

嗜酸乳杆菌产生的广谱抗菌肽 AP311 的分离和鉴定*

那淑敏 贾士芳 陈秀珠 陈美玲 还连栋**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:分离、鉴定了乳酸菌素片生产菌嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)产生的热稳定性抗菌多肽 AP311。浓缩的 AP311 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑制作用。AP311 对枯草杆菌蛋白酶、凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 敏感。AP311 的抑菌活性随 pH 升高而降低,在酸性 pH(pH2~4)条件下可经 100℃加热 30min 活性不变。正丁醇可使 AP311 沉淀,当沉淀溶解于 pH2 的酸溶液时,活性恢复。氯仿、甲苯、乙酸乙酯、丁酮等有机溶剂对 AP311 活性没有影响。基于 AP311 可被蛋白酶酶解,具有广谱的抑菌活性,认为这种生物活性物质是一种抗菌肽。

关键词:嗜酸乳杆菌, 抗菌肽, 抑菌谱

中图分类号:Q939.11 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2001)04-0494-05

1908 年,自 Metchnikoff 报道乳酸杆菌能抑制非肠道微生物以来,许多学者对乳酸菌产生的抑菌活性物质进行了广泛的研究。迄今为止,已在 7 个不同属的乳酸菌中发现了多种抑菌活性物质。1959 年, Vincent^[1]首次报道嗜酸乳杆菌产生的 lactocidin。之后又发现了 lactacinB, acidophilucinA, acidocin8912^[2]。由乳酸菌产生的抑菌活性物质,其抗菌作用以及潜在的应用价值引起国内外学者的极大关注^[3]。本实验室多年来一直致力于由乳酸乳球菌产生的乳链菌肽的研究与开发^[4~6]。最近,我们在对黑龙江省泰格药业有限公司生产的治疗肠胃病的药物—乳酸菌素片的生产菌嗜酸乳杆菌的菌株特性^[7]、代谢产物^[8]研究过程中,发现了该菌产生的一种广谱的抗菌肽 AP311。现将 AP311 的分离及一些特性研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌株

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)(乳酸菌素片生产菌)由黑龙江省泰格药业有限公司提供。其它实验菌株见表 1。

1.2 培养基

乳杆菌斜面、平板、液体种子和发酵培养基用 MRS^[9] 培养基,其它乳酸菌用 MRS 或

* 国家自然科学基金项目(39970391)、中国科学院重点课题(KY95-J1-331)和黑龙江省泰格药业有限公司资助

** 通讯作者(微生物资源国家重点实验室)

那淑敏、贾士芳为本文并列第一作者

本文作者还有郭兴华研究员和黑龙江省泰格药业有限公司的李金波、李金燕、刘军

作者简介:那淑敏(1939-),女,北京市人,高级实验师,主要从事微生物遗传学研究。

收稿日期:2000-10-30,修回日期:2000-12-20

M17^[9] 培养基, 酵母菌用麦芽汁培养基, 其它菌株用 LB 培养基, 效价测定用 S1 培养基^[5]。

表 1 抗菌肽 AP311 的抑菌谱

Table 1 Inhibitory spectra of antimicrobial peptide (AP311) produced by *Lactobacillus acidophilus*

Indicator strains	Source	MIC/(AU/mL)
<i>Escherichia coli</i> JM109	This lab.	160
<i>Escherichia coli</i> DH5α	This lab.	320
<i>Escherichia coli</i> HB101	This lab.	640
<i>Escherichia coli</i> 44104	CMCC	1280
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	Prov. by Prof. Wang Aoquan	640
<i>Salmonella</i> sp. 50311E group O type	CMCC	1280
<i>Rhizobium leguminosarum</i> AS1.87	CGMCC	80
<i>Listeria monocytogenes</i> 54003	CMCC	320
<i>Corynebacterium crenatum</i> B9	This lab.	40
<i>Bacillus licheniformis</i> 2709	This lab.	320
<i>Bacillus cereus</i> AS1.126	CGMCC	1280
<i>Bacillus subtilis</i> DB104	This lab.	160
<i>Staphylococcus aureus</i> AS1.89	CGMCC	40
<i>Staphylococcus aureus</i> 26071	CMCC	1280
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AS1.50	CGMCC	40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10105	CMCC	1280
<i>Clostridium butyricum</i>	Tiger Pharma. Group Ltd.	40
<i>Micrococcus flavus</i> NCIB8166	This lab.	40
<i>Shigella flexneri</i> 51285	CMCC	1280
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS1.557	This lab.	1280
<i>Lactobacillus casei</i>	This lab.	1280
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 54	This lab.	2560
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB42	Prov. by Prof. Lin Daiwen	640
<i>Lactococcus lactis</i> IM0230	This lab.	640
<i>Streptococcus faecalis</i> AS1.130	CMCC	2560
<i>Streptococcus thermophilus</i>	This lab.	1280
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Tiger Pharma. Group Ltd.	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AS1.2	CGMCC	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> BNS2	This lab.	-
<i>Lactobacillus brevis</i> AS1.7	CGMCC	-
<i>Lactobacillus casei</i>	This lab.	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS1.550	CGMCC	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	This lab.	-
<i>Lactococcus lactis</i> S1	This lab.	-
<i>Candida krusei</i> AS2.1182	Prov. by Jia Jianhua	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Prov. by Jia Jianhua	-

- : No inhibition

1.3 试剂

枯草杆菌蛋白酶、凝乳蛋白酶为上海生化制药厂产品,胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 分别为 England, Difco、BRL 产品。

1.4 敏感菌的筛选

直接法和三明治法,分别参照文献[10、11]。

1.5 抗菌肽 AP311 的制备

参照文献[12]。

1.6 抗菌肽效价的测定

按文献[10]的方法,用二倍稀释法,测定指示菌为黄色微球菌 NCIB8166。肉眼观察到有确定抑菌圈时,最高稀释度的倒数即为该样品的效价,用 AU/mL (Activity Units/mL) 表示。

1.7 蛋白酶的处理

用适当缓冲液配制成浓度为 1mg/mL 的各种蛋白酶溶液,加不同量蛋白酶液到样品中,37℃反应 2~4h,用黄色微球菌 NCIB8166 作指示菌测定抑菌活性。

1.8 有机溶剂的处理

将透析后样品与不同有机溶剂混合(1:5 体积),在冰浴中萃取 20min, 13000r/min 离心 15min,取上、下相及沉淀溶解物分别测定效价。

1.9 抑菌谱的测定

采用平板挖井扩散法,同时用冷干浓缩的对照样品或 0.02mol/L HCl 作对照。

2 结果

2.1 敏感菌的筛选

采用直接法和三明治法,用 13 株乳酸菌和 1 株黄色微球菌 NCIB8166 作指示菌筛选敏感菌。结果表明,用黄色微球菌 NCIB8166 作指示菌时,在 pH7.6 的 MRS 平板上穿刺或点种,乳酸菌素片生产菌—嗜酸乳杆菌的周围出现透明的抑菌圈,于是选定黄色微球菌 NCIB8166 为敏感菌。

2.2 抗菌肽 AP311 的提取

按照文献[12]方法,每升发酵培养物可得到 50mL 效价为 320AU/mL 的抗菌肽 AP311。经过换算,发酵液中抗菌肽 AP311 的浓度仅为 16AU/mL。由于该菌发酵上清液含有有机酸,故本工作采用这种提取、浓缩抗菌肽的方法,可排除有机酸的干扰。国外用此方法提取乳酸乳球菌、片球菌、明串珠菌和清酒乳杆菌产生的 Nisin, Pediocin ACH, Leconocin Lcml, Sakacin A 均获得成功,收率在 95% 以上^[12]。我们用此方法也成功地提取了抗菌肽 AP311。提取的 AP311 经冷冻干燥后用于进一步试验。

2.3 抗菌肽 AP311 的抑菌谱

用本组保藏和收集到的 36 株革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌作检测指示菌,采用平板挖井扩散法测定了 AP311 对这些菌的抑制作用。结果表明(表 1)AP311 有较宽的抑菌谱,对 36 株菌中的 26 株有不同程度抑制作用。对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,特别对致病的一些革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,如大肠杆菌 44104(致小儿腹泻),单胞增生利斯

特氏菌,金黄色葡萄球菌,绿浓杆菌、福氏志贺菌均有不同程度的抑制作用(图 1),但对大多数乳酸菌抑制作用很差或根本不抑制。

2.4 抗菌肽 AP311 的理化性质

2.4.1 对蛋白酶的敏感性:将效价为 320AU/mL 的抗菌肽 AP311 调到酶反应最适 pH 后,分别加入枯草杆菌蛋白酶、凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K。结果表明,5 种蛋白酶均使抗菌肽 AP311 丧失对黄色微球菌 NCIB8166 的抑制作用(图 2)。但蛋白酶最低作用浓度与提取液效价、黄色微球菌 NCIB8166 的菌龄和浓度有关。

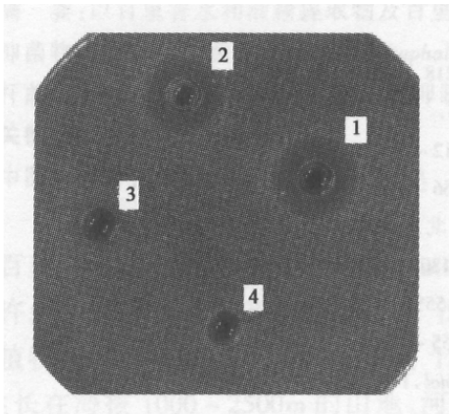


图 1 抗菌肽 AP311 对大肠杆菌 44104 的抑制作用

Fig.1 Inhibition of *E. coli* 44104 by antimicrobial peptide (AP311)
1 ~ 3. Antimicrobial peptide (AP311);
4. Control (0.02mol/L HCl).

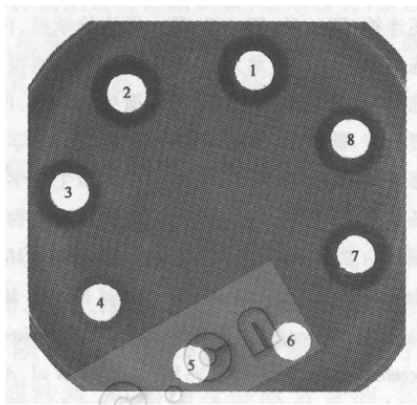


图 2 抗菌肽 AP311 对胰蛋白酶的敏感性

Fig.2 Sensitivity of antimicrobial peptide (AP311) to various concentration of trypsin
1 ~ 6. Trypsin concentration: 0.0001 ~ 0.1mg/mL;
7. Inactivated trypsin; 8. Control.

2.4.2 抗菌肽 AP311 的稳定性:抗菌肽 AP311 的抑菌活性随 pH 上升而逐渐丧失。在低 pH 条件下(pH2 ~ 4),抗菌肽 AP311 对热稳定,可经 100℃ 加热 30min 而不失活,但调至 pH12 时则产生沉淀,用 HCl 重新调回 pH2 后,则沉淀溶解,活性不变。

2.4.3 有机溶剂对抗菌肽 AP311 的作用:有机溶剂与抗菌肽 AP311 的作用表明,用氯仿、丁酮处理 AP311,活性物质全在水相中;用正丁醇、甲苯、乙酸乙酯处理 AP311,活性物质存在于有机相或形成的沉淀中。正丁醇与高效价 AP311 以 5:1 体积混合萃取,可使 AP311 沉淀,经 0.02mol/L HCl 溶解可回收 AP311,说明可用正丁醇浓缩 AP311 样品。

3 讨 论

本工作利用低分子量多肽在不同 pH 条件下可被细胞吸附或解吸附的分离方法,成功地从乳酸菌素片生产菌—嗜酸乳杆菌发酵液中提取了广谱抗菌肽 AP311,同时排除了发酵产物中有机酸的干扰。抗菌肽 AP311 的产生依赖于 pH,它的产量受 pH 影响。

1997 年, Berent-Camard^[13] 等人报道,粘附于人类肠道的嗜酸乳杆菌 LA1 分泌的一种抑菌物质 LA1-SCS 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有抑制作用,它的抑菌谱与 AP311 极为相似,但 LA1-SCS 对蛋白酶不敏感,而 AP311 对 5 种蛋白酶都敏感。表明两者之间有本质的不同。AP311 与已往报道的嗜酸乳杆菌产生的抗菌肽相比,虽然在热稳定性、对蛋白酶敏感等性质方面相似,但是象 AP311 具有如此广泛抑菌谱的抗菌肽还未见报道。

对 AP311 的分离、纯化及其性质的研究正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Vincent J G, Veornett R C, Riley R F. *J Bacteriol*, 1959, **78**: 477 ~ 484.
- [2] Ouwehand A C. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S, von Wright A V ed. *Lactic acid bacteria-microbiology and functional aspects*. Second edition. New York: Marcel Dekker, Inc. Press. 1998. 139 ~ 159.
- [3] Dodd H M, Gasson M J. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: Gasson M J, de Vos W M ed. *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. London: Chapman & Hall Inc. Press. 1994. 211 ~ 251.
- [4] 还连栋, 陶 勇, 何 松, 等. 微生物学报, 1995, **35**: 364 ~ 367.
- [5] 陈秀珠, 何 松, 龙力红, 等. 微生物学通报, 1995, **22**: 215 ~ 218.
- [6] 陈秀珠, 何 松, 龙力红, 等. 微生物学报, 1996, **36**: 269 ~ 275.
- [7] 贾士芳, 那淑敏, 陈美玲, 等. 中国微生态学杂志, 1999, **11**: 212 ~ 214.
- [8] 那淑敏, 贾士芳, 陈秀珠, 等. 中国微生态学杂志, 1999, **11**: 266 ~ 268.
- [9] 杨洁彬, 郭兴华, 张 麓, 等. 乳酸菌-生物学基础及应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [10] Barefoot S F, Klaenhammer T R. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **45**: 1808 ~ 1815.
- [11] Muriana P M, Klaenhammer T R. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 553 ~ 560.
- [12] Yang R, Johnson M C, Ray B. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 3355 ~ 3359.
- [13] Berent-Camard M, Lievin V, Brassart D, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 2747 ~ 2753.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE BROAD SPECTRUM ANTIMICROBIAL PEPTIDE AP311 PRODUCED BY *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* *

Na Shumin Jia Shifang Chen Xiuzhu Chen Meiling Huan Liandong

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The heat stable antimicrobial peptide (AP311) produced by *Lactobacillus acidophilus* was isolated and identified. The AP311 has broad spectrum of inhibition including many Gram-positive and Gram-negative bacteria. The inhibition activity of AP311 was lost upon treatment with trypsin, subtilisin, proteanase K, chymotrypsin and pepsin. Inhibition activity of AP311 was decreased with pH increasing. The AP311 is very stable at acidic condition (pH2 ~ 4) even if heating at 100 °C for 30min. But it was inactivated at basic pH (pH12) and the activity was restored completely upon reversion to acidic. The AP311 was not precipitated and inactivated by various organic solvents, except n-butanol. When the precipitate was redissolved in 0.02 mol/L HCl, its activity was restored. Based on its proteinaceous nature, broad spectrum of inhibition, we propose that AP311 should be considered the broad spectrum antimicrobial peptide.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, Antimicrobial peptide, Inhibition spectrum

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (39970391)