

文章编号:1673-1689(2007)04-0121-06

细菌芽孢形成机制在生态制剂生产中的应用

徐世荣, 陈骧, 吴云鹏

(重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要: 益生菌的生存能力和稳定性是生产者和技术和市场方面面临的两大挑战。由于芽孢对多种不利环境有极大的抗性而成为近年来益生菌剂中一个研究热点。芽孢的抗性与多种因素有关,并通过芽孢这种独特结构来实现。Spo0A和 σ 是芽孢形成过程中基因表达的关键调节因子。杆菌和梭菌在芽孢形成中的主要差别是梭菌形成感受态细胞和淀粉粒的积累。为了得到最高的菌体浓度和芽孢形成率,需要优化培养条件。其中,遗传性、接种量、培养温度、pH值、无机盐、淀粉、菌体浓度、营养因子的限量添加都与芽孢的形成有重要关系。

关键词: 益生菌;芽孢;芽孢的结构;芽孢形成机制;芽孢形成率;培养条件

中图分类号: Q 939.9

文献标识码: A

Application of the Mechanism of Sporulation in Production of Pharmaceutical Probiotics

XU Shi-rong, CHEN Xiang, WU Yun-peng

(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Pharmaceutical probiotics may be given as either a single or a mixture of living microorganisms used therapeutically to prevent diarrhea, improve lactose tolerance and modulate immunity. They may also have potential to prevent cancer and lower serum cholesterol levels. The viability and stability of probiotics were the a marketing and technological challenge for commercial production. Pharmaceutical probiotics should contain specific probiotic strains and maintain a certain amount of viable cells during the product's shelf life. Many organisms of probiotics have the ability to form spores, bacterial endospores are the most resistant living structures. Their high degree of resistance to many treatments is due to many factors and is governed by the unique spore structure. In the whole process of sporulation, Spo0A and σ factors are key regulators to the pattern of gene expression. Major differences between bacilli and clostridia are existed in the fact of formation of clostridial stage cells and granulose accumulation in clostridia. To get the highest cell concentration and spore forming rate, the culture conditions, such as inoculum size, temperature, pH value, inorganic salt, amyllum, cell concentration, nutrient limitation were must optimized.

Key words: probiotics; spore; structure of endospore; mechanism of sporulation; spore forming rate; culturing condition

收稿日期:2006-03-06.

作者简介:徐世荣(1947-),男,重庆市人,高级工程师;主要从事生物医学工程方面的研究。Email: xushirong05@tom.com

能产生芽孢的细菌主要是属于 G^+ 细菌的好气性的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和厌氧性的梭菌属 (*Clostridium*)。芽孢 (endospore, spore) 是产芽孢菌在生长发育后期在细胞内形成的圆形或椭圆形、厚壁含水量低、抗逆性强的休眠构造。芽孢没有新陈代谢,能经受多种环境伤害,包括热、紫外线、多种溶剂、酸、碱、酚类、醛、酶和烷基化试剂的处理^[1]。作为微生态制剂中的微生物,在制剂过程中要经过干燥、制粒、甚至是压片等处理过程;口服制剂还需耐胃酸、胆盐;在贮存期内需保持其活性;甚至一些益生菌剂的疗效只归结为芽孢或它们在肠道外的营养生长^[2]。因此,通过干燥、制剂、与其它成分包括抗生素配伍用药和经过胃环境后保持活性及在贮藏期内有较高的稳定性,是益生菌剂有效性的一个重要指标。由于芽孢菌的芽孢对上述不良物理、化学刺激具有极强的抗性及其他益生菌不具备的生物功能,已成为益生菌剂中的研究热点。

1 芽孢的结构

芽孢的基本结构存在于所有的芽孢形成菌的芽孢中。芽孢的抗性应归于很多因素,并通过独特的芽孢结构来控制。芽孢的结构较为复杂,它由芽孢囊和芽孢两大部分组成。芽孢又由胞外壁,芽孢衣,皮层和核心组成。核心包括芽孢壁、芽孢质、核心区三个部分。

芽孢衣是由多达 25 种常有高度横向联系的多肽组成^[3]。芽孢衣的蛋白质产生于母细胞内,并沉积在发展的前芽孢表面。芽孢衣蛋白皮层的包裹确保芽孢免受溶菌酶等大分子的攻击。一株完全丧失芽孢衣层的枯草芽孢杆菌对溶菌酶高度敏感,但是对热显示普通的抵抗力^[4]。也有资料显示芽孢衣能保护芽孢抵抗小分子化学试剂的致死作用,包括戊二醛、碘和一些氧化剂。这种作用的机制还不清楚,可能芽孢衣是一些化学物质的渗透屏障,或有毒化学物质只与芽孢衣起作用,这就降低了对在芽孢核心的酶或 DNA 等更中心的芽孢物质的损伤。尤其是它能防止肽聚糖溶解酶进入芽孢皮层。但对于一些有毒化学物质(如烷基化试剂),芽孢衣在其抗性方面不起什么作用^[5]。

芽孢衣内侧一层是由几乎达到总芽孢干重的 10% 厚厚的肽聚糖构成皮层。近来对枯草芽孢杆菌的芽孢肽聚糖生物合成的研究表明,交联有明显的梯度。然而这种梯度不是核心脱水所必需的。这表明芽孢肽聚糖的低交联度是起一种平衡作用,皮层的可降解性是芽孢生长和芽孢核心脱水效果

所必需的^[6]。皮层对维持芽孢的抗性和休眠状态很重要。

芽孢核心含有如 DNA 等细胞代谢的必需成分。芽孢核心高度矿化,主要包含 Ca^{2+} , Mn^{2+} 和 Mg^{2+} , 它们与芽孢特殊成分吡啶二羧酸结合以螯合物的形式存在。在休眠芽孢中核心被脱水使得它的内含物具有热抵抗能力。核心的矿质化与降低核心水分含量有关,从而增加了芽孢的热抗性。吡啶二羧酸(DPA)能和芽孢的很多二价阳离子螯合,它在芽孢的抗性方面的作用还不太清楚。在枯草芽孢杆菌的 *spoVFA* 或 *spoVFB* 基因发生突变的菌株缺乏 DPA,它们编码 DPA 合成酶的两个亚单元^[7],较大地增加了芽孢核心的水分并降低其对热和 H_2O_2 的抗性,可是 DPA 含量减少的芽孢对紫外线的抗性没有降低甚至比其野生亲本更具抗性。在核心内含量很少的 α/β 型小的酸溶性芽孢蛋白 (SASPs) 在芽孢核心浓缩,这与芽孢 DNA 抗性有关且主要与紫外线抵抗力有关^[8]。这些蛋白质也保护 DNA 由热引起的损伤。没有 α/β 型小的酸溶性芽孢蛋白 (SASPs) 的芽孢比野生型芽孢的热抗性弱^[9]。芽孢核心的低渗透性也在芽孢对有毒化学物质的抗性方面起重要作用。用于杀灭芽孢的有毒化学物质绝大多数是水溶性的并在水中进行反应,这有理由猜测芽孢核心的水分含量较低能降低有毒化学物质同在芽孢核心的靶标的反应。

2 芽孢形成的分子机制

杆菌和梭菌中芽孢的形成在形态、生理学和分子生物学细胞事件方面显示出显著的相似性。主要差别是梭菌感受态细胞的形成和淀粉粒的积累^[10]。活跃生长的枯草芽孢杆菌细胞通过碳源、氮源和在某些情况下的磷源限量添加,起始信号导致控制转录的调节子 *Spo0A* 通过磷酸化而活化,随后在 RNA 聚合酶 σ 因子的一系列作用下形成芽孢^[11]。在 37 °C 芽孢的形成大概需要 7 h。激活的 *Spo0A* 引起非对称的芽孢形成分裂和 *spoIIA*, *spoIIE* 和 *spoIIG* 位点的转录,它们编码关键的芽孢形成调节剂。芽孢化分裂产生两个命运迥然不同的细胞,较小的前芽孢发展为芽孢,母细胞是芽孢形成所必需的但最后溶解(细胞程序性死亡)。通过前芽孢中芽孢形成专一的 RNA 聚合酶 σ 因子、 σ^F 和母细胞中 σ^E 指导,大概分裂后 1 h,前芽孢被母细胞吞噬。在基因调节下通过各部分信号把全局性的变化与各部分的形态变化偶联起来,最后导致表征成熟芽孢的抗性的产生。

Spo0A 磷酸化是芽孢形成所必需的正向调节剂,它激活几种芽孢形成专一基因的转录,特别是 spoIIA, spoIIE 和 spoIIG 基因。有研究成果显示,在早期的母细胞的发育期间,Spo0A 可能就是芽孢形成一种重要的因子^[12]。基因组分析已指出 Spo0A 直接调节 121 个基因的转录,有三分之一被激活,其余的被抑制。其中包括几个转录因子,更进一步甚至达 400 个基因直接受到 Spo0A 的控制^[13]。Spo0A 的不同的角色,大概是由不同的磷酸化水平决定的。其他关键的芽孢形成的正向调节剂是一种 σ 因子, σ^H 与核心 RNA 聚合酶相互作用并指导它起始转录从至少 49 个启动子控制 87 个或更多基因^[14]。 σ^H 和 Spo0A 调控的途径很多地方密切地相互联系、重叠,以至不能完全分辨出来。

对 Rap 蛋白 A、B、E 调节的五肽均来源于 phrA, phrC 和 phrE 基因表达产物的衍生物。值得注意的是,phrA 和 phrE 基因转录受 CodY 抑制^[15]。CodY 似乎与细胞内 GTP 水平的启动相有重要作用,并且作为中间代谢状态的主要指示剂^[15]。CodY 是鸟嘌呤核苷酸水平的感受器^[16]。GTP 和 GDP 的浓度急剧下降是芽孢形成起始的关键。它发生在芽孢形成的起始,并在没有芽孢形成的条件下触发芽孢的形成^[17]。鸟嘌呤核苷酸水平下降解除了 CodY 对 phrA、phrE、kinB 间接的抑制,从而为 Spo0F 编码一种激酶^[15]。因此 CodY 与鸟嘌呤核苷酸水平下降相关并活化磷酸中继酶。

以前认为杆菌和梭状芽孢杆菌之间的芽孢形成的机制相似,但基因组测序显示梭状芽孢杆菌中不存在磷酸中继成分(Spo0A 例外)。杆菌对营养限制的响应并形成芽孢,保证存活到能获得新的底物。梭状芽孢杆菌用形成芽孢的方式来逃避因发酵形成的有机酸产生的恶劣的生存条件,并伴随着外部和内部的 pH 减小,细胞质膜质子梯度消散^[18]。且杆菌只形成一个芽孢,梭状芽孢杆菌则可在母细胞中形成众多的芽孢^[19]。

3 影响芽孢形成的主要因素

3.1 降低 GTP 浓度

反映环境中营养状况的胞内鸟嘌呤磷酸化水平的关键效应蛋白 CodY 也是通过抑制 phrA、phrE 及 KinB 等来影响 Spo0A 磷酸化水平的^[15]。减少 GTP 汇集的一个办法就是用德夸菌素(decyoinine)这种药物。德夸菌素是 GMP 合成的一种抑制剂并阻止 XMP 向 GMP 转变,这是导致 GDP 和 GTP 浓度降低的原因,当被加到快速生长的细胞

中,德夸菌素能导致芽孢高效率地形成,甚至在营养丰富的培养基中^[20]。饥饿与芽孢形成相联系的唯一可能的指示剂也是降低胞内 GTP 的浓度。

3.2 提高菌群密度

近年来的研究表明,许多种类的细菌在高细胞密度条件下也能通过化学信号(自体诱导物,auto-inducer)传递帮助细胞监控细菌群体浓度的变化,这一现象常常被称为“群体感应调节”(quorum sensing QS)。群体感应能让细菌细胞感知细胞密度变化,从而引发其在高细胞密度下异常的、多样的细胞行为模式。芽孢杆菌中感受态与芽孢的形成与其群体密度有关。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)也利用 QS 系统对自身发育进行调控,当菌体密度高时,信号分子浓度相应增高启动了芽孢形成基因的表达^[21]。

3.3 遗传因素

这也是芽孢形成的重要因素。有关芽孢形成的基因发生突变则该菌不形成芽孢。有人已构建了 *Clostridium beijerinckii* 和 *Clostridium acetobutylicum* 的 spo0A 破坏和缺失菌株。两个菌株不能形成梭菌感受态细胞和芽孢^[22]。这方面最显著的是在湿热抗性方面喜温菌的芽孢比中温菌芽孢抗性强,低温微生物的芽孢对湿热的抗性最弱。

4 生产中获得较高芽孢率的措施

微生物工业的核心是实行规模化的微生物发酵。它的发展和创新性,都必须处理好下面的问题:就是优良的菌种,适当的反应器,发酵用培养基的选定以及适合的、良好的检验方法。

4.1 在培养基中限量添加碳源、氮源,有时限量添加磷源

B. subtilis 的芽孢形成是通过营养限量诱导的,碳源、氮源和磷源都能作为相关的限制生长的底物,因此,在生产中有必要选择合适的碳源、氮源和磷源,并注意限量添加,同时加入必要的金属离子尤其是二价阳离子 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 。在形成芽孢的培养基中添加 Mn^{2+} 能使芽孢的得率、稳定性提高、皮层结构改善,并增加其热抵抗能力。 Mn^{2+} 与碳水化合物的代谢有密切关系。 Mn^{2+} 也在皮层生物合成的相关酶活性和(或)基因表达中发挥作用。

4.2 菌种活化及一些必要的处理确保良好的遗传性状

用 80 °C 或更高温度水浴一定时间以有效杀死菌种中的营养体和可能潜在的杂菌及可能存在的

不产生芽孢的变异菌株,将芽孢接种到培养基中活化培养,使之得到有效地提纯和复壮^[23],这对提高菌数和芽孢率均有显著的影响。但目前这在国内微生物制剂的生产中较少采用。大多数是直接将冻干管菌种加入适温培养基中培养,培养前最好洗脱低温保护剂,更换新鲜培养液。菌种用培养基一定要选择合适的营养丰富的培养基,在最佳条件下培养,这样可在一定程度上防止菌种退化。*Clostridium perfringens* 在 pH2 的环境中暴露 30 min 后,其芽孢形成能力增加了。这些表明,在生产前对菌种作一些必要的处理有利于提高芽孢的得率。

4.3 采用分段培养的策略

最佳的工艺条件对菌体量和芽孢的生产是不同的。在菌体生长阶段采用如补料发酵等高密度的培养方法提高菌群密度。采用两阶段策略在第一阶段处于菌体量生产的最佳环境,刺激产生更多的菌体,接着第二阶段在有助于芽孢形成的最佳操作条件下形成芽孢。通过采用这种策略和最佳的实验条件,菌体(*Bacillus coagulans* RK-02)增加了大约 55%,芽孢在每克干菌体中达到 $10^9 \sim 10^{11}$ ^[24]。

4.4 芽孢的萌发

对于益生菌,芽孢在胃肠道中的萌发是它起作用的关键,只有萌发后它才能发挥免疫的调节作用和分泌抗微生物物质^[25]。如采用菌落计数法检测芽孢率则也必须考虑萌发因素。芽孢萌发是一系列通过特殊萌发剂触发的连续的降解事件,会导致其丧失特殊的芽孢特性。将芽孢暴露于亚致死量的 NaOH 溶液中抽提一些芽孢衣蛋白比没有处理的芽孢萌发更快。芽孢自然萌发可能仅是对萌发剂的反应。当营养萌发剂结合到受体复合物并激活芽孢萌发专一的皮层溶解酶。这些萌发剂通常是特定的氨基酸、糖类或嘌呤核苷酸,此外也有引发芽孢萌发的营养混合物,一个是天门冬氨酸、葡萄糖、果糖和 K^+ (AGFK) 混合物引发枯草芽孢杆菌萌发^[26]。除营养物外芽孢也能通过多种非营养因素引发芽孢萌发^[27],包括溶菌酶、 Ca^{2+} - DPA, 阳离子表面活性剂、高压和盐等。

近年来国内对益生芽孢菌也有较多的研究,李野、张小平等对蜡质芽孢杆菌 DLSL-2 的发酵条件和培养基作了一些探索工作^[28]。吴俊罡、张秉胜等对枯草芽孢杆菌发酵培养基的进行了优化实验^[29]。杜冰、刘长海对芽孢乳酸杆菌 D-1 的液体深层发酵培养进行了探讨^[30]。匡群、孙梅、施大林对酪酸梭状芽孢杆菌的培养条件进行了研究^[31],并取得了较

好的效果。接种量、溶解氧、初始 pH 和芽孢形成时的 pH 值也是影响芽孢形成的重要因素。梭状芽孢杆菌的培养基中添加适量的淀粉对芽孢形成有一定的促进作用,发酵培养时间是影响菌体浓度及芽孢成熟率的重要因素。

5 存在的问题及展望

德国细菌学家 R. 科赫于 1876 年已揭示炭疽病杆状弧菌(后称炭疽杆菌)的生活史,观察到炭疽芽孢杆菌的芽孢能在煮沸条件下存活。可是,尽管付出了巨大的努力,使芽孢具有如此抗性的机制仍然难以捉摸,芽孢的形成机制也仍未完全了解。对提高芽孢梭菌和芽孢杆菌的菌体数、芽孢率的方法的研究虽有较大进展但仍不太系统,缺乏可靠的、普遍适用的理论指导,在研究中对影响因素考虑也欠全面,主要集中在培养基的优化及一些常规培养条件优化上。在芽孢菌剂的生产中仍存在菌数低、芽孢率不高且不可控等问题。不过,在芽孢菌剂生产中从以下方面入手一般能取得较好的生产效果:1) 微生物具有易变异的特点,且芽孢是在特定的条件下才能形成,生产中在保证制剂的疗效和安全性的基础上不断筛选、培育出生产周期短,菌体、芽孢得率高的菌种;2) 减少接种传代次数,种子培养阶段培养基营养要适当丰富;3) 从发酵培养基成分、发酵工艺上创造芽孢形成的条件,提高芽孢率;4) 结合适当的后工序措施,延长芽孢菌剂的贮存期;5) 努力探索适于特定菌种的检测方法。

芽孢的抗性机制和形成机制的研究对食品业、农业、医药业都具有极为重要的意义。随着分子生物学技术和现代发酵调控技术的发展,对芽孢的抗性形成机制和分子机制的研究将会更深入的、更清晰。数学的发展也为我们研究多因素问题提供了的方法上的指导。单细胞生物的代谢调节主要是酶的调节,酶的催化作用具有高效性、专一性和需要适宜条件的特点。微生物在生长过程中,机体的复杂代谢过程是互相协调和高度有序,又能对外界环境的改变迅速作出反应。因此,芽孢菌活菌制剂的生产也必将会更加全面地考虑影响芽孢形成的诸多因素,优化芽孢菌的培养和芽孢形成条件,逐步达到芽孢率高、稳定性好、生产成本低、生产可控化、贮存期较长的目标。芽孢益生菌剂将以其独特的保健和治疗功能为人类的健康事业作出贡献。

参考文献(References):

- [1] Sen R, Swaminathan T. Application of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1997, 47:358-363.
- [2] Spinosa M R, Braccini T, Ricca E, et al. On the fate of ingested *Bacillus spores*[J]. **Res Microbiol**. 2000, 151:361-368.
- [3] Driks A. *Bacillus subtilis* spore coat[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1999, 63, 1-20.
- [4] Riesenman P J, Nicholson W L. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar radiation[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2000, 66: 620-626.
- [5] Setlow B, K J Tautvydas, P Setlow. Small, acid-soluble spore proteins of the a/b-type do not protect the DNA in *Bacillus subtilis* spores against base alkylation[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1998, 64:1958-1962.
- [6] Meador-Parton J, D L Popham. Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation[J]. **J Bacteriol**, 2000, 182:4491-4499.
- [7] Daniel R A, J Errington. Cloning, DNA sequence, functional analysis and transcriptional regulation of the genes encoding dipicolinic acid synthetase required for sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. **J Mol Biol**, 1993, 232:468-483.
- [8] Setlow P. Mechanism which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus species*[J]. **Journal of Applied Bacteriology**, 1994, 76: 49-60.
- [9] S J C M Oomes, S Brul B. The effect of metal ions commonly present in food on gene expression of sporulating *Bacillus subtilis* cells in relation to spore wet heat resistance[J]. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2004, 5:307-316.
- [10] Dürre P, Hollergschwandner C. Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*[J]. **Anaerobe**, 2004, 10:69-74.
- [11] Piggot P J, Hilbert D W. Sporulation of *Bacillus subtilis*[J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2004, 7:579-586.
- [12] Fujita M, Losick R. The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division[J]. **Genes Dev**, 2003, 17:1166-1174.
- [13] Molle V, Fujita M, Jensen S T, et al. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*[J]. **Mol Microbiol**, 2003, 50:1683-1701.
- [14] Britton R A, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, et al. Genome-wide analysis of the stationaryphase sigma factor (σ^H) regulon of *Bacillus subtilis*[J]. **J Bacteriol**, 2002, 184:4881-4890.
- [15] Molle V, Nakaura Y, Shivers RP, et al. Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis[J]. **J Bacteriol**, 2003, 185:1911-1922.
- [16] Ratnayake-Lecamwasam M, Serror P, Wong K W, et al. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels[J]. **Genes Dev**, 2001, 15:1093-1103.
- [17] Sonenshein A L. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*[J]. **Curr Opin Microbiol**, 2000, 3:561-566.
- [18] Durre P, Bohringer M, Nakotte S, et al. Transcriptional regulation of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*[J]. **J Mol Microbiol Biotechnol**, 2002, 4:29-300.
- [19] Angert E R, Brooks A E, Pace N R. Phylogenetic analysis of *Metabacterium polyspora*: clues to the evolutionary origin of daughter cell production in *Epulopiscium* species, the largest bacteria[J]. **J Bacteriol**. 1996, 178:1451-1456.
- [20] Mitani T, Heinze J E, Freese E. Induction of sporulation in *Bacillus subtilis* by decoyinine or hadacidin[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1977, 77(3): 1118-1125.
- [21] Lazizzera B A. The intracellular function of extracellular signaling peptides[J]. 2001, 22 (10) : 1519-1527.
- [22] Harris L M, Welker N E, Papoutsakis E T. Northern, morphological, and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. **J Bacteriol**, 2002, 184:3586-3597.
- [23] 连常平. 芽孢杆菌的生产方法及该菌在水产养殖中的应用[J]. 水产科技情报, 2005, 32 (3): 114-117.
LIAN Chang-ping. Production methods of spore-bearing bacilli and the application of these bacteria to aquaculture[J]. **Fisheries Science & Technology Information**, 2005, 32 (3): 114-117. (in Chinese)
- [24] Ramkrishna Sena, K Srinivasa Babub. Modeling and optimization of the process conditions for biomass production and sporulation of a probiotic culture[J]. **Process Biochemistry**, 2005, 40:2531-2538.
- [25] Hong H A, Duc Le H, Cutting S M. The use of bacterial spore formers as probiotics[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 2005, 29:813-835.
- [26] Paidhungat M, Setlow P. Spore germination and outgrowth[M]. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2002: 537-548.

- [27] Setlow P. Spore germination [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6:550-556.
- [28] 李野,张小平,张克强,等. 蜡质芽孢杆菌 DLSL-2 发酵条件探讨及培养基优化[J]. 微生物学通报, 2005, 32(2): 45-49.
LI Ye, ZHANG Xiao-ping, ZHANG Ke-qiang, et al. Optimization of conditions on submerged fermentation of *Bacillus cereus* [J]. *Microbiology*, 2005, 32(2): 45-49. (in Chinese)
- [29] 吴俊雷,张秉胜,刘吉华,等. 枯草芽孢杆菌发酵培养基优化培养实验[J]. 国外畜牧学—猪与禽, 2003, 23(3): 31-33.
WU Jun-Gang, ZHANG Bing-sheng, LIU Ji-Huan, et al. The optimize of zymolysis substrate and culture for the *Bacillus subtilis* [J]. *Pigs and Poultry*, 2003, 23(3): 31-33. (in Chinese)
- [30] 杜冰,刘长海. 液体深层发酵培养芽孢乳酸杆菌 D-1 的研究[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20 增刊(z1): 5-7.
DU Bing, LIU Chang-Hai. Submerged culture of *Lactobacillus sporogenes* D-1 [J]. *Guang Zhou Food Science and Technology*, 2004, 20(z1): 5-7. (in Chinese)
- [31] 匡群,孙梅,施大林. 酪酸梭状芽孢杆菌培养条件的研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(10): 36-38.
KUANG Qun, SUN Mei, SHI Da-Lin. Study of culturing conditions of *Clostridium butyricum* [J]. *Feed Industry*, 2005, 26(10): 36-38. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)

《食品与生物技术学报》2008 年征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品、生物工程及其相关研究的专业性学术期刊,为全国中文核心期刊,中国科技核心期刊,中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外 10 余家著名检索系统收录。本刊主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,微生物发酵,生物制药工程等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文、试验报告、反映学科前沿研究动态的高质量综述文章,同时兼发动物营养与饲料工程、环境生物技术等方面的最新研究成果。

本刊读者对象:相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员,专业管理人员以及有关院校师生。本刊热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》,A4(大 16K)开本,128 页,每册定价 15.00 元,全年 6 期 90.00 元;本刊邮发代号:28-79,全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部