

条斑紫菜蛋白酶解产物中抗菌肽的纯化及特征

刘冬冬, 周 锋, 周楠迪, 田亚平*

江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要:以酶解产物对金黄色葡萄球菌的抑菌能力为指标, 筛选出木瓜蛋白酶并优化确定酶解条件, 酶解液中分子量在 1000 Da 以下的小分子肽类占 96.68%; 采用 DEAE-52 纤维素阴离子交换层析、Sephadex G-25 凝胶层析得到纯化的紫菜蛋白抗菌肽(LPAP); 液质联用分析该纯化抗菌肽中主要的多肽序列为 FFDD(Phe-Phe-Asp-Asp); 该 LPAP 对 G⁺ 菌和 G⁻ 菌都有抑制作用, 具有相对广谱性, 对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)为 0.25 mg/mL, 抗菌肽作用金黄色葡萄球菌的电镜照片表明其抑菌机制可能是对细胞膜的破坏作用。

关键词:紫菜; 蛋白酶; 水解产物; 抑菌肽; 分离纯化

中图分类号: Q946.1; TS254.9

文献标识码: A

Purification and Characterization of Antimicrobial Peptides from the Proteolytic Product of Laver Protein

LIU Dong-dong, ZHOU Feng, ZHOU Nan-di, TIAN Ya-ping*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In this study, papain was chosen as the hydrolyzing enzyme and the enzymatic hydrolysis conditions were optimized with the inhibitory effect of protein hydrolysate against *Staphylococcus aureus* as index. The relatively molecular weight distribution of laver enzymolysis liquid showed that laver protein with molecular weight below 1000 Da accounted for 96.68%. The laver protein antimicrobial peptides(LPAP) was purified through DEAE-52 cellulose anion exchange chromatography and Sephadex G-25 gel filtration chromatography, which was identified as a tetrapeptide FFDD(Phe-Phe-Asp-Asp) by Q-TOF-MS. This LPAP possessed a relatively broad spectrum of antibacterial activity, and showed significant growth inhibition against gram-positive bacteria and gram-negative bacteria. Minimum inhibitory concentration of LPAP against *S. aureus* was 0.25 mg/mL. The electron microscope photos of *S. aureus* impacted by antibacterial peptides revealed its antibacterial mechanism was mainly due to the destruction of cell membrane.

Key words: laver; protease; hydrolyzate; antimicrobial peptides; purification

随着抗生素的广泛使用, 抗药性微生物越来越多, 特别是 90 年代以来, 禽流感的全球性蔓延, 科学家担心家禽和各种动物的耐药性疾病会通过食物链传染给人类, 造成难治愈的病患感染, 人们开始关注高效安全的抑菌药物。抑菌肽是天然存在或蛋白经酶解产生的, 相对分子质量小于 10 kDa 的有不同抑菌活性的活性肽总称^[1]。瑞典科学家 Boman 研究果蝇时发现其经大肠杆菌和阴沟杆菌诱导时可产生天蚕素(cecropins), 这是人类历史上发现的第一个天然抗菌肽^[2], 此后从两栖动物、昆虫、微生物、

高等动物和植物中分离出多种抑菌肽。天然的抗菌肽具有较强的抑制活性和很高的安全性, 酶解法制备抗菌肽的过程温和可控, 成为近年来人们关注的热点。刘士伟等^[3]利用双酶法水解螺旋藻蛋白时, 发现酶解液经超滤和 G-25 凝胶层析得到的一种分子量为 36000 Da 的抗菌肽, 其对大肠杆菌的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)为 1.56 mg/mL。赵玲等^[4]采用复合酶处理南极磷虾时, 发现多肽的抗菌性具有相对广谱性且抗菌能力与相对分子量相关, 分子质量在 1000 ~ 3000 Da 的多肽对金黄色葡萄球菌的抑制能力最佳。这些都可以证明酶解天然产物制备抗菌肽具有很好的发展潜力。

条斑紫菜(laver)为属红藻门、原红藻纲、红毛

菜科、紫菜属,具有很高的食用和药用价值,可以治疗甲状腺肿大,降低胆固醇和预防动脉粥样硬化等。我国的海洋地区紫菜原料来源广泛丰富,目前大多仅用于制成休闲食品,对其深加工的研究开发较少。紫菜原料中蛋白含量高达 37% 左右、此外还含有多糖、纤维、VC、各种矿物质等,因此通过紫菜蛋白深度酶解获得活性物质的研究将对今后海洋资源的充分开发和利用有较好的推动作用。

抗菌肽作为一类抗菌能力强、抑菌谱广、种类多、可供选择范围广的多肽,在医药、生物农药、生物饲料添加剂、天然食品防腐剂、动植物抗病基因工程方面将有着广阔的应用前景。抗菌肽分子量小、热稳定性好、水溶性好、对人体无毒无副作用,并且可以被人体内的酶系降解、消化,保持食品营养价值、风味、结构、颜色的同时,可提高热稳定性和低温贮藏稳定性,因而可以将其作为一种新型的食品防腐剂。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

条斑紫菜,南通千鹤食品有限公司;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),江南大学食品学院保藏;氯化三苯基四氮唑, Sigma 公司;酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶,广西南宁庞博生物工程有限公司;1398 中性蛋白酶,苏柯汉生物生物工程科技有限公司;胃蛋白酶,上海生物工程有限公司;其他试剂均为国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

高速冷冻离心机 Himac CR22G (HITACHI 集团);AKTA 蛋白质分析仪(美国电气医疗集团);HH-4 型恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);旋转蒸发仪(郑州市亚荣仪器有限公司);高速冷冻离心机、真空冷冻干燥机(日本日立公司);超声破碎仪(宁波新芝生物科技生物股份有限公司);Water 600 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);HP1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

2 实验方法

2.1 紫菜蛋白的制备

紫菜粉碎(60~80 目)→干燥→正己烷脱脂(质

量体积比 1:8)→超声波破碎(底物浓度为 40g/L,缓冲液为 pH7.0,0.02 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$)→离心取上清液→硫酸铵沉淀蛋白→纳滤除盐(截留分子量为 1000 Da)

2.2 紫菜蛋白酶解条件优化

将紫菜蛋白分别用胃蛋白酶、胰蛋白酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶进行酶解,进行酶解。酶解后煮沸灭酶 15 min,用 HCl 或 NaOH(1 mol/L)调节酶解液 pH,8000 rpm 离心 15 min,测定上清液对金黄色葡萄球菌的抑菌作用,以抑菌能力为指标,选择酶解效果最好的蛋白酶,并对酶解条件底物浓度、加酶量、酶解 pH、反应温度、酶解时间进行优化。

紫菜蛋白酶解液的分子量分布:紫菜蛋白酶解液 5 mL 与 10% 的三氯乙酸 5 mL 混合均匀,静止 10 min,10000 rpm 离心 10 min 后备用。色谱条件:液相色谱柱 TSKgel 2000 SWxl(300 mm×7.8 mm,5 μm),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相水:乙腈:三氯乙酸=550:450:1(V/V),流速为 1 mL/min,进样量 5 μL ,检测波长 220 nm。分子质量校正曲线所用标准品:细胞色素(分子量为 12500),乙胺酸-乙胺酸-酪氨酸-精氨酸(分子量为 451),杆菌酶(分子量为 1450),乙胺酸-乙胺酸-乙胺酸(分子量为 189)。

2.3 LPAP 的分离纯化

2.3.1 DEAE-52 阴离子交换层析

紫菜蛋白酶解液用 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液 A (10 mmol/L, pH6.8) 稀释至 10 mg/mL,经滤膜(0.22 μm)过滤后备用。DEAE-52 阴离子交换层析柱经缓冲液 A 平衡后,上样量 10 mL,采用阶段洗脱的方式,流动相:0~74 min 用平衡液 A 洗脱,74~120 min 用含 0.2 mol/mLNaCl 的缓冲液 A 洗脱,120~200 min 用含 0.4 mol/mLNaCl 的缓冲液 A 洗脱,200~250 min 用含 0.6 mol/mLNaCl 的缓冲液 A 洗脱,流速 1 mL/min,检测波长:220 nm,收集各洗脱峰并浓缩(6 mg/mL)后进行抑菌活性测定,将抑菌活性较好的峰组分冷冻干燥备用。

2.3.2 Sephadex G-25 凝胶层析

取上步纯化的具有活性的样品溶解于超纯水中备用。Sephadex G-25 凝胶层析柱经超水平衡后,上样量 1 mL,用超纯水进行洗脱,检测波长 220 nm,流速 0.5 mL/min,收集各峰组分并浓缩(6 mg/mL)后进行抑菌活性测定,将抑菌活性较好的峰组分冷冻干燥备用。

2.3.3 蛋白酶活力测定

Folin-酚试剂法^[6]。

2.2.4 多肽含量测定

双缩脲法^[6]。

2.4 LPAP 的抑菌谱研究

将具有抑菌作用的紫菜蛋白酶解产物分别对金黄色葡萄球菌、地衣芽孢杆菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌等菌种做抑菌活性检测。采用琼脂平板扩散法测定抑菌活性^[5]。

2.5 测定 LPAP 对金黄色葡萄球菌的 MIC

分析方法:改良的微量稀释法^[7]。

2.6 LPAP 的效价测定

为了测定 LPAP 的效价,采用已知效价的氨苄青霉素和硫酸卡那霉素作对照,分别配制不同浓度的抗生素溶液,滤膜除菌后与 2 mg/mL 抗菌肽在标准条件下进行抑菌作用测定,通过比较各自形成抑菌圈直径大小,计算 LPAP 的抗菌效价。

2.7 LPAP 的质谱分析

取 G-25 凝胶纯化的样品溶于超纯水中,用滤膜(0.22 μm)过滤备用。色谱条件:液相色谱分析柱 BEH (2.1 mm × 100 mm);流动相:A,超纯水,0.2% 甲酸(V/V);B,乙腈,0.2% 甲酸(V/V);洗脱程序:梯度洗脱,流速 0.3 mL/min,0 ~ 15 min 100% A,15 ~ 20 min 100% ~ 0% A;柱温:30 °C,检测器:WATERS ACQUITY PDA,检测波长 220 nm;质谱条件:检测电压 1.6 KV;离子方式 ESI⁺;碰撞能量 70 V;离子源温度 100 °C;毛细管电压 2500 V;锥孔气体流量 50 L/h;锥孔电压 30 V;核质比扫描范围 50 ~

3000 m/z;脱溶剂气体流量 60 L/min,脱溶剂气体温度 250 °C。

2.8 LPAP 对金黄色葡萄球菌抑制机理分析

以正常生长的金黄色葡萄球菌为空白对照组,以添加 2 mg/mL LPAP 的金黄色葡萄球菌为实验组,分析两组实验的电镜图^[10]。

3 结果与分析

3.1 紫菜蛋白酶解条件优化

以酶解产物对金黄色葡萄球菌的抑菌能力为指标,如图 1 所示紫菜蛋白经木瓜蛋白酶水解后具有较明显的抑菌作用,因此选用木瓜蛋白酶作为酶解用酶,并通过优化确定酶解紫菜蛋白的条件为底物浓度 5%、木瓜蛋白酶加酶量 4000 U/g、pH6.5、温度 65 °C、反应时间 4 h。

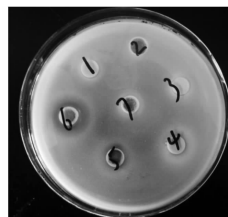


图 1 紫菜蛋白经不同蛋白酶水解的抑菌效果

Fig. 1 Antibacterial results of different hydrolysates of *Laver* protein

注:1. 胃蛋白酶;2. 胰蛋白酶;3. 酸性蛋白酶;4. 中性蛋白酶;5. 碱性蛋白酶;6. 木瓜蛋白酶;7. 未水解

Note:1. Pepsin;2. Trypsin;3. Acidic protease;4. Neutral protease;5. Basic protease;6. Papain;7. No enzyme

采用液相色谱柱 TSKgel 2000 SWxl 对酶解产物的分子量进行了分析,结果如图 2。

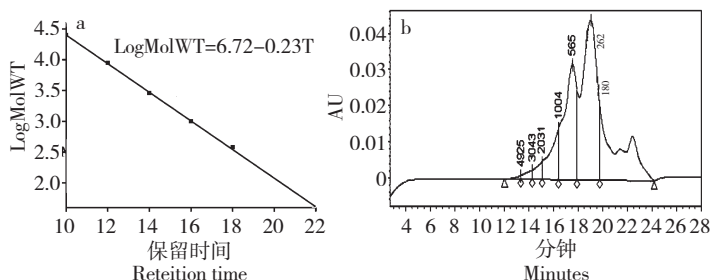


图 2 标准样品分子量对数与 HPLC 保留时间曲线 (a) 及紫菜酶解液分子量分布 (b)

Fig. 2 Regression curve of the logarithm of standard sample molecular mass vs HPLC retention time (a) and the molecular weight distribution of *Laver* hydrolysate (b)

通过图 2(a)可以看出标准样品的相对分子质量的对数值与其洗脱保留时间成很好的线性关系 ($R^2 = 0.9993$)。通过观察图 2(b)可以看出,紫菜

蛋白经木瓜蛋白酶酶解 4 h 后,得到的紫菜蛋白酶解液中主要为分子量在 1000 Da 以下的小分子肽类,比例达 96.68%,其中 600 Da 以下达 88.91%,

木瓜蛋白酶水解后多肽分布较集中。

3.2 LPAP 的分离纯化

选用 DEAE 52 阴离子交换层析对紫菜蛋白酶解液进行分离,收集阴离子交换层析柱洗脱的各个峰组分(图 3a),富集浓缩后测定它们的抑菌能力,只有峰 b 有抑菌活性(图 3b)。Sephadex G-25 凝胶层析进一步分离组分 b(图 3c),收集所出的两个峰

组分富集浓缩后测定它们的抑菌能力,结果显示仅 b₂ 有抑菌活性,收集峰 b₂ 冷冻干燥,得到纯化的 LPAP。

3.3 LPAP 的性质鉴定

3.3.1 LPAP 的抑菌谱研究

将酶解紫菜蛋白制备的抗菌肽,在标准条件下对各种指示菌株做抑菌实验(表 1)。

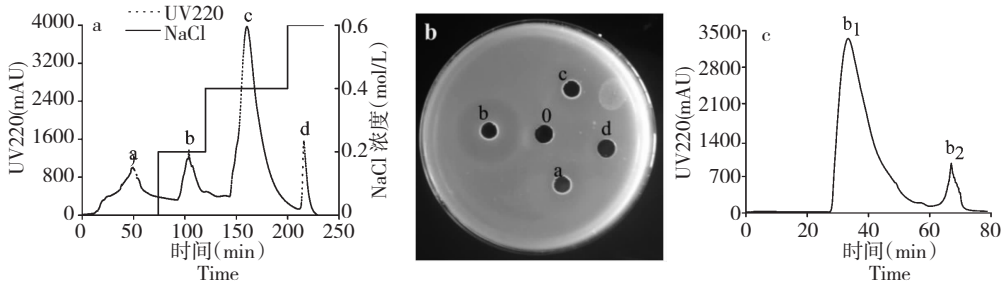


图 3 DEAE-52 离子交换层析图谱 (a);层析出峰各分部的抑菌效果 (b) 及 Sephadex G-25 层析图谱 (c)

Fig. 3 DEAE-52 anion exchange chromatogram (a), the bacteriostatic spectrum of the four fractions (b) and Sephadex G-25 chromatogram (c)

表 1 LPAP 的抑菌谱

Table 1 Antibacterial spectrum of LPAP

	实验菌株 Experimental strains	抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter (mm)
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria	地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	12.6
	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	9.9
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	22.0
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	26.2

结果表明紫菜蛋白经木瓜蛋白酶水解制备的抗菌肽对 G⁻ 菌和 G⁺ 菌均产生了抑菌作用,说明了此种抗菌肽具有广谱抑菌作用。可能是抑菌肽和不同类型细菌结合机制不同,导致抑菌效果不同,此种抗菌肽对 G⁻ 菌抑菌效果低于 G⁺ 菌。

3.3.2 测定 LPAP 对金黄色葡萄球菌 MIC

采用改良的微量稀释法测定 LPAP 对金黄色葡萄球菌的 MIC,以氯化三苯基四氮唑 (TTC) 为指示

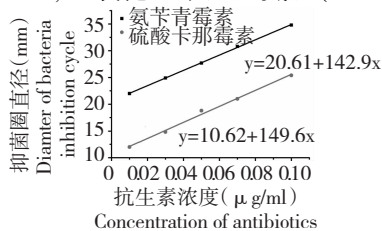


图 4 氨苄青霉素与硫酸卡那霉素的抑菌能力

Fig. 4 Antibacterial power of ampicillin and kanamycin monosulfate

剂^[8]。通过计算得出 LPAP 的 MIC 为 0.25 mg/mL。与刘士伟等^[3] 酶解螺旋藻制备的抗菌肽的 MIC 为 1.56 mg/mL 相比,LPAP 的抗菌作用较强。

3.3.3 LPAP 抑菌效价测定

采用已知效价的氨苄青霉素和硫酸卡那霉素作为紫菜抗菌肽的阳性对照,将不同浓度的抗生素与 2 mg/mL 的 LPAP 进行抑菌活性大小测定,根据抑菌圈直径来测定 LPAP 的抑菌效力^[9],测定结果显示,纯化后所得的紫菜蛋白抗菌肽 (2 mg/mL) 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果与分 36 μg/mL 氨苄青霉素和 100 μg/mL 硫酸卡那霉素的抑菌效果相当。

3.3.4 LPAP 质谱分析

纯化后的 LPAP 经过液质联用 (LC-MS) 得到的总离子流图与溶剂本身的图谱对比,去除溶剂本身所产生的离子流峰,发现紫菜酶解抗氧化肽的主要离子峰为 1.186 min 的信号峰 m/z 543.3,表明该抗

氧化肽带一个正电荷的质谱信号,且该抗氧化肽相对分子质量为 542.3,其他的峰主要为碎片峰。根据氨基酸和肽的分子离子质量数使用 Profiling Solution 分析软件与质谱中信息进行匹配分析,推测出此 LPAP 中主要的多肽序列是由苯丙氨酸、天冬氨酸组成,其氨基酸序列为:FFDD (Phe-Phe-Asp-Asp)。

3.3.5 LPAP 对金黄色葡萄球菌抑制机理分析

通过图 6 可以看出,未添加抗菌肽的金黄色葡萄球菌正常生长,而加入抗菌肽 7 h 后金黄色葡萄球菌的膜变的模糊和破裂,部分细胞质流出细胞外,说明此紫菜酶解抗菌肽 LPAP 可能是通过破坏金黄色葡萄球菌的细胞膜使其无法正常生长^[10]。

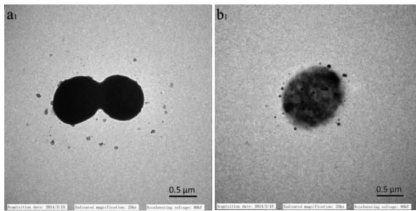


图 6 金黄色葡萄球菌的透射电镜图(a_1 为对照, b_1 为实验组)

Fig. 6 The transmission electron microscopic images of *S. aureus* before (a_1) and after (b_1) treated with antibacterial peptides

4 结论

条斑紫菜经木瓜蛋白酶在一定条件下可控酶解后,得到水解产物对金黄色葡萄球菌具有较强抑菌作用;通过 DEAE-52 阴离子交换层析、Sephadex G-25 凝胶层析得到纯化的 LPAP;液质联用分析此纯化抗菌肽中主要的多肽序列为 FFDD (Phe-Phe-Asp-Asp);该 LPAP 对 G^+ 菌和 G^- 菌都有抑制作用,具有相对广谱性,对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.25 mg/mL。2 mg/mL 抗菌肽的作用效果与分别用 36 μ g/mL 氨苄青霉素和 100 μ g/mL 硫酸卡那霉素产生的效果相当,抗菌肽作用于金黄色葡萄球菌后的电镜照片表明其抑菌机制可能是对细胞膜的破坏作用。

LPAP 属于天然产物、易于获得、分子量小,符合作为食品防腐剂的要求。紫菜蛋白酶解深加工获得抗菌肽 LPAP 的研究为海洋原料的深度开发提供了新思路。

参考文献

- 1 Gu RZ, Li CY, Liu WY, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low molecular weight peptides from Atlantic salmon skin. *Food Res Int*, 2011, 44:1536-1540.
- 2 Boman HG, Nilsson I, Rasmuson B. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature*, 1972, 237:232-235.
- 3 Liu SW (刘士伟). Preparation and separation of degradable peptide from *Spirulina* protein and research of antibacterial property. Beijing: Beijing Forestry University (北京林业大学), MSc. 2011.
- 4 Zhao L (赵玲), Cao R (曹荣), Liu Q (刘洪), *et al.* Antimicrobial activity of polypeptides from Antarctic krill. *Progress Fish Sci* (渔业科学进展), 2011, 32:112-116.
- 5 Zhou YF (周雨凡), Wang JH (王蓟花), Liu ZL (刘志龙), *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of the leaf essential oil of *Platycladus orientalis*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23:620-624.
- 6 Cai XY (蔡海燕), Zhou XH (周小华). Primary research of preparation and anti-micelle extracting about ginger protease. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 16:543-547.
- 7 Wu XY (邬晓勇), He G (何刚), Yan J (颜军). Study on determinations of antibacterial activity of antimicrobial peptides. *Bull Biol* (生物学通报), 2011, 46(4):44-47.
- 8 Nichols M, Kuljanin M, Nategholeslam M, *et al.* Dynamic turn conformation of a short tryptophan-rich cationic antimicrobial peptide and its interaction with phospholipid membranes. *J Phys Chem B*, 2013, 117:14697-14708.
- 9 Seo JK, Lee MJ, Jung HG, *et al.* Antimicrobial function of SH β AP, a novel hemoglobin β chain-related antimicrobial peptide, isolated from the liver of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 37:173-183.
- 10 Zhao L, Yin B, Liu Q, *et al.* Purification of antimicrobial peptide from Antarctic Krill (*Euphausiasuperba*) and its function mechanism. *J Ocean Univ China*, 2013, 12:484-490.