



发明专利证书

Certificate of Invention Patent

中华人民共和国国家知识产权局

State Intellectual Property Administration of the People's Republic of China

证书号第1141568号



发明专利证书

发明名称：新颖液化淀粉芽孢杆菌菌株及其应用

发明人：谢奉家；高穗生

专利号：ZL 2008 1 0182428.7

专利申请日：2008年12月05日

专利权人：农业药物毒物试验所

授权公告日：2013年02月27日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年12月05日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



国家知识产权局



国家知识产权局



(12) 发明专利

010806002-E

(10) 授权公告号 CN 101748078 B

(45) 授权公告日 2013.02.27

(21) 申请号 200810182428.7

C12R 1/07(2006.01)

(22) 申请日 2008.12.05

(56) 对比文件

(83) 生物保藏信息

DSM21836 2008.09.11

CN 101270344 A, 2008.09.24, 权利要求 2, 说明书第 3 页第 5 段.

(73) 专利权人 农业药物毒物试验所

地址 中国台湾台中县雾峰乡旧正村光明路 11 号

CN 101085448 A, 2007.12.12, 说明书全文.

CN 1952116 A, 2007.04.25, 说明书全文.

(72) 发明人 谢奉家 高穗生

Li, X. Mei., et al., Genbank 序列号:

EU855185, 《Genbank 数据库》. 2008,

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 陶贻丰 杨淑媛

J.-H. Yang, et al., Diversity analysis

of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases, 《Journal of Applied Microbiology》. 2007, 第 104 卷 (第 1 期), 表 5.

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 9/24(2006.01)

C12N 9/54(2006.01)

C12N 9/42(2006.01)

C12N 9/16(2006.01)

C12P 19/14(2006.01)

C12P 21/00(2006.01)

C12P 21/06(2006.01)

C02F 3/34(2006.01)

A23K 1/16(2006.01)

A01N 63/02(2006.01)

A01P 21/00(2006.01)

A01P 3/00(2006.01)

A61K 35/74(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

A61P 31/10(2006.01)

Xu A et al., Genbank 序列号: EU723210,

《Genbank 数据库》. 2008,

Yang JH et al., Genbank 序列号: EF178456,

《Genbank 数据库》. 2008,

Yang JH et al., Genbank 序列号: EF178461,

《Genbank 数据库》. 2008,

Xu A et al., Genbank 序列号: EU723210,

《Genbank 数据库》. 2008,

Yang JH et al., Genbank 序列号: EF178456,

《Genbank 数据库》. 2008,

Yang JH et al., Genbank 序列号: EF178461,

《Genbank 数据库》. 2008,

审查员 郭婷婷

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 2 页

(54) 发明名称

新颖液化淀粉芽孢杆菌菌株及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种新颖液化淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciensBa-BPD1) (德国微生物菌种保藏中心, 生物材料样品保藏编号 DSM21836), 其具有命名为 SEQ ID NO:1 的独特 16S 核糖体 RNA 序列, 且可制造淀粉分解酶、蛋白分解酶、纤维素分解酶、脂质分解酶及血栓分解酶以显示其生物降解活性。该液化淀粉芽孢杆菌还

可生产抗生素, 例如: 伊枯草菌素、芬芥素及表面活性素, 用以抑制真菌或细菌生长。本发明的新颖液化淀粉芽孢杆菌及其产物可应用于农业、污水处理、食品业及化学工业。

CN 101748078 B

1. 一种分离的菌株,该菌株为液化淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) Ba-BPD1 菌株,其生物材料样品保藏编号为 DSM21836,其包含 16S 核糖体 RNA,该核糖体 RNA 的核苷酸序列如 SEQ IDNO:1 所示。

2. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用于生产下列组成群组中至少一种酶,该组成群组由淀粉分解酶、蛋白分解酶、纤维素分解酶及脂质分解酶所同时组成。

3. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用于分解下列组成群组中至少一种有机成分,该组成群组由淀粉、蛋白质、纤维素、脂质及血栓所同时组成。

4. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用于处理废水、水管道系统及有机废弃物。

5. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用作动物饲料添加剂。

6. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用于促进植物生长。

7. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用于生产下列组成群组中至少一种成分,该组成群组由伊枯草菌素、表面活性素及芬芥素所同时组成。

8. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用于生产生物表面活性剂,该生物表面活性剂是由表面活性素、伊枯草菌素及芬芥素所组成。

9. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用于预防或治疗被真菌感染或细菌感染的植物。

10. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用于制备预防或治疗被真菌感染或细菌感染的动物的药物。

11. 如权利要求 9 或 10 所述的用途,其特征在于,该真菌感染由下列组成群组中至少一种真菌所造成,该组成群组由百合灰霉病菌、玫瑰灰霉病菌、椴果炭疽病菌、香蕉炭疽病菌、甜柿胶孢炭疽菌、水稻立枯丝核菌、豌豆尖孢镰刀菌、番茄尖孢镰刀菌、兰花镰刀菌、荔枝镰刀菌、百合白绢病菌、苹果链格孢菌、甜椒疫病菌、洋葱黑曲霉菌、柑桔青霉菌、莲雾果腐菌及椴果蒂腐菌所同时组成;以及该细菌感染由下列组成群组中至少一种细菌所造成,该组成群组由菊软腐欧氏杆菌和胡萝卜软腐欧氏杆菌胡萝卜亚种、燕麦嗜酸菌瓜类亚种、根癌农杆菌、石竹伯克氏菌、茭白细菌性基腐菌、杨桃假单胞菌、青枯病菌、柑桔溃疡菌、茄科植物细菌性斑点菌、十字花科黑腐菌与水稻白叶枯菌、蜡状芽孢杆菌及沙门氏菌所同时组成。

12. 一种如权利要求 1 的菌株的用途,其用作抗微生物剂。

13. 如权利要求 12 所述的用途,其特征在于,该抗微生物剂抑制下列组成群组中至少一种真菌生长,该组成群组由百合灰霉病菌、玫瑰灰霉病菌、椴果炭疽病菌、香蕉炭疽病菌、甜柿胶孢炭疽菌、水稻立枯丝核菌、豌豆尖孢镰刀菌、番茄尖孢镰刀菌、兰花镰刀菌、荔枝镰刀菌、百合白绢病菌、苹果链格孢菌、甜椒疫病菌、洋葱黑曲霉菌、柑桔青霉菌、莲雾果腐菌、椴果蒂腐菌所同时组成;以及该抗微生物剂抑制下列组成群组中至少一种细菌生长,该组成群组由菊软腐欧氏杆菌和胡萝卜软腐欧氏杆菌胡萝卜亚种、燕麦嗜酸菌瓜类亚种、根癌农杆菌、石竹伯克氏菌、茭白细菌性基腐菌、杨桃假单胞菌、青枯病菌、柑桔溃疡菌、茄科植物细菌性斑点菌、十字花科黑腐菌与水稻白叶枯菌、蜡状芽孢杆菌及沙门氏菌所同时组成。

14. 如权利要求 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 12 所述的用途,其特征在于,该菌株的应用型态为全肉汤培养液、上清液、可湿性粉剂、粒剂、浓缩悬剂及微囊形式。

15. 一种包含液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 菌株的组合物,其中该液化淀粉芽孢杆菌菌株具有生物材料样品保藏编号 DSM 21836。

新颖液化淀粉芽孢杆菌菌株及其应用

技术领域

[0001] 本发明是关于一种新颖液化淀粉芽孢杆菌菌株—*Bacillus amyloliquefaciens*, 尤其, 本发明是关于一种新颖液化淀粉芽孢杆菌菌株—*Bacillus amyloliquefaciens* Ba-BPD1 或其突变株, 用以产生多种酶、多种抗生素及生物表面活性剂。

背景技术

[0002] 微生物及其产物已被广泛应用以增进人类生活, 例如在食品、酒类、药物、化学工业及农业等方面。这些应用大量地降低生产及 / 或处理成本以及满足人类需求。

[0003] 某些微生物生产酶以分解大分子。例如, 解脂耶氏酵母菌 (*Yarrowialipolytica*) 生产脂质分解酶 (脂酶) 用以降解橄榄研磨厂污水处理的化学需氧量 (chemical oxygen demand, COD) (Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D. and Guerzoni, M. E. Use of *Yarrowialipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 2005, 96(3) :317-22); 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 生产碱性蛋白酶用以水解皮革制造业的主要蛋白固体废弃物—动物肉质 (Kumar, A. G., Swarnalatha, S., Sairam, B. and Sekaran, G. Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries. *Bioresour. Technol.* 2008, 99(6) :1939-44); 及土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 生产羧甲基纤维素酶 (carboxymethyl cellulase, CMCase) 用以生物降解木质纤维素废弃物 (lignocellulosic waste) (Emtiazzi, G., Naghavi, N. and Bordbar, A. Biodegradation of lignocellulosic waste by *Aspergillus terreus*. *Biodegradation*, 2001, 12(4) :257-61)。然而, 这些微生物被证明其主要酶功能在于分解一种受质。当处理都市污水中更复杂的成分时, 加入多种微生物以降解多种大分子是必要且无可避免的。这将增加成本、降低经济效益, 而且处理过程将更复杂。再者, 这些添加的微生物可能相互竞争生长优势。若一种微生物具有生产多种酶的能力但只能应用于一种领域, 此微生物的经济效益比其他具有产生多种酶的能力及应用多种领域的微生物低。

[0004] 除了生物降解有机废弃物, 微生物也可生产抗生素以拮抗其他真菌或细菌。一般说来, 抗生素是由真菌生产或提取且应用于医药方面。然而, 植物、果实及动物在成熟及生长时也面临真菌或细菌感染。传统的杀真菌剂、杀细菌剂及化学合成药剂不只抑制真菌及细菌感染, 而且危害人体及环境。若细菌被发现能生产生物性的抗生素以抑制真菌或细菌生长, 此菌株将有益于农业及畜牧业。

[0005] 近来, 由微生物生产的独特两亲性 (amphiphilic) 生物性化合物—生物表面活性剂, 已在有机及金属污染地区的复原上显现出多种潜在的应用 (Bodour, A. A., Drees, K. P. and Maier, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69(6) :3280-7)。生物表面活性剂可降低表面张力、稳定乳化作用及促进

泡沫生成,而且通常不具毒性且可生物降解。生物表面活性剂分为糖脂质(glycolipid)及脂蛋白(lipoprotein)两类,其中脂蛋白包括由芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)生产的伊枯草菌素(iturin)、表面活性素(surfactin)及芬芥素(fengycin)等。生产生物表面活性剂的微生物在碳氢化合物污染区域的生物复原上扮演重要角色。生物表面活性剂也可用于促进油类回收,被认为在环境保护上具有其他应用潜力。其他应用包括杀草剂及杀虫剂的剂型、清洁剂、保健及化妆品、纸浆与制纸、煤炭、纺织品、陶器处理及食品工业、铀矿处理及泥碳机械脱水。

[0006] 因此,若微生物被发现能生产多种酶及分子,此微生物将有益于人类的生活及经济。本发明申请人鉴于现有技术中的不足,经过悉心试验与研究,并一本锲而不舍之精神,终构思出本发明「新颖液化淀粉芽孢杆菌菌株及其应用」,筛选出的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 与其他微生物相比较,具有生产上述酶、抗生素及生物表面活性剂的能力,能够克服先前技术的不足,以下为本发明的简要说明。

发明内容

[0007] 本发明提出一种筛选出的菌株,其具有特定的 16S 核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 序列,分类为液化淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* Ba-BPD1),其在德国微生物菌种保藏中心的生物材料样品保藏编号为 DSM 21836。此新颖菌株生产具有专一性且有益的酶,例如脂质分解酶用以分解脂质、淀粉分解酶用以水解淀粉、纤维素分解酶用以水解纤维素、及蛋白分解酶用以水解蛋白质。

[0008] 由于有机物质存在于污水中,生产多种酶的新颖液化淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens* Ba-BPD1) 应用于处理污水、水管道系统、动物饲料、厨房垃圾处理,以增进污水中的有机物质分解以及污水、垃圾处理过程的品质及效率。因此,此新颖菌株及其酶可被制作成清洁剂并应用于除污及食品制造。

[0009] 再者,该生产多种酶的新颖液化淀粉芽孢杆菌应用于农业,包括青贮菌剂 (silage inoculants)、家畜粪肥处理及动物饲料组成的益生菌 (Direct Fed Microbials)。

[0010] 再者,由于其将大分子分解为简单有机分子的酶活性,筛选出的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 可促进植物生长。

[0011] 此外,由液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的血栓分解酶可水解血栓,以致降低血液中的血栓量,预防及治疗心血管疾病、栓塞、动脉硬化、子宫内膜异位及癌症。因此,血栓分解酶可促进人类及动物的健康。

[0012] 此外,分离出的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产抗生素(包括:伊枯草菌素、表面活性素及芬芥素)及表面活性剂。尤其,伊枯草菌素是指伊枯草菌素 A 及其同源物。伊枯草菌素、表面活性素及芬芥素属于脂多肽,对预防及治疗真菌及/或细菌感染有益,而这些感染的对象为植物、动物及果实。

[0013] 此外,液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产生物表面活性剂,包括表面活性素、伊枯草菌素及芬芥素,用以抑制植物病原菌及动物病原菌的生长,并具有抗生素生产的潜力。

[0014] 本发明另一目的在于提出新颖菌株—液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 及/或该菌株所生产的抗生素,作为抗真菌剂,用以抑制属于下列组成群组中至少一种真菌菌属的生长,该组成群组包括:葡萄孢属 (*Botrytis*)、刺盘孢属 (*Colletotrichum*)、丝核菌属

(*Rhizoctonia*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、菌核属 (*Sclerotium*)、链格孢属 (*Alternaria*)、疫霉属 (*Phytophthora*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、青霉菌属 (*Penicillium*)、拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*) 及球二孢属 (*Botryodiplodia*)。

[0015] 其中, 该真菌感染源自下列组成群组的真菌: 百合灰霉病菌 (*Botrytis elliptica*)、玫瑰灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、橡果炭疽病菌 (*Glomerellacingulata*)、香蕉炭疽病菌 (*Colletotrichum musae*)、甜柿胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、水稻立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、豌豆尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*)、番茄尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)、兰花镰刀菌 (*Fusarium solani*)、荔枝镰刀菌 (*Fusarium solani*)、百合白绢病菌 (*Sclerotium rolfsii* Saccardo)、苹果链格孢菌 (*Alternaria mali*)、甜椒疫病菌 (*Phytophthora capsici*)、洋葱黑曲霉菌 (*Aspergillus niger*)、柑桔青霉菌 (*Penicillium italicum*)、莲雾果腐菌 (*Pestalotiopsis eugeniae*) 及橡果蒂腐菌 (*Botryodiplodia theobromae*)。

[0016] 本发明另提出新颖菌株—液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 及 / 或该菌株所生产的抗生素, 作为抗菌剂, 用以抑制属于下列组成群组中至少一种细菌属的生长, 该组成群组包括: 欧氏杆菌属 (*Erwinia*)、嗜酸菌属 (*Acidovorax*)、农杆菌属 (*Agrobacterium*)、伯克氏菌属 (*Burholderia*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、青枯菌属 (*Ralstonia*)、黄色单胞菌属 (*Xanthomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 及沙门氏菌属 (*Salmonella*)。

[0017] 其中, 该细菌感染源自下列组成群组的细菌: 菊软腐欧氏杆菌和胡萝卜软腐欧氏杆菌胡萝卜亚种 (*Erwinia chrysanthemi* 及 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)、燕麦嗜酸菌瓜类亚种 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、石竹伯克氏菌 (*Burholderia caryophylli*)、茭白细菌性基腐菌 (*Enterobacter cloacae*)、杨桃假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*)、柑桔溃疡菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)、茄科植物细菌性斑点菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*)、十字花科黑腐菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、水稻白叶枯菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 及沙门氏菌 (*Salmonella*)。

[0018] 再者, 筛选出的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 作为抑制真菌及 / 或细菌生长的抗微生物制剂, 抗真菌剂抑制属于下列组成群组中的真菌生长: 百合灰霉病菌、玫瑰灰霉病菌、橡果炭疽病菌、香蕉炭疽病菌、甜柿胶孢炭疽菌、水稻立枯丝核菌、豌豆尖孢镰刀菌、番茄尖孢镰刀菌、莲花镰刀菌、荔枝镰刀菌、百合白绢病菌、苹果链格孢菌、甜椒疫病菌、洋葱黑曲霉菌、柑桔青霉菌、莲雾果腐菌及橡果蒂腐菌。抗菌剂抑制属于下列组成群组中的细菌生长: 细菌性软腐杆菌、燕麦嗜酸菌瓜类亚种、根癌农杆菌、石竹伯克氏菌、茭白细菌性基腐菌、杨桃假单胞菌、青枯病菌、柑桔溃疡菌、茄科植物细菌性斑点菌、十字花科黑腐菌、水稻白叶枯菌、蜡状芽孢杆菌及沙门氏菌。

[0019] 表面活性素抑制家畜及食物的病原菌生长, 并且预防及 / 或治疗受该病原菌感染的动物或植物。此外, 由于对环境无毒及较佳的生物降解特性, 表面活性素被广泛地应用于清洁剂、化妆品、食品、药物、石化业、农业及环境保护等方面。

[0020] 根据上述构想,筛选出的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 的应用型态为全肉汤培养液 (whole broth culture)、上清液、可湿性粉剂 (wettable powder)、粒剂 (granule)、水分散性粒剂 (water dispersible granule)、浓缩悬剂 (suspension concentrate or flowable concentrate) 及微囊形式 (microencapsulation)。

[0021] 本发明另一目的在于提出生物材料样品保藏编号为 DSM 21836 的液化淀粉芽孢杆菌的筛选突变株,其具有特定的 16S 核糖体序列 (SEQ ID NO:1)。

[0022] 本发明另一目的在于提出包括具有生物材料样品保藏编号为 DSM21836 的液化淀粉芽孢杆菌的组合物。

附图说明

[0023] 图 1 为根据本发明实施例 7 及 8,由液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的伊枯草菌素 A 及表面活性素的 LC/TOF-MS 分析图谱。

[0024] 图 2 为根据本发明实施例 7,由液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的芬芥素的 LC/TOF-MS 分析图谱。

具体实施方式

[0025] 本发明所提出的「新颖液化淀粉芽孢杆菌菌株及其应用」将可由以下的实施例说明而得到充分了解,使得本领域技术人员可以据以完成,然而本发明的实施并非可由下列实施例而被限制其实施型态,本领域技术人员仍可依据除已公开的实施例的精神推演出其他实施例,这些实施例都应当属于本发明的范围。

[0026] 实施例 1:新颖液化淀粉芽孢杆菌的特征

[0027] 新颖液化淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens* Ba-BPD1) 是由发明人自台湾台中县梨山的土壤筛选出来,并且进一步培养、鉴定及保存。当培养液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 时,接种其单菌落并过夜培养于 6ml 的 LB 培养液 (Luria-Bertani, Miller, Difco)。培养后的菌液再以 1/100 比例接种于 500ml LB 培养液,于 30°C、150rpm 培养 6 天。

[0028] 此外,液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 与其他细菌相较,具有特定的 16S 核糖体 RNA 序列,其部分的 16S 核糖体序列被测序,且将于 2009 年 12 月 31 日公开于美国国家生物科技信息中心网站 (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.gov/Genbank/>),其基因库 (GenBank) 序号命名为 EF137183。如后所述的该部分 16S 核糖体序列 (SEQ ID NO:1) 成为液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 特殊及重要的特征。

[0029] 液化淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* Ba-BPD1) 于 2008 年 9 月 11 日保藏于德国微生物菌种保藏中心 (地址:德国不伦瑞克 D-38124 茵霍芬大街 7B),生物材料样品保藏编号为 DSM21836。

[0030] 实施例 2:液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的淀粉分解酶

[0031] 为了证明液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 可生产淀粉分解酶 (淀粉酶) 以水解淀粉,淀粉酶水解测试如下所述。由营养琼脂培养基 (nutrient agar (NA) plate) 挑取液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 的单菌落并混合于 50 μ l 无菌水作为菌液。然后,将此 50 μ l 菌液滴在 1cm 直径的滤纸上,再放置于酵母提取物-可溶性淀粉琼脂培养基 (yeast extract-soluble starch agar (YSA) plate, 含 1.0% 酵母提取物、1.0% 可溶性淀粉及 1.5% 琼脂) 上。将 YSA

培养基置于 30°C 培养 2 至 3 天。培养后,以 3 至 4ml 碘液 (含 0.3% (w/v) 碘及 3% (w/v) 碘化钾 (potassium iodine)) 覆满 YSA 培养基,于 5 分钟内测量液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 的菌落大小及溶解圈 (clear zone) 大小。培养基变成蓝黑色表示淀粉未被水解,然而,菌落周围的溶解圈表示淀粉被水解。三重重复的结果显示菌落直径及溶解圈大小分别为 1.57cm 及 2.81cm。

[0032] Ito 等人 (1998) 也证实嗜碱性枯草芽孢杆菌生产碱性胞外清洁酶,包括 α -淀粉酶,应用于强效清洁剂及自动洗碗机清洁剂,用以分解污水里的淀粉 (Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S. and Hatada, Y. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles*. 1998. 2(3):185-90)。因此,液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的淀粉分解酶可以应用于水解污水、废弃物、农业及食品业的淀粉。

[0033] 实施例 3: 液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的蛋白分解酶

[0034] 为了证明液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产蛋白分解酶 (蛋白酶) 水解蛋白质,蛋白水解测试如下所述。液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 的菌液如实施例 2 所述制备。将 50 μ l 菌液滴在 1cm 直径的滤纸上,再放置于脱脂乳琼脂培养基 (skim milk agar (SMA) plate, 含 1.5% 脱脂奶粉、1.3% 营养肉汤 (nutrient broth, NB) 及 1.5% 琼脂) 上 (Elsheikh, L. E., Bergman, R., Cryz, S. J. Jr. and Wretling, B. A comparison of different methods for determining elastase activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains from milk. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B, Microbiol.* 1986. 94(3):135-8)。将此 SMA 培养基以 30°C 培养 2 至 3 天,测量液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 的菌落大小及溶解圈大小。菌落周围的溶解圈表示脱脂乳中的蛋白质被细菌水解。三重重复的结果显示菌落直径及溶解圈大小分别为 1.77cm 及 3.61cm。

[0035] Kumar 等人 (2008) 发现铜绿假单胞菌生产碱性蛋白酶,用以水解皮革制造工厂产出的蛋白固体废弃物 (Kumar, A. G., Swarnalatha, S., Sairam, B. and Sekaran, G. Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries. *Bioresour. Technol.* 2008. 99(6):1939-44)。此外, Drouin 等人 (2008) 证实地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 生产的蛋白酶对污水污泥具有蛋白水解活性 (Drouin, M., Lai, C. K., Tyagi, R. D. and Surampalli, R. Y. *Bacillus licheniformis* proteases as high value added products from fermentation of wastewater sludge: pre-treatment of sludge to increase the performance of the process. *Water Sci. Technol.* 2008. 57(3):423-9)。在实施例 3 中,液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的蛋白分解酶也可应用于污水、废弃物、农业及食品业的蛋白水解,并可制造为清洁剂或洗衣剂的成分。

[0036] 实施例 4: 液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的纤维素分解酶

[0037] 为了证明液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产纤维素分解酶 (纤维素酶) 水解纤维素,纤维素水解测试如下所述。液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 菌液如实施例 2 所述制备。将 50 μ l 菌液滴在 1cm 直径的滤纸上,再放置于 Mandel-Reese (M-R) 琼脂培养基 (含 1.0% 羧甲基纤维素 (carboxyl methylcellulose, CMC)、0.1% 蛋白胨 (peptone)、0.03% 尿素、0.14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2% KH_2PO_4 、0.04% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 5×10^{-4} %

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $1.4 \times 10^{-3}\%$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $1.6 \times 10^{-3}\%$ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $2 \times 10^{-3}\%$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及 1.5% 琼脂, 调整 pH 至 6.0 并灭菌) (Mandel, M. and Reese, E. T. Induction of cellulose in fungi by cellobiose. *J. Bact.* 1960. 79 :816-26)。此 M-R 琼脂培养基于 30°C 培养 2 天后, 将 3 至 4ml 的 0.1% 刚果红 (Congo Red) 覆满 M-R 琼脂培养基 30 分钟, 再以 1M 氯化钠溶液洗去未结合的刚果红, 刚果红通过氢键形成团块 (agglomerate) 或胶体 (colloid), 再与纤维素结合, 而溶解圈的形成表示纤维素未与刚果红结合。三重复的结果显示液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 形成的溶解圈直径为 2.3cm。

[0038] Alam 等人 (2008) 证实哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 生产纤维分解酶用以在污水污泥的生物转换中水解纤维素 (Alam, M. Z., Muyibi, S. A. and Wahid, R. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. *Bioresour. Technol.* 2008. 99(11) : 4709-16)。Sangave 及 Pandit 于 2006 也发表纤维素酶用于蒸馏厂污水的生物降解活性的前处理步骤, 以将纤维素转化为简单的生物分子 (Sangave, P. C. and Pandit, A. B. Enhancement in biodegradability of distillery wastewater using enzymatic pretreatment. *J. Environ. Manage.* 2006. 78(1) :77-85)。由于 M-R 琼脂培养基的主要成分是羧甲基纤维素, 所以液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 可生产纤维素分解酶以消化纤维素及在消化时显现透明环是相当明显的。因此, 由于纤维素分解酶的生产及水解活性, 液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 在处理废水的纤维素上具有显著的经济价值。新颖菌株—液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 可以生产纤维素分解酶, 用以水解废弃物处理的纤维素。

[0039] 实施例 5: 液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 生产的脂质分解酶

[0040] 为了证明液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 生产脂质分解酶 (脂酶) 以分解脂质, 脂酶水解测试如下所述。首先, 接种液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 的单菌落于 5ml 营养液, 再以 30°C、150rpm 培养 1 天。之后, 将 5 μ l 的培养菌液滴在罗丹明 B 琼脂培养基 (Rhodamine B agar plate, 含 1% 橄榄油、0.001% 罗丹明 B 及 1.5% 营养琼脂) 上, 于 30°C 培养 7 天。作为染剂的罗丹明 B 嵌入脂质, 在例如荧光显微镜的生物技术应用上作为荧光标志。溶解圈表示脂质被水解, 且罗丹明 B 无法嵌入脂质。因此, 实验结果发现液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 显现荧光菌落, 且菌落周围的溶解圈直径为 0.6cm。

[0041] Ertuğrul 等人于 2007 年发表: 枯草杆菌属生产的脂酶显现其于分解橄榄研磨厂污水组成、甘油三乙酸酯 (triacetin)、聚山梨醇酯 80 (Tween 80) 及乳清 (whey) 等的解脂活性 (Ertuğrul, S., Dönmez, G. and Takac, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J. Hazard. Mater.* 2007. 149(3) :720-4)。甚至, 固定化的脂酶 (immobilized lipase) 被用于具有高油及油脂浓度的污水的水解 (Joganathan, J., Nakhla, G. and Bassi, A. Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. *J. Hazard. Mater.* 2007. 145(1-2) :127-35)。因此, 液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 生产的脂质分解酶可应用于污水、废弃物、农业及食品业的脂质分解。

[0042] 实施例 6: 液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPDI 生产的血栓分解酶

[0043] 纤维蛋白 (Fibrin) 为负责止血的关键性血液成分, 已被广泛地作为组织工程的多

功能生物聚合物骨架。单独的纤维蛋白或与其他材料结合(例如纤维蛋白原(fibrinogen)和凝血酶(thrombin))已被用作干细胞或初生细胞的生物骨架,用以再生脂肪组织、心脏组织、软骨、肝脏、神经组织、眼球组织、皮肤、肌腱及韧带,并显现组织再生及伤口愈合的重大潜力(Ahmed, T. A. E., Dare, E. V. and Hincke, M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2008. 14(2):199-215)。然而,若纤维蛋白在血管或心脏凝集为血栓(fibrin clot 或 thrombus),将导致心血管疾病或使人致死(Hua, Y., Jiang, B., Mine, Y. and Mu, W. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste. *J. Agric. Food Chem.* 2008. 56(4):1451-7)。枯草杆菌属菌株被证明生产血栓分解酶用以通过自血纤维蛋白溶酶原(plasminogen)形成具活性的血纤维蛋白溶酶(plasmin)或通过直接血栓溶解(fibrinolysis)分解血栓。因此,由微生物生产的血栓分解酶在组织再生、伤口愈合及性命急救上相当重要。

[0044] 在本发明中,接种液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 的单菌落于 5ml 营养液,于 30℃ 培养 12 小时。离心 5ml 营养液中的 100 μl 菌液后,将 20 μl 上清液滴入事先以移液管尖头(tip)在挖出的纤维蛋白琼脂培养基(fibrin agar plate)的浅洞内,再将该纤维蛋白琼脂培养基以 37℃ 培养 12 小时,观察其溶解圈的形成。结果显示溶解圈直径为 1.8cm,证实液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 具有生产血栓分解酶以水解血栓的能力,并涉及例如血栓形成(thrombosis)、动脉硬化(arteriosclerosis)、子宫内膜异位(endometriosis)及癌症的病理状态。

[0045] 实施例 7: 液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的伊枯草菌素及芬芥素

[0046] 伊枯草菌素(一种生物表面活性剂)是一种抗真菌脂多肽(antifungal lipopeptide),作为一种具生物活性的微生物二次代谢产物,并显示其吸引力的抗生素特性(Hsieh, F.-C., Lin, T.-C., Meng, M. and Kao, S.-S. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr. Microbiol.* 2008. 56(1):1-5)。枯草杆菌属生产的伊枯草菌素 A (iturin A) 与固醇分子在致病真菌(例如立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*))的细胞膜表面形成复合物,以致扩大离子通道大小、改变膜渗透压,并进一步导致致病真菌的菌丝分解及抑制孢子萌芽。由此达到植物病原菌的抑制效果。因此,伊枯草菌素 A 及枯草杆菌属被应用于饲料及/或食物保存,动物及植物的预防及/或治疗,可用作工业、农业、环境的生物降解及清除的表面活性素(或生物表面活性剂),以及作为动物及/或植物感染的抗生素(Mizumoto, S. and Shoda, M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. 76(1):101-8)。

[0047] 请参阅图 1,为根据本发明实施例 7,由液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的伊枯草菌素 A 的液相色谱分析/飞行时间质谱仪(Liquid chromatography/time-to-flight-mass spectrometry, LC/TOF-MS)分析图谱。在图 1 中,伊枯草菌素 A 同源物(A2 至 A8)的分子量鉴定为 1043、1057、1065、1079、1095 及 1119 Da,这些伊枯草菌素 A 同源物及液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 可应用于食品业及农业。

[0048] 芬芥素是另一种由枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)生产的具生物活性的

脂多肽及抗真菌物质,在枯草芽孢杆菌拮抗葫芦粉霉菌 (*Podosphaera fusca*, cucurbit powdery mildew) (Deleu, M., Paquot, M. and Nylander, T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys. J.* 2008. 94(7):2667-79, Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M. and Pérez-García, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007. 20(4):430-40) 扮演重要角色。如同伊枯草菌素 A, 芬芥素也应用于饲料及 / 或食物保存, 作为工业、农业、环境的生物降解及清除的表面活性素 (或生物表面活性剂), 以及作为动物及 / 或植物感染的抗生素。

[0049] 请参阅图 2, 为根据本发明实施例 7, 由液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的芬芥素的 LC/TOF-MS 分析图谱。在图 2 中, 芬芥素同源物的分子量鉴定为 1449、1463、1477、1491 及 1505Da, 这些芬芥素同源物及液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 可应用于食品业及农业。

[0050] **实施例 8: 液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的表面活性素**

[0051] 表面活性素是一种细菌性环状脂多肽或表面活性剂, 作为抗生素, 其两亲性 (amphiphilic) 特性帮助此物质存在于疏水及亲水两种环境。例如, 表面活性素在牛奶中可显现其对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的抗微生物活性, 以对牛奶杀菌 (Huang, X., Wei, Z., Zhao, G., Gao, X., Yang, S. and Cui, Y. Optimization of Sterilization of *Escherichia coli* in milk by surfactin and fengycin using a response surface method. *Curr. Microbiol.* 2008. 56(4):376-81)。Whang 等人 (2008) 证实表面活性素具有对柴油污染的水及土壤的生物降解能力 (Whang, L.-M., Liu, P.-W. G., Ma, C.-C. and Cheng, S.-S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* 2008. 151(1):155-63)。因此, 表面活性素可以作为食品制造及食品保存的杀菌剂, 并作为工业、农业、环境的生物降解及清除的表面活性素 (或生物表面活性剂)。

[0052] 为了证明液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 可生产表面活性素, 大规模的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 菌液及表面活性素制备如下。以 30°C、200rpm 培养液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 16 小时, 培养后的菌液再以 1/100 比例接种于 Cooper's 培养基, 并于 30°C 培养 120 小时。Cooper's 培养基为具有 4% 葡萄糖的无机盐类 (mineral salts, 含 0.05M NH_4NO_3 、0.03M K_2HPO_4 、0.04M Na_2HPO_4 、 $8.0 \times 10^{-3}\text{M}$ MgSO_4 、 $7.0 \times 10^{-6}\text{M}$ CaCl_2 、 $4.0 \times 10^{-6}\text{M}$ FeSO_4 及 $4.0 \times 10^{-6}\text{M}$ 乙二胺四乙酸二钠 (Na_2 EDTA))。

[0053] 离心移除菌体后, 加入浓盐酸至液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 培养菌液, 分离出天然的表面活性素。收集、干燥、以二氯甲烷萃取, 在 pH 2 生成沉淀物。以减压移除二氯甲烷以获得黄白色固体。以再结晶进一步纯化。二氯甲烷萃取物溶解于含有足量氢氧化钠的无菌水以达到 pH 8。此溶液进一步以 Whatman No. 1 滤纸过滤, 并以浓盐酸滴定至 pH 2。离心后获得白色固体沉淀物。此外, 精炼的表面活性素购自 Sigma 公司 (Steinheim, Germany) 或由枯草芽孢杆菌菌液纯化, 以作为校正标准品。

[0054] 分离出的表面活性素沉淀物溶解于 1ml 甲醇, 再以活性炭处理, 并以 0.22 μm 孔径的滤纸过滤, 过滤液注入高效液相色谱仪 (HPLC) 的反向管柱 (RP-18, 5 μm , 4x250mm;

Merek)。该管柱以 3.8mM 乙腈-三氟乙酸 (acetonitrile-trifluoroacetic acid, 80:20 (v/v))、1.0ml/min 的流速洗提,并以 210nm 波长检测。表面活性素的浓度以 Sigma 公司购买的精炼表面活性素作为校正曲线而测定,并以 6 种表面活性素异构物的总量作为表面活性素的浓度。实验证明:液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的表面活性素浓度为 460mg/L。

[0055] 请参阅图 1,为根据本发明实施例 8,由液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的表面活性素的 LC/TOF-MS 分析图谱。在图 1 中,表面活性素同源物的分子量鉴定为 1022 及 1036Da。因此,由液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 生产的表面活性素可应用于食品杀菌、食品保存、生物降解,及工业、农业及环境的清除。

[0056] **实施例 9:液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 与病原真菌的对峙试验**

[0057] 根据实施例 7 和 8 的结果,可知三种脂多肽-伊枯草菌素 A、芬芥素及表面活性素可抑制病原真菌及病原细菌的生长。为了确定液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 的拮抗病原真菌能力,对峙培养及试验操作如下。对峙试验显示出一种生物对另一种生物的生长抑制。

[0058] 培养液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 及 21 种真菌。接种液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 的单菌落于 5ml LB 培养液,并以 30°C、200rpm 培养 7 天。在每一片马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar (PDA) plate) 中央放置 1cm 直径的真菌菌丝块 (mycelial disc),再培养于 25°C 直到长满,共培养 21 株真菌。

[0059] 对峙试验开始时,放置上述 1cm 直径的真菌菌丝块于一 PDA 培养基中央,并放置 3 片 9mm 直径滤纸于 PDA 培养基上,每片滤纸距离真菌菌丝块边缘 1.8cm,放置在 PDA 培养基的 3 片滤纸看似等边三角形的三个顶点。在实验组方面,在 PDA 培养基的每一片滤纸上滴入 30 μ l 的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 菌液;在对照组方面,在 PDA 培养基的每一片滤纸上滴入 30 μ l 无菌水。将这些 PDA 培养基培养于 25°C 直到长满。滤纸周围将会形成新月形的抑制。纪录液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 与真菌菌株间的对峙培养,并计算液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 滤纸到真菌菌丝块间的对峙距离。

[0060] 请参阅表 1,为本发明实施例 9 的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 滤纸与真菌菌丝块间的平均对峙距离。对峙距离越长,抑制真菌效果越佳。在表 1 中,可知此 21 种真菌生长可被液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 有效地抑制,其中液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 与柑橘青霉菌 (*Penicillium italicum*, 缩写为 Pi13) 间的对峙距离最长 (13.5mm),液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 与椴果炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*, 缩写为 Gc) 间的对峙距离最短 (3.1mm)。因此,液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 对真菌的生长抑制效果被加以证实。

[0061] **实施例 10:液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 与病原细菌的对峙试验**

[0062] 另一个液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 与病原细菌间的对峙试验如下所述。首先,将 60 μ l 待测试的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 滴在营养琼脂培养基的滤纸上,于 30°C 培养 24 小时。每一待测试的病原细菌均匀喷洒到培养好的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 的营养琼脂培养基上,再将此培养基以 30°C 培养 24 小时。每一病原细菌进行三重复测试。测定液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 对每一种病原细菌的抑制圈大小。

[0063] 请参阅表 2,为本发明实施例 10 的液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 对病原细菌的抑制圈大小。在表 2 中,可知液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 可有效抑制这些病原细菌的生长。因此,由这些细菌引起的病原植物及果实疾病被预防、治疗或控制。此外,液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 可抑制蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* JSR01) 及沙门氏菌 (*Salmonella* TA100),

而且液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 可预防及治疗由这些细菌引起的细菌性食物中毒。

[0064] 本发明的新颖液化淀粉芽孢杆菌具有独特的 16S 核糖体 RNA 序列,且可制造多种酶用以分解淀粉、蛋白质、纤维素、脂质及血栓,并可生产抗生素,对病原真菌及病原细菌皆具有显著的抑制效果,实属难能的创新发明,深具产业价值,因此依法提出申请。此外,本发明可以由本领域技术人员做任何修改,但不脱离如所附权利要求所要保护的范围。

[0065] 参考文献:

[0066] 1. Ahmed, T. A. E., Dare, E. V. and Hincke, M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2008. 14(2):199-215.

[0067] 2. Alam, M. Z., Muyibi, S. A. and Wahid, R. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. *Bioresour. Technol.* 2008. 99(11):4709-16.

[0068] 3. Bodour, A. A., Drees, K. P. and Maier, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. 69(6):3280-7.

[0069] 4. Deleu, M., Paquot, M. and Nylander, T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys. J.* 2008. 94(7):2667-79.

[0070] 5. Drouin, M., Lai, C. K., Tyagi, R. D. and Surampalli, R. Y. *Bacillus licheniformis* proteases as high value added products from fermentation of wastewater sludge: pre-treatment of sludge to increase the performance of the process. *Water Sci. Technol.* 2008. 57(3):423-9.

[0071] 6. Elsheikh, L. E., Bergman, R., Cryz, S. J. Jr. and Wretling, B. A comparison of different methods for determining elastase activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains from mink. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B, Microbiol.* 1986. 94(3):135-8.

[0072] 7. Emtiazi, G., Naghavi, N. and Bordbar, A. Biodegradation of lignocellulosic waste by *Aspergillus terreus*. *Biodegradation*, 2001. 12(4):257-61.

[0073] 8. Ertugrul, S., Dönmez, G. and Takac, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J. Hazard. Mater.* 2007. 149(3):720-4.

[0074] 9. Hsieh, F.-C., Lin, T.-C., Meng, M. and Kao, S.-S. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr. Microbiol.* 2008. 56(1):1-5.

[0075] 10. Hua, Y., Jiang, B., Mine, Y. and Mu, W. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste. *J. Agric. Food Chem.* 2008. 56(4):1451-7.

[0076] 11. Huang, X., Wei, Z., Zhao, G., Gao, X., Yang, S. and Cui, Y. Optimization of sterilization of *Escherichia coli* in milk by surfactin and fengycin using a response surface method. *Curr. Microbiol.* 2008. 56(4):376-81.

- [0077] 12. Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S. and Hatada, Y. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles*. 1998, 2(3):185-90.
- [0078] 13. Jeganathan, J., Nakhla, G. and Bassi, A. Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. *J. Hazard. Mater.* 2007, 145(1-2):127-35.
- [0079] 14. Kumar, A. G., Swarnalatha, S., Sairam, B. and Sekaran, G. Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries. *Bioresour. Technol.* 2008, 99(6):1939-44.
- [0080] 15. Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D. and Guerzoni, M. E. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 2005, 96(3):317-22.
- [0081] 16. Mandel, M. and Reese, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bact.* 1960, 79:816-26.
- [0082] 17. Mizumoto, S. and Shoda, M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 76(1):101-8.
- [0083] 18. Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. -W., Arrobona, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M. and Pérez-García, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospira fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007, 20(4):430-40.
- [0084] 19. Sangave, P. C. and Pandit, A. B. Enhancement in biodegradability of distillery wastewater using enzymatic pretreatment. *J. Environ. Manage.* 2006, 78(1):77-85.
- [0085] 20. Whang, L. -M., Liu, P. -W. G., Ma, C. -C. and Cheng, S. -S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* 2008, 151(1):155-63.
- [0086] 表 1、液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1 滤纸与真菌菌丝块间的平均对峙距离
- [0087]

病原真菌	缩写	平均对峙距离(mm)
百合灰霉病菌(<i>Botrytis elliptica</i>)	Be	9.2
玫瑰灰霉病菌(<i>Botrytis cinerea</i>)	Bc	8.8
椴果炭疽病菌(<i>Glomerella cingulata</i>)	Gc	3.1
香蕉炭疽病菌(<i>Colletotrichum musae</i>)	Cm	9.8
水稻立枯丝核菌(<i>Rhizoctonia solani</i>)	Rs	4.0
豌豆尖孢镰刀菌(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisif</i>)	F307	10.5
番茄尖孢镰刀菌(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>)	F308	5.2
番茄尖孢镰刀菌(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>)	Fol-33	7.7
兰花镰刀菌(<i>Fusarium solani</i>)	FSO	7.3
荔枝镰刀菌(<i>Fusarium solani</i>)	FSL	7.5
百合白绢病菌(<i>Sclerotium rolfsii</i> Saccardo)	Sr	3.0
苹果链格孢菌(<i>Alternaria mali</i>)	Am	8.0
甜椒疫病菌(<i>Phytophthora capsici</i>)	PcS1	5.0
洋葱黑曲霉菌(<i>Aspergillus niger</i>)	An12	5.0
洋葱黑曲霉菌(<i>Aspergillus niger</i>)	An22	4.0
柑桔青霉菌(<i>Penicillium italicum</i>)	Pi13	13.5
柑桔青霉菌(<i>Penicillium italicum</i>)	Pi28	12.3
甜柿胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	Cg-T4018	7.8
甜柿胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	Cg-T4044	9.4
莲雾果腐菌(<i>Pestalotiopsis eugeniae</i>)	Pe	7.3
椴果蒂腐菌(<i>Botryodiplodia theobromae</i>)	Bot	9.3

[0088]

表2. 液化淀粉芽孢杆菌Ba-BPD1对病原细菌的抑制圈大小

细菌名称	疾病	抑制圈直径(厘米)
燕麦嗜酸菌瓜菜亚种(<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrullii</i>)	瓜类细菌性果斑病(Bacterial fruit blotch of melon)	3.4
根瘤农杆菌(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	根瘤病(Crown gall)	2.3
石竹伯克氏菌(<i>Burkholderia caryophylli</i>)	石竹青枯病(Bacterial wilting)	3.5
茭白细菌性基腐菌(<i>Enterobacter cloacae</i>)	茭白细菌性基腐病(Bacterial basal rot)	2.5
胡萝卜软腐欧氏杆菌胡萝卜亚种(<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>)	细菌性软腐病(Soft rot disease)	2.3
菊秋腐欧氏杆菌(<i>Erwinia chrysanthemi</i>)	细菌性软腐病(Soft rot disease)	3.1
梅缺裂早胞菌(<i>Pseudomonas syringae</i>)	梅桃细菌性斑点病(Bacterial leaf spots)	3.1
青枯病菌(<i>Ralstonia solanacearum</i>)	青枯病(Bacterial wilting)	2.9
柑桔溃疡病菌(<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>)	柑桔溃疡病(Citrus canker)	4.5
茄科植物细菌性斑点菌(<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>)	茄科植物细菌性斑点病(Bacterial spot of tomato)	4.5
十字花科黑腐菌(<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>compestris</i>)	十字花科黑腐病(Black rot of brassica)	4.5
水稻白叶枯菌(<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)	水稻白叶枯病(Bacterial leaf blight)	3.2
蜂状芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i> JSR01)	细菌性食物中毒(Bacterial food poisoning)	0.9
沙门氏菌(<i>Salmonella</i> TA 100)	细菌性食物中毒(Bacterial food poisoning)	1.1

[0089]

序列表

[0090] <110> 行政院农业委员会农业药物毒物试验所

[0091] <120> 新颖液化淀粉芽孢杆菌菌株及其应用
 [0092] <160>1
 [0093] <210>1
 [0094] <211>1421
 [0095] <212>RNA
 [0096] <213> 液化淀粉芽孢杆菌 Ba-BPD1
 [0097] <220>
 [0098] <223> 部分 16S 核糖体 RNA 序列
 [0099] <400>1
 [0100]
 caagucgagc ggacagaugg gagcuugcuc ccugauguaa gcggcggacg ggugaguaac 60
 acguggguua ccugccugua agacugggau aacuccgga aaccggggcu aaauaccgau 120
 gguuguuuga accgcauggu ucagacauaa aagguggcuu cggcuaccac uuacagaugg 180
 acccgcggcg cauuagcuag uuggugaggu aacggcucac caaggcgacg augcguagcc 240
 gaccugaag gguaucggc cacacuggga cugagacac gccagacuc cuacgggagg 300
 cagcaguagg gaaucuuccg caauggacga aagucugacg gagcaacgcc gcgugaguga 360
 ugaagguuuu cggaucguaa agcucuguuu uuagggaaga acaauggccg uucaaaauagg 420
 gcggcaccuu gacgguaacu aaccagaaag ccacggcuaa cuacgugcca gcagccgcgg 480
 uaauacguag guggcaagcg uuguccgaa uuauuggcg uaaaggcuc gcagcgguu 540
 ucuuaagucu gaugugaaag ccccgccuc aaccggggag ggucuuugga aacuggggaa 600
 [0101]

cuugagugca gaagaggaga guggaaaucc acguguagcg gugaaaugcg uagagaugug 660
gaggaacacc aguggcgaag gcgacucucu ggucuguaac ugacgcugag gagcgaagc 720
guggggagcg aacaggauua gauaccuigg uaguccacgc cguaaacgau gagugcuaag 780
uguuaggggg uuuccgccc uuagugcugc agcuaacga uuaagcacuc cgccugggga 840
guacggucgc aagacugaaa cucaaaggaa uugacggggg cccgcacaag cgguggagca 900
ugugguuuaa uucgaagcaa cgcgaagaac cuuaccaggu cuugacauc ucugacauc 960
cuagagauag gacgucccu ucgggggag agugacaggu ggugcauggu ugucgucagc 1020
ucgugucgug agauguuggg uuaaguccc caacgagcgc aaccuugau cuuaguugc 1080
agcauucagu ugggcacucu aaggugacug ccggugacaa accggaggaa gguggggaug 1140
acgucaaac aucaugcccc uuauaccug ggcuacacac gugcuacaau ggacagaaca 1200
aagggcagcg aaaccgcgag guuaagcaa ucccacaa cuuucucag uucggaucgc 1260
agucugcaac ucgacugcgu gaagcuggaa ucgcuagua ucgcggauca gcaugccgcg 1320
gugaauacgu ucccgggcu uguacacacc gcccgucaca ccacgagagu uuguaacacc 1380
cgaagucggu gagguaaccu uuuaaggagc agccgcccga g 1421

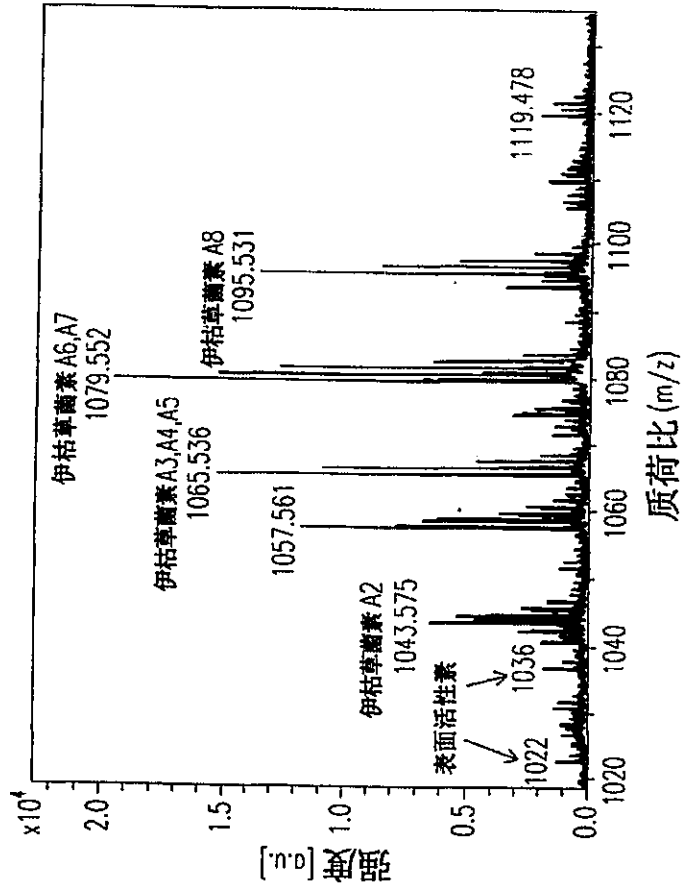


图 1

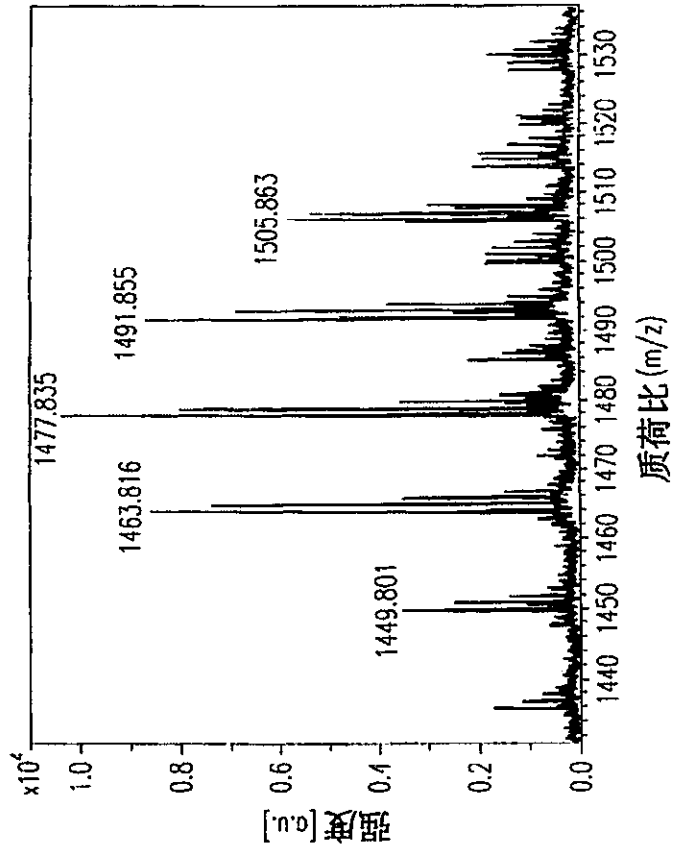


图 2