

复合诱变增强植物乳杆菌 *fmb10* 的抑菌性能研究

Study on enhancing antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* *fmb10* through composite mutagenesis

陈芸芸¹ 陆兆新² 党丽娟² 高钰淇²

CHEN Yun-yun¹ LU Zhao-xin² DANG Li-juan² GAO Yu-qi²

(1. 闽南师范大学生物科学与技术学院, 福建 漳州 363000; 2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210000)

(1. School of Biological Science and Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China;

2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210000, China)

摘要:以植物乳杆菌 *fmb10* 为出发菌株,依次通过 $\text{Co}^{60}\gamma$ 射线、低能氮离子束诱变、硫酸二乙酯(DES)诱变、EMS 诱变等手段对菌株进行单一和复合诱变改良,以期提高其抑菌活性。结果表明,菌株 *fmb10* 对低能氮离子束注入和 EMS 诱变敏感,通过低能氮离子注入和 EMS 化学诱变,获得一株抑菌活性强、遗传特性稳定的正向突变菌株 *fmb10-Z*。通过测定,发现菌株 *fmb10-Z* 不仅保留了广谱抑菌活性,且抑菌活性有不同程度的提高,对大肠杆菌的抑菌圈直径与出发菌株相比提高了 23%,细菌素相对效价比原始菌株提高了 1.5 倍,诱变效应明显。

关键词:复合诱变;植物乳杆菌;抑菌性能;低能离子束;EMS

Abstract: Induced mutation of *Lactobacillus plantarum fmb10* divided from pineapple was performed by $\text{Co}^{60}\gamma$, low-energy N^+ beam irradiation, DES, EMS and composite mutagenesis, respectively, to enhance the antibacterial activity. The results showed that *Lactobacillus plantarum fmb10* was sensitive to low-energy N^+ beam and EMS irradiation, and a high-activity strain *fmb10-Z* with stable inheritance and forward mutation was obtained after the treatment of EMS-low-energy N^+ beam composite mutagenesis. The bacteriostatic diameter against *E. coli* was increased by 23%, and the antibacterial activity of the mutant *fmb10-Z* was increased 1.5 times compared with original strain.

Keywords: composite mutagenesis; *Lactobacillus plantarum*; antibacterial activity; low-energy beam; EMS

化学防腐剂的大量连续使用和抗生素滥用,会造成了一

系列严重后果,如医药资源浪费、环境污染等^[1];引起人和动物的胃肠功能紊乱,肠道菌群失调^[2];微生物对药物抗生素抗药性增强^[3];化学防腐剂通常存在致癌性、致畸性和易引起食物中毒等诸多安全隐患^[4](而长期以来,食品工业都习惯使用化学防腐剂^[5])。因而开发出广谱、高效、稳定、安全的天然食品防腐剂是食品工业发展的必然趋势^[6]。细菌素是由某些细菌通过核糖体合成,对产生菌有近缘关系的菌株具有抑制或杀灭作用的蛋白质或多肽类物质^[7]。乳酸菌细菌素不仅可以抑制或杀死一些病原菌和食物腐败菌,而且可以改善肠道生态^[8]。细菌素与化学防腐剂相比具有无毒副作用、适用条件宽泛、在人体内能被蛋白酶降解无残留、能够增加食品风味等优点,作为安全高效的新一代生物防腐剂得到广泛关注^[9]。本试验前期研究发现一株产广谱高效细菌素的植物乳杆菌 *fmb10*,其对大部分革兰氏阳性和阴性菌有较强的抑菌作用,同时对串珠镰刀菌等部分霉菌和单增李斯特菌等多种病原菌也表现出不同程度的抑制作用^[10],具有一定的开发价值。

通过遗传改良选育菌株,是提高其细菌素产量的关键^[11]。在微生物诱变育种的研究方法中,常规的辐射诱变仅利用能量的交换,如紫外诱变所得正突变较少;化学诱变只考虑分子基团的交换;而离子注入同时具有能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷的中和与交换联合作用的诱变优势,因而诱变谱更广、突变率更高^[12-13]。普遍认为,复合诱变具有协同效应,若合理搭配使用 2 种或 2 种以上诱变剂,复合诱变相较于单一诱变效果更好^[14]。对于复合诱变研究报道较多,但因诱变方法灵活多样,包括不同诱变剂的先后使用或同时使用甚至同一诱变剂的重复作用,采用低能氮离子注入和 EMS 化学诱变进行复合诱变提高植物乳杆菌细菌素抑菌性能的研究目前尚无报道。

本研究拟以本实验室保存的植物乳杆菌 *fmb10* 为出发菌株,对其进行物理、化学及复合诱变,通过测定诱变菌株对

基金项目:“十二五”科技部农业支撑课题(编号:2011BAD23B05)

作者简介:陈芸芸,女,闽南师范大学讲师,硕士。

通讯作者:陆兆新(1957-),男,南京农业大学教授,博士。

E-mail: fmb@njau.edu.cn

收稿日期:2016-01-25

大肠杆菌的抑菌性能,以期获得细菌素效价较高且遗传稳定的突变菌株,为后续研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

植物乳杆菌 *fmb10* (*Lactobacillus plantarum fmb10*): 分离自福建漳州地区水果——凤梨,由南京农业大学酶工程实验室保存;

大肠杆菌 *E.coli*: 南京农业大学酶工程实验室保藏;

原始菌株 *fmb10* 活化及培养: 采用优化 MRS 培养基^[10];

大肠杆菌 *E.coli* 活化及培养: 采用 NA 培养基^[15];

Nisin 标准品: 10^6 IU/g, 分析纯, 美国 Sigma 公司;

硫酸二乙酯: 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司;

甲基磺酸乙酯: 分析纯, 上海谱振生物科技有限公司;

其它试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化及诱变菌龄的选择 将原始菌株 *fmb10* 活化传代稳定后,按 1 mL/100 mL 的接种量将菌种接种于 MRS 液体培养基,30 °C 静置培养 36 h,每隔 2 h 取样,测定不同时间的 OD_{600} 值,以空白 MRS 液体培养基为对照,以时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标绘制出发菌株 *fmb10* 的生长曲线^[16]。

1.2.2 菌悬液的制备 菌体于 MRS 液体培养基中培养至对数生长期后期, 1×10^4 r/min 离心 10 min,收集沉淀得菌体,用 1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0,灭菌)制成菌悬液,再离心,洗涤 2 次,稀释至 10^8 CFU/mL,备用^[17]。

1.2.3 物理诱变

(1) $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线诱变: 取制备好的对数生长期菌悬液 0.1 mL 均匀涂布于 9 cm 培养皿中央,置超净工作台中无菌风吹干,分别以 0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.5 kGy 的辐照剂量进行 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线处理,剂量率为 0.034 Gy/s,以真空和空气为对照。照射后用 1 mL 生理盐水浸泡 10 min,充分洗脱菌体,制成菌悬液,稀释至 $10^{-3} \sim 10^{-4}$,取 0.1 mL 均匀涂布于 9 cm 培养皿中央,于 30 °C 培养 24 h 后平板计数,计算致死率及正突变率^[18]。试验于厦门市第一医院进行 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射诱变。

(2) 低能氮离子束注入及剂量选择: 本试验所用的离子束辐照设备由厦门大学能源研究院提供,取制备好的对数生长期菌悬液 0.1 mL 均匀涂布,无菌风吹干,采用 10 keV N^+ 离子束处理,注入时间分别为 0,5,10,15,20,25 s,以真空和空气为对照。注入后用 1 mL 生理盐水浸泡 10 min,充分洗脱菌体,制成菌悬液,稀释至 $10^{-3} \sim 10^{-4}$,涂布计数,计算致死率及正突变率^[19]。

1.2.4 化学诱变

(1) 硫酸二乙酯(DES)诱变: 用磷酸缓冲液(pH 7.0)将 DES 母液(10%)配制成终浓度分别为 0.00% (对照),0.10%,0.20%,0.35%,0.50%,0.65%,0.80%,1.00% 的诱变剂,0.45 μm 滤膜过滤,与菌悬液 1:1 均匀混合,30 °C 保温

40 min,用硫代硫酸钠溶液(25%)稀释至 $10^{-3} \sim 10^{-4}$,反应体系为 2 mL。取稀释度为 10^{-4} 的菌液涂布计数,计算致死率及正突变率。

(2) 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变: 用磷酸缓冲液(pH 7.0)将 1 mol/L EMS 母液配成终浓度分别为 0.00(对照),0.10,0.20,0.35,0.50,0.65,0.80,1.00 mol/L 的诱变剂,0.45 μm 滤膜过滤,与菌悬液 1:1 均匀混合,30 °C 保温 30 min,用无菌生理盐水将菌液稀释至 $10^{-3} \sim 10^{-4}$,后同 1.2.4(1)。

1.2.5 第一轮复合诱变 以单一诱变所得高抑菌活性菌株为出发菌株,以致死率和正突变率为指标确定第一轮复合诱变条件,将所选条件考虑所有先后顺序进行组合,每一条件按单一诱变步骤进行,具体见 2.6.1。

1.2.6 第二轮复合诱变 以第一轮复合诱变筛选所得高抑菌活性菌株为出发菌株,以致死率和正突变率为指标确定第二轮复合诱变条件,步骤同第一轮复合诱变。

1.2.7 突变株的筛选及遗传稳定性分析 采用打孔扩散法测定突变株抑菌圈大小^[20],选取抑菌活性较大的正突变株传代 10 次,选择第 2,4,6,8,10 代诱变株进行液体发酵培养,每代 3 次平行,以原始菌株 *fmb10* 为对照,采用牛津杯法检测其抑菌活性大小,检验诱变株的遗传稳定性。

1.2.8 致死率及正突变率测定 致死率(fatality rate)及正突变率(positive mutation rate)分别按式(1)和(2)计算^[21]:

$$L = \left(1 - \frac{S}{S_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

$$P = \frac{M_n}{S_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

L ——致死率,%;

P ——正突变率,%;

S_0 ——对照菌落数,即未经诱变处理的单菌落数,CFU/mL;

S ——诱变处理后单菌落数,CFU/mL;

M_n ——正突变株数,即抑菌圈直径 D 与菌落直径 d 比值显著高于原始菌株的突变株总数($n < 0.05$),CFU/mL。

1.2.9 细菌素效价标准曲线的测定 利用 Nisin 标品和样品抑菌圈直径、效价间比例关系进行换算:取 0.01 g Nisin 标品溶于 10 mL 的 0.02 mol/L 稀盐酸中,配成浓度为 4×10^3 IU/mL,再用 0.02 mol/L 的稀盐酸分别稀释成浓度为 $2 \times 10^3, 1 \times 10^3, 500, 250, 100, 50$ IU/mL 的溶液;采用牛津杯法测定 Nisin 标品对浓度为 10^6 CFU/mL 的大肠杆菌的抑菌圈直径(mm);绘制 Nisin 效价的对数 $\lg(d)$ 值(横坐标)和抑菌圈直径(纵坐标)关系的标准曲线^[22]。

2 结果与分析

2.1 诱变菌龄选择

原始菌株 *fmb10* 生长曲线见图 1。由图 1 可知,0~5 h 为延滞期,6~15 h 为对数期,15~22 h 为稳定期,26 h 以后开始衰落。选择对数期后期 14 h 为诱变出发菌株的培养时间。

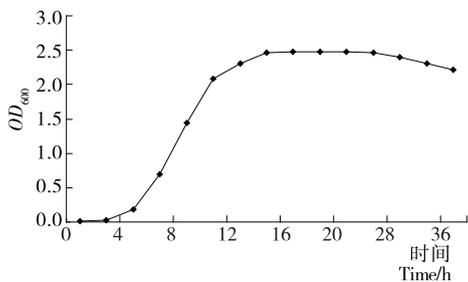


图 1 原始菌株 *fmb10* 生长曲线

Figure 1 Growth curve of *Lactobacillus plantarum fmb10*

2.2 细菌素效价标准曲线的测定

以 Nisin 溶液为标准,制备细菌素效价标准曲线,抑菌圈直径与 Nisin 效价对数值 lg(d) 之间的线性关系见图 2。

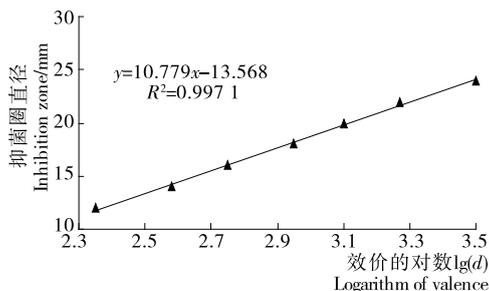


图 2 Nisin 效价标准曲线

Figure 2 The standard curve of Nisin titer

2.3 物理诱变方法的选择

2.3.1 ⁶⁰Coγ 射线诱变剂量的确定 不同⁶⁰Coγ 射线剂量对原始菌株 *fmb10* 致死率、突变率和抑菌活性的影响见图 3。

由图 3 可知,随着⁶⁰Coγ 射线注入剂量的增加,原始菌株 *fmb10* 致死率呈现增大趋势,而正突变率在注入剂量 0.8 kGy 时达到最大,为 59.5%,最大抑菌圈直径也达最大 (19.7 mm),此时致死率高达 82.8%。但高剂量高强度的致死率下,负突变率往往较大,诱变效果不佳,故不采用此方法。

2.3.2 低能 N⁺ 离子束注入时间的选择 低能 N⁺ 离子束注入对原始菌株 *fmb10* 致死率、突变率和抑菌活性的影响见图 4。

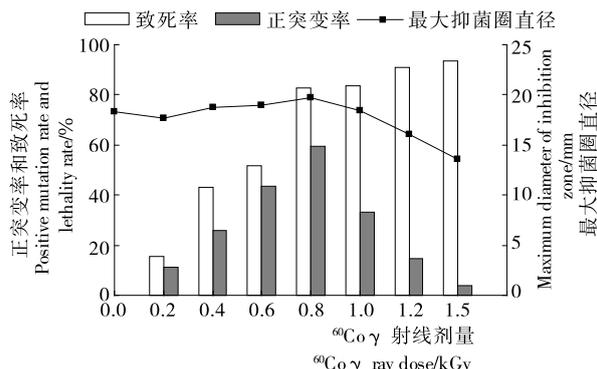


图 3 ⁶⁰Coγ 射线剂量对菌株 *fmb10* 诱变效应的影响

Figure 3 Effect of ⁶⁰Coγ exposure dose on mutagenesis of *Lactobacillus plantarum fmb10*

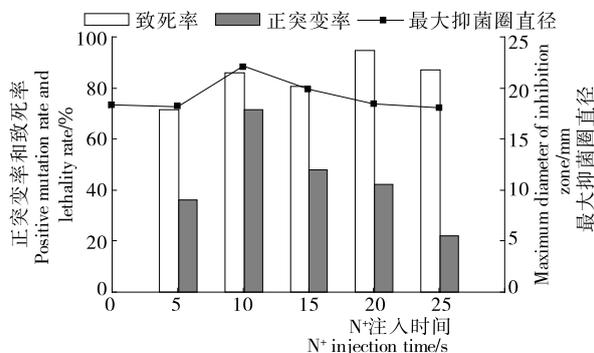


图 4 离子注入时间对菌株 *fmb10* 诱变效应的影响

Figure 4 Effect of ion implantation time on mutagenesis of *Lactobacillus plantarum fmb10*

由图 4 可知,随着 10 keV 的 N⁺ 注入时间的增长,原始菌株 *fmb10* 致死率经过 2 次先高后低的波动,这与很多研究^[23-24] 结果一致,被认为是能量、动量作用下的损伤效应和质量、电荷作用下的保护和刺激综合作用所致。在注入 10 s 时致死率陡然升至 85.8%,随后下降,注入 20 s 时又升至 94.8%,可能是大量连续注入的电荷弱电场阻碍离子对生物体的损伤,同时刺激菌体生长发育^[25]。正突变率在 N⁺ 注入 10 s 时达到最大 71.5%,同时呈正相关的诱变株最大抑菌圈直径为最大,为 22.13 mm。综合考虑,N⁺ 离子注入时间采用 10 s。

2.4 化学诱变方法选择

2.4.1 硫酸二乙酯浓度的确定 由图 5 可知,随 DES 浓度升高,原始菌株 *fmb10* 致死率呈现正相关的上升趋势,这与姜丽艳等^[26] 的研究结果一致;正突变率呈先升后降的规律,在 DES 浓度为 0.65% 时正突变率达到最大,诱变株最大抑菌圈直径与正突变率呈正相关,最高达 19.99 mm;同时可看出,此诱变条件下以负突变为,且最大抑菌圈直径仅比原始菌株的抑菌圈(18.37 mm)提高了 8.82%,可见诱变效果不明显,故不采用此方法。

2.4.2 EMS 浓度的确定 较低的 EMS 浓度就可以导致大部分菌体死亡,如图 6 所示,在 EMS 浓度达到 0.2 mol/L 时原始菌株 *fmb10* 致死率便超过了 80%,之后缓慢升高直至平衡,为最易产生突变的致死率范围。正突变率在 EMS 浓

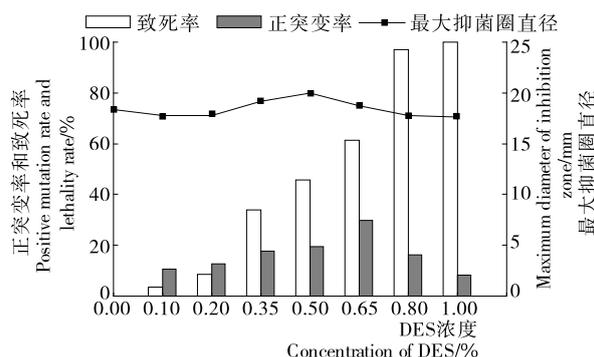


图 5 DES 浓度对菌株 *fmb10* 诱变效应的影响

Figure 5 Effect of DES concentration on mutagenesis of *Lactobacillus plantarum fmb10*

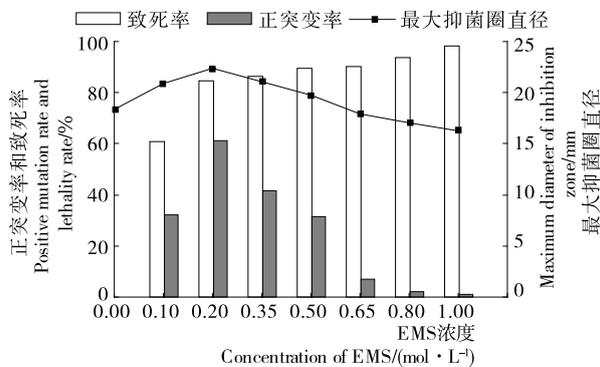


图6 EMS浓度对菌株 *fmb10* 诱变效应的影响

Figure 6 Effect of EMS concentration on mutagenesis of *Lactobacillus plantarum fmb10*

度为0.2 mol/L时达到最大,为61.2%,最大抑菌圈直径也在此浓度下最大,达到22.35 mm。综合考虑,选用EMS诱变剂浓度为0.2 mol/L。

2.5 初筛结果

优良诱变菌株:通过单一诱变多次复筛,共筛得158株抑菌圈直径增长≥15%的正突变株,作为第一轮复合诱变的出发菌。

最佳诱变条件:通过单一诱变发现,⁶⁰Coγ射线诱变、硫酸二乙酯诱变的正突变率较低,且抑菌活性提高较小,诱变效果不佳;而低能N⁺离子束注入、EMS诱变条件下,菌株正突变率高达71.5%(EMS诱变条件下仅为61.2%:正突变率在N⁺注入10 s时达到最大值71.5%),最大抑菌圈直径22.35 mm比原始菌株的抑菌圈(18.37 mm)提高了21.67%,故选择EMS诱变剂0.2 mol/L、低能N⁺离子束注入10 s,作为第一轮复合诱变条件。

2.6 复合诱变

2.6.1 第一轮复合诱变结果 以初筛所得158株菌为出发菌株,采取两种方式进行第一轮复合诱变:①先进行低能N⁺离子束注入10 s,从中挑取抑菌圈较大的菌株再进行EMS诱变;②先进行EMS诱变再进行低能N⁺离子束注入诱变。获得5株抑菌活性较原始菌株有较大提高的菌株,抑菌圈直径和菌株命名见表1。

比较抑菌圈直径,发现突变株D92的抑菌活性最大,为22.51 mm,较原始菌株 *fmb10* 的抑菌圈直径(18.37 mm)提高了22.54%。

另发现,低能N⁺离子束注入10 s和EMS诱变先后顺序对诱变结果没有太大影响。

表1 第一轮复合诱变筛选结果[†]

Table 1 The consequence of the first composite mutation mm

突变菌株	原始菌 <i>fmb10</i>	C21	C84	C167	D92	D113
抑菌圈直径	18.37±0.15 ^a	22.15±0.19 ^b	22.43±0.19 ^b	22.32±0.20 ^b	22.51±0.15 ^b	22.20±0.15 ^b

† 同行不同字母表示在0.05水平差异显著。

2.6.2 第二轮复合诱变结果 经第二轮复合诱变,获得1株抑菌圈直径为22.60 mm的菌株,较原始菌株抑菌圈直径(18.37 mm)提高了23%,并命名为 *fmb10-Z*。同时也发现,经第二轮复合诱变,大部分诱变株抑菌活性提高幅度较小,有的甚至出现负突变,故第二轮复合诱变意义不大。

2.6.3 复合诱变后菌株相对效价 将抑菌圈直径代入回归方程 $y = 10.779x - 13.568$,得到突变株 *fmb10-Z* 的细菌素相对效价,为2 264.64 IU/mL,与原始菌株 *fmb10* 细菌素相对效价(918.33 IU/mL)相比,提高了1.5倍。

2.7 遗传稳定性试验

突变株 *fmb10-Z* 的遗传稳定性考察结果见表2。由表2可知,其抑菌活性在传代试验中表现稳定,可以作为进一步研究的试验菌。

表2 突变株 *fmb10-Z* 遗传稳定性

Table 2 Genetic stability of target mutant strain *fmb10-Z* after 10 passages IU/mL

菌株	遗传稳定性				
	F2	F4	F6	F8	F10
原始菌株 <i>fmb10</i>	918.33	919.72	921.43	920.18	920.35
突变株 <i>fmb10-Z</i>	2 264.64	2 263.67	2 264.25	2 264.73	2 265.01

2.8 复合诱变后菌株抑菌范围测定

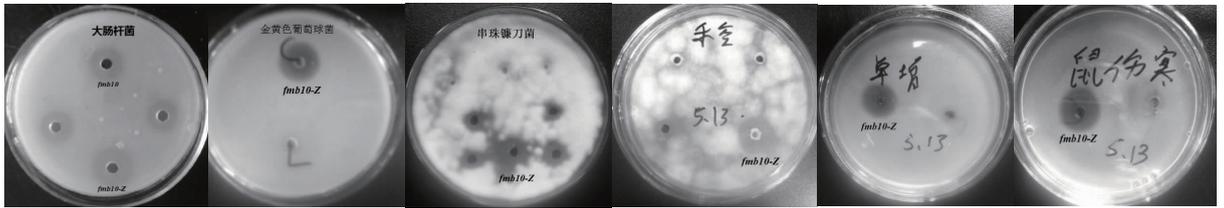
对复合诱变菌株 *fmb10-Z* 抑菌范围进行测定,发现菌株 *fmb10-Z* 对大部分G-和G+菌、串珠镰刀菌、禾谷镰孢菌等部分霉菌及单增李斯特菌、鼠伤寒和猪霍乱沙门氏菌等多种病原菌的抑制作用都有不同程度的提高(见表3)。

表3 复合诱变菌株 *fmb10-Z* 抑菌范围[†]

Table 3 Antimicrobial range of target mutant strain *fmb10-Z* mm

菌株	抑菌圈直径					
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	串珠镰刀菌	禾谷镰孢菌	单增李斯特菌	鼠伤寒沙门氏菌
原始菌株 <i>fmb10</i>	18.37±0.15 ^a	19.58±0.10 ^a	18.63±0.15 ^a	25.67±0.19 ^a	20.18±0.15 ^a	25.67±0.16 ^a
突变株 <i>fmb10-Z</i>	22.35±0.15 ^c	23.43±0.11 ^c	25.98±0.18 ^c	26.78±0.15 ^c	25.98±0.17 ^c	29.63±0.12 ^c

† 同行不同字母表示在0.05水平差异显著。

图 7 复合诱变菌株 *fmb10-Z* 的部分抑菌图Figure 7 Parts of antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum fmb10-Z*

3 结论

(1) 对原始菌株 *fmb10* 依次通过 10 keV N^+ 离子束注入 10 s、0.2 mol/L EMS 诱变剂单一诱变及两轮复合诱变筛选, 最终得到了一株细菌素相对效价比原始菌株提高了 1.5 倍的突变株 *fmb10-Z*, 经遗传稳定性试验证明其遗传性状稳定, 利用 N^+ 离子束注入和 EMS 诱变剂复合诱变, 对植物乳杆菌 *fmb10* 进行改造是一种可行有效的手段。

(2) 植物乳杆菌 *fmb10-Z* 所产细菌素不仅对大部分革兰氏阳性和阴性菌、部分霉菌和大多数致病菌有较强的抑制作用, 同时作为食品添加剂具有安全、可靠等优点, 在食品工业应用中有良好的发展前景。

(3) 工业诱变育种的方法灵活多样, 由于条件和精力有限, 本研究前期只探讨了部分物理诱变和化学诱变因子, 今后将继续对该菌的诱变改良研究, 同时渗入生物诱变, 以期细菌素的工业化生产提供试验依据。

参考文献

- [1] 樊亭亭. 我国抗生素滥用规制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012: 13.
- [2] 丁成为. 乳酸片球菌抑菌谱及应用性研究[D]. 天津: 天津大学, 2007: 16.
- [3] 曾锋, 张立彦, 曾庆孝. 微生物对食品防腐剂的抗药性研究进展[J]. 食品与机械, 2005, 21(2): 51-53.
- [4] 徐洪涛. 类植物乳杆菌所产活性物质 LPX-600 的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2006: 1.
- [5] 滕志利, 钱方, 姜淑娟, 等. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选及分类鉴定[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 45-48.
- [6] 党丽娟, 高钰淇, 别小妹, 等. Co^{60} γ 射线复合硫酸二乙酯诱变选育高产新型细菌素 *Plantaricin163-1* 菌株的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(15): 174-179.
- [7] Nes I F, Diep D B, Holo H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(4): 1 189-1 198.
- [8] 武运, 李远, 王冰峰, 等. 新疆骆驼乳中细菌素乳酸菌的筛选及其抑菌性[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 25-28, 62.
- [9] 郑雯, 孙琳, 宋谈. 一株植物乳杆菌所产细菌素的性质及诱变筛选[J]. 食品科技, 2014, 39(10): 12-16.
- [10] 陈芸芸, 陆兆新, 卢静, 等. 植物乳杆菌 *fmb10* 产细菌素发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2014, 36(17): 140-145.
- [11] 高钰淇, 党丽娟, 别小妹, 等. 不同诱变方法选育嗜酸乳杆菌 NX2-6 类细菌素高产菌株[J]. 食品工业科技, 2014, 35(9): 184-187, 193.
- [12] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 17-18.
- [13] Li Shi-chang, Wu Min, Yao Jian-ming, et al. Mutation-screening in xylanase-producing strains by ion implantation[J]. Plasma Science & Technology, 2005(1): 2 697-2 700.
- [14] 李荣杰. 微生物诱变育种方法研究进展[J]. 河北农业科学 2009, 13(10): 73-76, 78.
- [15] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 50-53.
- [16] 张红丹, 杜茜, 张正坤, 等. 放线菌 769 抑菌谱及液体培养生长曲线的测定[J]. 中国植保导刊, 2010, 3(7): 5-9.
- [17] 芦焯, 梁金钟, 施铜铃. 多抗性保加利亚乳杆菌的诱变和筛选[J]. 乳业科学与技术, 2010, 47(1): 6-10.
- [18] Liu Gui-jun, Meng You-ting, Yang Su-ling, et al. Study on γ -ray irradiation mutation of bacillus subtilis NCD-2[J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(11): 1 633-1 636, 1 743.
- [19] 赵君峰. 淀粉液化芽孢杆菌 ES-2-4 基因组改组提高脂肽产量及其突变菌株差异蛋白组学分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 60-61.
- [20] 高飞. 抗菌肽快速筛选方法与抗菌活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011: 10-13.
- [21] 梁金钟, 李雯, 王凤青. 产氨基丁酸乳酸菌的筛选及诱变育种[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 228-232.
- [22] 王小娜. 产细菌素植物乳杆菌的初探及其应用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2011: 28-29.
- [23] 李市场, 葛春梅, 古绍斌, 等. 低能离子修饰技术在 *L*-乳酸菌诱变中的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4 397-4 399.
- [24] 陈洪卫, 陈林海, 张国只. 低能氮离子注入诱变选育乳链菌肽产生菌的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 177-180.
- [25] 曾莹, 向新柱. 复合诱变原生质体选育高活性木聚糖酶产生菌[J]. 酿酒科技, 2009(9): 58-60.
- [26] 姜丽艳, 闫国栋, 张宏宇, 等. 乳链菌肽高产菌株的推理选育[J]. 食品与机械, 2009, 25(4): 38-40.