

Brevibacillus brevis HOB1 所产脂肽的 分离纯化和鉴定

王吉 Namir I A Haddad 杨世忠 牟伯中*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 应用化学研究所 上海 200237)

摘要: 用常压反相色谱对从短芽孢杆菌 HOB1 发酵液中提取到的脂肽类生物表面活性剂进行了分离纯化, 并用 HPLC 制备了其中的一个化合物。经电喷雾质谱分析得到该化合物的相对分子量为 1035.7 D, GC/MS 的分析结果显示其脂肪酸部分为 C₁₅ β-羟基脂肪酸, 由 PITC 柱前衍生法测得该化合物的氨基酸组成比例为: Asp:Glu:Val:Leu = 1:1:1:4。结果显示该脂肽的结构与表面活性素 (C₁₅ surfactin) 类似。实验表明, 除芽孢杆菌属外, surfactin 系列脂肽还能为短芽孢杆菌属所产生。
关键词: 短芽孢杆菌, 生物表面活性剂, 脂肽, 分离纯化, 鉴定

Isolation, Purification and Identification of a Lipopeptide Produced by *Brevibacillus brevis* HOB1

WANG Ji Namir I A Haddad YANG Shi-Zhong MU Bo-Zhong*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering and Institute of Applied Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The lipopeptide samples were purified by normal reverse-phase column chromatography after isolated from the cell free broth of *Brevibacillus brevis* HOB1. A lipopeptide was separated from these samples by preparative HPLC, and determined to have a molecular weight of 1035.7 D by ESI-MS. The fatty acid part was identified to be C₁₅ β-hydroxyl fatty acid by GC/MS. A quantitative analysis of the PITC-derivated amino acids of the lipopeptide by HPLC gave the following molar ratios: Asp 1, Glu 1, Val 1, Leu 4. All the results indicated that the lipopeptide has a structure similar to C₁₅ surfactin. This study revealed that surfactin series lipopeptides can be produced by *Brevibacillus* genus in addition to *Bacillus* genus.

Keywords: *Brevibacillus brevis*, Biosurfactant, Lipopeptide, Isolation, Identification

微生物产生的脂肽是一类重要的生物表面活性剂。它不仅具有优良的表面活性, 还具有特殊的生物活性, 如抗细菌、抗真菌、抗凝血、溶血、促进脂膜中离子通道的形成、抗病毒和抗肿瘤等活性^[1]。

因此, 脂肽既可以作为一种低毒、环境友好的表面活性剂应用到石油开采、环境治理、食品、化妆品、农业等众多工业领域中, 也可以作为一种药物用于治疗疾病。

脂肽类化合物一般由一个长链脂肪酸和一个多肽链组成,通过内酯键或酰胺键形成环状结构或线性结构。其中组成脂肽的肽链多为七元肽或十元肽,组成脂肽的长链脂肪酸为链长为十几个碳的 β -羟基脂肪酸或 β -氨基脂肪酸。目前发现的脂肽主要有表面活性素(Surfactin)、地衣素(Lichenysin)、伊枯草菌素(Iturin)、丰原素(Fengysin)等几个系列,并多为芽孢杆菌属所产生。本实验室从油田产出液中分离到一株脂肽类生物表面活性剂产生菌,经16S rRNA基因鉴定为短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)^[2],本文报道该菌所产脂肽的分离纯化和鉴定。

1 材料与方 法

1.1 菌株及培养

菌株HOB1分离自油田产出液,经16S rRNA基因鉴定为短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*),并鉴定为产脂肽类生物表面活性剂,由本实验室保存。种子培养基和发酵培养基配方为(g/L):蔗糖10.0,酵母提取物0.5, NH_4NO_3 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7.0, CaCl_2 0.01, $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ 0.01和1 mL/L的微量元素溶液[配方为(g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.116, H_3BO_3 0.232, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.41, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.008, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.008, $[\text{NH}_4]_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.022, ZnSO_4 0.174]。

发酵在15 L的发酵罐中进行,装液量为10 L,30°C下培养72 h,搅拌转速为200 r/min,通气量为1.0 vvm。

1.2 脂肽粗品的分离提取

将发酵液5000 r/min离心30 min除去菌体,上清液用6 mol/L HCl调至pH 2.0,放置于4°C冰箱中过夜。然后5000 r/min离心20 min收集沉淀,用稀NaOH溶液调至pH中性后,进行冷冻干燥。用甲醇浸提干燥物,旋转蒸发去除溶剂,得脂肽粗提物。

1.3 常压反相色谱纯化

常压柱为ODS C_{18} 填充的反相柱(50 μm , 3.0 cm \times 10 cm),在220 nm波长下在线检测吸光度。色谱柱先用100%的甲醇冲洗至平衡,再用70%的甲醇洗至平衡。量取3 mL样品溶液加到柱上方,先用70%的甲醇洗脱至220 nm下吸光度平衡,然后再用100%的甲醇洗脱至220 nm下吸光度平衡。洗脱流速为2 mL/min,洗出液按峰合并为各个组分。然后用薄层析色谱对各个组分进行初步鉴定^[3]。

1.4 高效液相色谱分析和分离

分析条件:柱型, Hypersil ODS C_{18} (5 μm , 4.6 mm \times 25 cm);流速, 1 mL/min;柱温, 30°C;检测波长, 214 nm;流动相 A, 乙腈;流动相 B, 水(含0.05% TFA, V/V)。洗脱程序: 0 min, 60% A; 5 min, 60% A; 10 min, 65% A; 30 min, 75% A; 40 min, 100% A。

制备条件:柱型, HiQ sil C_{18}W (5 μm , 21.2 mm \times 25 cm);流速, 13 mL/min;柱温, 30°C;检测波长: 214 nm;流动相 A, 乙腈;流动相 B, 水(含0.05% TFA, V/V)。洗脱程序: 0 min, 85% A; 10 min, 85% A; 60 min, 100% A。按30 s/管收集洗脱液。

1.5 电喷雾质谱

脂肽的电喷雾质谱分析在阳离子条件下进行, Capillary 电压、Sample cone 电压和 Extraction cone 电压, 分别为3 kV、100 V和6 V。所用仪器为英国Micromass公司的LCT TOF-MS质谱仪。

1.6 脂肪酸分析

在 ϕ 5 mm \times 10 cm的玻璃管(一端已封口)中加入1 mg脂肽,再加入6 mol/L的盐酸1 mL。然后火焰封口另一端,90°C下水解18 h。将水解液转移到20 mL的玻璃试管中,甲醇洗涤酸解管若干次并入同一试管中,然后向试管中加入重蒸水至5 mL。在酸解液加入1 mL乙醚萃取3次,合并3次萃取液。萃取液用重蒸水洗2次,然后吹干乙醚。在吹干后的脂肪酸中加入10%(V/V)的硫酸甲醇溶液,在55°C下进行酯化反应6 h。反应结束后,加入1:3体积的重蒸水,混匀后用乙醚萃取(每次1 mL,共3次),合并乙醚萃取液并用重蒸水洗2次。然后吹干乙醚并加入500 μL 甲醇,取1 μL 进样进行GC/MS(美国Agilent公司的6890 GC-5975 MSD气质联用仪)分析。GC/MS条件: HP-5MS 石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm , 5%苯基甲基硅氧烷填充),载气为高纯氦气(99.999%),流速为1.0 mL/min,进样口温度为250°C,升温程序:起始柱温为120°C,保持3 min,以8°C/min升温至260°C,保持5 min。质谱条件: EI 离子源,离子源温度230°C,四极杆温度150°C。

1.7 氨基酸分析

将上述经乙醚萃取过的酸水解液用空气吹干,然后加入1 mL重蒸水,混匀。然后用异硫氰酸苯胺(Phenyl isothiocyanate, PITC)柱前衍生化法^[4]对其进

行氨基酸组成的测定。方法如下:

衍生化操作: 取 30 μL 上述样品于 2 mL 离心管中, 依次加入 170 μL 重蒸水、100 μL 0.1 mol/L PITC 的乙腈溶液和 100 μL 1 mol/L 三乙胺的乙腈溶液, 混合物漩涡振荡 1 min, 静置 40 min。然后向混合物中加入 400 μL 正己烷, 漩涡振荡 2 min, 静置 5 min。用注射器小心吸取下相, 并用 0.22 μm 的有机滤膜过滤。取 20 μL 进样 HPLC 进行分析。

色谱条件: Hypersil ODS C_{18} 色谱柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), 柱温 38 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 254 nm。流动相 A: 乙腈-水(体积比为 4:1)溶液; 流动相 B: 0.1 mol/L 醋酸钠-乙腈(体积比为 97: 3)溶液。线性梯度洗脱程序: 0 min, 0% A; 13 min, 7% A; 23 min, 23% A; 29 min, 35% A; 35 min, 40% A; 40 min, 100% A; 45 min, 100% A; 47 min, 0% A。流动相流速 1.0 mL/min。

摩尔浓度均为 0.2 mmol/L 的 L-Asp、L-Glu、L-Val、L-Ile、L-Leu 的混合溶液为标准氨基酸溶液。重蒸水为空白对照。柱前衍生化反应和 HPLC 操作条件与前面一致。

2 结果与讨论

2.1 脂肽的纯化与制备

Brevibacillus brevis HOB1 的发酵液经离心除菌、酸沉、干燥和有机溶剂浸提等步骤获得脂肽的粗品。然后用常压反相柱色谱对其进行纯化, 洗脱曲线如图 1。图 1 显示了 a、b、c 三个峰, 其中 a 峰为 70% 甲醇洗脱出来的, b 峰和 c 峰是用 100% 甲醇洗脱出来的。用薄层层析色谱结合茚三酮显色的方法对这三个组分分别进行初步的鉴定。由于脂肽分子所含的肽链呈闭合状态, 它的茚三酮显色反应应该呈阴性, 而在脂肽酸解后, 肽键被打断, 氨基游离出来, 此时的茚三酮显色反应则呈阳性。b 组分恰好符合脂肽的显色规律, 因此初步确定 b 为含脂肽组分。

HPLC 分析显示 b 组分是一组脂肽类化合物的混合物, 为了得到脂肽的单个组分, 用制备型 HPLC 对其进行了分离, 结果如图 2 所示。图 2 中的 S 峰分离效果最好, 含量较高, 因此收集制备了 S 峰, 后面将对其做进一步的鉴定。

2.2 脂肽的鉴定

图 3 为 S 组分的电喷雾质谱分析, 图中显示的

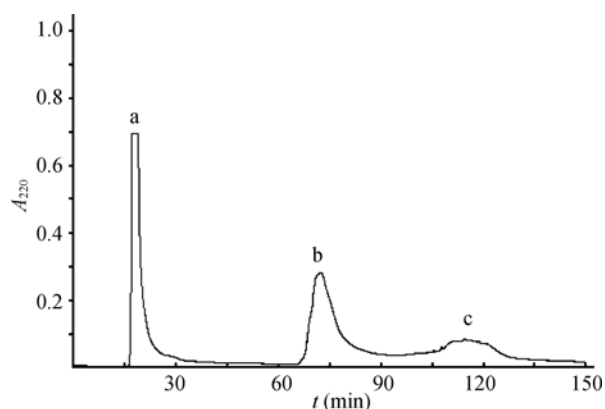


图 1 反相柱色谱的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve in reverse-phase column chromatography

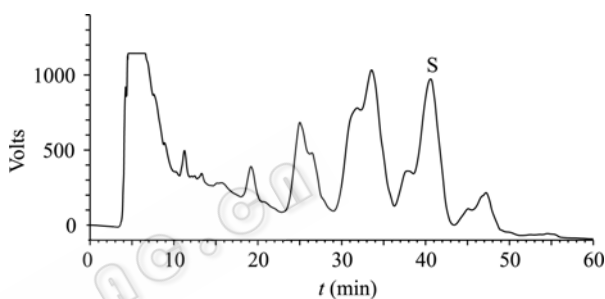


图 2 脂肽的制备型高效液相色谱分离谱图

Fig. 2 Separation profile of lipopeptide by prep HPLC

m/z 为 1036.7、1058.7、1072.7 的峰恰好分别与准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 相对应。由此判断 S 的分子量为 1035.7 D。

将脂肽 S 用酸水解后对其脂肪酸部分进行了分析。从气相色谱(图 4 A)可知, P_1 和 P_2 为样品中的主要成分, 其质谱鉴定结果如图 4 B 和 4 C 所示。质谱图中的基峰 103 为典型的 β -羟基脂肪酸甲酯的特征峰, 即 $[\text{CHOHCH}_2\text{COOCH}_3]^+$ 碎片离子。222、254、271 等峰分别对应于 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$ 、 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 、 $[\text{M}-\text{H}]^+$, 据此可得到脂肪酸甲酯的分子量为 272, 那么此脂肪酸甲酯为 C_{15} β -羟基脂肪酸甲酯。 P_1 和 P_2 的质谱图近乎一致, 但不难发现两者峰 43 和峰 57 的丰度比有着明显的差异, 杨世忠等^[5]报道了根据 I_{43}/I_{57} (即峰 43 和峰 57 的丰度比)可以鉴定出 β -羟基脂肪酸甲酯的支链类型。根据这种方法, 得到 P_1 和 P_2 分别为异构(*iso*)和反异构(*anteiso*)类型的 C_{15} β -羟基脂肪酸甲酯。

图 5 显示的是对 S 酸水解产物的水溶性部分进行的氨基酸分析结果。对照标准氨基酸谱图(图 5 A)和空白对照(图 5 C), 不难得出 S 酸水解产物的样品

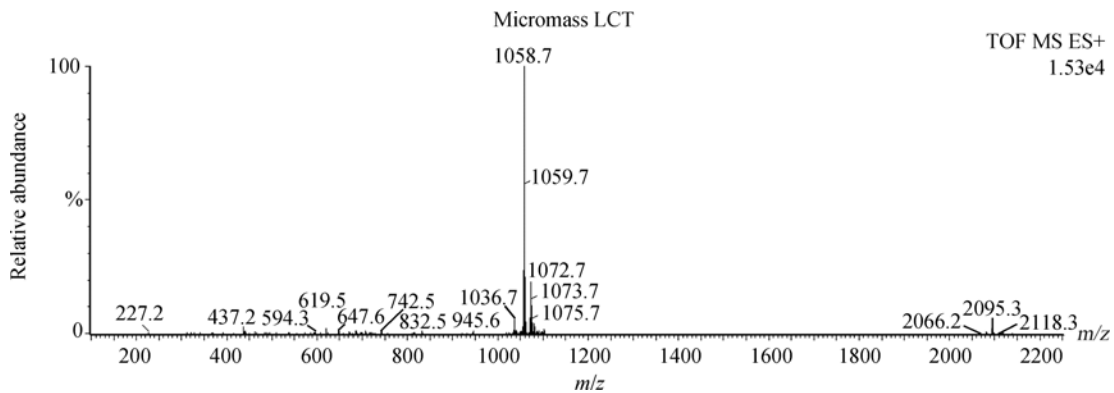


图3 S组分的电喷雾质谱谱图

Fig. 3 The ESI-MS spectrum of fraction S

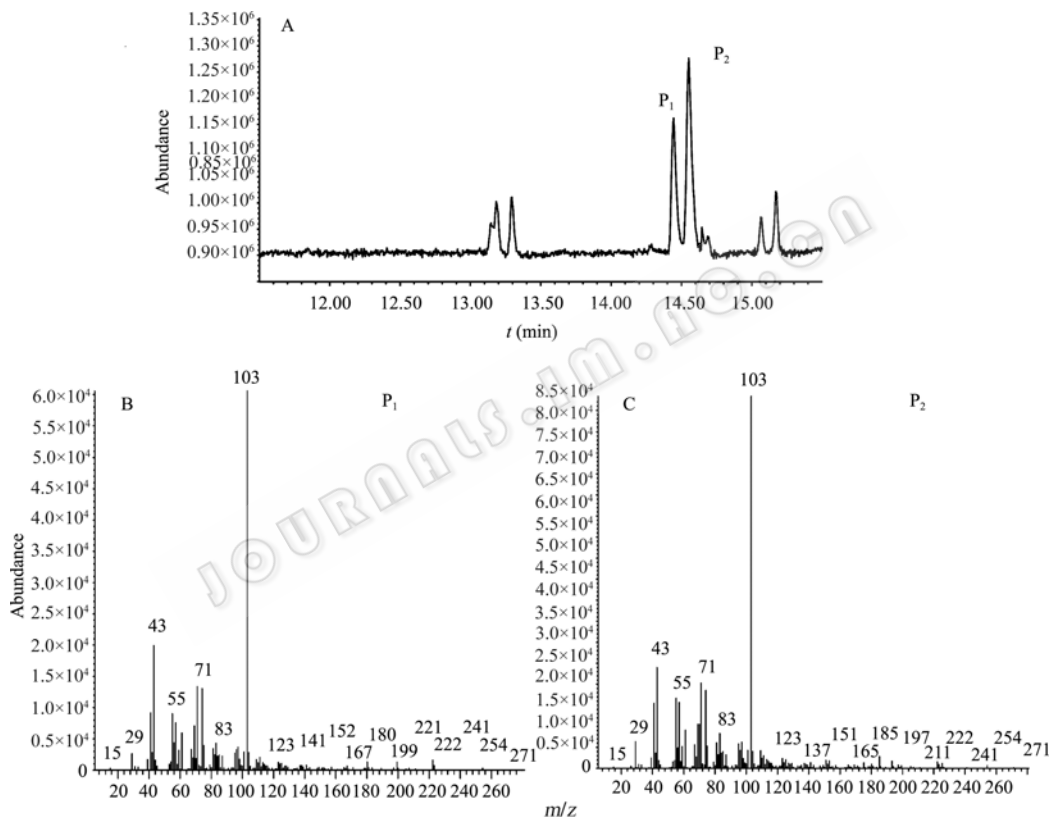


图4 脂肪酸部分的GC/MS色谱和质谱图

Fig. 4 The chromatograph and MS spectrum of fatty acids by GC/MS

Note: A: Gas chromatogram of fatty acids; B, C: EI mass spectra of P₁ and P₂.

(图5B)中含有 Asp、Glu、Val、Leu 等氨基酸。通过峰面积的计算,得到水解样品中所含 Asp、Glu、Val、Leu 的摩尔比约为 1:1:1:4。

天然的 Surfactin、Lichenysin、Iturin、Fengysin 等脂肽一般都由一组相对分子量相差 14 D(即-CH₂-)的同系物组成。其中, Surfactin 有 994(或 993.6, 取四舍五入,下同)、1008、1022、1036、1050 等系列的分子量^[6], Lichenysin 有 993、1007、1021、1035、

1049 等^[7], Iturin 有 1042、1056、1070、1084、1098、1112 等^[8,9], Fengysin 有 1478、1492、1506 等^[10]。在脂肪酸部分上, Surfactin、Lichenysin、Fengysin 为 β-羟基饱和脂肪酸, Iturin 为 β-氨基饱和脂肪酸。此外,它们在肽链部分上的结构也互不相同。

Surfactin 是脂肽中较常见的一类,多由枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)产生,此外地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)

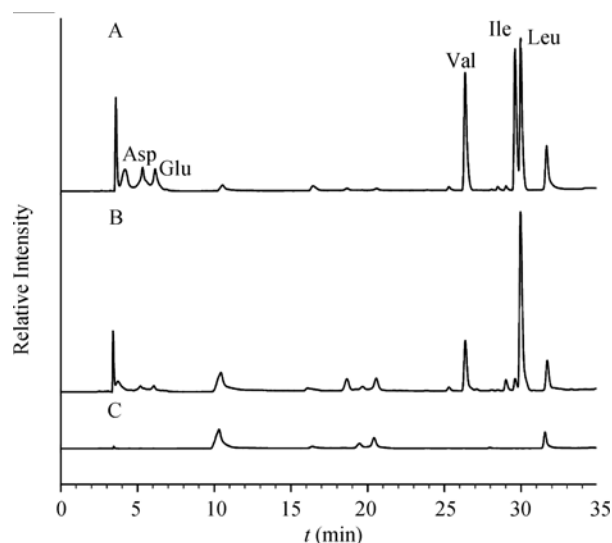


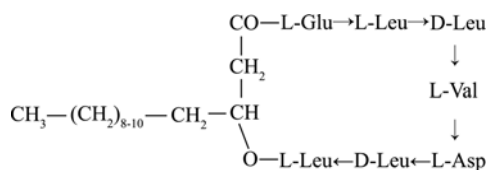
图 5 氨基酸的 HPLC 色谱图

Fig. 5 The chromatograph of amino acids determined by HPLC

Note: A: Standard amino acid; B: Hydrolysate of fraction S; C: Negative control.

也能产生 Surfactin, 它是目前发现最有效的生物表面活性剂之一。Surfactin 的肽链部分的氨基酸序列一般为: N-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-C^[11,12], 但 2、4、7 位也可被同类的疏水性氨基酸替代^[13-16]。脂肪酸部分为链长从 C₁₃ 到 C₁₅ 的 β-羟基饱和脂肪酸, 每个链长主要存在两种构型, C₁₃ 和 C₁₅ 有异构(*iso*)和反异构(*anteiso*), C₁₄ 有正构(*normal*)和异构^[17,18]。

本实验中分离到的脂肽 S 从分子量看, 应属于 Surfactin 系列脂肽, 并且其脂肪酸部分恰好鉴定为 C₁₅ β-羟基脂肪酸, 氨基酸组成也与 Surfactin 相同。根据分子量、脂肪酸结构、氨基酸组成三者信息, 我们判定脂肽 S 为 C₁₅ Surfactin 结构类似物。



3 结论

本文从短短芽孢杆菌 HOB1 的发酵液中分离制备了一个脂肽化合物, 利用 ESI-MS、GC/MS 和 HPLC 等方法分别分析了它的分子量、脂肪酸结构和氨基酸组成, 结果显示, 短短芽孢杆菌 HOB1 产生的脂肽由 β-羟基脂肪酸与七元肽组成, 属于

C₁₅ Surfactin 结构类似物。本实验表明, 除芽孢杆菌属外, Surfactin 系列脂肽还能为短芽孢杆菌属所产生。

参考文献

- [1] Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, *et al.* Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother*, 2006, **57**(4): 609-618.
- [2] Haddad NIA, Wang J, Mu BZ. Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain, *Brevibacillus brevis* HOB1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, **35**(12): 1597-1604.
- [3] 吕应年, 杨世忠, 牟伯中. 脂肽的分离纯化与结构研究. *微生物学通报*, 2005, **32**(1): 67-73.
- [4] 杨菁, 孙黎光, 白秀珍, 等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生反相高效液相色谱法同时测定 18 种氨基酸. *色谱*, 2002, **20**(4): 369-371.
- [5] Yang SZ, Wei DZ, Mu BZ. Determination of the structure of the fatty acid chain in a cyclic lipopeptide using GC-MS. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, **70**(3): 519-523.
- [6] Kowall M, Vater J, Kluge B, *et al.* Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J Colloid Interface Sci*, 1998, **204**(1): 1-8.
- [7] Grangemard I, Bonmatin JM, Bernillon J, *et al.* Lichensins G, a novel family of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus licheniformis* IM 1307: production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry. *J Antibiot (Tokyo)*, 1999, **52**(4): 363-373.
- [8] 陈华, 袁成凌, 蔡克周, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 产生的脂肽类抗生素-iturin A 的纯化及电喷雾质谱鉴定. *微生物学报*, 2008, **48**(1): 116-120.
- [9] Vater J, Kablitz B, Wilde C, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(12): 6210-6219.
- [10] Vanittanakom V, Loeffler W, Koch U, *et al.* Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J Antibiot (Tokyo)*, 1986, **39**(7): 888-901.

- [11] Kakinuma A, Hori M, Isono M, *et al.* Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptide-lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agric Biol Chem*, 1969, **33**: 971–972.
- [12] Hosono K, Suzuki H. Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase. II. Amino acid sequence and location of lactone linkage. *J Antibiot (Tokyo)*, 1983, **36**(6): 674–678.
- [13] Peypoux F, Bonmatin JM, Labbe H, *et al.* [Ala4] surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *FEBS Journal*, 1994, **224**(1): 89–96.
- [14] Peypoux F, Bonmatin JM, Labbe H, *et al.* Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7] surfactin. *Eur J Biochem*, 1991, **202**: 101–106.
- [15] Grangemard I, Peypoux F, Wallach J, *et al.* Lipopeptides with improved properties: Structure by NMR, purification by HPLC and structure–activity relationships of new isoleucyl-rich surfactins. *J Pept Sci*, 1997, **3**(2): 145–154.
- [16] Bonmatin JM, Labbé H, Grangemard I, *et al.* Production, isolation and characterization of [Leu4]-and [Ile4] surfactins from *Bacillus subtilis*. *Lett Pept Sci*, 1995, **2**(1): 41–47.
- [17] Kakinuma A, Sugino H, Isono M, *et al.* Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. *Agric Biol Chem*, 1969, **33**: 973–976.
- [18] Hosono K, Suzuki H. Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. I. Purification, physicochemical properties and structures of fatty acid residues. *J Antibiot (Tokyo)*, 1983, **36**(6): 667–673.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内,研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏),大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“*et al.*”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. *微生物实验教程*. 北京: 北京大学出版社, 2000, p.4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞等. *核农学进展*. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2009-00-00 ; 接受日期: 2009-00-00

(下转 p.1149)