

# Surfactin 的结构、生物合成及其在生物防治中的作用

王俊芳 黄秋斌 张飘丹 张彭湃

(河南大学生命科学学院, 开封 475004)

**摘要:** Surfactin 是由多种芽孢杆菌产生的一种脂肽, 其由一个环七肽头基通过内脂键与链长 12-17 个碳原子的  $\beta$ -羟基脂肪酸连接组成, 是一种非常有效的生物表面活性剂, 并具有重要的生物学功能。本文介绍了 surfactin 家族的结构和生物合成模式, surfactin 是由非核糖体肽合成酶催化合成, 这种机制赋予了 surfactin 家族成员的结构多样性; 综述了 surfactin 在植物病害生防中的作用及机制。已有的研究表明 surfactin 在生物防治中的作用机制主要有以下 4 种方式: (1) 损伤病原菌细胞膜, 引起细胞膜裂解或渗透压失衡; (2) 抑制病原体繁殖; (3) 诱导植株系统抗性; (4) 促进生防菌株的定殖或生物膜的形成。进一步总结了利用基因工程技术研究 surfactin 的最新进展, 以指导 surfactin 的生物合成及其新衍生物开发。Surfactin 的高度结构多样性, 使其具有丰富的物理化学特性, 这些特性可以与多种生物活性联系在一起, 将在不同的领域有更广泛应用。随着对 surfactin 生物合成研究的日益深入, 将会有更多高性能和广阔应用前景的新型脂肽被研发, 这为 surfactin 的进一步研究和生防应用提供依据。

**关键词:** surfactin; 生物表面活性剂; 生物防治; 环脂肽; 生物合成; 结构; 诱导系统抗性

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-0509

## Structure and Biosynthesis of Surfactin as well as Its Role in Biological Control

WANG Jun-fang HUANG Qiu-bin ZHANG Piao-dan ZHANG Peng-pai

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004)

**Abstract:** As a lipopeptide produced by various strains of *Bacillus* spp., surfactin is composed of a cyclo-heptapeptide head group connected to  $\beta$ -hydroxy fatty acids with a chain length of 12 to 17 carbon atoms by endosomal bonds. It is a very powerful biosurfactant and has significant biological functions. In this paper, we reviewed the structure, biosynthesis model and the role of surfactin lipopeptides in biological control of plant diseases. Surfactin is synthesized by non-ribosomal peptide synthetases, which endows the structural diversity of surfactin family members. Previous studies found that the action mechanism of surfactin lipopeptides in biological control of plant disease mainly are in four ways. 1) It caused damage to the cell membrane of pathogen, resulting in its cell membrane rupture or osmotic pressure imbalance. 2) It inhibited the reproduction of pathogen. 3) It induced systemic resistance (ISR) in plants. 4) It promoted the colonization of biocontrol strains or the formation of their biofilms. The current information about surfactin using genetic engineering techniques is also highlighted to guide the biosynthesis of surfactin and to develop new derivatives. Surfactin is rich in physical and chemical properties due to its high structural diversity, which can be associated with a variety of biological activities and may have a wider range of applications in different fields. With the increasingly in-depth research on the biosynthesis of surfactin, more new lipopeptides with high performance and wide application will be developed, which will provide the basis for further research and biocontrol application of surfactin.

**Key words:** surfactin; biosurfactant; biological control; cyclic lipopeptide; biosynthesis; structure; induction of systemic resistance

脂肽是由微生物产生的一类低分子量生物表面活性剂, 这类活性物质具有独特的两亲性分子结

构, 由氨基酸结合形成极性亲水肽键与由脂肪酸烃链组成的非极性疏水基构成<sup>[1]</sup>。因此, 脂肽类表现

收稿日期: 2023-05-30

基金项目: 河南省科技攻关项目 (222102110305)

作者简介: 王俊芳, 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 资源微生物应用; E-mail: jfw188@163.com

通讯作者: 张彭湃, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品发酵; E-mail: bio\_apai@163.com

出多样的生物活性，如抗菌、抗炎和环境修复等生物活性，其在医药、化工、农业、食品和环境治理等领域都有广泛应用<sup>[2-3]</sup>。依据肽链拓扑结构的不同，微生物所产脂肽可以分为线性脂肽和环状脂肽。线性脂肽是由氨基酸肽链与脂肪酸链结合形成链状的脂肽化合物。环脂肽是由氨基酸肽链连接成环或肽链氨基酸上的羧基与部分脂肪酸链上的羟基或氨基结合形成内脂键或酰胺键，成为环状的脂肽化合物。根据合成脂肽的基因簇和化学结构的差异，芽孢杆菌（*Bacillus* spp.）所产脂肽主要有表面活性素（surfactin）、伊枯草菌素（iturin）、泛革素（fengycin）3 大家族<sup>[4]</sup>，其结构如图 1 所示，多为环脂肽形式，它们的脂质部分都是由异构或长度和饱和状态不同的  $\beta$ - 羟基脂肪酸（fatty acid, FA）链组成，肽段由 7 个（surfactins, iturin）或 10 个（fengycin）L 或 D 型的氨基酸残基组成<sup>[5]</sup>。本文主要介绍芽孢杆菌分泌的 surfactin 的结构、生物合成机制、结构多样性及其在农业中的生防作用等。

1 Surfactin 的结构及生物合成

1.1 Surfactin 的结构

Surfactin 是被研究的最多的生物表面活性剂。1968 年，Arima 等<sup>[6]</sup>在研究微生物代谢产物对纤溶系统和凝血系统的影响时发现，了几株枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）菌株分泌到发酵液中的一种强效凝血抑制剂，经分离纯化凝血抑制剂为浅黄色针状物，由于它的高表面活性超过了十二烷基磺酸钠，因此被命名为“表面活性素（surfactin）”。Kakinuma 等<sup>[7-8]</sup>通过对 surfactin 氨基酸序列和脂肪酸链分析阐明了其结构，surfactin 具有亲水性肽段和亲脂性脂肪酸链的两亲性，有特殊的表面活性。Surfactin 是具有共同结构特征的一个脂肽家族，该家族的肽链为七元肽，结构特点是由 7 个  $\alpha$ - 氨基酸残基的短肽与链长 12–17 个碳原子的  $\beta$ - 羟基脂肪酸通过内酯键交联组成的环状物质。Surfactin 家族典型的氨基酸顺序为：L-Glu1-L-Leu2-D-Leu3-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6-L-Leu7，它们具有手性序列<sup>[9]</sup>，位置 3 和 6 含有 D 型氨基酸残基，两个带负电荷的氨基酸残基 Glu 和 Asp 组成 surfactin 的极性部分（在天然 surfactin 分子中），其分子形成马鞍形构象，导致

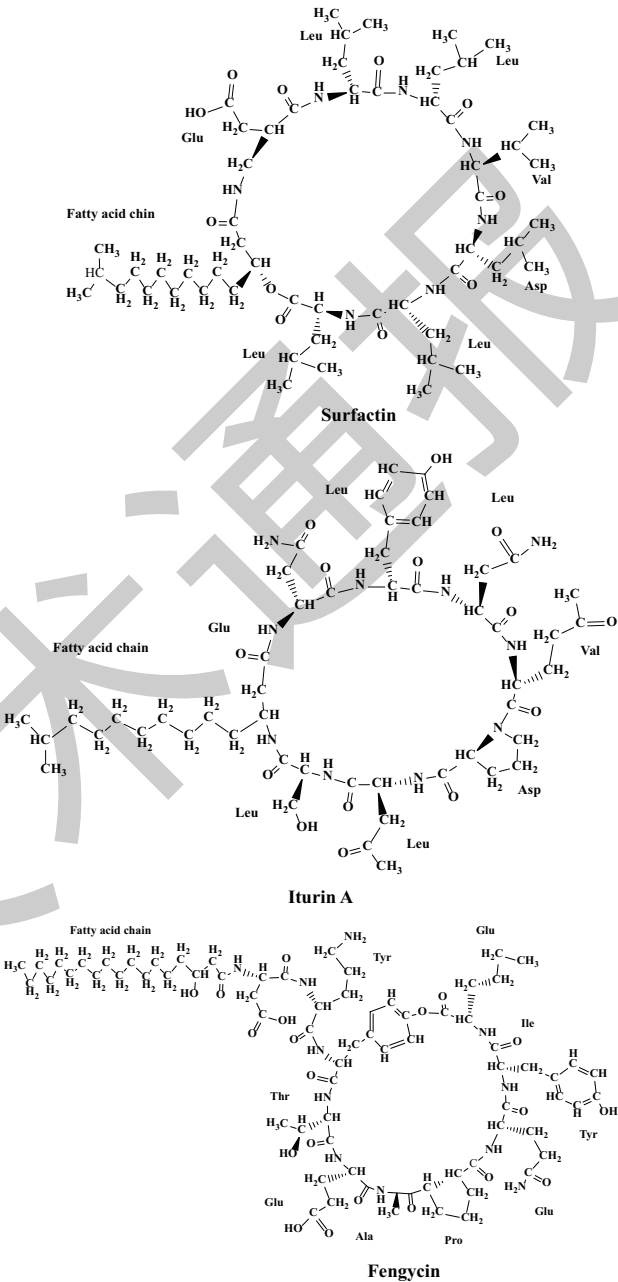


图 1 Surfactin、fengycin 和 iturin A 的结构

Fig. 1 Structures of surfactin, fengycin and iturin A

两个氨基酸残基形成一个极性带负电荷的爪状结构，电离时具有螯合能力（ $pK_a = 5.8$ ），因此，surfactin 具有可以通过 pH 值来控制的螯合和吸附性能。

利用核磁共振氢谱（nuclear magnetic resonance, H NMR）技术检测 surfactin 的三维结构，研究表明，surfactin 存在一个亲水结构域和一个疏水结构域。

亲水结构域由环肽的主链及其两个带负电荷的 Glu1 和 Asp5 氨基酸残基形成。疏水结构域由脂肪酸链和 Leu2、Leu3、Val4、Leu6 和 Leu7 氨基酸残基形成<sup>[10]</sup>, 这种双结构域结构使 surfactin 具有两亲性, 因此决定了其具有高的表面活性。浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  的 surfactin 可以将水的表面张力从 72  $\text{mN}/(\text{mol} \cdot \text{L})$  降低到 27  $\text{mN}/(\text{mol} \cdot \text{L})$ , 这大大低于文献中大多数生物表面活性剂的表面张力<sup>[11]</sup>。Surfactin 在细胞中利用蛋白质在水介质中的  $\beta$ -片层结构形成的特殊构象, 从而赋予 surfactin 分子广泛的生物活性, 它们通过几种干扰机制破坏细胞膜结构, 具有抗菌活性, 如通过类洗涤剂机制使细胞膜溶解、包裹磷脂双分子层, 通过离子扩散穿过膜屏障或形成孔状通道等而改变膜的渗透性等生物活性<sup>[12-13]</sup>。由于不同菌株产生的 surfactins 的氨基酸残基和脂肪酸链组成不同, 变异性大, 导致 surfactin 的生物活性具有多样性。Surfactin 具有抗细菌、抗真菌、抗炎、溶栓、环境修复、抗支原体、抗高胆固醇、抗病毒、抗癌活性和对胰岛素抵抗的改善等生物活性<sup>[14-22]</sup>。

## 1.2 Surfactins 的生物合成

Surfactins 的生物合成包括脂肪酸的合成及活化、氨基酸的合成、肽段的合成和释放几部分组成, 下面主要介绍其肽部分和脂肪酸的合成。

### 1.2.1 Surfactins 肽部分的生物合成

通过对 surfactin 脂肽合成相关基因鉴定分析, 证明 surfactin 的肽部分是由非核糖体肽合成酶 (nonribosomal peptide synthetases, NRPSs) 催化合成<sup>[23]</sup>, 这种机制赋予 surfactin 家族成员的脂肽结构及活性多样化。非核糖体脂肽的生物合成主要分为两部分进行: (1) 单体物质 (脂肪酸和氨基酸) 的生物合成, 属于初级代谢; (2) 组装和释放, 属于次级代谢 (非核糖体肽的合成过程见图 2)。NRPS 是一种由重复模块组成的多模块巨型酶复合体, 模块被定义为 NRPS 的一部分, 其功能是将一个特定的氨基酸结合到肽骨架中。模块的顺序通常与产物肽序列共线性, 每个模块又可以分解为以下 3 个主要结构域: 腺苷酸 (adenylation, A) 结构域、巯基化 (thiolation, T) 结构域 (又称肽基载体蛋白 (peptidyl carrier protein, PCP-)) 和缩合 (condensation, C) 结构域<sup>[24]</sup>。A 结

构域识别、选择并激活特定氨基酸, 通过与 ATP 的反应催化特定氨基酸转化为氨基酰基腺苷酸。一些特异性低的 A 结构域, 可以激活结构相似的氨基酸残基, 如 Val、Leu 和 Ile 等氨基酸, 这种低特异性增加了同一 NRPS 合成的脂肽的结构及活性多样化。活化的氨基酸以硫酯的形式共价结合到 T 结构域的柔性辅基 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基 (4'-Ppant) 臂上, 形成氨基酰-S-载体复合物; 4'-Ppant 辅基的长度为 20 Å, 可以在相邻的催化中心之间摆动, 正是这种灵活性使活化的氨基酸底物能够转移到 C 结构域<sup>[25]</sup>。C 结构域负责催化 (i) 新生肽和相邻模块携带的氨基酸之间形成肽键, 并允许随后 (ii) 延伸链易位到下一个模块。C 结构域分为几种功能亚型, 如 <sup>1</sup>C<sub>L</sub> 结构域催化两个 L-氨基酸之间的肽键形成, 而 <sup>D</sup>C<sub>L</sub> 结构域则催化 L-氨基酸与以 D-氨基酸结尾的延伸肽之间的肽键形成。A-T 模块被认为是起始模块, C-A-T 模块被定义为延伸模块, 在几个模块介导的肽延伸循环之后, 末端硫酯酶 (thioesterase, TE) 结构域负责释放完整的线性中间肽, 并催化其内部环化<sup>[26]</sup>。除了上述结构域, NRPS 装配线还进一步包括其他修饰结构域, 如催化修饰氨基酸结构的差向异构化 (epimerization, E) 结构域<sup>[27]</sup>。

Surfactin 的生物合成启动模块采用 C-A-T 结构, 而不是经典的 A-T 结构, 该模块包含一个特殊的 N-末端 C-结构域<sup>[28]</sup>, 称为 C-起始 (C<sub>s</sub>) 结构域, 负责已活化  $\beta$ -羟基脂肪酸与第一个氨基酸残基的连接, 活性脂肪酸主要来源于初级代谢<sup>[29]</sup>。对于 surfactins 家族, 催化合成 surfactins 的酶由 *srfA* 操纵子转录, 有 *srfAA*、*srfAB*、*srfAC* 和 *srfAD* 四个结构基因编码 7 模块 NRPSs 装配线 (图 3), 通过这些基因获得的 7 模块 NRPS 装配线中, *srfAA* 编码前 3 个模块, 其包含有 CLP 生物合成基因簇 (biosynthetic gene clusters, BGCs) 的 N 末端典型 C<sub>s</sub> 结构域, 将第一个氨基酸 Glu1 与初级代谢产生的  $\beta$ -羟基脂肪酸酰化连接; *srfAB* 编码 4、5 和 6 三个模块、*srfAC* 编码第 7 个模块和末端 TE; 起始肽随后通过 SrfAA、SrfAB 和 SrfAC 的延伸模块以共线性方式延伸, 产生线性七肽 (FA-L-Glu1-L-Leu2-D-Leu3-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6-L-Leu7), 立体化学结构可以很容易地分析出模块 M3

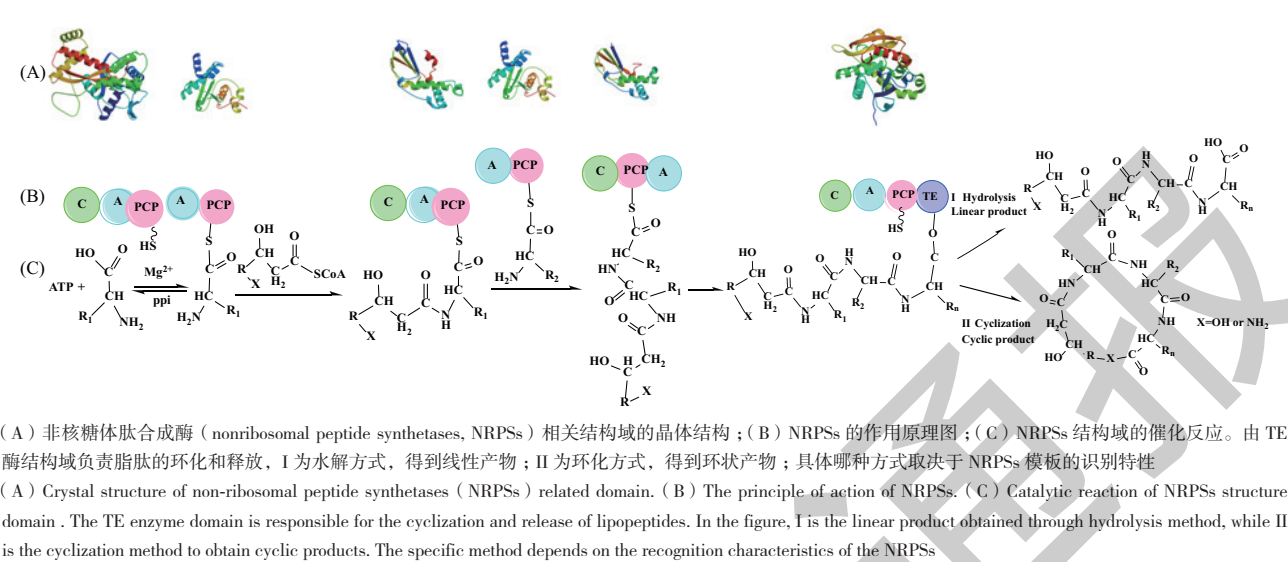


图 2 非核糖体肽生物合成的原理

Fig. 2 Principle of non-ribosomal peptide (NRP) biosynthesis

和 M6 中存在 E 结构域以及模块 M4 和 M7 中存在<sup>D</sup>C<sub>L</sub> 结构域。SrfAA 催化前 3 位氨基酸的组装，SrfAB 催化肽链 4-6 位氨基酸的组装；SrfAC 催化肽链第 7 位氨基酸的组装，最后，SrfAC 的 TE 结构域催化释放脂肽，并催化在 Leu7 与 β- 羟基脂肪酸的羟基之间形成内脂键进行大环化<sup>[30-31]</sup>。值得注意的是，*srfAD* 编码刺激 surfactin 生物合成起始的 IITE/ 酰基转移酶，属于水解酶家族成员，该结构域相当于一种支持性修复酶，能够在 NRPS 组装过程中再生定位错误的 T 结构域<sup>[32-33]</sup>。

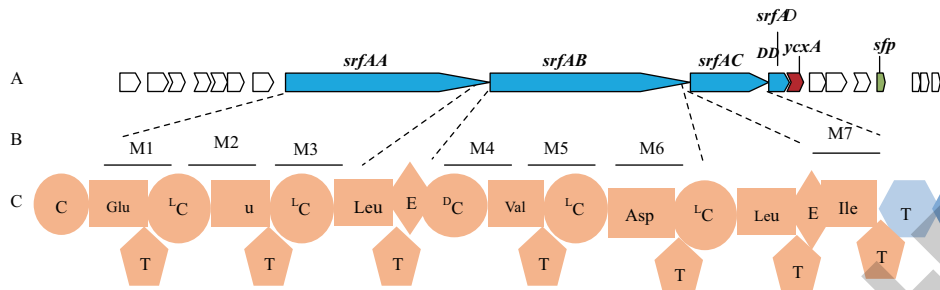
除以上结构基因外，surfactin 生物合成基因簇 (BGCs) 还包括一些辅助基因，如编码转运蛋白和调控蛋白的基因 *ycxA*、*krsE* 和 *yerP* 基因，以及与 surfactin 合成特别相关的基因或调控系统，如 *sfp*、*degU*、*codY* 基因及感受态调控系统 ComQXPA 等。

在 *B. subtilis* 中 surfactin 的生物合成受到感受态调控系统 ComQXPA (Com 是 competence 的缩写) 的调控，该系统由 *comX*、*comQ*、*comP* 和 *comA* 等 4 个结构基因组成。相应编码产物为 ComX 信息素、群体信号传感器 ComP 一种组氨酸激酶 (histidine sensor kinase) 和应答调节因子 (response regulator) ComA<sup>[34-35]</sup>。*srfA*-A 与 *comA* 基因相隔，磷酸化的 ComA (ComA-P) 能促进 RNA 聚合酶与 *srfA* 启动子

的结合，激活 *srfA* RNA 聚合酶的起始转录<sup>[36]</sup>。全局调控因子 CodY 和天冬氨酰基磷酸酶 Rap 负调控 surfactin 的生物合成，天冬氨酰基磷酸酶 Rap 使 ComA-P 脱磷酸化，阻止操纵子 *srfA* 转录<sup>[37]</sup>；过量 CodY 直接作用于 *srfA* 启动子，抑制其转录进行；而全局调控因子 DegU 正调控 surfactin 的生物合成<sup>[38]</sup>。

芽孢杆菌 *sfp* 基因位于 *srfA* 下游约 4 kb 处 (图 3-A)，其转录产物 Sfp 为磷酸泛乙烷基转移酶 (PPTase)。NRPS 的 T 结构域是以无活性功能的 apo 形式新生存在，需在 Sfp 酶催化下 T 结构域的柔性辅基 4'-Ppant 产生一个可与氨基酰-腺苷酸反应的巯基，将 T 结构域激活为其全活性 holo 形式，从而在 T 结构域和氨基酸残基的羧酸基团之间形成硫酯键，氨基酰-S-载体复合物形成。如在 *B. subtilis* 168 菌株中剪切部分 *sfp* 基因，导致其功能丧失，突变株不能合成 surfactin；然而，通过转移一个完整的 *sfp* 位点，其互补菌株恢复了合成 surfactin 的能力，这也证明 Sfp 对于 surfactin 的合成必不可少<sup>[39]</sup>。

在合成 surfactin 的背景下，编码转运蛋白的基因 (如 *ycxA*，位点见图 3-A) 也是其生物合成的重要基因，这些转运蛋白类似外排泵，从生理学角度来看，外排泵可避免细胞内 surfactin 的大量积聚，并构成一种基本的自我保护机制<sup>[40]</sup>，特别是由



A : Surfactin 生物合成基因簇, *srfAA*、*srfAB*、*srfAC* 和 *srfAD* 为 NRPS 的结构基因; B : SrfAA-SrfAD 的经典模块组成; C : SrfAA-SrfAD 的结构域

A: Surfactin biosynthesis gene cluster, and the structural genes of NRPS for biosynthesis of surfactin are *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, and *srfAD*. B: Classic module composition of SrfAA-SrfAD. C: Domain architecture of SrfAA-SrfAD

图3 Surfactin 合成基因簇组成

Fig. 3 Composition of gene cluster of surfactin biosynthesis

于 surfactin 具有插入生物膜和在较高浓度导致膜破坏的能力, 转运蛋白的生态学原理是使 surfactin 处于细胞外可能是其正确的位置, 在胞外它可以发挥有益的生物活性。到目前为止, 已在芽孢杆菌中鉴定出 3 种参与 surfactin 外排的转运蛋白, 即 YcxA、KrsE 和 YerP。已经证明, 相应基因的单独过表达分别使 surfactin 的外排释放率提高了 89%、52% 和 145%<sup>[41]</sup>。

**1.2.2 Surfactins 脂肪酸链的生物合成** 由于脂肪酸生物合成在 surfactin 生产中起着关键作用, 并强烈决定了其生物活性和性质, 因此对这一中心代谢途径以及导致脂酰-CoA 前体修饰和激活的后续步骤进行总结。脂肪酸的合成在细胞溶胶中进行, 包括脂肪酸链自乙酰-CoA 获得两个碳原子单元, 从而增长链长的若干步骤。第一轮循环的产物是丁酰-ACP, 丁酰-ACP 可以进入第二轮的碳链延伸。如此下去, 每一循环碳链即延伸两个碳原子单元<sup>[42]</sup>。乙酰-CoA 被用作合成直链脂肪酸的底物, 而支链脂肪酸 (branch chain fatty acid, BCFA) 的合成由异丁酰基-CoA、异戊酰基-CoA 和甲基丁酰基-CoA 作为底物, 这些前体分别来源于 Val、Leu 和 Ile 等支链氨基酸的分解代谢。碳链延伸至终产物形成, 终产物脂酰-ACP 在脂酰-ACP 硫酯酶催化作用下 FA 被释放, 游离出来。

长链 FA 被合成后, surfactin 生物合成所需的下一个步骤是对底物长链 FA 的活化, 即  $\beta$ -羟基酰基-CoA 的生成。Youssef 等<sup>[43]</sup> 基于体外测定, 研

究表明酰基羟基化发生在与辅酶 A (CoA) 连接之前, 催化 FA 前体羟基化的 YbdT 是一种细胞色素 P450 酶。枯草芽孢杆菌基因组包含 8 个编码细胞色素 P450 酶的基因, *B. subtilis* OKB105 菌株的 *ybdT* 突变菌株产生的 surfactin 中只有 2.2% 的  $\beta$ -羟基化  $C_{14}$  的 FA, 而菌株的 97.8% surfactin 为含有链长  $C_{12}$  和  $C_{14}$ - $C_{18}$  的非羟基化 FA<sup>[44]</sup>。羟基化 FA 和 CoA 通过脂酰-CoA 连接酶 (FACS) 催化, 生成相应的  $\beta$ -羟基酰基-CoA 衍生物, 至此 FA 被活化完成。在 *B. subtilis* 基因组同源性搜索中确定 4 个 FACS (LcfA、YhfL、YhfT 和 YngI), 其中 LcfA 和 YhfL 在体外鉴定中参与了 surfactin 的合成, 利用液质联用技术 (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) 对 FACS 的活性分析表明, LcfA 和 YhfL 可催化 CoA 和各种羟基化 FA 底物 ( $\beta$ -OH  $C_8$ 、 $\beta$ -OH  $C_{10}$ 、 $C_{12}$  和  $C_{14}$ ) 形成  $\beta$ -羟基酰基-CoA。最后, surfactin 合成酶 NRPSs 装配线可以在  $\beta$ -羟基酰基-CoA 衍生物存在的情况下启动, 在由 N-末端缩合 ( $C_5$ ) 结构域进行催化的反应中, 活化的 FA 最终转移到 surfactin 合成酶 NRPSs 装配线上, 并与第一个氨基酸相连接。如上所述, 该反应负责启动脂肽的初始合成<sup>[45]</sup>。

## 2 Surfactin 家族结构多样性

枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 和短小芽孢杆菌 (*B. pumillus*) 等多种芽孢杆菌能合成 surfactin (美国国

家生物技术信息中心)。Surfactin 是由多种结构相似同系物组成的混合物, 统称为 surfactin 家族, 其结构上的差别主要在于脂肪酸链的长度以及肽环特定氨基酸种类的不同。根据多肽第 7 位氨基酸的不同, 将 surfactin 的同系物分为 A、B、C 三类: Surfactin A 类的第 7 位氨基酸为 L-Leu7, 其结构是由一个手性序列七肽(L-Glu1-L-Leu2-D-Leu3-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6-L-Leu7) 与一个有 12-17 个碳原子的  $\beta$ -羟基脂肪酸相连<sup>[46-48]</sup>。Surfactin B 类肽链上第 7 位氨基酸为 L-Val7, 其同系物与标准 surfactin A 的结构不同, 命名为 Val7 surfactin 同系物<sup>[49]</sup>。Surfactin C 类肽链的第 7 位氨基酸为 L-Ile7, 被命名为 Ile7 surfactin 同系物<sup>[50]</sup>。此外, 由 *B. licheniformis* 菌生物合成的脂肽地衣素(lichenysin)也隶属 surfactins 家族, 理化性质与 surfactin 极为相似的脂肽类表面活性剂。然而, lichenysin 与 surfactin A 不同在于, 前者第一位氨基酸残基是 Gln 而不是 Glu, 该类脂肽表面活性更高, 还是很好的螯合剂<sup>[51]</sup>。由 *B. pumillus* 生物合成的脂肽短小酸素(pumilacidins)也隶属 surfactins 家族, Pumilacidins 与 surfactins A 的不同之处在于第 4 位的 Leu4 取代 Val4, 第 7 位的 Val 或 Ile 取代 Leu<sup>[52]</sup>。此外, 还观察到 surfactins 不同程度的其他结构多样性, 如对于同一菌株, 所产生脂肽的一个氨基酸残基发生变化, 从而形成不同的肽链, 这种变化的起源是由于 NRPS 中 A 结构域的低特异性, 对于 2、4 和 7 位置的氨基酸存在更大的可变性, 接受的氨基酸属于脂肪族氨基酸 (Leu、Val、Ile 和 Ala); 对于其他位置 1、3、5 和 6 的氨基酸缺乏可变性, 可能是由于氨基酸的类型 (Glu1 和 Asp5 带负电荷) 和差向异构 (位置 3 和 6 处为 D-Leu) 原因。但是, 位置 5 的亲水性残基 Asp5 可以被修饰, 它被甲基化并转化为相对疏水的 Asp-4-甲基酯<sup>[53]</sup>。

对于 surfactins 家族, 除了肽链的变化外, FA 链的结构也会发生变化, 如 FA 链会发生长度、饱和度和异构等结构变化。FA 链的长度从 C<sub>12</sub>-C<sub>17</sub> 个碳原子不等, 主要是具有 14 和 15 个碳原子长度的异构体。并且有直链、支链、异构 (Iso) 链或反异构 (anteiso) 链等结构形式, 从而增加 surfactin 类生物分子的数量<sup>[54]</sup>。脂肪酸的 Iso 形式存在于所有碳链长度中, 而 anteiso 形式存在于不均匀碳链长度

中。在研究中还发现生物合成酯化的 surfactin, 如由 *B. subtilis* HSO121 菌株产生的单甲基酯-surfactin 和 *B. licheniformis* HSN221 菌株可产生两种单甲基酯-surfactin 和一种单甲基酯-lichenysin, 具有抗癌细胞活性<sup>[55-56]</sup>。

### 3 基因工程提高 surfactin 产量及其衍生物开发

#### 3.1 提高 surfactin 产量

利用基因工程技术开发基因修饰的突变菌株, 以解除 surfactins 生物合成中的反馈调节作用, 提高 surfactin 产量, 如对非核糖体肽合成酶 (NRPS) 的调控基因进行修饰, 促进信号肽、转运蛋白或辅助蛋白的过表达等作用。刘皓等<sup>[57]</sup>通过转录组分析鉴定 *B. subtilis* THY-7 菌株中 surfactin 合成酶原启动子 PsrfA 的局限性, 设计人工强诱导型启动子 Pg3 替换基因组中原启动子 PsrfA, 增强 surfactin 合成酶表达; 又通过强化脂肪酸生物合成关键基因, 并优化 surfactin 发酵条件, 使突变菌株 surfactin 产量比野生型提高了 75%。Wang 等<sup>[58]</sup>在 *B. subtilis* 菌株中发现 *bkd* 操纵子的 *bkdAA* 和 *bkdAB* 基因负调控 surfactin 的生物合成, 利用 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 干扰技术抑制该操纵子的 *bkdAA* 和 *bkdAB* 基因表达, 使 surfactin 产量增加 5.8 倍。周泽宇等<sup>[59]</sup>利用基因工程方法, 切断支路代谢途径策略, 敲除 *B. amyloliquefaciens* NK- $\Delta$  LP 菌株中 Iturin 和 Fengycin 合成酶基因簇, 强化合成 surfactin 的脂肪酸前体供应, 并分别过表达了与 swarming 相关的 SwrC 蛋白、跨膜转运蛋白 YbfB 和 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 Sfp 等酶, 使 surfactin 产量显著提高至 50.17 mg/L。Klausmann 等<sup>[60]</sup>对不产 surfactin 的 *B. subtilis* 168 菌株进行基因突变, 得到 *sfp*<sup>+</sup> 突变菌株 JABs32, 该菌株 *spoOA* 位点和 *abrB* (其基因产物从 96 个氨基酸延长到 107 个氨基酸) 位点的突变与高细胞密度补料间歇工艺相结合, 致使 surfactin 的产量提高 21 倍。

#### 3.2 Surfactin 新衍生物开发

Hu 等<sup>[61]</sup>研究发现随着 Arg、Gln 或 Val 的添加, 增加了 *B. subtilis* TD7 中偶数  $\beta$ -羟基脂肪酸组分的 C<sub>14</sub> 和 C<sub>16</sub> 的 surfactin 的比例增加, 而 Cys、His、

Ile、Leu、Met 和 Ser 的添加增加了 *B. subtilis* TD7 中奇数  $\beta$ -羟基脂酸的比例；通过敲除位于 *bkd* 操纵子（包括 *lpdV*、*bkdAA*、*bkdAB* 和 *bkdB* 基因）的 *lpdV* 基因，nC<sub>14</sub> surfactin 的比例增加了 2.5 倍，该基因负责 acyl-CoA 中支链氨基酸（branch chain amino acid, BCAA）降解的最后一步，脂肪酸前体供应对修饰 surfactin 的脂酰部分的重要性被证明。*B. subtilis* PB2-L1 为产生 surfactin 菌株，Jiang 等<sup>[62]</sup>采用同源重组方法成功敲除了 *B. subtilis* BP2-L1 菌株中 NRPSs 合成酶的 SrfA-A-Leu、SrfA-B-Asp 和 SrfA-B-Leu 模块，结果产生了 3 种新的 surfactin 脂肽产品，分别缺乏氨基酸 Leu-3、Asp-5 或 Leu-6；与野生菌株产的天然 surfactin 相比， $\Delta$ Leu-3 和  $\Delta$ Leu-6 surfactin 表现出毒性变低，而  $\Delta$ Asp-5 surfactin 对短小芽孢杆菌（*B. pumilus*）和黄体微球菌（*Micrococcus luteus*）的抑制作用强于天然 surfactin。Eppelmann 等<sup>[63]</sup>开发非核糖体肽合成酶选择性编码，为合理设计新型脂肽抗生素提供可能。Mootz 等<sup>[64]</sup>利用一种新的基因工程技术，通过交换催化亚基来重新编辑 NRPS 的模块化结构，得到杂交的 NRPS，在 NRPS 装配线中删除整个模块，获得了预测的环尺寸减小的脂肽抗生素变体。

## 4 Surfactins 对植物病害的生防特性及作用机制

### 4.1 Surfactins 对植物病害的生防特性

4.1.1 抑制病原体 Surfactin 的生物活性与其特定的化学键和亲水亲油基团独特的性质相关，在农业生产中，surfactin 对细菌、真菌及病毒都有一定抑制作用，可以作为生防制剂，其在菌体生物膜形成、叶面或根际定殖和抑制或杀死病原菌等生防方面都发挥重要作用（图 4）。如生防菌株 *B. subtilis* VD18R19 产生的 surfactin 类产物对胡椒花叶病具有显著的生防效果，防效达 87.18%<sup>[65]</sup>；不产生 surfactin 的 *B. subtilis* 168 菌株，其重组菌株 B168S 具有产 surfactin 能力；利用两菌株处理黄瓜种子，重组菌株在黄瓜根部的定殖量相对提高，同时，对尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, Foc）侵染引起的黄瓜枯萎病防效相对增强。研究结果说明 surfactin 可明显促进菌体在黄瓜根部的定殖，

并通过抑制 Foc 的侵染增强对黄瓜枯萎病的防治效果<sup>[66]</sup>。香蕉内生细菌 *B. amyloliquefaciens* G9R-3 菌株对香蕉枯萎病菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4）具有较强抑制活性，体外检测其产生的 surfactin 类化合物能抑制病原菌 Foc4 菌丝的生长和孢子的萌发<sup>[67]</sup>。生防芽孢杆菌 SPB 菌株产生的 surfactin A 对 *Fusarium oxysporum*、*F. moniliforme*、*F. solani*、*Trichoderma atroviride* 和 *T. reesei* 均有较强的抑制活性，surfactin A 能显著降低水稻恶苗病发病率达 80%<sup>[68]</sup>。Laird 等<sup>[69]</sup>研究发现番茄细菌性溃疡病生防菌株 *B. velezensis* 1B-23 和 *Bacillus* spp. 1D-12 产生的脂肽 C<sub>13</sub>-surfactins A、C<sub>14</sub>-surfactins A 和 C<sub>15</sub>-surfactins A 均能抑制病原菌 *Clavibacter michigan* sub (Cmm98-1) 的生长。生防菌株 *B. subtilis* 9407 对果斑病菌（*Acidovorax citrulli*）的体外抑菌活性较强，活体检测对甜瓜幼苗果斑病的生防效果达 61.7%，经检测该菌株的主要抗菌物质是 C<sub>13</sub>-C<sub>16</sub> 的 surfactins，其在菌体生物膜形成、聚集运动、叶面定殖和抑制 *A. citrulli* 生长等方面都发挥重要作用<sup>[70]</sup>。

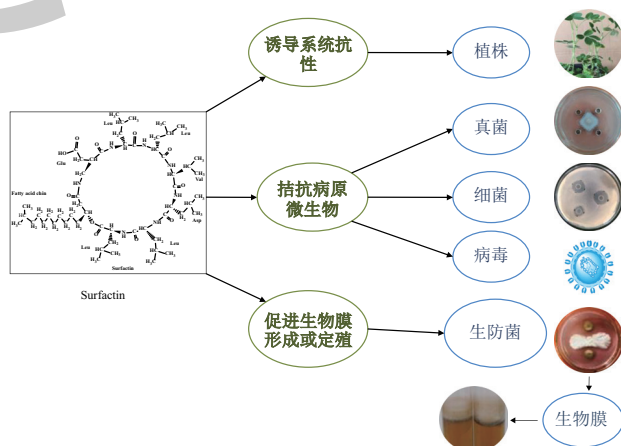


图 4 Surfactin 的生防作用示意图

Fig. 4 Schematic representation of biocontrol effects of surfactin

4.1.2 诱导植株产生系统抗性 Surfactin 还具有能够刺激宿主组织产生免疫相关反应的生物学功能，这有助于增强植株对病原体的抵抗作用（图 4）。*B. subtilis* GLB191 是一株防治葡萄霜霉病的有效生防

菌,其产生的脂肽 surfactin 和 fengycin 对葡萄霜霉病都具有显著的防效,经检测脂肽的这种生防作用既来自对病原菌的直接抑制作用,也来自对植株的防御刺激(诱导植株防御基因表达),即诱导植株产生系统抗性(induced systemic resistance, ISR)<sup>[71]</sup>。任鹏举等<sup>[72]</sup>将生防菌株 *B. subtilis* OKB105 产生的脂肽 surfactin 配成溶液,处理感染烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)的烟草,结果显示 surfactin 对 TMV 病防治效果显著,并诱导烟草植株的系统抗性。*B. velezensis* MS20 菌株产生的 surfactin 具有抑制立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)菌丝生长的特性,用 surfactin 处理感染了 *R. solani* 的玉米植株,能有效降低玉米纹枯病的发病率,经检测抗性玉米植株细胞产生的防御酶量相对提高,说明 surfactin 诱导了玉米植株的系统性抗性<sup>[73]</sup>。生防菌 *B. amyloliquefaciens* S499 产生的 surfactin,温室试验其对小麦叶枯病的防效达 70%;体外抑菌试验表明, surfactin 对小麦叶枯病原菌 *Zymoseptoria tritici* 无抑制作用,而 surfactin 通过刺激小麦细胞水杨酸和茉莉酸依赖的信号通路,诱导小麦植株系统抗性防御小麦叶枯病<sup>[74]</sup>。Rodríguez 等<sup>[75]</sup>研究显示,施用由 *B. subtilis* 菌株产生的 surfactin 处理花生植株,显著降低了齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)感染引起花生白绢病的发病率,受感染植株的过氧化物酶活性和酚类化合物在真菌感染区下方的沉积量明显增加,证明 surfactin 诱导了花生植株对 *S. rolfsii* 的系统抗性的能力。Cawoy 等<sup>[76]</sup>通过对特定菌株的研究,建立了一项涉及一系列天然菌株的比较研究。首先测试它们的分泌物用于诱导在培养烟草细胞的早期防御情况,确定 surfactin 是刺激植物免疫相关反应的主要化合物。基于宏观的病情减轻和作为防御机制的 Oxylinin 途径的刺激,评估了 6 个野生分离株对植株系统抗性的诱导能力。研究发现,菌株的防御诱导活性与其产生的 surfactin 的量有较强的正相关性。

#### 4.2 Surfactin 对植物病害的生防机制

Surfactin 在作物生防中的抑菌或杀菌作用机制较复杂,目前的研究发现主要有以下几种生防作用机制:(1)阻碍 DNA 复制,抑制蛋白质合成,阻止病原菌繁殖。如从 *B. brevis* KN8 菌株中提

取的 surfactin 可防治病原菌 *F. moniliforme* 对玉米籽粒的感染,经体外检测显示,该 surfactin 对 *F. moniliforme* 菌丝生长有抑制和损伤作用,生化分析结果显示,其破坏了病原菌 *F. moniliforme* 的 DNA 和部分蛋白质,谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量下降<sup>[77]</sup>。(2)诱导植株系统抗性,产生防御酶来抵御病原菌侵染。从 *B. pumilus* W-7 菌株发酵液提取的 surfactins 和 fengycin B 脂肽,通过协同作用可有效降低马铃薯晚疫病的发病率。Fengycin B 通过诱导菌丝变形、氧化损伤和线粒体功能障碍抑制 *P. infestans* 菌丝体菌丝生长;Surfactin 通过加强植株防御基因(*pod*、*pal* 和 *cat*)表达,提高了(POD、PAL 和 CAT)酶活,诱导马铃薯的植株防御反应以抵抗晚疫病的发生<sup>[78]</sup>。Henry 等<sup>[79]</sup>研究植物细胞表面感知 surfactin 的机制,结合烟草细胞中的氧化诱导、结构/活性关系、竞争抑制、植物膜内动力学以及模型质膜参数的热力学测定数据表明,烟草细胞对 surfactin 的感知依赖于烟草细胞质膜水平的脂质驱动过程,即脂质双分子层的传感器作用。(3)损伤病原菌细胞膜,引起细胞膜裂解或渗透压失衡。Carrillo 等<sup>[80-81]</sup>利用傅里叶变换红外光谱(fourier translation infrared spectroscopy, FTIR)跟踪 surfactin 对细胞膜磷脂双分子层不同组分的影响,对棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱(palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine, POPC)振动的 CO 拉伸模式的影响表明, surfactin 脂肽引起了膜强烈的脱水;另一方面,CH 拉伸带表明 surfactin 与磷脂酰链相互作用,导致膜流态化;以上的试验发现有助于解释 surfactin 诱导形成膜孔隙,最终导致细胞内容物泄漏,菌体死亡。(4)促进生防菌株的定殖或生物膜的形成,增强生防能力。如不合成 surfactin 的 *B. subtilis* 168 菌株,其重组菌株 B168S 具有合成 surfactin 能力,利用两菌株处理黄瓜种子,结果表明 surfactin 可促进重组菌株 B168S 在黄瓜植株根部的定殖作用<sup>[66]</sup>。Surfactin 在生防菌株 *B. subtilis* 9407 生物膜形成、聚集运动和叶面定殖等方面都发挥重要作用<sup>[70]</sup>。

#### 5 总结与展望

通过对 surfactin 的生防特性及作用机制总结,在植物病害防治上, surfactin 对黄瓜枯萎病、小麦

纹枯病、水稻恶苗病、葡萄霜霉病、烟草花叶病毒病和花生白绢病等多种作物病害都有较好生防作用<sup>[66-71]</sup>。但是, surfactin 的生防作用机制较复杂, 对于 surfactin 抑制植物病原菌生长的作用机制尚未完全阐明, 其既有细胞膜靶点作用机制, 如形成膜离子通道、跨膜孔隙或广泛的膜破裂等方式导致微生物细胞的裂解; 也有细胞内非膜靶点作用机制, 如 DNA、RNA、蛋白质或酶等; 还有诱导植物系统抗性、促进生防菌的定殖和生物膜的形成等特性。Surfactin 的抑菌活性可能是以上这些特性共同作用的结果, 这表明 surfactin 的抑菌机理有待进一步研究分析。

基于 surfactin 对多种作物病害有较好的生防效果, 抑菌谱广泛, 对多种作物有诱导系统抗性作用, surfactin 可作为生防制剂或植物生长促进剂进行开发利用。Surfactin 作为天然的生防制剂与化学农药相比有以下优点: 毒性相对低<sup>[82]</sup>、生物降解性高、更环保、极端条件(温度、酸碱度和盐离子浓度)比活性高, 以及可以利用可再生原料生产的特性等<sup>[83-87]</sup>。因此, surfactin 在农业上可作为生防制剂或植物生长促进剂进行重点研发应用。

鉴于 surfactin 的抑菌杀菌方面的生防潜力及其多样的生物活性, 可以利用基因工程技术的优势, 探索和生产更多样化碳骨架的 surfactin。开发新型的 surfactin 及其衍生物, 不仅有重要应用价值, 而且有利于从分子水平上深入研究和阐明不同亚型 surfactin 的结构、功能及作用机制等, 对改进 surfactin 的表面活性、稳定性、抑菌谱和可溶性等具有理论意义。

#### 参考文献

- [1] Li Y, Zou AH, Ye RQ, et al. Effects of molecular structure on surfactin micellization activity [J]. *Acta Phys Chim Sin*, 2011, 27 (5): 1128-1134.
- [2] Kundu D, Hazra C, Chatterjee A, et al. Surfactin-functionalized poly (methyl methacrylate) as an eco-friendly nano-adsorbent: from size-controlled scalable fabrication to adsorptive removal of inorganic and organic pollutants [J]. *RSC Adv*, 2016, 6 (84): 80438-80454.
- [3] Kim SD, Park SK, Cho JY, et al. Surfactin C inhibits platelet aggregation [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 58 (6): 867-870.
- [4] Jacques P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. [M] // *Biosurfactants*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011: 57-91.
- [5] Théate A, Hoste ACR, Rigolet A, et al. *Bacillus* sp.: a remarkable source of bioactive lipopeptides [M] // *Biosurfactants for the Biobased Economy*. Cham: Springer International Publishing, 2021: 123-179.
- [6] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968, 31 (3): 488-494.
- [7] Kakinuma A, Hori M, Isono M, et al. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* [J]. *Agric Biol Chem*, 1969, 33 (6): 971-972.
- [8] Kakinuma A, Sugino H, Isono M, et al. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin [J]. *Agric Biol Chem*, 1969, 33 (6): 973-976.
- [9] Maget-Dana R, Ptak M. Interfacial properties of surfactin [J]. *J Colloid Interface Sci*, 1992, 153 (1): 285-291.
- [10] Liu JF, Mhadinga SM, Yang SZ, et al. Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (3): 4814-4837.
- [11] Augustyn AR, Pott RWM, Tadie M. The interactions of the biosurfactant surfactin in coal flotation [J]. *Colloids Surf A*, 2021, 627: 127122.
- [12] Deleu M, Bouffieux O, Razafindralambo H, et al. Interaction of surfactin with membranes: a computational approach [J]. *Langmuir*, 2003, 19 (8): 3377-3385.
- [13] Grau A, Gómez Fernández JC, Peypoux F, et al. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1418 (2): 307-319.
- [14] Chen XY, Zhao HY, Meng FQ, et al. Ameliorated effects of a lipopeptide surfactin on insulin resistance *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Sci Nutr*, 2022, 10 (7): 2455-2469.
- [15] Kotoky R, Pandey P. Rhizosphere mediated biodegradation of benzo (a) pyrene by surfactin producing soil bacilli applied through *Melia azadirachta* rhizosphere [J]. *Int J Phytoremediation*, 2020, 22 (4): 363-372.
- [16] Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated

- by biofilm formation and surfactin production [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134 ( 1 ) : 307-319.
- [ 17 ] Zhao F, Zhu HB, Cui QF, et al. Anaerobic production of surfactin by a new *Bacillus subtilis* isolate and the *in situ* emulsification and viscosity reduction effect towards enhanced oil recovery applications [J]. *J Petrol Sci Eng*, 2021, 201: 108508.
- [ 18 ] Tank JG, Pandya RV. Anti-proliferative activity of surfactins on human cancer cells and their potential use in therapeutics [J]. *Peptides*, 2022, 155: 170836.
- [ 19 ] Meena KR, Sharma A, Kanwar SS. Antitumoral and antimicrobial activity of surfactin extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015 [J]. *Int J Pept Res Ther*, 2020, 26 ( 1 ) : 423-433.
- [ 20 ] Lim JH, Park BK, Kim MS, et al. The anti-thrombotic activity of surfactins [J]. *J Vet Sci*, 2005, 6 ( 4 ) : 353-355.
- [ 21 ] Wang Y, Tian JH, Shi FF, et al. Protective effect of surfactin on copper sulfate-induced inflammation, oxidative stress, and hepatic injury in zebrafish [J]. *Microbiol Immunol*, 2021, 65 ( 10 ) : 410-421.
- [ 22 ] Mnif I, Segovia R, Bouallegue A, et al. Identification of different lipopeptides isoforms produced by *Bacillus mojavensis* B12 and evaluation of their surface activities for potential environmental application [J]. *J Polym Environ*, 2023, 31 ( 6 ) : 2668-2685.
- [ 23 ] Ishikawa F, Konno S, Uchida C, et al. Chemoproteomics profiling of surfactin-producing nonribosomal peptide synthetases in living bacterial cells [J]. *Cell Chem Biol*, 2022, 29 ( 1 ) : 145-156.e8.
- [ 24 ] Fortinez CM, Bloudoff K, Harrigan C, et al. Structures and function of a tailoring oxidase in complex with a nonribosomal peptide synthetase module [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 ( 1 ) : 548.
- [ 25 ] Finking R, Mofid MR, Marahiel MA. Mutational analysis of peptidyl carrier protein and acyl carrier protein synthase unveils residues involved in protein-protein recognition [J]. *Biochemistry*, 2004, 43 ( 28 ) : 8946-8956.
- [ 26 ] Peypoux F, Bonmatin JM, Labbé H, et al. Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [ Val7 ] surfactin [J]. *Eur J Biochem*, 1991, 202 ( 1 ) : 101-106.
- [ 27 ] Dowling DP, Kung Y, Croft AK, et al. Structural elements of an NRPS cyclization domain and its inter module docking domain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 ( 44 ) : 12432-12437.
- [ 28 ] Schneider A, Marahiel MA. Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* [J]. *Arch Microbiol*, 1998, 169 ( 5 ) : 404-410.
- [ 29 ] Sieber SA, Marahiel MA. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics [J]. *Chem Rev*, 2005, 105 ( 2 ) : 715-738.
- [ 30 ] Tseng CC, Bruner SD, Kohli RM, et al. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase [J]. *Biochemistry*, 2002, 41 ( 45 ) : 13350-13359.
- [ 31 ] Bruner SD, Weber T, Kohli RM, et al. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE [J]. *Structure*, 2002, 10 ( 3 ) : 301-310.
- [ 32 ] Linne U, Schwarzer D, Schroeder GN, et al. Mutational analysis of a type II thioesterase associated with nonribosomal peptide synthesis [J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271 ( 8 ) : 1536-1545.
- [ 33 ] Schwarzer D, Mootz HD, Linne U, et al. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases [J]. *PNAS*, 2002, 99 ( 22 ) : 14083-14088.
- [ 34 ] Chiochini C, Linne U, Stachelhaus T. *In vivo* biocombinatorial synthesis of lipopeptides by COM domain-mediated reprogramming of the surfactin biosynthetic complex [J]. *Chem Biol*, 2006, 13 ( 8 ) : 899-908.
- [ 35 ] Nakano MM, Zuber P. The primary role of comA in establishment of the competent state in *Bacillus subtilis* is to activate expression of srfA [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173 ( 22 ) : 7269-7274.
- [ 36 ] Nakano MM, Xia LA, Zuber P. Transcription initiation region of the srfA operon, which is controlled by the comP-comA signal transduction system in *Bacillus subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173 ( 17 ) : 5487-5493.
- [ 37 ] Ogura M, Fujita Y. *Bacillus subtilis* rapD, a direct target of transcription repression by RghR, negatively regulates srfA expression [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 268 ( 1 ) : 73-80.
- [ 38 ] Liang Z, Qiao JQ, Li PP, et al. A novel Rap-Phr system in *Bacillus velezensis* NAU-B3 regulates surfactin production and sporulation via interaction with ComA [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104 ( 23 ) : 10059-10074.
- [ 39 ] Nakano MM, Corbell N, Besson J, et al. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis* [J]. *Mol*

- Gen Genet, 1992, 232 ( 2 ) : 313-321.
- [ 40 ] Tsuge K, Ohata Y, Shoda M. Gene yerP, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis* [ J ] . Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45 ( 12 ) : 3566-3573.
- [ 41 ] Li X, Yang H, Zhang DL, et al. Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis* [ J ] . J Ind Microbiol Biotechnol, 2015, 42 ( 1 ) : 93-103.
- [ 42 ] 王镜岩. 生物化学 [ M ] . 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- Wang JY. Biochemistry [ M ] . 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2002.
- [ 43 ] Youssef NH, Wofford N, McInerney MJ. Importance of the long-chain fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450 enzyme YbdT for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* strain OKB105 [ J ] . Int J Mol Sci, 2011, 12 ( 3 ) : 1767-1786.
- [ 44 ] Hlavica P, Lehnerer M. Oxidative biotransformation of fatty acids by cytochromes P450: predicted key structural elements orchestrating substrate specificity, regioselectivity and catalytic efficiency [ J ] . Curr Drug Metab, 2010, 11 ( 1 ) : 85-104.
- [ 45 ] Steller S, Sokoll A, Wilde C, et al. Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein [ J ] . Biochemistry, 2004, 43 ( 35 ) : 11331-11343.
- [ 46 ] Dae KS, Cho J, Park HJ, et al. A comparison of the anti-inflammatory activity of surfactin A, B, C, and D from *Bacillus subtilis* [ J ] . J Microbiol Biotechnol, 2006, 16: 1656-1659.
- [ 47 ] Bonmatin JM, Labbé H, Grangemard I, et al. Production, isolation and characterization of [ Leu<sup>4</sup> ] - and [ Ile<sup>4</sup> ] surfactins from *Bacillus subtilis* [ J ] . Lett Pept Sci, 1995, 2 ( 1 ) : 41-47.
- [ 48 ] Park G, Nam J, Kim J, et al. Structure and mechanism of surfactin peptide from *Bacillus velezensis* antagonistic to fungi plant pathogens [ J ] . Bull Korean Chem Soc, 2019, 40 ( 7 ) : 704-709.
- [ 49 ] Vater J, Stein T, Vollenbroich D, et al. The modular organization of multifunctional peptide synthetases [ J ] . J Protein Chem, 1997, 16 ( 5 ) : 557-564.
- [ 50 ] Grady EN, MacDonald J, Ho MT, et al. Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6 [ J ] . BMC Microbiol, 2019, 19 ( 1 ) : 5.
- [ 51 ] Nerurkar AS. Structural and molecular characteristics of lichenysin and its relationship with surface activity [ J ] . Adv Exp Med Biol, 2010, 672: 304-315.
- [ 52 ] Naruse N, Tenmyo O, Kobaru S, et al. Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity [ J ] . J Antibiot, 1990, 43 ( 3 ) : 267-280.
- [ 53 ] Kecske méti A, Bartal A, Bóka B, et al. High-frequency occurrence of surfactin monomethyl isoforms in the ferment broth of a *Bacillus subtilis* strain revealed by ion trap mass spectrometry [ J ] . Molecules, 2018, 23 ( 9 ) : 2224.
- [ 54 ] Théâtre A, Cano-Prieto C, Bartolini M, et al. The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range [ J ] . Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 623701.
- [ 55 ] Liu XY, Yang SZ, Mu BZ. Production and characterization of a C<sub>15</sub>-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121 [ J ] . Process Biochem, 2009, 44 ( 10 ) : 1144-1151.
- [ 56 ] Li YM, Yang SZ, Mu BZ. Structural characterization of lipopeptide methyl esters produced by *Bacillus licheniformis* HSN 221 [ J ] . Chem Biodivers, 2010, 7 ( 8 ) : 2065-2075.
- [ 57 ] 刘皓, 杨欢, 李雪, 等. 脂肽-糖脂混合生物表面活性剂产生菌筛选和优化培养 [ J ] . 生物工程学报, 2013, 29 ( 12 ) : 1870-1874.
- Liu H, Yang H, Li X, et al. Identification of *Bacillus subtilis* THY-7 and high titer optimization for the blend-biosurfactant of lipopeptide and glycolipid [ J ] . Chin J Biotechnol, 2013, 29 ( 12 ) : 1870-1874.
- [ 58 ] Wang CY, Cao YX, Wang YP, et al. Enhancing surfactin production by using systematic CRISPRi repression to screen amino acid biosynthesis genes in *Bacillus subtilis* [ J ] . Microb Cell Fact, 2019, 18 ( 1 ) : 90.
- [ 59 ] 周泽宇, 张婉茹, 张柔萱, 等. 代谢工程改造 *Bacillus amyloliquefaciens* 提高 Surfactin 产量 [ J ] . 南开大学学报: 自然科学版, 2018, 51 ( 5 ) : 18-26.
- Zhou ZY, Zhang WR, Zhang RX, et al. Metabolic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* to improve surfactin production [ J ] . Acta Sci Nat Univ Nankaiensis, 2018, 51 ( 5 ) : 18-26.
- [ 60 ] Klausmann P, Hennemann K, Hoffmann M, et al. *Bacillus subtilis* high cell density fermentation using a sporulation-deficient strain

- for the production of surfactin [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105 ( 10 ) : 4141-4151.
- [ 61 ] Hu FX, Cai WJ, Lin JZ, et al. Genetic engineering of the precursor supply pathway for the overproduction of the  $nC_{14}$ -surfactin isoform with promising MEOR applications [J]. Microb Cell Fact, 2021, 20 ( 1 ) : 96.
- [ 62 ] Jiang J, Gao L, Bie XM, et al. Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme* [J]. BMC Microbiol, 2016, 16: 31.
- [ 63 ] Eppelmann K, Stachelhaus T, Marahiel MA. Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics [J]. Biochemistry, 2002, 41 ( 30 ) : 9718-9726.
- [ 64 ] Mootz HD, Kessler N, Linne U, et al. Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes [J]. J Am Chem Soc, 2002, 124 ( 37 ) : 10980-10981.
- [ 65 ] 高圣风, 王锋, 刘爱勤, 等. *Bacillus subtilis* VD18R19 脂肽类产物鉴定及其对胡椒花叶病的田间生防效果 [J]. 热带农业科学, 2019, 39 ( 10 ) : 89-94.
- Gao SF, Wang F, Liu AQ, et al. Identification and field application of the lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* VD18R19 against black pepper mosaic disease [J]. Chin J Trop Agric, 2019, 39 ( 10 ) : 89-94.
- [ 66 ] 高毓晗, 李世东, 郭荣君. *sfp* 基因转化增强了 *Bacillus subtilis* 168 的定殖能力和对黄瓜茎内枯萎病菌的抑制作用 [J]. 中国生物防治学报, 2016, 32 ( 1 ) : 76-85.
- Gao YH, Li SD, Guo RJ. Transformation of *sfp* gene into *Bacillus subtilis* 168 promotes its colonization on cucumber roots and suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in cucumber stems [J]. Chin J Biol Contr, 2016, 32 ( 1 ) : 76-85.
- [ 67 ] 周维, 田丹丹, 杨扬, 等. 解淀粉芽孢杆菌 G9R-3 脂肽类化合物抑制香蕉枯萎病菌机理及防效评价 [J]. 西南农业学报, 2019, 32 ( 8 ) : 1810-1816.
- Zhou W, Tian DD, Yang Y, et al. Antifungal mechanism and control effects on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G9R-3 [J]. Southwest China J Agric Sci, 2019, 32 ( 8 ) : 1810-1816.
- [ 68 ] Sarwar A, Hassan MN, Imran M, et al. Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease [J]. Microbiol Res, 2018, 209: 1-13.
- [ 69 ] Laird M, Piccoli D, Weselowski B, et al. Surfactin-producing *Bacillus velezensis* 1B-23 and *Bacillus* sp. 1D-12 protect tomato against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [J]. J Plant Pathol, 2020, 102 ( 2 ) : 451-458.
- [ 70 ] Fan HY, Zhang ZW, Li Y, et al. Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1973.
- [ 71 ] Li Y, Héloir MC, Zhang X, et al. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation [J]. Mol Plant Pathol, 2019, 20 ( 8 ) : 1037-1050.
- [ 72 ] 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.
- Ren PJ, Xie YL, Zhang Y, et al. Effect and mechanism of controlling TMV disease on tobacco by surfactin produced by *Bacillus subtilis* OKB105 [J]. Chin J Biol Contr, 2014, 30 ( 2 ) : 216-221.
- [ 73 ] Ali SAM, Sayyed RZ, Mir MI, et al. Induction of systemic resistance in maize and antibiofilm activity of surfactin from *Bacillus velezensis* MS20 [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 879739.
- [ 74 ] Le Mire G, Siah A, Brisset MN, et al. Surfactin protects wheat against *Zymoseptoria tritici* and activates both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent defense responses [J]. Agriculture, 2018, 8 ( 1 ) : 11.
- [ 75 ] Rodríguez J, Tonelli ML, Figueredo MS, et al. The lipopeptide surfactin triggers induced systemic resistance and priming state responses in *Arachis hypogaea* L. [J]. Eur J Plant Pathol, 2018, 152 ( 3 ) : 845-851.
- [ 76 ] Cawoy H, Mariutto M, Henry G, et al. Plant defense stimulation by natural isolates of bacillus depends on efficient surfactin production [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2014, 27 ( 2 ) : 87-100.
- [ 77 ] Krishnan N, Velramar B, Velu RK. Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis [J]. Pestic Biochem Physiol, 2019, 155: 101-107.
- [ 78 ] Wang YY, Zhang CY, Liang J, et al. Surfactin and fengycin B

- extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104 ( 17 ) : 7467-7481.
- [ 79 ] Henry G, Deleu M, Jourdan E, et al. The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses [J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13 ( 11 ) : 1824-1837.
- [ 80 ] Carrillo C, Teruel JA, Aranda FJ, et al. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1611 ( 1/2 ) : 91-97.
- [ 81 ] Heerklotz H, Seelig J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin [J]. *Eur Biophys J*, 2007, 36 ( 4/5 ) : 305-314.
- [ 82 ] Deravel J, Lemi re S, Coutte F, et al. Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98 ( 14 ) : 6255-6264.
- [ 83 ] de Andrade CJ, Barros FF, de Andrade LM, et al. Ultrafiltration based purification strategies for surfactin produced by *Bacillus subtilis* LB5A using cassava wastewater as substrate [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2016, 91 ( 12 ) : 3018-3027.
- [ 84 ] Marin CP, Kaschuk JJ, Frollini E, et al. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production [J]. *Ind Crops Prod*, 2015, 66: 239-245.
- [ 85 ] Zanotto AW, Val rio A, de Andrade CJ, et al. New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the discovery [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103 ( 21/22 ) : 8647-8656.
- [ 86 ] de Oliveira Schmidt VK, de Vasconcelos GMD, Vicente R, et al. Cassava wastewater valorization for the production of biosurfactants: surfactin, rhamnolipids, and mannosileritritol lipids [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2022, 39 ( 2 ) : 65.
- [ 87 ] Kisil OV, Trefilov VS, Sadykova VS, et al. Surfactin: its biological activity and possibility of application in agriculture [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2023, 59 ( 1 ) : 1-13.

( 责任编辑 高洁 )