

## 南极磷虾酶解多肽的抑菌活性

赵玲<sup>1,2</sup> 曹荣<sup>2</sup> 刘淇<sup>2\*</sup> 魏玉西<sup>1\*</sup> 薛勇<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>青岛大学生物系, 266071)

(<sup>2</sup>中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘要** 选用复合酶酶解南极磷虾, 对酶解多肽进行多肽含量及相对分子质量分布测定。采用滤纸片法筛选南极磷虾酶解多肽及各分级别分对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、四联微球菌、大肠杆菌、啤酒酵母和副溶血弧菌 6 种菌的抑菌活性。结果表明, 该法所得的南极磷虾酶解多肽的含量达 81.44%, 相对分子质量范围为 254~10 000; 酶解多肽对金黄色葡萄球菌有明显的抑菌活性, 且分级别分Ⅲ ( $1.0 \times 10^3 < Mr < 3.0 \times 10^3$ ) 的抑菌效果明显优于其他级分。

**关键词** 南极磷虾 多肽 抑菌活性

**中图分类号** Q954.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)04-0112-05

## Antimicrobial activity of polypeptides from Antarctic krill

ZHAO Ling<sup>1,2</sup> CAO Rong<sup>2</sup> LIU Qi<sup>2\*</sup> WEI Yu-xi<sup>1\*</sup> XUE Yong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Biology Department, Qingdao University, 266071)

(<sup>2</sup> Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** In the paper, combined enzymes were used for the hydrolysis of Antarctic krill *Euphausia superba* to obtain polypeptides, and the polypeptides contents and molecular weight distribution were determined by biuret method and liquid chromatography respectively. The antimicrobial activity of peptides and different molecular-weight fractions of polypeptides to six strains including *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus tetragenus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Vibrio parahaemolyticus* was carried out by the filter paper method. The results showed that polypeptides contents of the hydrolysate was 81.44% and the range of peptides molecular weight was 254~10 000. The polypeptides from Antarctic krill presented obvious antibacterial activity to *S. aureus*, and fraction Ⅲ ( $Mr < 3.0 \times 10^3$ ) showed the strongest antimicrobial activity.

**KEY WORDS** Antarctic krill Polypeptide Antimicrobial activity

磷虾, 是一类多年生的海洋浮游甲壳动物, 属节肢动物门、甲壳纲、磷虾目(刘 丽等 2010), 体形似小虾, 体长 1~2 cm, 最大的可达 7 cm, 几乎在整个南极海域都有分布。南极磷虾 *Euphausia superba* 通常是指南极大磷虾, 据估计南极磷虾的生物量为 6.5~10.0 亿 t(陈雪忠等 2010), 因其巨大的生物量和潜在的渔业资源

国家 863 计划项目(2011AA090801)和农业部“南极海洋生物资源开发利用”项目共同资助

\* 通讯作者。E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn; yuxiw729@163.com

收稿日期: 2011-01-25; 接受日期: 2011-02-27

作者简介: 赵 玲(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物检测与控制研究。E-mail: zhaoling922@sina.com

价值,以及在南极生态系统中所占据的特殊地位而日益受到人们的注意。南极磷虾不但资源巨大,而且营养价值高,具有高蛋白、低脂肪及丰富的矿物质元素(孙雷等 2008)。研究表明,南极磷虾含有多种活性物质,如抗高血压肽(Hatanaka *et al.*, 2009)、紫外屏蔽物质(孙松等 2001)、极性脂(孙松等 2001)、虾青素(刘丽等 2010)、甲壳素(刘丽等 2010)等,但目前尚未见对其酶解多肽抑菌活性研究的报道。本文旨在对南极磷虾酶解多肽进行多肽含量和相对分子量分布分析,并在分子量分级的基础上对酶解多肽各级分进行抑菌活性筛选。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 南极磷虾

南极磷虾由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供,2010年采自大西洋海区西侧的 Scotia 海域。

#### 1.1.2 供试菌种

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草杆菌 *Bacillus subtilis*、四联微球菌 *Micrococcus tetragenus*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 和啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由青岛大学生物系提供,副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 由中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋食品工程实验室提供。

#### 1.1.3 主要仪器

Millipore Labscale 小型切向流超滤系统,美国 Millipore Bioprocess Division Billerica Massachusetts; MSC300 超滤杯,上海摩速科学器材有限公司;紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;冷冻离心机,德国 Eppendorf;凝胶成像系统,上海天能科技有限公司;旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司;真空冷冻干燥机,丹麦 Scanlaf 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酶解多肽的制备与分级纯化

南极磷虾解冻、沥干,经均质器破碎后用复合酶(中性蛋白酶:胰蛋白酶=1:1)酶解,酶解液分别用乙酸乙酯、正丁醇萃取,待酶解液澄清后除去有机相,先经旋转蒸发除去残留的有机溶剂,再经离心取上清液,即得南极磷虾酶解多肽溶液。将此多肽溶液用 Labscale™ TFF System、MSC300 超滤杯进行超滤分级、减压浓缩,得到按分子量大小分成的3个级分样品:级分 I ( $5.0 \times 10^3 < Mr < 1.0 \times 10^4$ ),级分 II ( $3.0 \times 10^3 < Mr < 5.0 \times 10^3$ ),级分 III ( $Mr < 3.0 \times 10^3$ )。各级分溶液经冷冻干燥即得粉末状固体样品。

#### 1.2.2 多肽含量测定

参照文献(陈雅蕙等 2005)并做适当改进,采用双缩脲法测定南极磷虾酶解多肽溶液中多肽含量,以牛血清白蛋白为标准,按表1所示加入试剂,平行做3组;取1ml待测液加入6% NaOH 1.5 ml 和 0.15 ml 双缩脲试剂,充分混合后室温(20~25 °C)下放置30 min后,在310 nm处测各溶液的吸光度(徐娟等 2010)。

表1 标准曲线加样

Table 1 The reagent recipe for the standard curve

编号 Number	0	1	2	3	4	5	编号 Number	0	1	2	3	4	5
1mg/ml 标准蛋白溶液(ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	6%氢氧化钠溶液(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
去离子水(ml)	1.5	1.3	1.1	0.9	0.7	0.5	双缩脲试剂(ml)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15

#### 1.2.3 液相色谱分析酶解多肽相对分子量分布

取南极磷虾酶解多肽用流动相溶解,0.45 μm 膜过滤后上柱,记录出峰时间,求出酶解多肽的相对分子量。层析条件:色谱柱(TSK gel 2500 PWXL 300 mm × 7.8 mm),柱温 40 °C,以乙腈/水/三氟乙酸,50/50/0.1(V/V/V)为流动相,流速 0.5 ml/min,在波长 220nm 下测定。

### 1.2.4 培养基制备

YEPD培养基(沈萍等 1999):葡萄糖 20 g、蛋白胨 20 g、酵母粉 10 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 ml, pH 6.0, 该培养基用于啤酒酵母的培养。

牛肉膏蛋白胨琼脂(沈萍等 1999):牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 15 g 和蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.2, 该培养基用于金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、四联微球菌、大肠杆菌的培养。

ZoBell2216E 琼脂(张士瑾等 1998):蛋白胨 5 g、酵母膏 1 g、磷酸铁 0.1 g、琼脂 15g 和过滤陈海水 1 000ml, 调 pH 为 7.6~7.8, 该培养基用于副溶血弧菌的培养。

### 1.2.5 实验样品准备

将南极磷虾酶解多肽及各级分分别配成一定浓度溶液即为供试样品, 4℃保存。实验前将各供试样品经 0.22 μm 孔径无菌过滤器过滤除菌(刘蕾等 2010), 由于分子量最小的级分可能含有氯化钠等小分子化合物, 故配制 5%氯化钠作对照(郭奇等 2010)进行以下实验。

### 1.2.6 酶解多肽及各级分抑菌活性测定

参考文献(Bulet *et al.* 1991)并做适当改进, 采用滤纸片法(唐裕芳等 2005)筛选南极磷虾酶解多肽及各级分的抑菌活性。取无菌培养皿, 迅速倒入灭菌后冷却至 45℃左右的培养基 20 ml, 并快速而轻巧地晃动培养皿, 平置冷却备用。用生理盐水将活化好的金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、四联微球菌、大肠杆菌、啤酒酵母和副溶血弧菌 6 种菌株, 分别配制成一定浓度( $10^8 \sim 10^9$  CFU/ml)的菌悬液。取 100 μl 菌悬液注入冷却好的培养基上, 用涂布棒将其涂抹均匀(沈萍等 1999; 郭道森等 2005)。在直径 3 mm 的滤纸片上加待测样品 10 μl, 平行做 3 组。加样后, 枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和四联微球菌置于 37℃培养 24 h, 测量抑菌圈直径; 副溶血弧菌和啤酒酵母置于 28℃培养 48 h, 测量抑菌圈直径, 取所测抑菌圈直径的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 多肽含量测定结果

凡具有两个酰胺基或两个直接连接的肽键, 或能通过一个中间碳原子相连的肽键, 这类化合物都有双缩脲反应(刘扬等 2008), 即双缩脲法可测定含两个(包括两个)以上肽键的多肽的含量。吸光度与蛋白含量的标准曲线见图 1, 回归方程  $y=0.6331x+0.0198$ 。经测定, 0.48 mg/ml 的南极磷虾酶解多肽的吸光度为 0.279, 则对应多肽含量为 0.3909 mg/ml, 由此可计算出南极磷虾酶解多肽样品中多肽质量分数为:  $0.3909/0.48 \times 100\% = 81.44\%$ 。

### 2.2 酶解多肽相对分子质量分布情况

图 2 为南极磷虾酶解多肽分子量测定液相色谱图。首先, 根据标准蛋白质相对分子量及其对应的出峰时间,

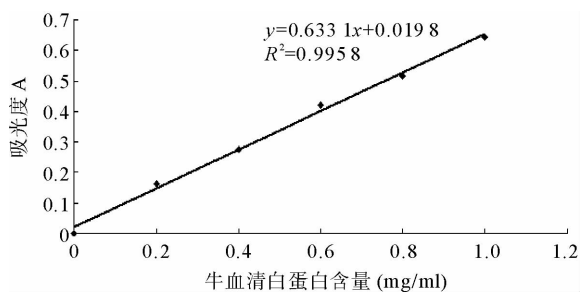


图 1 蛋白含量标准曲线

Fig. 1 The standard curve for protein content

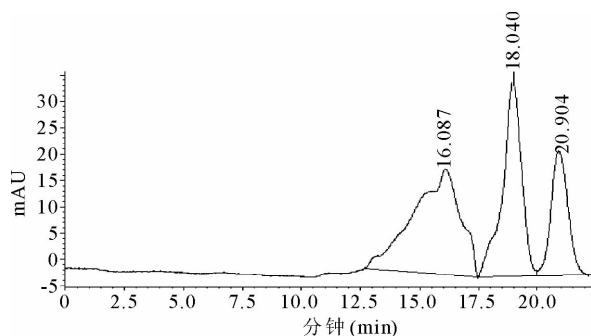


图 2 南极磷虾酶解多肽分子量分布液相色谱

Fig. 2 The liquid chromatography of molecular weight distribution for polypeptides from Antarctic krill *E. superba*

求出相对分子质量标准曲线为:  $\text{Log}Mr = 7.0118 - 0.2743t$ , 再用待测酶解多肽上柱, 记录出峰时间, 从标准曲线可求出酶解多肽的相对分子质量。经计算, 相对分子质量大于 1 000 的组分占 46.04%, 相对分子质量为 903 的组分占 34.60%, 相对分子质量为 254 的组分占 19.36%, 南极磷虾酶解多肽相对分子质量范围为 254~10 000。

## 2.3 酶解多肽及其各分级级分的抑菌活性

### 2.3.1 酶解多肽抑菌活性筛选

以浓度为 80 mg/ml 的酶解多肽溶液进行滤纸片法抑菌活性测定。结果表明, 在受试菌中, 南极磷虾酶解多肽仅对金黄色葡萄球菌的生长有明显抑制作用, 其抑菌圈直径为 38mm。对枯草杆菌、大肠杆菌、四联微球菌、啤酒酵母和副溶血弧菌无明显抑制作用。

### 2.3.2 不同浓度酶解多肽对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

10、20、40、80 mg/ml 浓度的南极磷虾酶解多肽对金黄色葡萄球菌的抑菌活性结果见图 3。从图 3 可以看出, 随着酶解多肽浓度的增加, 其抑菌圈逐渐增大, 表明其抑菌活性也逐渐增强。

### 2.3.3 不同级分酶解多肽对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

级分 I ( $5.0 \times 10^3 < Mr < 1.0 \times 10^4$ )、级分 II ( $3.0 \times 10^3 < Mr < 5.0 \times 10^3$ ) 和级分 III ( $Mr < 3.0 \times 10^3$ ) 3 个级分样品在浓度均为 10 mg/ml 时对金黄色葡萄球菌的抑菌效果见图 4。经测量, 级分 III ( $Mr < 3.0 \times 10^3$ ) 的抑菌圈最大 (10 mm), 级分 II ( $3.0 \times 10^3 < Mr < 5.0 \times 10^3$ ) 的抑菌圈次之 (9 mm)。而级分 I ( $5.0 \times 10^3 < Mr < 1.0 \times 10^4$ ) 则无明显抑菌活性。

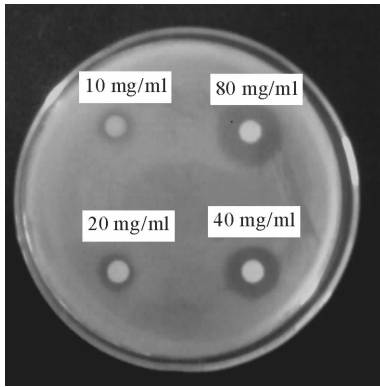


图3 不同浓度酶解多肽对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Fig. 3 The antimicrobial activity of polypeptide at different concentration to *S. aureus*

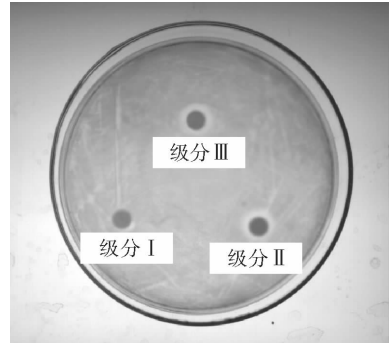


图4 各分级级分对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Fig. 4 The antimicrobial activity of each fraction to *S. aureus*

## 3 讨论

目前, 国内外对南极磷虾的研究主要集中在食品、饲料(吴伟平等 2010)等行业的加工工艺, 而对其活性物质的研究较少, 目前未见对其酶解多肽抑菌活性研究的报道。随着人们对更多海洋动物的抗菌肽结构和功能研究的深入, 抗菌肽不但可以替代抗生素, 还可以作为饲料的添加剂(王明昌等 2008)。尽管目前仍有很多问题需要解决, 如抗菌肽分子量比较小, 在生产过程中其分离纯化比较困难, 很难得到纯度较高的产品(肖建光等 2005)。但是随着分离纯化技术的进步, 这些问题将逐步被解决, 其应用前景十分广阔。

本研究通过将南极磷虾酶解、萃取、离心、冷冻干燥得到酶解多肽固体样品。抑菌试验结果表明, 南极磷虾酶解多肽对金黄色葡萄球菌有明显的抑菌作用, 且随着酶解多肽浓度的增加, 抑菌作用逐渐增强。经超滤分级获得的 3 个级分中, 级分 III ( $Mr < 3.0 \times 10^3$ ) 的抑菌效果优于其他组分。关于该级分的分离纯化及其抑菌机理

等有待于进一步研究。南极磷虾生长环境特殊且资源丰富,进行其抑菌活性肽的研究、开发,对南极磷虾资源的高值化利用具有重要意义。

## 参 考 文 献

- 王明昌,侯林,董长永,隋娜,张筠,李妍. 2008. 海洋动物抗菌肽的研究进展. 安徽农学通报, 14(5): 25~26, 24
- 孙雷,周德庆,盛晓风. 2008. 南极磷虾营养评价与安全性研究. 海洋水产研究, 29(2): 57~64
- 孙松,严小军. 2001. 南极大磷虾的生物活性物质及其用途研究进展. 极地研究, 13(3): 213~216
- 刘蕾,魏玉西,王长云,郭奇,万慧一,赵玲. 2010. 侧扁软柳珊瑚(*Subergorgia suberosa*)乙醇提取物抗氧化和抑菌活性研究. 海洋科学, 34(9): 19~22
- 刘丽,刘承初,赵勇,王锡昌,李加乐. 2010. 南极磷虾的营养保健功效以及食用安全性评价. 食品科学, 31(17): 443~447
- 沈萍,范秀榕. 1999. 微生物学实验(第三版). 北京:高等教育出版社, 214~230
- 张士璿,范晓. 1998. 海洋生物技术原理和应用. 北京:海洋出版社, 10~11
- 肖建光,刘文生. 2005. 水产动物抗菌肽的研究进展. 水利渔业, 25(1): 4~5
- 吴伟平,谢营樑. 2010. 南极磷虾及磷虾渔业. 现代渔业信息, 25(1): 10~13
- 郭奇,魏玉西,殷邦忠,刘淇,刘蕾. 2010. 鼠尾藻多酚分级组分的抑菌活性研究. 渔业科学进展, 31(1): 117~122
- 郭道森,魏玉西,李丽. 2005. 毛蚶血浆中抗菌蛋白的纯化及抗菌活性研究. 海洋科学, 29(3): 25~29
- 陈雪忠,徐兆礼,黄洪亮. 2009. 南极磷虾资源利用现状与中国的开发策略分析. 中国水产科学, 16(3): 451~458
- 陈雅蕙. 2005. 生物化学实验原理和方法(第二版). 北京:北京大学出版社, 232~235
- 徐娟,吕嘉彬. 2010. 乳蛋白水解液中多肽含量测定方法的研究. 食品科技, 35(12): 275~278
- 唐裕芳,张妙玲,冯波,陈权,刘新乐,邓孝平. 2005. 茶多酚的抑菌活性研究. 浙江林学院学报, 22(5): 553~557
- Bulet, P., Cociancich, S., and Dimarcq, J. 1991. Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. Biol. Chem. 266 (36): 24 520~24 525
- Hatanaka, A., Miyahara, H., Suzuki, K. I., and Sato, S. 2009. Isolation and identification of antihypertensive peptides from Antarctic krill. Food Science, 74(4): 116~120