

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛИПОПЕПТИДОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* B15, МЕТОДОМ АНАЛИЗА НА ПОВЕРХНОСТИ ОТКЛИКА

Фань Синь, магистрант¹

Чжу Хунъюань, магистрант¹

Го Даньян, кандидат биологических наук, старший инженер¹

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»²

Юдина Татьяна Георгиевна, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология»³

Ван Дэлян, доктор, профессор¹

Китайский государственный НИИ пищевой и ферментативной промышленности
Китай, г. Пекин, тел.: 8(10-086)13301175863, e-mail: guody@mail.ru¹

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(8422)55-95-34, fvm.zol@yandex.ru²

Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова³

119234. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, 8 (495) 939-27-76³

Ключевые слова: культуральная среда, брожение, оптимизированный, липопептиды.

В статье отражены результаты исследований по подбору оптимальных соотношений компонентов питательной среды и условий культивирования для увеличения выхода антибактериальных липопептидов. Подбор источников углерода и азота методами планирования Плакетта-Бермана, «наискорейшего подъёма» и анализа на поверхности отклика позволило оптимизировать состав питательной среды и условия культивирования. В результате проведенных исследований получили следующий состав среды: глюкоза – 36,28 г/л, порошок дрожжевого экстракта – 12,77 г/л, $MgSO_4$ – 0,5 г/л, KCl – 0,5 г/л, KH_2PO_4 – 1,0 г/л, $FeSO_4$ – 0,15 мг/л, $MnSO_4$ – 5,0 мг/л, $CuSO_4$ – 0,16 мг/л. Наибольшего выхода продуктов ферментации добились при следующих условиях культивирования: количество посевного материала – 4%, начальный pH – 6,82, температура 37°C, время – 51,69 ч, частота вращения качалки – 225 об/мин, объем жидкости – 100 мл.

Введение

Как только Арима и др. [1] обнаружили, что *Bacillus subtilis* (сенная палочка) способна синтезировать сурфактин, исследователи обратили своё внимание на поиск штаммов бактерий из числа бацилл, синтезирующих липопептиды. Липопептид представляет собой биологическое поверхностно активное вещество (био-ПАВ), состоящее из гидрофильной пептидной и липофильной цепи алифатического углеводорода.

По химическому составу липопептиды – это циклические соединения, имеющие в пептидной части β -аминогруппу или β -гидроксизирную кислоту. В зависимости от аминокислотной последовательности и ответвлений жирных кислот, липопептиды подразделяются на три категории: 1) итурины, в т. ч. итурин А, микосубтилин и бацил-

ломицин; 2) фенгицины, в т. ч. плипастатин; 3) сурфактины – наиболее хорошо исследованные среди липопептидов, в т. ч. и среди множества соединений с биологической активностью [7, 8].

Помимо поверхностной активности некоторые липопептиды проявляют также фунгицидную, бактерицидную, противовирусную, противоопухолевую и другие виды биологической активности [2]. В последние годы было проведено множество исследований, свидетельствующих о том, что, кроме *B. subtilis*, противомикробные липопептиды способны синтезировать также другие виды бацилл: *B. amyloliquefaciens* [1,2], *B. licheniformis* [3], *B. circulans* [4], *B. cereus* [5], *B. pumilus* [6] и др.

Штамм бацилл B15, способный синтезировать липопептиды, был выделен нами с кожицы виноградины и идентифицирован

как *B. amyloliquefaciens*.

В представленном исследовании нами был увеличен выход липопептидов при культивировании *B. amyloliquefaciens* B15 при оптимизации количества источников углерода и азота при использовании методов Плакетта-Бермана, Бокса-Бенкена и схему «наискорейшего подъёма».

Объекты и методы исследований

В работе использовали штамм бацилл *B. amyloliquefaciens* B15, выделенный из кожицы виноградины, который хранится в Китайском государственном НИИ пищевой и ферментативной промышленности.

Питательные среды и условия культивирования

В качестве питательных сред были использованы: картофельный агар с декстрозой (КАСД); питательный бульон (ПБ); питательная среда Ланди, состоящая из 30 г глюкозы, 5 г глутамата натрия, 0,5 г $MgSO_4$, 0,5 г KCl 1,0 г KH_2PO_4 , 0,15 мг $FeSO_4$, 5,0 мг $MnSO_4$, 0,16 мг $CuSO_4$, 1000 мл H_2O ; pH среды доводили до 7,0. Посевную колбу с ПБ (коническая колба Эрленмейера объёмом 250 мл, объём жидкости 100 мл) помещали на 24 часа в орбитальный шейкер с частотой встряхивания 120 об/мин при температуре 37°C.

Культуру бацилл в количестве 4% от объёма 100 мл среды Ланди высевали в коническую колбу Эрленмейера объёмом 250 мл и помещали на 24 часа в инокулятор с частотой встряхивания 180 об/мин при температуре 30°C.

Суммарный экстракт липопептидов

На этом этапе исследований экстрагирование липопептидов из *B. amyloliquefaciens* B15 проводили промышленным методом [7], для чего суспензию культуры микроорганизмов помещали в центрифугу и центрифугировали при температуре 4°C при 8000 об/мин в течение 20 минут, в результате чего бактериальные клетки выпадали в осадок. Шестимолярным хлороводородом доводили pH бесклеточной надосадочной жидкости до уровня 6, а затем помещали её на ночь в холодильник при температуре 4°C. Полученный осадок повторно центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 мин, экстрагировали добавлением метанола, встряхивали на шейкере при температуре 25°C и частоте встряхивания 120 об/мин в течение 30 мин. Полученный экстракт фильтровали через политетрафторэтиленовую мембрану.

Квантизация липопептидов ВЭЖХ-хроматографией

Квантизацию липопептидов высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) проводили в соответствии с предыдущими исследованиями путём внесения некоторых доработок [12,13].

При постановке данного эксперимента применяли метод квантизации липопептидов методом ВЭЖХ, который впервые был опубликован в работах Чжучжэня [7], Д. Витуло [8] и др. При этом нами были внесены некоторые изменения в методику постановки эксперимента. Используя ВЭЖХ, обнаружили соединения липопептидов на обращённо-фазовой колонке, имеющей привитую фазу C18 с размерами 4,6 мм × 250 мм × 0,5 мкм, 110 А. Температура колонки была равна 30°C, детекция - 210 нм, скорость потока 1 мл/мин, объём 20 мкл. При обнаружении итуринина А в систему «ацетонитрил – вода» (2:3) в качестве элюента добавляли 0,1 % трифторацетической кислоты (ТФА) на 20 минут. Площадь пика (х) и итуринина А (у) для калибровочной кривой была равна: $y = 7E-05x + 11.88$ ($R^2 = 0.9913$).

При обнаружении сурфактина в систему «ацетонитрил – вода» (4:1) в качестве элюента добавляли 0,1 % трифторацетической кислоты (ТФА) на 30 минут. Площадь пика (х) и сурфактина (у) для калибровочной кривой равнялись: $y = 0.0001x + 21.945$ ($R^2 = 0.9964$). Согласно приведённым уравнениям калибровочных кривых, составленных на основе площадей пика, рассчитывали доли итуринина А и сурфактина.

Фунгицидная активность

Антимикробная активность обнаружена в соответствии с результатами предыдущих исследований с некоторыми изменениями [14, 7]. Для изучения фунгицидной активности культуру плесневых грибов *Botrytis cinerea*, хранящуюся при температуре 4°C, высевали на скошенный агар КАСД и инкубировали в течение 7 суток при температуре 25°C. Далее готовили содержащую споры суспензию со стерильным буферным раствором, содержащим 0,5% NaCl, 15% глицерина и 1 % Твин-20 (полисорбата-20). Споровую суспензию в количестве 200 мкл засеивали в чашки Петри, оставляли на три часа для диффузии микроорганизмов в питательную среду и делали в агаре отверстия для внесения в них исследуемого экстракта липопептидов.

В каждое отверстие вносили по 80 мкл экстракта, в качестве контроля использовали метанол. Чашки выдерживали в термостате при температуре 25°C в течение 5 суток, а затем измеряли диаметр зон отсутствия роста плесневых грибов (ингибирующих зон или пятен, свидетельствующих о гибели микроорганизмов на данном участке среды).

Влияние источников углерода и азота на продуцирование липопептидов и их бактерицидную активность

В этом опыте глюкоза и глутамат натрия в основной ферментируемой среде были заменены на другие источники углерода: мальтозу, фруктозу, сахарозу, ксилозу, соевую, пшеничную и кукурузную муку. В качестве источника азота использовали глутамат натрия, пептон, дрожжевой экстракт, мясокостную и соевую муку, мочевины, сульфат и нитрат аммония. Долю и бактерицидную активность сурфактина определяли методами, описанными ранее.

Опыт оптимизации среды

Планы Плакетта-Бермана

На этом этапе исследований компоненты среды и условия ферментации были рассчитаны с помощью планов Плакетта-Бермана для четырнадцати переменных на двух

уровнях. Переменные представляли собой следующие четырнадцать факторов: глюкоза (X1), порошок дрожжевого экстракта (X2), $MgSO_4$ (X3), KCl (X4), KH_2PO_4 (X5), $FeSO_4$ (X6), $MnSO_4$ (X7), $CuSO_4$ (X8), количество посевного материала (X9), начальный pH (X10), температура (X11), время брожения (X12), частота вращения (X13), объём заливаемой жидкости (X14). Все эксперименты были рассчитаны с помощью программы Design Expert v 8.0, выполнены трехкратно. В результате проведенных исследований нами было рассчитано количество средних величин выхода липопептидов (табл. 1).

Метод «наискорейшего подъёма»

При анализе результатов, полученных по плану Плакетта-Бермана, нами были выбраны факторы, наиболее значительно влияющие на выход липопептидов. Траекторию метода «наискорейшего подъёма» (в том числе изменения направления и длина шага) определяли методом идентификации влияния каждого значимого фактора и условий, при которых был получен максимальный выход липопептидов.

Планы Бокса-Бенкена

В данном исследовании были приняты четыре ключевых переменных с тремя уровнями концентрации. Для экспериментального планирования и статистического анализа использовалась программа Design Expert v 8.0.6.1.

Результаты исследований

Влияние источников углерода и азота на количество синтезируемых бациллами липопептидов и их фунгицидную активность

Как видно на рис. 1 и 2, различные источники углерода и азота имели значительное влияние на производство липопептидов. При использовании глюкозы и порошка дрожжевого экстракта в качестве источников углерода и азота соответственно выход липопептидов оказался значительно выше, чем

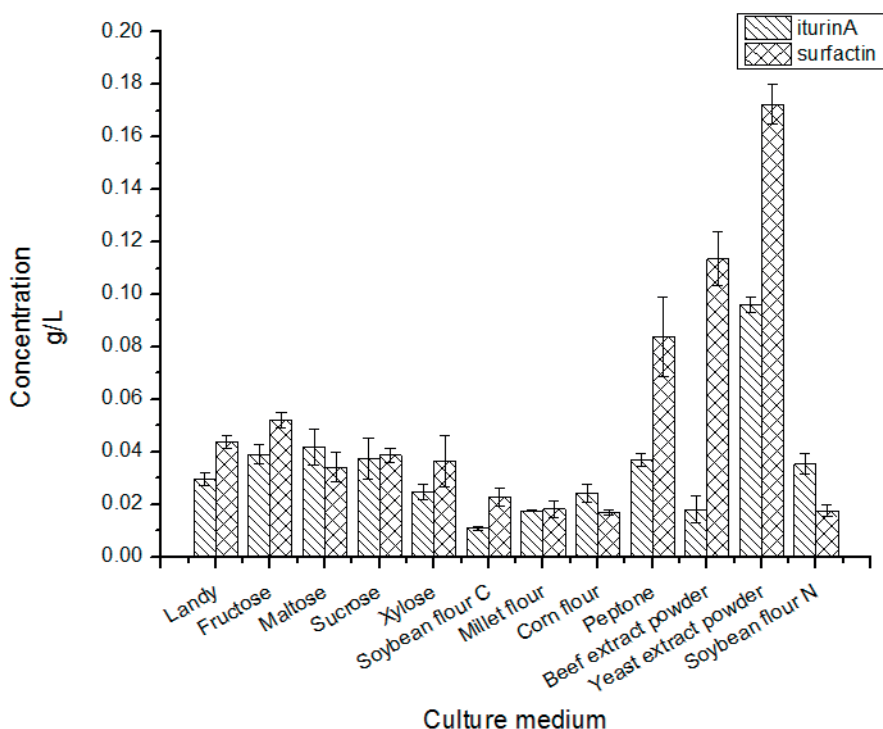


Рис. 1 – Влияние источников углерода и азота на производство липопептидов B15.

при использовании других компонентов. Так, выход итирина А и сурфактина составил 0,09283 г/ли 0,18583 г/л соответственно, а диаметр ингибирующей зоны – 25,22 мм.

Для уменьшения затрат в качестве источников углерода и азота использовали фруктозу и порошок дрожжевого экстракта, а также кукурузную и соевую муку, но эффект в обоих случаях оказался незначительным.

Планы Плаккетта-Бермана

Результаты расчётов выхода липопептидов в соответствии с планами Плаккетта-Бермана показаны в табл. 1.

Из результатов регрессионного анализа, отраженных в табл. 2, следу-

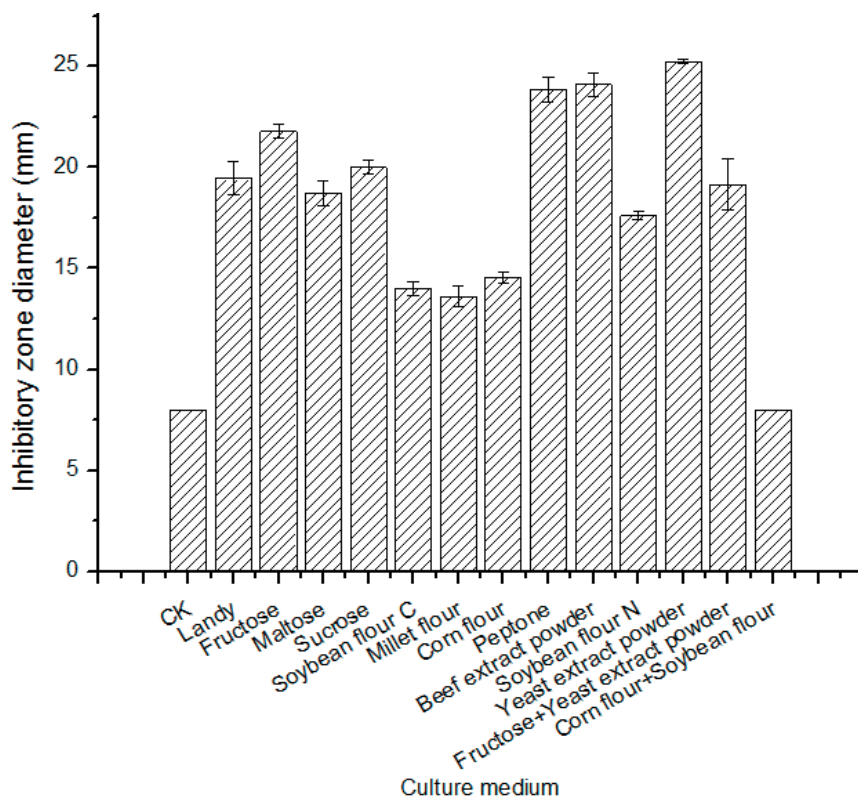


Рис. 2 – Влияние источников углерода и азота на диаметр ингибирующей зоны.

Таблица 1

Результаты расчётов по планам Плаккетта-Бермана

№ п/п	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	Липопептиды γ, г·л ⁻¹
1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	0.2311
2	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	0.1714
3	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	0.1655
4	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	0.1156
5	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	0.2871
6	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0.2054
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.1100
8	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	0.2063
9	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	0.1877
10	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0.2794
11	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	0.1490
12	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	0.1351
13	1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.1711
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	0.1544
15	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0.2144
16	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	0.2255
17	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	0.1142
18	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	0.1722
19	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	0.1235
20	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	0.1030

Таблица 2

Регрессионный анализ результатов эксперимента по планам Плакетта-Бермана

Входной параметр	Уровни		Эффект	F-величина	Р-величина возможно > F	Очередность
	низкий (-1)	высокий (+1)				
X_1	30	40	+0.021	17.8547	0.0083**	3
X_2	10	14	+0.023	18.0229	0.0081**	2
X_3	0.4	0.6	+3.716E-003	0.3384	0.5860	12
X_4	0.4	0.6	+3.590E-003	0.4449	0.5343	10
X_5	0.8	1.2	+3.277E-003	0.4177	0.5466	11
X_6	0.12	0.18	+0.012	5.8888	0.0596*	6
X_7	4	6	-9.987E-003	3.8798	0.1060	7
X_8	0.12	0.18	+9.843E-003	3.7693	0.1099	8
X_9	2	3	-5.266E-004	0.0108	0.9213	14
X_{10}	6.5	7.5	+0.019	14.0979	0.0132**	4
X_{11}	25	35	+3.473E-003	0.4693	0.5238	9
X_{12}	48	72	-0.026	23.3531	0.0047**	1
X_{13}	150	225	+0.014	7.1390	0.0442**	5
X_{14}	70	100	+5.666E-004	0.0125	0.9154	13

Таблица 3

Результаты расчётов по методу «наискорейшего подъёма»

№ п/п	Глюкоза, г/л	Порошок дрожжевого экстракта г/л	Начальный pH	Время, ч	Выход липопептидов, г/л
1	30	8	6.0	72	0.0702
2	33	10	6.5	60	0.1425
3	36	12	7.0	48	0.2319
4	39	14	7.5	36	0.1729
5	42	16	8.0	24	0.0881

ет, что наиболее значимыми четырьмя факторами являются X_{12} (время) > X_2 (порошок дрожжевого экстракта) > X_1 (глюкоза) > X_{10} (начальный pH). Таким образом, положительный эффект на выход конечного продукта ферментации оказали глюкоза, порошок дрожжевого экстракта и начальный pH, тогда как время сбраживания дало отрицательный эффект. Поэтому эти составляющие нами были выбраны в качестве значимых входных параметров эксперимента.

Метод «наискорейшего подъёма»

При анализе результатов планов Плакетта-Бермана траектория метода «наискорейшего подъёма» оказалась следующей: глюкоза, дрожжевой экстракт и начальный

pH произвели положительные эффекты, поэтому следует увеличить доли компонентов в соответствии с известным уклоном; время сбраживания оказало отрицательное воздействие, и его следует уменьшить в соответствии с известным уклоном. Остальные десять факторов выступили в качестве начальных дополнительных компонентов.

Чтобы определить оптимальный диапазон четырёх значимых факторов, был определён выход бактерицидных липопептидов. Результаты показаны в табл. 3.

В табл. 3 показана картина колебаний выхода липопептидов с изменением каждого из факторов. При значениях, равных 36 г/л, 12 г/л, 7,0 и 48 ч для глюкозы, порошка дрожжевого экстракта, начального pH и времени сбраживания соответственно, выходная величина была максимальной. Поэтому эти условия были выбраны в качестве центральной точки.

Планы Бокса-Бенкена

При расчётах по планам Бокса-Бен-

Таблица 4

Уровни и кодирование планов Бокса-Бенкена

Фактор	Входной параметр	Уровни		
		-1	0	+1
X1	Глюкоза, г/л	33	36	39
X2	Порошок дрожжевого экстракта, г/л	10	12	14
X3	Начальный, pH	6.5	7.0	7.5
X4	Время, ч	36	48	60

Таблица 5

Результаты расчётов по планам Бокса-Бенкена

№ п/п	X1	X2	X3	X4	Выход липопептидов, г/л
1	0	0	0	+1	0.3312
2	0	+1	0	0	0.3087
3	-1	+1	0	0	0.3171
4	0	+1	0	-1	0.2662
5	+1	+1	0	0	0.3206
6	0	0	1	+1	0.2010
7	0	0	0	0	0.3087
8	0	-1	0	-1	0.2469
9	0	-1	+1	0	0.2285
10	0	+1	-1	0	0.3188
11	0	-1	0	+1	0.2802
12	0	0	-1	+1	0.2802
13	0	0	+1	-1	0.2586
14	-1	-1	0	0	0.3009
15	0	-1	-1	0	0.2892
16	-1	0	-1	0	0.2742
17	0	0	0	0	0.3387
18	-1	0	0	+1	0.3018
19	0	0	-1	-1	0.2087
20	-1	0	+1	0	0.2371
21	+1	0	-1	0	0.3107
22	+1	0	0	+1	0.2721
23	+1	-1	0	0	0.3082
24	0	+1	+1	0	0.2329
25	+1	0	0	-1	0.2447
26	-1	0	0.000	-1	0.2578
27	+1	0	+1	0	0.2485

кена глюкоза, порошок дрожжевого экстракта, начальный pH и время сбраживания рассматривались как независимые переменные. Уровни факторов, кодированные величины, расчёты и результаты эксперимента показаны в таблице 4 и таблице 5.

Величина выхода липопептидов принималась за значение отклика в соответствии с результатами эксперимента по планам Бокса-Бенкена (табл. 5). Регрессионный анализ (табл. 6) был проведён с помощью программы Design Expert 8.0. Квадратное уравнение множественной регрессии приняло следующий вид: $Y=0.33+0.001325A+0.006836B-0.023C+0.015D-0.0095AB-0.006275AC-0.00415AD-0.0063BC-0.00115BD-0.032CD-0.011A^2-0.011B^2-0.049C^2-0.042D^2$, $R^2=0.8584$.

Как видно из табл. 6, входные параметры C, CD, C² и D² оказались наиболее значимыми, параметр D – значимым, в то время как неадекватность незначимой. На основании этого можно считать, что модель пригодна для анализа эксперимента.

На основании выше приведённого анализа экспериментальных данных был спрогнозирован выход липопептидов. При значениях входных параметров, равных 36,28 г/л, 12,77 г/л, 6,82 и 51,69 ч для глюкозы, порошка дрожжевого экстракта, начального pH и времени сбраживания соответственно, спрогнозированная величина выхода липопептидов была равна 0,3356 г/л.

Проверочные испытания проводили при этих оптимальных условиях. Выход липопептидов составил 0,3309 г/л, что оказалось очень близко к предсказанному значению.

Выводы

Посредством планов Плакетта-Бермана, метода «наискорейшего подъёма» и планов Бокса-Бенкена были оптимизированы условия сбраживания и количество источников углерода и азота для питательной среды. Оптимальный состав питательной среды включал следующие компоненты: 36,28 г/л глюкозы и 12,77 г/л порошка дрожжевого экстракта при pH, равном 6,82. Оптимальным временем сбраживания была 69-часовая инкубация. При данных показателях вы-

ход липопептидов увеличился с 0,2686 г/л до 0,3309 г/л. Таким образом, производительность процесса увеличилась на 23,19 %. Исследования также показали существенное

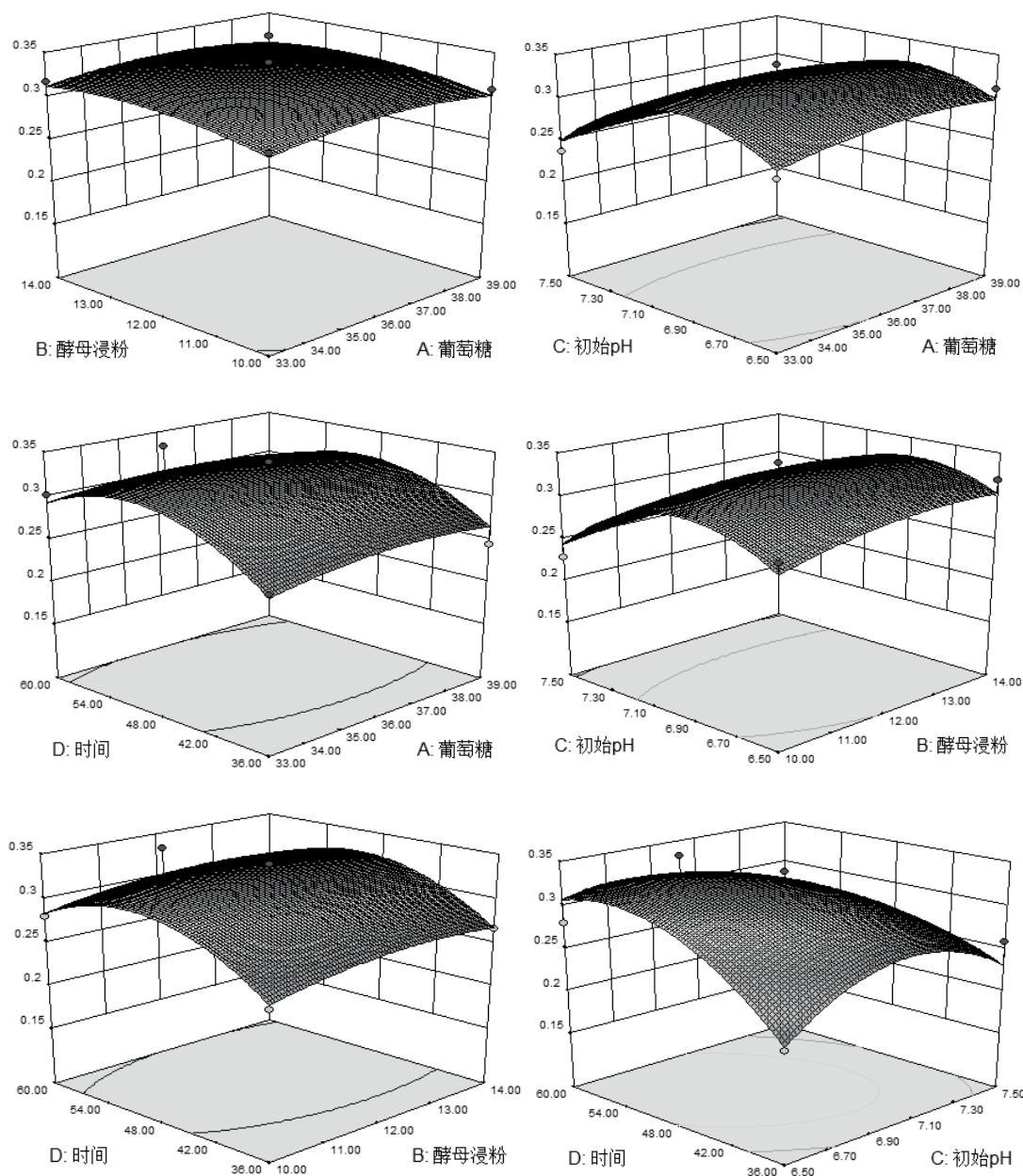


Рис. 3 – Графики поверхностей отклика для четырёх факторов.

увеличение выхода липопептидов по сравнению с применением среды Ланди и глутамата натрия в качестве источника азота.

Библиографический список

1. Kei A, Atsushi K, Gakuzo T. Surfactin a crystalline peptidelipid surfactant produced by bacillus subtilis isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1968, 31(3):488-496.
2. Martin K, Joachim V, Britta K, et al. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by Bacillus subtilis OKB 105[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1998, 204: 1-8.
3. Syuntaro H, Shigenobu Y, Hajime S, et al. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by Bacillus amyloliquefaciens RC-2[J]. Phytichemistry, 2002, 61: 693-698.
4. Koumoutsi A, Chen X H, Henne A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in Bacillus amyloliquefaciens strain Fzb42[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186: 1084-1096.
5. Hathout Y, Ho Y P, Ryzhov V, et al. Kunstakins: a new class of lipopeptides isolated from Bacillus thuringiensis[J]. Journal of Natural Products, 2002, 63: 1492-1496.

Таблица 6

Регрессионный анализ результатов эксперимента по плану Бокса-Бенкена

Входной параметр	SS	df	mf	F-величина	P-величина возможно>F
А-глюкоза	2.107E-005	1	2.107E-005	0.048	0.8308
В-порошок дрожжевого экстракта	5.200E-004	1	5.200E-004	1.18	0.2991
С-начальныйрН	6.311E-003	1	6.311E-003	14.29	0.0026**
Д-время	2.448E-003	1	2.448E-003	5.54	0.0364*
AB	3.610E-006	1	3.610E-006	8.177E-003	0.9294
AC	1.575E-004	1	1.575E-004	0.36	0.5614
AD	6.889E-005	1	6.889E-005	0.16	0.6998
BC	1.588E-004	1	1.588E-004	0.36	0.5599
BD	3.419E-006	1	3.419E-006	7.744E-003	0.9313
CD	4.167E-003	1	4.167E-003	9.44	0.0097**
A ²	5.868E-004	1	5.868E-004	1.33	0.2714
B ²	5.405E-004	1	5.405E-004	1.22	0.2902
C ²	0.012	1	0.012	27.27	0.0002**
D ²	7.489E-003	1	7.489E-003	16.96	0.0014**
Модель	0.032	14	2.294E-003	5.20	0.034**
Остаток	5.298E-003	12	4.415E-004		
Неадекватность	4.848E-003	11	4.407E-004	0.98	0.6660
Истинная ошибка	4.500E-004	1	4.500E-004		
Всего	0.037	26			

Примечание: символы *и **указывают на значимость при 0,05 и 0,01 соответственно.

6. Perez C, Suarez C, G.R. Castro. Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster[J]. Folia of Microbiology, 1993, 38: 25-28.

7. Nishikori T, Naganawa H, Muraoka Y et al. Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-Ff67. . Structural elucidation of plipastatins[J]. The Journal of Antibiotics, 1986, 39: 755-761.

8. Marikawa M, Ito M, Tadayuki I. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, And Cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1 [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, 74:255-216.

9. Marc O, Philippe J. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16: 115–25.

10. Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, et al.

Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140, 27–37.

11. Lee SC, Kim SH, Park IH, et al. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity[J]. Arch Microbiol, 2007, 188: 307–312.

12. Zhu Zhen, Luo Yi, Zhang Peng, et al. Screening a surfactin and iturin A producing strain and characterization of its lipopeptide products[J]. Microbiology China, 2011, 38(10): 1488-1498.

13. D. Vitullo, A. Di Pietro, A. Romano, et al. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*[J]. Plant Pathology , 2012, 61: 689–699.