

脂肽的分离纯化与结构研究*

吕应年 杨世忠 牟伯中**

(华东理工大学化学系 上海 200237)

摘要: 采用酸沉淀分离、有机溶剂提取、分级沉淀、脱色吸附及制备薄板的方法, 从枯草芽孢杆菌 HSO121 的培养液中分离得到一种脂肽类化合物。茚三酮试验、红外光谱分析表明该脂肽具有环状结构, 电喷雾离子化质谱结果显示, 该脂肽是分子量为 1,022D 和 1,036D 的两个同系物, 氨基酸分析及串联质谱分析表明, 脂肽的肽链结构为 Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Glu, 说明它是 Surfactin 的结构类似物。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 脂肽, 分离纯化, 环状结构

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0067-07

Isolation and Identification of a Lipopeptide *

LV Ying-Nian YANG Shi-Zhong MU Bo-Zhong**

(Department of Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: A lipopeptide compound was isolated from the culture of *Bacillus subtilis* HSO121 by methods of acidic precipitation, solvent extract, fractional precipitation, adsorption and prepared thin-layer chromatography; and its molecular structure was determined by ninhydrin assay and IR methods following the Amino analysis, MS-MS and ESI-MS. It shows that the isolated lipopeptide consists of two homologues with molecular mass 1,022D and 1,036D and bearing a cyclic structure with the amino acid sequence Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Glu in the peptide chain, which indicates that the isolated lipopeptide falls into the analogs of surfactin.

Key words: *Bacillus subtilis*, Lipopeptide, Isolation, Cyclic structure

细菌代谢产生的脂肽是一类生物表面活性剂。脂肽分子由亲水的肽链和亲油的脂肪链两部分组成, 由于其特殊分子结构, 脂肽在抗生素、化妆品及微生物采油等领域有重要的应用前景^[1]。细菌产生的脂肽种类繁多、结构复杂。即使具有同一基本结构的脂肽也存在多种结构类似物^[2,3]。由于这些脂肽的结构相似, 性质相近, 从细菌发酵液中分离纯化得到单分子化合物非常困难, 这给进一步的结构鉴定带来困难。脂肽结构鉴定的一个重点是肽链的鉴定, 包括氨基酸的种类、比例和连接顺序等。质谱技术的发展为肽链结构的鉴定提供了一种有效的方法。利用两种重要软离子化质谱新技术即基质激光解吸离子化质谱 (MALDI-MS) 和电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 技术^[4], 结合时间飞行质谱仪 (TOF) 或串联质谱 (-MS-MS), 可以不需要分离混合物即可测定其中的肽链的结构。Lin 等人采用特殊分离柱的 RP-HPLC 分离结构相似的脂肽, 并用

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 59974014)

Project Granted by Chinese National Natural Science Found (No. 59974014)

高等学校博士学科点专项科研基金资助课题 (No. 20030251002)

上海市教委资助项目

** 联系人 Tel: 021-64252063; E-mail: bzmu@ecust.edu.cn

收稿日期: 2004-04-23 修回日期: 2004-06-07

质谱技术对脂肽的结构进行鉴定^[5]。国内在脂肽方面的研究不多^[6]，在脂肽分子结构鉴定方面的研究更少。本文研究了由枯草芽孢杆菌产生的脂肽的分离纯化条件，采用电喷雾离子化质谱结合串联质谱解析脂肽的氨基酸连接顺序，用化学方法结合仪器分析鉴定了该脂肽的基本结构，得到了预期的结果。

1 材料与方法

1.1 菌株

从油田水中采集，分离纯化后经鉴定（中国科学院微生物研究所）为枯草芽孢杆菌，本室保藏，编号为 HS0121。

1.2 培养基

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4.8 g, KH_2PO_4 1.5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, $Na_3C_6H_5O_4 \cdot 2H_2O$ 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2 mg, 酵母粉 0.1 g, 葡萄糖 4.0 g, 用去离子水定容至 1,000 mL。

1.3 细菌培养

用接种环从斜面培养基上挑取一环菌苔，接入盛有 15 mL 液体培养基的试管中，35℃ 恒温水浴摇床中培养 24 h，转速 120 r/min。活化菌液按 3% 接种量加入 250 mL 液体培养基中，35℃ 空气摇床中恒温培养 48 h，转速 140 r/min。

1.4 样品的分离纯化

1.4.1 粗品制备：细菌培养液离心除去菌体，上清液加浓盐酸调节到 pH=2.0，4℃ 静置过夜，离心分离得沉淀，真空干燥后放入索氏抽提器加二氯甲烷抽提，抽提液于旋转蒸发器中减压蒸干，得到淡黄色粉末即粗品，记为 F1。

1.4.2 纯化：粗品溶解于适量丙酮中，离心分离得上清液（记为 F2），上清液中加入活性炭吸附脱色，溶液减压蒸干得到白色粉末（记为 F3），重溶于二氯甲烷中，条带形点样于制备型硅胶薄板，在氯仿：乙酸=8:2（V/V）的展开剂中展开，提取单一条带用二氯甲烷浸提，蒸干后得到白色固体（记为 F4）即纯化样品。

1.4.3 定性分析：原位酸水解-茚三酮显色法^[7]。将分离得到的表面活性剂样品溶解在二氯甲烷中配成溶液。取两块活化的薄板，记为 A 板、B 板，每块板分别点样，在氯仿：乙酸=8:2（V/V）中展开 10 min。挥发掉溶剂后，A 板直接以茚三酮试剂（0.5% 的茚三酮丙酮溶液）显色。把 B 板放入耐高温的密封瓶内，瓶中预先以小杯盛约 1 mL 浓盐酸，110℃ 烘箱中熏蒸 1 h 进行原位酸水解，通风橱中冷却，吹去盐酸后，以茚三酮试剂显色。

1.5 结构鉴定

1.5.1 官能团结构：用傅立叶变换红外光谱（AVATAR360）测定。

1.5.2 氨基酸组成：纯化样品经 6 mol/L 盐酸在氮气保护下 110℃ 水解 18 h，用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪分析。

1.5.3 分子量测定：电喷雾离子化质谱法，用 Q-Tof micro 质谱仪测定。

1.5.4 分子结构：串联质谱法，用 Q-Tof micro 质谱仪测定。

2 结果与讨论

2.1 脂肽的分离纯化

粗品 F1，得率约 0.15 g/L（培养液），经 TLC 展开后用水显色显示 5 个白色斑点，

说明样品中有 5 个疏水性成分；用茚三酮直接显色后又出现 2 个紫红色斑点，说明样品中还含有 2 个亲水性成分，它们具有与茚三酮显色的官能团，应是亲水性的蛋白质或肽类物质。综合两种显色结果，说明粗品中含有 7 个成分，比移值 R_f 分别是 0, 0.06, 0.26, 0.38, 0.62, 0.76, 0.87。

样品 F2 经 TLC 展开后用水显色出现与 F1 样品相同的 5 个白色斑点，用茚三酮直接显色没有紫红色斑点，说明粗品经丙酮沉淀后除去了其中的亲水性成分。因此，样品 F2 中有 5 个疏水性成分，比移值 R_f 分别是 0.26, 0.38, 0.62, 0.76, 0.87。

样品 F3 经 TLC 展开后用水显色有 2 个白色斑点，说明活性炭吸附能除去样品 F2 中含量较少的 3 个疏水成分，因此样品 F3 中只有 2 个疏水成分，比移值 R_f 分别是 0.62, 0.76。

样品 F4 经 TLC 展开后用水显色只有 1 个白色斑点，表明薄板分离能得到具有单一比移值的成分，比移值 R_f 为 0.76。分离纯化结果如表 1。

在粗品 F1 中，比移值 R_f 分别是 0.26, 0.38, 0.62, 0.76, 0.87 的成分在

水显色的薄板上显示白色斑点，其中 R_f 分别是 0.26, 0.38, 0.62, 0.87 的斑点直接加茚三酮不显色，原位酸水解后加茚三酮也不显色，其具体结构待进一步鉴定。 R_f 值 0.76 的斑点直接加茚三酮不显色，原位酸水解后显示橙红色斑点，该斑点成分即分离纯化得到的样品 F4，得率约 0.061 g/L (培养液)。结果如图 1。

表 1 分离纯化结果

| 样品名称 | 斑点的 R_f 值 |
|------|---------------------------------------|
| F1 | 0, 0.06, 0.26, 0.38, 0.62, 0.76, 0.87 |
| F2 | 0.26, 0.38, 0.62, 0.76, 0.87 |
| F3 | 0.62, 0.76 |
| F4 | 0.76 |

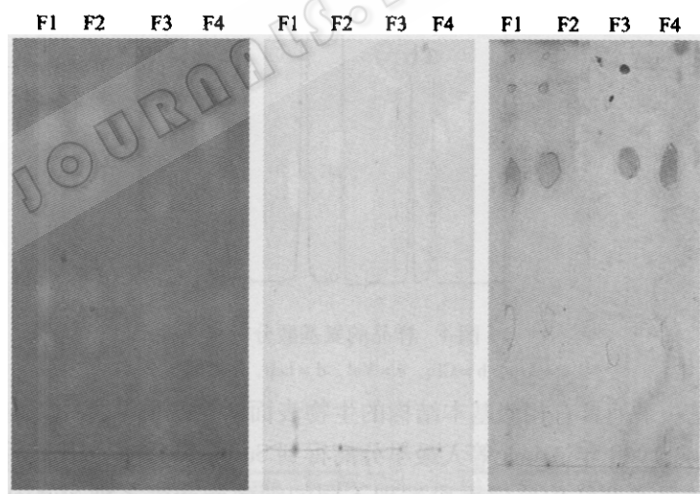


图 1 样品的 TLC 分析

左图用水显色，中图直接用茚三酮显色，右图酸水解后茚三酮显色

2.2 结构鉴定

纯化样品 F4 展开后直接加茚三酮不显色 (如图 2 A)，原位酸水解后加茚三酮能显示红色斑点 (如图 2 B)，表明该物质本身不含有游离氨基酸，但酸水解后产生游离氨基酸，初步推测该物质具有闭合的肽键。

为了进一步确定分子的官能团，对样品做了红外光谱分析 (图 3)。3,304 cm^{-1} 的吸

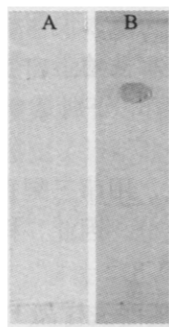


图2 定性试验

收峰是分子间 N-H 键的伸缩振动, $1,648\text{ cm}^{-1}$ 与 $1,534\text{ cm}^{-1}$ 强吸收为酰胺键的吸收谱带, 说明表面活性剂分子结构中有肽键; $2,926 \sim 2,862\text{ cm}^{-1}$ 和 $1,458 \sim 1,382\text{ cm}^{-1}$ 为脂肪碳链中的 C-H 键伸缩振动; $1,727\text{ cm}^{-1}$ 小峰表明是内酯的羰基结构。综合定性和红外光谱结果, 说明样品是具有环状结构的脂肽类物质。

经氨基酸分析表明 (图 4), 纯化脂肽 F4 由天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)、缬氨酸 (Val) 和亮氨酸 (Leu) 4 种氨基酸组成, 这 4 种氨基酸的分子组成比为 Asp: Glu: Val: Leu = 1: 1: 1: 4。这与已知的脂肽类生物表面活性剂 surfactin 的氨基酸组成相似, 指示该物质是 surfactin 的结构类似物。

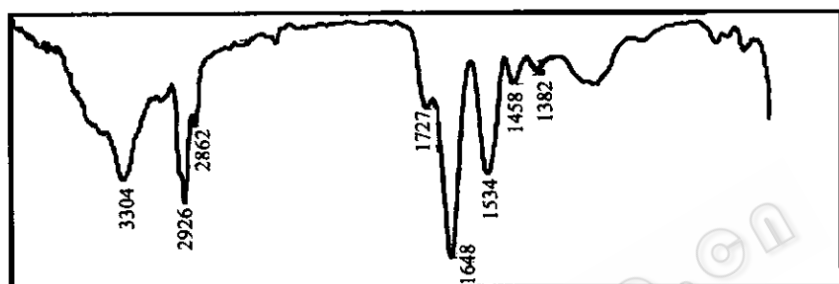


图3 样品的红外光谱

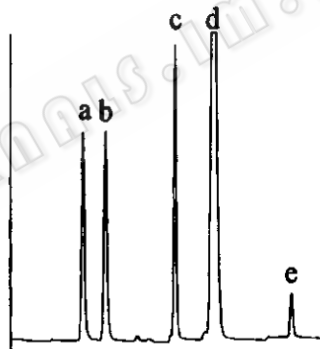


图4 样品的氨基酸分析

a = Asp, b = Glu, c = Val, d = Leu, e = NH_3

Surfactin 是一系列具有相似基本结构的生物表面活性剂的总称^[8], Surfactin 的基本结构如图 5A。自 1968 年 Arima 等人最早分离得到 Surfactin 以来^[9], 其后的研究人员采用更先进的分离技术和结构鉴定手段发现不同的细菌能产生多种 Surfactin 的结构类似物^[10], 细分为 Surfactin A、Surfactin B、Surfactin C₁、Surfactin C₂ 等。这些结构类似物的共同之处在于分子中都有 7 个氨基酸连成的肽链, 与碳数 13-15 的 β -羟基脂肪酸以内酯键结合成环状, 其中肽环构成亲水基, 长烃链形成疏水基, 7 个氨基酸一般是天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)、缬氨酸 (Val) 和亮氨酸 (Leu)。这些结构类似物的差别在于肽键中的氨基酸连接顺序、氨基酸的种类和侧链脂肪酸的碳原子个数不同^[11], 天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸可分别被天冬酰胺 (Asn)、谷氨酰胺 (Gln)、异亮氨酸 (Ile) 取代。Surfactin 的结构类似物有相似的物理化学性质, 都有良好的表面活性。

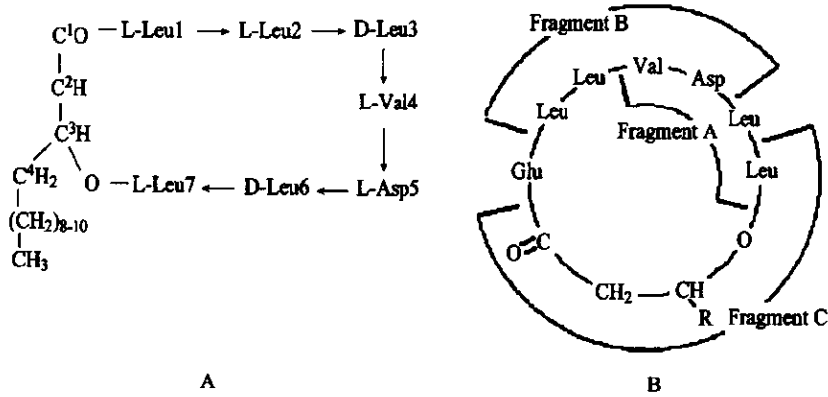


图 5 Surfactin 及样品的结构

纯化样品经电离喷雾质谱测定分子量，发现样品是分子量为 1,022D 和 1,036D 的两个分子（图 6）。负离子质谱 TOF-MS-ES⁻得到 m/z 峰值 (M_1-1 和 M_2-1) 分别为 1,020.81 和 1,034.81，说明样品中含有两种分子，分子量分别为 1,022D 和 1,036D；同时，经正离子质谱 TOF-MS-ES⁺对照得到 m/z 峰值 ($M_1 + \text{H}^+$ 和 $M_2 + \text{H}^+$) 分别为 1,022.73 和 1,036.73， m/z 峰值 ($M_1 + \text{Na}^+$ 和 $M_2 + \text{Na}^+$) 1,044.69, 1,058.69, m/z 峰值 ($M_1 + \text{K}^+$ 和 $M_2 + \text{K}^+$) 1,060.73, 1,074.73。由此验证样品中有两种分子，分子量分别为 1,022D 和 1,036D。

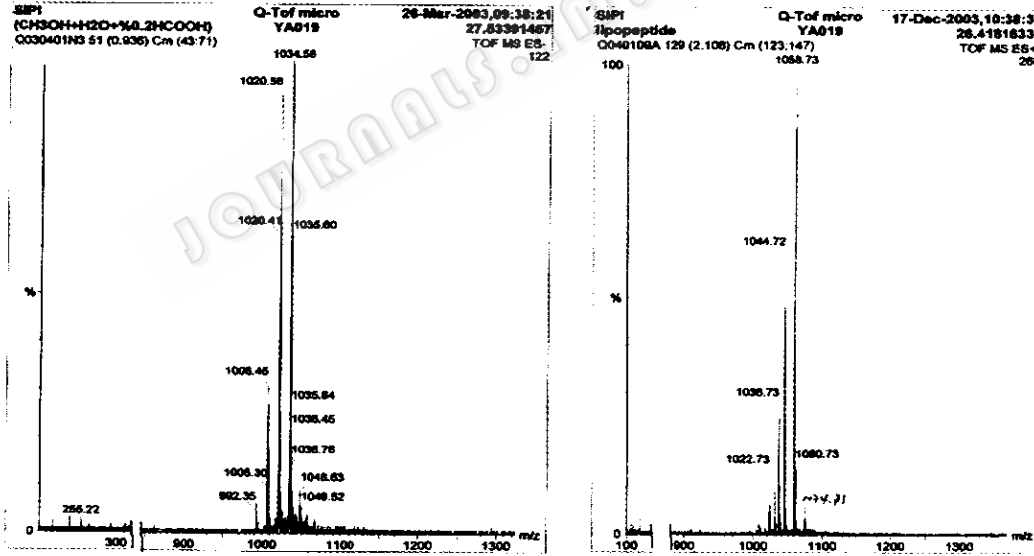


图 6 样品的 TOF-MS-ES 图谱

左图：TOF-MS-ES⁻，右图：TOF-MS-ES⁺

在串联质谱检测中，电喷雾质谱得到的分子离子被分离进入碰撞室，与惰性气体碰撞使脂肽分子上的氨基酸被逐个解离，成为离子碎片进入串联的次级质谱，即可检测到碎片的离子峰，根据这些碎片的质荷比即可反推得到分子中氨基酸的连接顺序（图 7）。由图 7 可知，纯化样品中两个分子解离的离子碎片大多相同，不同的部分分子量相差 14，综合考虑到这两个分子性质相近，在薄板上不能分开，分子量相差 14，推

测这两个分子应是具有相同结构的同系物, 只在烃链上相差一个亚甲基 ($-\text{CH}_2$)。以分子量 1,036D ($\text{M} + \text{Na}^+$ 碎片, m/z 1,058.69) 的分子为例分析氨基酸的连接顺序如下:

根据串联质谱图的 m/z 峰值分析表明脂肽中存在肽的片段 A, Leu-Leu-Asp-Val:

$$1,058.69 \xrightarrow{-\text{Leu}} \xrightarrow{-113.05} 945.64 \xrightarrow{-\text{Leu}} \xrightarrow{-113.09} 832.55 \xrightarrow{-\text{Asp}} \xrightarrow{-115.07} 717.48 \xrightarrow{-\text{Val}} \xrightarrow{-99.08} 618.40$$

根据串联质谱图的 m/z 峰值分析表明脂肽中存在肽的片段 B, Leu-Leu-Val-Asp:

$$707.50 \xrightarrow{-\text{Leu}} \xrightarrow{-113.15} 594.35 \xrightarrow{-\text{Leu}} \xrightarrow{-113.04} 481.31 \xrightarrow{-\text{Val}} \xrightarrow{-99.09} 382.22 \xrightarrow{-\text{Asp}} \xrightarrow{-115.04} 267.18$$

根据串联质谱图的 m/z 峰值分析表明脂肽中存在肽的片段 C, Leu-Leu- β -hydroxy fatty acid:

$$1,058.69 \xrightarrow{-\text{Leu}} \xrightarrow{-113.05} 945.64 \xrightarrow{-\text{Leu}} \xrightarrow{-113.09} 832.55 \xrightarrow{-\text{BHA}} \xrightarrow{-238.2} 594.35$$

氨基酸分析表明脂肽分子中只有一个 Val 和 Asp, 有 4 个 Leu, 结合 A), B) 片段可以认为肽中的氨基酸有这样的片段: Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, 即 (Val-Asp) 两端各有两个 Leu; 脂肽分子中只有一个 Glu, 结合片段 C, 得到脂肽分子的结构如图 5B, 与文献报道的 surfactin 基本结构 (图 5A) 相同。

因此, 分子量 1,036D 的脂肽中-R 是有 12 个碳原子的烃链, 分子量 1,022D 的脂肽中-R 是有 11 个碳原子的烃链, 它们具有和 surfactin 相同的环肽亲水结构。

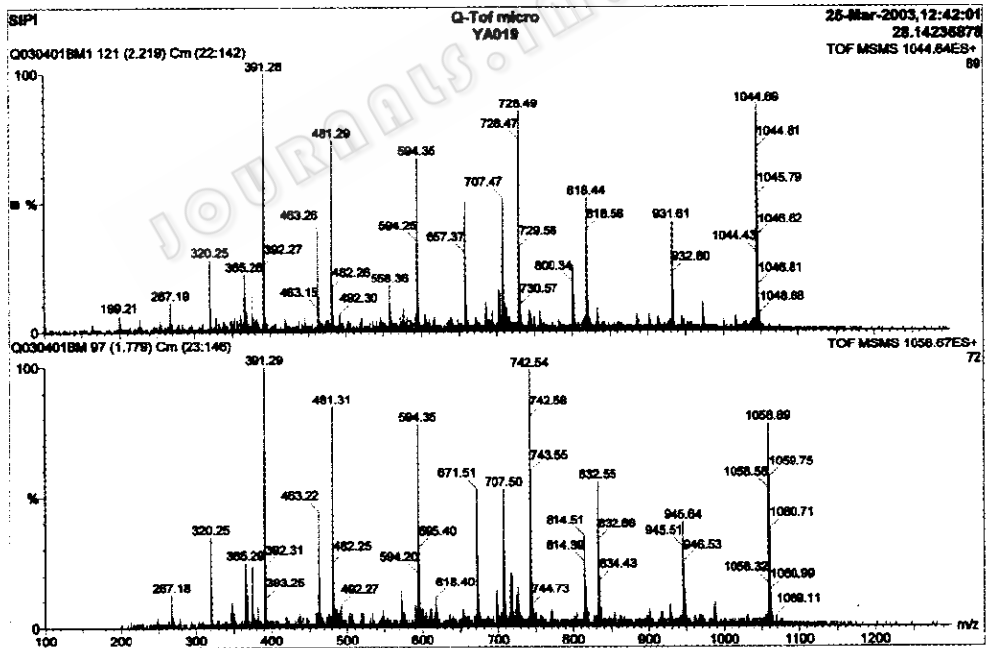


图 7 样品的串联质谱

3 结论

枯草芽孢杆菌 HS0121 的代谢产物经酸沉淀分离、有机溶剂提取、分级沉淀、脱色

吸附和制备型薄板分离纯化得到白色样品,在薄板上展开显示为单一斑点,经高灵敏度的电喷雾质谱分析仍然有两个分子离子峰,说明薄板分离得到的脂肽是两个同系物分子的混合物。结构鉴定表明,该脂肽具有环状结构,是 Surfactin 的结构类似物。本文研究的薄层色谱分离条件,对于用色谱柱大量制备脂肽有借鉴作用;同时,本文研究的脂肽分子结构对于进一步研究脂肽的结构-活性关系、开发脂肽的新用途具有参考价值。

参考文献

- [1] Desai J D, Banat I M. *Microbio Mol Biol Rev*, 1997, **61** (1): 47 ~ 64.
- [2] Hue N, Serani L. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, **15** (3): 203 ~ 209.
- [3] Deleu M, Razafindralambo H, Popineau Y. *J Colloids and Surfaces A*, 1999, **152**: 3 ~ 10.
- [4] 李永民. 分析测试技术与仪器, 2002, **8** (3): 131 ~ 135.
- [5] Lin S G, Chen Y C, Lin Y M. *Journal of Chromatography A*, 1998, **825**: 149 ~ 159.
- [6] 高学文, 姚仕义. *微生物学报*, 2003, **43** (5): 647 ~ 652.
- [7] 周俊, 谭宁华. *科学通报*, 2000, **45** (10): 1047 ~ 1051.
- [8] Kowall M, Vater J, Kluge B, *et al.* *J of Colloids and Interface Science*, 1998, **204**: 1 ~ 8.
- [9] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968, **31**: 488 ~ 494.
- [10] Grangemard L. *Appl Biochem Biotechnol*, 2001, **90** (3): 199 ~ 210.
- [11] Jacques P, Hbid C, Destain J. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999, **77 ~ 79**: 223 ~ 233.