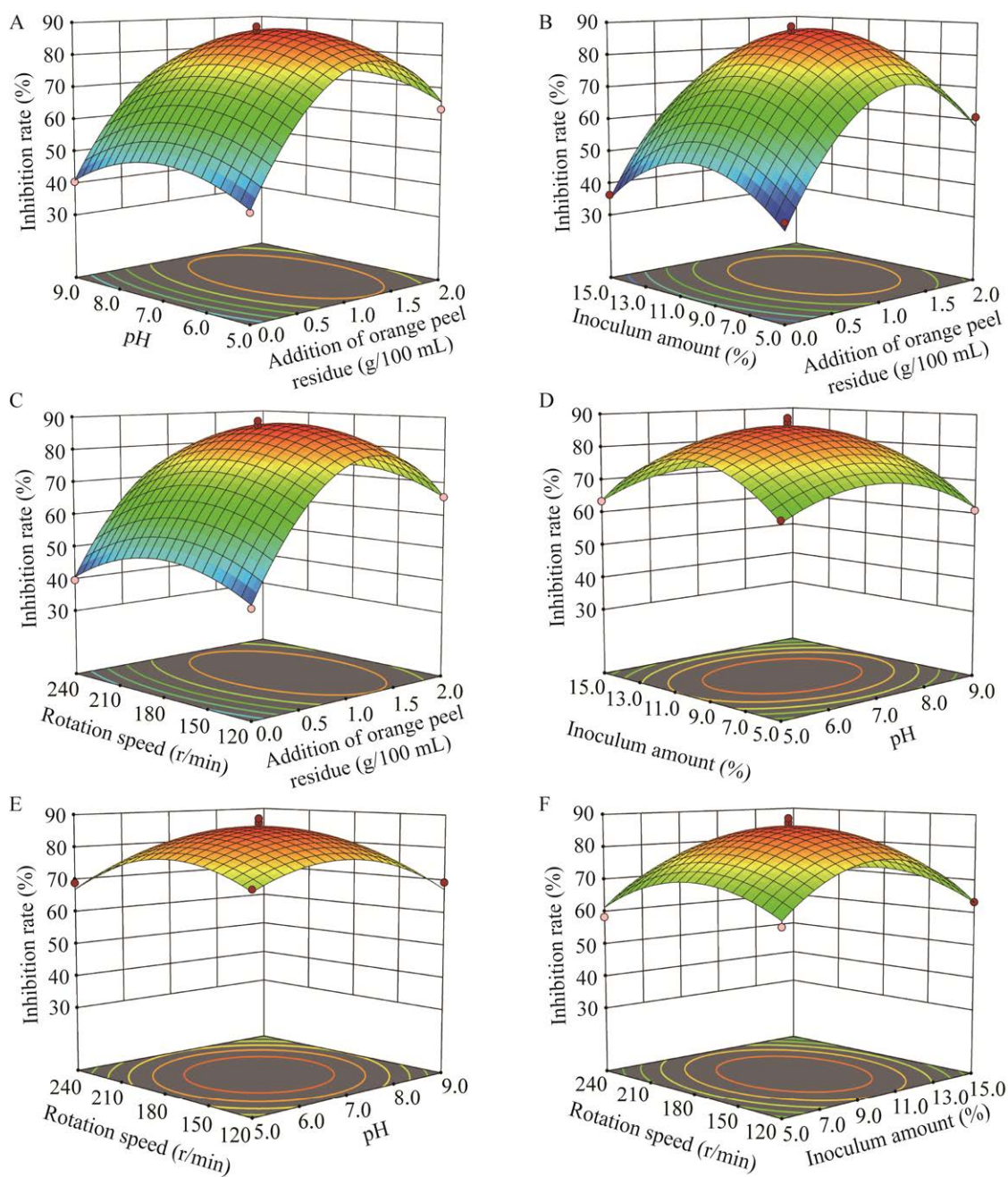


图 5 各因素交互作用对 B02c 抑菌率的影响 A: pH 和柑橘皮渣添加量的响应面图. B: 接种量和柑橘皮渣添加量的响应面图. C: 转速和柑橘皮渣添加量的响应面图. D: 接种量和 pH 的响应面图. E: 转速和 pH 的响应面图. F: 转速和接种量的响应面图

Figure 5 The effect of factors interaction on the antimicrobial activity of B02c. A: pH and addition of orange peel residue response surface. B: Inoculum amount and addition of orange peel residue response surface. C: Rotation speed and addition of orange peel residue response surface. D: Inoculum amount and pH response surface. E: Rotation speed and pH response surface. F: Rotation speed and inoculum amount response surface.

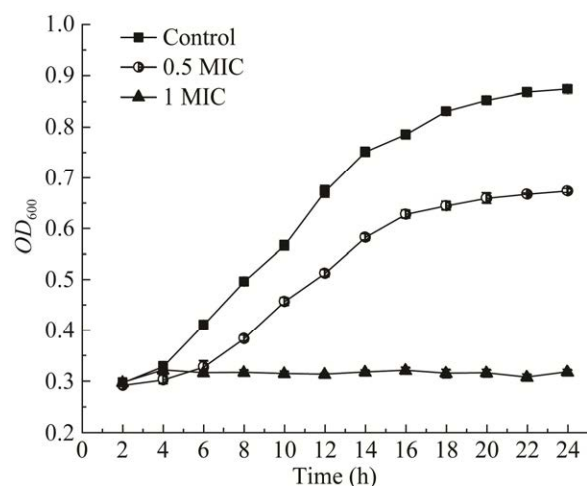


图6 菌株 Z10 的 B02c 对金黄色葡萄球菌的抑制曲线

Figure 6 Inhibition curve of B02c of strain Z10 against *Staphylococcus aureus*.

## 2.7 菌株 Z10 的 B02c 对金黄色葡萄球菌细胞膜完整性的影响结果

如图 7 所示, 未经提取液处理的对照组呈现大量绿色荧光, 几乎不可见红色荧光, 表明细胞膜完整, 未出现损伤。0.5 MIC 处理组菌体仍以绿色为主, 极少量菌体呈现红色; 1 MIC 处理组的红、绿色荧光数量接近, 说明在此浓度处理下, 近乎一半的 *S. aureus* 细胞膜被破坏。当质量浓度为 2 MIC 时, 菌体以红色荧光为主, 罕见有绿色荧光, 表明在此浓度下 *S. aureus* 细胞膜被严重损坏。

为进一步说明 B02c 对 *S. aureus* 细胞膜的破坏, 利用流式细胞术对细胞膜损伤程度进行定量分析。如图 8 所示, 未经处理的对照组

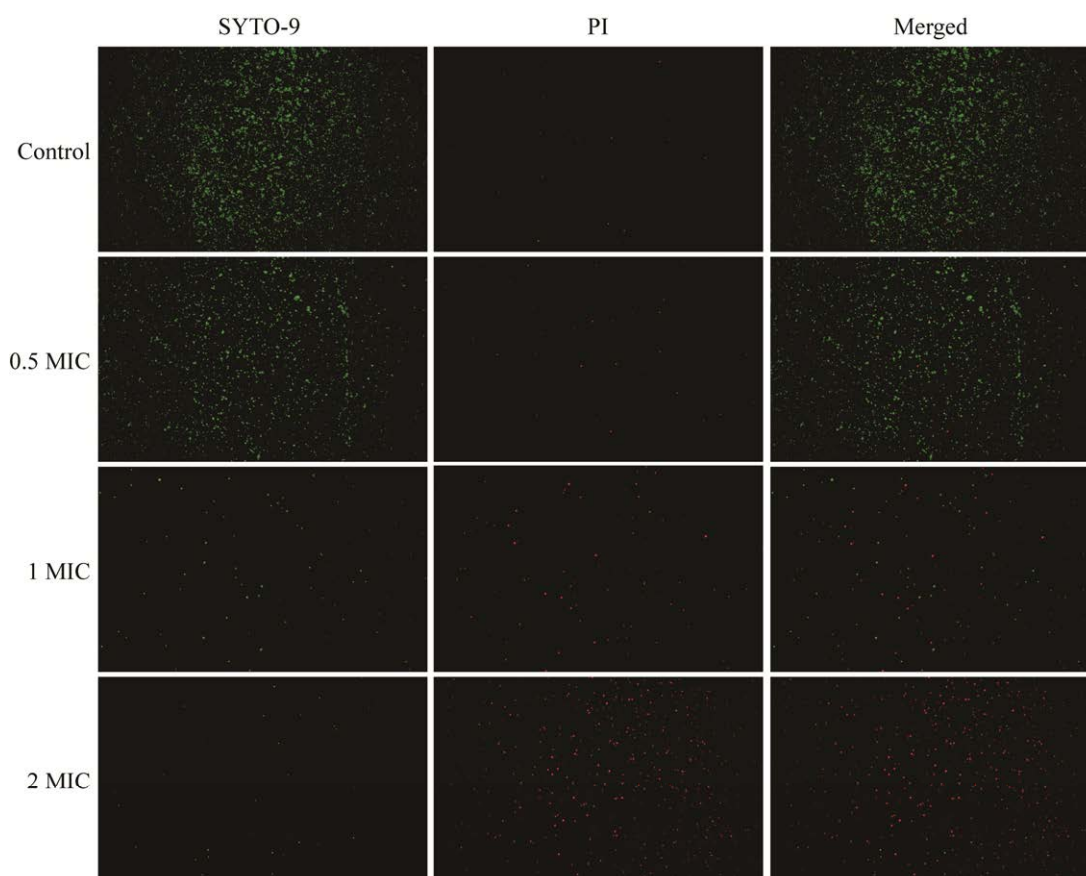


图7 菌株 Z10 的 B02c 对金黄色葡萄球菌细胞膜完整性的影响

Figure 7 Effect of B02c of strain Z10 on cell membrane integrity of *Staphylococcus aureus*.



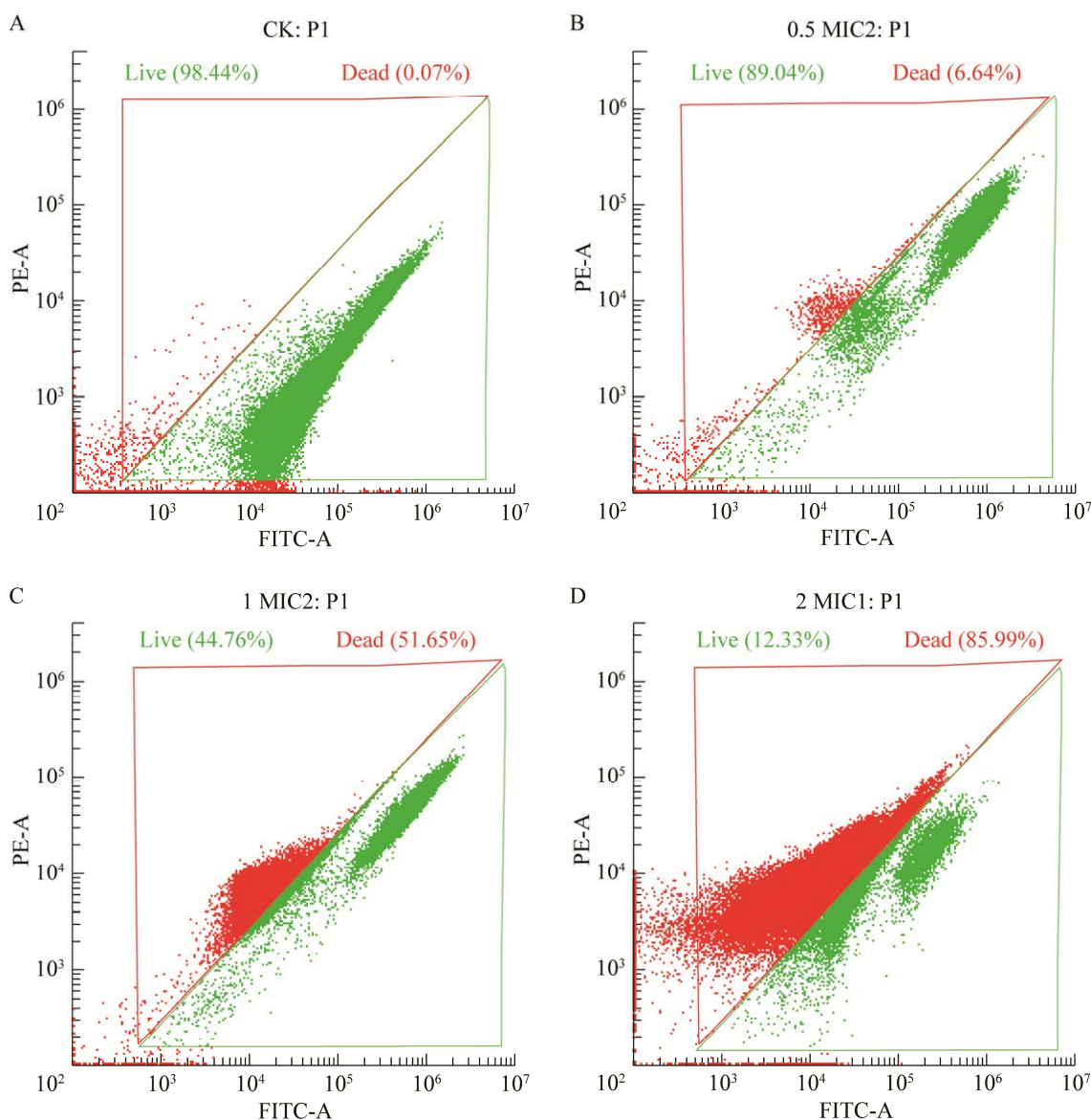


图 8 流式细胞术分析菌株 Z10 的 B02c 对金黄色葡萄球菌细胞膜的影响

Figure 8 Flow cytometry analysis of the effect of B02c of strain Z10 on the cell membrane of *Staphylococcus aureus*. A: Control. B: 0.5 MIC. C: 1 MIC. D: 2 MIC.

*S. aureus* 细胞膜受损率为 0.07%，0.5 MIC 处理后 *S. aureus* 细胞膜受损率为 6.64%，1 MIC 处理组 *S. aureus* 细胞膜受损率 51.65%，2 MIC 处理组 *S. aureus* 细胞膜受损率为 85.99%。从流式的结果可以看出，1 MIC 和 2 MIC 处理组对 *S. aureus* 细胞膜表现出显著破坏性，这与荧光显微镜的观察结果一致，均显示菌株 Z10 的 B02c

能够破坏 *S. aureus* 细胞膜的完整性。

### 3 讨论与结论

芽孢杆菌是一类产芽孢的革兰氏阳性细菌，具有代谢旺盛、可以产生多种次生代谢产物、发酵密度高、抗逆性强和适应性强等特征，是自然界中重要的优势生防细菌<sup>[26]</sup>。从各种植

物中筛选得到的芽孢杆菌及其发酵液已被广泛报道能有效抑制多种病原菌生长。屈欢等<sup>[27]</sup>从荒漠植物沙葱中分离到 9 株内生细菌均为芽孢杆菌属, 其中 4 株对 7 种植物病原菌表现出较强的拮抗作用, 以菌株 ZT14 拮抗作用最强, 抑菌率均在 65% 以上。Wu 等<sup>[28]</sup>从芝麻香型白酒大曲中分离出了 11 株能抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长的芽孢杆菌。本研究从柠檬中筛选出多株具有良好抗菌活性的内生菌, 其中芽孢杆菌属菌株 Z10 的抑菌活性最显著, 为柠檬拮抗内生菌资源的开发利用提供了实践指导。

微生物的生长代谢往往受到培养条件的影响, 适宜的培养条件能够显著提高微生物代谢产物的产量<sup>[29-30]</sup>, 但影响不同拮抗芽孢杆菌产物抗菌活性的关键发酵条件存在差异。例如, 蜡样芽孢杆菌 BCCY-22<sup>[31]</sup>的关键影响因素是培养基初始 pH, pH 值能影响微生物细胞中的酶活性和微生物细胞质膜的电荷, 以及培养基中某些重要营养素和中间代谢产物的分解<sup>[32]</sup>; 地衣芽孢杆菌 FA6 和萎缩芽孢杆菌 E2030 的关键影响因素分别是转速和装液量<sup>[33-34]</sup>。本研究中柑橘皮渣添加量对菌株 Z10 产物的抗菌活性具有较大影响, 有研究表明柑橘皮渣中多种组分均有抑菌消炎作用, 一定浓度的柑橘皮渣提取物可以抑制常见细菌的生长<sup>[35]</sup>。为避免由于柑橘皮渣本身的抑菌作用, 设置未添加菌种的液体发酵培养基为对照, 结果显示, 未添加菌种的含有柑橘皮渣的发酵培养基提取液对 4 种病原菌均无抑菌作用。与未添加柑橘皮渣的对照组相比, 柑橘皮渣添加量为 1.6 g/100 mL 时, 菌株 Z10 发酵液提取液的抑菌活性有显著提升。导致这一结果的原因可能是: 一方面柑橘皮渣含有丰富的碳、氮源, C/N 比约为 36<sup>[36]</sup>, 可以为微生物提供生命活动所需要的能量、利于菌体生长、有助于其合成次级代谢产物; 另

一方面菌株 Z10 对柑橘皮渣中的有效成分进行微生物转化, 通过酶的催化作用影响不同活性物质的成分含量, 从而提高抗菌活性或产生新的活性成分。菌株 Z10 有效利用柑橘皮渣进行生物转化, 不仅能显著提高 B02c 的抑菌活性, 还提高了柑橘皮渣的资源利用率。然而, 关于菌株 Z10 对柑橘皮渣的转化机制尚不明确, 有待进一步研究。

正交试验设计是研究多因素多水平的一种设计方法, 虽能判断各因素之间的交互作用, 但需要的试验次数较多, 实验结果不够精确。而响应面试验设计能在较少试验次数的情况下, 得到直观、精确度高的响应曲面及多因素间的最优组合。响应曲面图可以形象地看出各因素之间的相互作用及最佳参数, 等高线的形状可以说明两个因素之间交互作用的强弱<sup>[37]</sup>。本研究通过单因素试验和响应面试验设计方法, 确定了菌株 Z10 的最优发酵条件: 柑橘皮渣添加量 1.6 g/100 mL、pH 6.8、接种量 10.0% (100 mL/250 mL)、转速 172 r/min、发酵时间 36 h。这与张慧等<sup>[38]</sup>报道的枯草芽孢杆菌 CS<sub>2</sub>7 的最佳发酵条件: 发酵温度 32 °C, 最佳装液量 50 mL/250 mL, 最佳接种量 10.0%, 初始 pH 7.0 的结论十分接近, 符合多数芽孢杆菌的培养条件; 而与郭若琳等<sup>[39]</sup>报道的枯草芽孢杆菌 LC1-1 响应面法优化后的液体发酵条件: pH 5.5、发酵温度 34 °C、装液量 20%、转速 180 r/min、接种量 2.0%、发酵周期 20 h 相比, 初始 pH、发酵温度、接种量和发酵周期均比其高, 猜测原因可能是菌株 LC1-1 分离自海洋, 独特的生存环境导致发酵条件的差异。优化后的 B02c 对金黄色葡萄球菌的抑菌率提升到 84.36%, 较优化前提高了 16.36%, 其效果优于王学文等<sup>[40]</sup>、黎燕珊等<sup>[41]</sup>的研究成果。

金黄色葡萄球菌被认为是最常见的食源性

致病菌之一,其防控问题至今仍十分严峻。本研究获得的菌株 Z10 对金黄色葡萄球菌抑制作用显著,其发酵液提取液对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 3.125 mg/mL,当 B02c 浓度为 0.5 MIC 时,能明显抑制金黄色葡萄球菌的生长,相同时间的  $OD_{600}$  明显低于对照组;B02c 浓度为 1 MIC 时,能够完全抑制金黄色葡萄球菌的生长,24 h 内  $OD_{600}$  无变化。采用 PI 和 SYTO-9 对金黄色葡萄球菌进行染色,并通过荧光显微镜和流式细胞仪观测菌株 Z10 的 B02c 对其细胞膜完整性的影响。PI 不能透过完整的细胞膜,但当细胞膜破损时,PI 就能进入胞内对 DNA 染色并发出红色荧光<sup>[42]</sup>;而 SYTO-9 能通过细胞膜对 DNA 进行染色,并发出绿色荧光<sup>[43]</sup>。随着 B02c 浓度的增加,金黄色葡萄球菌的细胞膜破损越严重,当 B02c 浓度为 2 MIC 时,*S. aureus* 细胞膜被严重损坏,菌体出现大量死亡。因此,推测 B02c 对 *S. aureus* 的抑菌机制可能是由于随着 B02c 浓度的增加,导致金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性增强,破坏了细胞膜的完整性,造成大量外源物质的流入和细胞质的外泄,从而引起胞内渗透压紊乱使菌体不能正常生长繁殖。

本研究获得的菌株 Z10 对金黄色葡萄球菌具有较强的抑制作用,添加柑橘皮渣作为菌株 Z10 液态发酵的转化底物,显著提升了菌株发酵液提取液中抑菌活性物质的产量,提高了柑橘皮渣的资源利用率,为柑橘皮渣高效资源化利用提供了新思路。试验确定了菌株 Z10 的最优发酵条件,相比于优化前抑菌率得到明显提升,其发酵液提取液能破坏金黄色葡萄球菌的细胞膜。该研究为菌株 Z10 的进一步扩大培养和抑菌机制的探究提供了理论指导和依据。

## REFERENCES

- [1] SHI Y, ZHANG B, LU YY, QIAN CD, FENG Y, FANG LW, DING ZS, CHENG DQ. Antiviral activity of phenanthrenes from the medicinal plant *Bletilla striata* against influenza A virus[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17(1): 273.
- [2] LI ZG, XIONG KY, WEN WE, LI L, XU DL. Functional endophytes regulating plant secondary metabolism: current status, prospects and applications[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1153-1176.
- [3] SHARMA G, AGARWAL S, VERMA K, BHARDWAJ R, MATHUR V. Therapeutic compounds from medicinal plant endophytes: molecular and metabolic adaptations[J]. Journal of Applied Microbiology, 2023, 134(4): 1xad07.
- [4] ALAM F, MOHAMMADIN K, SHAFIQUE Z, AMJAD ST, ASAD MHHB. Citrus flavonoids as potential therapeutic agents: a review[J]. Phytotherapy Research, 2022, 36(4): 1417-1441.
- [5] GUALDANI R, CAVALLUZZI M, LENTINI G, HABTEMARIAM S. The chemistry and pharmacology of Citrus limonoids[J]. Molecules, 2016, 21(11): 1530-1568.
- [6] BANYAL A, THAKUR V, THAKUR R, KUMAR P. Endophytic microbial diversity: a new hope for the production of novel anti-tumor and anti-HIV agents as future therapeutics[J]. Current Microbiology, 2021, 78(5): 1699-1717.
- [7] GONZÁLEZ-MOLINA E, DOMÍNGUEZ-PERLES R, MORENO DA, GARCÍA-VIGUERA C. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 51(2): 327-345.
- [8] 冯瑞章,田婧,韩睿康,陈文凤,刘艳丽,魏琴,梁寒峭,张勇波. 体外降胆固醇活性柠檬内生菌的分离筛选及鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(6): 954-959.
- FENG RZ, TIAN J, HAN RK, CHEN WF, LIU YL, WEI Q, LIANG HQ, ZHANG YB. Isolation, screening and identification of lemon endophyte with high cholesterol-reducing activity *in vitro*[J]. Natural Product Research and Development, 2022, 34(6): 954-959 (in Chinese).
- [9] KAUR R, KAUR J, KAUR M, KALOTRA V, CHADHA P, KAUR A, KAUR A. An endophytic *Penicillium oxalicum* isolated from Citrus limon possesses antioxidant and genoprotective potential[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(5): 1400-1413.



- [10] 吴剑. 柑橘活性成分及皮渣再利用研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(3): 93-96.  
WU J. Research progress of *Citrus* peels active composition and reutilization[J]. *Sichuan Food and Fermentation*, 2013, 49(3): 93-96 (in Chinese).
- [11] 付复华, 李忠海, 单杨, 潘兆平, 李高阳. 柑橘皮渣综合利用技术研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(5): 178-184.  
FU FH, LI ZH, SHAN Y, PAN ZP, LI GY. Research progress in comprehensive utilization of *Citrus* peels and residue[J]. *Food & Machinery*, 2009, 25(5): 178-184 (in Chinese).
- [12] 李世忠, 李勇, 黄建国, 彭良志, 雷霆. 柑橘皮渣资源化利用研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(7): 38-41.  
LI SZ, LI Y, HUANG JG, PENG LZ, LEI T. Research advance in resource utilization of *Citrus* dregs[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(7): 38-41 (in Chinese).
- [13] 孙金辉, 陈海桂, 卢沿钢, 尚永彪. 柑橘皮渣生物转化利用研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 312-315.  
SUN JH, CHEN HG, LU YG, SHANG YB. Research advance in biotransformation and utilization of *Citrus* peels[J]. *Food Science*, 2011, 32(19): 312-315 (in Chinese).
- [14] 陈传文, 孙前光, 朱军, 吴晓鹏, 黄惠琴, 鲍时翔. 三种药用植物内生菌的分离及其抗肿瘤活性菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1462-1466.  
CHEN CW, SUN QG, ZHU J, XU XP, HUANG HQ, BAO SX. Isolation and screening for endophyte with antitumor activities from three medicinal plants[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(10): 1462-1466 (in Chinese).
- [15] 王永刚, 杨光瑞, 陈凯, 王鸣刚, 冷非凡, 杨明俊, 田艳花. 内生真菌链格孢菌醋酸乙酯提取物对金黄色葡萄球菌抑菌机制的研究[J]. 中草药, 2018, 49(3): 619-625.  
WANG YG, YANG GR, CHEN K, WANG MG, LENG FF, YANG MJ, TIAN YH. Antibacterial mechanisms of ethyl acetate extract from endophytic fungi *Alternaria alternata* against *Staphylococcus aureus*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(3): 619-625 (in Chinese).
- [16] CHEN ZT, AO JQ, YANG WC, JIAO LP, ZHENG TL, CHEN XH. Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an arctic sediment[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(24): 10381-10390.
- [17] 余之蕴, 黄宝莹, 刘海卿, 林耀文, 罗湘蓉, 黄玲玲. 牛津杯法测定食品添加剂对五种益生菌的抑菌活力[J]. 食品工业, 2016, 37(1): 171-174.  
SHE ZY, HUANG BY, LIU HQ, LIN YW, LUO XR, HUANG LL. Antibacterial activity of foods additives against five strains of probiotics by Oxford plate assay system[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(1): 171-174 (in Chinese).
- [18] 罗亚军, 孙红敏, 何宁, 袁丽杰, 解云英. 西藏沙棘根瘤及根际土壤放线菌分离及抗菌活性研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(11): 225-236.  
LUO YJ, SUN HM, HE N, YUAN LJ, XIE YY. Isolation and antibacterial activity of actinomycetes from the nodules and rhizosphere soil of *Hippophae rhamnoides* in Tibet[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(11): 225-236 (in Chinese).
- [19] 廖海浪, 钟芙蓉, 柯汶佳, 李娜, 马云桐. 黄连根腐病原菌的分离鉴定及其拮抗菌筛选[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(9): 900-912.  
LIAO HL, ZHONG FR, KE WJ, LI N, MA YT. Isolation and identification of the pathogen of root rot of *Coptis chinensis* and screening of antagonistic microorganism[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2022, 47(9): 900-912 (in Chinese).
- [20] 宁亚维, 付浴男, 何建卓, 苏丹, 候琳琳, 王志新, 贾英民. 苯乳酸和醋酸联用对单核细胞增生李斯特菌的协同抑菌机理[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 70-76.  
NING YW, FU YN, HE JZ, SU D, HOU LL, WANG ZX, JIA YM. Synergistic antibacterial mechanism of phenyllactic acid combined with acetic acid against *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Science*, 2020, 41(23): 70-76 (in Chinese).
- [21] 饶苇, 陈奎霖, 方子莹, 陈昭民, 方祥. 植物乳杆菌 SCB2505 代谢物对液化沙雷氏菌的抑菌机理[J]. 食品与发酵工业, 2023. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036071>.  
RAO W, CHENG KL, FANG ZY, CHEN ZM, FANG X. Antibacterial mechanism of *Lactobacillus plantarum* SCB2505 metabolites against *Serratia liquefaciens*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036071> (in Chinese).
- [22] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [23] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a

- new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [24] 王淑培, 吴玉财, 兰美香, 史昌蓉, 张静. 柑橘皮渣液态发酵制取曲酸工艺优化[J]. *中国酿造*, 2016, 35(7): 108-112.
- WANG SP, WU YC, LAN MX, SHI CR, ZHANG J. Optimization of liquid-state fermentation process of kojic acid by citrus pomace[J]. *China Brewing*, 2016, 35(7): 108-112 (in Chinese).
- [25] SRIVASTAVA G, ROY S, KAYASTHA AM. Immobilisation of Fenugreek  $\beta$ -amylase on chitosan/PVP blend and chitosan coated PVC beads: a comparative study[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 844-851.
- [26] 徐靖, 牛邦彦, 张亚南, 魏海雷, 张晓霞, 高森. 芽孢杆菌属分类学研究进展[J]. *中国土壤与肥料*, 2022(12): 225-237.
- XU J, NIU BY, ZHANG YN, WEI HL, ZHANG XX, GAO M. Advances in taxonomy of genus *Bacillus*[J]. *Soils and Fertilizers Sciences in China*, 2022(12): 225-237 (in Chinese).
- [27] 屈欢, 郭震, 马莉, 陈文娟. 沙葱内生菌的分离鉴定及抑菌活性[J]. *中国植保导刊*, 2023, 43(1): 16-20, 35.
- QU H, GUO Z, MA L, CHEN WJ. Isolation, identification, and antifungal activity of endophytes from *Allium mongolicum regel*[J]. *China Plant Protection*, 2023, 43(1): 16-20, 35 (in Chinese).
- [28] WU XY, JIANG QE, WANG ZS, XU YQ, CHEN WH, SUN JY, LIU Y. Diversity, enzyme production and antibacterial activity of *Bacillus* strains isolated from sesame-flavored liquor Daqu[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(9): 5831-5839.
- [29] 张昊月, 郭正彦, 吕志堂, 陈义华. 应用响应面法优化发酵培养基提高达托霉素产量[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(1): 113-122.
- ZHANG HY, GUO ZY, LV ZT, CHEN YH. Medium optimization with the response surface methodology to improve daptomycin production[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(1): 113-122 (in Chinese).
- [30] 金亮, 李利宏, 张荣珍, 徐岩. 重组枯草芽孢杆菌发酵生产乳铁蛋白 N 叶工艺优化[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(7): 2628-2638.
- JIN L, LI LH, ZHANG RZ, XU Y. Fermentation optimization for production of lactoferrin N-lobe by recombinant *Bacillus subtilis*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(7): 2628-2638 (in Chinese).
- [31] 赵月, 杨亚楠, 李雅华, 赵洪海, 咸洪泉. 生防细菌蜡芽孢杆菌 BCCY-22 发酵条件优化[J]. *福建农业学报*, 2022, 37(7): 938-945.
- ZHAO Y, YANG YN, LI YH, ZHAO HH, XIAN HQ. Optimizing fermentation of biocontrol bacterium *Bacillus cereus* BCCY-22[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37(7): 938-945 (in Chinese).
- [32] 秦泽华, 张汝兵, 郁建平. 大肠杆菌通过甲羟戊酸途径合成紫杉醇[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(5): 722-730.
- QIN ZH, ZHANG RB, YU JP. Perillyl alcohol production by engineered heterologous mevalonate pathway in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(5): 722-730 (in Chinese).
- [33] 潘美井, 王桂堂, 吴山功. 鱼类肠道益生地衣芽孢杆菌 FA6 发酵工艺的响应面法优化[J]. *水生生物学报*, 2024, 48(1): 166-175.
- PAN MJ, WANG GT, WU SG. Optimization of fermentation medium and conditions of fish intestinal probiotic *Bacillus licheniformis* FA6 by response surface methodology[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, 48(1): 166-175 (in Chinese).
- [34] 乔佳慧子, 沈硕, 呼荣. 响应面法优化提高萎蔫芽孢杆菌 E20303 抑制马铃薯干腐病原菌活性的研究[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(7): 2411-2427.
- QIAO JHZ, SHEN S, HU R. Improving the activity of *Bacillus atrophaeus* E20303 against the dry rot pathogen of potato: based on response surface methodology[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(7): 2411-2427 (in Chinese).
- [35] 唐清苗, 王鲁峰. 柑橘皮渣的功能组分及加工应用现状[J]. *食品与机械*, 2022, 38(6): 180-185, 218.
- TANG QM, WANG LF. Functional components of citrus peel and its processing and application status[J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(6): 180-185, 218 (in Chinese).
- [36] 兰子平, 邱德敏, 雷光东. 柑橘皮渣中碳氮比的测定[J]. *内江师范学院学报*, 2013, 28(10): 28-30.
- LAN ZP, QIU DM, LEI GD. Determination of carbon-nitrogen ratio of *Citrus* peel residue[J]. *Journal of Neijiang Normal University*, 2013, 28(10): 28-30 (in Chinese).
- [37] RLARA OR, ABDURAHMAN NH, OLALERE OA. Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoids and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using response surface methodology[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2018, 107: 36-48.
- [38] 张慧, 林陈强, 吴大华, 陈济琛, 蔡海松. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CS<sub>2</sub>7 液体发酵条件优化[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(5): 995-1001.

- ZHANG H, LIN CQ, WU DH, CHEN JC, CAI HS. Optimization of liquid fermentation conditions of *Bacillus subtilis* CS<sub>2</sub>7[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(5): 995-1001 (in Chinese).
- [39] 郭若琳, 汤伟, 刘仕博, 朱檬, 何增国. 海洋源枯草芽孢杆菌生产壳聚糖酶的发酵工艺研究[J]. 中国海洋药物, 2022, 41(5): 57-64.
- GUO RL, TANG W, LIU SB, ZHU M, HE ZG. Optimization of fermentation conditions for chitosanase production by *Bacillus subtilis* LC1-1[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2022, 41(5): 57-64 (in Chinese).
- [40] 王学文, 于存, 潘洪祥. 高知芽孢杆菌 *Cytobacillus kochii* H 产蛋白酶条件优化及抑菌效应[J]. 福建农业学报, 2023, 38(1): 47-57.
- WANG XW, YU C, PAN HX. Process optimization and antimicrobial effect of *Cytobacillus kochii* H protease[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2023, 38(1): 47-57 (in Chinese).
- [41] 黎燕珊, 崔文艳, 张陈芳, 黄小欣, 何朋杰. 抗金银花白粉病贝莱斯芽孢杆菌 HC-8 菌株培养基及发酵条件优化[J]. 南方农业学报, 2021, 52(8): 2148-2157.
- LI YS, CUI WY, ZHANG CF, HUANG XX, HE PJ. Optimization of culture medium and fermentation parameters of *Bacillus velezensis* HC-8 antagonistic to *Erysiphe lonicerae*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(8): 2148-2157 (in Chinese).
- [42] CROWLEY LC, SCOTT AP, MARFELL BJ, BOUGHABA JA, CHOJNOWSKI G, WATERHOUSE NJ. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2016, 2016(7): pdb.prot087163.
- [43] LIU S, HE XL, ZHANG T, ZHAO KX, XIAO CH, TONG ZR, JIN L, HE NY, DENG Y, LI S, GUO Y, CHEN Z. Highly sensitive smartphone-based detection of *Listeria monocytogenes* using SYTO9[J]. Chinese Chemical Letters, 2022, 33(4): 1933-1935.