

条斑紫菜蛋白酶解多肽的抑菌活性*

宋惠平 于佳 李钊 魏玉西^① 王文秀 许丽娜 韩丹

(青岛大学生命科学学院 青岛 266071)

摘要 以条斑紫菜为原料,分别提取水溶、酸溶、碱溶、盐溶性蛋白质,并用6种蛋白酶酶解,将所得24种酶解物采用琼脂孔穴扩散法对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、四联微球菌(*Micrococcus tetragenus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)以及大肠杆菌(*Escherichia coli*)4种菌进行抑菌活性测定。结果显示,水溶性胃蛋白酶酶解物的抑菌活性最优。将水溶性蛋白质经硫酸铵沉淀以及超滤分级,比较不同饱和度和硫酸铵沉淀所得蛋白质酶解物以及不同分子量多肽的抑菌效果。结果显示,水溶性蛋白在硫酸铵饱和度为40%、50%时沉淀所得蛋白的胃蛋白酶酶解物中,相对分子质量小于5 kDa的级分抑菌效果最为明显。此外,对该级分进行了抑菌活性影响因素的初步研究,结果表明该级分热稳定性以及酸碱稳定性均较好,有望开发为天然的食品防腐剂。

关键词 条斑紫菜;水溶性蛋白质;胃蛋白酶;多肽;金黄色葡萄球菌;抑菌活性
中图分类号 S985 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0140-06

紫菜(*Porphyra*)属红藻门(Rhodophyta)、红毛菜科(Bangiaceae),广泛分布于从寒带到亚热带的潮间带水域(Niwa *et al.*, 2009)。条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)是我国重要的经济海藻之一。研究表明,条斑紫菜主要成分是蛋白质(含量高达36.31%)和多糖(冯琛等, 2004; 范晓等, 1993; 高淑清等, 2004)。目前,国内外有关紫菜营养与活性功能的研究主要集中在紫菜多糖,对于紫菜蛋白的关注相对较少(朱晓君等, 2008; 闫建忠等, 2005; 刘青梅等, 2005)。

随着致病菌抗药性问题日益突出,寻找全新类型的抗生素是解决抗药性问题的一条有效途径。由于目前已发现的抗菌肽存在资源有限、活性不足或合成成本高等问题(刘石宝等, 2011; Li *et al.*, 2013),部分抗菌肽具有抵抗胰蛋白酶或胃蛋白酶水解的能力(刘静等, 2006),由特定酶降解蛋白质已明确成为生物活性肽的来源(Hend *et al.*, 2012)。目前,国内外对条斑紫菜的加工还主要停留在初加工上,亟待进行高值化利用。本研究拟从条斑紫菜中提取不同溶解性蛋白质,并在初步纯化的基础上,进行酶解多肽的抑菌活性筛选及其影响因素研究,为条斑紫菜蛋白作为食品防腐剂的新来源提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

条斑紫菜购自江苏连云港,供试菌种:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、四联微球菌(*Micrococcus tetragenus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)以及大肠杆菌(*Escherichia coli*)均由青岛大学生命科学学院微生物学实验室提供。胃蛋白酶为Solarbio产品,活力单位为800–2500 U/mg。

1.2 主要仪器与设备

DXF-10A型多功能摇摆式粉碎机(广州市大祥电子机械设备有限公司)、JY92-II超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)、GL-20G-II高速冷冻离心机(Hitachi)、Labscale小型切向流超滤系统(Millipore)、Sartorius PB-10(赛多利斯科学仪器有限公司,北京)、真空冷冻干燥机(丹麦Scanlaf公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 条斑紫菜预处理 将干紫菜用粉碎机粉碎后过40目筛、密封,4℃避光保存。

* 山东省自然科学基金(ZR2012DM014)资助。宋惠平, E-mail: 919323479@qq.com

^① 通讯作者: 魏玉西, 教授, E-mail: yxwei@qdu.edu.cn

收稿日期: 2014-08-14, 收修改稿日期: 2014-09-19

1.3.2 条斑紫菜蛋白粗提液制备 准确称取一定量的紫菜粉,按 1:50(w/w)加入蒸馏水,溶胀 1-2 d, -20℃、4℃反复冻融两次,机械搅拌,超声波破碎后高速冷冻离心 15 min,上清液即为水溶性蛋白粗提液;沉淀物加入适量 0.1 mol/L NaCl 溶液,搅拌 10 min 后离心,上清液即为盐溶性蛋白粗提液。按照相同方法依次提取酸溶性和碱溶性蛋白粗提液。各蛋白质粗提液分别以 20%-80%饱和度硫酸铵沉淀其中蛋白质,过滤,将沉淀透析除去硫酸铵,冻干得 4 种目的蛋白。

1.3.3 条斑紫菜蛋白酶解多肽抑菌活性初筛 准确称取等量 4 种条斑紫菜蛋白,分别溶于等体积不同 pH 磷酸盐缓冲液中,80℃水浴 10 min 以破坏蛋白质的空间结构,使其变得松散易于酶切(刘石宝等,2011)。分别用胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、酸性蛋白酶和复合蛋白酶在各自最适的酶解条件下(表 1)酶解 3 h,采用琼脂孔穴扩散法分别将酶解物进行抑菌活性测定,筛选出最佳指示菌和具最佳抗菌活性酶解物对应蛋白质和蛋白酶。

表 1 6 种蛋白酶最适反应条件

Tab.1 The best reaction conditions of the six proteases

酶 Enzymes	胰蛋白酶 Trypsin	胃蛋白酶 Pepsin	复合蛋白酶 Compound protease	中性蛋白酶 Neutral protease	木瓜蛋白酶 Papain	酸性蛋白酶 Acid protease
pH	8.1	1.8	6.0	6.5	6.5	2.5-3.5
温度 Temperature(℃)	50	37	55	50	55	40-50
反应时间 Reaction time(h)	3	3	3	3	3	3

1.3.4 硫酸铵盐析分级和活性筛选 条斑紫菜蛋白质的硫酸铵盐析分级方法参照张龙翔等(1997)进行。将上述筛选出的条斑紫菜蛋白质溶液进行硫酸铵分级沉淀(硫酸铵饱和度分别为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%),4℃静置过夜,离心得沉淀。将蛋白沉淀再经透析除盐,制成冻干粉。取适量分别酶解后进行抑菌活性测定,筛选出最佳抑菌活性酶解多肽对应的分级蛋白质。

1.3.5 超滤分级和活性筛选 采用 Labscale 小型切向流超滤系统(Labscale TFF System)对上述分级蛋白质的酶解液进行超滤,按相对分子质量<5 kDa、5-10 kDa、10-50 kDa、50-100 kDa 和>100 kDa 分级,将各相对分子质量段酶解多肽液冷冻干燥得冻干粉,筛选出对指示菌的抑菌活性最强的肽段(抗菌多肽)。

1.4 条斑紫菜抗菌多肽抑菌活性

1.4.1 不同温度处理对条斑紫菜蛋白抗菌多肽抑菌效果的影响 将浓度为 50 mg/ml 的条斑紫菜抗菌多肽液分别放入 10、30、50、70、90 和 100℃的恒温水浴中处理 30 min,以室温 18℃为对照,处理后立即冷却到 4℃,10000 r/min 离心 20 min,取上清液,采用琼脂孔穴扩散法测定不同温度处理后对金黄色葡萄球菌的抑制作用。每个样品设 3 个平行实验,结果取平均值。

1.4.2 不同 pH 对条斑紫菜蛋白抗菌多肽抑菌效果的影响 将浓度为 50 mg/ml 的多肽溶液分别调节 pH 至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,

采用琼脂孔穴扩散法测定不同 pH 处理后对金黄色葡萄球菌的抑制作用。每个样品设 3 个平行实验,结果取平均值。

1.4.3 条斑紫菜蛋白抗菌多肽液浓度对抑菌效果的影响 多肽液初始浓度为 80 mg/ml,采用二倍稀释法依次稀释(冯自立等,2014),至最小浓度为 10 mg/ml,采用琼脂孔穴扩散法测定抑菌活性,37℃恒温培养。设平行 3 个平行实验,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 条斑紫菜中不同溶解性蛋白质酶解物的抑菌活性

条斑紫菜中蛋白质种类很多。本研究将原料经超声波处理后,依次用水、盐、酸和碱溶液提取,对金黄色葡萄球菌、四联微球菌、枯草杆菌以及大肠杆菌 4 种实验细菌的抑制结果见图 1-图 4。不同溶解性蛋白质采用不同蛋白酶酶解所得酶解多肽液对 4 种受试菌均有一定的抑制作用,但以胃蛋白酶酶解水溶性蛋白所得多肽液对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最为明显。因此,后续实验选取胃蛋白酶作为水解酶,金黄色葡萄球菌作为指示菌,对条斑紫菜水溶性蛋白进行初步纯化及其酶解多肽进行分级和活性影响因素研究。

2.2 硫酸铵盐析分级及抑菌活性筛选结果

不同饱和度中性盐对同一种蛋白质具有不同的盐析效果。条斑紫菜水溶性蛋白质硫酸铵盐析结果如

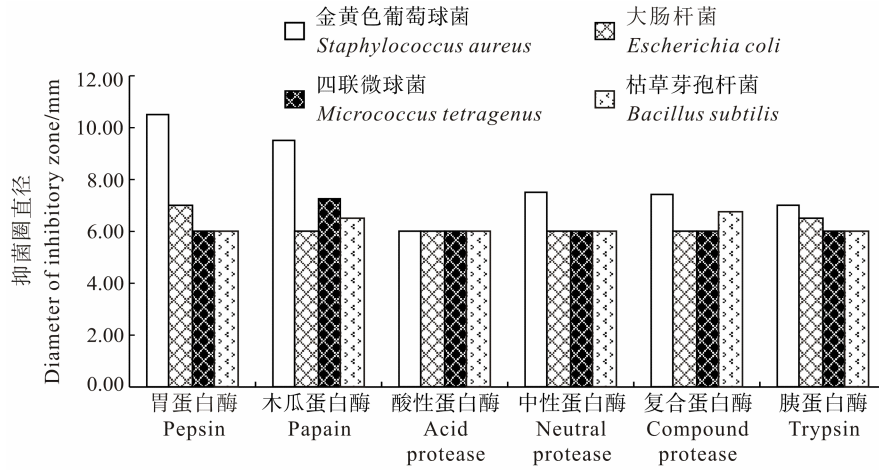


图 1 水溶性蛋白酶解多肽抑菌效果

Fig.1 The antibacterial effects of peptides from water-soluble proteins

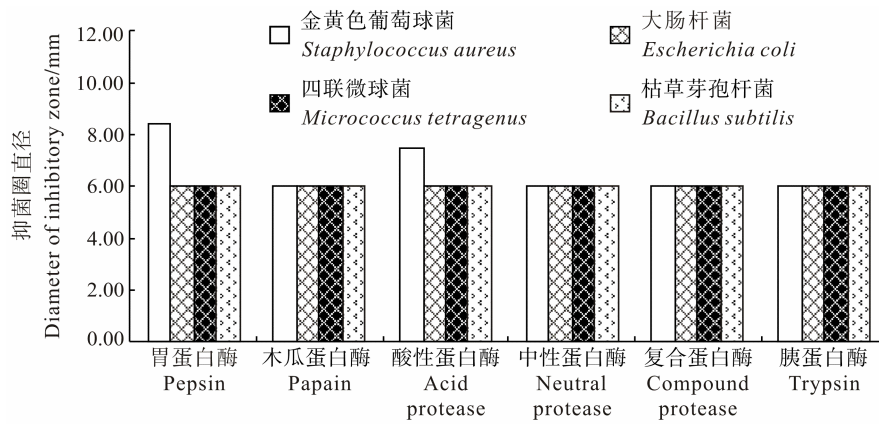


图 2 盐溶性蛋白酶解多肽抑菌效果

Fig.2 The antibacterial effects of peptides from salt-soluble proteins

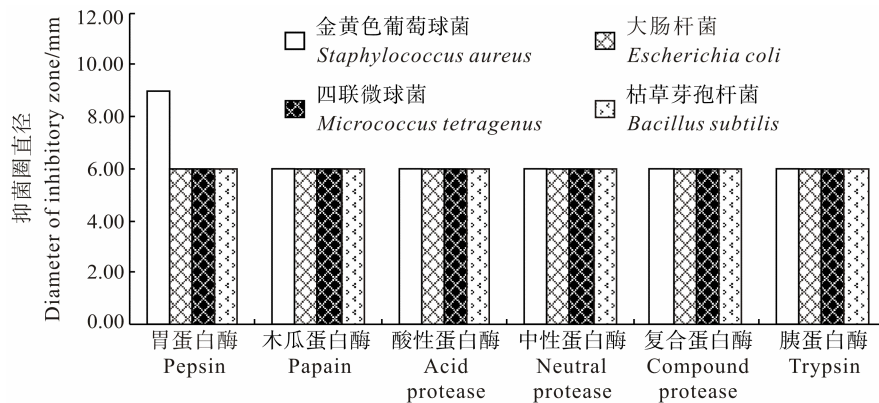


图 3 酸溶性蛋白酶解多肽抑菌效果

Fig.3 The antibacterial effects of peptides from acid-soluble proteins

图 5 所示。由图 5 可以看出，不同硫酸铵饱和度下盐析分级所得条斑紫菜水溶性蛋白以胃蛋白酶水解所对应的酶液抑菌活性差别较大，以硫酸铵饱和度分别为 40%、50%沉淀所得水溶性蛋白酶解物抑菌效果

最好，二者差别不明显；而当硫酸铵饱和度继续增大至 60%以上或减小至 30%以下时，抑菌活性呈迅速下降趋势。因而硫酸铵饱和度是影响酶解物抑菌活性的重要因素。后续将就硫酸铵饱和度为 40%、50%获得

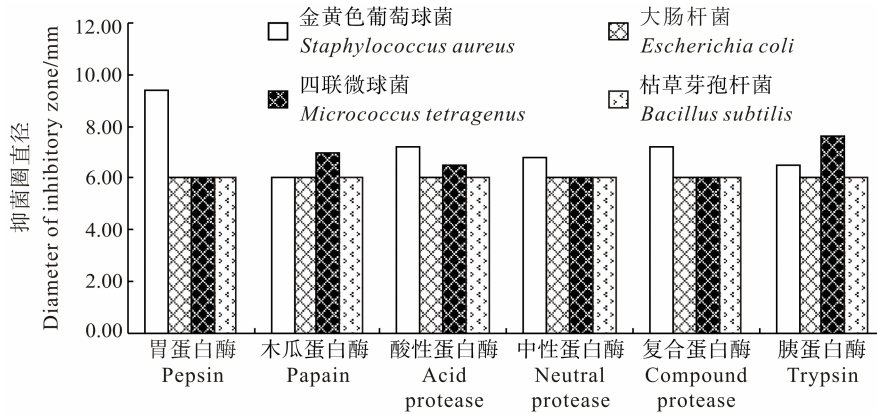


图 4 碱性蛋白酶解多肽抑菌效果
Fig.4 The antibacterial effects of peptides from alkali-soluble proteins

的水溶性蛋白酶解物进行分子量分级和活性影响因素研究。

2.3 酶解物的超滤分级以及不同级分酶解多肽的抑菌活性测定结果

将条斑紫菜水溶性蛋白质胃蛋白酶酶解物超滤分成如下 5 个级分, 分别为级分 I ($M_r < 5$ kDa)、级分 II (5 kDa $< M_r < 10$ kDa)、级分 III (10 kDa $< M_r < 50$ kDa)、级分 IV (50 kDa $< M_r < 100$ kDa)和级分 V ($M_r > 100$ kDa)。它们对金黄色葡萄球菌的抑菌效果见表 2。由表 2 可见, 上述 5 个级分对金黄色葡萄球菌均有较强抑制活性, 且抑菌圈直径均在 12 mm 以上。其中, 级分 I ($M_r < 5$ kDa)的抑菌圈直径最大(18.70 mm), 其活性优于其他级分, 该级分即为条斑紫菜抗菌多肽; 抑菌活性随分子量的增大而减小, 这与关于抗菌肽分子量大小与抗菌活性的文献报道结果一致(Bulet *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004)。以下就级分 I 作为抗菌多肽进行活性影响因素研究。

2.4 条斑紫菜抗菌多肽活性的影响因素

2.4.1 温度的影响 不同温度处理对抑菌活性的影响结果如图 6 所示, 从图 6 可以看出, 在 10–100℃温度范围内处理 30 min 对抗菌多肽的抑菌效果无明显影响。推测这可能是因为抗菌多肽为小分子, 不具备蛋白质复杂的空间结构, 因而不容易受到热效应对其结构的影响, 亦即该抗菌多肽的热稳定性较好, 与刘蕾等(2011)报道结果相近。

2.4.2 pH 的影响 介质 pH 值对抗菌多肽抑菌活性的影响见图 7。由图 7 可见, 在介质 pH 3–6 及 pH 10–11 范围内, 条斑紫菜抗菌多肽均保持最高活性(抑菌圈直径大于 14 mm)。这种现象可以用 Hancock 等(1997)的研究结果加以解释, 即有些抗菌肽对较大的离子强度和较低及较高的 pH 都具有较强的抗性。但

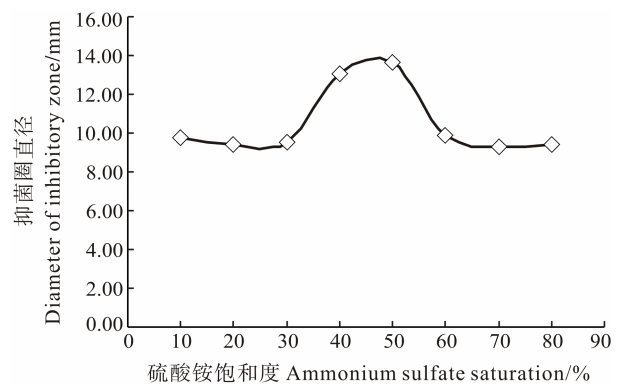


图 5 不同硫酸铵饱和度所得蛋白酶解多肽抑菌效果
Fig.5 Effects of different ammonium sulfate saturation on the antibacterial activity of protein hydrolysates

表 2 各分级级分对金黄色葡萄球菌的抑菌活性
Tab.2 The antimicrobial activity of polypeptides with different molecular-weight to *S.aureu*

级分 Fraction	I	II	III	IV	V
抑菌圈直径 Inhibitory zone diameter (mm)	18.70	17.75	15.75	14.95	12.14

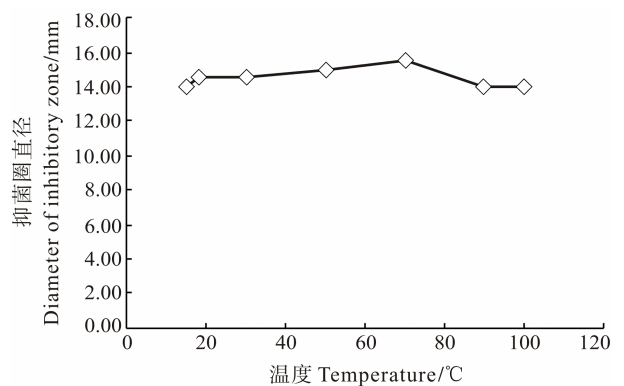


图 6 处理温度对条斑紫菜抗菌多肽抑菌活性的影响
Fig.6 Effects of temperature on the antimicrobial activity of polypeptides to *S.aureus*

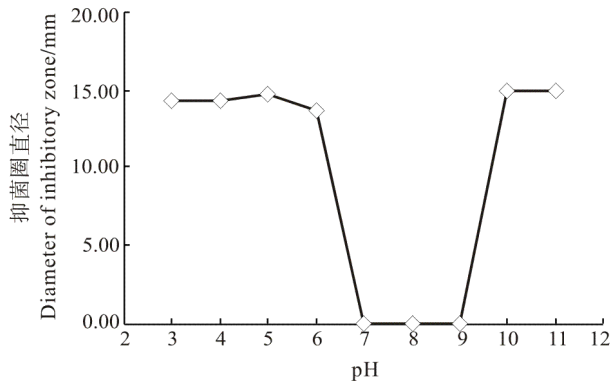


图7 不同介质 pH 对抗菌多肽抑菌活性的影响

Fig.7 Effects of different pH values on the antimicrobial activity of polypeptides to *S.aureus*

是,值得注意的是,当介质 pH 在 7.0–9.0 亦即中性偏碱范围内则未发现抑菌活性。近几年研究表明,抗菌肽等电点一般大于 7 (冯兴军等, 2006; 刘琳等, 2008), 多肽处于等电点时, 所带净电荷为零, 溶解度最小(郑集等, 2007)。因此, 可以推测条斑紫菜抗菌多肽等电点应在 pH 7.0–9.0 之间。

2.4.3 条斑紫菜抗菌多肽浓度对金黄色葡萄球菌抑菌活性的影响 浓度分别为 10.0、20.0、40.0、80.0 和 100.0 mg/ml 的条斑紫菜抗菌多肽对金黄色葡萄球菌的抑菌活性结果见图 8。从图 8 可以看出, 随着多肽浓度的增加, 其抑菌圈直径逐渐增大(从 6.0 mm 增加至 20.5 mm), 表明其抑菌活性与浓度呈现量效依赖关系。

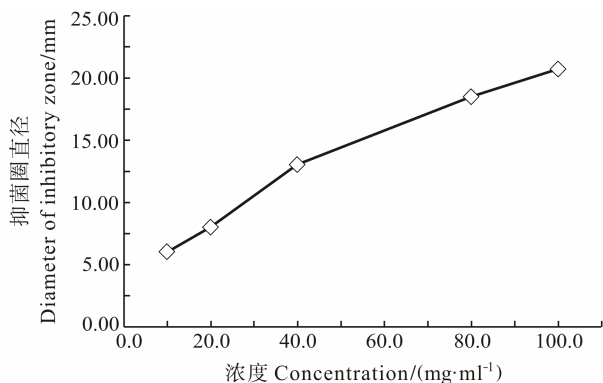


图8 不同浓度抗菌多肽对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Fig.8 The antimicrobial activity of polypeptides at different concentration to *S.aureus*

3 结论

本研究首先提取条斑紫菜不同溶解性蛋白质并进行硫酸铵分级沉淀, 再经酶解、超滤分级得到对金黄色葡萄球菌具有最佳抑制活性的抗菌多肽级分(分子量小于 5 kDa)。对其进行的抑菌活性影响因素研究表明, 条斑紫菜抗菌多肽热稳定性好, 100℃以

下处理 30 min 其抑菌活性无变化; 在介质 pH 3–6 及 pH 10–11 范围内稳定性好; 其抑菌活性在 10–100 mg/ml 浓度范围内呈现量效依赖关系。

上述研究结果为今后条斑紫菜抗菌多肽的进一步纯化, 进而明确其氨基酸序列提供了基础。同时, 关于条斑紫菜抗菌多肽的抑菌机理的研究也有待进行。

参 考 文 献

- 冯自立, 李志刚, 敖义俊, 等. 朱桔叶挥发油化学成分及抑菌活性研究. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 102–105
- 冯兴军, 王建华, 单安山. 抗菌肽基因工程研究及其表达策略. 中国生物工程杂志, 2006, 26(3): 63–67
- 冯琛, 路新枝, 于文功. 逆境胁迫对条斑紫菜生理生化指标的影响. 海洋湖沼通报, 2004, 18(3): 22–26
- 朱晓君, 安欣欣, 顾丽, 等. 超声辅助同时提取条斑紫菜多糖及藻胆蛋白工艺的优化. 食品科学, 2008, 29(5): 241–244
- 刘石宝, 倪孟祥, 罗学刚. 抗菌肽研究进展. 药物生物技术, 2011, 18(5): 466–470
- 刘青梅, 杨性民, 邓红霞, 等. 紫菜多糖提取分离及纯化技术研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2005, 31(3): 293–297
- 刘琳, 马廷方, 祝永强, 等. 抗菌肽的结构特征及其与活性的关系. 药物生物技术, 2008, 15(1): 64–67
- 刘静, 陈均志. 微波双酶协同水解大豆分离蛋白制备小分子肽的研究. 食品研究与开发, 2006, 27(8): 9–13
- 刘蕾, 魏玉西, 刘淇, 等. 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)中抑菌活性肽的制备与初步纯化. 现代生物医学进展, 2011, 11(3): 476–481
- 闫建忠, 吕昌龙, 李胜军, 等. 紫菜多糖的免疫功能增强作用. 中国海洋药物, 2005, 24(4): 36–38
- 张龙翔, 张廷芳, 李令媛. 生化实验方法和技术(第 2 版). 北京: 高教出版社, 1997, 47–51
- 范晓, 韩丽君. 我国常见食用海藻的营养成分分析. 中国海洋药物, 1993, 12(4): 32–38
- 郑集, 陈钧辉. 普通生物化学(第 4 版). 北京: 高等教育出版社, 2007, 123–124
- 高淑清, 单保恩. 条斑紫菜生物学作用的研究进展. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(12): 1661–1662
- Bulet P, Stocklin R, Menin L. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunoll Rev, 2004, 198: 169–184
- Li L, Shi Y, Cheserek MJ, et al. Antibacterial activity and dual mechanisms of peptide analog derived from cell-penetrating peptide against *Salmonella typhimurium* and *Streptococcus pyogenes*. Appl Microbiol Biotech, 2013, 97(4): 1711–1723
- Niwa K, Kobiyama A. Research note: Simple molecular discrimination of cultivated *Porphyra* species (*Porphyra yezoensis* and *Porphyra tenera*) and related wild species

(Bangiales, Rhodophyta). *Phycol Res*, 2009, 57(4): 299–303
Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides:

premises and promise. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 24(6):
536–547

(编辑 冯小花)

The Antibacterial Activity of Peptides From *Porphyra yezoensis*

SONG Huiping, YU Jia, LI Shan, WEI Yuxi^①, WANG Wenxiu, XU Lina, HAN Dan

(College of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071)

Abstract Enriched in proteins and with similar amino acid compositions to the terrestrial vegetables, *Porphyra* has become an important economic marine algae with high nutritional and medical values in China. In order to obtain peptides holding antibacterial activity, *Porphyra yezoensis* was utilized as raw material and water, NaCl, HCl and NaOH were used as the solvents. Water-dissolved, salt-dissolved, acid-dissolved and alkaline-dissolved proteins were prepared by the extraction, ammonium sulfate salting-out, dialysis and freeze-drying, respectively. The four types of proteins were hydrolyzed respectively by pepsin, papain, neutral protease, trypsin, acid protease and compound protease under the optimum conditions for each enzyme. Twenty-four hydrolysates were selected to evaluate the antibacterial activity to *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus tetragenus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* that were used as the indicator bacteria. Moreover, the proteins were divided into 7 portions by fractional precipitation with different saturation degree of ammonium sulfate; and their hydrolysates were fractioned to peptide fragments with different molecular weights by ultrafiltration. The best antibacterial peptides were evaluated by comparing the inhibitory effects of hydrolysates to the indicator bacteria. The result showed that the zymolyte of water-soluble proteins hydrolyzed by pepsin presented the strongest antibacterial activity. Thus, antimicrobial peptides were achieved via fraction precipitation by ammonium sulfate for the proteins, ultrafiltration for their zymolyte, and the ammonium sulfate saturation at 40%–50%, and the range of molecular-weight was less than 5 kDa. In addition, factors (such as temperature, medium pH and antimicrobial peptides concentration) that affect the antibacterial activities were also studied. The results indicated that the antimicrobial peptides from *Porphyra yezoensis* possessed good thermal and acid-base stability, which may be candidate for a safe food preservative.

Key words *Porphyra yezoensis*; Antibacterial peptide; *Staphylococcus aureus*; Antibacterial activity

① Corresponding author: WEI Yuxi, E-mail: yxwei@qdu.edu.cn