

枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的表面活性素 变异体的纯化和鉴定

高学文¹ 姚仕义¹ Huong Pham² Joachim Vater² 王金生¹

(¹南京农业大学 农业部病虫害监测与治理重点开放实验室 南京 210095)

(²柏林理工大学生物化学和分子生物学研究所 柏林 10587)

摘 要 利用 6 mol/L HCl 沉淀枯草芽孢杆菌 B2 菌株的去细胞培养液,甲醇抽提获得脂肽类抗生素粗提物,过 Sephadex LH-20 层析柱获得粗纯化物,经 MALDI-TOF-MS 检测表明 B2 菌株仅含有表面活性素一种脂肽类抗生素。利用 HPLC SMART SYSTEM 将粗纯化物过 μ RPC C2/C18 层析柱对表面活性素变异体进行分离后获得纯化物。经 MALDI-TOF-PSD-MS 对纯化物的结构分析表明,B2 菌株的表面活性素变异体由 13、14 和 15 个碳原子的脂肪酸链以及 L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu 七环肽组成。

关键词 枯草芽孢杆菌 基质协助激光解吸/离子化-飞行时间质谱 MALDI-TOF 源后衰变质谱 表面活性素变异体 纯化 鉴定

中图分类号 S476 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2003)05-0647-06

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)产生的脂肽类抗生素有表面活性素(Surfactin)、伊枯草菌素(Iturins)和 Fengycin 3 大类。表面活性素由于其卓越的表面活性剂性质最初由 Arima 等鉴定和命名^[1],其化学结构由 Kakinuma 等^[2]确定为含有 7 个 α -氨基酸和具有 13、14 或 15 个碳原子的 β -羟基脂肪酸构成的大环内酯型脂肽类化合物,被称为标准表面活性素(Standard surfactin)。此后表面活性素家族的成员不断增加,分别来源于天然的、生物合成的或基因工程产生的肽链或脂肪酸链的变异体^[3]。

表面活性素不仅是高活性的生物表面活性剂,同时也是具有广泛用途的生物活性物质。它表现出抗病毒^[4,5]、抗肿瘤^[6]、抗支原体^[7]、抗真菌^[8]活性和一定程度的抗细菌^[9]活性。它的作用机制包括其能够与细胞膜上的磷脂(Phospholipids)互作引起离子通道的形成^[10],整合一、二价阳离子^[11]从而抑制多种酶类如 Cyclic AMP phosphodiesterase^[12]和胞质 PLA₂^[13]的活性。而膜活性的表面活性素还可以与病毒脂膜(Virus lipid membrane)互作来破坏病毒脂膜和衣壳^[4],从而具有抗病毒活性。由此可见,表面活性素在医学和农业生物防治领域具有广阔的应用前景,是很有希望开发的环保型生物源农药。

枯草芽孢杆菌 B2 菌株是 90 年代本实验室王金生教授开发的“B”系列(*Bacillus subtilis*)生防菌之一,多年来用于防治大白菜软腐病和油菜菌核病,具有很好的防治效果。明确 B2 菌株产生的脂肽类抗生素种类是进一步开发和利用该类生防菌剂的基础,本研究确定了 B2 菌株产生的脂肽类抗生素种类,并对表面活性素变异体进行了纯化和鉴定。

基金项目 国家自然科学基金(30170623)

作者简介 高学文(1965-)男,副教授,博士,从事植物与病原物互作分子机理和植物病害生物防治研究。Tel: 86-25-4396072; E-mail: gaouxuew@yahoo.com

收稿日期 2002-12-20,修回日期:2003-06-30

1 材料和方法

1.1 材料

本研究使用的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B2 菌株为本实验室保存, OKB105 来自于文献[4]。Sephadex LH-20 葡聚糖和 μ RPC C2/C18 SC2.1/10 层析柱购于 Pharmacia Biosystems 公司(Freiburg, FRG)。甲醇、乙酸和乙腈等试剂皆为分析纯或色谱纯。表面活性素纯品由德国柏林理工大学 Dr. Joachim Vater 实验室提供。

1.2 菌体培养和脂肽类化合物的粗制备

枯草芽孢杆菌 B2 和 OKB105 菌株的培养使用 Landy 培养基^[14]。菌株在含 500mL Landy 培养基的 2L 三角瓶中, 在 33℃ 180 r/min 条件下培养 30h。培养结束后, 将培养物离心去除菌体细胞, 上清液加入 6mol/L HCl 调 pH 至 2.0, 然后轻微搅动 2h 或过夜。离心收集沉淀, 加入甲醇后用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 再用甲醇抽提两次并将抽提液合并。将表面活性素甲醇粗提物过 Sephadex LH-20(2cm × 50cm)层析柱, 收集表面活性素组分即为粗纯化物。放入 -20℃ 冰箱备用。

1.3 表面活性素变异体的分离和浓度确定

已过 LH-20 层析柱的粗纯化物, 再利用 HPLC SMART SYSTEM 过 μ RPC C2/C18 层析柱来分离表面活性素变异体。梯度洗脱, 洗脱液 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, B 为含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液, 历经梯度洗脱的条件是 0% ~ 100% B 液 55min, 共收集 48 管, 每管 100 μ L, 检测波长为 210nm。表面活性素浓度的测定是将待测样品和配制成浓度为 1mg/mL 的纯品以上述同样梯度条件作 HPLC 检测, 表面活性素在 44 ~ 48min 被洗脱出来, 通过待测样品和纯品在该时间段的峰面积比值来确定待测样品浓度。

1.4 表面活性素的质谱分析

利用 MALDI-TOF-MS 分析 B2 产生的脂肽类化合物种类, MALDI-TOF-MS 以 Bruker Reflex MALDI-TOF 仪记录, 使用 337nm 氮激光源解吸附和电离, 基质为 α -氰-4-羟肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)。利用 MALDI-TOF 源后衰变(Post source decay, PSD)质谱分析 B2 产生的表面活性素变异体。

2 结果和分析

2.1 枯草芽孢杆菌 B2 的生长和表面活性素产量

在 Landy 液体培养基中, 33℃ 180r/min 的条件下, 用分光光度计(551S UV/VIS, Perkin-Elmer)和 pH 仪(PHC3006L, Radiometer Analytical)每隔 1h 测定一次 B2 的 OD 值和 pH 值(图 1)。结果显示, B2 的 OD 值从第 7 小时进入对数生长期, 在第 18 小时进入对数生长末期, pH 值从最初 6.0 开始不断下降到对数生长初期的 5.5, 然后在对数生长期不断升高, 至稳定期为 7.2, 最高升至 7.4。利用 HPLC SMART SYSTEM 测定表面活性素的产量表明(图 1), 在对数生长期的培养液中表面活性素的产量不断增加, 在稳定期产量达到最高水平为 280mg/L, 之后在所测范围内未见显著增加。

2.2 枯草芽孢杆菌 B2 产生的脂肽类抗生素种类

将粗纯化物进行 MALDI-TOF-MS 分析, 枯草芽孢杆菌产生的脂肽类抗生素的相对分

子质量应在 900 ~ 2000 范围内^[15]。MALDI-TOF-MS 谱显示(图 2),B2 仅在 m/z 值为 1061 处有离子峰(簇)出现,该离子峰相对应于表面活性素的质量(理论计算值为 1059.4),说明 B2 只含有表面活性素一种脂肽类抗生素。

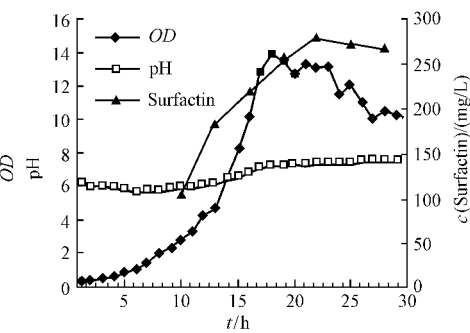


图 1 B2 的生长曲线、pH 值曲线和表面活性素产量

Fig.1 The growth curve ,pH curve and surfactin productivity of B2 strain

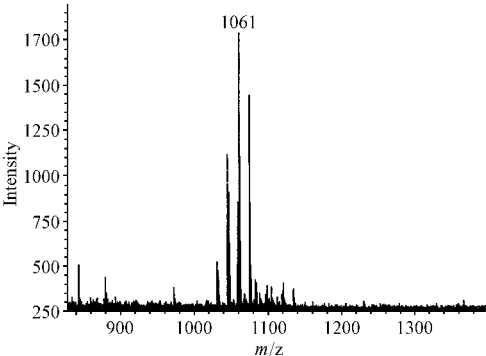


图 2 B2 脂肽类抗生素粗纯化物的 MALDI-TOF-MS 质谱图

Fig.2 MALDI-TOF mass spectrum of sub-pure lipopeptide of B2 strain

2.3 枯草芽孢杆菌 B2 产生的表面活性素变异体分离

利用 HPLC SMART SYSTEM 将粗纯化物过 μ RPC C2/C18 层析柱,表面活性素变异体在 44 ~ 48 min 处依次出现 3 个主峰(检测波长为 210nm),分别收集于 40 ~ 43 管中(图 3)。

2.4 枯草芽孢杆菌 B2 产生的表面活性素变异体的分子结构分析

MALDI-TOF-PSD-MS 分析脂肽类化合物分子结构的原理是通过源后衰变(PSD)产生的质子化或碱金属加合的离子片段值与理论计算相应产生的离子片段值进行比较,来确定其分子结构^[15]。将经 HPLC SMART SYSTEM 分离的表面活性素变异体 3 个主峰收集液做 MALDI-TOF-

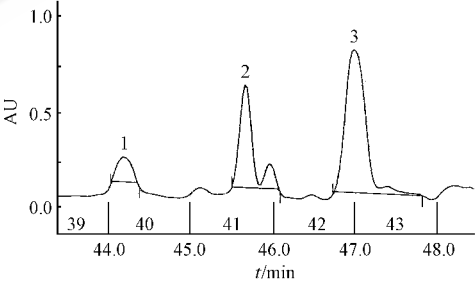


图 3 B2 产生的表面活性素变异体的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of surfactin isoforms of B2 strain

PSD-MS 分析。第 1 峰(第 40 管)产生的 MALDI-TOF-PSD-MS 质谱图如图 4 所示,图下部各峰上的数字是实验测定的质子化或碱金属加合的离子片段质量,而推测的分子结构以及源后衰变产生的理论计算相应值列于图中上部,实际测定值与理论计算值二者之间的差异在仪器误差 0.2% 范围内,因而可以确定第 1 峰的表面活性素变异体为含 13 个碳原子的脂肪酸链以及 L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu 七环肽组成,简称为 C13 表面活性素变异体。同样方法分析了第 2 和第 3 峰(Parention m/z 分别为 1044 和 1058),分别鉴定为 C14 和 C15 表面活性素变异体。因此,B2 产生的表面活性素变异体由 13、14 和 15 个碳原子的脂肪酸链以及 L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu 七环肽组成。

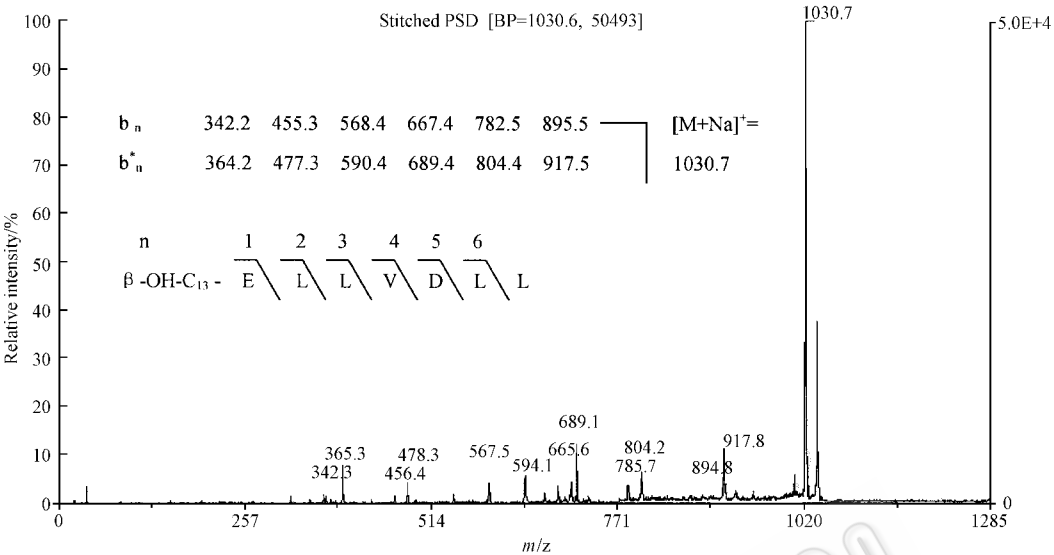


图 4 B2 产生的表面活性素变异体 MALDI-TOF-PSD-MS 质谱图

Fig.4 MALDI-TOF-PSD mass spectrum of B2 surfactin isoform

b_n is theoretically calculated $[M + H]^+$ mass numbers of fragment ion ; b_n^+ is theoretically calculated $[M + Na]^+$ mass numbers of fragment ion ;The error between theoretical and experimental value is under $\pm 0.2\%$ limit of error of the PSD-MS measurements ; Single-letter amino acid code is used .

3 讨论

本文通过 MALDI-MS 分析 ,确定了枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的脂肽类抗生素为表面活性素 ,并且确定了表面活性素变异体的分子结构。MALDI-MS 是近来作为功能强大的新技术引入生物科学的多个领域 ,其突出优点是快速简便和高灵敏度 ,可在数分钟内检测 pmol 甚至 fmol 浓度的样品^[15]。在微生物的分类领域可以利用 MALDI-MS 技术通过分析微生物产生的次生代谢产物来划分微生物的属、种和菌株^[15]。已有的研究显示该技术还可以区分致病和非致病细菌 ,检测食品病原体 ,在活体条件下鉴定细胞成份和代谢物的结构等。

表面活性素的生物合成是以非核糖体途径由组件(Modules)组成的多酶复合体(表面活性素合成酶)催化的 ,非核糖体途径中氨基酸参入的严谨性降低 ,常受培养基、温度等外界条件的影响发生改变 ,从而形成表面活性素肽链变异体^[16]。本研究中 B2 产生的表面活性素变异体是自然培养条件下的标准型(Standard surfactin) ,若培养条件改变将可能产生新的变异体。已有研究结果显示肽链部分只有在 2、4 和 7 位的 L-氨基酸是可以被替换的 ,并且 4 位表现得更易变化 ,而 3、6 位 D 构像的氨基酸是严格保守的 ,原因是 D 构像的氨基酸在肽链闭合时起关键作用^[3]。不同的表面活性素变异体的生物学活性是不同的 ,不仅表现在其表面活性能力发生改变^[17] ,而且在抗病毒活性上也存在明显差别 ,如脂肪酸链为 15 个碳原子和具一个负电荷的表面活性素表现了最高的抗病毒活性^[5]。而 B2 产生的表面活性素中 15 个碳原子的变异体比重很大 ,具有很好的失活衣壳病毒 VSM(Vesic-

ular stomatitis virus)、SHV-1(Suid human herpes virus type1)和 SFV(Semliki forest virus)的作用(将另文发表)。在分离和鉴定表面活性素变异体的基础上,可以对不同变异体的功能进行研究,并在基因水平上对肽链的氨基酸顺序和组成进行改造以符合不同的需要。正是由于非核糖体途径合成酶的组件(Modules)结构,才提供了通过重新组合组件来创造新的生物活性物质的可能性^[18]。

参 考 文 献

- [1] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968, **31**: 488 ~ 494.
- [2] Kakinuma A, Sugino K, 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.
- [3] Peypoux F, Bonmatin J M, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *App Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 553 ~ 563.
- [4] Vollenbroich D, Ozel M, Vater J, *et al.* Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 1997, **25**: 289 ~ 297.
- [5] Kracht M, Rokos H, Ozel M, *et al.* Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *J Antibiotics*, 1999, **52**: 613 ~ 619.
- [6] Kameda Y, Matsui K, Hisato K, *et al.* Antitumor activity of *Bacillus natto* III. Isolation and characterization of a cytolytic substance on Ehrlich ascites carcinoma cells in the culture medium of *Bacillus natto* KMD1126. *Chem Pharm Bull*(Tokyo), 1972, **20**: 1551 ~ 1553.
- [7] Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M, *et al.* Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(1): 44 ~ 49.
- [8] Bernheimer A W, Avigad L S. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol*, 1970, **61**: 361 ~ 369.
- [9] Tsukagoshi N, Tamura G, Arima K. A novel protoplast-bursting factor(surfactin) obtained from *Bacillus subtilis* IAM 1213 II. The interaction of surfactin with bacterial membranes and lipids. *Biochim Biophys Acta*, 1970, **196**: 211 ~ 214.
- [10] Sheppard J D, Jumaric C, Cooper D G, *et al.* Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1064**: 13 ~ 23.
- [11] Osman M, Hoiland H, Holmsen H, *et al.* Tuning micelles of a bioactive heptapeptide biosurfactant via extrinsically induced conformational transition of surfactin assembly. *J Peptide Sci*, 1998, **4**: 449 ~ 458.
- [12] Hosono K, Suzuki H. Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase III. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase. *J Antibio*(Tokyo), 1983, **36**: 679 ~ 683.
- [13] Kim K, Jung S Y, Lee D K, *et al.* Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A₂. *Biochem Pharmacol*, 1998, **155**: 975 ~ 985.
- [14] Landy M, Warren G H, Rosenman S B, *et al.* Bacillomycin: An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1948, **67**: 539 ~ 541.
- [15] Leenders F, Stein T H, Kablitz B, *et al.* Rapid typing of *Bacillus subtilis* strains by their secondary metabolites using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of intact cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999, **13**: 943 ~ 949.
- [16] Vater J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. *Progr Colloid Polym Sci*, 1986, **72**: 12 ~ 18.
- [17] Peypoux F, Bonmatin J M, Labbe H, *et al.* [Ala4]surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *Eur J Biochem*, 1994, **224**: 89 ~ 96.
- [18] Eppelmann K, Stachelhaus T, Marahiel M A. Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry*, 2002, **41**(30): 9718 ~ 9726.

Purification and Identification of Surfactin Isoforms Produced by *Bacillus subtilis* B2 Strain

Gao Xuewen^{1*} Yao Shiyi¹ Huong Pham² Joachim Vater² Wang Jinsheng¹

(¹ Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects of Ministry of Agriculture ,
Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

(² Institut für Biochemie und Molekulare Biologie für Berlin Technische Universität , Berlin D-10587 , Germany)

Abstract : Crude lipopeptide was extracted with methanol from the pellet which was precipitated with 6mol/L HCl from the culture medium of *Bacillus subtilis* B2 strain. The crude lipopeptide was purified by gel filtration on Sephadex LH-20 column , the obtained product was referred to as sub-pure lipopeptide. The MALDI-TOF mass spectrum showed that B2 produced only lipopeptide surfactin. Sub-pure lipopeptide was run on μ RPC C2/C18 column by HPLC SMART SYSTEM with aim at separation of surfactin isoforms. The surfactin isoforms fractions was detected by MALDI-TOF-PSD mass spectrometry , results indicated that the surfactin isoforms of B2 strain was cyclic lipodecapeptide L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu containing fatty acid with a side chain length of 13 , 14 and 15 carbon atoms.

Key words : *Bacillus subtilis* , MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) , MALDI-TOF-PSD-MS (MALDI-TOF post-source decay mass spectrometry) , Surfactin isoforms , Purification , Identification

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (30170623)

* Corresponding author. Tel 86-25-4396072 ;E-mail : gaoxuew@ yahoo. com

Received date : 12-20-2002

2004 年《中国酿造》改为月刊

欢迎订阅 邮发代号 2-124

《中国酿造》应广大读者的要求 ,自 2004 年起由双月刊正式改为月刊 ! 改刊后的《中国酿造》将会以更大的信息量、更丰富的内容、更强的实用性、更精美的印刷质量展现在您的面前 ,不仅能够使您得到知识上的满足 ,而且还会感到精神上的愉悦 ,这也正是我们一直在追求的目标。

《中国酿造》为中文核心期刊 ,是学位与研究生教育的中文重要期刊 ,被美国《化学文摘》(CA)列入重点收录期刊 (自 1982 年至 2002 年共被收录 445 篇文章) ;已加入《中国学术期刊 (光盘版)》、《万方数据库》期刊 ,是《中国期刊网》重点收录期刊。

《中国酿造》立足于传统酿造与现代技术相结合 ,为酿造业的权威杂志 ,主要栏目有 :专论与综述、研究报告、创新与借鉴、酿造技术、科学管理等 ,以刊登酱油、醋、酱类、酱腌菜、酒类、酶制剂及呈味核苷酸等方面的内容为主。是从事酿造事业的科技人员、大专院校及酿造企业技术管理人员必备的国家一级科技期刊。

《中国酿造》为月刊 ,每月 20 日出版 ,大 16 开本 ,内文 56 页 ,单价 8.00 元 ,全年 12 期订价 96.00 元。

国际标准刊号 :ISSN 0254-5071 国内统一刊号 :CN11-1818/TS

汇款请寄 :北京市宣武区右安门内大街 79 号南楼三层 (红旗大学院内)

邮 编 :100054 电 话 : (010) 83542991 传 真 : (010) 83531323