

高抑菌活性物质产生菌的选育、优化及其特性表征

李 勋, 周楠迪, 田亚平*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌能力作为指标,从实验室保藏菌株中筛选出一株产抑菌活性物质水平较高的菌株 JN-814C,经鉴定其为地衣芽孢杆菌。进一步研究该菌株产生与分泌细菌素的特性,确定其最适培养基为糊精 2.5 g/L,酵母粉 7.5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,氯化钠 3 g/L,最佳培养条件为培养时间 22 h,培养温度 37 °C,初始 pH 7.0,装液量 50 mL,接种量 2%。通过硫酸铵分级沉淀与 DEAE-Sephrose-FF 阴离子交换层析可初步纯化得到抑菌活性物质样品。纯化后的抑菌物质对革兰氏阳性菌有较好的拮抗性,对样品进行蛋白酶处理与氨基酸分析,发现其对碱性蛋白酶敏感,组成中谷氨酸含量较高,对温度、酸碱的敏感性较低,因此可基本被确定为一种抑菌肽。

关键词: 地衣芽孢杆菌;细菌素;发酵优化;分离纯化;特性

中图分类号:Q 819 文章编号:1673-1689(2019)10-0144-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.020

Screening of Bacteriocin Producing Bacillus and Study on Fermentation Conditions and Its Antibacteriocin's Properties

LI Xun, ZHOU Nandi, TIAN Yaping*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, bacterial strain preserved in laboratory was chosen with the inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*, it was identified as *Bacillus licheniformis* JN-814C. The optimal conditions for *Bacillus licheniformis* JN-814C to produce bacteriocin were as follow: 2.5 g/L dextrin, 7.5 g/L yeast extract, 10 g/L peptone, 3.0 g/L NaCl, at pH 7.0 and at 37 °C for 22 h, with an inoculum density of 2% and inoculum age of 22 h, with fluid volume 50 mL/250 mL. The bacteriocin was purified through salting-out 40-80% and DEAE-Sephrose-FF anion exchange chromatography respectively. This purified bacteriocin had the inhibitory activity on gram-positive bacterium. It is sensitive to alkaline protease and is not sensitive to temperature or acid or alkali and it have high glutamate content. Therefore, it can be basically determined as an antibacterial peptide.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, bacteriocin, fermentation conditions, purification, characteristics

收稿日期: 2017-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601558)。

* 通信作者: 田亚平(1964—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物活性物质方面的研究。E-mail:yapingtian@hotmail.com

引用本文: 李勋,周楠迪,田亚平,等. 高抑菌活性物质产生菌的选育、优化及其特性表征[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(10):144-151.

抗生素是全球最广泛使用的抗菌药物,但其在医药与畜牧方面的过度使用造成严重后果,耐抗生素细菌的出现,使得抗生素的使用面临严重挑战^[1-2],因此,寻找可代替传统抗生素药物且对人体与环境无毒害、无残留的天然抑菌物质成为研究热点,细菌素独特的优点,使其成为抗生素类药物替代品的首要选择,在生物饲料添加剂、微生态制剂^[3]、生物药品等领域具有较好的应用前景^[4]。细菌素是由某些细菌代谢过程中通过核糖体合成的一类具有抑菌活性的多肽或蛋白复合物^[5]。芽孢杆菌(*Bacillus*)在自然界中分布广泛,生理特性丰富,能够产生酶类、胞外杆菌肽、大环内酯、类噬菌体颗粒等多种拮抗物质^[5-6]。

地衣芽孢杆菌能够代谢产生多种物质,在工业和医药业中应用较多,是一种具有极高应用价值的微生物^[7]。地衣芽孢杆菌产抑菌活性物质种类较多,其中,抗菌肽因其可作为抗生素的替代品,受到重视。Mendo 等^[8]报道地衣芽孢杆菌 189 可产生抑菌多肽,可以抑制革兰氏阳性菌株的生长。樊陈^[1]等从地衣芽孢杆菌发酵液中分离出一种具有广谱抑菌效果的抗菌肽,该抑菌肽对革兰氏阳性菌株抑制效果优于革兰氏阴性菌株。纪兆林等^[9]对地衣芽孢杆菌培养条件进行优化,抑菌率提升了 34.6%,并从发酵液中分离出一种稳定性高的抑菌肽。

本研究从实验室保藏菌株中筛选出一株高抑菌活性物质产生菌,对其菌落形态、生理生化特征与 16S rRNA 基因水平鉴定。通过单因素试验与正交试验,确定其最适发酵培养基与培养条件。使用硫酸铵分级盐析与离子交换层析对发酵液中抑菌物质进行分离,并对分离纯化所得抑菌物质的特性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 实验室保藏菌株 JN-814B、JN-814C、JN-814D、JN-814E、JN-814、JN-814G、JN-814LX、凝结芽孢杆菌 ACCC10229、凝结芽孢杆菌 CICC21736、凝结芽孢杆菌 0076(T)。

1.1.2 指示菌株 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*E.coli*)、酵母菌(*Yeast*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

1.1.3 培养基 LB 培养基;YPD 培养基;PDA 培养基。固体培养基向其中添加 1.5%~2%琼脂粉。

初始培养基:葡萄糖 10 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,氯化钠 10 g/L。

1.2 方法

1.2.1 抑菌活性物质的检测 采用管碟法^[10]检测抑菌活性物质。

1.2.2 目的菌株的选育 将实验室保藏菌株分别活化后,接种入 LB 培养基,适宜条件下培养 12 h,发酵液 10 000 r/min,4 ℃离心 20 min,以金黄色葡萄球菌为指示菌,以管碟法测定上清液对其的抑制作用,选择抑菌效果最佳的菌株作为目标菌株。

1.2.3 发酵培养基的优化 采用单因素实验,将初始培养基中碳源葡萄糖分别替换为蔗糖、乳糖、麦芽糖、环糊精、玉米淀粉,将其中氮源物质胰蛋白胨替换为鱼粉蛋白胨,豆饼、豆粕、硫酸铵、尿素,将其中无机盐分别替换为氯化钾,磷酸氢二钾,磷酸氢二钠,硫酸镁。分别对单因素优化出的 3 个营养元素与酵母粉进行添加量优化。根据优化结果,设置 3 个水平对其进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。

1.2.4 发酵条件的优化 使用优化后的培养基进行发酵,在其他条件不变的情况下,分别对发酵初始 pH,装液量,发酵温度,接种量,发酵时间进行优化。

1.2.5 优化结果的验证 为验证培养基与培养条件优化结果的可靠性,对优化后的培养基组成与培养条件进行验证,分别以优化前与优化后进行发酵培养,检测发酵液上清液的抑菌效果。

1.2.6 抑菌效价的计算 抑菌效价计算采用管碟法:二剂量法^[11]。

1.3 抑菌活性物质的分离纯化

1.3.1 硫酸铵分级盐析^[12] 将发酵液离心,取上清液,分别向其中添加硫酸铵至饱和度为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%,离心,取沉淀,将沉淀溶于 50 mmol/L,pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液中,将溶解液置于缓冲液中透析除盐^[13],检测透析液的抑菌活性^[14]。

1.3.2 DEAE-Sephrose-FF 阴离子交换层析 硫酸铵沉淀后的溶解液,DEAE-Sephrose-FF 阴离子交换层析柱经 0.05 mmol/L,pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液平衡后,上样量 1 mL,使用 0%、27%、46%、100% 1 mol/L NaCl Tris-HCl 缓冲液进行梯度洗脱,检测

波长 280 nm,收集各峰组分并浓缩,检测其抑菌活性^[15]。

1.4 抑菌肽的特性研究

1.4.1 抑菌肽蛋白酶敏感性 取阴离子交换分离后的抑菌活性物质样品,分别置于 6 支试管中,调节 pH 至所用蛋白酶最适pH,分别加入酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶,木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、亮氨酸氨肽酶、脯氨酸氨肽酶,使酶的最终浓度为 10 mg/mL,对照组添加无菌水,在各酶最适温度水浴 30 min 后调 pH 至中性。检测各组样品抑菌活性。

1.4.2 抑菌肽氨基酸组成分析 对离子交换后所得抑菌肽进行浓盐酸水解,高效液相色谱检测水解后样品中的氨基酸组成,与未经水解的样品进行对比,获得目标抑菌肽的氨基酸组成。

1.4.3 抑菌肽温度稳定性 取阴离子交换分离后的抑菌活性肽样品,配置成 0.02 g/mL 溶液,放入离心管中,分别置于 50,60,70,80,90,100 ℃条件下水浴 20 min,冷却至室温后测定抑菌活性。

1.4.4 抑菌肽 pH 稳定性 取 7 管阴离子交换分离后的抑菌活性肽样品,使用 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液与 0.05 mol/L HCl 分别调整 pH 4~10,37 ℃处理 12 h,调整 pH 至 7.0 后测定其抑菌活性

1.4.5 抑菌肽抑菌谱 将硫酸铵初步分离得到的抑菌肽分别对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、酵母等菌株做抑菌活性检测。

2 结果与分析

2.1 抑菌活性物质产生菌的选育

2.1.1 目的菌株的选择 将实验室保藏的 10 株菌发酵液上清液抑菌效果如图 1 所示。其中,菌株 JN-814C 抑菌圈直径最大,对金黄色葡萄球菌抑制效果最明显,故选择菌株 JN-814C 为抑菌活性物质产生菌进行研究。

2.1.2 菌株 JN-814C 的鉴定 菌株 JN-814C 在 LB 培养基上生长良好,菌落为浅黄色圆形菌落,不透明,表面光滑,菌落边缘呈不规则状。其生理生化特征见表 1。

对菌株 JN-814C 进行 16S rRNA 测序,将所测得的序列与 Genbank 中的 16S rRNA 相似性进行比较。菌株 JN-814C 与 *Bacillus cheniformis* 的 16S

rRNA 序列同源性达到 99%以上。

综合生理生化鉴定和 16S rRNA 测序结果,可以认为菌株 JN-814C 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus cheniformis*) 的一个亚种。

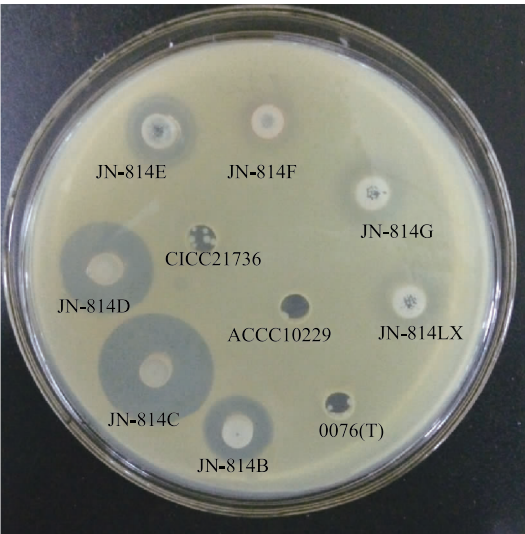


图 1 实验室保藏菌株发酵液上清液抑菌效果
Fig. 1 Antibacterial results of differernt bacterial strains preserved in the laboratory

表 1 菌株 JN-814C 生理生化特征
Table 1 Physio-biochemical characteristics of strain JN-814C

检测内容	检测结果
革兰氏染色	+
芽孢染色	+
37℃生长	+
厌氧生长	+
7%NaCl 生长	+
淀粉水解试验	+
甲基红试验	+
V-P 试验	+
明胶液化试验	+
葡萄糖氧化发酵	+

2.2 菌株 JN-814C 产抑菌活性物质的优化

2.2.1 菌株 JN-814C 细胞生长与发酵曲线 由图 2 可知,菌株 JN-814C 接种入发酵培养基后即开始产生抑菌活性物质,在 22 h 时分泌产物抑菌圈直径达到最大值,抑菌净直径约为 23 mm,发酵 30 h 以后,由于培养基中营养物质被消耗,不利于代谢产物积累,发酵液中活菌数量也逐渐减少,同时,产物

抑菌圈直径开始逐渐下降,发酵液中抑菌活性物质的量开始减少。因此推断抑菌活性物质主要产生于菌体生长的对数期,在发酵后期抑菌活性物质的减少可能与菌体分泌蛋白酶有关。故选择 22 h 作为发酵培养周期。

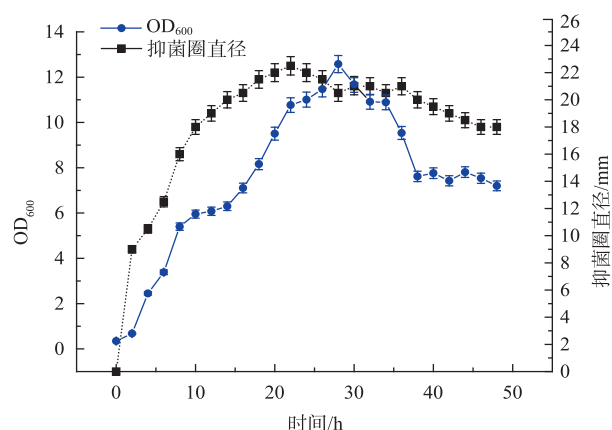


图 2 菌株 JN-814C 产抗菌物质的发酵曲线

Fig. 2 Fermentation curve of strain JN-814C for an antibacterial substance productionan antibacterial substance production

2.2.2 发酵培养基的确定 由图 3 可知,培养基最佳碳源、氮源、无机盐分别为糊精、胰蛋白胨、硫酸镁。其最适添加量分别为糊精 0.5%, 胰蛋白胨 0.5%,硫酸镁 0.1%。培养基成分正交优化结果见表 2。经单因素试验与正交试验,确定培养基中各因

素影响大小依次为 $A > C > B > D$, 最优培养及配方为糊精 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L,硫酸镁 3 g/L。

2.2.3 培养条件的确定 培养条件产抑菌物质的抑菌活性的影响见图 4。

1)种子培养时间的确定。由图 4(a)可以看出,种子培养时间最佳为 22 h,此时菌体生长处于对数末期,菌体生长速率与菌体数量均处在较高水平,故选择种龄为 22 h。

2)培养温度对抑菌效果的影响。使用优化后的培养基,分别在 25、28、31、34、37、40、43 °C 温度条件下进行发酵培养,检测发酵液上清液抑菌效果。由图 4(b)可知,温度对发酵上清液抑菌效果影响较大,低温和高温都不利于抑菌活性物质的产生,在 37 °C 时,分泌产物抑菌圈直径大到最大,所以选择 37 °C 作为发酵的培养温度。

3)初始 pH 对抑菌效果的影响。将发酵培养基的 pH 分别调整为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,培养 22 h 后检测发酵上清液的抑菌效果。由图 4(c)可知,在 pH 范围为 6.0~9.0 内,培养基初始 pH 对发酵液抑菌效果基本无影响。

4)装液量对抑菌效果的影响。分别向 250 mL 锥形瓶中添加 20、30、40、50、60、70、80 mL 培养基,培养后测定发酵上清液的抑菌效果。由图 4 (d)可知,装液量在 50 mL 以内时,随着装液量增加,上清

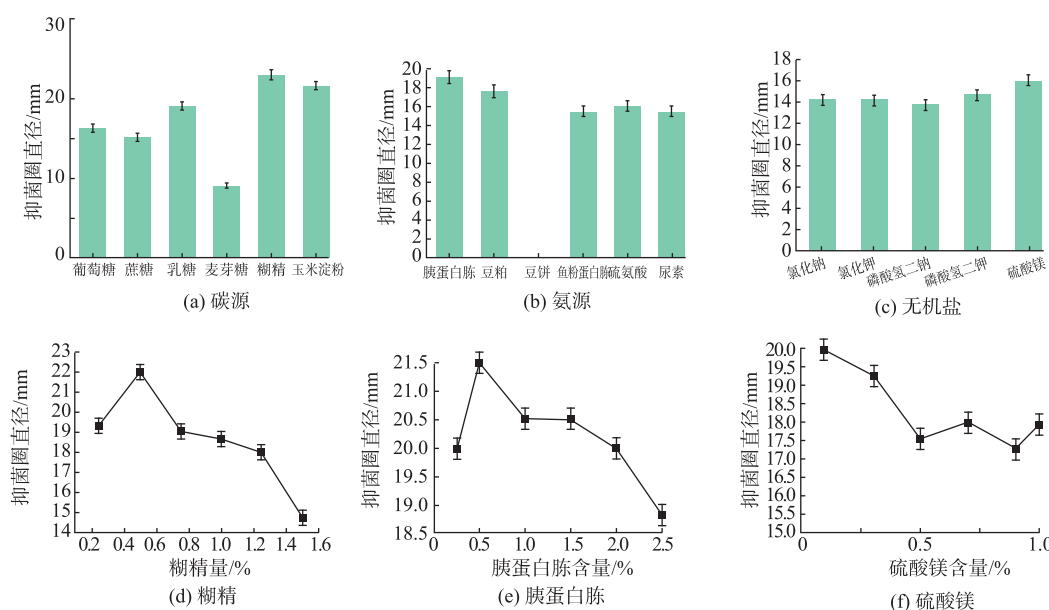


图 3 培养基成分对产抑菌物质的抑菌活性的影响

Fig. 3 Effects of carbon source on antibacterial activity

表 2 培养基成分正交优化结果

Table 2 Orthogonal test results of medium composition

试验号	糊精 A/(g/L)	胰蛋白胨 B/(g/L)	酵母粉 C/(g/L)	硫酸镁 D/(g/L)	抑菌圈直径/mm
1	2.5	5.0	5.0	1.0	21.0
2	2.5	10.0	7.5	3.0	28.0
3	2.5	15.0	10.0	5.0	26.0
4	5.0	5.0	7.5	5.0	22.0
5	5.0	10.0	10.0	1.0	21.5
6	5.0	15.0	5.0	3.0	20.5
7	7.5	5.0	10.0	3.0	19.0
8	7.5	10.0	5.0	5.0	19.0
9	7.5	15.0	7.5	1.0	19.5
K_1	75.0	62.0	60.5	62.0	—
K_2	64.0	68.5	69.5	67.5	—
K_3	57.5	66.0	66.5	67.0	—
R	17.5	6.5	9	5.5	—
最优方案	A_1	B_2	C_2	D_2	—

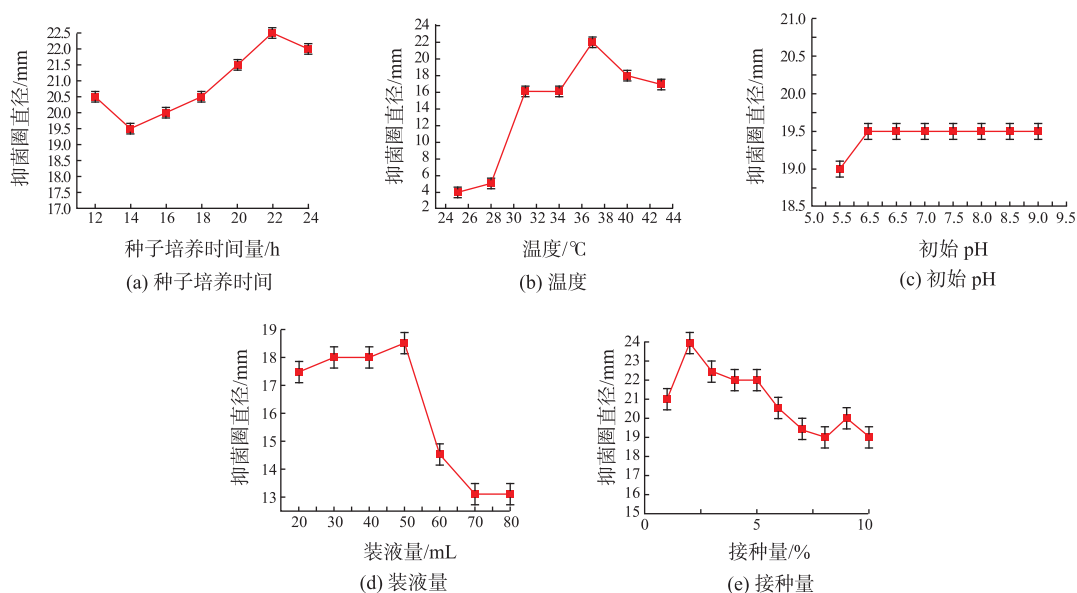


图 4 培养条件产抑菌物质的抑菌活性的影响

Fig. 4 Effects of fermentation conditions on antibacterial activity

液抑菌圈直径逐渐增大, 装液量超过 50 mL 以后, 上清液抑菌圈直径迅速下降, 在装液量 50 mL 时分泌产物抑菌圈直径最大, 抑菌效果最佳, 故选择 50 mL 作为发酵过程装液体积。

5) 接种量对抑菌效果的影响。由图 4(e) 可以看出, 接种量在 1%~10% 范围内时, 接种量大小对发酵液抑菌效果影响较大, 接种量在 2% 时, 抑菌圈最大, 发酵液的抑菌效果最佳, 随着接种量增大, 上清液抑菌圈直径呈减小趋势。

6) 优化结果的验证。为验证培养基与培养条件优化结果的可靠性, 对优化后的培养基组成与培养条件进行验证, 分别对优化前与优化后进行发酵培养, 检测发酵液上清液的抑菌效果。结果如图 5 所示。

优化后发酵液上清液抑菌效果得到提高, 通过计算, 优化后发酵液抑菌效果较未优化的发酵液抑菌效果提高 41.4%。

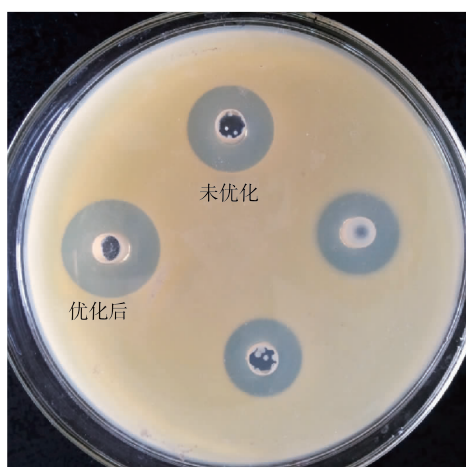


图 5 不同发酵条件下的抑菌效果

Fig. 5 Bacteriostatic effects of different fermentation conditions

2.3 抑菌活性物质的分离纯化

2.3.1 硫酸铵沉淀粗提取 硫酸铵盐析如图 6 所示。由图 6 可知,菌株 JN-814C 的发酵上清液经硫酸铵分级盐析浓缩后,抑菌活性物质主要集中在硫酸铵饱和度为 40%~70%的范围之内,在 70%~80%范围内抑菌活性物质的量减少,说明该菌株所产抑菌性物质可被硫酸铵沉淀,具有蛋白性质,为保证抑菌活性物质的收率,选择硫酸铵饱和度 40%~80%作为上清液处理浓度。

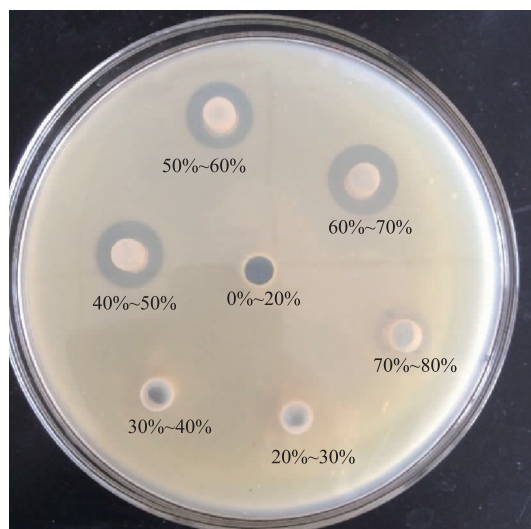


图 6 硫酸铵盐析

Fig. 6 Ammonium sulfate salting-out

2.3.2 DEAE-Sephrose-FF 阴离子交换层析分离 选用 DEAE-Sephrose-FF 对硫酸铵粗提液进行分

离,收集阴离子交换层析洗脱的个各峰组分,富集浓缩后测定其抑菌能力,结果抑菌性物质分布于峰 a 与峰 b,其中,a 峰为穿透峰,峰 b 为 27%NaCl 洗脱峰,分别收集峰 a 与峰 b,冷冻干燥得到纯化的抑菌肽。

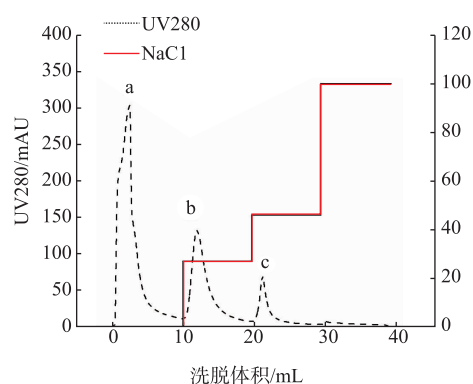


图 7 DEAE-Sephrose-FF 离子交换图谱

Fig. 7 DEAE-Sephrose-FF anion exchange chromatogram

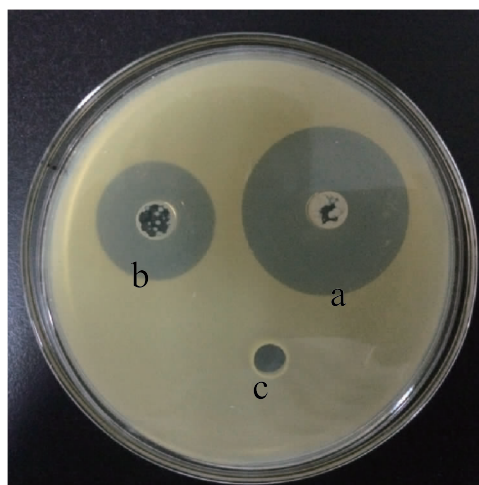


图 8 层析出峰的各峰抑菌效果

Fig. 8 Bacteriostatic spectrum of the three fractions

2.4 抑菌物质的特性研究

发酵液中抑菌活性物质经硫酸铵沉淀与 DEAE 阴离子交换层析后得到分离,表现出一定的蛋白性,对其进行蛋白酶处理。

2.4.1 蛋白酶敏感性 蛋白酶对抑菌活性的影响如图 9 所示。由图 9 可知,纯化后的抑菌活性物质经 7 种蛋白酶处理后,碱性蛋白酶对其抑菌活性影响较大,其次为亮氨酸氨肽酶,结果表明该抑菌物质是多肽类物质,其肽链 N 端存在亮氨酸残基。

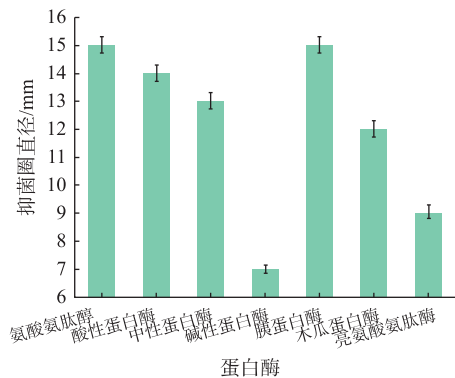


图 9 蛋白酶对抑菌活性的影响

Fig. 9 Effects of proteases on antimicrobial activity

2.4.2 抑菌肽氨基酸组成 抑菌肽氨基酸的组成如表 4 所示。氨基酸分析表明,分离出的抑菌肽主要含有 9 种氨基酸,其中谷氨酸的含量处于较高水平。

表 4 抑菌肽氨基酸组成

Table 4 Amino acid composition of antimicrobial peptide

氨基酸种类	质量分数/%	氨基酸种类	质量分数/%
谷氨酸	40.97	异亮氨酸	6.10
天冬氨酸	13.53	亮氨酸	6.50
组氨酸	1.58	赖氨酸	4.69
甘氨酸	7.92	脯氨酸	13.31
缬氨酸	6.58		

2.4.3 热稳定性 温度对抑菌活性的影响如图 10 所示。由图 10 可知,纯化后的抑菌肽经不同温度处理,在 80 ℃以内时,抑菌效果保持在较高水平,且相对稳定,超过 80 ℃以后,抑菌效果明显下降,说明该菌株所产抑菌肽具有一定的温度耐受性,但对 80 ℃以上高温耐受性较差。

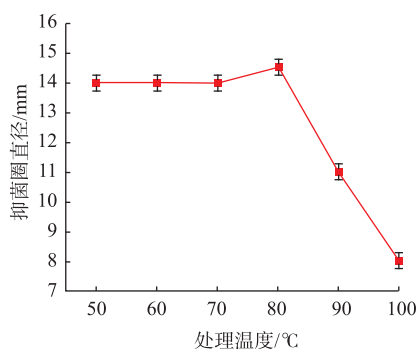


图 10 温度对抑菌活性的影响

Fig. 10 Effects of temperature on antimicrobial activity

2.4.4 pH 稳定性 将纯化后抑菌肽样品在不同 pH 条件下处理后,抑菌性实验结果如图 11 所示,从图 11 可以看出抑菌圈直径变化较小,说明在 pH 4~10 范围内,该细菌素活性较为稳定。

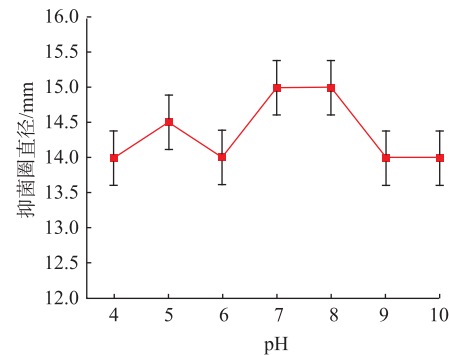


图 11 pH 对抑菌活性的影响

Fig. 11 Effects of pH on antimicrobial activity

2.4.5 抑菌肽抑菌谱的测定 抑菌肽的抑菌谱如表 3 所示。结果表明,分离所得抑菌肽对革兰氏阳性菌表现出很好的拮抗性,对革兰氏阴性菌及真菌无抑制作用。

表 3 抑菌肽的抑菌谱

Table 3 Antibacterial spectrum of antimicrobial peptide

指示菌	抑菌圈直径/mm
金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>	29
枯草芽孢杆菌 <i>B.subtilis</i>	23
铜绿假单胞菌 <i>P.aeruginosa</i>	0
大肠杆菌 <i>E.coli</i>	0
酿酒酵母 <i>S.cerevisiae</i>	0
黑曲霉 <i>A.niger</i>	0

3 结 语

本研究筛选出一株产抑菌活性物质较高的菌株,地衣芽孢杆菌 JN-814C,通过发酵优化,将其抑菌效价提高 41.4%,对发酵液中抑菌活性物质进行分离纯化后,通过蛋白酶处理与氨基酸分析确定其为一种抑菌肽,研究表明,该抑菌肽稳定性较好,其对革兰氏阳性菌有较好的抑制作用,与文献报道一致。

参考文献:

- [1] FAN Chen,GAO Zhaojian,CHEN Hongmin,et al. Screening and identification of antimicrobial protein-producing strain[J]. **Food Science**,2013,34(13):213-217.(in Chinese)
- [2] CHEN Yizi,HU Bin. Reason & harm of animal medicine remainder to animal material food [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(2):162-166.(in Chinese)
- [3] LU Y,GU W,JING R,et al. Identification and antimicrobial broad-spectrum analysis of a biocontrol bacteria strain GB58[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**,2016,32(6):198-204.(in Chinese)
- [4] ZHU Shuang,ZHANG Aizhong,JIANG Ning,et al. Bacteriocin and their application in animal production [J]. **Chinese Journal of Animal Nutrition**,2014,26(2):327-333.(in Chinese)
- [5] XIE Jianhua,WU Jinrui,ZHANG Rijun. The characteristics and action mechanism of bacteriocin and its application [J]. **Feed Industry**,2009,30(16):1-5.(in Chinese)
- [6] LIU Jinyuan,PAN Naisui,CHEN Zhangliang. Purification and characterization of an antibacterial protein form [J]. **Acta Microbiologica Sinica**,1993,33(4):268-273.(in Chinese)
- [7] TANG Juan,ZHANG Yi,LI Leilei,et al. Research advances in applying of *Bacillus licheniformis* [J]. **Hubei Agricultural Sciences**,2008,47(3):351-354.(in Chinese)
- [8] MENDO S,FAUSTINO A N,SARMENTO C A,et al. Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain[J]. **Biotechnology Letters**,2004,26(2):115-119.
- [9] JI Zhaolin,SONG Hao,XU Jingyou,et al. Fermentation process of antifungal protein produced by *Bacillus licheniformis* W10[J]. **Chinese Journal of Biological Control**,2013,29(4):579-585.(in Chinese)
- [10] LI Fan,ZHU Zhihua,JIANG Fengli,et al. The discussion of influence factor on titer measurement of cylinder plate method[J]. **Chinese Journal of Veterinary Drug**,2008,42(1):45-48.(in Chinese)
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2010 年版一部. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [12] SHEN Guanghui,FENG Meng,ZHANG Zhiqing,et al. Isolation,identification of an antagonistic bacteria from bee bread and characteristics of antimicrobial substances[J]. **Microbiology China**,2016,43(10):2197-2206.(in Chinese)
- [13] MURIANA P M,KLAENHAMMER T R. Purification and partial characterization of lactacin F,a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088.[J]. **Applied & Environmental Microbiology**,1991,57(1):114-121.
- [14] LI Huarong,XIAO Jianguo,YAN Siqi. Biological control of rice sheath blight by bacillus cereus R2 [J]. **Acta Phytopathologica Sinica**,1993,23(2):7-11.(in Chinese)
- [15] LIU Dongdong,ZHOU Feng,ZHOU Nandi,et al. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the proteolytic product of laver protein[J]. **Natural Product Research and Development**,2014,26(12):1921-1925.(in Chinese)