

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.01.010

高产淀粉酶细菌的分离鉴定及产酶条件优化

Isolation and identification of amylase bacterial and optimization of enzyme production conditions by response surface

刘延波^{1,2,3}张世凯^{1,2,3}赵志军^{1,2,3}LIU Yan-bo^{1,2,3}ZHANG Shi-kai^{1,2,3}ZHAO Zhi-jun^{1,2,3}王 贤⁴潘春梅^{1,2,3}孙西玉^{1,2,5}WANG Xian⁴PAN Chun-mei^{1,2,3}SUN Xi-yu^{1,2,5}

(1. 河南牧业经济学院食品与生物工程学院〔酒业学院〕,河南 郑州 450046; 2. 河南牧业经济学院河南省白酒风格工程技术研究中心,河南 郑州 450046; 3. 河南牧业经济学院郑州市白酒酿造微生物技术重点实验室,河南 郑州 450046; 4. 赊店老酒股份有限公司,河南 社旗 473300;

5. 河南张弓老酒酒业有限公司,河南 宁陵 476733)

(1. College of Food and Biological Engineering〔Liquor Industry College〕, Henan University of Animal

Husbandry and Economy, Zhengzhou, Henan 450046, China; 2. Henan Liquor Style Engineering Technology Research Center, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou,

Henan 450046, China; 3. Zhengzhou Key Laboratory of Liquor Brewing Microbial Technology, Henan

University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou, Henan 450046, China; 4. Shedianlaojiu Co., Ltd., Sheqi, Henan 473300, China; 5. Henan Zhanggonglaojiu Wine Co., Ltd., Ningling, Henan 476733, China)

摘要:从赊店老酒大曲中分离筛选产淀粉酶的细菌,通过碘熏蒸产生透明圈法进行初筛,淀粉酶活力测定进行复筛,结合菌落形态观察和16S rDNA同源序列分析以及生理生化对筛选获得的高产淀粉酶细菌进行鉴定,研究影响细菌产淀粉酶能力的单因素:碳源、发酵时间、初始pH、接种量,采用响应面优化确定最佳产酶条件。结果表明,6-10菌株为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),通过响应面优化确定产酶工艺条件最佳为:发酵时间4 d,初始pH 5,接种量10%。优化后产酶能力达到(164.37±3.25) U/mL,是优化前产酶能力的4.43倍,具有较强的产淀粉酶能力。

关键词:高产淀粉酶;贝莱斯芽孢杆菌;分离鉴定;发酵条件优化

Abstract: The amylase-producing bacteria were isolated and screened from the old liquor of Dadian, and the retort was used to perform the preliminary screening by the iodine fumigation method. The amylase activity was measured by rescreening, combined with colony morphology observation, 16S rDNA homologous sequence analysis, and physiological and biochemical screening. The high-yield amylase bacteria were identified to study the single factors affecting the ability of the bacteria to produce amylase, including carbon sources, fermentation time, initial pH and inoculum size, and the optimal enzyme production conditions were determined by response surface optimization. The results showed that strains 6-10 were *Bacillus velezensis*. The optimal conditions for enzyme production were determined by response surface optimization i.e. fermentation for 4 d, initial pH value at 5, and inoculum size at 10%. After optimization, the enzyme production capacity reached (164.37±3.25) U/mL, which increased by 4.43 times.

Keywords: high-yield amylase; *Bacillus velezensis*; isolation and identification; fermentation condition optimization

基金项目:河南省重大科技专项(编号:181100211400);河南省高等学校重点科研项目(编号:17A180005);河南牧业经济学院博士科研启动基金项目(编号:906/53000158);河南牧业经济学院青年科研创新基金项目(编号: XKYCXJJ2017015);河南牧业经济学院重点学科项目(编号:503/14020807)

作者简介:刘延波,男,河南牧业经济学院讲师,博士。

通信作者:潘春梅(1976—),女,河南牧业经济学院教授,博士。
E-mail: siges18888@163.com

孙西玉(1965—),男,河南牧业经济学院教授,学士。
E-mail: 1142594146@qq.com

收稿日期:2019-02-15

中国白酒是世界六大蒸馏酒之一,具有悠久的历史,

其独特的酿造工艺和特殊香味成分,在世界酒类产品中别有风味^[1]。中国酒曲源远流长,有学者^[2]认为,制曲酿酒可与中国古代四大发明相媲美。酿酒微生物和酶的载体是大曲^[3],大曲内部微生物种类错综复杂,主要包括三大类即霉菌、细菌和酵母菌^[4],淀粉酶(主要可以分为 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和糖化型淀粉酶 3 种)、蛋白酶、纤维素酶和酯化酶等都是大曲中与酿酒有关的酶系^[5],另外酶可以将大分子营养物质分解成可以被微生物所利用的小分子物质,如氨基酸脱氢酶将氨基酸转化为氨,然后 3-羟基丁酮和氨通过缩合作用合成四甲基吡嗪^[6],直接参与独特的风味物质形成;由此可见酿酒的出酒率和成品酒的质量与大曲酶系密不可分^[4]。

在白葡萄酒酿造过程中,提高产淀粉酶菌株的作用可以提高淀粉原料的利用率和出酒率^[7]。淀粉酶降解原料所产生的小分子糖类物质不仅是酿酒过程中各种微生物生长繁殖所需的碳源,而且小分子物质之间也会发生复杂的反应从而生成多种风味成分^[8]。近年来,与白酒大曲微生物相关的研究逐渐增多,主要是对白酒大曲中微生物的品种、数目及其与白酒大曲理化性质关系的研究^[9],以及对白酒大曲中优良菌株的选育等方面^[10-11]。有关中原地区浓香型白酒大曲中高产淀粉酶菌株的研究未见报道。试验拟以中高温白酒大曲作为研究样品,对成熟曲中高产淀粉酶的细菌进行分离鉴定并优化产酶条件,为后续提高大曲液化力、糖化力提供菌种,以便有效控制制曲工艺与酒曲质量,以期对提升白酒品质和产量提供参照。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品

中高温白酒大曲:除店老酒股份有限公司。

1.1.2 培养基

选择培养基:10 g 蛋白胨,5 g NaCl,5 g 牛肉膏,2 g 可溶性淀粉,20 g 琼脂,加水至 1 L,121 °C 灭菌 20 min^[12];

种子培养基:10 g 蛋白胨,5 g NaCl,3 g 牛肉膏,2 g 可溶性淀粉,加水至 1 L;

产酶发酵培养基:可溶性淀粉 20 g,蛋白胨 20 g,磷酸氢二钠 5 g,硫酸镁 0.1 g,氯化钠 0.1 g,pH 7.0^[13]。

1.1.3 主要试剂、仪器

牛肉膏、蛋白胨:北京澳博星生物技术有限公司;

可溶性淀粉:天津市盛奥化学试剂有限公司;

琼脂粉:天津市科密欧化学试剂有限公司;

磷酸氢二钠、氯化钠、硫酸镁:分析纯,西陇化工股份有限公司;

柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒:天根生化科技有限公司;

振荡培养箱:ZQLY-300S 型,上海知楚仪器有限公司;
恒温培养箱:DHP-9272 型,上海一恒科学仪器有限公司;

高压灭菌锅:LDZM-60KCS 型,上海申安医疗器械厂;
分光光度计:722S 型,上海菁华科技仪器有限公司;

恒温水浴锅:HHS-21-6 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

超净工作台:SW-CJ-2F 型,苏州净化设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 产淀粉酶菌株的筛选

(1) 初筛:无菌环境中,采用分区方法称取曲皮、曲心共 5 g,研磨后加入 45 mL 无菌水振荡 30 min,用梯度稀释法逐级稀释后,依次得到不同梯度的稀释液($10^{-2} \sim 10^{-6}$)。取 10^{-5} , 10^{-6} 各 100 μ L 稀释菌悬液涂布在淀粉培养基上,并置于 37 °C 恒温培养箱倒置培养 2 d^[14]。对培养皿中生长出的单菌落进行碘熏,菌落周围如果有白色透明圈出现,说明该菌株能生产淀粉酶^[12]。

(2) 复筛:选取透明圈较明显的菌株,用液体种子培养基培养 1 d,然后以 10% 的接种量(250 mL 三角瓶装液量 90 mL)接种于液体发酵培养基中,150 r/min,37 °C 摇瓶培养 24 h,5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,采用 Yoo 改良法^[15]进行淀粉酶活力测定。结合透明圈直径/菌落直径(D/d 值)与酶活力大小确定高产淀粉酶菌株。

1.2.2 菌株形态观察、分子鉴定及生理生化试验

(1) 形态鉴定:将活化后的高产淀粉酶的菌株,用点接法接种到淀粉平板培养基上,37 °C 培养 24 h,观察其形态特征并进行革兰氏染色,在显微镜下观察其菌体形态。

(2) 分子生物学鉴定:利用柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,提取复筛得到的高产菌株的基因组 DNA,并以获得的 DNA 为模板,用细菌 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATAGAGTTTGATC-3')/1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')为上/下游引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应程序:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 90 s,35 个循环,72 °C 修复延伸 10 min,4 °C 下保存。PCR 扩增反应体系(50 μ L):Mix 25 μ L,DNA 样品 1 μ L,上游引物 2 μ L,下游引物 2 μ L,蒸馏水 20 μ L。

应用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果,然后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。序列结果采用 NCBI 在线工具 Blast 在 GeneBank 内与标准菌株比对,找出与克隆子序列同源性最高的序列,根据其同源性构建系统发育树并明确其分类地位。DNAMAN 软件对齐序列^[16],Mega 6.0 软件的邻位法构建系统发育树^[17]。

(3) 生理生化试验:结合生理生化试验结果参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[19]对高产淀粉酶菌株进行鉴定。

1.2.3 6-10 菌株产酶条件的优化

(1) 碳源对淀粉酶菌株产酶能力的影响:在液体产酶发酵培养基中分别加入 2% 不同碳源(蔗糖、葡萄糖、玉米粉、麸皮、可溶性淀粉)替换产酶发酵培养基中碳源成分,进行碳源优化试验^[20]。

(2) 发酵时间对淀粉酶菌株产酶能力的影响:取无菌液体发酵培养基,初始 pH 为 7,以 10% 的菌液接种量接种于三角瓶中进行 37 °C,150 r/min 摇床震荡培养,分别在培养 2,3,4,5,6 d 后取出,进行酶活力测定^[20-21],确定最优发酵时间。

(3) 初始 pH 对淀粉酶菌株产酶能力的影响:取无菌液体发酵培养基(初始 pH 分别为 3,4,5,6,7),以 10% 的菌液接种量接种于三角瓶中进行 37 °C,150 r/min 摇床震荡培养,在培养 2 d 后取出,进行酶活力测定^[22],确定最优初始 pH。

(4) 接种量对淀粉酶菌株产酶能力的影响:取无菌液体发酵培养基,初始 pH 为 7,分别以 4%,6%,8%,10%,12% 的菌液接种量接种于三角瓶中进行 37 °C,150 r/min 摇床震荡培养,在培养 2 d 后取出,进行酶活力测定^[23],确定最优接种量。

(5) 响应面优化试验:在单因素试验的基础上,选取影响因素显著的发酵条件,以酶活力为因变量,利用 Design Expert 8.0.6 软件设计 Box-Behnken 试验^[24-25],确定高产淀粉酶菌株的最佳发酵工艺参数组合并进行实验验证。

2 结果与分析

2.1 菌株初筛

样品经涂布和多次纯化后,进行固体碘熏蒸试验(见图 1)。经初步筛选共有 100 株菌株产生了透明圈,其中 D/d 值 >2.5 的菌株共有 6 株,分别命名为 6-8、6-10、26、29、32、35;其中 D/d 值最大的为 6-10(表 1)。

2.2 淀粉酶活力测定

对 6 株菌株进行摇床发酵,采用 Yoo 改良法测定酶活,结果如表 2 所示。从表 2 可以得出,菌株 6-10 的酶活最大可达 37.13 U/mL,与透明圈的有效值大小相符。李兰等^[12]从白酒大曲中分离出产淀粉酶细菌最高初始酶活

表 1 透明圈与菌落直径

Table 1 The diameter of colony and transparent circle

菌株编号	透明圈平均值/mm	菌落平均直径/mm	D/d 值
6-8	17.33	6.67	2.60
6-10	17.67	5.67	3.12
26	12.33	4.00	3.08
29	13.33	5.33	2.50
32	12.33	4.33	2.85
35	14.33	5.67	2.53

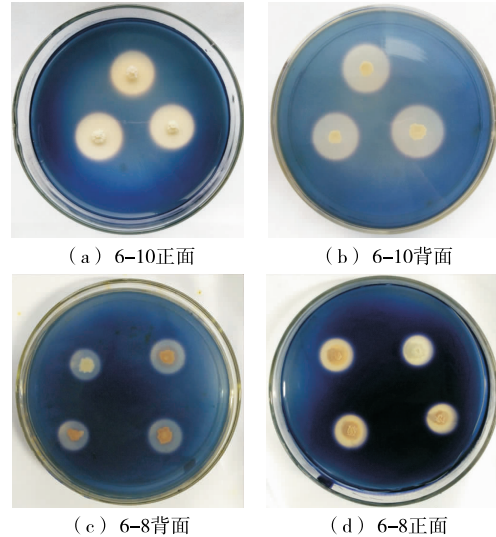


图 1 淀粉酶菌株产生的透明圈

Figure 1 The transparent ring produced by the amylase strain

表 2 粗酶液酶活力测定结果

Table 2 The determination result of enzyme activity in impure enzyme liquid

菌株编号	酶活/(U · mL ⁻¹)	菌株编号	酶活/(U · mL ⁻¹)
6-8	7.68	29	5.72
6-10	37.13	32	12.65
26	30.77	35	6.48

为 33.65 U/mL,唐丽江等^[26]筛选的产酶活性最高的 Pab03、Pab02 枯草芽孢杆菌在未优化前酶活力分别为 31.33、21.52 U/mL,均低于试验未优化前菌株 6-10 的酶活。

2.3 高产淀粉酶细菌的形态与分子学鉴定及生理生化试验

2.3.1 形态鉴定 将菌株 6-10 活化后在淀粉平板培养基上点接观察其菌落形态特征(见图 2)。菌落颜色为乳白色,表面湿润较稠密,粗糙且边缘不规则有皱纹,菌落呈圆形中间凹陷呈火山口状。进行革兰氏染色,用显微镜

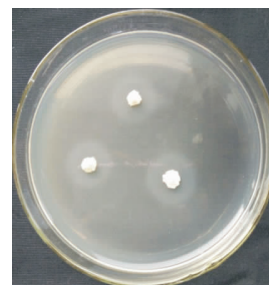


图 2 6-10 菌落形态图

Figure 2 Colony morphology of 6-10

观察其细胞形态(见图 3)。菌体呈红色,为革兰氏阴性菌,细胞形态为短杆状。

2.3.2 分子生物学鉴定 提取 6-10 菌株的 16S rDNA, PCR 扩增电泳检测(见图 4),将扩增的基因序列在 NCBI 数据库中搜索相似序列,构建系统发育树采用 Mega 6.0 软件的邻位法(见图 5)。

由图 4 可知,基因组 DNA 进行 PCR 扩增后,得到 1 500 bp 的目的 DNA 片段。

由图 5 可知,菌株 6-10 与 *Bacillus velezensis* 同源性为 99%,鉴定菌株 6-10 为芽孢杆菌属。

2.3.3 生理生化试验 如表 3 所示,6-10 菌株可水解淀粉、甲基红、明胶,不能产氨、抗酸、反硝酸化。结合生理生化试验结果和 16S rDNA 分子鉴定,可确定 6-10 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。

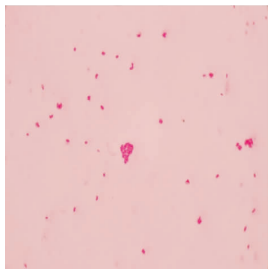


图 3 6-10 革兰氏染色细胞形态

Figure 3 6-10 Gram stained cell morphology (×1 000)

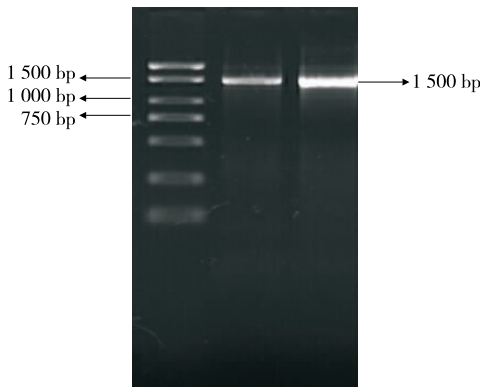


图 4 PCR 扩增电泳检测

Figure 4 PCR amplification electrophoresis

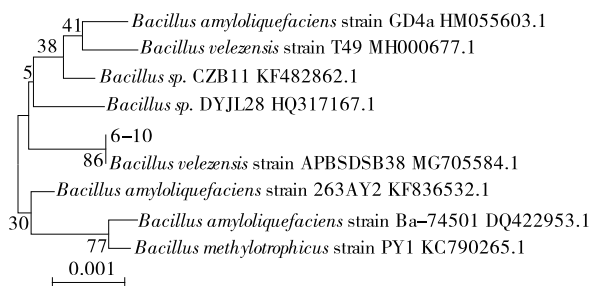


图 5 菌株 6-10 系统发育树

Figure 5 Strain 6-10 phylogenetic tree

表 3 6-10 菌株的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of the strain

试验	结果	试验	结果
淀粉水解	+	明胶液化	+
产氨试验	-	抗酸	-
葡萄糖氧化发酵	+	吡嗪	+
甲基红	+	反硝酸化	-

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)是芽孢杆菌属的一个新种^[27-28],不仅具有较强的产淀粉酶能力,而且可以水解淀粉、血液、明胶等,目前对其产淀粉酶能力尚未见深入研究。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)在农业上还有促使植物生长和抵抗病原微生物作用,在提高粮食产量、质量和生物农药开发应用上潜力无穷^[29]。

2.4 6-10 菌株产酶条件的优化

2.4.1 单因素试验结果 由图 6 可知,6-10 菌株的最适碳源为可溶性淀粉,最适发酵时间为 4 d,最适初始 pH 为 4,最适接种量为 10%。

2.4.2 Box-Behnken 设计与结果 在单因素试验的基础上,选取发酵时间、初始 pH、接种量 3 个具有显著影响的因素作为自变量,根据 Box-Behnken 试验设计原理,设计了 17 个试验点的响应面分析试验。试验因素水平见表 4,试验设计与结果见表 5。

采用 Design Expert 8.0.5 软件对表 5 数据进行回归拟合,得到酶活对自变量发酵时间、初始 pH、接种量的多元回归方程为:

$$Y = 164.46 + 8.28A + 3.22B - 0.97C + 19.91AB - 5.49AC + 4.8BC - 22.41A^2 - 22.62B^2 - 3.65C^2 \quad (1)$$

由表 6 可知,回归模型 F 值为 22.4,且显著性检验为极显著(P=0.000 2),失拟项不显著(P=0.112 4>0.05),说明该模型真实。回归方程决定系数 R²=0.966 4,表明响应值+酶活真实值与预测值之间具有较好的拟合度和可靠度,该方案是可行的。

2.4.3 酶活的响应曲面分析 图 7 为发酵时间、初始 pH、接种量 3 个因素两两之间交互作用对淀粉酶菌株酶活的影响。

由图 7 可知,发酵时间和初始 pH 两两之间存在显著

表 4 Box-Behnken 试验因素水平设计表

Table 4 Box-Behnken horizontal design table of experimental factors

编码	A 发酵时间/d	B 初始 pH	C 接种量/%
-1	3	4	8
0	4	5	10
1	5	6	12

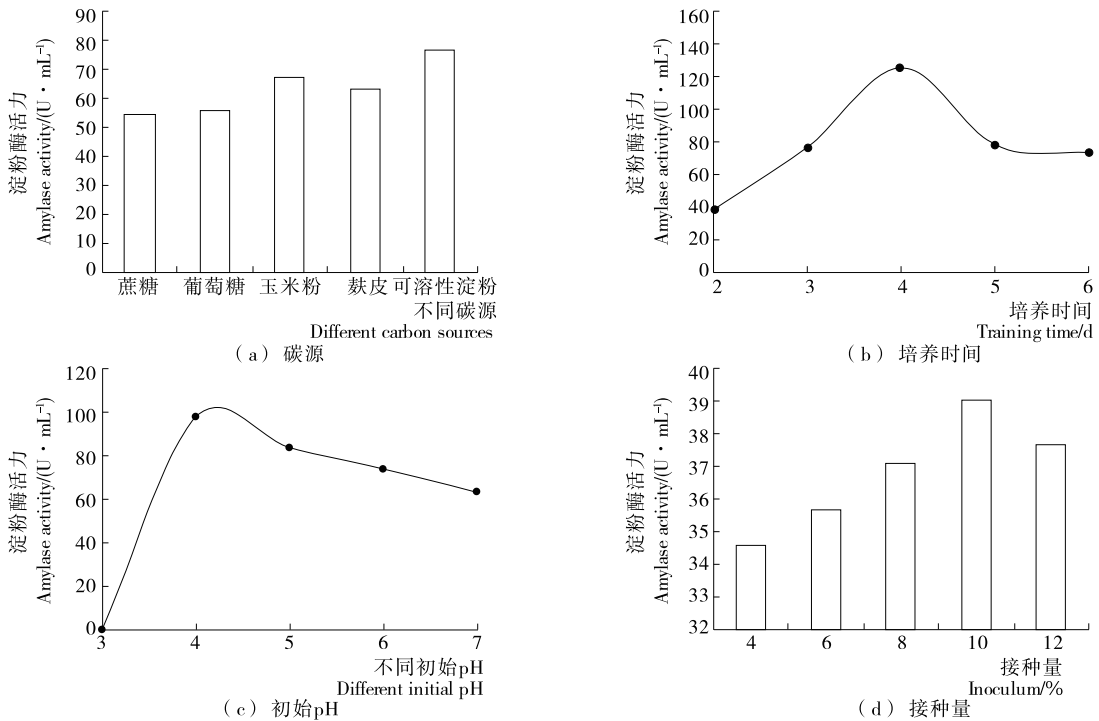


图 6 6-10 菌株产酶条件优化单因素试验结果

Figure 6 Single factor test results of optimized enzyme production conditions of strain 6-10

表 5 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 5 Design and results of Box-Behnken experiments

试验号	A	B	C	酶活/(U · mL ⁻¹)
1	0	0	0	164.85
2	0	-1	1	133.85
3	0	0	0	167.11
4	1	0	1	141.36
5	1	0	-1	154.32
6	0	0	0	160.55
7	0	1	1	140.61
8	-1	0	-1	124.46
9	-1	0	1	133.46
10	-1	-1	0	124.35
11	1	1	0	154.32
12	0	0	0	168.54
13	0	-1	-1	145.36
14	-1	1	0	100.27
15	1	-1	0	98.77
16	0	0	0	160.23
17	0	1	-1	132.92

表 6 响应面回归方程的方差分析

Table 6 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均值	F 值	P 值	显著性
模型	7 102.99	9	789.22	22.40	0.000 2	**
A	548.30	1	548.30	15.56	0.005 6	**
B	83.14	1	83.14	2.36	0.168 4	
C	7.57	1	7.57	0.21	0.657 1	
AB	1 585.23	1	1 585.23	45.00	0.000 3	**
AC	120.56	1	120.56	3.42	0.106 8	
BC	92.16	1	92.16	2.62	0.149 8	
A ²	2 113.95	1	2 113.95	60.00	0.000 1	**
B ²	2 154.71	1	2 154.71	61.16	0.000 1	**
C ²	56.07	1	56.07	1.59	0.247 5	
残差	246.61	7	35.23			
失拟项	183.31	3	61.10	3.86	0.112 4	
误差项	63.30	4	15.83			
总和	7 349.60	16				

的交互影响,发酵时间和接种量、初始 pH 和接种量存在交互影响,证明了响应面曲线分析结果的切实性。

2.4.4 发酵最佳条件确定及实验验证 采用 Design Expert 8.0.5 软件优化发酵工艺条件,分析结果为:发酵

时间 4.29 d,pH 5.17,接种量 9.52%。此条件下,模型预测值酶活为 165.98 U/mL。为验证响应面法所得预测值的可靠性,采用上述试验条件进行发酵的工艺验证,考虑到试验中实际操作的方便,将最佳条件修改为发酵时间 4 d,pH 5,接种量 10%。经过实验验证得到的酶活平均值为(164.37±3.25) U/mL,与预测值基本靠近,说明所建模型拟合优良且真实。

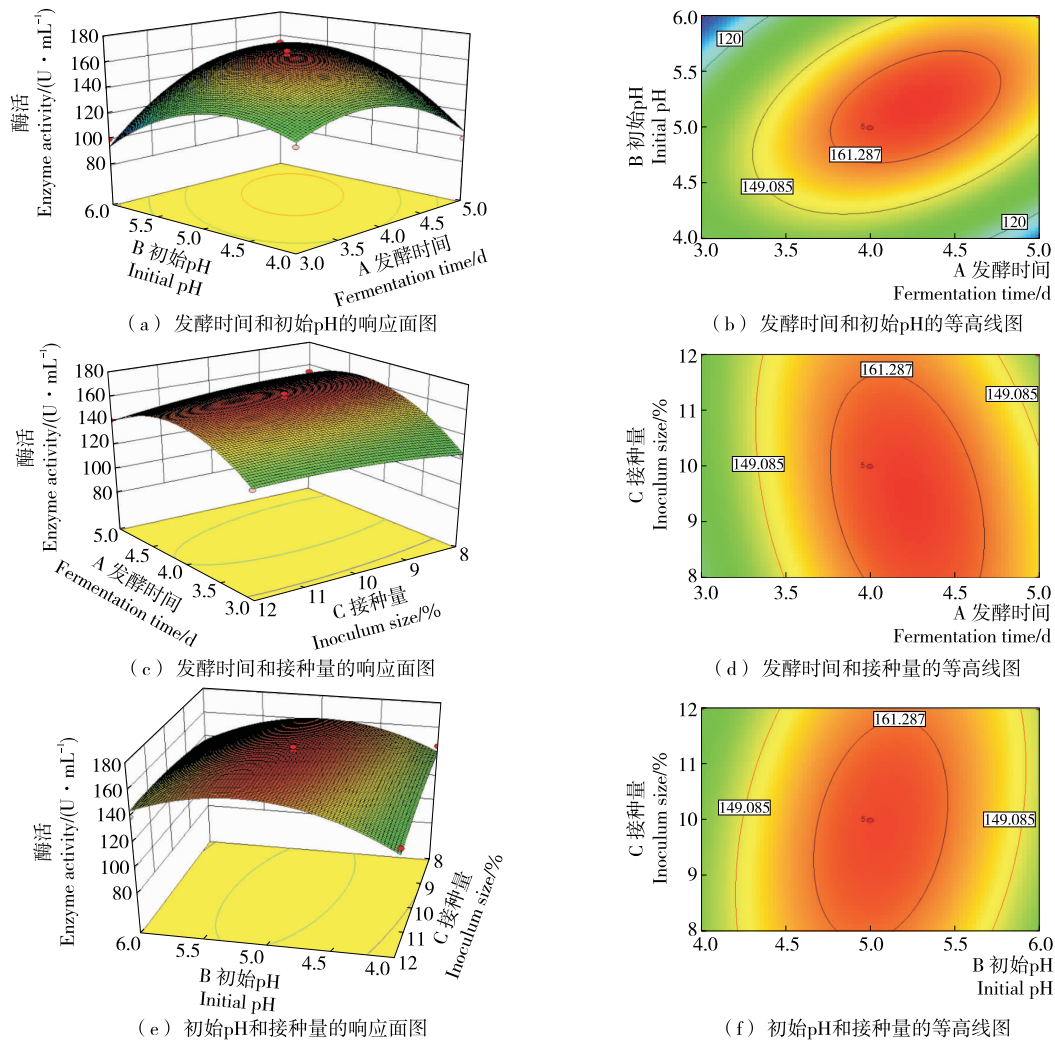


图 7 发酵时间、初始 pH、接种量 3 个因素两两之间交互作用对淀粉酶菌株酶活的影响

Figure 7 Effect of interaction between three factors, namely fermentation time, initial pH and inoculum, on enzyme activity of amylase strain

3 结论

试验从大曲中筛选产淀粉酶细菌,利用透明圈和 Yoo 改良法测定酶活,选出高产菌株 6-10,结合形态观察和 16S rDNA 同源序列分析以及生理生化试验对菌株进行鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),通过单因素与响应面试验得到 6-10 最优发酵工艺条件为:发酵时间 4 d, pH 5, 接种量 10%。优化后产酶能力达到 (164.37 ± 3.25) U/mL 是优化前酶活 37.13 U/mL 的 4.43 倍,具有较强的产淀粉酶能力。

试验仅研究了贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的高产淀粉酶能力,后续将对其他性能进行深入研究,进一步发掘其应用潜力。

参考文献

[1] 孙宝国, 吴继红, 黄明泉, 等. 白酒风味化学研究进展[J].

中国食品学报, 2015, 15(9): 1-8.

[2] 李健容, 蔡爱群. 民间传统酒曲主要微生物的分离及鉴定[J]. 酿酒科技, 2007(5): 111-115.

[3] 范光森, 许岱, 富志磊, 等. 古井贡酒曲中酵母的分离及其产挥发性风味物质分析[J]. 中国食品学报, 2018, 18(7): 220-229.

[4] WANG Hai-feng. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqu by PCR-DGGE[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(2): 134-140.

[5] ZHENG Xiao-wei, TABRIZI M R, NOUT M J R, et al. Daqu: A traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90.

[6] 吴建峰. 白酒中四甲基吡嗪全程代谢机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 10-15.

[7] 申孟林, 张超, 王玉霞, 等. 白酒大曲微生物酶系研究进展[J]. 中国酿造, 2018, 37(4): 7-11.

- [8] 毛祥, 黄丹, 沈才萍, 等. 酱香型大曲中产淀粉酶菌的分离鉴定及发酵特性研究[J]. 中国酿造, 2015, 34(12): 24-27.
- [9] 姚万春, 唐玉明, 张正英, 等. 泸型陈曲贮存期微生物酶类的变化及酿造效果[J]. 酿酒科技, 1996(4): 19-20.
- [10] 唐玉明, 廖建民, 姚万春, 等. 浓香型曲药功能菌选育及利用研究[J]. 酿酒科技, 1998(3): 22-24.
- [11] 廖建民, 唐玉明, 姚万春, 等. 浓香型曲药微生物的分离与筛选研究简报[J]. 酿酒, 2000(1): 36-38.
- [12] 李兰, 杨天佑, 代雪原, 等. 白酒大曲中产淀粉酶细菌的快速分离[J]. 河南科技学院学报, 2009, 37(2): 42-44.
- [13] MOHSEN F N, DILEEP D, DEEPI D, et al. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 41(6): 349-354.
- [14] 林梦丹, 王国增, 叶秀云, 等. 产 α -淀粉酶海洋微生物的筛选及酶学性质研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(2): 77-84.
- [15] 王福荣, 唐景春. 耐高温 α -淀粉酶活力测定法的研究[J]. 食品与发酵工业, 1995(2): 27-31.
- [16] CHEN Jian-qiang, MENG Xiu-ping, ZHANG Yun, et al. Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(12): 2 191-2 198.
- [17] PI Bo-rui, YU Dong-liang, DAI Fang-wei, et al. A genomics based discovery of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Aspergillus ustus* [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0116089.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398.
- [19] 布坎南, 吉本斯. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 9版. 北京: 科学出版社, 1984: 7-15.
- [20] 李刚, 孙俊良, 葛晓虹, 等. 碳源对枯草芽孢杆菌产 α -淀粉酶的影响[J]. 食品与机械, 2010, 26(5): 13-14, 18.
- [21] 张琪, 朱丹, 牛广财, 等. 纳豆芽孢杆菌发酵黑豆豉的前发酵工艺优化[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 179-183.
- [22] 唐鑫, 夏延斌, 吴灿, 植物乳杆菌发酵盐渍辣椒汁培养基及其条件的优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 66-71.
- [23] 潘婉舒, 彭杨, 杜大钊, 等. 醋酸菌麸曲制备工艺的优化[J]. 食品与机械, 2018, 34(10): 206-211.
- [24] 盛亚男, 王长远, 张舒, 等. 绿豆多酚提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 193-196.
- [25] 田艳, 段晓嫣, 邓放明. 纤维素酶协同超声波辅助乙醇提取红肉火龙果色素工艺的优化[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 173-180.
- [26] 唐丽江, 王振华, 王迪. 高产淀粉酶芽孢杆菌菌株的筛选[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5 362-5 363, 5 371.
- [27] 蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 等. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展[J]. 北方园艺, 2018(12): 162-167.
- [28] DUNLAP C A, KIM S J, KWON S W, et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3): 1 212-1 217.
- [29] GAO Zhen-feng, ZHANG Bao-jun, LIU Hui-ping, et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* [J]. Biological Control, 2017, 105: 27-39.
- [8] 翟柱成, 吴克刚, 柴向华, 等. 天然抗氧化剂对葵花籽油抗氧化作用的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 148-150.
- [9] 张红雨, 陈德展. 酚类抗氧化剂清除自由基活性的理论表征与应用[J]. 生物物理学报, 2000(1): 1-9.
- [10] 苏怡, 周鲁, 左之利, 等. 应用量子化学方法研究茶多酚类抗氧化剂的构效关系[J]. 天然产物研究与开发, 2001(6): 19-21.
- [11] 周旭. 脂溶性天然抗氧化剂在葡萄籽油和核桃油中的应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016: 52-62.
- [12] MALHEIRO R, RODRIGUES N, MANZKE G, et al. The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 44: 37-43.
- [13] NOR F M, MOHAMED S, IDRIS N A, et al. Antioxidative properties of *Curcuma longa* leaf extract in accelerated oxidation and deep frying studies[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2009, 86(2): 141-147.

(上接第 64 页)

- [2] KAROU I J, DHIFI W, JEMIA M B, et al. Thermal stability of corn oil flavoured with *Thymus capitatus* under heating and deep-frying conditions[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(5): 927-933.
- [3] MALHEIRO R, RODRIGUES N, MANZKE G, et al. The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 44: 37-43.
- [4] 朱启思, 钟国才, 王亚军, 等. 复合天然抗氧化剂延长储备花生油储存期的效果研究[J]. 粮食储藏, 2014, 43(1): 33-36.
- [5] 梁永铭, 周波, 王进英, 等. 采用 Rancimat 法评价茶油多酚对茶油稳定性的影响[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 54-58.
- [6] 廖义秀, 钟海雁. 茶油贮藏的稳定性及高效液相色谱分析[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 173-176.
- [7] 戚聿妍. 亚临界水提取芝麻粕中酚类化合物及水解芝麻蛋白的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016: 36-42.