淀粉对硫酸黏菌素发酵水平的影响

范家同[1],孙作刚[2],许朋斐[1],颜 卫[1],曾 周[1]

(1. 新疆天富阳光生物科技有限公司,新疆石河子 832000;2. 新疆维吾尔自治区兽药饲料监察所,新疆乌鲁木齐 830000)

摘要 [目的]探究淀粉对硫酸黏菌素发酵水平的影响。[方法]在发酵培养基中添加淀粉,并对淀粉进行双酶法水解,研究水解时间对发酵水平的影响。[结果]添加淀粉的发酵水平比原配方高;水解时间不同,发酵水平也不同,水解20 min(21 178 μg/mL)>水解40 min(20 651 μg/mL)>水解60 min(20 230 μg/mL)>水解0 min(20 146 μg/mL)>原配方(19 750 μg/mL)。[结论]淀粉可以提高硫酸黏菌素的发酵水平,其中水解时间20 min的发酵水平最高。

关键词 硫酸黏菌素;淀粉;淀粉水解;还原糖

中图分类号 TS201.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517 – 6611(2018)04 – 0163 – 03

Effects of Starch on the Fermentation Level of Colistin Sulfate

FAN Jia-tong[1], SUN Zuo-gang[2], XU Peng-fei[1] et al (1. SEL Biochem Xinjiang Co., Ltd., Shihezi, Xinjiang 832000; 2. The Xinjiang Uygur Autonomous Region Veterinary Feed monitoring Station, Urumqi, Xinjiang 830000)

Abstract [Objective]To research the effect of starch on colistin sulfate fermentation level. [Method]Starch was added into the fermentation medium, and the starch was hydrolyzed by two enzymes. The effect of hydrolysis time on the fermentation level was studied. [Result]The fermentation level of added starch was higher than that of the original formula; Different hydrolysis time, different levels of fermentation: hydrolysis 20 min (21 178 μg/mL) > hydrolysis 40 min (20 651 μg/mL) > hydrolysis 60 min (20 230 μg/mL) > hydrolysis 0 min (20 146 μg/mL) > original formula (19 750 μg/mL). [Conclusion]Starch can improve the fermentation level of colysin sulfate, of which the hydrolysis time 20 min is the highest.

Key words Colistin sulfate; Starch; Starch hydrolysis; Seducing sugar

硫酸黏菌素,又称多黏菌素E,为多黏菌素E1、E2和E1 – 2硫酸盐的复合物。它是由小山康夫在1950年从福岛县土壤中分离到的多黏芽孢杆菌抗敌素变株(*Bacillus polymyxa* var. colistinus)产生的,是一种锁环状碱性多肽类抗生素,对革兰氏阴性杆菌如铜绿假单孢菌、鼠伤寒杆菌和痢疾志贺氏菌等有强烈的毒杀作用。其原理如下:硫酸黏菌素中含有带阳电荷的亲脂和疏脂基团,与革兰氏阴性菌细胞膜中的带负电荷的磷脂基团反应,引起细胞膜张力降低和通透性的改变,导致细胞内容物如嘌呤、核苷酸和蛋白等漏出胞外,不能按照正常的调控机制进出细胞内外,导致细胞代谢异常,最终导致细菌死亡[1-11]。淀粉作为碳源能提高发酵液中的多黏类芽孢杆菌菌体浓度[12-13],同时淀粉相比葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖等碳源,是菌体最适碳源和产多黏菌素E量最高的碳源[14]。在微生物发酵中碳源一般选择葡萄糖,即使使用淀粉作为碳源,也是直接投入基础培养基中使用,很少采用双酶法水解淀粉用于抗生素发酵。笔者使用淀粉和葡萄糖作为复合碳源,通过双酶法水解淀粉控制还原糖的含量,旨在提高发酵水平,为指导大生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源。多黏类芽孢杆菌由天富阳光生物科技有限公司菌种组提供。

1.1.2 培养基。种子罐培养基:大豆饼粉1.50%,硫酸铵1.90%,七水硫酸亚铁0.02%,大豆油1.00%,泡敌0.02%,磷酸二氢钾0.35%。

原发酵培养基:大豆饼粉1.50%,硫酸铵1.90%,玉米蛋白粉0.50%,七水硫酸亚铁0.02%,大豆油1.00%,泡敌0.02%,磷酸二氢钾0.35%。

现发酵培养基:大豆饼粉1.50%,硫酸铵1.90%,玉米蛋白粉0.50%,玉米淀粉2.00%,七水硫酸亚铁0.02%,大豆油1.00%,泡敌0.02%,磷酸二氢钾0.35%,淀粉酶0.04%,糖化酶0.01%。

1.1.3 主要仪器设备。百伦发酵罐(BLB10 – 15SJ – 50SJ – 50SJ),上海百伦生物科技有限公司;灭菌锅(XG1.Y型),山东新华医疗器械股份有限公司;电子秤(LT202E和LT5001E型电子天平),常熟市天量仪器有限公司;岛津高效液相色谱仪(SPD – 20A)。

1.2 方法

1.2.1 种子罐消毒和培养。在不锈钢桶里投入大豆饼粉、硫酸铵、七水硫酸亚铁和磷酸二氢钾,充分溶解后,倒入种子罐,再加入大豆油和泡敌,定容体积至14.5 L,消后体积16.0 L,消毒(120 ~ 122 ℃,30 min)。

种子罐培养条件:(33 ± 1)℃,搅拌(300 ± 20)r/min,风量(0.25 ± 0.05)m^3/h,罐压(0.03 ± 0.01)MPa。

1.2.2 发酵罐消毒和培养。

1.2.2.1 原发酵配方消毒。在不锈钢桶里溶解大豆饼粉、玉米蛋白粉、硫酸铵、七水硫酸亚铁、磷酸二氢钾,加入大豆油和泡敌,定容体积至29.0 L,消后体积32.0 L,消毒(120 ~ 122 ℃,30 min)。

1.2.2.2 现发酵配方消毒。淀粉加酶不液化和糖化:在不锈钢桶里加入玉米淀粉、淀粉酶、糖化酶、豆饼粉、玉米蛋白粉、硫酸铵、七水硫酸亚铁、磷酸二氢钾,溶解充分后,倒入发酵罐,加入大豆油和泡敌,定容体积至29.0 L,消后体积32.0 L,消毒(120 ~ 122 ℃,30 min)。

作者简介 范家同(1983—),男,江苏泗阳人,硕士,从事微生物发酵研究。

收稿日期 2017 – 11 – 17

淀粉加酶液化和糖化 20 min:在不锈钢桶里加入玉米淀粉和淀粉酶,溶解充分后,倒入发酵罐,加水定容至 10.0 L,升温至 80.0 ~ 84.0 ℃,保温液化 20 min,降温到 60.0 ~ 62.0 ℃,加入糖化酶,保温糖化 20 min,升温至 100 ℃灭活糖化酶 10 min。淀粉糖化后,加入溶解好的豆饼粉、玉米蛋白粉、硫酸铵、七水硫酸亚铁、磷酸二氢钾,再加入大豆油和泡敌,定容体积至 28.0 L,消后体积 32.0 L,消毒(120 ~ 122 ℃,30 min)。

淀粉加酶液化和糖化 40 min:在不锈钢桶里加入玉米淀粉和淀粉酶,溶解充分后,倒入发酵罐,加水定容至 10.0 L,升温至 80.0 ~ 84.0 ℃,保温液化 40 min,降温到 60.0 ~ 62.0 ℃,加入糖化酶,保温糖化 40 min,升温至 100 ℃灭活糖化酶 10 min。淀粉糖化后,加入溶解好的豆饼粉、玉米蛋白粉、硫酸铵、七水硫酸亚铁、磷酸二氢钾,再加入大豆油和泡敌,定容体积至 28.0 L,消后体积 32.0 L,消毒(120 ~ 122 ℃,30 min)。

淀粉加酶液化和糖化 60 min:在不锈钢桶里加入玉米淀粉和淀粉酶,溶解充分后,倒入发酵罐,加水定容至 10.0 L,升温至 80.0 ~ 84.0 ℃,保温液化 60 min,降温到 60.0 ~ 62.0 ℃,加入糖化酶,保温糖化 60 min,升温至 100 ℃灭活糖化酶 10 min。淀粉糖化后,加入溶解好的豆饼粉、玉米蛋白粉、硫酸铵、七水硫酸亚铁、磷酸二氢钾,再加入大豆油和泡敌,定容体积至 28.0 L,消后体积 32.0 L,消毒(120 ~ 122 ℃,30 min)。

1.2.3 消后还原糖测定。发酵液的消后还原糖含量检测采用碘量法[15]。

1.2.4 种子罐移种和发酵培养。种子罐培养 24 h 左右,菌体较粗壮,菌量较多时移种,移种量 3 L。

发酵培养条件:(34 ± 1)℃,搅拌(300 ± 50)r/min,风量(1.00 ± 0.20)m^3/h,罐压(0.03 ± 0.01)MPa。

发酵罐接种后补加 35% 的葡萄糖溶液至还原糖含量为 10 g/L,当还原糖低于 6 g/L 时开始补糖。发酵过程补加 35% 的葡萄糖溶液,控制还原糖范围:0 ~ 10 h 为 6 ~ 10 g/L,10 ~ 24 h 为 4 ~ 6 g/L,24 ~ 90 h 为 2 ~ 4 g/L。

1.2.5 硫酸黏菌素效价测定。使用高效液相色谱技术测定发酵罐的硫酸黏菌素效价。

色谱条件:色谱柱 C_{18},柱温 30 ℃,流速 1.0 mL/min,检测波长 215 nm,进样量 20 μL,运行时间 30 min。

试剂配制:①混合溶剂。将水:己腈按4:1混合,过滤,待用。②参比溶液。将 25.0 mg 标准品用混合溶剂溶解并定容至 50 mL。③样品溶液。取滤液 2.5 mL,置 50 mL 容量瓶中,用纯化水稀释至刻度。

检测方法:首先进样参比溶液 2 针,记录相关峰面积,再进样样品溶液 1 针,记录相关峰面积。计算公式如下:

总含量(μg/mL) = *E*1 含量 + *E*2 含量

$$E1\text{ 含量}(\mu g/mL)=\frac{\text{标准品溶液的含量}(\mu g/mL)\times\text{标准品 }E1\text{ 含量}(\%)\times\text{试剂 }E1\text{ 峰面积}\times\text{稀释倍数}}{\text{标准品 }E1\text{ 的峰面积}}$$

$$E2\text{ 含量}(\mu g/mL)=\frac{\text{标准品溶液的含量}(\mu g/mL)\times\text{标准品 }E2\text{ 含量}(\%)\times\text{试剂 }E2\text{ 峰面积}\times\text{稀释倍数}}{\text{标准品 }E2\text{ 的峰面积}}$$

2 结果与分析

2.1 种子液移种前的涂片 图 1 是种子液培养 24 h 的移前涂片。可以看出菌体粗壮、菌形均匀整齐、菌量较多,表明种子液的质量很好,是较好的移种时机[16]。

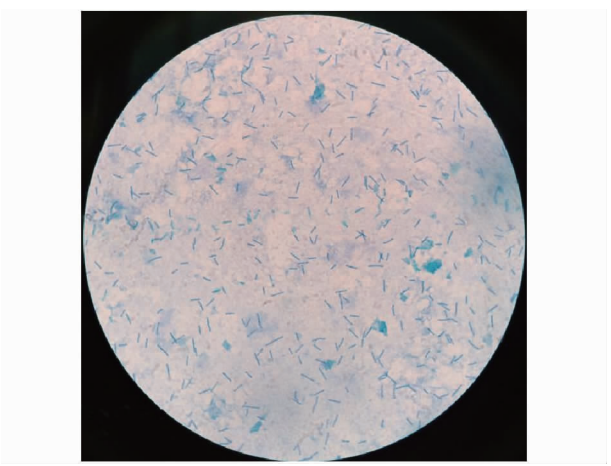

图 1 种子液的涂片

Fig. 1 The smear of seed broth

2.2 发酵结果 对原配方以及现配方加酶处理 0、20、40 和 60 min 的还原糖和发酵效价做曲线,如图 2 所示。

从图 2 可以看出,原配方和加酶没有处理的现配方的还原糖含量为 0.1 g/L,说明原配方基本不含还原糖,没有升温

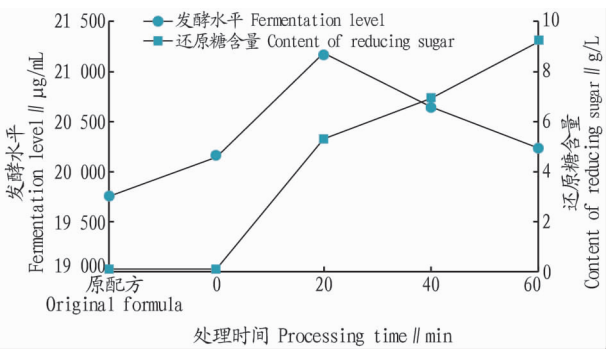

图 2 还原糖含量和发酵水平曲线

Fig. 2 The curves of reducing sugar content and fermentation level

处理的现配方,由于处理时间和温度不够,也没有还原糖。现配方加酶处理时间越长,水解的还原糖量越高,水解60 min(9.2 g/L) > 水解 40 min(6.9 g/L) > 水解 20 min(5.3 g/L)。说明淀粉水解需要一定的作用时间。加淀粉的发酵水平高于原配方发酵水平:20 min 时 21 178 μg/mL、40 min时 20 651 μg/mL、60 min 时 20 230 μg/mL 和 0 min 时 20 146 μg/mL 均大于原配方(19 750 μg/mL),说明淀粉能够提高发酵水平。现配方加酶处理的时间不同,发酵水平也不同:20 min(21 178 μg/mL) >40 min(20 651 μg/mL) >60 min(20 230 μg/mL) >0 min(20 146 μg/mL)。说明淀粉的水解

程度影响发酵水平。

3　结论与讨论

近年来,随着对碳源的研究,很多研究报道淀粉可以提高硫酸黏菌素的发酵液菌浓度和发酵水平,但是没有后续的研究,这些技术手段很难推广到发酵大生产中。而该试验的小试罐发酵控制条件和大生产紧密联系,数据和方法可以作为大生产的依据,对大生产来说,具有较好的指导意义。

通过对比原配方和加酶没有处理的现配方的还原糖含量,说明原配方中基本不含还原糖。虽然原配方中的玉米蛋白粉含 15% 左右的淀粉[17],但是由于没有加酶液化,所以没有还原糖水解出来。而加淀粉的配方由于升温速度很快,很短的时间就超过 100 ℃,酶的活性降低和失活[18],淀粉也没有水解。

现配方加酶处理时间越长,水解出的还原糖量越高,验证了张剑等[19]的双酶法水解淀粉里提到的处理 20 ~ 120 min 的还原糖含量随着时间的延长而产量增加。

加淀粉的发酵水平高于原配方发酵水平,说明淀粉可以提高发酵水平。孙仲奇等[14]研究了葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖和可溶性淀粉等碳源对多黏菌素 E 合成的影响,结果表明:最终发酵水平由高到低依次是淀粉、乳糖、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖。同时王成迎[20]的硫酸黏杆菌素菌种选育与发酵工艺研究显示,淀粉可以提高菌浓度,使用淀粉和葡萄糖复合碳源对抗生素的合成有利。淀粉配合葡萄糖是最佳的复合碳源,葡萄糖可以促进菌体的生长和初级代谢,为次级代谢提供前提物质,而淀粉可以降低葡萄糖的阻遏效应,提高和延长次级代谢产物的合成量[21]。

现配方加酶处理时间不同,发酵水平也不同。原因可能是还原糖量不同,对应发酵水平不同。刘铁军等[22]研究了葡萄糖浓度对杆菌肽发酵过程的影响,结果表明:在基础料中葡萄糖含量为 5 g/L 时,发酵前期菌体生长较快,且发酵液中的乙酸(发酵中大量葡萄糖存在时,会产生乙酸,对次级代谢产物的合成起抑制作用)累积较少,最终菌量较低,后期杆菌肽产生速度较慢,最终产量很低;当基础料中葡萄糖含量为10 g/L时,菌量较高,发酵液中的乙酸积累较少,同时中后期的杆菌肽的产量合成速度较快,最终的杆菌肽产量较高;当基础料中葡萄糖含量 15 或 20 g/L 时,菌量较高,但是发酵液中的乙酸累积也较多,乙酸过多反而抑制菌体合成杆菌肽,影响最终的产量。虽然两者的发酵产物不同,但是试验现象相似,与该试验的结果也基本一致。试验中用酶处理 20 min的消后培养基的还原糖含量为 5.3 g/L,接种后补至 10.0 g/L,最后的发酵水平最高,效价为21 178 μg/mL。处理 0 min 的消后培养基的还原糖含量为 0.1 g/L,效价最低,为 20 146 μg/mL。原因可能是接种后补充到 10.0 g/L 后,较高浓度的葡萄糖浓度在代谢中产生了糖代谢阻遏效应,抑制了硫酸黏菌素合成相关基因转录和酶的活性,导致合成受阻,最终效价偏低。另一方面,淀粉的利用率有限,当基础料中有葡萄糖存在时,优先利用葡萄糖。因为葡萄糖是速效碳源,只有当葡萄糖被利用后,淀粉这类的迟效碳源才会被利用。微生物的细胞经济学假说认为,在微生物的代谢活动中,存在着以最少的耗费获得最大的经济效益现象。该试验中菌体如果要利用淀粉,则需要分泌分解淀粉的一系列酶,最后转化为葡萄糖再利用,从而浪费了能量。处理 40 和 60 min的消后培养基的还原糖含量分别为 6.9 和 9.2 g/L,效价分别为 20 651 和 20 230 μg/mL。虽然接种后,通过补糖,还原糖含量为 10.0 g/L,但是效价偏低。原因是淀粉酶解过程的产物不是单一的葡萄糖,还有麦芽糖,麦芽糖也是还原糖,所以最终的葡萄糖含量达不到 10.0 g/L,造成效价偏低。而20 min的还原糖含量偏低,加上补充的葡萄糖,发酵液中的葡萄糖含量高于处理 40 和 60 min 的葡萄糖含量,更接近于文献中的 10.0 g/L,所以发酵水平最高。处理 40 min 的发酵水平比 60 min 高一些,也是这个原因。

因此,淀粉可以提高发酵水平,配合葡萄糖是最佳的复合碳源。同时控制淀粉水解时间 20 min,还原糖含量5.3 g/L 的发酵水平最高。

参考文献

[1] AZZOPARDI E A,FERGUSON E L,THOMAS D W. Colistin past and future:A bibliographic analysis [J]. Journal of critical care,2013,28(2):13 -19.

[2] LI C H,BUDGE L P,DRISCOLL C D,et al. Incremental conversion of outer-membrane permeabilizers into potent antibiotics for Gram-negative bacteria[J]. Journal of the American chemical society,1999,121(5):931 -940.

[3] 高延玲,刘宏伟,周红霞,等. 治疗多重耐药革兰氏阴性菌感染的有效抗菌药——多黏菌素[C]//高光,朱明文. 中国畜牧兽医学会动物药品学分会 2008 学术年会论文集. 北京:中国畜牧兽医学会,2008:372.

[4] 凤权,汤斌,陈中碧. 多粘芽孢杆菌发酵培养基优化及发酵特性研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33(7):46 -48.

[5] FALAGAS M E,KASIAKOU S K. The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections[J]. Clinical infectious diseases,2005,40(9):1333 -1341.

[6] KOYAMA Y,KUROSASA A,TSUCHIYA A,et al. A new antibiotic 'colistin' produced by spore-forming soil bacteria [J]. J Antibiot,1950,3:457 -458.

[7] KASIAKOU S K,MICHALOPOULOS A,SOTERIADES E S,et al. Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis[J]. Antimicroblal agents and chemothrapy,2005,49(8):3136 -3146.

[8] WOOTTON M,HOLT H A,MACGOWAN A P. Development of a novel assay method for colistin sulphomethate [J]. Clinical microbiology and infection,2005,11(3):243 -244.

[9] 王汝龙,原正平. 化工产品手册:药物[M]. 北京:化学工业出版社,1998:144.

[10] 冯淇辉,戎耀方,朱模忠. 兽医临床药理学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983:76 -78.

[11] 利·迈·琼斯. 兽医药理学与治疗学[M]. 冯淇辉,戎耀方,译. 上海:上海科学技术出版社,1982:716 -718.

[12] 陈小煌,李自然,黄小云,等. 多粘类芽孢杆菌培养条件优化研究[J]. 福州大学学报(自然科学版),2013,41(5):947 -954.

[13] 严芬,叶秀云,李仁宽,等. 一种高密度培养多粘类芽孢杆菌的方法:CN201210056279.6[P]. 2012 -07 -11.

[14] 孙仲奇,裘娟萍,陆建卫,等. 碳源对多粘类芽孢杆菌生长和多粘菌素 E 合成的影响[J]. 浙江农业学报,2016,28(8):1343 -1350.

[15] 杨艳彬,宋于洋,颜海燕. 葡萄酒中还原糖含量测定方法的研究[J]. 酿酒,2006(6):89 -91.

[16] 白秀峰. 发酵工艺学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2003:98.

[17] 陈列芹,李云捷. 玉米蛋白的研究进展[J]. 中国食物与营养,2009(5):27 -30.

[18] 王凤寰,孟青青,封棣,等. 嗜热糖化酶基因在重组黑曲霉工程菌中的表达及酶学性质初步研究[J]. 生物技术通报,2012(7):119 -125.

(下转第 168 页)

表 5 各处理评吸得分

Table 5 Smoking score of each treatment

分

包装形式 Packing form	处理 Treatment	评吸员 Smoking quality assessment personnel												平均 Average
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
硬盒	①	87	86.5	87.0	87	87	86.5	87	87	86.5	87	87	84.5	86.67
Rigid	②	87	87.0	87.5	87	87	87.0	87	87	87.0	87	87	87.0	87.04
package	③(CK)	87	86.5	87.5	87	87	87.0	87	87	87.0	87	87	86.0	86.92
软盒	①	87	87.5	87.5	87	87	87.0	87	87	86.5	87	87	86.5	87.00
Flexible	②	87	87.0	87.5	87	87	87.0	87	87	87.0	87	87	87.0	87.04
package	③(CK)	87	87.0	87.5	87	87	87.0	87	87	87.0	87	87	87.0	87.04

表 6 卷烟主流烟气检验结果

Table 6 Mainstream cigarette smoke test result

包装形式 Packing form	处理 Treatment	烟支规格 Cigarette size (mm + mm) × mm	盒标焦油量 Box standard tar content mg	盒标烟气烟碱量 Smoke and nicotine quantity of box mark mg	盒标 CO 量 Box standard CO quantity//mg	平均重量 Average weight g	抽吸口数 Puff number 口/支	总粒相物 Total particle//mg	水分 Water mg	烟气烟碱量 Smoke and nicotine content mg	焦油量 Tar mg	CO 实测量 Actual measured amount of CO mg	焦油量得分 Tar score 分	烟碱量得分 Nicotine quantity score 分	CO 实测量得分 Actual measured amount of CO score 分	判定 Judgemnt
软盒	①	(25 + 59) × 24.5	11	1.0	11	0.866	6.3	14.60	1.98	1.08	11.5	11.8	80	100	80	合格
Flexible	②	(25 + 59) × 24.5	11	1.0	11	0.876	6.4	14.62	2.04	1.06	11.5	11.0	80	100	80	合格
package	③(CK)	(25 + 59) × 24.5	11	1.0	11	0.880	6.4	15.08	2.18	1.08	11.8	11.8	80	100	80	合格
硬盒	①	(25 + 59) × 24.5	11	1.0	11	0.868	6.3	14.08	2.04	1.02	11.0	11.1	80	100	80	合格
Rigid	②	(25 + 59) × 24.5	11	1.0	11	0.875	6.3	14.04	2.08	1.00	11.0	11.0	80	100	80	合格
package	③(CK)	(25 + 59) × 24.5	11	1.0	11	0.882	6.4	14.63	2.26	1.04	11.3	11.8	80	100	80	合格

3 结论与讨论

通过研究可知,在低氧环境(氧气浓度小于 2%)及低温环境(4 ~ 5 ℃)30 d 左右即可 100% 杀死成品卷烟内各种虫态烟草甲,且通过充氮及低温处理 90 d 后评吸及相应指标检测,对卷烟评吸质量及各类理化指标无明显影响,可以作为成品卷烟储存期间的预防性杀虫手段。

当然,要实现充氮技术及低温技术在成品卷烟储存期间的规模化、成熟化应用,还有一系列的工作要做,这也为人们今后的研究提供了方向。

参考文献

[1] 李铁军,杨得强,李强. 国内车间烟虫治理现状及问题研究[J]. 北京农业,2013(6):193 - 194.
[2] 陆宗西,张华阳,董元堂. 控温充氮气调杀虫应用试验[J]. 粮食储藏,2013,42(6):10 - 12.
[3] 刘军. 充氮气调对烟草甲的防治效果试验[J]. 湖北农业科学,2016,55(9):22499 - 2251.
[4] 王秀芳,任广伟,周显升,等. 低温对不同虫态烟草甲的影响[J]. 华北农学报,2010,25(S1):287 - 289.
[5] 陈永年,彭清云. 烟草甲的生态学及其防治的调查研究[J]. 湖南农业大学学报,1995,21(5):467 - 471.
[6] 郭紫明,李艳春,董道竹,等. 卷烟包装材料中残留的挥发性有机物[J]. 烟草科技,2007,42(2):42 - 45.
[7] 王理珉,魏杰,胡群. 卷烟主要包装材料环保性能概述[J]. 包装工程,2004,25(6):168 - 170.

(上接第 165 页)

[19] 张剑,易华锋,张开诚,等. 双酶法水解玉米淀粉的工艺研究[J]. 酿酒科技,2009(3):95 - 97.
[20] 王成迎. 硫酸粘杆菌素菌种选育与发酵工艺研究[D]. 济南:山东大学,2015.
[21] 陶银英. 多粘菌素 E 产生菌高通量诱变育种的研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.
[22] 刘铁军,吴飞. 葡萄糖浓度对杆菌肽发酵过程的影响[J]. 医学信息,2011,24(9):4659 - 4660.

科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如 1990 年不能写成 90 年,文中避免出现“去年”“今年”等写法。小于 1 的小数点前的零不能省略,如 0.2456 不能写成. 2456。小数点前或后超过 4 位数(含 4 位数),从小数点向左右每 3 位空半格,不用“,”隔开。如 18 072. 235 71。尾数多的数字(5 位以上)和小数点后位数多的小数,宜采用 $\times 10^n$(n 为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。