

文章编号:1673-2383(2018)03-0127-08

网络出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1378.N.20180620.0922.044.html>

网络出版时间:2018-6-20 9:22:54

芽孢杆菌合成环脂肽的研究进展

伊艳杰¹, 王康², 周广舟¹, 陆恒¹, 张嘉隽²

(1.河南工业大学 生物工程学院,河南 郑州 450001;2.河南工业大学 国际教育学院,河南 郑州 450001)

摘要:芽孢杆菌是一类耐热、耐酸碱的细菌,能产生多种抗菌活性物质。芽孢杆菌合成的环脂肽由于结构的多样性和丰富的生物学功能的优越性而备受关注。环脂肽主要由一个肽环和脂肪酸链组成,是一类具有亲水和亲油特性的化合物,具有抗细菌、抗真菌、抗炎、抗肿瘤和抗病毒等生物学功能,故在生物防治、环境保护和医药治疗等方面具有潜在的应用价值。从环脂肽的不同类型结构特征、多种生物学功能、生物合成机制、分离纯化过程、结构鉴定方法与新型环脂肽筛选技术这些方面综述其研究进展。讨论与展望了环脂肽研究的不足、解决途径及未来发展前景。旨在能够快速地了解环脂肽的相关信息及研究状况,同时也为新型环脂肽的开发和利用提供理论参考。

关键词:芽孢杆菌;环脂肽;结构特征;生物学功能;筛选方法

中图分类号:TS201

文献标志码:B

0 前言

芽孢杆菌是一类能够耐热、耐酸碱、抗菌的革兰氏阳性细菌,其次级代谢产物能产生多种抗菌活性物质。这些活性物质除了少数复杂的有机硫化物、氮化物外,大多数都属于单一的多肽类化合物。其中环脂肽(cyclic lipopeptide, CLP)类化合物由于结构的多样性和生物学功能的优越性而备受关注。其结构主要由一个肽环和脂肪酸链组成,是一类具有亲水亲油特性的化合物。环脂肽具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等生物学功能,故在生物防治、环境保护和医药治疗等方面具有潜在的利用价值。

近些年研究表明,不同种类的芽孢杆菌所产生的环脂肽的种类有很大的差异,对应的生物学功能也会不同。而且,即使是同一类菌株,由于环境条件(培养条件)的不同,也可能产生不同结构的环脂肽变异体,进而发挥不同的生物学功能。Gao 等^[1]从解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefa-*

ciens)WH1 中分离出一种 surfacin 家族的环脂肽菌纤维素(fungin),该环脂肽对 1 型糖尿病的 NOD 小鼠模型具有显著的改善作用,同时它对免疫系统有很好的调控作用,进而也存在一定的抗炎活性。Xu 等^[2]在解淀粉芽孢杆菌 M1 的次级代谢产物中分离出一种 surfactin 家族的环脂肽,这种环脂肽对多种弧菌、海水希瓦氏菌(*Shewanella aquimarina*)都具有抗菌活性。

作者对芽孢杆菌合成环脂肽的结构特征、生物学功能、生物合成、分离纯化、结构鉴定与新型筛选方法等方面进行综述,旨在使更多的科研工作者能够快速地了解环脂肽的相关信息。同时,也为更好地开发和利用新型的环脂肽提供理论依据。

1 环脂肽的结构特征

芽孢杆菌是第一个被发现可以产生环脂肽类化合物的菌株。研究表明,虽然芽孢杆菌可以产生许多不同种类的环脂肽,但环脂肽的结构特征主要可分为两类:第一类是脂肪酸链直接参与成环,如表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturin)等;第二类是脂肪酸链不参与成环,如芬芥素(fengycin)。

1.1 Surfactin

Surfactin 主要是由芽孢杆菌产生的一类具有

收稿日期:2018-01-07

基金项目:国家自然科学基金项目(U1704112);河南省教育厅科学技术研究重点项目(12A180006);河南工业大学河南省属高校基本科研业务费专项资金资助(2016RCJH05)

作者简介:伊艳杰(1978—),女,河南许昌人,博士,副教授,研究方向为微生物防治。

高效表面活性的脂肽类化合物^[3]。由 7 分子氨基酸形成的肽片段和 C13~C15 脂肪酸酰基链组成,相对分子质量在 1 000 左右,见图 1(A)。Surfactin 对 G⁺和 G⁻细菌有显著的抑制作用,同时也具有抑制炎症因子的表达、肿瘤细胞的生长等功能。

1.2 Iturin

Iturin 主要是由枯草芽孢杆菌产生的环脂肽^[3]。由 7 分子氨基酸形成的肽片段和长度为 C13~C17 的 β -羟基脂肪酸链组成,相对分子质量在 1 000 左右,见图 1(B)。由于肽链中脂肪酸长度的不同,导致 iturin 的结构具有多样性,可分为 iturin A, iturin B, 芽孢菌素(bacillomycin)D、F、L 以及抗霉枯草菌素(mycosubtilin)等。研究表明,iturin 对多种植物病原菌都有较强的防治作用,例如:*Xanthomonas campestris cucurbitae*, *Rhizoctonia solani*, *Pectobacterium carotovo-rum* subsp. *Carotovorum*, *Fusarium gramine-arum* 等。

1.3 Fengycin

Fengycin 主要是由枯草芽孢杆菌或者类芽孢杆菌产生的具有抗真菌作用的环脂肽,尤其是对皮肤感染的真菌病有较好的抑制效果。Fengycin 主要是由 10 分子氨基酸形成的肽片段和 C14~C18 脂肪酸酰基链组成,相对分子质量在 1 500 左右,见图 1(C),其中 L-Glu 与 D-Orn 相连,后再与 8 分子氨基酸形成肽环,这与 surfactin 和 iturin 形成的 7 元环肽结构存在明显的差异,故其理化性质也会不同。由于肽链中脂肪酸长度的不同,导致 fengycin 的结构具有多样性,可分为 fengycin A, fengycin B 等。

1.4 新型环脂肽

通过对环脂肽类化合物的结构进行修饰和改造,可以得到许多种类的新型环脂肽化合物。Gui 等^[4]

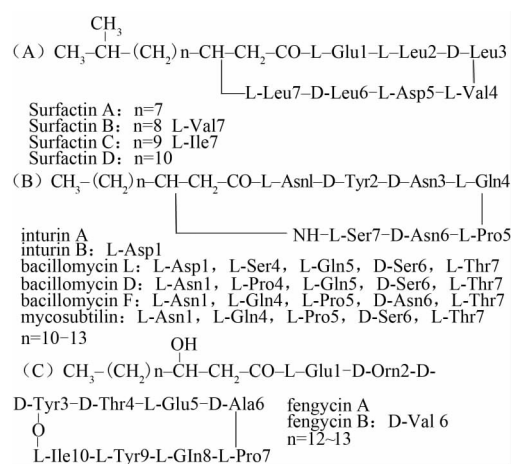


图 1 不同环脂肽结构

Fig.1 Primary structures of cyclic lipopeptides

通过树脂环化法合成了 26 种天然多黏菌素 (polymyxin) 化合物和一种新型的多黏菌素衍生物 S₂。该衍生物 S₂ 是由 10 分子氨基酸构成,其中 L-Dab、L-Thr 和 D-Ser 相连,后再与 8 分子氨基酸形成肽环,属于新型环脂肽类化合物(图 2)。然后,通过体内和体外试验,发现该衍生物 S₂ 对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、鲍氏不动杆菌都有很强的抑制效果,同时发现该衍生物 S₂ 在小鼠体内可以提高药效,降低毒性,是一种新型的环脂肽抗生素。Becker 等^[5]通过固相合成和树脂环化法合成了八肽菌素 C4 (Octapeptin C4), 即该新型环脂肽类化合物是由 8 分子氨基酸形成肽环(图 2)。研究发现,该 Octapeptin C4 对多种耐药的革兰氏阴性菌具有抑制作用,尤其是金黄色葡萄球菌。Chitty 等^[6]研究发现 Octapeptin C4 对临床分离的新生隐球菌(neoformans)及其变异菌种都有很好的抑制效果,其最小抑菌质量浓度(MIC)为 1.56~3.13 g/mL。

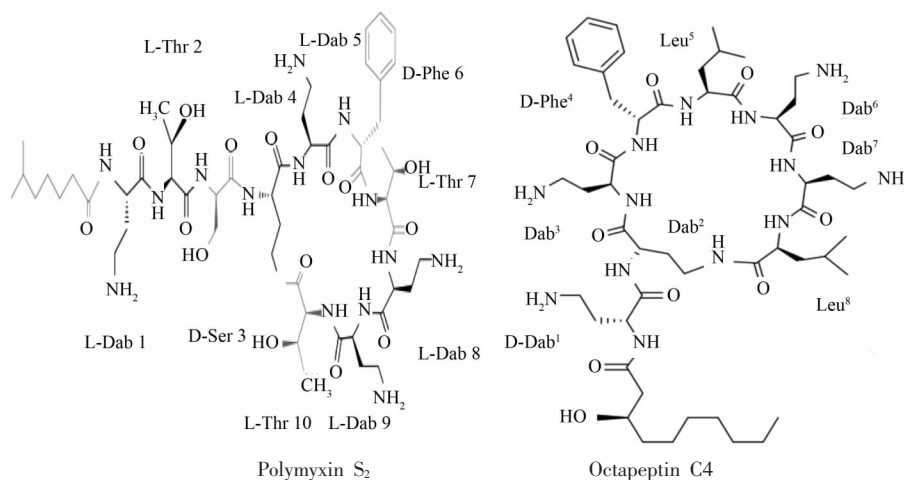


图 2 两种新型环脂肽的结构

Fig.2 Primary structures of two new cyclic lipopeptides

2 环脂肽的生物学功能

根据环脂肽及其同系物结构和组成的多样性和复杂性特点,近些年来人们发现其存在着许多丰富的生物学功能,例如:抗细菌、抗真菌、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗肥胖细胞、抗支原体等作用^[7]。

2.1 抗细菌活性

根据目前的研究成果,环脂肽主要是通过抑制细菌细胞膜的功能,导致细胞凋亡,从而发挥抗菌活性。环脂肽的这种抗菌机制与其他某些常见抗生素的作用机制类似,如多黏菌素(polymyxin)、两性霉素B(amphotericin B)等。

Liu等^[8]在枯草芽孢杆菌CAU21代谢物中提取了一种新型环脂肽Bacaucin,并发现这种新型环脂肽既有较高的表面活性,又有极强的抗G⁺细菌的作用,尤其是能杀灭耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。Yu等^[9]发现一株枯草芽孢杆菌能够代谢产生一种环脂肽Fusaricidins,这种环脂肽对植物病原真菌和G⁺细菌都有较强的抑制作用。陆金荣等^[10]从枯草芽孢杆菌的次级代谢产物中分离出一种surfactin家族的环脂肽,这种环脂肽对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和鸡白痢沙门氏菌等细菌都有较强的抑制作用。荣艳君等^[11]从解淀粉芽孢杆菌R3的代谢产物中分离出一种surfactin家族的环脂肽类化合物,这种环脂肽对临床致病菌大肠杆菌有极强的抑制效果。

2.2 抗真菌活性

目前的研究表明,环脂肽除了对多种细菌有显著的拮抗作用外,对来自植物和临床分离的病原真菌都有较强的抑制活性。

Aleti等^[12]从萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)176S的代谢产物中分离纯化出一种surfactin家族的环脂肽,这种环脂肽对植物病原菌中的立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)有很强的抑制作用。Romano等^[13]在解淀粉芽孢杆菌BO5A的次级代谢产物中发现两种新型环脂肽,通过核磁共振(1D和2D)、MS、MS1和MS2等方法鉴定,这两种环脂肽属于surfactin家族和iturin家族,并且这种环脂肽对黑曲霉(*Aspergillus niger*)、葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、青霉菌(*Penicillium italicum*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)等都有一定的抑制作用。Li等^[14]从枯草芽孢杆菌XF-1的次级代谢产物中分离出一种fengycin家族的新型环脂肽,这种环脂肽对根肿病菌(*plasmiodiophora brassicae*)有极强的抑制作用。Song等^[15]从解淀粉芽孢杆菌的代谢物中分离纯化出一种surfactin家族的环脂肽,这种环脂肽对来自临床分离的白色念珠菌具有极强的抑制

作用,具有开发为医药的潜力。

2.3 抗炎活性

研究发现,环脂肽类化合物还有很强的抗炎活性。Gan等^[16]从芽孢杆菌的次级代谢产物中分离出一种环脂肽surfactin,该脂肽在体内和体外都有很广泛的抗炎活性。例如,在小鼠小肠内,surfactin通过抑制IgA、转化生长因子(TGF)- β 和白介素(IL)-10等炎症因子的产生与释放,从而产生抗炎作用。在小鼠脾脏内,surfactin通过诱导CD4 + CD25 + FoxP3 + Tregs系统,抑制T细胞产生促炎性细胞因子,包括肿瘤坏死因子(TNF)- α 和干扰素(IFN)- γ 等,从而表现出抑制炎症反应的活性。Zhang等^[17]从纳豆芽孢杆菌TK-1中分离出一种具有极强表面活性剂的环脂肽surfactin,该环脂肽在某一浓度下具有无细胞毒性的抗炎作用,其作用机制是:抑制IFN- γ 、IL-6、iNOS和NO的表达。

2.4 抗肿瘤活性

近年来,人们对抗肿瘤药物的开发和利用成为热点,其中包括一些环脂肽类抗生素。安秀峰等^[18]从纳豆芽孢杆菌的次级代谢产物中提取出一种surfactin家族的纳豆环脂肽,这种环脂肽对人乳腺癌细胞MCF-7的增殖有显著抑制作用,并呈一定的剂量效应关系。经过活细胞工作站镜检和流式细胞仪检测,证实该环脂肽可改变细胞形态,诱导MCF-7细胞凋亡。同时,该纳豆环脂肽进一步阻滞细胞周期,抑制肿瘤细胞生长,从而表现出抗肿瘤活性。

郭传龙等^[19]在枯草芽孢杆菌代谢物中分离纯化出一种环脂肽,这种环脂肽对人乳腺癌细胞MCF-7有较强的增殖抑制作用,并随着环脂肽浓度的升高和作用时间的延长,对MCF-7细胞增殖抑制作用不断提高,且该环脂肽对人胚肺成纤维HELF细胞生长没有影响。经过流式细胞仪和Annexin V/PI双染标记检测,环脂肽使MCF-7细胞的早期凋亡率明显上升,表现出抗肿瘤活性。Wu等^[20]研究发现,从芽孢杆菌分离得到的surfactin对各种肿瘤细胞都有抑制作用,如艾氏腹水癌(Ehrlich ascites)、乳腺癌、结肠癌、白血病、肝癌等。其作用机制是大多数的surfactin能抑制和阻滞肿瘤细胞生长和转移,促使肿瘤细胞凋亡等。同时,他们还发现将surfactin合并为聚合物纳米粒、胶束、微乳剂、脂质体等纳米制剂,可以大大提高抗肿瘤活性。

2.5 其他活性

环脂肽除了具有抗细菌、抗真菌、抗炎、抗肿瘤等功能外,还具有改善石油污染,防治动物、植物病毒等作用。

Liu 等^[21]从地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) Y-1 的次级代谢产物中提取出一种环脂肽,这种环脂肽有很强的表面活性,对被石油污染的土壤有显著的改善作用,同时也有较高的抗真菌活性。Li 等^[22]从食用油污染的土壤中分离得到了一株假蕈状芽胞杆菌(*Bacillus pseudomycooides*)BS6,在该菌株的次级代谢产物中提取到一种具有强表面活性的环脂肽,这种环脂肽在回收废弃食用油和生物修复石油污染的场地等方面有很好的应用前景。

任鹏举等^[23]从枯草芽胞杆菌 OKB105 的次级代谢产物中提取分离出一种 surfactin 家族的环脂肽,这种环脂肽对烟草花叶病毒病有显著的防治效果,病斑抑制率达到 70.9%。通过 Real-time PCR 检测说明 surfactin 诱导了烟草依赖于 SA 和 ET 信号通路的诱导系统抗性(induced systemic resistance, ISR)反应,从而抑制了烟草花叶病毒的侵染。梁婷婷等^[24]从芽胞杆菌的代谢产物中分离出一种 surfactin 家族的环脂肽,这种环脂肽对 H9N2 型禽流感病毒和新城疫病毒都有很高的防治作用。同时,他们通过鸡胚培养病毒方法和血凝实验,证实了该环脂肽对鸡胚本身无毒性作用,且对两种病毒在鸡胚中的增殖有一定的抑制作用。

3 环脂肽的生物合成

随着研究的深入与现代生物学基因分析鉴定技术的发展,大量试验结果表明,环脂肽是由一系列相关基因系统共同表达调控合成。其中,芽胞杆菌所产生的环脂肽由非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs)催化合成。

NRPSs 是由多个功能模块按一定的空间顺序排列组合的复合酶体系,且每个模块又是由多个结构域组成。其中启动、核心和终止 3 个模块是 NRPSs 的基本组成部分。其中各模块的主要结构域由腺苷酰化(adenylation, A)结构域、肽酰基载体蛋白(peptidyl carrier protein, PCP)结构域、缩合(condensation, C)结构域 3 个核心部分组成。另外,许多模块还存在一些其他的结构域,如硫酯酶(thioesterase, TE)结构域,羟基化(hydroxylation, H)、甲基化(methylation, MT)结构域、氨基转移酶(aminotransferase, AMT)结构域,环化(cyclization, Cy)结构域,浓缩/差向异构化(condensation/epimerization, C/E)结构域等。

NRPSs 其中一个典型核心模块的排布顺序为 C-A-PCP,大约由 1 000 个氨基酸组成。其中 C 结

构域(约 450 个氨基酸,50 kDa)可以保证肽链的合成;A 结构域(约 550 个氨基酸,50 kDa)的作用是活化氨基酸底物;PCP 结构域(约 80 个氨基酸,8~10 kDa)有助于对氨基酸底物进行转移。NRPSs 的起始模块有两种类型:一种是 A-PCP,这个起始模块在 NRPSs 的合成中是最常见的,其中 A 结构域可以识别肽链,并且与 PCP 结构域结合,从而发挥起始作用;另一种是 C-A-PCP, C 结构域可将氨基酸 N 末端进行酰基化,同时也可以将 L-氨基酸转化成 D-氨基酸。NRPSs 的终止模块一般是由 C-A-PCP-TE 组成,TE 结构域能够催化肽链的释放和环化,并起到终止肽链合成的作用。由于氨基酸的不同以及脂肪酸链的长度、特性的差异,导致了环脂肽结构和种类的多样性,进而使其生物学功能发生变化^[25]。

4 环脂肽的分离纯化、结构鉴定

4.1 分离纯化

依据环脂肽的结构特征和理化性质,其分离纯化主要步骤:沉淀、冷冻干燥、萃取、层析、高效液相色谱等。由于环脂肽具有耐强酸的性质,故使用 6 mol/L 浓盐酸对微生物的发酵液进行沉淀,此时沉淀物除了环脂肽类化合物外,还有杂蛋白和色素等杂质。沉淀后去除上清液,用水洗沉淀 3~4 次,以除去较多的水溶性杂质,再进行冷冻干燥。干燥后的沉淀一般加入甲醇(乙醇)进行萃取,从而使环脂肽溶解,以除去不溶于溶剂的杂质,便于后续分离和提纯。经过萃取离心去除沉淀,剩余的环脂肽粗提液中存在不容易除去的杂质多为色素。故进一步层析的目的是除去少量的色素。

层析的方法有很多,主要包括有:薄层层析(TLC)、葡聚糖凝胶层析(Sephadex)、凝胶色谱层析(GPC)。层析能除去环脂肽初提物中的大部分色素,且能初步地分离出不同类别的环脂肽化合物,从而进一步达到分离纯化的目的^[26]。层析后的物质经过冷冻干燥得到较纯的环脂肽样品。再通过高效液相色谱测定样品的保留时间、出峰面积与比例,然后与标准品的相关数据进行比较,从而确定环脂肽化合物的大体种类。经过高效液相色谱后的环脂肽可以按峰面积收集纯化,用来进行后续的结构鉴定^[27]。

4.2 结构鉴定

鉴定环脂肽的结构有很多方法,根据其结构特征可以划分为两类:一是对于环脂肽平面结构的鉴定方法,如 MS 法、GC-MS 法、2D-NMR 法、红

外光谱(IR)等;二是对于环脂肽立体结构的鉴定方法,如氨基酸化学衍生法、核磁共振(NMR)法、X-射线单晶衍射、基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)等^[26]。

5 新型环脂肽的筛选方法

传统的环脂肽筛选是以微生物次级代谢产物的表面活性和抗菌等作用为参照,对各种产环脂肽的有益菌种进行筛选。然后对微生物的代谢产物进行分离纯化,从而得到较纯的环脂肽类物质。最后通过IR、MS、NMR等方法对环脂肽的结构进行鉴定。由于微生物代谢发酵产物中环脂肽的浓度较低,需要大量的发酵和分离纯化,才能得到一定量的环脂肽纯品。所以,传统的分离纯化方法存在耗时长、产量少、特异性差等诸多问题。面对这些问题,快速、高效地筛选合成专一环脂肽的微生物和提高环脂肽的浓度、产量就显得极为重要。

5.1 PCR 扩增技术

PCR 扩增技术由于其高效、快速、便捷且具有专一性和敏感性等优点而被广泛推广和应用。Habe 等^[28-29]以枯草芽孢杆菌 NBRC 109107 的总DNA为模板,同时使用正向和反向多种引物,如在 *srfAA* 区中的 *SrfA-AF* 和 *SrfA-AR* 引物,在 *fenA* 区中的 *FenAF* 和 *FenAR* 引物,在 *locD* 区中的 *LocDF* 和 *LocDR* 引物,在 *ituA* 区和 *ituB* 区之间的 *ITUP1-F* 和 *ITUP1-R* 引物,然后通过 PCR 技术来扩增 NRPS 编码基因,进而合成多种类型的环脂肽,这些环脂肽大多数具有降低表面张力的活性。Farias 等^[30-31]在编码芽孢杆菌 *gyrB* 区和 *rpoB* 区分别设计引物 *UP1-F* 和 *UP2-R*, *rpoB-F* 和 *rpoB-R*, 以此为核酸序列进行 PCR 扩增,得到不同种类的芽孢杆菌,对这些菌株进行系统发育分析,分别属于 *Bacillus subtilis* TIM27 和 TIM49, *Bacillus vallismortis* TIM68, *Bacillus amyloliquefaciens* ICA13, 该方法为发现多种新型环脂肽提供了一条简单、快捷和严谨的思路。

5.2 基因组挖掘

随着高通量技术和生物信息学的快速发展,基因组挖掘发现新的微生物代谢产物已经成为一个新的发展领域。同时,通过不断优化培养基组分、培养条件和加入其他酶抑制剂等方法,从而挖掘更多优良的次级代谢产物^[32]。合成新型环脂肽类化合物的主要步骤包括:基因→预测→合成酶系→优化→筛选→化合物。通过基因组分析和基因敲除,并结合传统化学转化方法和 LC-FTICR-MS/MS 分离及结构分析,Jiang 等^[33]对枯草芽孢杆菌中

的 NRPS 基因进行结构修饰,得到一种新型的 surfactin 家族的环脂肽,该环脂肽对串珠镰刀菌 (*Fusarium Moniliforme*) 有很强的抑制作用。王傲等^[34]在 PCR 扩增技术的基础上,以 NRPS 基因为靶点,筛选到能产生环脂肽的枯草芽孢杆菌 PTWA2,对该菌株的发酵产物进行分离纯化,然后通过核磁共振和质谱方法进行结构鉴定,最终证实该环脂肽类型为 surfactin A。

5.3 高通量筛选

高通量筛选(High-Throughput Screening, HTS)作为一项化合物筛选技术,主要包括三大基本技术:自动化技术、计算机软件技术和生物评价法测定技术^[35]。HTS 技术特有快速、微量、准确和灵敏等优点,现已在筛选出具有优良生物活性的微生物的代谢产物中被广泛应用。Hazra 等^[36]从土壤、污水和污泥中共筛选出 76 种细菌,通过 16 种不同的高通量筛选方法,最终得到了一株具有较强生物表面活性的菌株,基于 16S rDNA 测序和 FAME 分析,确定该菌株为克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*) BS02,同时经过 LC-ESI-MS 鉴定该表面活性剂为 surfactin 家族的环脂肽,该环脂肽具有一定的杀虫活性。Zhu 等^[37]以枯草芽孢杆菌 723 作为突变亲本和常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP),通过高通量筛选技术从已突变的 27 000 菌株中筛选出 37 株高产菌株,其中一个突变菌株产生 473.6 mg/L surfactin,这些菌株的产量是亲本菌株的 5.4 倍。

6 讨论与展望

芽孢杆菌所产生的环脂肽因其具有抗菌、抗真菌、抗炎、抗肿瘤等多种生物学功能在作为抗生素方面具有潜在的应用价值。而且,由于环脂肽结构的多样性,导致了其理化性质的多样性,因而也被广泛应用于其他领域,如生物医药、石油开采以及农业生产等。Jemil 等^[38]从甲基营养芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*) DCS1 中分离和筛选出一种具有极强表面活性的生物表面活性剂,通过质谱(mass spectrometry, MS)方法分析该生物表面活性剂得到 3 种环脂肽:surfactin、iturin 和 fengycin。然后进一步通过串联质谱(tandem mass spectrometry, TMS)方法来阐明 3 种环脂肽的结构特征。最后通过基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)总共鉴定出 25 种不同环脂肽母离子的亚型结构,同时这些环脂肽可被广泛地应用于生物技术、农业药学和食品保藏等方面的研究。Jasim 等^[39]从 *Bacopa monnieri* 的茎组织中分离出一种能抗真菌和抗

细菌的内生芽孢杆菌(*Endophytic Bacillus*)BmB 9,同时对该菌株的生物合成基因簇进行 PCR 扩增和基因挖掘,得到 3 种不同的代谢产物:surfactin,iturin,I 型酮化合物合酶 (type I polyketide synthase,PKS)基因。然后通过 LC-MS/MS 进一步分析该提取物,结果表明该提取物存在 3 种环脂肽成分:surfactin 衍生物、iturin、fengycin。

以上研究表明,某些芽孢杆菌能产生许多不同种类的环脂肽,同时这些环脂肽大部分都具有很多优点的生物学功能。但是,通过传统的方法筛选得到的菌株其产量较低,而且成本也较高,不利于大规模的生产和广泛的应用,从而阻碍了对环脂肽的进一步研究。因此,通过生物学方法和新型的设备技术,可能会对用工业方法生产出大量的环脂肽提供一些新的思路。

参考文献:

- [1] GAO Z Q,ZHAO X Y,YANG T,et al. Immunomodulation therapy of diabetes by oral administration of a surfactin lipopeptide in NOD mice [J]. *Vaccine*,2014,32(50):6812-6819.
- [2] XU H M,RONG Y J,ZHAO M X,et al. Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* amyloliquefaciens M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*,2014,98(1):127-136.
- [3] LIU H X,GAO L,HAN J Z,et al. Biocombinatorial synthesis of novel lipopeptides by COM Domain-Mediated reprogramming of the plipastatin NRPS complex[J]. *Frontiers in Microbiology*,2016,7:1801.
- [4] CUI A L,HU X X,GAO Y,et al. Synthesis and bioactivity investigation of the individual components of cyclic lipopeptide antibiotics [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*,2018,61(5):1845-1857.
- [5] BECKER B,BUTLER M S,HANSFORD K A,et al. Synthesis of octapeptin C4 and biological profiling against NDM-1 and polymyxin-resistant bacteria [J].*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*,2017,27(11):2407-2409.
- [6] CHITTY J L,BUTLER M S,SUBOH A,et al. Antimicrobial octapeptin C4 analogues active against cryptococcus species [J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*,2018,62(2):e00986-17.
- [7] MEENR K R,SHARMA A,KANWAR S S. Lipopeptides:A distinct class of antibiotics with diverse applications [J].*Advances in Biotechnology & Microbiology*,2017,7(2):555706.
- [8] LIU Y,DING S ,DIETRICH R,et al. Corrigendum:A biosurfactant-inspired heptapeptide with improved specificity to kill MRSA [J]. *Angewandte Chemie*,2017,56(21):5651.
- [9] YU W B,YE B C. High-level iron mitigates fusaricidin-induced membrane damage and reduces membrane fluidity leading to enhanced drug resistance in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Basic Microbiology*,2015,56(5):502-509.
- [10] 陆金荣,梅冬雪,宋涛,等.枯草芽孢杆菌 GD 产脂肽的抗菌作用及活性成分分析 [J].*畜牧与兽医*,2016,48(1):16-20.
- [11] 荣艳君. 解淀粉芽孢杆菌 R3 菌株抗菌脂肽及其作用于病原大肠杆菌的研究[D].青岛:中国海洋大学,2014.
- [12] ALETI G,LEHNER S,BACHER M,et al. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus* [J].*Environmental Microbiology*,2016,18(8):2634-2645.
- [13] ROMANO A,VITULLO D,SENATORE M,et al. Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain B05A [J]. *Journal of Natural Products*,2013,76(11):2019-2025.
- [14] LI X Y,MAO Z C,WANG Y H,et al. Diversity and active mechanism of fengycin-type cyclopeptides from *Bacillus subtilis* XF-1 against *Plasmodiophora brassicae* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*,2013,23(3):313-321.
- [15] SONG B,RONG Y J,ZHAO M X,et al. Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens*,anti-CA against *Candida albicans*,isolated from clinic [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2013,97(16):7141-7150.
- [16] GAN P,JIN D,ZHAO X Y,et al. *Bacillus*-produced surfactin attenuates chronic inflammation in atherosclerotic lesions of ApoE(-/-) mice[J]. *International Immunopharmacology*,2016,35:226-234.

- [17] ZHANG Y Y, LIU C, DONG B, et al. Anti-inflammatory activity and mechanism of surfactin in lipopolysaccharide-activated macrophages [J]. *Inflammation*, 2015, 38 (2): 756-764.
- [18] 安秀峰, 刘瑞雪, 冯莉, 等. 纳豆脂肽诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的机制研究 [J]. *癌变 畸变 突变*, 2015, 27(6): 459-462.
- [19] 郭传龙, 王莹, 王旻. 枯草芽孢杆菌发酵产物 CLPs 抗肿瘤活性研究 [J]. *药物生物技术*, 2013, (4): 340-343.
- [20] WU Y S, NGAI S C, GOH B H, et al. Anti-cancer activities of surfactin and potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 761.
- [21] LIU B Q, LIU J P, JU M T, et al. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis*, Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 107 (1): 46-51.
- [22] LI J, DENG M C, WANG Y, et al. Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycoloides*, BS6 utilizing soybean oil waste [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 112: 72-79.
- [23] 任鹏举, 谢永丽, 张岩, 等. 枯草芽孢杆菌 OKB105 产生的 surfactin 防治烟草花叶病毒病及其机理研究 [J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(2): 216-221.
- [24] 梁婷婷. 芽孢杆菌降解霉菌毒素及脂肽化合物防治家禽病毒病的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [25] 黎循航, 张言周, 魏志文, 等. 环脂肽的研究进展 [J]. *中国酿造*, 2016, 35(12): 5-11.
- [26] 肖怀秋, 李玉珍. 环脂肽化学结构及鉴定方法研究进展 [J]. *食品与发酵科技*, 2008, 44 (6): 1-5.
- [27] 周伟, 郑维, 陶思美, 等. 芽孢杆菌产生的环脂肽类物质的研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2015(4): 80-86.
- [28] HABA H, TAIRA T, IMURA T. Screening of a *Bacillus subtilis* strain producing multiple types of cyclic lipopeptides and evaluation of their surface-tension-lowering activities [J]. *Journal of Oleo Science*, 2017, 66 (7): 785-790.
- [29] LUO C P, LIU X H, ZHOU H F, et al. Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 422-431.
- [30] FARIAS B C S, HISSA D C, NASCIMENTO C T M D, et al. Cyclic lipopeptide signature as fingerprinting for the screening of halotolerant *Bacillus* strains towards microbial enhanced oil recovery [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2017: 1-12.
- [31] AHAOTU I, ANYOGU A, NJOKU O H, et al. Molecular identification and safety of *Bacillus*, species involved in the fermentation of African oil beans (*Pentaclethra macrophylla*, Benth) for production of Ugba [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 162 (1): 95-104.
- [32] 向照举, 李小璐, 李治. 假单胞菌属合成环脂肽分子的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(7): 974-980.
- [33] JIANG J, GAO L, BIE X M, et al. Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme* [J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 31.
- [34] 王傲, 杨柯, 吕曼, 等. 基于 NRPS 基因筛选鉴定产生环脂肽葡萄附生细菌的研究 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(12): 164-170.
- [35] SCHMATLOCH S, SCHUBERT U S. Techniques and instrumentation for combinatorial and high-throughput polymer research: recent developments [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2004, 25(1): 69-76.
- [36] HAZRA C, KUNDU D, CHAUDHARI A. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus clausii* BS02 using sunflower oil soapstock: evaluation of high throughput screening methods, production, purification, characterization and its insecticidal activity [J]. *RSC Advances*, 2015, 5 (4): 2974-2982.
- [37] ZHU L Y, XU Q, JIANG L, et al. Polydiacetylene-based high-throughput screen for surfactin producing strains of *Bacillus subtilis* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88207.

- [38] JEMIL N, MANRESA A, RABANL F, et al. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus*, DCS1 strain [J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1060: 374–386.
- [39] JASIM B, SREELAKSHMI K S, MATHEW J, et al. Surfactin, iturin, and fengycin biosynthesis by endophytic *Bacillus*, sp. from *Bacopa monnieri* [J]. *Microbial Ecology*, 2016, 72(1): 106–119.

ADVANCE IN STUDY ON CYCLIC LIPOPEPTIDES PRODUCED BY *BACILLUS*

YI Yanjie¹, WANG Kang², ZHOU Guangzhou¹, LU Heng¹, ZHANG Jiajun²

(1. School of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. School of International Education, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: *Bacillus* is a kind of Gram-positive bacteria that can withstand heat, acid and alkali, and produce many kinds of antimicrobial substances. The cyclic lipopeptide from *Bacillus* has attracted much attention due to its structural diversity and many biological functions. Cyclic lipopeptide is composed of a peptide ring and fatty acid chain. It has hydrophilic and lipophilic property. Cyclic lipopeptide has diverse function such as antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antitumor and antiviral and therefore it has potential application value in biological control, environmental protection and medical treatment. The research progresses of cyclic lipopeptides in structural features of different types, many biological functions, biosynthesis mechanisms, separation and purification processes, structural identification methods and screening techniques for new cyclic were reviewed in this paper. Finally, the shortcomings, solutions and future development of cyclic lipopeptides were discussed and prospected. The aim is to help more researchers to quickly understand the information of cyclic lipopeptide. At the same time, it also provides a theoretical reference for the development and utilization of the new cyclic lipopeptide.

Key word: *Bacillus*; cyclic lipopeptide; structural characteristics; biological functions; screening