



## 环状细菌素研究进展

张军<sup>1,3</sup>, 汤伟<sup>1,2</sup>, 孙晓雯<sup>1,3</sup>, 刘晓坤<sup>2</sup>, 何增国<sup>2,3\*</sup>

1 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266000

2 青岛海洋生物医药研究院, 山东 青岛 266000

3 青岛百奥安泰生物科技有限公司, 山东 青岛 266000

张军, 汤伟, 孙晓雯, 刘晓坤, 何增国. 环状细菌素研究进展. 微生物学报, 2022, 62(7): 2498–2508.

Zhang Jun, Tang Wei, Sun Xiaowen, Liu Xiaokun, He Zengguo. Research progress of circular bacteriocin. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2498–2508.

**摘要:** 细菌素是一类由细菌核糖体合成的抗菌肽, 是产生菌获得生存优势的重要手段。与大多数线性细菌素不同, 环状细菌素具有 N 端和 C 端共价连接的特殊结构。这种环状结构赋予环状细菌素良好的耐热性、广泛的 pH 适应性和抗蛋白酶降解能力, 在食品防腐和对治耐药性细菌领域表现出巨大的应用潜能。通过对已发现的环状细菌素结构分析发现, 相对于一级结构, 其三级结构的相似性更高, 可以作为环状细菌素归类的依据。环状细菌素的生物合成机制尚不清楚, 但其环化机制是最具价值的研究热点, 可为其他一些肽类物质的合成提供支架, 从而提高应用潜能。环状细菌素抑菌机制主要是在目标菌株的细胞膜上穿孔, 使胞内物质外流, 进而导致目标细菌死亡。其有类似于抗生素的抑菌活性和有别于抗生素的抑菌机制, 为治疗日益严重的耐药性病原菌提供了可靠备选资源。本文综述了环状细菌素的构效关系、生物合成和抑菌机制方面的研究进展, 希望能够对环状细菌素的深入研究和应用提供有价值的参考。

**关键词:** 环状细菌素; 构效关系; 生物合成; 抑菌机制

**基金项目:** 广东省重点领域科技计划(2020B0202010001); 青岛海洋生物医药研究院大健康项目(HYJK2021003)

Supported by the Science and Technology Projects in Key Areas of Guangdong (2020B0202010001) and by the Qingdao Scientific and Technological Innovation Center for Marine Biomedicine Development Grant (HYJK2021003)

\*Corresponding author. Tel: +86-532-85906865; E-mail: bioantai88@vip.163.com

Received: 21 November 2021; Revised: 7 January 2022; Published online: 19 January 2022

## Research progress of circular bacteriocin

ZHANG Jun<sup>1,3</sup>, TANG Wei<sup>1,2</sup>, SUN Xiaowen<sup>1,3</sup>, LIU Xiaokun<sup>2</sup>, HE Zengguo<sup>2,3\*</sup>

1 School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266000, Shandong, China

2 Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266000, Shandong, China

3 Qingdao Bioantai Biotechnology Co., Ltd., Qingdao 266000, Shandong, China

**Abstract:** Bacteriocins are a class of ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria, which endow bacteriocinogenic strains with unique survival advantages. Different from linear bacteriocins, circular bacteriocins have unique N-to-C terminal covalent linkage, and thus they have strong heat tolerance, adaptability to a wide range of pH, as well as certain resistance to protease. Therefore, they show great potential in food antiseptics and antagonization of resistance bacteria. Circular bacteriocins show higher similarity in tertiary structure than in primary structure, laying a basis for the classification. The biosynthesis mechanism of circular bacteriocins is still unclear, whereas the cyclization mechanism is attracting the interest of scholars, given that it can provide scaffolds for the synthesis and the modification of other types of peptide. The antibacterial mechanism of circular bacteriocins is mainly associated with perforation on the cell membrane and the consequential outflow of intracellular substances. With the antibacterial activity similar to or different from antibiotics, they can be potential candidates against the resistance pathogens. In this paper, research on circular bacteriocins was summarized, and the structure-activity relationship, biosynthesis pathway, the mode of action, as well as the application potential of them were highlighted, respectively.

**Keywords:** circular bacteriocin; structure-activity relationship; biosynthesis; antibacterial mechanism

近年来,人们对即食食品(ready-to-eat foods)中防腐剂的关注度日渐提高,化学类防腐剂应用的安全性日渐受到质疑,发掘和使用天然生物防腐剂的呼声越来越高。一些来源安全的抗菌肽逐渐进入天然防腐剂的视野。

细菌素是一类由细菌核糖体合成的抗菌肽。按照是否经过翻译后修饰,一般可分为2大类,即I类细菌素和II类细菌素,两者的碳骨架均由细菌核糖体直接翻译合成,不同之处在于前者存在较多的翻译后修饰。2类细菌素按照各自结构特点又分为若干亚类。以nisin为代表的细菌素作为天然防腐剂在食品防腐领域应用了近一个世纪。在食品加工、流通和储藏领域,nisin可以有效地抑制/杀灭食品腐败菌和致病菌,被认为是一种安全、有效、绿

色的食品防腐剂。然而,nisin在应用过程中也存在一定的局限性,如抑菌活性高度依赖较低的pH环境、易被蛋白酶的降解等条件限制<sup>[1]</sup>。近年来新发现的一类环状细菌素(circular bacteriocin),其N端和C端通过肽键共价相连,整个肽链形成了稳定的环状结构,这一特殊的结构赋予了环状细菌素诸如耐热、抗蛋白酶降解以及广泛的pH适应性等优点,具有成为天然防腐剂的潜能,并逐渐成为细菌素研究的热点。

环状细菌素由细菌产生,在结构上与同样具有环状结构的“cyclotides”(环肽)具有一定的相似性,但又有着明显的区别。为了避免二者的混淆,引入了“circular bacteriocin”(环状细菌素)一词,在概念上同环肽加以区分<sup>[2]</sup>。两者的区别主要表现在:(1)在基因水平上,环状细菌

素的结构基因包含了完整的碳骨架，一次性合成，然后通过翻译后修饰完成首尾连接形成的环形结构；而环肽则是将位于不同基因中的结构单元分别进行转录翻译后，通过多步酶促反应拼接、组装形成；(2) 在合成过程中，环状细菌素遵循“中心法则”，翻译时从 N 端开始逐渐延伸，而环肽合成时则从核心前体肽的两端同时开始装配；(3) 在空间结构上，环状细菌素的翻译后修饰仅仅包括前体肽的切割和 N、C 端的共价键连接，而环肽一般还存在分子内的二硫键交联等结构。因此，在表述中需要对环状细菌素和环肽加以区分。

## 1 分类和结构特点

按照传统的细菌素分类方法，环状细菌素被认为属于 II 类非修饰肽，被归入 II c 类。然而，环状细菌素 N 末端和 C 末端氨基酸残基以肽键“首尾相连”形成独特环状结构却是经翻译后修饰形成，该特征明显有别于其他 II 类细菌素，且其空间结构表现出较高的一致性，因此环状细菌素具有单独归类的潜在属性。已经有研究者提出了将环状细菌素作为细菌素新的分类群体将其归为第 IV 类或 V 类细菌素<sup>[2]</sup>。不含有除“首尾相连”结构的任何翻译后修饰，日渐成为环状细菌素的分类依据。之前的一些归属于环状细菌素的肽类，如 subtilisin A 因存在分子内硫醚键，其划归环状细菌素尚存在有一定的争议<sup>[3]</sup>。相信随着新的环状细菌素资源的不断发掘，未来该类细菌素极有可能作为一个单独的细菌素分类单元。

自 1986 年第一个源自粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的环状细菌素 enterocin AS-48 发现以来<sup>[4]</sup>，迄今为止，发现并鉴定的环状细菌素已达 17 种，根据理化特性，将它们再细分为 2 个亚类：第 i 亚类具有较高的净正电荷(+3 到+6)

和等电点( $pI > 10$ )；ii 亚类的净电荷数(-2 到+2)和等电点均较低( $pI < 10$ ) (表 1)。

成熟的环状细菌素一级结构由 58–70 个氨基酸残基组成，分子量为 5–7 kDa (表 1)，肽链中富含带正电荷和疏水性氨基酸残基，整个肽链表现出较高的净正电荷，且不含有二硫键。环状细菌素一级结构中氨基酸序列的整体相似性不高，仅为 20%–30%<sup>[20]</sup>。然而，带正电荷的氨基酸残基、芳香族氨基酸残基以及 N 端和 C 端的氨基酸残基仍然表现出一定的保守性。Vezina 等通过生物信息学对公开的数据库进行检索，从中预测了 99 条潜在的环状细菌素的序列，通过序列比对发现其中带正电荷和芳香族氨基酸残基的位置表现出了极高的保守性，分别达到了 93.3%和 96.6%<sup>[21]</sup>。

环状细菌素二级结构中富含  $\alpha$ -螺旋结构。在已完成结构解析的环状细菌素中，均包含有 4–5 个  $\alpha$ -螺旋结构(图 1)。肽链的长度与  $\alpha$ -螺旋结构的数量直接相关。Gabrielsen 等<sup>[20]</sup>通过同源建模的方式预测 6 种不同环状细菌素的二级结构，其中肽链较长的 circularin A (69 个)、uberolysin A (70 个)和 amylocyclicin (64 个)可形成 5 个  $\alpha$ -螺旋结构，而序列长度较短的 garvicin ML (60 个)、lactocyclicin Q (61 个)和 leucocyclicin Q (61 个)则形成 4 个  $\alpha$ -螺旋结构。其中 N 端和 C 端首尾相连的 2 个疏水性氨基酸残基，处于第一个  $\alpha$ -螺旋结构内<sup>[23]</sup>。

环状细菌素一级结构的氨基酸序列存在较大差异性，且未发现共有基序。然而三级结构却表现出较高的相似性，且存在共有基序——saposins 折叠，其特征为 4–5 个  $\alpha$ -螺旋结构中的疏水面，面向内部形成了一个紧密的疏水核心<sup>[3]</sup>。与其他来源的 saposins 结构依赖二硫键维持构象稳定不同，环状细菌素仅靠首尾相连的方式，维持构象的稳定<sup>[24]</sup>。同时，在几

表 1 环状细菌素的结构特征

Table 1 Characteristics of circular bacteriocins

Bacteriocin	Length (AA)		MW/Da	pI	Net charge	Hydrophobicity	References
	Leader peptide	Core peptide					
Subgroup i							
Enterocin AS-48	35	70	7 149.48	10.83	+6	0.539	[5]
Circularin A	3	69	6 770.99	11.13	+4	1.007	[6]
Uberolysin A	6	70	7 048.22	10.17	+3	0.937	[7]
Carnocyclin A	4	60	5 861.98	10.70	+4	1.058	[8]
Lactocyclin Q	2	61	6 060.09	10.50	+4	0.826	[9]
Garvicin ML	3	60	6 007.21	10.85	+5	0.887	[10]
Leucocyclin Q	2	61	6 115.16	10.33	+3	0.744	[11]
Amylocyclin	48	64	6 381.55	10.41	+5	0.850	[12]
Enterocin NKR-5-3B	23	64	6 316.46	10.47	+5	0.953	[13]
Pumilarin	38	70	7 087.35	10.72	+5	0.579	[14]
Bacicyclin XIN-1	4	60	5 848.17	10.29	+3	0.877	[15]
Cerecyclin	4	70	7 066.84	10.00	+4	0.563	[1]
Subgroup ii							
Gassericin A	33	58	5 653.54	7.54	+1	0.997	[16]
Butyrivibriocin AR10	22	58	5 981.90	3.88	-2	1.002	[2]
Acidocin B	33	58	5 621.47	7.54	+1	1.036	[17]
Plantaricyclin A	33	58	5 570.47	9.53	+2	1.057	[18]
Plantacyclin B21AG	33	58	5 668.41	9.99	+2	1.002	[19]

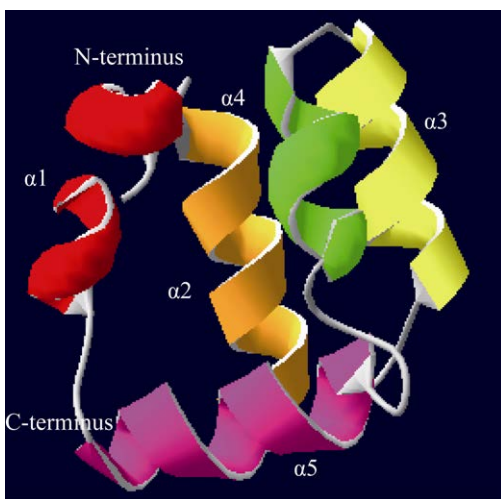
图 1 环状细菌素三维结构示意图(enterocin AS-48, PDBe 登记号: 1e68<sup>[22]</sup>)

Figure 1 Three-dimensional structure schematic diagram of circular bacteriocin. Enterocin AS-48, PDBe ID: 1e68<sup>[22]</sup>.

乎所有的环状细菌素的三级结构中, 都存在一个正电荷氨基酸聚集区和一个疏水性氨基酸聚集区。尽管一级结构中的氨基酸种类差异巨大, 但在三级结构形成过程中, 氨基酸残基通过空间位置的改变, 倾向于实现正电荷氨基酸残基和疏水性氨基酸残基的聚集, 从而有助于正电荷聚集区和疏水区的形成。Martin-Visscher 等对 5 个环状细菌素 carnocyclin A、lactocyclin Q、enterocin AS-48、circularin A 和 uberolysin 的三级结构分析后发现, 其存在的 4–5 个  $\alpha$ -螺旋结构中的疏水性氨基酸均会形成一定的疏水表面<sup>[3]</sup>。环状细菌素更高级结构可能以寡聚物的形式存在。研究发现, 在生理 pH 下, enterocin AS-48 单体的疏水面在水溶液中相互聚集, 以二聚体的形式存在<sup>[25]</sup>。

环状细菌素一级结构的差异性和二、三级结构的相似性,决定了未来环状细菌素的确定和分类,应该更多地通过二、三级结构的比来实现。同时,三级结构中固有的 saposins 折叠、正电荷表面和疏水表面更决定了环状细菌素作用机制的相似性。

## 2 基因簇和生物合成

环状细菌素合成基因簇至少包含 5–7 个基因:环状细菌素前体基因、ATP 依赖的 ABC 转运蛋白基因、细菌素免疫基因以及一些功能未知的基因(图 2)。通过序列比对发现,环状细菌素基因簇中相关基因的保守性达到 75.6%<sup>[21]</sup>。相似的基因簇结构表明环状细菌素应该具有相似的生物合成机制。环状细菌素前体基因编码一段包含前导肽序列在内的无活性环状细菌素前体。前导肽的作用主要在于促进成熟肽的正确折叠,以便于后续切割和环化作用相关酶的作用和防止细菌素对产生菌自身的伤害。在其他类型的细菌素中,前导肽通常具有一定的保守性,保守序列为前导肽的切割提供识别位点,如羊毛硫细菌素前导肽序列中的 FNLD box 和 II a 类细菌素前导肽末端的双甘氨酸序列<sup>[26]</sup>。然而,对环状细菌素前导肽序列比对,并未发现其存在保守的序列特征,其序列长度从 2–48 个氨基酸残基不等,前导肽序列的特异性和巨大差异性,预示了环状细菌素前导肽的切割可能

存在另外的机制。ATP 依赖的 ABC 转运蛋白基因和细菌素免疫基因分别参与环状细菌素向胞外的转运和产生菌自身对环状细菌素的免疫。最新的研究显示,转运和自身免疫的作用,应该以 ATP 依赖的 ABC 转运蛋白和细菌素免疫蛋白为基础,同时需要基因簇内一些功能未知的蛋白与之形成的复合体,共同参与转运和免疫的过程。Van Belkum 等研究发现,几乎所有的环状细菌素基因簇内都存在一个参与芽孢形成的膜蛋白基因(*SpoIIM*)<sup>[27]</sup>。Mu 等发现 *SpoIIM* 基因缺失后环状细菌素在胞内的大量积累,表明 *SpoIIM* 蛋白可能参与了 ABC 转运蛋白对环状细菌素的转运过程<sup>[28]</sup>。Scholz 等发现,产生菌对环状细菌素 amylocyclicin 的免疫作用受多个基因调控,其免疫基因只提供最基础的自我免疫<sup>[12]</sup>。同时,另一些参与环状细菌素形成的基因可能不在基因簇内,如参与前导肽切割的酶基因和参与 N 端 C 端连接酶的基因。Gabrielsen 等分析发现,在环状细菌素合成的基因簇中未发现任何与肽酶有关的保守序列和结构域,因此环状细菌素前导肽序列的切割酶可能类似于大肠杆菌(*Escherichia coli*)和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的信号肽酶(signal peptidase)存在于染色体的其他位置<sup>[20]</sup>。另外,一些环状细菌素在不同属的工程菌中进行异源表达产物的不稳定,更进一步证实了这一观点<sup>[20,24]</sup>。

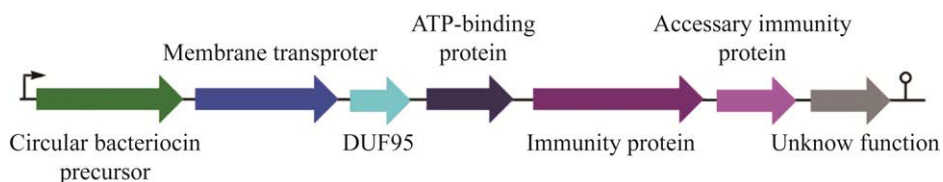


图 2 环状细菌素基因簇示意图(图片用 ChemBioDraw Ultra 14.0 软件绘制)

Figure 2 Gene cluster schematic diagram of circular bacteriocins. Image are drawn using ChemBioDraw Ultra 14.0.

环状细菌素前体基因表达后, 从线性前体肽到环状成熟肽需要经过 3 个步骤(图 3): 前导肽的切割、N 端与 C 端的环化和成熟肽向胞外的分泌。目前对该合成机制的研究尚不清楚, 但综合之前一些研究结果, 发现至少有 4 种蛋白或多肽参与这一过程, 即前导肽、核心肽、前导肽切割酶和肽连接酶。(1) 前导肽。前导肽序列可能含有同各自切割酶识别的特异性位点, 这些识别位点可能存在巨大差异。研究发现, *enterocin* NKR-5-3B 前导肽序列任何部分的缺失, 都会导致成熟肽活性的丧失, 而将其成熟肽与其他环状细菌素的前导肽杂合后, 同样导致了抑菌活性的丧失<sup>[23]</sup>。(2) 核心肽。核心肽 N 端和 C 端的氨基酸残基直接参与环化的过程, 其首尾的氨基酸序列或残基组成对环化反应的进行至关重要。Cebrián 等将 *enterocin* AS-48 首尾的蛋氨酸和色氨酸分别用丙氨酸进行替代, 结果未发现环状细菌素 *enterocin* AS-48

的形成<sup>[29]</sup>。环状细菌素的 C 端氨基酸残基以疏水性氨基酸为主, 而 N 端氨基酸残基以短侧链的氨基酸残基为主, 且位于同一个  $\alpha$ -螺旋内<sup>[3]</sup>。因此, 推断参与该  $\alpha$ -螺旋形成的氨基酸残基组成可直接影响环化反应的进行。研究发现, 将 *enterocin* AS-48 N 端的氨基酸残基分别用能促进和阻碍  $\alpha$ -螺旋形成的氨基酸残基进行替代, 前者对成熟肽环状肽的形成没有影响, 而后者则完全阻断了环状肽的形成, 只形成了线性肽<sup>[23]</sup>。另外, 在细菌素前导肽的切割和向胞外分泌过程中, 环状细菌素是通过 N 端疏水性氨基酸聚集区的疏水作用来实现成熟肽向胞外转移<sup>[23]</sup>, 而其他类型细菌素多是 N 端带电荷氨基酸残基聚集区通过静电作用完成前导肽的切割和向胞外分泌。(3) 前导肽切割酶和肽连接酶。前导肽切割和 N 端 C 端肽连接的机制仍未被揭示。但较为确定的是, 参与这 2 个作用的酶并不存在于环状细菌素合成的基因簇内。

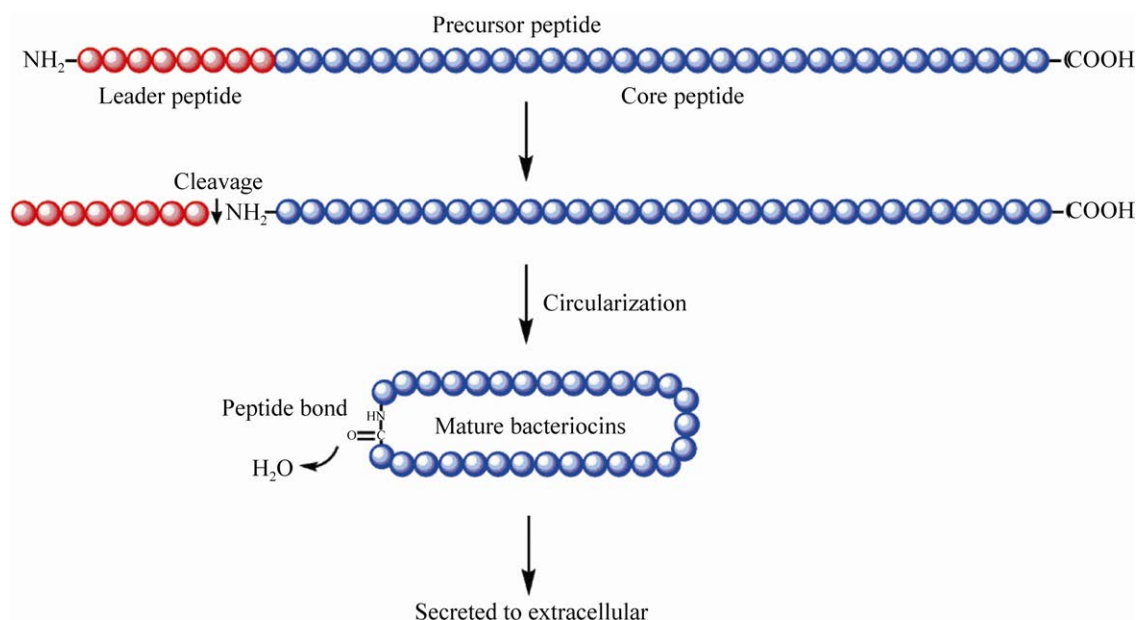


图 3 环状细菌素生物合成示意图(图片用 ChemBioDraw Ultra 14.0 软件绘制)

Figure 3 Biosynthesis schematic diagram of circular bacteriocin. Image are drawn using ChemBioDraw Ultra 14.0.

然而, 由于参与环状细菌素前导肽切割和首尾连接的酶未被发现, 其具体的酶促反应过程尚不清楚。

切割、环化和分泌这 3 个步骤是相互偶联还是彼此独立仍有待研究。但有研究显示, enterocin NKR-5-3B 的前导肽序列突变后导致前导肽无法切割, 但并未发现前体肽在胞内的聚集, 表明线性肽的前体肽在胞内极容易被蛋白酶非特异性降解<sup>[23]</sup>。因此, 为避免环状细菌素合成过程中被胞内蛋白酶降解, 目前的研究倾向于认为前导肽的切割和 N 端与 C 端环化应该快速发生, 即 2 个过程的偶联。然而, Gabrielsen 等通过构建环状细菌素 garvicin ML 基因簇的系列突变体, 表明 N 端与 C 端环化和前导肽的切割是 2 个独立的过程, 且后者先于前者发生, 但作者也谨慎地表示这一发现仅在 garvicin ML 中得到观察, 是否具有普遍性, 还有待论证<sup>[10]</sup>。

对环化机制的揭示是环状细菌素生物合成中最具价值的研究热点。对环状细菌素基因簇内的基因进行分析未发现连接酶的结构域。这提示我们介导环化的酶基因可能不在基因簇内。近年来, 一些在体外通过酶促反应来实现肽环化的研究可能为揭示环状细菌素的环化过程提供一定的参考。Toplak 等以枯草芽孢杆菌蛋白酶 subtilisin BPN 为基础合成了一个肽连接酶 peptiligase, 实现了肽链的体外环化, 传统上认为具有蛋白降解作用的 subtilisin, 在肽链大于 11 个氨基酸残基时, 可以实现肽链的首尾相连, 使肽链形成环肽; 同时还发现肽链连接的效率同 N 端的 2 个和 C 端的 4 个氨基酸残基的组成直接相关, 即 N 端的氨基酸残基以 Ser、Gly 和 Ala 为主, 且不能有 Pro, C 端的氨基酸残基应该以疏水性氨基酸残基为主<sup>[30]</sup>。这一发现同环状细菌素 N 端和 C 端参与环化的氨基酸

残基的种类<sup>[24]</sup>有惊人的一致性, 为研究细菌素的环化作用提供了一定的参考和借鉴。

### 3 抑菌作用机制

细菌素的合成从本质上来讲是产生菌 (bacteriocinogenic strains) 与处于同一生态位中的其他微生物展开生存竞争的有效手段, 细菌素的作用机制从目标菌株生物被膜、细胞壁、细胞膜到胞内大分子等均可产生影响<sup>[31]</sup>。环状细菌素在一级结构方面具有巨大差异, 因此难以在氨基酸序列层面对抑菌机制的构效关系做出明确的结论。然而, 可以确定的是环状细菌素中共有或相似的三级结构如 saposin 折叠基序和相对集中的正电荷表面区及疏水区可能才是决定环状细菌素的抑菌机制的决定因素, 因此核心肽序列的改变应该是通过对三级结构功能区的影响来间接影响抑菌活性。Cebrián 等通过将 enterocin AS-48 疏水区的 13 位和 40 位的甘氨酸和亮氨酸分别用赖氨酸替代, 以降低疏水区对膜的亲和力, 结果发现其抑菌活性大幅降低<sup>[32]</sup>, 即佐证了这一点。

目前, 对环状细菌素抑菌作用机理通常认为是孔洞机制, 即认为是环状细菌素与目标菌株细胞膜结合后, 在细胞膜上形成穿孔后引发的胞内  $K^+$  离子释放、细胞膜的去极化, 进而导致目标菌株死亡<sup>[5,33]</sup>。其作用过程具体为: 当与膜相互作用时, 细胞膜附近的酸性环境使环状细菌素寡聚物构象发生变化, 正电荷聚集区与细胞膜表面的负电荷结合, 暴露的疏水表面, 向细胞膜内插入, 使细胞膜表面的局部区域失去了稳定性, 最终在细胞膜上形成了孔洞(图 4)。

有意思的是, 环状细菌素在抑制目标菌株生长过程中也表现出对生物被膜(biofilm)形成

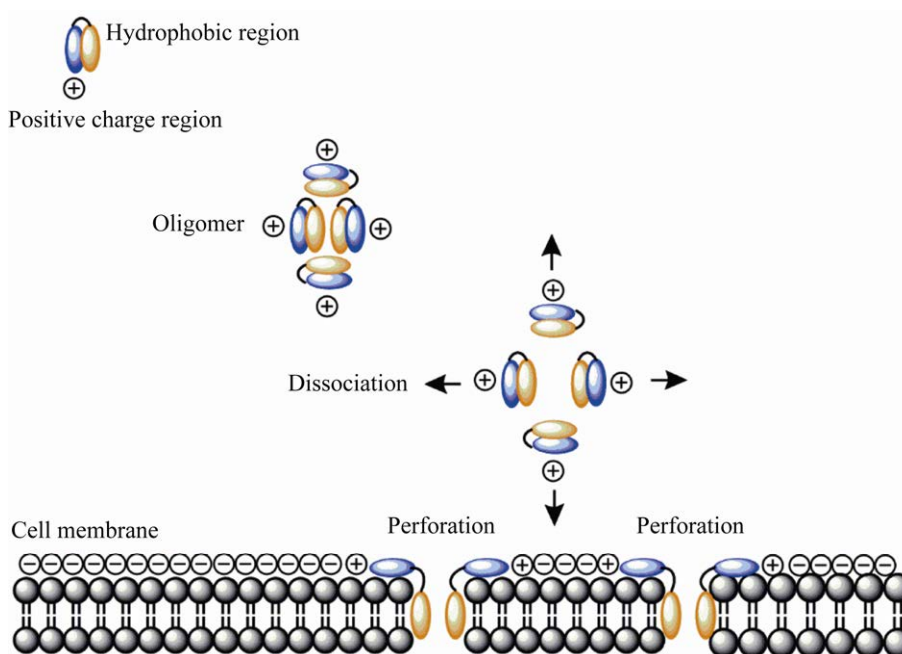


图 4 环状细菌素作用机制示意图(图片用 ChemBioDraw Ultra 14.0 软件绘制)

Figure 4 Mechanism schematic diagram of circular bacteriocin. Image are drawn using ChemBioDraw Ultra 14.0.

的抑制作用。研究发现, 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 enterocin AS-48 即可抑制单核增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 生物被膜的形成, 而 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  则可以完全抑制生物被膜的形成<sup>[34]</sup>。Velázquez-Suárez 等用 enterocin AS-48 处理金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 48 h 后, 发现 enterocin AS-48 不仅显著杀死生长在生物被膜上的细胞, 而且可以诱导影响生物被膜结构改变<sup>[35]</sup>。这表明环状细菌素可能是通过影响生物被膜的结构来实现对生物被膜合成的抑制作用。

另外, 环状细菌素还可以抑制芽孢的形成。研究发现, 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的环状细菌素 bacicyclicin XIN-1 和 cerecyclin 可以完全抑制蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的芽孢形成<sup>[1,15]</sup>。

## 4 应用前景

环状细菌素的应用研究为开发生物防腐剂

和对治耐药性病原菌提供了巨大的备选资源库。在生物防腐剂的开发方面, 环状细菌素以其良好的热稳定性、广泛的 pH 适应性和抗蛋白酶降解等特性, 在食品加工领域有着良好的应用前景。目前, 环状细菌素 enterocin AS-48 在控制肉类、奶制品、海洋食品以及蔬菜中的腐败菌, 如芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、梭菌属 (*Clostridium*) 和李斯特菌属 (*Listeri*) 等方面效果突出<sup>[5,15]</sup>。利用生物信息学的手段分析海量的细菌基因组数据, 发掘更多的环状细菌素, 将为开发安全、绿色的生物防腐剂提供备选资源<sup>[1,21]</sup>。

在环状细菌素应用的安全性方面, 一些环状细菌素, 如 bacicyclicin XIN-1 等的研究显示其没有溶血性等安全问题<sup>[1,15]</sup>。然而, 另一些环状细菌素, 如 enterocin NKR-5-3B 和 enterocin AS-48 等, 则表现出了一定的溶血性, 虽然达



到溶血性的浓度远小于最小抑菌浓度,但也给其应用带来了一些不确定性;进一步的研究发现,这些环状细菌素并不具有细胞毒性,特别是对肠道上皮细胞<sup>[36-37]</sup>。本课题组对1种源自贝莱斯芽孢杆菌的环状细菌素的研究同样发现,其在8×MIC的浓度下对小鼠红细胞表现出一定的溶血性,但在16×MIC浓度下仍未表现出对肠道上皮细胞 Caco-2 的细胞毒性。因此,食品防腐领域可能是环状细菌素较为直接的应用方面。

在对治耐药性病原菌方面,环状细菌素对一些常见的病原微生物,特别是具有抗药性的病原菌,如耐甲氧西林 *S. aureus*<sup>[35]</sup>,抑制效果达到了媲美抗生素的水平。研究表明 enterocin AS-48 对 *L. monocytogenes* 的抑菌活性可达 0.1 μg/mL<sup>[5]</sup>。本课题组从贝莱斯芽孢杆菌中分离的环状细菌素粗品抑菌活性也达到了 2 μg/mL。未来,随着传统抗生素的开发逐渐进入瓶颈期,环状细菌素为代表的细菌素以有别于传统抗生素的作用机制,成为开发新型抗菌药物的备选资源。

环状细菌素 N 末端和 C 末端首尾交联形成的环状结构,降低了线性肽的高度柔性和无序性的构象熵(conformational entropy),使其活性构象更加稳定<sup>[2]</sup>,从而使其在耐高温、pH 适应性方面具有天然优势。而环状结构由于缺乏外肽酶裂解位点,使其更耐蛋白质水解。目前发现的所有环状细菌素均表现出对蛋白酶一定的耐受性<sup>[20,24]</sup>。将环状细菌素作为宏观构架和载体分子,嫁接到现有的肽类抗菌药物开发中,将为功效和稳定性更强的药物开发提供分子骨架或载体。

尽管环状细菌素在食品防腐和对治耐药性病原菌方面潜力巨大。然而,涉及环状细菌素环化、切割、免疫和抑菌的分子机制方面的研究仍有待加强。(1) 在环状细菌素的合成方面,

特别是环化过程的机制是环状细菌素最具价值的研究热点。在基因簇外寻找参与环化作用的蛋白酶系,探讨其环化作用的酶促反应过程是其主要的研究方向;(2) 在环状细菌素前导肽的切割方面,由于缺乏保守序列,根据不同的环状细菌素特点探讨其各自前导肽的切割过程可能是其重要的研究方向;(3) 在环状细菌素的自我免疫方面,通过对免疫蛋白复合体的深入研究,可为防止环状细菌素耐受性菌株的出现和其规范化应用提供理论依据;(4) 在抑菌机理方面,通过对肽链中不同类型氨基酸残基进行定点突变,探讨不同突变体对抑菌活性和耐受性的影响,将为改善环状细菌素的性能提供指导依据,并对其在医药行业中用于对治耐药性细菌提供理论支撑。本课题组通过转录组测序,在产环状细菌素的贝莱斯芽孢杆菌中发现了1个类似于 subtilisin 的蛋白酶。该蛋白酶与 Toplak 等<sup>[30]</sup>提到参与肽体外环化的 subtilisin BPN,具有一定的相似性。因此,有望通过该基因的突变,研究其是否参与环状细菌素的环化过程。

随着新环状细菌素资源的不断发掘和新研究方法的建立,未来有望能够在深入揭示上述分子机理的基础上,促进环状细菌素在食品防腐和对治耐药性病原菌方面的规模化应用。

## 参考文献

- [1] Xin BY, Liu HL, Zheng JS, Xie CS, Gao Y, Dai DD, Peng DH, Ruan LF, Chen HC, Sun M. *In silico* analysis highlights the diversity and novelty of circular bacteriocins in sequenced microbial genomes. *mSystems*, 2020, 5(3): e00047–e00020.
- [2] Maqueda M, Sánchez-Hidalgo M, Fernández M, Montalbán-López M, Valdivia E, Martínez-Bueno M. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(1): 2–22.

- [3] Martin-Visscher LA, Gong XD, Duszyk M, Vederas JC. The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(42): 28674–28681.
- [4] Gálvez A, Maqueda M, Valdivia E, Quesada A, Montoya E. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1986, 32(10):765–771.
- [5] Burgos MJG, Pulido RP, Del Carmen López Aguayo M, Gálvez A, Lucas R. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(12): 22706–22727.
- [6] Kemperman R, Jonker M, Nauta A, Kuipers OP, Kok J. Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 5839–5848.
- [7] Wirawan RE, Swanson KM, Kleffmann T, Jack RW, Tagg JR. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology (Reading)*, 2007, 153(5): 1619–1630.
- [8] Martin-Visscher LA, Van Belkum MJ, Garneau-Tsodikova S, Whittall RM, Zheng J, McMullen LM, Vederas JC. Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4756–4763.
- [9] Sawa N, Zendo T, Kiyofuji J, Fujita K, Himeno K, Nakayama J, Sonomoto K. Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(6): 1552–1558.
- [10] Gabrielsen C, Brede DA, Salehian Z, Nes IF, Diep DB. Functional genetic analysis of the *GarML* gene cluster in *Lactococcus garvieae* DCC43 gives new insights into circular bacteriocin biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(5): 911–919.
- [11] Masuda Y, Ono H, Kitagawa H, Ito H, Mu FQ, Sawa N, Zendo T, Sonomoto K. Identification and characterization of leucocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(22): 8164–8170.
- [12] Scholz R, Vater J, Budiharjo A, Wang ZY, He YQ, Dietel K, Schwecke T, Herfort S, Lasch P, Borriß R. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(10): 1842–1852.
- [13] Perez RH, Ishibashi N, Inoue T, Himeno K, Masuda Y, Sawa N, Zendo T, Wilaipun P, Leelawatcharamas V, Nakayama J, Sonomoto K. Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of enterocin NKR-5-3B, a novel circular bacteriocin. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(2): 291–300.
- [14] Van Heel AJ, Montalban-Lopez M, Oliveau Q, Kuipers OP. Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin. *Microbial Genomics*, 2017, 3(10): e000134.
- [15] Xin BY, Xu HT, Liu HL, Liu S, Wang JJ, Xue JP, Zhang F, Deng SL, Zeng HW, Zeng X, Xu DY, Zhao Y, Li F, Wang GL. Identification and characterization of a novel circular bacteriocin, bacicyclin XIN-1, from *Bacillus* sp. Xin1. *Food Control*, 2021, 121: 107696.
- [16] Pandey N, Malik RK, Kaushik JK, Singroha G. Gassericin A: a circular bacteriocin produced by lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 29(11): 1977–1987.
- [17] Acedo JZ, Van Belkum MJ, Lohans CT, McKay RT, Miskolzie M, Vederas JC. Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(8): 2910–2918.
- [18] Borrero J, Kelly E, O'Connor PM, Kelleher P, Scully C, Cotter PD, Mahony J, Van Sinderen D. Plantaricyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NI326: purification, characterization, and heterologous production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(1): e01801–e01817.
- [19] Golneshin A, Gor MC, Williamson N, Vezina B, Van TTH, May BK, Smith AT. Discovery and characterisation of circular bacteriocin plantacyclin B21AG from *Lactiplantibacillus plantarum* B21. *Heliyon*, 2020, 6(8): e04715.
- [20] Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF, Diep DB. Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(22): 6854–6862.
- [21] Vezina B, Rehm BHA, Smith AT. Bioinformatic prospecting and phylogenetic analysis reveals 94

- undescribed circular bacteriocins and key motifs. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 77.
- [22] González C, Langdon GM, Bruix M, Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M, Rico M. Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *PNAS*, 2000, 97(21): 11221–11226.
- [23] Perez RH, Sugino H, Ishibashi N, Zendo T, Wilaipun P, Leelawatcharamas V, Nakayama J, Sonomoto K. Mutations near the cleavage site of enterocin NKR-5-3B prepeptide reveal new insights into its biosynthesis. *Microbiology (Reading)*, 2017, 163(4): 431–441.
- [24] Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Circular and leaderless bacteriocins: biosynthesis, mode of action, applications, and prospects. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2085.
- [25] Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M, Cruz V, Albert A. Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 334(3): 541–549.
- [26] Zheng S, Sonomoto K. Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(10): 4243–4253.
- [27] Van Belkum MJ, Martin-Visscher LA, Vederas JC. Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology*, 2011, 19(8): 411–418.
- [28] Mu FQ, Masuda Y, Zendo T, Ono H, Kitagawa H, Ito H, Nakayama J, Sonomoto K. Biological function of a DUF95 superfamily protein involved in the biosynthesis of a circular bacteriocin, leucocyclin Q. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 117(2): 158–164.
- [29] Cebrián R, Maqueda M, Neira JL, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Montalbán-López M. Insights into the functionality of the putative residues involved in enterocin AS-48 maturation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(21): 7268–7276.
- [30] Toplak A, Nuijens T, Quaedflieg PJLM, Wu B, Janssen DB. Peptilgase, an enzyme for efficient chemoenzymatic peptide synthesis and cyclization in water. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2016, 358(13): 2140–2147.
- [31] 张军, 王祺, 汤伟, 刘国瑞, 许向阳, 何增国. 细菌素对产生菌获得生存优势及其诱导合成条件的研究进展. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 923–932.
- Zhang J, Wang Q, Tang W, Liu GR, Xu XY, He ZG. Bacteriocinogeny, the way to acquire survival advantages through biosynthetic regulation: a review. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 923–932. (in Chinese)
- [32] Cebrián R, Martínez-Bueno M, Valdivia E, Albert A, Maqueda M, Sánchez-Barrena MJ. The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity. *Journal of Structural Biology*, 2015, 190(2): 162–172.
- [33] Kawai Y, Ishii Y, Arakawa K, Uemura K, Saitoh B, Nishimura J, Kitazawa H, Yamazaki Y, Tateno Y, Itoh T, Saito T. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2906–2911.
- [34] Caballero Gómez N, Abriouel H, Grande MJ, Pérez Pulido R, Gálvez A. Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 2012, 30(1): 51–58.
- [35] Velázquez-Suárez C, Cebrián R, Gasca-Capote C, Sorlózano-Puerto A, Gutiérrez-Fernández J, Martínez-Bueno M, Maqueda M, Valdivia E. Antimicrobial activity of the circular bacteriocin AS-48 against clinical multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics: Basel, Switzerland*, 2021, 10(8): 925.
- [36] Himeno K, Rosengren KJ, Inoue T, Perez RH, Colgrave ML, Lee HS, Chan LY, Henriques ST, Fujita K, Ishibashi N, Zendo T, Wilaipun P, Nakayama J, Leelawatcharamas V, Jikuya H, Craik DJ, Sonomoto K. Identification, characterization, and three-dimensional structure of the novel circular bacteriocin, enterocin NKR-5-3B, from *Enterococcus faecium*. *Biochemistry*, 2015, 54(31): 4863–4876.
- [37] Cebrián R, Rodríguez-Cabezas ME, Martín-Escolano R, Rubiño S, Garrido-Barros M, Montalbán-López M, Rosales MJ, Sánchez-Moreno M, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Marín C, Gálvez J, Maqueda M. Preclinical studies of toxicity and safety of the AS-48 bacteriocin. *Journal of Advanced Research*, 2019, 20: 129–139.

(本文责编 张晓丽)