

木霉 peptaibols 抗菌肽的研究进展

宋晓妍¹, 张玉忠², 王元秀¹

¹ 济南大学医学与生命科学学院, 济南 250022

² 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要: Peptaibols 是一类由非核糖体肽合成酶 (NRPSs) 合成的富含 α -氨基异丁酸 (Aib) 的特殊抗菌肽。目前发现的 317 种 peptaibols 大多由木霉属真菌产生。本文对木霉产生的这类特殊抗菌肽-peptaibols 的多样性、发酵、分离纯化、鉴定及其生物合成进行了综述。

关键词: 木霉, peptaibols, 抗菌肽, 生物合成

中图分类号: Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0438-07

木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 属于半知菌亚门丝状真菌, 是重要的酶和抗生素的生产菌株, 也常用作植物生长促进剂和生物杀菌剂的生产。木霉能产生多种抗菌物质参与其生物防治过程。Peptaibols 是研究得最为深入的一种。Peptaibols 是一类富含 Aib 的特殊抗菌肽, 其分子量通常为 500–2200 Da, 含有 5–20 个氨基酸残基, 多数为 15–20 残基; 其 N-末端烷基化 (通常乙酰化), C-末端羟基化, 通常为苯丙氨酸醇^[1]。后来的研究还发现了 C-末端没有氨基酸的 peptaibols 而将其称为 peptaibiotics^[2]。目前已经发现的 300 多种 peptaibols 的序列及结构信息可从其专业网站 <http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml> 中得到^[3]。Peptaibols 具有抗菌、抗病毒、诱导肿瘤细胞凋亡、诱导植物抗性等多种生物学活性^[4–7]。其作用机制一般认为 peptaibols 形成离子通道, 造成胞内物质外流而引起细胞的死亡, 其作用方式符合“桶-板 (barrel-stave)”

模型和“地毯 (carpet)”式结构模型^[8]。有关 peptaibols 的结构、作用机制和生物学活性我们已经进行了综述^[9–10], 本文主要就木霉 peptaibols 的多样性、发酵、分离纯化和鉴定以及生物合成的研究进展进行综述。

1 木霉 peptaibols 的多样性

木霉是 peptaibols 的主要产生菌株, 已经发现的 317 种 peptaibols 中有 190 种来源于木霉菌株, 典型的木霉 peptaibols 序列见表 1^[11]。从表 1 可以看出, *T. viride*、*T. atroviride*、*T. harzianum*、*T. koningii*、*T. pseudokoningii*、*T. longibrachitum*、*T. reesei*、*T. saturnisporum*、*T. Polysporum* 均能产生 peptaibols。木霉 peptaibols 产生菌株主要来源于土壤环境, 近年来从海洋和植物内共生环境中也筛选到产 peptaibols 的木霉菌株^[12–14]。木霉 peptaibols 以含

基金项目: 国家自然科学基金 (30870047); 国家“863 计划” (2007AA091504); 山东省优秀中青年科学家奖励基金 (BS2009SW045); 济南大学博士基金 (XBS0824); 济南大学科研基金 (XKY1017)

作者简介: 宋晓妍: (1970–), 女, 山东省威海市人, 博士, 资源与环境微生物研究。Tel: +86-531-82769230; Fax: +86-53188564326; E-mail: chm_songxy@ujn.edu.cn

收稿日期: 2010-09-13; **修回日期:** 2010-12-11

有 15 – 20（特别是 18 – 20）个氨基酸残基的长链 peptaibols 为主,少数菌株产生短链 peptaibols,序列中的 Aib 残基含量可达 40%^[15]。从序列上分析,木霉 peptaibols 中尚未发现碱性氨基酸 His, Arg 和 Lys,带负电荷氨基酸 Asp,极性不带电荷氨基酸 Thr,芳香族氨基酸 Tyr 和含硫氨基酸 Cys 和 Met。木霉 peptaibols 具有种的特异性,目前还没有发现一

种 peptaibol 来源于不同种的木霉菌株,因此 peptaibols 可能在木霉分类上具有一定的意义^[16]。Peptaibols 具有高度的异质性,每一菌株都能产生多种 peptaibols,这些 peptaibols 只有一个或几个氨基酸不同,类似于基因组和基因组学,Degenkolb 等人提出了 peptaibiome 和 peptaibiomics 的概念,旨在从一个整体水平来认识木霉 peptaibols^[17]。

表 1 代表性的木霉 Peptaibols
Table 1 Typical peptaibols from *Trichoderma*

Strains of <i>Trichoderma</i>	Name of peptaibols	Sequence of peptaibols
<i>Trichoderma longibrachitum</i>	Longibrachin_A_I	Ac U A U A U A Q U V U G L U P V U U Q Q F OH
	Longibrachin_A_II	Ac U A U A U A Q U V U G L U P V U J Q Q F OH
	Longibrachin_A_III	Ac U A U A U U Q U V U G L U P V U U Q Q F OH
	Longibrachin_A_IV	Ac U A U A U U Q U V U G L U P V U J Q Q F OH
	Longibrachin_B_II	Ac U A U A U A Q U V U G L U P V U U E Q F OH
	Longibrachin_B_III	Ac U A U A U A Q U V U G L U P V U J E Q F OH
<i>Thrichoderma reesei</i>	Paracelsin_A	Ac U A U A U A Q U V U G U U P V U U Q Q F OH
	Paracelsin_B	Ac U A U A U A Q U L U G U U P V U U Q Q F OH
	Paracelsin_C	Ac U A U A U U Q U V U G U U P V U U Q Q F OH
	Paracelsin_D	Ac U A U A U U Q U L U G U U P V U U Q Q F OH
<i>Trichoderma polysporum</i>	Polysporin_A	Ac U P U A U U Q U V U G V U P V U U Q Q F OH
	Polysporin_B	Ac U P U A U U Q U V U G L U P V U U Q Q F OH
	Polysporin_C	Ac U P U A U U Q U I U G L U P V U U Q Q F OH
	Polysporin_D	Ac U P U A U U Q U I U G L U P V U V Q Q F OH
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	Saturnisporin_SA_I	Ac U A U A U A Q U L U G U U P V U U Q Q F OH
	Saturnisporin_SA_II	Ac U A U A U A Q U L U G U U P V U J Q Q F OH
	Saturnisporin_SA_III	Ac U A U A U U Q U L U G U U P V U U Q Q F OH
	Saturnisporin_SA_IV	Ac U A U A U U Q U L U G U U P V U J Q Q F OH
<i>Trichoderma viride</i> NRRL 3199	Alamethicin_F-30	Ac U P U A U A Q U V U G L U P V U U E Q F OH
	Alamethicin_F-50	Ac U P U A U A Q U V U G L U P V U U Q Q F OH
	Alamethicin_II	Ac U P U A U U Q U V U G L U P V U U E Q F OH
<i>Trichoderma atroviride</i>	Atroviridin_A	Ac U P U A U A Q U V U G L U P V U U Q Q F OH
	Atroviridin_B	Ac U P U A U A Q U V U G L U P V U J Q Q F OH
	Atroviridin_C	Ac U P U A U U Q U V U G L U P V U J Q Q F OH
<i>Trichoderma koningii</i>	Trichokonin_I a	Ac U A U A U A Q U V U G L A P V U U Q Q F OH
	Trichokonin_I b	Ac U G U A U A Q U V U G L U P V U U Q Q F OH
	Trichokonin_II a	Ac U A U A U A Q U V U G L U A U U Q Q F OH
	Trichokonin_II b	Ac A A U A U A Q U V U G L U P V U U Q Q F OH
	Trichokonin_II c	Ac U A A A U A Q U V U G L U P V U U Q Q F OH
	Trichokonin_V	Ac U A U A U Q U V U G L P V U U Q Q F OH
	Trichokonin_VI	Ac U A U A U A Q U V U G L U P V U U Q Q F OH
	Trichokonin_VII	Ac U A U A U A Q U V U G L U P V U J Q Q F OH
<i>Trichoderma harzianum</i>	Harzianin_HC_I	Ac U N L U P S V U P U L U P L OH
	Harzianin_HC_III	Ac U N L U P S V U P J L U P L OH
	Harzianin_HC_IX	Ac U N L U P A I U P J L U P L OH
	Harzianin_HC_VI	Ac U N L U P A V U P U L U P L OH
	Harzianin_HC_VIII	Ac U N L U P A V U P J L U P L OH
	Harzianin_HC_VIII	Ac U N L U P A V U P J L U P L OH
	Harzianin_HC_X	Ac U Q L U P A V U P J L U P L OH
	Harzianin_HC_XI	Ac U N L U P S I U P U L U P L OH
	Harzianin_HC_XII	Ac U N L U P S I U P J L U P L OH
	Harzianin_HC_XIII	Ac U Q L U P S I U P J L U P L OH
	Harzianin_HC_XIV	Ac U N L U P A I U P U L U P L OH
	Harzianin_HC_XV	Ac U Q L U P A I U P J L U P L OH
	Harzianin_HK_VI	Ac U N I I U P L L U P L OH

U = Aib, J = Iva(isovaline) .

2 木霉 peptaibols 的发酵、分离纯化和鉴定

Peptaibols 属于次级代谢产物,目前有关其发酵生产的研究还很少。木霉 peptaibols 大多采用液体培养方式,固体培养方式较少^[18-19]。液体培养基通常采用葡萄糖、酵母粉、麦芽汁、蛋白胨等为碳氮源,同时添加少量的无机盐,有的则直接采用 PDA 培养基。Peptaibols 生产的培养温度一般控制在 25℃ 左右,发酵周期较长,一般需要 10 - 15 天,如 *T. harzianum* CECT 2413 发酵生产 peptaibols 需 14 天^[19]。但我们在研究中发现采用固体培养方式,利用廉价的麸皮和草粉作为主要培养基质,在优化条件下 *T. koningii* SMF2 培养 3 天就可以产生大量的 peptaibols^[6]。

目前 peptaibols 的分离纯化技术已经比较成熟,一般先用不同的有机溶剂从木霉发酵液和/或菌丝中提取^[19-21]。随后通过多步层析过程,如排阻色谱,吸附色谱和反相半制备 HPLC,进行纯化^[6, 20, 22]。常用的排阻色谱凝胶介质是 Sephadex LH20, HPLC 常用反相的 C₁₈ 柱。我们在研究中建立了 peptaibols 大量制备的简单方法^[6]。

Peptaibols 序列中含有大量的非蛋白质氨基酸,这和核糖体合成的抗菌肽不同,因此不能采用 Edman 降解法等常规蛋白质、多肽分析方法来进行序列分析^[23]。Peptaibols 的鉴定方法随着质谱技术的发展有了快速的发展。最初采用场解吸离子化质谱^[25],后来采用快原子轰击质谱((FAB) MS)、离子喷雾离子阱质谱(ISI-MS)和电喷雾离子阱质谱(ESI-MS)等进行 peptaibols 的序列鉴定^[19, 26-27]。近年来,液质联用电喷雾串联质谱(LC/ESI-MS/MS),基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和纳升液相-电喷雾串联质谱(nano-ESI-QTOF MS/MS)等也成功用于 peptaibols 的鉴定,并且这些方法具有高通量、检测和序列分析同步完成的特点,特别是液质联用串联质谱成为 peptaibols 序列鉴定最为有力的技术,目前所发现的 300 多种 peptaibols 约一半是 2002 年以后采用 HPLC-MS 技术鉴定的^[12, 28-29]。MALDI-TOF 质谱分析成功地用于了全细胞 peptaibome 的研究^[30]。在 peptaibols 链中通常有一个不稳定的 Aib-Pro 键,离子化条件下,该键往

往优先断裂,在质谱数据中出现特征性的 N-末端和 C-末端寡肽酰基化离子^[23],这成为 peptaibols 质谱解析的重要特征。但是上述方法不能鉴定特定位置的同分异构氨基酸(如 Leu 或 Ile; Val 或 Iva),因此全序列的阐明有时还需要进一步的核磁共振鉴定^[31]。

一维核磁共振(¹H-NMR 和 ¹³C-NMR)和二维核磁共振(¹H-¹H COSY, NOESY/ROESY, HMQC/HSQC 和 HMBC)是常用的多肽结构鉴定技术。根据二维核磁共振谱可以分析氨基酸之间的排列,确定多肽的氨基酸序列。¹H-¹³C 远程 COSY 和 COLOC 谱可以解析氨基酸残基间的连接方式。Peptaibols 中氨基酸的 C^αH 质子处于 3.3 - 4.6 ppm 之间,而 Aib 残基的 β-CH₃ 则在 1.3 - 1.5 ppm 之间,这些 NMR 谱的特征信号有助于 peptaibols 结构的测定^[32-33]。Peptaibols 通常有一个 C-末端氨基醇,如: *T. longibrachiatum* 产生的 longibrachin LGB III,其 NMR 谱具有 C-苯丙氨酸的信号:δ_H 芳香质子 7.23 (2', 6'-H), 7.27 (3', 5'-H)和 7.15 (4'-H), δ_C 特征谱则为 130.2 (3', 5'), 126.9 (4'), 54.5 (CH-α), 38.0 (CH-β)和 64.9 (CH₂OH-β)^[34]。在这种情况下,2D NMR 技术就可以测定 peptaibols 的氨基酸全序列。有关 peptaibols 的鉴定, Dianel 等的综述中进行了详细的阐述^[35]。

此外, NMR 技术还常用于 peptaibols 在有机溶剂中构象的研究,特别是其与拟态膜的相互作用的研究^[36-37]。

3 木霉 peptaibols 的生物合成

除了末端的修饰, peptaibols 的本质是肽,采用与其它微生物肽相同的合成途径-非核糖体合成(NRPS)途径。NRPS 利用多载体巯基化模板机制合成多肽。NRPS 具有模块(module)结构,每个模块负责将相应的单体结合到新生肽的主链中^[38]。每一个模块又进一步分为腺苷酰化结构域(adenylation, A)、硫醇化结构域(thiolation, T)和缩合结构域(condensation, C),组成 NRPS 的最小重复单元^[39]。和其他肽合成酶一样, peptaibols 合成过程中 A 结构域识别和活化特定氨基酸单体, T 结构域负责将活化的氨基酸单体结合到正在生长的肽链

中,C 结构域催化肽键的形成^[40-41]。目前已经从 *T. virens*、*T. virens* (*Hypocrea virens*)^[42-43], *T. asperellum*^[44], 和 *T. harzianum*^[19] 中克隆了编码 peptaibols 合成酶的基因。从 *T. reesei* (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>) 和 *T. atroviride* (*H. atroviridis*) 的基因组中也发现了相应的基因^[45]。*Tex1* 是研究最为深入的 peptaibols 合成基因,该基因没有内含子,编码一个 10925 残基的蛋白质,转录产生的 mRNA 约长 63kb。Wiest 等强调这样大的一个 mRNA 长约 10 μ m,超过细胞的直径,细胞必须具有处理该大分子的特殊机制,而这可能与 peptaibols 生物合成有关。*Tex1* 负责 *T. virens* 菌株所有 peptaibols 的合成^[42],模块结构研究发现负责 18 个氨基酸残基组装的每一个模块都具有保守的 A,T 和 C 结构域序列。

Peptaibols 合成酶活性位点的 9 个氨基酸在底物特异性加入中发挥着重要作用,被作为特定氨基酸加入的特征序列。Wiest 等指出 *Tex1* 的 1、9、12、15 和 16 模块的特征序列具有高度的相似性^[42]。从对应的 peptaibols 氨基酸序列分析这些模块可能参与 Aib 的加入,但是特征序列并不能单独决定氨基酸的特异性。采用 *tex1* 缺失突变株研究 peptaibols 的合成,发现氨基酸的加入反映了同源底物的可利用性而并不存在多种 NRPS^[42]。

木霉 peptaibols 无论从其序列长度还是序列中特定位置的氨基酸组成看都是显著异质的,同一菌株培养物通常产生多个组分的 peptaibols。*T. virens* TV29-8 能产生 18、14 和 11 个残基 3 种序列长度的 peptaibols,其 *tex1* 基因缺失会丧失所有 peptaibols 组分的产生能力^[42]。这表明 *Tex1* 不仅有非常广泛的底物特异性,而且能越过特定的 domains,产生短链 peptaibols。但是,木霉菌株 *T. virens* G20 缺失 *tex1* 基因仅造成 18 残基 peptaibols 的缺失,并不影响 11 和 14 残基 peptaibols 的合成^[43]。因此可能存在第二个 peptabiols 合成酶,但至今尚未发现形成 11 和 14 残基 peptaibols 的合成酶。

Peptaibols 乙酰化的 N-末端和 C-末端氨基醇的生物合成的研究始于 1978 年 Mohr 和 Kleinkauf 对于 Almethicin (Alm) 生物合成过程中乙酰化的 N-末端和 C-末端氨基醇残基来源的研究^[46]。他们认为 N-末端的 N-乙酰-Aib 本身不是由 *T. viride* 的其他代谢途径合成的,也不是合成酶的直接底物。酶本

身催化乙酰-CoA 的乙酰基团转运到 Alm 的第一个氨基酸。Alm C-末端的苯丙氨醇从 L-苯丙氨酸衍生而来并且是一个独立的酶系反应产物。Peptaibols 合成酶结构域的研究也证实了这一点,这些研究清晰地表明这些修饰是由转录后的加工完成的。*T. koningii* 能产生 C 末端分别带有酰胺基团和羟基哌嗪酮 (hydroxyketopiperazine) 基团的两种 peptaibiotics pseudokonin KL III 和 VI。这种 C-末端修饰的 peptaibols 的结构表明不同氨基醇的连接可能发生在肽链延伸终止的同一肽合成酶上^[47]。和其他大多数肽合成酶的 C-末端有硫酯酶结构域不同,peptaibols 合成酶最后一个模块含有一个还原结构域(R-结构域),其催化一个二电子或四电子的还原反应,使肽酰载体蛋白结合肽将其还原成相应的伯醇,即引导 peptaibols C-末端的氨基醇的形成,释放还原产物^[48]。Peptaibiotics pseudokonin KL III 和 VI 末端带有的酰胺基团和羟基哌嗪酮基团可能是由含有 Aib9-Pro10 的 10 个氨基酸残基的前体末端修饰的结果,或者是 KL III 的 Pro10 酰胺化或者是 KL VI 的 Aib9 和 Pro10 环化形成羟基哌嗪酮环^[47]。

Peptaibols 富含 Aib 和 Iva 等非蛋白质氨基酸残基。虽然有关 peptaibols 生物合成的研究越来越受到重视,但是到目前为止还没有有关来源于木霉或其他真菌的任何一种 peptaibol 中非蛋白源氨基酸合成的报导。仅有的研究发现 peptaibols 混合产物的复杂性可以通过向培养液中补充特定的氨基酸加以控制^[34]。在已测定的两个种中,外源补充 Aib 或 Glu 会改变 peptaibols 的生物合成,使其混合物简单化。向 *T. harzianum* 培养液加入 Aib 形成新的 peptaibols 分子,并且导致几乎只有一种肽的产生,所有的 Ala 残基都被 Aib 代替;而给 *T. longibrachiatum* 提供 Glu 则倾向于酸性的 longibrachins 的合成^[34]。Kubicek 和 Raap 提出了 Aib 合成的两种可能途径^[45]。

另外,Kubicek 等的研究发现 peptaibols 的形成不是发生在菌丝生长阶段,而是孢子形成阶段,但是并不是所有的突变体孢子化就可以产生 peptaibols^[45]。我们在研究中也发现,采用固体培养基培养 *T. koningii* SMF2 3d 就能产生 peptaibols,此时木霉孢子已大量形成,而采用同样的培养基液体培养则检测不到 peptaibols 的形成,其机制我们正在

研究。

4 结论

Peptaibols 是丝状真菌产生的一类特殊的抗菌肽,主要由木霉属真菌产生。随着质谱、核磁共振技术的发展,越来越多的新 peptaibols 结构得到解析,peptaibols 序列为我们展示出其更为多样的特征。近年来,有关其生物合成机制的研究日益受到重视,其 NRPS 模块的操作、非蛋白质氨基酸的合成、孢子形成与 peptaibols 合成是否有关等问题的研究将是今后关注的焦点。Peptaibols 发酵制备技术的开发对于木霉生物学基础问题的研究及 peptaibols 的应用必将有着积极的推动作用。

参考文献

- [1] Benedetti E, Bavoso A, Di Blasio B, Pavone V, Pedone C, Toniolo C, Bonora GM. Peptaibol antibiotics: a study on the helical structure of the 2-9 sequence of emerimicins III and IV. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(24): 7951-7954.
- [2] Matha V, Jegorov A, Kiess M, Brückner H. Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, alpha-aminoisobutyric acid-rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae. *Tissue Cell*, 1992, 24(4): 559-564.
- [3] Whitmore L, Wallace BA. The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 (Database issue): D593-594.
- [4] Shi M, Wang HN, Xie ST, Luo Y, Sun CY, Chen XL, Zhang YZ. Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Cancer*, 2010, 9: 26.
- [5] Viterbo A, Wiest A, Brotman Y, Chet I, Kenerley C. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8 (6): 737-746.
- [6] Song XY, Xie ST, Chen XL, Sun CY, Shi M, Zhang YZ. Solid-state fermentation for Trichokonins production from *Trichoderma koningii* SMF2 and preparative purification of Trichokonin VI by a simple protocol. *Journal of Biotechnology*, 2007, 131(2): 209-215.
- [7] Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, et al. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2005, 52(2): 137-168.
- [8] Chugh JK, Wallace BA. Peptaibols: models for ion channels. *Biochemical Society Transactions*, 2001, 29 (Pt 4): 565-570.
- [9] 宋晓妍,陈秀兰,孙彩云,解树涛,张玉忠. 哌珀霉素类抗菌肽——一类特殊的抗菌肽. 生命的化学 (*Chemistry of Life*), 2005, 25(3): 184-186.
- [10] 解树涛,宋晓妍,陈秀兰,孙彩云,张玉忠. Peptaibols 类抗菌肽的结构及作用机制研究进展. 国外医药抗生素分册 (*World Note on Antibiotics*), 2006, 27(5): 193-197.
- [11] <http://www.cryst.bsk.ac.uk>, 2010-7-10.
- [12] Ruiz N, Wielgosz-Collin G, Poirier L, Grovel O, Petit KE, Mohamed-Benkada M, du Pont TR, Bissett J, Verite P. New Trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. *Peptides*, 2007, 28(7): 1351-1358.
- [13] Maddau L, Cabras A, Franceschini A, Linaldeddu BT, Crobu S, Roggio T, Pagnozzi D. Occurrence and characterization of peptaibols from *Trichoderma citrinoviride*, an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microbiology*, 2009, 155 (Pt 10): 3371-3381.
- [14] Ren J, Xue C, Tian L, Chen J, Deng Z, Proksch P, Lin W. Asperelines A-F, peptaibols from the marine-derived fungus *Trichoderma asperellum*. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(6): 1036-1044.
- [15] Whitmore L, Wallace BA. Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation. *European Biophysics Journal*, 2004, 33(3): 233-237.
- [16] Degenkolb T, von Dohren H, Nielsen KF, Samuels GJ, Bruckner H. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, 5(5): 671-680.
- [17] Degenkolb T, Grafenhan T, Berg A, Nirenberg HI, Gams W, Bruckner H. Peptaibiotics: Screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. *Chemistry & Biodiversity*, 2006, 3(6): 593-610.
- [18] Berg A, Schlegel B, Ihn W, Demuth U, Grafe U. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, bergofungins B, C and D, from *Emericellopsis donezhii* HKI 0059. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1999, 52 (7): 666-669.

- [19] Vizcaino JA, Cardoza RE, Dubost L, Bodo B, Gutierrez S, Monte E. Detection of peptaibols and partial cloning of a putative peptaibol synthetase gene from *T. harzianum* CECT 2413. *Folia Microbiology (Praha)*, 2006, 51(2): 114-120.
- [20] Auvin-Guette C, Rebuffat S, Prigent Y, Bodo B. Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of American Chemistry Society*, 1992, 114: 2170-2174.
- [21] Bruckner H, Konig WA, Aydin M, Jung G. Trichotoxin A40. Purification by counter-current distribution and sequencing of isolated fragments. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, 827(1): 51-62.
- [22] Cosette P, Rebuffat S, Bodo B, Molle G. The ion-channel activity of longibrachins LGA I and LGB II: effects of pro-2/Ala and gln-18/Glu substitutions on the alamethicin voltage-gated membrane channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1461(1): 113-122.
- [23] Landreau A, Pouchus YF, Sallenave-Namont C, Biard JF, Boumard MC, Robiou du Pont T, Mondegue F, Goulard C, Verbist JF. Combined use of LC/MS and a biological test for rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 48(2-3): 181-194.
- [24] Iida A, Yoshimatsu S, Sanekata M, Fujita T. Fungal metabolites. IV. Synthesis of an antibiotic peptide, trichosporin B-V, from *Trichoderma polysporum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 1990, 38(11): 2997-3003.
- [25] Bruckner H, Przybylski M. Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by high-performance liquid chromatography with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1984, 296: 263-275.
- [26] Huang Q, Tezuka Y, Hatanaka Y, Kikuchi T, Nishi A, Tubaki K. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. IV. Minor peptaibols of *Trichoderma koningii*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 1995, 43(10): 1663-1667.
- [27] Jaworski A, Bruckner H. Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1999, 862(2): 179-189.
- [28] Stoppacher N, Reithner B, Omann M, Zeilinger S, Krska R, Schuhmacher R. Profiling of trichorzianines in culture samples of *Trichoderma atroviride* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21(24): 3963-3970.
- [29] Krause C, Kirschbaum J, Bruckner H. Peptaibiotics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS. *Amino Acids*, 2006, 30(4): 435-443.
- [30] Neuhoef T, Dieckmann R, Druzhinina IS, Zeilinger S, Krska R, Schuhmacher R. Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma/Hypocrea*: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures? *Microbiology*, 2007, 153(Pt 10): 3417-3437.
- [31] Rebuffat S, Prigent Y, Goulard C, Goulard C, Bodo B. Isolation and structural elucidation of the 11-residue peptaibol antibiotic, harzianin HK VI. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1996: 2021 - 2027.
- [32] Rebuffat S, Goulard C, Bodo B. Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1995: 1849 - 1855.
- [33] Rebuffat S, Conraux L, Massias M, Zeilinger S, Krska R, Schuhmacher R. Sequence and solution conformation of the 20-residue peptaibols, saturnisporins SA II and SA IV. *International Journal of Peptide Protein Research*, 1993, 41(1): 74-84.
- [34] Leclerc G, Goulard C, Prigent Y, Bodo B, Wroblewski H, Rebuffat S. Sequences and antimycoplasmic properties of longibrachins LGB II and LGB III, two novel 20-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Natural Product*, 2001, 64(2): 164-170.
- [35] Daniel JF, Filho ER. Peptaibols of *Trichoderma*. *Natural Product Reports*, 2007, 24(5): 1128-1141.
- [36] Salnikow ES, Friedrich H, Li X, Bertani P, Reissmann S, Hertweck C, O'Neil JD, Raap J, Bechinger B. Structure and alignment of the membrane-associated peptaibols ampullosporin A and alamethicin by oriented ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR spectroscopy. *Biophysical Journal*, 2009, 96(1): 86-100.
- [37] Levtsova OV, Antonov M, Shaitan AK, Orshanskii IA, Nikolaev IN, Shaitan KV. Molecular dynamics of zervamicin II and its analogues in water and methanol. *Biofizika*, 2009, 54(4): 616-621.
- [38] Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews*, 1997, 97(7): 2651-2674.

- [39] Stein T, Vater J, Kruff V, Otto A, Wittmann-Liebold B, Franke P, Panico M, McDowell R, Morris HR. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(26): 15428-15435.
- [40] Challis GL, Naismith JH. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 2004, 14(6):748-756.
- [41] Finking R, Marahiel MA. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58: 453-488.
- [42] Wiest A, Grzegorski D, Xu BW, Goulard C, Rebuffat S, Ebbole DJ, Bodo B, Kenerley C. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(23): 20862-20868.
- [43] Wei X, Yang F, Straney DC. Multiple non-ribosomal peptide synthetase genes determine peptaibol synthesis in *Trichoderma virens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51(5): 423-429.
- [44] Chuttrakul C, Peberdy JF. Isolation and characterisation of a partial peptide synthetase gene from *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 252(2): 257-265.
- [45] Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Sandor E, Druzhinina IS. Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma*. *Chemistry & Biodiversity*, 2007, 4(6): 1068-1082.
- [46] Mohr H, Kleinkauf H. Alamethicin biosynthesis: acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1978, 526(2):375-386.
- [47] Rebuffat S, Goulard C, Hlimi S, Bodo B. Two unprecedented natural Aib-peptides with the (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif and an unusual C-terminus: structures, membrane-modifying and antibacterial properties of pseudokonins KL III and KL VI from the fungus *Trichoderma pseudokoningii*. *Journal of Peptide Science*, 2000, 6(10):519-533.
- [48] Manavalan B, Murugapiran SK, Lee G, Choi S. Molecular modeling of the reductase domain to elucidate the reaction mechanism of reduction of peptidyl thioester into its corresponding alcohol in non-ribosomal peptide synthetases. *BMC Structural Biology*, 2010, 10:1.

Antimicrobial peptides peptaibols from *Trichoderma*—A review

Xiaoyan Song^{1*}, Yuzhong Zhang², Yuanxiu Wang¹

¹ College of Medical and Life Science, University of Jinan, Jinan 250022, China

² State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: Peptaibols are a family of antimicrobial peptides, which are synthesized by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and contain high proportions of α -aminoisobutyric acid (Aib). Up to now, 317 peptaibols have been identified, and the majority of them are produced by *Trichoderma* strains. In this review, we described the diversity, fermentation, purification, identification and biosynthesis of peptaibols from *Trichoderma*.

Keywords: *Trichoderma*, peptaibols, antimicrobial peptides, biosynthesis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870047), by the National High Technology Research and Development Program of China (2007 AA091504), by the Science Foundation for Middle-aged and Young Scientists of Shandong Province (BS2009SW045), by the Science Foundation for Doctors of University of Jinan (XBS0824) and by the Science Foundation of University of Jinan (XKY1017)

* Corresponding author. Tel: +86-531-82769230; Fax: +86-53188564326; E-mail: chm_songxy@ujn.edu.cn

Received: 13 September 2010/ Revised: 11 December 2010