

环脂肽类生物表面活性剂结构、功能及生物合成*

侯红漫^{1,2} 靳艳¹ 金美芳¹ 虞星炬¹ 张卫^{1**}

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)¹ (大连轻工业学院生物与食品工程学院 大连 116034)²

摘要: 环脂肽是由微生物产生的一类生物表面活性剂, 由亲水的肽环和亲油的脂肪烃链两部分组成, 具有独特的化学结构和生理功能。除具表面活性外, 环脂肽还具有抗真菌、抗细菌、抗病毒、抗肿瘤等生物活性, 具有广阔的应用前景, 但我国对这一领域的研究却刚刚起步。本文介绍了目前已知环脂肽的结构类型、结构与功能的关系、相关功能特点等, 着重介绍了环脂肽生物合成的非核糖体多酶体系及合成酶基因操纵子, 并对环脂肽的应用前景进行了展望。

关键词: 环脂肽, 生物表面活性剂, 生物合成

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0122-07

Structure, Function and Biosynthesis of Cyclic Lipopeptidic Biosurfactants*

HOU Hong-Man^{1,2} JIN Yan¹ JIN Mei-Fang¹ YU Xing-Yu¹ ZHANG Wei^{1**}

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)¹

(Dalian Institute of Light Industry, Department of Bioengineering and Food Science, Dalian 116034)²

Abstract: Cyclic lipopeptide is a kind of biosurfactant synthesized by microorganisms. Composed with hydrophilic peptide ring and hydrophobic fatty acid moieties, they have unique chemical structure and physiological function. In addition to the classical application as surfactant, they also have antibacterial, antifungal, antiviral and antitumor activity, which showed wide application perspective. But in our country, the studies to cyclic lipopeptide were rarely reported. This review explains the structural style, structure-function relationship, correlative functional characteristics of cyclic lipopeptide *et al.* The non-ribosomal multienzyme complex and synthetase gene operon of cyclic lipopeptidic biosynthesis were also discussed. Finally the future applications of cyclic lipopeptide were viewed.

Key words: Cyclic lipopeptide, Biosurfactant, Biosynthesis

生物表面活性剂是来源于生命有机体尤其是微生物的一类表面活性物质。生物表面活性剂在生物中具有溶解疏水性物质(如碳氢化合物、脂质、固醇等)以提高细胞同化作用, 使微生物在水不溶碳水化合物的环境中得以生存。像其它表面活性物质一样, 生物表面活性剂也是由一个或多个亲水性和疏水性基团组成, 亲水基可以是酯、羟基、磷酸盐、羧酸盐基团或者是糖基, 疏水基可以是蛋白质或者是脂肪酸链等。根据生物表面活性剂的结构特点, 可将其分为: 糖脂类、脂肽和脂蛋白类、磷脂和脂肪酸类、聚合表面活性剂类和微粒表面活性剂类等5大类。由于生物表面活性剂生产条件温和、低毒、生物可降解性和环境兼容等特点, 成为化学表面活性剂的优良替代品, 在工业化生产上具有潜在的应用优势, 可用于食品、化妆、制药工业、环境保护和节

* 国家“973”计划资助项目 (No. 2003CB716001)

** 通讯作者 Tel: 0411-4379069, E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

收稿日期: 2005-10-13, 修回日期: 2005-12-30

能工艺等方面。

在生物表面活性剂中,环脂肽类具有独特的化学结构和生理功能,已引起科学家的高度重视。环脂肽(CLPs)是由不同种类的细菌产生的,包括革兰氏阳性菌和阴性菌。产环脂肽微生物的高度多样性^[1]和环脂肽化学结构的明显不同说明,微生物产生环脂肽的作用是不同的,可能具有多重功效,目前对环脂肽的明确作用机理还不清楚^[2]。已报道的功能有:促进细菌聚集^[3];生物表面活性作用,促进疏水性物质(如碳水化合物、脂质、固醇等)的溶解,以提高细胞的同化作用^[4]等;在很多情况下,还具有对其他生物体的抗性作用^[5],既抑制植物病原菌、抗真菌、抗细菌、抗病毒和细胞毒素活性等。

目前已发现的环脂肽主要由枯草芽孢杆菌产生,包括:枯草菌脂肽类、伊枯草菌素类和 fengycin families。这些脂肽由7个或10个氨基酸组成肽环与脂肪酸链连接,脂肪酸链长度略有不同,枯草菌脂肽类的脂肪酸链长度为 C₁₃ ~ C₁₆,伊枯草菌素类为 C₁₄ ~ C₁₇, fengycins families 为 C₁₄ ~ C₁₈,每种脂肽类都由不同的类似物和异构体组成。枯草菌脂肽是人们了解最多的脂肽,有广谱抗菌活性,伊枯草菌素和 fengycin 有抗真菌活性。令人感兴趣的是,近些年来人们从海洋生物或海洋沉积物中分离出产不同环脂肽的微生物来,生物活性显著^[6,7]。

1 环脂肽类型及特点

环脂肽(CLPs)由两部分组成,即7~10个氨基酸组成的肽链和β-羟基脂肪酸链或β-氨基脂肪酸链,其中脂肪酸链上的羟基或氨基与肽链氨基酸上的羧基结合形成内酯键或酰胺键,使肽链闭合形成环状脂肽。

1.1 枯草菌脂肽(surfactin) 枯草菌脂肽由7个α-氨基酸残基和一个β-羟基脂肪酸残基组成,β-羟基脂肪酸链长度为 C₁₄ ~ C₁₅,和肽链以内酯键结合。根据肽链与β-羟基脂肪酸形成内酯环的位点氨基酸组成的不同,分为 surfactin A、B、C, surfactin-A 在7位点是L-亮氨酸, surfactin-B 是L-缬氨酸, surfactin-C 是L-异亮氨酸,结构如图1(1)。

枯草菌脂肽是由芽孢菌产生的高效脂肽类表面活性剂,可使水的表面张力由72降至27 mN/m, CMC 值为 7×10^{-5} M。此外具有显著的生物活性,除具有抗真菌和中等抗细菌活性外,还具有抑制纤维蛋白凝结、诱导脂质双分子层离子孔道的形成、抑制 cAMP、抑制血小板、脾细胞磷脂酶 A2 和抗病毒抗肿瘤活性。

科学家对环脂肽结构与功能之间的关系非常感兴趣,进行了一系列的实验研究。枯草菌脂肽(SF)结构变化对其表面活性有着明显的影响。SF 内酯键经皂化作用打开形成直链结构后,其表面活性下降近1/3,最低表面张力值由27上升到36 mN/m, CMC 值在 $7 \sim 8 \times 10^{-5}$ M 之间,说明三级结构受到破坏后,仍具有较高的表面活性,同时环状结构对于保持高表面活性也是非常重要的^[8]。线性 SF 经α-螺旋和β-折叠可分别降低和升高 SF 的临界胶束浓度 CMC 值。通常 SF 的多肽链上有几个疏水性氨基酸残基和二个酸性氨基酸残基,而表面活性较弱的 Iturin 中不含有羧基氨基酸,含有羟基氨基酸。为了解 SF 中 Asp、Glu 羧基的重要性,将 SF 羧基分别酰胺化、甲基化和氨基甲基磺酸化。SF 经酰胺化或甲基化后失去水溶性,溶解于70%乙醇中测定排油活性,活性提高20%。试验说明 SF 的带电性与表面活性无关,而氨基酸亲水侧链的局部结构才是关键,氨基酸羧基的作用是水溶性;而氨基甲基磺酸化后,虽然仍然具有水溶性,

但表面张力、排油活性剧烈下降，经分析很可能是分子内或分子间电排斥造成结构扭曲影响到表面活性^[8]。

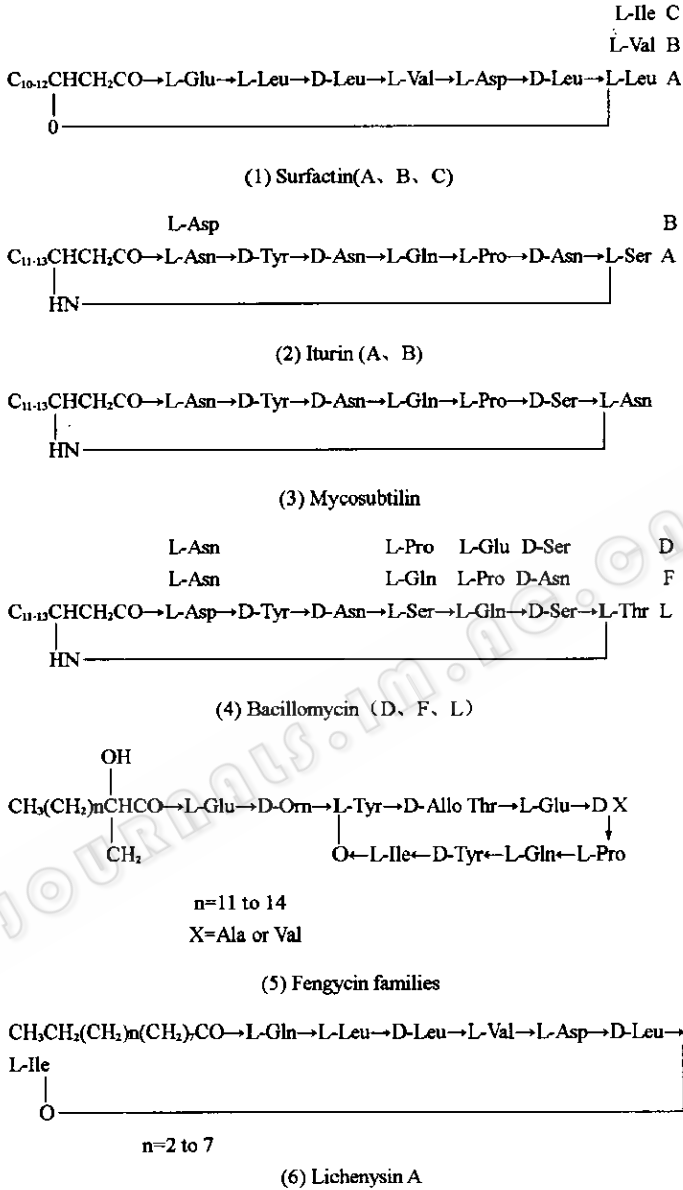


图1 枯草芽孢菌产生的环脂肽

1.2 伊枯草菌素 (Iturin)^[9] Iturin A 是最早发现具有抑菌活性的生物表面活性剂之一，是枯草芽孢杆菌产生的有效抗真菌的脂肽类表面活性剂。Iturin 在结构上与其它环脂肽最显著的区别是，具有 β-胺基脂肪酸链，而其他环脂肽由 β-羟基脂肪酸组成。肽环 1 位上天冬氨酰和天冬氨酸的变化，可将伊枯草菌素分成 IturinA 和 IturinB，结构见图 1 (2)。

Iturin A 表面活性低于枯草菌脂肽 (Surfactin)，但生物活性却很强。其通过小囊泡的形成和内膜颗粒聚集来干扰真菌细胞质膜功能，促进释放电解质、大分子物质以及降解磷脂，导致细胞死亡。Iturin A 已经被提出作为高效抗真菌试剂用于真菌病治疗，

动物和人体临床试验表明, Iturin A 低毒、低致敏性。同时可用于植物病原体的防治, 在植物病害的生物防治方面大有用武之地。

与 IturinA 结构极相识的是抗霉枯草菌素 (Mycosubtilin), 二者相比较肽环上 6 位与 7 位的氨基酸发生了置换, 而其他结构完全相同, 见图 1 (3)。

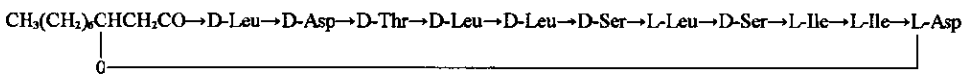
伊枯草菌素类的其他生物表面活性剂芽孢霉素 (Bacillomycin) 也具有 β -胺基脂肪酸, 根据肽环上氨基酸组成不同分为芽孢霉素 D、F、L^[10], 见图 1 (4)。其中芽孢霉素 D 和芽孢霉素 L 也有抗微生物活性。

1.3 Fengycin families^[11] Fengycin 是枯草芽孢杆菌产生的另一类环脂肽, 包括长度为 C₁₆ - C₁₉ 的 β -羟基脂肪酸链, 和 10 个氨基酸组成的肽链。与其它环脂肽不同的是, α -氨基酸除了 L-氨基酸还包括 4 种 D-氨基酸和鸟氨酸, 其中后八位氨基酸形成肽环。Fengycin 为同分异构体混合物, 变化主要在脂肪酸链长度和支链、肽环氨基酸的组成上。其中 FengycinA 与 B 区别主要是在 6 位的氨基酸不同, FengycinA 为 D-丙氨酸, FengycinB 为 D-缬氨酸, 结构见图 1 (5)。Fengycin 对丝状真菌有明显抑制活性, 且溶血活性低于伊枯草菌素类 (Iturins)。

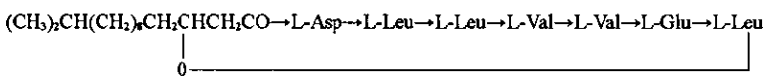
1.4 Lichenysin^[12] 由 *Bacillus licheniformis* 产生的 Lichenysin, 在结构上与枯草菌脂肽类似, 在环肽中 1 位的 L-谷氨酸由 L-谷氨酰胺取代, 见图 1 (6)。这种变化引起分子特性的明显改变。与枯草菌脂肽相比 Lichenysin 具有较高的表面活性, CMC 值显著降低, 由 220 MM (surfactin) 下降到 22 MM。由于谷氨酰胺取代了谷氨酸, 使侧链局部空间发生改变, 羧基对阳离子的亲和性明显增加, 因此 Lichenysin 也是很好的螯合剂。同时抑菌活性发生明显改变, 对 G+ 和 G-具有广泛的抑菌活性。

1.5 其它微生物产生的环脂肽 目前研究较多的是芽孢菌产生的环脂肽, 其种类丰富, 包括 surfactin A, B, C; Iturin A, B, Mycosubtilin, BacillomycinD, F, L; Fengycin families 类; 结构非常类似于 surfactin A 的 Lichenysin A 等环脂肽。近年来, 从其它微生物中发现并分离出的一些环脂肽具有很好的生物活性。

Arthrofactin 是从假单胞菌中分离出的一种高效环脂肽类生物表面活性剂, 由 β -羟基脂肪酸残基和 11 个 α -氨基酸残基组成, 结构见图 2 (1), 可使水的表面张力由 72 降到 24mN/m, CMC 值为 $1 \sim 7 \times 10^{-5} M^{[13]}$ 。在驱油性能上优于化学表面活性剂, 如 triton X-100、十二烷基磺酸钠等。



(1) Arthrofactin



(2) Antiadhesin (1)

图 2 其它微生物产生的环脂肽

从地下 2, 100m 处的 56℃ 地下热水中分离出的 *Bacillus licheniformis* 603 芽孢菌^[14], 产生环脂肽 Antiadhesin, 见图 2 (2)。Antiadhesin 又分为 I 与 II 型, II 与 I 的区别主要是 1 位、6 位的氨基酸形成甲酯, 为 Antiadhesin 二甲基酯。Antiadhesin I 在结构上又与 Surfactin-A 相似, 尤其肽环上氨基酸成分相同, 7 个肽都是由 Asp Leu Val Glu 组成, 不

同的是在排列上 Asp 为 N 端氨基酸, 以及 7 个氨基酸都是 L 构型。在性质上, Antiadhesin I 具有明显的抗黏附作用, 对 *Corynebacterium variabilis* 和 *Acinetobacter* sp. 有抑制活性。

2 环脂肽的生物合成机制

由于微生物产生的环脂肽为次级代谢产物, 通常产量很低, 同时微生物培养成本较高, 即使环脂肽的应用有着明显的优势, 但目前仍未大规模生产及应用。然而环脂肽合成酶及基因的研究, 有助于了解脂肽生物合成的机制, 进而通过构建基因工程菌改进生产工艺、降低生产成本, 在不久的将来可大规模生产环脂肽用于医药工业、食品工业和植物保护等方面。

2.1 枯草菌脂肽 (Surfactin) 合成酶操纵子^[15]

随着枯草芽孢杆菌基因组测序工作的开展, 对枯草菌脂肽 (Surfactin) 生物合成机制了解较清楚, 合成酶操纵子 *sfmA* 已得到公认。

枯草菌脂肽的生物合成最早由 Kluge 提出, 合成酶由多酶体系构成, 为非核糖体催化机制合成。该酶存在于细胞质中, 由 4 个单体酶组成, 其中 3 个单体酶已被纯化, E1A 分子量为 460 kD, E1B 分子量为 435 kD, E2 分子量为 160 kD, 而 E3 还没有完全纯化, 其分子量约 40 kD。体外试验表明, 脂肽合成第一步催化反应是与 E3 有关的酰基转移酶催化的, 形成最初的中间产物 β -羟酰-L-谷氨酸盐; E1A 与 E1B 通过一系列催化反应切开硫酯键, 同时完成转肽作用的反应, 催化最初的产物形成脂三肽及脂六肽, 最后 E2 催化 7 位氨基酸的连接。

枯草菌脂肽生物合成酶基因操纵子约 25 kb 大小, 命名为 *sfmA*, 它由 4 个开放阅读框架组成, 即 ORF1 (*sfmA-A*), ORF2 (*sfmA-B*), ORF3 (*sfmA-C*) 和 ORF4 (*sfmA-D*), 见图 3。前 3 个框架编码 3 个合成酶单体: E1A、E1B 和 E2, L-亮氨酸异构酶的两个核苷区位于 *sfmA-A* 和 *sfmA-B* 基因的 3' 端; 在 *sfmA-C* 基因的末端区域 (TE) 编码 I 型脂肪酸硫酸酯酶, 另一个 TE 区域编码哺乳动物细胞 II 型脂肪酸硫酸酯酶和同源性酶蛋白, 这一区域目前被认为与肽链的内酯化作用有关, 该区对于脂肽的生物合成不象第一个 TE 区域那

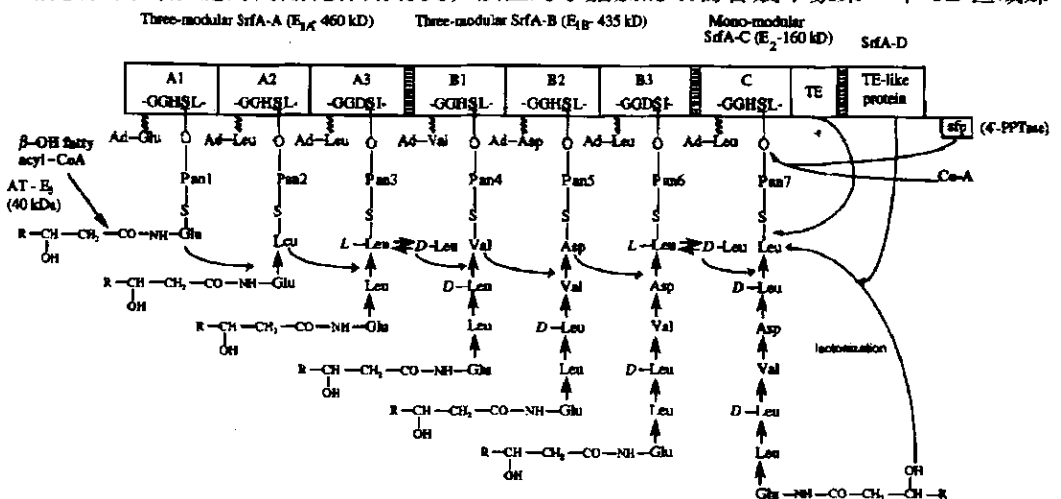


图 3 枯草菌脂肽 (Surfactin) 合成酶操纵子

未绝对比必要,而且肽链的内酯化被认为是非酶反应,可能由热力学反应控制。编码单体酶 E3 的基因还未确定,但不是 *srfA* 操纵子的组成部分。*Sfp* 基因大小 4 kb,位于 *srfA* 操纵子的下游,是枯草菌脂肽的生物合成必需的第 2 个基因,编码的 *sfp* 酶属于 4' PPT 酶系,功能是催化非核糖体肽和载铁蛋白前体的形成。

2.2 伊枯草菌素 (Iturin) 合成酶操纵子 在 Iturin 合成的多酶体系中,肽链的合成与其它枯草菌环脂肽相类似,为非核糖体催化机制,但合成酶操纵子的研究还不够成熟。首先是氨基酸的腺苷酸化,即氨基酸 + ATP——氨基酸-AMP + 焦磷酸盐,接着是氨基酸的酰胺化和肽链的延长。

枯草芽孢杆菌 RB14 的 Iturin A 合成酶操纵子,大小为 38kb,由 4 个开放阅读框架 (ORF) 组成, *ituA*, *ituB*, *ituC* 和 *ituD*^[16]。*ItuD* 与 *E. coli*、*B. subtilis* 168 中编码脂肪酸合成有关的丙二酰辅酶 A 转酰基酶基因具有同源性,可能与脂肪酸合成有关,当菌株缺失该基因时会使 Iturin A 合成明显不足,因此是 Iturin A 合成的重要酶。*ituA* 基因具有 3 个功能模块,编码的 *ituA* 与脂肪酸合成酶、氨基酸转移酶和肽合成酶都具有同源性,分子量为 449 kD,可能与 β -氨基脂肪酸及 β -氨基脂肪酸 - Asn 形成有关。*ituB*, *ituC* 上分别具有 4 个和 2 个氨基酸模块,两个基因分别编码分子量为 609 和 297-kD 肽合成酶。

由枯草芽孢杆菌产生的抗霉枯草菌素 (Mycosubtilin) 与 IturinA 结构上极相识^[17],只是肽环上 6、7 位的氨基酸发生了置换。将 IturinA 合成酶操纵子与 Mycosubtilin 合成酶操纵子进行比对, *ituA*, *ituB*, *ituD* 与 *fenF*, *mycA*, *mycB* 基因同源性分别为 79%, 79%, 79%。编码氨基酸序列的 *ituC* 与 *mycC* 同源性相对较低为 64%,说明二者编码的脂肽的氨基酸序列是不同的,而二者相对应的 Ser 腺苷酸化、Asn 腺苷酸化模块的同源性却较高,分别为 79%、80%,可能是基因内腺苷酸化区域发生了交换。

2.3 Fengycin 合成酶操纵子 关于 Fengycin 的生物合成酶的研究主要来自对 *B. subtilis* 168、b213、F29-3 脂肽合成酶的研究。*B. subtilis* 168 合成酶操纵子为 *pps* 操纵子^[18], *B. subtilis* b213、F29-3 为 *fen* 操纵子^[19,20],它们具有高度同源性。Fengycin 合成酶的 *pps* 操纵子组成,是通过欧洲 *B. subtilis* 168 基因组测序计划完成的测序工作。*Pps* 操纵子大小 37.8 kb,5 个开放阅读框架 (ORF) 包括 10 个氨基酸活化模块,编码了 5 个多功能酶 (即 PpsA-E) 催化 Fengycin 肽链的合成。在 *B. subtilis* b213 *fen* 操纵子中,合成酶 Fen1, Fen2 和 Fen3 分子量相近,约 286 kD,每个酶都具有两个活性模块,活化相对应的 1~6 位的氨基酸,酶 Fen1 活化谷氨酸和鸟氨酸形成 Fengycin 侧链;酶 Fen2 活化并合并酪氨酸和苏氨酸异构体;Fen3 合并谷氨酸、缬氨酸或丙氨酸。接下来是较大的 ORF4,编码具有 3 个活性模块的 Fen4 酶, Fen4 约 400 kD,活化脯氨酸、谷氨酸、酪氨酸;最后一个较小的 ORF5 编码酶 Fen 5,分子量约 140kD,活化异亮氨酸,推测还参与肽环的环化。Fen 1~4 在羧基端模块都有异构区,催化 2、4、6、9 位氨基酸转化为 D 型。

3 环脂肽类生物表面活性剂的应用^[23]

最初人们对环脂肽类生物表面活性剂感兴趣,主要是其具有高效、低毒、无污染等优点,可替代化学表面活性剂。近年来发现生物表面活性剂除具有表面活性的功能外,具有潜在的抗菌活性,包括:抗真菌、抗细菌、抗支原体 and 抗病毒等活性,此外

还可用作免疫调节分子、粘合剂、疫苗及基因治疗等方面。

由于生物表面活性剂生产成本较高,在价格上很难取代化学表面活性剂,大规模的推广应用受到限制。然而在制药和治疗方面,作为抗菌药物、抗真菌、抗病毒制剂,通常具有使用剂量低、活性高的特点,可以弥补高成本的问题。因此,这些生物分子在生物控制制剂、新药特药、化妆品和保健品生产方面具有很好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Moffitt M C, Neilan B A. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **191**: 159 ~ 167.
- [2] Ron E Z, Rosenberg E. *Environ Microbiol*, 2001, **3**: 229 ~ 236.
- [3] Lindum P, Anthoni U, Christophersen C, *et al.* *J Bacteriol*, 1998, **180**: 6384 ~ 6388.
- [4] Rosenberg E, Ron E Z. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999, **52**: 154 ~ 162.
- [5] Cameotra S S, Makkar R S. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, **7**: 262 ~ 266.
- [6] Natalie I K, Tatyana A K, Elena P I, *et al.* *Biotechnol*. 2002, **4**: 179 ~ 188.
- [7] Christian T P, Joachim V, Christopher W, *et al.* *Biotechnol*, 2003, **5**: 424 ~ 434.
- [8] Masaaki M, Yoshihiko H, Tadayuki I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1488**: 211 ~ 218
- [9] Francois A, Philippe J, Magali D. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **27**: 749 ~ 754
- [10] Moyne A L, Shelby R, Cleveland T E, *et al.* *J Appl Microbiol*, 2001, **90**: 622 ~ 629
- [11] Lin T P, Chen C L, Fu H C, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1730**: 159 ~ 164
- [12] Grangemard I, Wallach J, Maget D R, *et al.* *Appl Biochem Biotechnol*, 2001, **90**: 199 ~ 210.
- [13] Amada K, Haruki M, Imanaka T, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1478**: 201 ~ 210.
- [14] Stanislav G B, Tatiana A R, Stanislav E E, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, **1634**: 107 ~ 115
- [15] Peypoux F, Bonmatin J M, Wallach J. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 553 ~ 563
- [16] Kenji T, Takanori A, Makoto S. *Cloning J Bacteriol*, 2001, **183**: 6265 ~ 6273
- [17] Duitman E H, Hamoen L W, Rembold M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1999, **96**: 13294 ~ 13299.
- [18] Valentina T, Alessandra M A, Michela Z, *et al.* *Microbiology*, 1997, **143**, 3443 ~ 3450.
- [19] Sigrid S, Dirk V, Frank L, *et al.* *Chemistry & Biology* January, 1999, **6**: 31 ~ 41.
- [20] Sigrid S, Joachim V. *Journal of Chromatography B*, 2000, **737**: 267 ~ 275.
- [21] Cao S, Yang Y, Lee J, *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005, **15**: 2595 ~ 2599.
- [22] Michail M Y, Andrea K, Tatiana N S, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998, **1399**: 141 ~ 153.
- [23] Singh P, Cameotra S S. *Trends in Biotechnology*, 2004, **22**: 142 ~ 146.