

# 抗菌肽 Fengycins 抑制串珠镰刀菌的初步机制

胡梁斌<sup>1,2</sup> 周威<sup>1</sup> 章挺<sup>4</sup> 杨志敏<sup>3</sup> 徐剑宏<sup>1</sup> 石志琦<sup>1\*</sup>

(1. 江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所 江苏 南京 210014)

(2. 河南科技学院食品学院 河南 新乡 453003)

(3. 南京农业大学生命科学学院 江苏 南京 210095)

(4. 江西省林业科学院 江西 南昌 330032)

**摘 要:** Fengycins 是枯草芽孢杆菌非核糖体合成的环状脂肽类抗生素, 本文从其特性入手, 研究了其抑制串珠镰刀菌的初步作用机制。普通显微观察结果显示, Fengycins 处理能使部分串珠镰刀菌菌丝顶端破裂, 进一步通过 PI 染色与荧光显微观察发现, Fengycins 处理会导致串珠镰刀菌菌丝膜的损伤。在添加几丁质、壳聚糖、 $\beta$ -1,3 葡聚糖、甾醇、胆固醇的平板内, Fengycins 的抑菌活性没有受到太大影响; 而在添加卵磷脂的平板, Fengycins 的抑菌活性受到明显的拮抗。这些结果说明卵磷脂很可能是 Fengycins 在膜上的作用靶标。此外, 研究还发现 Fengycins 能够抑制串珠镰刀菌分泌的磷脂酶 A<sub>2</sub> 的活性, 该性质很可能也在 Fengycins 的抑菌活性中起到了一定作用。

**关键词:** Fengycins, 串珠镰刀菌, 抑制机制

## Mechanism of Inhibition to *Fusarium moniliforme* by Antimicrobial Peptide Fengycins

HU Liang-Bin<sup>1,2</sup> ZHOU Wei<sup>1</sup> ZHANG Ting<sup>4</sup> YANG Zhi-Min<sup>3</sup>  
XU Jian-Hong<sup>1</sup> SHI Zhi-Qi<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

(2. School of Food, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

(3. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(4. Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang, Jiangxi 330032, China)

**Abstract:** Fengycin is a cyclic lipopeptide antibiotic produced nonribosomally by *Bacillus subtilis*. In this study, the primary mechanism of inhibition to *Fusarium moniliforme* by Fengycins was investigated according to their special properties. Microscopic observation on morphology of *F. moniliforme* mycelia revealed that tips of partial mycelia were lysed. PI staining of Fengycins-treated *F. moniliforme* mycelia was observed under fluorescence microscope, which indicated the toxin-mediated damage of cytoplasmic membrane. Further study showed that addition of chitin, chitosan,  $\beta$ -1,3-glucan, ergosterol and cholesterol in agar media

could not significantly modify the inhibition to *F. moniliforme* by Fengycins, while addition of phosphatidylcholine could antagonize the antifungal activity of Fengycins. These results suggested that phosphatidylcholine probably was the plasma membrane target for Fengycins. Additionally, our results also showed that fengycins could depress the activity of PLA<sub>2</sub> secreted by *F. moniliforme*, which might contribute to the antifungal activity of fengycins against *F. moniliforme*.

**Keywords:** Fengycins, *Fusarium moniliforme*, Mechanism of inhibition

枯草芽孢杆菌在防治土传、种传病害的生产实践中有许多成功应用,表现出明显的防病增产作用。近年来,枯草芽孢杆菌被广泛用于遗传学和生物技术研究领域。目前,已收集到几百个枯草芽孢杆菌菌株,能够产生多于 20 类抗生素,其中包括非核糖体合成的脂肽 Fengycins<sup>[1]</sup>。Fengycins 是一类由一段  $\beta$ -羟基脂肪酸链和 10 个氨基酸(其中 8 个氨基酸组成 1 个环)组成的化合物(图 1)。通常这些氨基酸包括 L-Glu、D-Orn、L-Tyr、D-allo-Thr、L-Glu、D-Ala (or D-Val)、L-Pro、L-Glu、D-Tyr 和 L-Ile, 在第 3 个氨基酸 L-Tyr 及第 10 个氨基酸 L-Ile 会形成内酯键<sup>[2-3]</sup>。早在 1986 年, Vanittanakom 等<sup>[4]</sup>发现 Fengycins 能够抑制植物病原真菌的生长,并推测其作用靶标可能与膜上的甾醇和磷脂相关。后来,Deleu (2005)等用人工膜系统发现 Fengycins 能够与膜层的磷脂相互作用,并导致膜损伤<sup>[5]</sup>。但是总体来说,关于 Fengycins 对真菌作用机制报道很少。在本文中,我们从 Fengycins 的一些特性入手,对 Fengycins 抑制串珠镰刀菌的机制进行了初步研究。

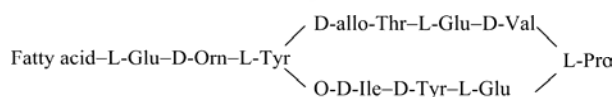


图 1 Fengycins B 的结构图

Fig. 1 Structure of Fengycins B

注: Fengycins A 肽环上六号位为 Ala.

Note: The sixth amino acid is Ala in the peptide cycle of Fengycins A.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*)(ATCC 38932)购于中国微生物菌种保藏中心。

Fengycins 的制备参照 Deleu 等<sup>[5]</sup>的方法。主要是在 B-FS01 发酵后,采用酸沉淀及硅胶柱层析相结合来制备 Fengycins。制备的 Fengycins 通过电喷雾质谱鉴定,纯度接近 90%,其纯化鉴定过程已另拟文发表<sup>[6]</sup>。

试验中所用的其他试剂均为分析纯以上。

### 1.2 串珠镰刀菌的培养

串珠镰刀菌(ATCC 38932)经 PDA 培养活化后,打取菌碟接种于 6%的绿豆培养液中进行产孢。120 r/min 的培养条件下培养 2 d。孢子培养液经双层纱布过滤,8000  $\times$  g 离心除掉上清,用 0.01% 吐温-20 溶液悬浮孢子,并用血球计数板检测孢子悬浮液浓度备用。

接种串珠镰刀菌孢子于 PDB 培养基中(100 个孢子/mL 培养基),26°C、120 r/min 条件下培养 48 h,备用。

### 1.3 Fengycins 对串珠镰刀菌菌丝形态的影响

挑取 PDB 培养好的串珠镰刀菌菌丝,置于凹玻片上,加入 20  $\mu$ L 除过菌的 50  $\mu$ g/mL Fengycins 溶液,于纱布保湿的培养皿中室温培养,普通光学显微镜下定时镜检。以无菌水为对照。

### 1.4 Fengycin 对串珠镰刀菌菌丝膜透性的影响

将串珠镰刀菌的培养液 6000  $\times$  g 离心 10 min,弃上清,用 50  $\mu$ g/mL Fengycins 溶液轻轻悬浮菌丝 15 min,用去离子水清洗,通过碘化丙锭(PI)染色后在荧光显微镜下进行观察。对照菌丝用无菌水悬浮处理。PI (Sigma, China)的配制参照厂家说明书。荧光显微镜: Olympus fluorescence microscope BX-60 (Olympus, Japan);激发光波长 450 nm–490 nm;发射光波长 520 nm。

### 1.5 细胞壁物质及膜物质对 Fengycins 抑菌活性的拮抗

称取一定量胶状几丁质、壳聚糖、 $\beta$ -1,3 葡聚糖直接混入 PDA 培养基中,使其终浓度分别为 0.5、1.0、2.0、10.0 mg/mL,然后高温灭菌备用。卵磷脂、麦角甾醇、胆固醇分别配成 1 mg/mL 母液,过滤除菌后,混入 PDA 培养基中,使其终浓度分别为 0.5、1.0、2.0、10.0、50.0  $\mu$ g/mL。然后通过带毒平板法(含 50  $\mu$ g/mL Fengycins)检测加入各物质后 Fengycins 对串珠镰刀菌的抑制率,通过比较抑制率的改变情况

来判断各物质对 Fengycins 抑菌活性是否具有拮抗作用。

### 1.6 串珠镰刀菌菌丝分泌的磷脂酶的提取

将培养 48 h 的串珠镰刀菌培养液离心( $10000 \times g$ , 10 min), 除掉菌丝, 将上清液在  $4^{\circ}\text{C}$  用 70% 饱和度的硫酸铵沉淀。然后离心收集沉淀, 用  $\text{PLA}_2$  提取液(pH 7.5, 50 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA; 2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ; 1% Triton X-100)溶解, 透析除盐后进行活性测定。

磷脂酶  $\text{A}_2(\text{PLA}_2)$  的活性测定: 参考 Jim 等<sup>[7]</sup>, 采用双酶反应体系, 基本原理: 选用 1,2-二亚油酰基卵磷脂(Dilinoleoyl phosphatidylcholine, 缩写为 DL-PC)作为磷脂酶  $\text{A}_2$  的底物, 生成物亚油酸由脂氧合酶催化发生氧化反应, 生成物氢过氧化物(Hydroperoxide)对应的紫外吸收光谱在 234 nm 的波长位置有吸收峰。在给定的反应时间(50 min)内, 该波长下的吸光值每增加 0.1 为 1 个酶活单位。

试验中采用的具体反应体系: DL-PC (5 mg/mL) 50  $\mu\text{L}$ , pH 8.5 的 Tris-HCl (0.05 mol/L) 625  $\mu\text{L}$ ; 大豆脂氧合酶(10  $\mu\text{g/mL}$ ) 25  $\mu\text{L}$ ; 10 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液 250  $\mu\text{L}$ ;  $\text{PLA}_2$  粗提液 50  $\mu\text{L}$ 。 $\text{PLA}_2$  粗提物在体系中的蛋白含量要低于 3 mg/mL。

### 1.7 Fengycins 对串珠镰刀菌菌丝分泌的 $\text{PLA}_2$ 的活性影响

将上述反应体系中混入 Fengycins, 使其终浓度分别为 0、10、30、50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$ , 通过测定各反应体系在  $25^{\circ}\text{C}$  条件下前后 50 min 内在

234 nm 的吸收值变化来反映活性。以 0 浓度下的活性定为 100%, 通过吸光度变化值的比值来计算各个浓度下的相对活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 Fengycins 对串珠镰刀菌菌丝形态的影响

如图 2 所示, 与对照菌丝相比, 在 Fengycins 处理 3 h 后, 很多菌丝体内出现较大的囊泡。在处理 8 h 后, 部分菌丝出现顶端破裂, 而在对照中则没有观察到这种现象。

### 2.2 Fengycins 对串珠镰刀菌膜透性的影响

PI 与核酸结合后在 450 nm–490 nm 绿光照射下会发射出波长 520 nm 左右的红色荧光, 但是 PI 本身不能透过生物膜。所以, 当在荧光显微镜下观察到细胞在 PI 的染色下呈红色时, 则意味着该细胞膜的透性发生了改变。如图 3 所示, Fengycins 处理 15 min 后, 就可以在荧光显微镜下观察到大部分菌丝被染成了红色, 而对照只有很少一部分被染色。这说明 50  $\mu\text{g/mL}$  的 Fengycins 能够破坏串珠镰刀菌菌丝膜的通透性。但是孢子在处理到萌发前仍然不能被染色, 说明 Fengycins 不容易破坏串珠镰刀菌孢子的膜透性。

### 2.3 一些细胞壁物质以及膜物质对 Fengycins 抑菌活性的拮抗

含有胶状几丁质、壳聚糖、 $\beta$ -1,3 葡聚糖的平板, Fengycins 的抗菌活性没有变化。而含有麦角甾醇和卵磷脂的平板在浓度达到 0.5  $\mu\text{g/mL}$  以上都能部分

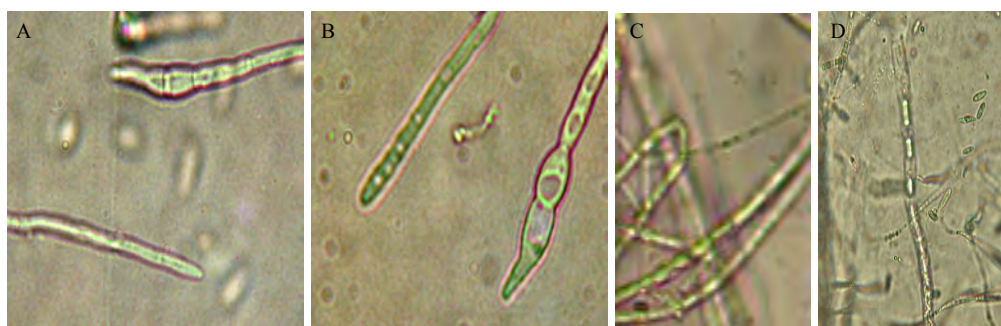


图 2 Fengycins 对串珠镰刀菌 ATCC 38932 菌丝形态的影响

Fig. 2 Effects of Fengycins on the hypha morphology of *F. moniliforme* Sheldon ATCC 38932

注: A: 对照清水处理 3 h 后的菌丝形态; B: Fengycins 处理 3 h 后的菌丝形态; C: 对照清水处理 8 h 后的菌丝形态; D: Fengycins 处理 8 h 后的菌丝形态。

Note: A: Hypha morphology at 3 h after treatment with a control solution; B: Hypha morphology at 3 h after treatment with Fengycins; C: Hypha morphology at 8 h after treatment with a control solution; D: Hypha morphology at 8 h after treatment with Fengycins.

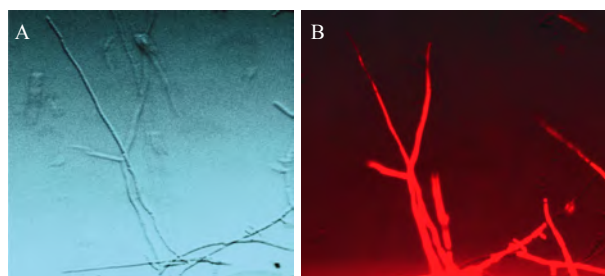


图3 Fengycins处理过的菌丝被PI染色后的荧光显微图  
Fig. 3 Fluorescence microscopy of Fengycins-treated *F. moniliforme* mycelia by PI staining

注: A: 常规光源; B: 激发光源。

Note: A: Normal light source; B: Exciting light source.

拮抗 Fengycins 的抗菌活性(图 4), 含有胆固醇的平板在 1  $\mu\text{g/mL}$  以上才能观察到微弱的对 Fengycins 作用的拮抗。但是随着胆固醇和麦角甾醇浓度的升高这种效应并没有明显增强, 而且平板中的麦角甾醇浓度在 50  $\mu\text{g/mL}$  时, 对菌丝生长有着明显的副作用。值得注意的是, 平板中卵磷脂浓度的增加, 对 Fengycins 的拮抗效应越来越明显。当卵磷脂浓度达到 50  $\mu\text{g/mL}$ , Fengycins 的抑菌活性降低了 57%。

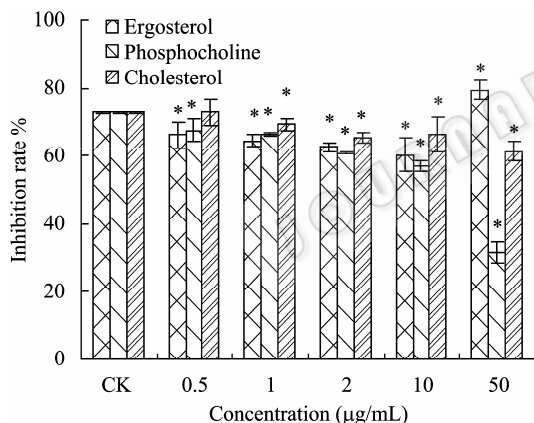


图4 麦角甾醇、卵磷脂、胆固醇对 Fengycins 的抑菌活性的拮抗

Fig. 4 Antagonism of ergosterol, phosphocholine and cholesterol to the antifungal activity of Fengycins

Note: Vertical bars represent standard deviation of the mean ( $n = 3$ ). Asterisks indicate that mean values are significantly different between the treatment and control ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 Fengycins 对串珠镰刀菌菌丝分泌的 PLA<sub>2</sub> 的活性影响

通过双酶反应体系测得不同浓度 Fengycins 处理的 PLA<sub>2</sub> 的活性变化趋势如图 5 所示。随着 Fengycins 浓度的增加, PLA<sub>2</sub> 的活性急剧下降。当 Fengycins 浓度达到 100  $\mu\text{g/mL}$  时, PLA<sub>2</sub> 的活性几乎完全被抑制。

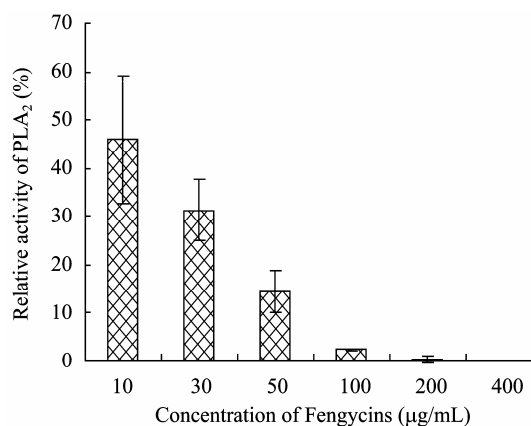


图5 Fengycins 对串珠镰刀菌菌丝分泌的 PLA<sub>2</sub> 的活性影响

Fig. 5 Effects of Fengycins on the activity of PLA<sub>2</sub> secreted by *F. moniliforme* mycelia

Note: Vertical bars represent standard deviation of the mean ( $n = 3$ ).

## 3 讨论

在本研究中, 我们通过 PI 染色证实了 Fengycins 能够破坏串珠镰刀菌菌丝的细胞膜, 最终还能导致部分菌丝顶端破裂。已有研究表明枯草芽孢杆菌分泌的另一类两性脂肽抗生素 iturin A 能够与膜物质结合, 并在膜内形成聚合物, 导致膜穿孔<sup>[8]</sup>。Vanittanakom 等(1986)<sup>[4]</sup>通过硅胶薄层层析发现 Fengycins 能够与麦角甾醇形成复合物。但是那是在有机相中, 麦角甾醇处于溶液态, 而且 Fengycins 也不容易形成胶团结构。生物体的环境主要是水相, 而 Fengycins 也是两性化合物, 当浓度达到一定值(胶团浓度)时能够形成聚合物<sup>[10]</sup>。而这种两性物质能形成聚合物的特性恰是其应用于生物学上通过增溶作用破膜的前提条件<sup>[11]</sup>。因此很可能 Fengycins 与膜上磷脂类物质, 形成的 Fengycins/磷脂复合体会导致膜的穿孔, 这很可能就是 Fengycins 破坏串珠镰刀菌质膜的主要原因。

早在 1960 年就有报道指出添加麦角甾醇、胆固醇等甾醇类物质可以降低多烯类抗菌物质如菲律宾菌素、制霉菌素等对啤酒酵母或黄曲霉的抗菌活性<sup>[11-12]</sup>。但甾醇类化学结构不同其效应差别很大<sup>[8]</sup>。Lampen 等<sup>[12]</sup>观察到, 外部添加甾醇类物质可以减少菌体对这些抗菌物质的吸收。从紫外吸收光谱可推断, 这是由于添加的甾醇类物质与多抗菌物质相互作用的结果。但是 Goltlieb 等认为, 甾醇与多烯类抗菌物质形成的络合物很不牢固, 难以解释其降低抗菌活性的原因<sup>[11]</sup>。我们的研究发现外加麦角甾

醇、胆固醇, 只能轻微的缓解 Fengycins 的抑菌活性, 但是随着浓度的升高这种缓解效应并没有增加。添加的卵磷脂能够明显拮抗 Fengycins 的抑菌活性, 这在一定程度上支持了由于 Fengycins 与卵磷脂类物质结合导致串珠镰刀菌的生长受到抑制的推论。

磷脂酶在细菌和原生动物的病程发生过程中起重要作用, 但是关于磷脂酶与真菌毒性关系的研究最近才有所进展。目前已证实磷脂酶是很多真菌的致病因子<sup>[13-14]</sup>。Ganendren 等<sup>[15]</sup>以磷脂酶 B 为靶标筛选抗真菌药物发现供试的瘾球菌(*Cryptococcal*)磷脂酶的抑制剂能够抑制该病原菌的生长。很多脂肽类抗生素都对磷脂酶的活性有影响。

Fengycins (Plipstatins)被报道能够抑制猪胰脏磷脂酶 A<sub>2</sub> 的活性<sup>[16]</sup>。本研究中, 我们发现 Fengycins 能够抑制串珠镰刀菌分泌的磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性, 该性质很可能也在 Fengycins 的抑菌活性中起到了一定的作用。Fengycins 不能够杀死未萌发的串珠镰刀菌孢子, 而孢子在萌发过程就可以完成对种子的侵染。磷脂酶 A<sub>2</sub> 在侵染过程中起到重要的作用。因此在种子贮藏中, Fengycins 对串珠镰刀菌分泌型磷脂酶 A<sub>2</sub> 活性的抑制作用会缓解种子被串珠镰刀菌感染的进程。

卵磷脂是磷脂酶 A<sub>2</sub> 的底物, 而本研究中我们发现 Fengycins 在水相体系中能够与卵磷脂结合。这种结合可能与其对串珠镰刀菌分泌型磷脂酶 A<sub>2</sub> 的抑制活性有关。总的来说, Fengycins 对菌丝的作用比较明显, 能够破坏其质膜。但是在相当的浓度下仍然不能破坏孢子的质膜, 这可能与孢子特殊的孢子壁有关。但是 Fengycins 能够延滞孢子的萌发, 其作用机制需要进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] 郑媛, 王跃军, 孙谧. 海洋侧孢短芽孢杆菌 *Brevibacillus laterosporus* Lh-1 产抗菌肽 R-1 的培养条件优化. 微生物学通报, 2009, 36(3): 398-403.
- [2] Chang LK, Chen CL, Chang YS, *et al.* Construction of Tn917ac1, a transposon useful for mutagenesis and cloning of *Bacillus subtilis* genes. *Gene*, 1994(150): 129-134.
- [3] Chen CL, Chang LK, Chang YS, *et al.* Transposon mutagenesis and cloning of the genes encoding the enzymes of fengycin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*, 1995(248): 121-125.
- [4] Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, *et al.* Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1986(39): 888-901.
- [5] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005(283): 358-365.
- [6] Hu LB, Shi ZQ, Zhang T, *et al.* Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. *FEMS Microbiology Letters*, 2007(272): 91-98.
- [7] Jimenez M, Cabanes J, Gandia-Herrero F, *et al.* A continuous spectrophotometric assay for phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Analytical Biochemistry*, 2003(319): 131-137.
- [8] Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, 1994(87): 151-174.
- [9] Deleu M, Razafindralambo H, Popineau Y, *et al.* Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1999(152): 3-10.
- [10] Lichtenberg D, Robson R, Dennis E. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochim Biophys Acta*, 1983(737): 285.
- [11] Gottlieb D, Carter HE, Wu L, *et al.* Inhibition of fungi by filipin and its antagonism by sterols. *Phytopath*, 1960(50): 594-603.
- [12] Lampen JO, Arnow PM, Safferman RS. Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 1960(80): 200-206.
- [13] David HE, Tania CS. Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(2): 414-421.
- [14] Ivanovska N. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003(22): 357-361.
- [15] Ganendren R, Widmer F, Singhal V, *et al.* *In vitro* antifungal activities of inhibitors of phospholipases from the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004(48): 1561-1569.
- [16] Umezawa H, Aoyagi T, Nishikiori T, *et al.* Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub>, produced by *Bacillus cereus* BMG302-IF67. I. Taxonomy, production, isolation and preliminary characterization. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1986(39): 737-744.