

文章编号:1001-6880(2015)2-0199-06

Bacillus amyloliquefaciens C-1 胞外抑菌脂肽的分离与鉴定

吕佳^{1,2},徐兴科^{1,2},胡森科^{1,2},张瑞娟^{1,2},韩蓓^{1,2*}¹西安交通大学医学部公共卫生学院;²陕西省营养与食品安全工程研究中心,西安 710061

摘要:*Bacillus amyloliquefaciens* C-1 为本实验室从即食食品中分离出的菌株,其发酵液上清具有一定的抑菌活性。通过酸沉淀法从发酵液上清中分离粗脂肽,并确定脂肽是发酵液上清中具有抑菌活性的物质。本实验以蜡样芽孢杆菌 MS10362R(产黑色素)、蜡样芽孢杆菌 CMCC63301(不产黑色素)和大肠杆菌 O157: H7 CDC157 为指示生物进行粗脂肽的抑菌活性测定,结果显示 0.1 mg/mL 的脂肽对这三个菌的 6 h 生长抑制率分别 96%、75%、93%;同时在不同温度、蛋白酶和有机溶剂处理下分别测定了该脂肽的抑菌活性稳定性,结果显示 C-1 抑菌脂肽对这些处理均不敏感,其抑菌活性非常稳定,具有很好的开发利用潜力。

关键词:解淀粉芽孢杆菌 C-1;抑菌活性;脂肽;食源性致病菌

中图分类号:Q939.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.02.001

Isolation and Identification of Antibacterial Lipopeptide Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C-1

LV Jia^{1,2}, XU Xing-ke^{1,2}, HU Sen-ke^{1,2}, ZHANG Rui-juan^{1,2}, HAN Bei^{1,2*}¹School of Public Health, Health Science center, Xi'an Jiaotong University; ²Nutrition and Food Safety Engineering Research Center of Shaanxi Province, Xi'an 710061, China

Abstract:*Bacillus amyloliquefaciens* C-1 is a newly isolated strain from ready-to-eat food. Its fermentation supernatant showed strong antibacterial activity. The crude lipopeptide was isolated by acid precipitation method from C-1 fermentation supernatant. The antibacterial activity of this lipopeptide was verified. Then, *Bacillus cereus* MS10362R, *Bacillus cereus* CMCC63301 and *Escherichia coli* O157: H7 CDC157 were selected as the indicating bacterium to track the antibacterial activity. The results showed the inhibition rate of 0.1 mg/mL lipopeptide against those 3 strains were 96%, 75% and 93%, respectively. In addition, C-1 lipopeptide had very stable antibacterial activity under high temperature, different proteases and solvents treatment. The results suggested that strain C-1 had the potential application value to be developed as new bio-preservative.

Key words:*Bacillus amyloliquefaciens* C-1; antibacterial activity; lipopeptide; food-borne pathogens

食源性致病菌是导致微生物性食物中毒的一类病原菌,对食源性致病菌的控制是食品工业防腐方向的一个重点,针对食源性致病菌的高效生物防腐剂研究成为了当前的热点之一。芽孢杆菌可以产生许多种抗菌物质,包括肽类、细菌素、脂肽类等,其中肽类和脂肽类具有较高的生物工程利用价值^[1-3]。Sutyak 等从酸奶厂的益生菌乳制品中分离出一株解淀粉芽孢杆菌,其培养物上清对李斯特菌、阴道加德纳菌和无乳链球菌有抑制效果,其有效抑菌物质为细菌素^[4]。Romano 等从解淀粉芽孢杆菌 BO5A 中

分离出 2 种环状脂肽,其对真菌 *Fusarium xoxysporum*、*Aspergillus niger*、*Botrytis cinerea*、*Penicillium italicum*、*Trichoderma harzianum* 等具有显著的抑制作用^[5]。脂肽类物质是枯草芽孢杆菌产生的主要抗菌物质之一,但是研究解淀粉芽孢杆菌产生脂肽类抑菌物质的报道不多。

本实验室从即食水果果盘上分离出一株解淀粉芽孢杆菌,命名为 C-1,其在发酵过程中能产生大量的胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS),该菌现保存于中国典型培养物保藏中心(编号 M2012177)。C-1 的胞外多糖具有高的抗氧化活性,同时具有抑制人肿瘤细胞生长并诱导其凋亡的活性^[6]。同时 *B. amyloliquefaciens* C-1 的发酵液上清具有显著的抑菌活性,但是该抑菌活性与胞外多糖无关^[7]。

收稿日期:2014-10-28 接受日期:2015-01-26

基金项目:国家自然科学基金(31200031);陕西省科技计划国际合作项目(2014KW12-02)

* 通讯作者 Tel:86-29-82655107;E-mail:hanbei@mail.xjtu.edu.cn

基于此,本实验初步推测其胞外抑菌物质可能为蛋白类或多肽类物质。为了进一步分析与鉴定 *B. amyloliquefaciens* C-1 发酵上清液中的抑菌物质,本研究从 C-1 上清中分离出了粗脂肽,并对其是否具有抑菌活性、对不同测试菌的抑菌活性、抑菌活性的稳定性分别进行了研究,结果显示 *B. amyloliquefaciens* C-1 胞外抑菌活性物质为脂肽,且其抑菌活性非常稳定,具有潜在的开发应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

本实验以 *Bacillus amyloliquefaciens* C-1(本实验室自行分离保藏)为生产菌株。蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* MS10362R,产黑色素)为中国科学院武汉病毒研究所袁志明研究员惠赠;大肠杆菌 O157: H7 CDC157 来源于西安市疾控中心;蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* CMCC63301)购自于中国医学微生物菌种保藏管理中心,这 3 株细菌为抑菌试验的测试菌株。

液体培养基采用 LB 培养基,配方为:蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L、酵母粉 5 g/L;固体平板采用 LB 固体培养基,配方为:蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L、酵母粉 5 g/L,琼脂 1.5%。*B. amyloliquefaciens* C-1 发酵培养基,配方为:蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L、酵母粉 5 g/L、葡萄糖 1%。

1.2 试剂

冰乙酸、考马斯亮蓝 G250、Tris-HCl、TEMED、甲醇、乙腈、丙酮、10% 胰蛋白酶(使用浓度为 0.1%)、4% 胃蛋白酶(使用浓度为 0.1%)、2% 蛋白酶 K(使用浓度为 0.1%)、0.5 mol/L NaOH、0.5 mol/L HCl、30 mg/mL 卡那霉素(使用浓度为 30 μg/mL),14 mg/mL 四环素(使用浓度为 14 μg/mL)。所用试剂均为分析纯。

1.3 *B. amyloliquefaciens* C-1 胞外脂肽类活性物质的提取与定性检测

接种环取 C-1 单菌落至 3 mL LB 液体培养基,30 °C、200 rpm 恒温摇床中培养过夜;次日按 1% 量转接至 50 mL LB 培养基中,30 °C、200 rpm 恒温摇床中培养 5 h,按 1% 量转接至多份 150 mL LB 培养基中,30 °C、200 rpm 恒温箱中培养 96 h。4 °C,10000 rpm 离心取上清液。上清液用 6 M 盐酸调节 pH 值至 2.0,混匀后 4 °C 静置 24 h,4 °C 10000 rpm 离心收集沉淀,冷冻干燥后为粗提活性物质^[8]。

利用三重四极杆液质联用仪(ABI, API3200 LC-20A)对 C-1 菌株发酵液上清粗提活性物质进行高效液相色谱-质谱联用的定性检测,初步确定提取物的主要成分。

1.4 *B. amyloliquefaciens* C-1 胞外脂肽的抑菌活性

1.4.1 平板法抑菌试验

以革兰氏阳性细菌蜡样芽孢杆菌 *B. cereus* CM-CC63301、产黑色素蜡样芽孢杆菌 *B. cereus* MS10362R 和大肠杆菌 *E. coli* O157: H7 CDC157 作为测试菌,在直径约 15 cm 平板倾倒固体培养基厚约 6 mm,冷却后均匀打孔 5 个,孔径 6 mm,其中包含阳性对照孔一个(敏感抗生素,大肠杆菌使用 30 μg/mL 卡那霉素,蜡状芽孢杆菌使用 14 μg/mL 四环素),阴性对照孔一个(等体积的 LB 液体培养基),实验组孔 3 个,分别加入 10 mg/mL C-1 脂肽溶液 200 μL、分离脂肽前的发酵液上清 200 μL、分离脂肽后的发酵液上清 200 μL(表 1 中为“去脂肽上清”,为酸沉淀脂肽后的上清,pH 与发酵液上清调节为一致),抑菌活性以抑菌圈直径表示。

1.4.2 生长曲线法抑菌试验

B. cereus CMCC63301、*B. cereus* MS10362R 和 *E. coli* O157: H7 CDC157 作为测试菌,过夜培养,培养液用 LB 液体培养基稀释至 1%,取 2 mL 分别置入 24 孔板中,每孔加入 20 μL 10 mg/mL 脂肽溶液,混匀,加入 20 μL 无菌水的孔作为阴性对照。酶标仪测定初始的 OD₆₀₀。将 24 孔板分别置于 30 °C(蜡样芽孢杆菌)、37 °C(大肠杆菌)培养 6 h,每小时测定一次 OD₆₀₀,观察脂肽对病原菌生长的抑制作用,并绘制抑制曲线,计算加入脂肽后培养 6 h 的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (B_2 - B_0) / (A_2 - A_0) \times 100\%$$

式中,A 为阴性对照组 OD₆₀₀,A0 为 0 h 数据,A2 为 6 h 数据;B 为添加脂肽的处理组 OD₆₀₀,B0 为 0 h 数据,B2 为 6 h 数据。

1.5 *B. amyloliquefaciens* C-1 胞外脂肽的稳定性

10 mg/mL 脂肽溶液分别置于 50、80、120 °C 下处理 30 min,处理后放于室温,对处理后的脂肽溶液进行 1.4.2 的抑菌活性测定实验,以 *B. cereus* CM-CC63301、*B. cereus* MS10362R 和 *E. coli* O157: H7 CDC157 作为测试菌,以未处理的脂肽为阳性对照。绘制抑制曲线,并计算培养 6 h 后的抑制率。

10 mg/mL 脂肽溶液分别用 0.1% 胰蛋白酶、0.1% 胃蛋白酶、0.1% 蛋白酶 K 处理,37 °C 孵育 1 h,对经过不同蛋白酶处理后的脂肽溶液进行 1.4.2

的抑菌活性测定实验,以 *B. cereus* CMCC63301、*B. cereus* MS10362R 和 *E. coli* O157: H7 CDC157 作为测试菌,以未处理的脂肽为阳性对照。绘制抑制曲线,并计算培养 6 h 后的抑制率。

分别用甲醇、乙腈、丙酮溶解脂肽,配成 10 mg/mL 脂肽溶液,对处理后的脂肽溶液进行 1.4.2 的抑菌活性测定实验,以 *B. cereus* CMCC63301、*B. cereus* MS10362R 和 *E. coli* O157: H7 CDC157 作为测试菌,以未处理的脂肽为阳性对照,计算培养 6 h 后的抑制率。

2 实验结果

2.1 *B. amyloliquefaciens* C-1 胞外脂肽类活性物质的提取与定性检测

C-1 菌株在 LB + 1% 葡萄糖液体培养基中 30 °C 震荡培养 60 h, 培养液离心取上清, 用 HCl、NaOH 分别调节 C-1 上清至 pH = 2、4、6、8、10。在调节 pH 时, 当溶液的 pH 达到 3 左右, 开始出现沉淀, 溶液变得浑浊, 继续调节 pH 至 2, 沉淀完全, 溶液变的较为澄清。放置于 4 °C 冰箱中 24 h。10000 rpm, 4 °C 离心获得胞外活性物质沉淀和去沉淀的上清液, 胞外活性物质沉淀经过冻干获得干粉, 产量为 1.2 g/

L。

将菌株 C-1 发酵液上清的粗提物进行高效液相色谱-质谱联用分析, 经过质谱结果确定 HPLC 分析得到的主要物质峰属于伊枯草菌素同系物, 为分子量相差 14 Da (CH_2) 的代谢同系物。胞外脂肽类粗提物的质谱图结果显示其实测值分别为 1045.5、1065.3、1067.1、1080.6 Da, 分别与脂肽类抗生素 C14-C17 Iturin A 的分子量的理论预测值 1042.54、1056.55、1070.57、1084.61 Da 相吻合^[10-14]。其中以分子量为 1065.3 Da 的伊枯草菌素代谢同系物的含量最高。从质谱图上可以初步确定该提取物为脂肽类伊枯草菌素同系物。

2.2 解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* C-1 脂肽的抑菌作用

2.2.1 C-1 脂肽的平板抑菌试验

根据 1.4.1 的设计进行平板抑菌试验, 用牛津杯法分别定性 *B. amyloliquefaciens* C-1 发酵上清液、重溶的粗脂肽和分离脂肽后的发酵液上清液对蜡样芽孢杆菌 MS10362R、蜡样芽孢杆菌 CMCC63301 和大肠杆菌 O157: H7 的抑菌活性。得到如表 1 的抑菌结果。阳性对照为敏感抗生素, 阴性对照为空白培养基, 脂肽浓度为 10 mg/mL, 加样量均为 200 μL。

表 1 C-1 上清液的平板抑菌试验结果($n=3$)

Table 1 Results of antibacterial activity of C-1 supernatant ($n=3$)

受试菌 Tested strains	阳性对照 Positive control	抑菌圈 Diameter of inhibitory zone(D/mm)			阴性对照 Negative control
		实验组 1 (发酵液上清) Supernatant group	实验组 2 (脂肽溶液) Lipopeptide group	实验组 3 (去脂肽上清) Supernatant removed Lipopeptide group	
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> CMCC63301	29 ± 2.2	15 ± 2.1	17 ± 1.5	0	0
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> MS10362R	28 ± 1.6	18 ± 1.0	20 ± 1.7	0	0
大肠杆菌 <i>E. coli</i> O157: H7 CDC157	29 ± 1.8	15 ± 1.3	22 ± 2.6	0	0

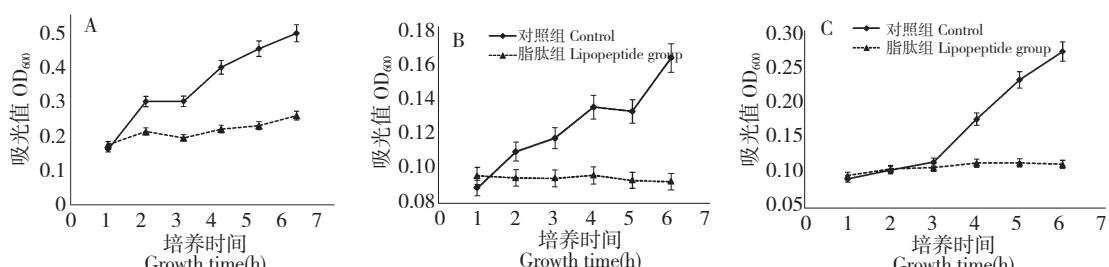


图 1 在 C-1 脂肽抑制作用下的 *B. cereus* CMCC63301 (A)、*B. cereus* MS10362R (B)、*E. coli* O157: H7 CDC157 (C) 生长曲线图

Fig. 1 Growth curves of *B. cereus* CMCC63301 (A), *B. cereus* MS10362R (B) and *E. coli* O157: H7 CDC157 (C) treated by C-1 lipopeptide

由该表数据得知, C-1 发酵上清液具有一定的抑菌活性, 当将脂肽类物质分离后, 余下的上清不具有抑菌效果, 而抑菌效果集中体现在分离出的活性脂肽类物质中。

2.2.2 测试菌在 C-1 脂肽作用下的生长曲线

以 *B. cereus* CMCC63301、产黑色素 *B. cereus* MS10362R、*E. coli* O157: H7 CDC157 作为测试菌, 进行生长曲线试验。在 24 孔板中加入培养基 2 mL 并接种, 根据平板抑菌实验结果, 加入 10 mg/mL 脂肽溶液 20 μ L, 使用酶标仪测定 6 h 内脂肽作用下的细菌生长曲线, 结果如图 1。

图 1 中对照组和脂肽处理组生长曲线有非常显著的差异, 表明 *B. amyloliquefaciens* C-1 脂肽溶液对于测试细菌的生长具有抑制作用。其中 C-1 脂肽对 *B. cereus* MS10362R 和 *E. coli* O157: H7 CDC157 的

抑制作用特别明显, 从开始接种到 6 h 测定结束, 这两株菌的生长抑制率分别稳定的保持在 96%、93%, 并且脂肽可以抑制 *B. cereus* MS10362R 产黑色素。脂肽对 *B. cereus* CMCC63301 的 6 h 生长抑制率为 75%。

2.3 解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* C-1 脂肽的稳定性

2.3.1 温度处理对 C-1 脂肽抑菌活性的影响

为了验证 C-1 抑菌脂肽对温度的敏感性, 对其分别进行了 50、80、120 $^{\circ}$ C 的处理, 处理后的 *B. amyloliquefaciens* C-1 脂肽溶液对受试菌进行抑菌活性试验, 分析数据绘制折线图并计算其抑菌率, 如图 2、表 2 所示。C-1 脂肽的抑菌活性并未受到高温的影响, 其抑菌活性基本维持在处理前的 94% ~ 97%。

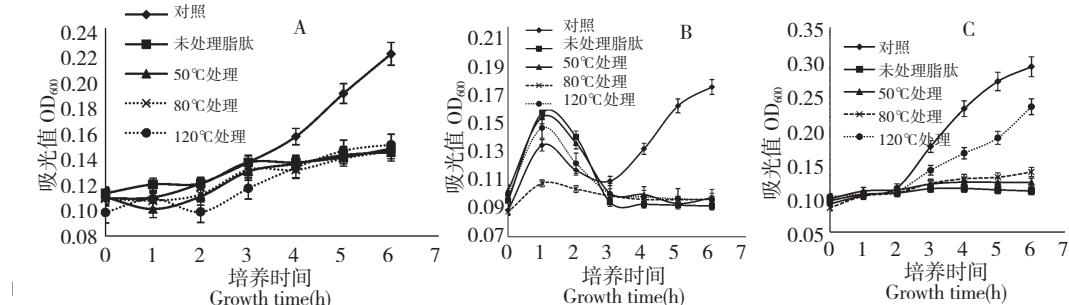


图 2 C-1 脂肽在不同温度处理下对 *B. cereus* CMCC63301 (A)、*B. cereus* MS10362R (B) 及 *E. coli* O157: H7 CDC157 (C) 的抑制活性

Fig. 2 Inhibition effect of C-1 lipopeptide with different treatment temperatures on the growth curve of *B. cereus* CMCC63301 (A), *B. cereus* MS10362R (B) and *E. coli* O157: H7 CDC157 (C)

2.3.2 蛋白酶处理对 C-1 脂肽抑菌活性的影响

用 4% 胃蛋白酶、10% 胰蛋白酶和 2% 蛋白酶 K (使用浓度为 0.1%) 于 37 $^{\circ}$ C 处理 C-1 脂肽溶液 1 h 后, 进行抑菌活性试验, 计算抑菌率。分析数据说明

经蛋白酶处理过 C-1 脂肽仍然具有抑菌活性, 抑菌活性几乎不受影响, 保持在原有活性的 90% 以上。结果见图 3、表 2。

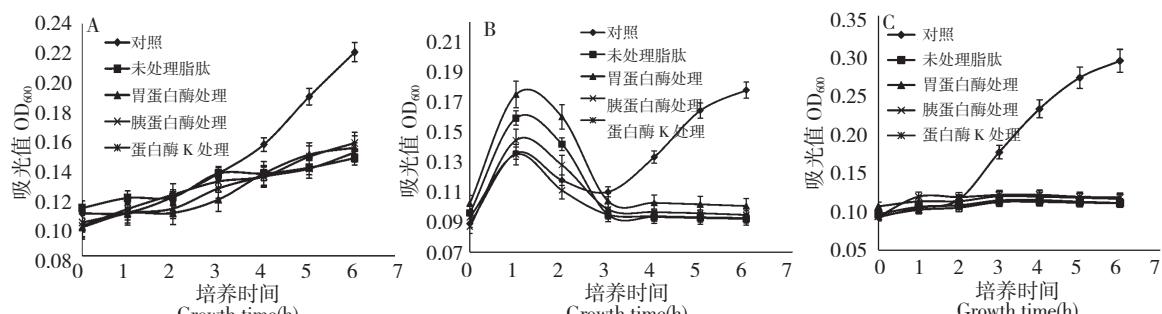


图 3 C-1 脂肽在不同蛋白酶处理下对 *B. cereus* CMCC63301 (A)、*B. cereus* MS10362R (B) 及 *E. coli* O157: H7 CDC157 (C) 的抑制活性

Fig. 3 Inhibition effect of C-1 lipopeptide with different protease treatment on the growth curve of *B. cereus* CMCC63301 (A), *B. cereus* MS10362R (B) and *E. coli* O157: H7 CDC157 (C)

2.3.3 有机溶剂处理对 C-1 脂肽抑菌活性的影响

分别用甲醇、乙腈、丙酮溶解脂肽,配成 10 mg/mL 脂肽溶液,对处理后的脂肽溶液进行抑菌活性试验,分别计算 C-1 脂肽对 3 种测试菌株培养 6 h 后

表 2 不同处理的 *B. amyloliquefaciens* C-1 脂肽对 *B. cereus* CMCC63301、*B. cereus* MS10362R、*E. coli* O157: H7 CDC157 生长的抑制率

Table 2 Inhibition rate of C-1 lipopeptide with different treatments on the growth of *B. cereus* CMCC63301, *B. cereus* MS10362R and *E. coli* O157: H7 CDC157

测试菌 Tested strains	脂肽 未处理 Untreated lipopeptide	抑制率 Inhibitory rate(%)								
		50 °C	80 °C	120 °C	0.1% 蛋白酶 K Proteinase K	0.1% 胃蛋白酶 Pepsin	0.1% 胰蛋白酶 Trypsin	甲醇 Methanol	丙酮 Butanol	乙腈 Acetonitrile
					0.1% 蛋白酶 K Proteinase K	0.1% 胃蛋白酶 Pepsin	0.1% 胰蛋白酶 Trypsin	甲醇 Methanol	丙酮 Butanol	乙腈 Acetonitrile
<i>B. cereus</i> CMCC63301	75%	75%	72%	70%	70%	65%	72%	74%	70%	71%
<i>B. cereus</i> MS10362R	96%	93%	94%	91%	93%	90%	95%	90%	90%	86%
<i>E. coli</i> O157: H7 CDC157	93%	88%	87%	92%	88%	92%	93%	88%	86%	84%

3 讨论与结论

解淀粉芽孢杆菌分布广泛,菌种资源丰富,代谢产物种类丰富,具有广泛的细菌真菌抑菌活性,但由于分离株众多,抑菌谱不一,发酵效率一般,某些代谢产物低毒性^[9](尚无致病性报道)等原因,还没有得到广泛的应用,随着代谢工程的发展,解淀粉芽孢杆菌的发酵效率,毒性产物与抑菌活性等能得到很好的调和,其在生物防治方面的应用可行性将得到很好的提升。

本实验室自行分离的 *B. amyloliquefaciens* C-1 菌株发酵液上清具有一定的抑菌活性,并且从发酵液上清中分离除了具有抑菌活性的粗脂肽。该脂肽对食源性致病菌有较强抑菌活性,0.1 mg/mL 的脂肽对指示菌产黑色素 *B. cereus* MS10362R、*B. cereus* CMCC63301 和 *E. coli* O157: H7 CDC157 的 6h 生长抑制率分别 96%、75%、93%;同时该脂肽性质稳定,在不同温度处理、蛋白酶处理和有机溶剂处理后均可保持较强的抑菌活性,均可保持原有活性的 90%以上,抑菌活性非常稳定,具有很好的开发利用潜力。与已报道的脂肽相比,其不具有拮抗真菌的作用(结果未显示)^[5,10]。这可能与其结构有关,目前已知的脂肽类物质有表面活性素(Surfactin)^[11]、芬芥素(Fengycin)^[12]、制磷脂菌素(Plipastatin)^[13]、伊枯草菌素(Iturins)^[14]等。目前已知表面活性素具有抑制细菌的功能,不具有抑真菌的活性。而 C-1 粗提脂肽经过高效液相色谱-质谱联用检测,发现

的抑菌率。分析数据说明有机溶剂对 C-1 脂肽的抑菌活性几乎没有影响,有机溶剂处理后的脂肽仍具有抑菌活性,并且可以保持原有活性的 90%以上,结果见表 2。

只有 1 组较集中的物质峰,预测分子量与伊枯草菌素较为接近。但是该脂肽为混合物,需经过进一步纯化才可确定分子组成。因此 C-1 的脂肽有可能是新的具有抑制细菌活性的伊枯草菌素,也可能是和伊枯草菌素分子量差异不大的新型脂肽类抗生素。

另外,实验所用的细菌为食源性致病菌^[7],与之前报道的解淀粉芽孢杆菌脂肽类物质作为生物防治活性物质不同,这提示我们 C-1 脂肽可作为潜在的生物型防腐剂应用于食品生产过程,延缓微生物生长,延长食品的货架期,具有较好的应用前景。

参考文献

- Caldeira AT, Santos Arteiro JM, Coelho AV, et al. Combined use of LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051. *Proc Biochem*, 2011, 46:1738-1746.
- Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol Biochem*, 2002, 34:955-963.
- Chen XH, Koumoutsaki A, Scholz R, et al. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol*, 2009, 140:27-37.
- Sutayak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA, et al. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Appl Microbiol*, 2008, 104:1067-1074.
- Romano A, Vitullo D, Senatore M, et al. Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Strain BO5A. *J Nat Prod*, 2013, 76:2019-2025.

- 6 Luo WJ, Wan Y, Zhang RJ, et al. Evaluation the antitumor effects of exopolysaccharide produced by newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* strain C-1. *J Pure Appl Microbiol*, 2014, 8:469-474.
- 7 Zhou WJ (周文杰), Yang J (杨建), Wan Y(万茵), et al. Antimicrobial activity on Food-Borne pathogens of extracellular fermented products from *Bacillus amyloliquefaciens* C-1. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:123-127.
- 8 Benitez LB, Velho RV, Lisboa MP, et al. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *J Microbiol*, 2010, 48:791-797.
- 9 Huang HX(黄虎翔), Zhang WM (张万民). Prevalence and toxic effect of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int J Lab Med* (国际检验医学杂志), 2010, 31:243-244.
- 10 Wang JJ (汪静杰), Zhao DY (赵东洋), Liu YG (刘永贵), et al. Antagonism against *Beauveria bassiana* by lipopeptides produced by endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* strain SWB16. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2014, 54:778-785.
- 11 Sen R. Surfactin; biosynthesis, genetics and potential applications. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 672:316-323.
- 12 Falardeau J, Wise C, Novitsky L, et al. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J Chem Ecol*, 2013, 39:869-878.
- 13 Roongsawang N, Thaniyavarn J, Thaniyavarn S, et al. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles*, 2002, 6:499-506.
- 14 Gong GD (龚谷迪), Zhou GT (周广田), Guo Y (郭阳), et al. Study and prospects for properties and identification of lipopeptide surfactin, iturin and fengycin. *China Food Addit* (中国食品添加剂), 2013, 3:211-215.