

表面活性素的结构特性及其生物合成机理

吴清平^{1,2} 蔡芷荷¹ 张菊梅¹ 周小燕¹ 姚汝华²

(广东省微生物研究所¹ 广州 510070, 华南理工大学² 广州 510642)

关键词 表面活性素, 结构特性, 生物合成机理

分类号 TQ423

微生物可以产生一系列的生物表面活性剂(biosurfactant), 它们在工业、生物技术及医疗卫生等方面的应用正受到重视。1968 年 Arima 等首次发现由枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) IFO 3039 产生的脂肪多肽, 它是一种生物表面活性剂, 呈晶状, 商品名为表面活性素(surfactin)。表面活性素最初被分离并鉴定为纤维蛋白凝集抑制剂, 后来发现它能溶解红血细胞及某些细菌的原生质球和原生质体, 并能显著地降低水的表面张力, 使其表面张力从 72mN/m 下降至 27mN/m, 是已报道

的最强的生物表面活性剂^[1], 具有广泛的潜在工业应用前景, 如油类回收及感光乳剂的稳定等。由于表面活性素与化学合成的表面活性剂比较具有可生物降解及毒性低的特点, 因此愈来愈受到人们的日益重视^[2]。

1 表面活性素种类

表面活性素是一类脂肪多肽抗生素, 由 7 个 α 氨基酸组成的一个多肽及一个同源系列的带有 13、14 或 15 个碳原子的羟基脂肪酸构成一个大内酯环(图 1)。多肽中典型的氨基酸组成顺序为 (L)-Glu-(L)-Leu-(D)-

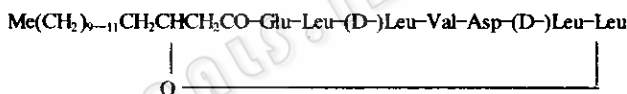


图1 枯草芽孢杆菌产生的表面活性素结构

Leu-(L)-Val-(L)-Asp-(D)-Leu-(L)-Leu, 此外, 还有 C-终端的 L-Leu 是分别由 L-Val 和 Ile 所取代的另外两种组成。1993 年 Oka 等^[3]采用优化后的高效液相色谱(HPLC), 首次对枯草芽孢杆菌产生的六种表面活性素分离成功, 并发现了两种具不同脂肪酸取代物的新表面活性素。1994 年 Peypoux 等^[4]通过质谱(MS)及核磁共振(NMR)又新发现了一种在典型多肽组成型中的第 4 个位置 L-Val 被 L-Ala 所取代的表面活性素 [Ala4]。

2 表面活性素结构及性质

1994 年 Bonmatin 等^[5]通过 ¹H-NMR 研究了 [Leu7] 表面活性素在溶液中的三维结构, 发现环状脂肪多肽在溶液中呈马鞍形, Glu 及 Asp 侧链和 C₁₁₋₁₃ 脂肪酸链构成明显的两极。同年 Osman 等又发现线性的七肽表面活性素可以通过环状结构的表面活性素采用烷基裂开的方式来获得。表面活性素的线性结构和环状结构可以相互转化, 其临界胶束浓度(CMC)为 1.28×10^{-5} mol/L, 当高于这一 CMC 时, 表面活性素呈 β -层(片)

状, 形成线性结构, 当低于这一 CMC 时, 表面活性素呈 α -螺旋状, 形成环状结构。Knoblich 等^[6]采用电子冷冻显微技术, 揭示出当 pH 为 7、9.5 及 12 时, 在不均质场所内的表面活性素形状分别为圆球形、椭圆形和圆柱体形的结构, 其内酯环的一条特征的 FT-IR 光谱段(频带), 在低 pH 值时可以出现, 在 pH 为 12 时又消失的现象, 表明其胶态分子团在不同的 pH 值条件下, 构成了圆柱体形和线性的头部结构; 当 pH 9.5 时, 加入 100mmol/L NaCl 和 20mmol/L CaCl₂ 到表面活性素溶液中, 就可以将圆柱体形的胶态分子团转变为圆球形或椭圆球形或两者均有的小型胶态分子团。表面活性素这一阴离子型生物表面活性剂, 在 pH 8.7 的 0.1mol/L NaHCO₃ 中, 当其 CMC 为 9.4×10^{-6} mol/L 时, 可形成大棒状胶态分子团, 分子量可达到 179ku, 这

广东省重点科技攻关资助项目

1998-01-15 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

时其表面张力为 30mN/m , 这种优良的表面活性作用是由于 β -层状结构所构成的表面活性素展开的缘故。

在酸性条件下, 表面活性素通常带有负电荷, 在 $5 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 的稀溶液中, 其最大吸附作用是 $3 \times 10^{18} \text{mol/m}^2$, 这表明表面活性素的分子在这种情况下紧密地挤拥在一起, 而在空气与水的界面上, 表面活性素可不断扩展, 当 KCl 或 CaCl_2 这类电解质溶解在碱性下层液相中时, 其均匀的展开压力可从 30mN/m 到达 45mN/m ; 虽然表面活性素的扩展压力与温度有关, 但下层液相 pH 值的改变是造成其扩展压力改变的最重要的原因; 在空气与水的界面上, 表面活性素的 pK 约为 6, 比在溶液中的表面活性素的 pK 高出 2 个 pH 值单位。这种在下层液相中的电解质 (0.15mol/L) 导致了表面活性素单分子层的电荷中性化 (多肽环中的 L-Glu^1 和 L-Asp^3 酸性残基质子化), 中性化作用在 Ca^{2+} 等二价离子存在时是完全的, 但在 Na^+ 或 K^+ 等一价离子存在时则不完全, 当表面活性素单分子层经受连续不断的压缩-扩展的循环时, 就能观察到可再现的滞后圈^[7]。表面活性素由于具有一个内酯键而形成重要的特征, 椭圆对称测定证实了在水和空气界面上表面活性素的平面位置, FTIR 光谱亦在二维空间中显示出了其内酯环的存在。离子化带有两个负电荷的表面活性素与卵磷脂泡囊的相互作用表明, 离子化的表面活性素可以渗入类脂单分子层, 这种渗透能力会随磷酸类脂的酰基链的加长而下降, 在有 Ca^{2+} 存在时, 由于其使下层液相中的表面活性素及类脂电荷中性化, 因而这种渗透能力会严重削弱, 但在酸性环境中, 这种渗透能力则会得到加强。

表面活性素具有离子载体和螯合的性质, 在 pH 为 9.5 的溶液中就可测出表面活性素结合 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的螯合特性, 并计算出 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 络合作用常数分别为 $K = 1.5 \times 10^5 \text{mol}^{-1}$, $K = 1.9 \times 10^4 \text{mol}^{-1}$ 。表面活性素的络合性质可以通过两相分配系统来测定, 在水相中含有 Ca^{2+} 或 Rb^+ , 在类脂相中含有表面活性素, 当 pH 为 9 时, 表面活性素以 1:1 方式络合 Ca^{2+} , 以 2:1 方式络合 Rb^+ , 这表明了表面活性素对二价阳离子比对一价阳离子具有更高的亲和力; 表面活性素对一价阳离子的结合是非选择性的, 但对二价阳离子的结合, Ca^{2+} 比 Mg^{2+} 或 Ba^{2+} 更为有效。除了络合性质外, 表面活性素可以作为移动性的载体运输一价和二价阳离子跨过溶

剂的障碍, 同时作为 H^+ 和无机阳离子之间的交换媒介^[8]。此外, 在类脂双分子膜中, 表面活性素可以产生选择性阳离子通道, 其选择顺序为 $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ = \text{Li}^+$, 在更高的盐浓度下, 一种二聚体就会在这种功能性的通道形成过程中形成^[9]。

3 表面活性素生物合成途径及合成酶结构

用 ^{14}C 标记的前体氨基酸试验表明, 表面活性素生物合成出现在细菌的对数生长期, ^{14}C 标记的前体氨基酸直接结合到了表面活性素的多肽部分, ^{14}C 标记的醋酸盐除出现在表面活性素的脂肪酸部分外, 同时亦部分转变为亮氨酸。进一步的表面活性素生物合成试验还发现, 在具有由表面活性素组成氨基酸传递的可催化 ATP 与无机磷酸盐 (P) 交换反应的芽孢杆菌无细胞抽提物中, 分离并部分纯化出的一种与表面活性素生物合成有关的酶, 其激活模型与可同时激活它的底物氨基酸成为活性磷酸氨酰基的一个肽合成多酶体系紧密相联。1992 年 Besson 等在经凝胶透过部分纯化的枯草芽孢杆菌细胞溶出物中, 又发现了被特别氨基酸传递并可催化 ATP 与无机焦磷酸盐 (PP_i) 交换反应的酶系。这些特别氨基酸的性质随细胞生长阶段发生变化, 在表面活性素合成期间, 能观察到表面活性素的组成氨基酸的激活作用, 但在表面活性素合成的初始阶段, 组成 iturin 的氨基酸的激活作用则未观察到, 而在 iturin 合成期间, 这种激活作用又可观察到。后来, 人们进一步发现 L-谷氨酸是在表面活性素合成酶的第一个范围内被活化的, 而在多肽合成酶的反应中心, 一个丝氨酸残基对底物氨基酸的活化来说又是至关重要的。

Menkhaus 等^[11]通过对枯草芽孢杆菌 ATCC21332 及 OKB105 抽提物的凝胶过滤, 获得了形成脂肪七肽表面活性素的多酶体系, 并被分离为 E_1 、 E_2 及 E_3 三个部分; E_1 可以活化所有表面活性素组成氨基酸, 成为氨酰腺苷酸及根据硫酯机理成为硫酯化合物; E_2 为亮氨酸活化酶, E_3 为酰基转移酶, 它们的分子量分别为约 160 和 40ku; 这种表面活性素合成酶多酶体系可以通过这三种酶的洗脱部分获得重组互补, 互补后的体系能够进行高效的脂肪多肽合成; E_1 由两个多功能聚多肽 E_{1A} 及 E_{1B} 所组成, 其分子量分别为 460 和 435ku, E_{1A} 结合 L-谷氨酸和 L-亮氨酸的摩尔比例为 1:2, 而 E_{1B} 结合 L-缬氨酸、L-天门冬氨酸及 L-亮氨酸的摩尔比例为 1:1:1; 表面活性素的羟基脂肪酸部分则是通过酰基转移酶接受

羧基脂肪酸 CoA 硫酯物作为底物而形成的, 羧基脂肪酸转移到 E_{1A} 和羧基酰基-L-谷氨酸盐中间物的构成, 在表面活性素的生物合成中是起始的步骤。1994 年 Besson 等亦证明表面活性素合成酶是由 3 个亚单位所组成的, 且其配体是表面活性素氨基酸组成之一。

4 表面活性素生物合成的遗传机制

在研究表面活性素生物合成过程及酶结构的同时, 人们亦同时进行控制其生物合成的遗传机制研究。迄今为止的试验表明, 调控表面活性素的合成最少有两个遗传位点, 它们分别为 *sfp* 和 *srfA*^[12]。Nakano 等^[4]进行的枯草芽孢杆菌中脂肪多肽表面活性素生物合成酶遗传位置的鉴定中发现, *sfp* 是控制表面活性素产生的基因, 它可改变基因 *srf* 的转录调节作用。后来又发现从 *sfp* 基因核苷酸顺序推断的氨基酸顺序和已知作用的蛋白质无同源性, *sfp* 基因编码了一种产生表面活性素的关键蛋白质。 *sfp* 基因代表了表面活性素多肽合成系统中的一个关键组成部分, 并在表面活性素生物合成基因表达中起着直接或间接的作用。 *srfA* 是枯草芽孢杆菌中, 表面活性素生产、感受态发育及高效孢子形成的一个操纵子, 而 *srfA*5' 端的 20535 对核苷酸顺序中包含了感受态发育所要求的区段, *srfA* 启动子区段也包含在其中, 它的第一个开放读框 *srfAA* 编码了表面活性素合成酶 I, 部分第二个开放读框 *srfAB* 编码了表面活性素合成酶 II, 在多肽合成酶中发现的三个氨基酸活化位置可以在 *srfAA* (活化 L-谷氨酸、L-亮氨酸及 D-亮氨酸) 和 *srfAB* (活化 L-缬氨酸、L-天门冬氨酸及 D-亮氨酸) 上辨别出来; 在 *srfAA* N-端一个保守间隔序列的存在表明, *srfAA* 产物不能起动表面活性素合成酶, 包含感受态发育所要求区段的 *srfA* 部分, 是由 *srfAA* 和 *srfAB* 中第一个氨基酸活化位置所组成^[13]。

Cosmina 等^[14]还进一步发现了枯草芽孢杆菌中含有完整 *srfA* 操纵子, *sfp* 以及其两者之间的 4000 个碱基对的染色体区段, 并进行了完全的顺序分析和功能特征的描绘, *srfA* 编码了三个表面活性素合成酶亚单位, 这些合成酶亚单位的分子量分别为 402、401 和 144ku, 在其上安排了作为一个系列的七个氨基酸活化位置, 作为信息传递、识别及结合表面活性素多肽上的 7 个氨基酸, *srfA* 氨基酸活化位置和其它多肽合成具有相似的同源性, 特别是在对活化同种氨基酸的位置上, 其位置能被鉴定并更具同源性, 而在 *srfA* 上的第四个基因编

码了一个与 *grsT* 同源的聚多肽; 在 *srfA* 和 *sfp* 之间的四个基因, 其中任何一个的被破坏都将不会影响表面活性素的合成。 *srfA* 有控制表面活性素产生、高效孢子形成及感受态发育这三个功能, 在其上的第二个开放读框上的 5' 区段是建立感受态发育所要求的最小遗传基础, 其编码了缬氨酸活化位置、*srfA*5' 部分的突变, 将影响枯草芽孢杆菌的上述三个功能, 而在 *srfA*3' 部分的突变, 只影响到其孢子形成及表面活性素的产生。进一步的研究还表明, *srfA* 编码表面活性素合成酶 E_{1A} 、 E_{1B} 和 E_2 , 这些酶催化了表面活性素底物氨基酸的结合, *srfA* 基因上的编码分配为 *srfAA*、*srfAB* 及 *srfAC* 分别控制表面活性素合成酶 E_{1A} 、 E_{1B} 和 E_2 的合成。

在单独进行表面活性素调控基因研究的同时, 从可同时产生 *iturinA* 的枯草芽孢杆菌 RB14 中, 人们又分离出可共同调节表面活性素和 *iturinA* 产生的 *Ipa-14* 基因, 这表明在芽孢杆菌属中, 普通的调节系统可能存在于控制多肽抗生素产生的这些基因之中^[15]。后来人们又从可产生表面活性素和 *iturinA* 的枯草芽孢杆菌 SD142 中, 再次分离出调控基因 *Ipa-14*, 并能用于表面活性素和 *iturinA* 的产生。

对表面活性素结构特性的研究有利于人们掌握及创造较有利于表面活性素发挥最大作用的条件, 因此对表面活性素的应用有着重要的意义, 而对表面活性素的生物合成机理研究则有利于人们对其合成途径的了解, 机理的认识和代谢途径的调控, 因此可为下一步进行表面活性素的菌种选育及发酵生产打下基础。

参 考 文 献

- [1] Cooper D G, Macdonald C R, Duff S J B *et al.* Appl Environ Microbiol, 1981, 42(3): 408~412.
- [2] Nakano M M, Marahiel M A, Zuber P. J Bacterio, 1988, 170(12): 5662~5668.
- [3] Oka K, Hirano T, Homma M *et al.* Chem Pharm Bull, 1993, 41(5): 1000~1002.
- [4] Peypoux F, Jean-Marc B, Henri L *et al.* Eur J Biochem, 1994, 224(1): 89~96.
- [5] Bonmatin J M, Genest M, Labbe H *et al.* Biopolymers, 1994, 34(7): 975~986.
- [6] Knoblich A, Matsumoto M, Ishiguro R *et al.* Colloids Surf B, 1995, 5(1/2): 43~48.
- [7] Maget-Dana R, Ptak M. J Colloid Interface Sci,

(下转第 324 页)

(上接第 353 页)

- 1992, **153**(1): 285~291.
- [8] Thimon L, Peypoux F, Wallach J *et al.* Colloids Surf B, 1993, **1**(1): 57~62.
- [9] Sheppard J D, Jumarie C, Cooper D G *et al.* Biochim Biophys Acta, 1991, **1064**(1): 13~23.
- [10] Kluge B, Vater J, Salnikow J *et al.* FEBS Lett, 1988, **231**(1): 107~110.
- [11] Menkhaus M, Ullrich C, Kluge B. J Biol Chem, 1993(1): 7678~7684.
- [12] Galli G, Rodriguez F, Cosmina P *et al.* Biochim Biophys Acta, 1994, **1205**(1): 19~28.
- [13] Fuma S, Fujishima Y, Corbell N *et al.* Nucleic Acids Res, 1993, **21**(1): 93~97.
- [14] Cosmina P, Rodriguez F, de Ferra F *et al.* Mol Microbiol, 1993, **8**(5): 821~823.
- [15] Huang C C, Ano T, Shoda M. J Ferment Bioeng, 1993, **76**(6): 445~450.