

海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 株所产多肽 R-1 性质分析及作用原理探讨

任召珍¹, 孙 谧², 郑 媛², 刘均忠², 王跃军², 郝建华², 张胜军³

(1. 山东省海洋食品营养研究院, 山东 荣成 264309; 2. 中国水产科学院 黄海水产研究所 海洋酶与酶工程实验室, 山东 青岛 266071; 3. 青岛市环境保护监测站, 山东 青岛 266071)

摘要: 对海洋侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*) Lh-1 所产多肽 R-1 的性质及作用机理进行了研究。R-1 对温度和 pH 稳定, 在 pH 11.0~12 条件下, 121 °C 处理 1 h, 其活力保持在 75% 以上。经 3 种不同浓度的蛋白酶(碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶)处理 4 h 后, 活性保持在 80% 以上。与常见的金属离子和化学试剂在一起反应, 对抗菌肽 R-1 的活性无明显影响, 可以配合一起使用, 仅吐温和 SDS 对其影响较大。氨基酸分析表明, 抗菌肽 R-1 由亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)、赖氨酸(Lys)、甘氨酸(Gly)、蛋氨酸(Met)、丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)9 种氨基酸组成, 其中疏水氨基酸居多。抑菌试验表明 R-1 的抑菌谱广泛, 对经培养分离出来的大肠杆菌及白假丝酵母菌的扫描电镜超微结构观察表明, R-1 的杀菌机制主要是通过含有带正电荷的 Lys 与带负电荷的磷脂分子结合, 然后 R-1 的疏水端插入到指示菌的疏水区, 改变膜的构象, 从而导致菌体的死亡。

关键词: 海洋侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*); 多肽; 性质; 作用机理

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)11-0041-05

海洋覆盖着地球表面积的 70%, 是生命的发源地, 其生物多样性远远超过陆地生物多样性。在海洋生物中发现了许多具有特殊结构和功能的生物活性物质, 包括抗肿瘤化合物、肿瘤促进剂、抗菌、抗病毒化合物、生物毒素等, 目前世界上至少已有 15 个以上海洋抗癌物进入临床或临床前研究阶段, 其中相当部分生物活性物质是陆地生物所没有的^[1,2]。同时海洋微生物活性物质可以利用现代微生物发酵等技术实现的产业化, 因此, 海洋微生物生物活性物质的研究已成为开发海洋资源的重要内容之一, 显示了广阔的应用前景^[3,4]。

本研究从海洋极端环境中分离到一株具有抗菌活性的侧孢短芽孢杆菌, 其产生的肽类抗菌物质 R-1 对多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和少数真菌有抑制作用^[5]。在此基础上本工作对 R-1 的理化性质和作用机理进行了初步研究, 为 R-1 的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

1.1.1 指示菌

溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus* ATCC

No.4698)购自 Sigma 公司。

1.1.2 检测菌

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、变形链球菌 (*Streptococcus mutans*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 均由中国生物制品检定所提供; 粪链球菌 (*Streptococcus Faecium*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus penamoniae*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 等临床分离致病菌由青岛大学医学院提供; 肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum*)、巴氏固氮梭状芽孢杆菌 (*Clostridium pasteurianum*)、酪酸梭状芽孢杆菌 (*Clostridium butyricum*)、腐败假单胞菌 (*Pseudomonas putrefaciens*)、热解糖梭状芽孢杆菌 (*Clostridium thermosaccharolyticum*)、致黑梭状芽孢杆菌 (*Clostridium nigrificans*) 等食品常见腐败菌株由黄海水产研究所海洋酶与酶工

收稿日期: 2009-09-20; 修回日期: 2009-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571429); 国家“863”计划项目(2006AA10Z349); 青岛市科技计划项目(05-2-JC-81)

作者简介: 任召珍(1981-), 女, 山东省莱州市, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物活性产物的分离纯化和性质研究, 电话: 13792780867, E-mail: zzen1012@126.com; 孙谧, 通信作者, 电话: 0532-85819525, Email: sunmi@ysfri.ac.cn

程实验室实验室保存。

1.1.3 培养基

营养肉汤培养基、真菌培养基及庖肉培养基按常规方法配制。

1.2 主要试剂

R-1 由黄海水产研究所海洋酶与酶工程实验室提供; 胰酶(Difco 产品分装); 胃蛋白酶(Sigma); 碱性蛋白酶系本实验室制备纯化。

1.3 测活方法

参照文献[6]管碟法。在混有适量溶壁微球菌的固体培养基平板上放上不锈钢制的小管(牛津杯), 在牛津小杯内加入抗菌物质 20 μ L, 以抑菌圈直径表示抑菌活性的大小。

1.4 R-1 理化性质研究

以下实验样品的质量浓度均为 10 mg/mL。

1.4.1 温度和 pH 稳定性研究

Glulino Bernal 等^[7]的研究表明: *Bacillus subtilis* 产生的抗菌物质经过 100 /15min 和 121 /20min 处理后活性无明显变化。胡剑等^[8]报道的一种对芦笋茎枯病等植物病原菌有抑菌作用的抗菌蛋白, 在高温酸性环境中具有良好的稳定性, 但是在 pH12、121

下该抗菌蛋白活性几乎全部损失了。本实验在 0.05 mol/L、pH 2.6~12.0 的广泛范围缓冲液, 分别在 40、60、80、100、121 $^{\circ}$ C 下保温 1 h, 测定抑菌活性, 并与 25 $^{\circ}$ C pH 6.0 时 R-1 的抑菌活性相比较, 进行 R-1 在不同 pH 和温度条件下的稳定性研究。

1.4.2 蛋白酶敏感性研究

3 种蛋白酶浓度如下: 碱性蛋白酶(15 000 U/mg), 胰蛋白酶(1 500 U/mg), 胃蛋白酶(1: 3 000)。

用 Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液配制不同浓度的碱性蛋白酶和胰蛋白酶, 同时用 KCl-HCl(pH 2.0)溶液配

制不同浓度的胃蛋白酶, 与 R-1 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 4 h 后, 之后再 80 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 终止酶活, pH 调回 6.5。以不加酶液和缓冲液的样品为对照, 测定抗菌物质活力保持情况。

1.4.3 金属离子和化学试剂对 R-1 活性的影响

在 R-1 中加入含各种金属离子的化学试剂(0.01 mol/L)和不同浓度的山梨酸钾、柠檬酸、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾和 EDTA, 30 $^{\circ}$ C 下反应 4 h, 测定 R-1 抑菌活性变化。

1.5 氨基酸组成分析

委托中国海洋大学药物所李桂玲老师对 R-1 的氨基酸组成进行分析(835250 型氨基酸自动分析仪, 日本日立公司)。精密称量 10 mg 样品, 加 10 mL 6 mol/L 的盐酸溶液封管, 于 110 $^{\circ}$ C 反应 22 h 冷却后, 开管, 减压过滤, 滤液定容至 10 mL。取 1 mL 滤液 60 $^{\circ}$ C 减压蒸干, 用 0.02 mol/L 的盐酸溶液定容到 10 mL, 上机测定。

1.6 抑菌谱的测定

取对数生长期的各菌株分别涂布平板, 菌体浓度为 10⁵ 个/mL, 使用管碟法检测 R-1 对指示菌是否有抑菌活性, 活性大小以抑菌圈直径表示(mm)。

1.7 作用原理研究

按照透射电镜制备方法^[7]制备大肠杆菌和白假丝酵母样品; 未加 R-1 的大肠杆菌和白假丝酵母菌同上制备做空白。

2 结果与分析

2.1 R-1 的理化性质研究

2.1.1 温度和 pH 稳定性

R-1 经如表 1 所示的 pH 和温度条件处理后, 其抑菌活性与 25 $^{\circ}$ C pH 6.0 时 R-1 的抑菌活性相比较,

表 1 不同 pH、温度处理下 R-1 的相对抑菌活力

Tab. 1 Effects of pH and temperature on the antimicrobial activity of R-1

热处理 ($^{\circ}$ C)	相对 25 $^{\circ}$ C pH 6.0 条件下 R-1 的抑菌活性(%)										
	pH										
	2.6	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
40	99.80	99.82	99.85	99.94	100.00	100.01	100.03	99.93	99.87	99.85	99.74
60	98.93	99.06	99.26	99.78	99.83	100.00	100.01	99.20	98.77	98.28	98.05
80	96.90	97.97	98.65	98.97	99.19	99.38	99.52	99.04	98.99	94.10	90.18
100	95.00	97.74	97.94	98.36	98.98	99.00	99.34	98.79	96.22	89.61	87.37
121	94.81	97.30	97.66	97.92	98.29	98.31	98.34	98.18	95.32	87.27	79.32

其结果由表 1 可以看出, 在 pH 3.0~10.0 下, R-1 随着处理温度的提高, 抑菌能力变化不大, 即使高温至 121 °C 保温 1 h, 抑菌活性仍保持在 95% 以上; 在 pH 2.6 下, 随着温度的提高, 抑菌能力下降, 但是抑菌活性保持在 90% 以上; pH 为 11~12 时, 随着温度升高, 抑菌活性下降, 但高温 121 °C 处理 1 h, 其活力保持在 75% 以上, 表明该物质对温度、pH 具有良好的稳定性。

2.1.2 蛋白酶对 R-1 活性的影响

R-1 经 3 种不同浓度的蛋白酶作用后, 其相对抑菌活性依然保持在 80% 以上(图 1), 可见 R-1 对蛋白酶不敏感, 不会被蛋白酶降解。

2.1.3 金属离子对 R-1 活性的影响

由表 2 数据可知, R-1 对 Ba²⁺、Li⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Sr²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺ 离子都是稳定的,

而且这些金属离子还对抗菌活性有促进作用, 说明 R-1 在有这些金属离子存在的情况下还能保持很好的抑菌活性, 可以和含有这些金属离子的化学试剂配合使用。

2.1.4 化学试剂对 R-1 活性的影响

R-1 经不同浓度的化学物质作用后的结果表明, 山梨酸钾、柠檬酸、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾和 EDTA 对 R-1 活力无影响; 吐温对 R-1 的活性有促进作用; SDS 有抑制作用(图 2)。

2.2 氨基酸组成

经分析, R-1 含有 9 种氨基酸。其中疏水氨基酸居多, 而且含有带正电荷的碱性氨基酸, 这对其跟细胞膜的脂质双分子层结合提供了条件。R-1 的氨基酸组成见表 3。

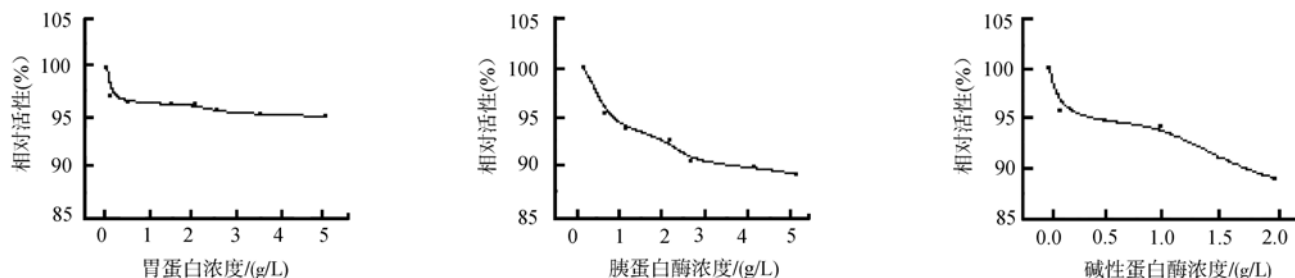


图 1 蛋白酶对 R-1 活力的影响

Fig. 1 Effects of proteases on the antimicrobial activity of R-1

表 2 金属离子对 R-1 活力的影响

Tab. 2 Effects of metal ions on the antimicrobial activity of R-1

离子浓度(1×10^{-2} mol/L)	对照	Ba ²⁺	Li ⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Cu ²⁺	Sr ²⁺	Pb ²⁺	Zn ²⁺	Ca ²⁺
相对活性(%)	100.00	121.66	119.29	111.87	117.21	117.80	116.62	118.69	118.69	118.69	119.59

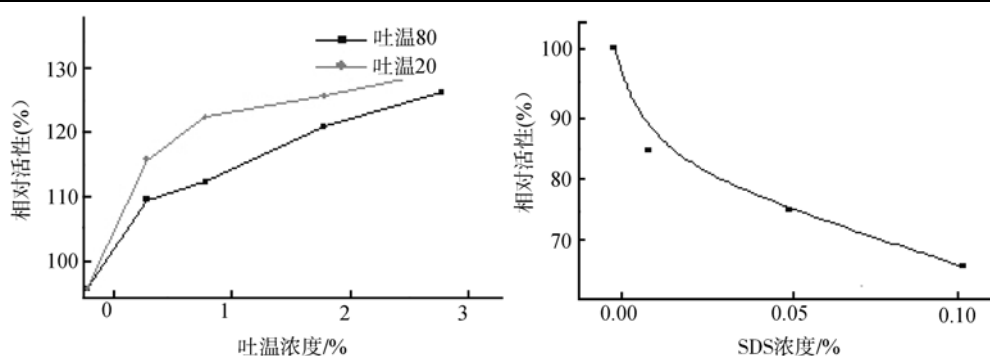


图 2 吐温和 SDS 对 R-1 活力的影响

Fig. 2 Effects of chemical agents on the antimicrobial activity of R-1

表 3 R-1 的氨基酸组成

Tab. 3 Amino acid composition of R-1

氨基酸组成	亮氨酸	酪氨酸	缬氨酸	异亮氨酸	赖氨酸	甘氨酸	蛋氨酸	丝氨酸	丙氨酸
相对质量分数(%)	22.23	15.39	14.76	11.31	10.24	8.36	7.05	5.18	5.17

2.3 R-1 抑菌谱

由表 4 可知 R-1 溶菌谱广泛, 对多种革兰氏阳性、阴性菌及部分真菌均有抑菌活性, 尤其是对金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠杆菌和白假丝酵母菌等致病菌及腐败假单胞菌、致黑梭状芽孢杆菌等食品腐败菌有较强的作用。

2.4 R-1 作用原理的初步分析

由图 3 可以看出, R-1 对大肠杆菌和白假丝酵母菌的作用机理不完全相同。R-1 对大肠杆菌作用一段时间后, 深色颗粒及胞浆内容物成囊状大量外泄, 最终细胞完全解体; R-1 对白假丝酵母菌作用一段时间后, 菌体内形成空泡, 胞内内容物发生絮凝至菌体死亡。推测是由于细菌和真菌的细胞壁和细胞膜不完全相同, 所以 R-1 的作用方式也不尽相同。

表 4 R-1 的抑菌谱

Tab. 4 Antimicrobial spectrum of R-1

指示菌	抑菌直径(mm)	指示菌	抑菌直径(mm)
金黄色葡萄球菌	18.3	短小芽孢杆菌	13.5
枯草芽孢杆菌	16.2	蜡状芽孢杆菌	16.8
变形链球菌	14.6	肺炎链球菌	17.4
粪链球菌	14.7	副溶血弧菌	15.9
大肠杆菌	17.5	白假丝酵母菌	17.8
肉毒梭菌	12.3	巴氏固氮梭菌	15.9
酪酸梭菌	14.5	腐败假单胞菌	17.3
热解糖梭菌	15.6	至黑梭状芽孢杆菌	17.2

3 讨论

通过对 R-1 的性质研究发现: 该物质对温度和 pH 稳定, 不易被蛋白酶降解, 结合其氨基酸组成, 可以得出 R-1 是一种肽类物质。关于抗菌肽的抑菌机理, 从目前研究成果来看主要是通过作用于细菌的细胞膜, 具体的作用过程是^[9-11]: 抗菌肽首先平铺在细胞膜上, 通过其所带的正电荷与脂双层外侧带负电荷的磷脂结合, 然后取代脂类分子的位置, 使脂双层外侧发生扭曲, 细胞膜产生了相变, 并且出现了短暂的离子通道, 从而导致菌体死亡。

R-1 的氨基酸组成主要为疏水氨基酸, 而且含有带正电荷的 Lys, 推测是通过带正电荷的 Lys 与带负电荷的磷脂分子结合, 然后 R-1 的疏水端插入到指

示菌的疏水区, 改变膜的构象, 从而导致菌体的死亡。有研究表明, 吐温可改善原生质膜的通透性。吐温 20、吐温 80 能增加 R-1 的活性, 而且随吐温浓度的增加抑菌能力增强, 这与吐温能提高膜的通透性有关, 也为 R-1 作用与细胞膜提供了证据^[12]。

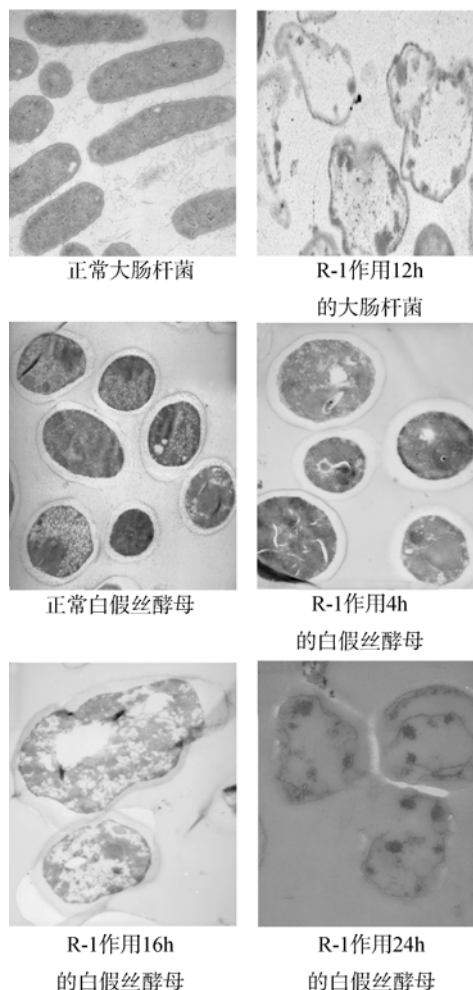


图 3 透射电镜下正常大肠杆菌和白假丝酵母与 R-1 作用后的大肠杆菌和白假丝酵母的形态结构

Fig. 3 Structure of normal *E.coli* and *Candida albicans* compared with *E.coli* and *Candida albicans* effected by the R-1 under transmission electron microscope

关于抗菌肽的作用机制研究还有种学说^[13]: 孔道的形成、开启和关闭都依赖于膜的电势, 只有当膜的电势高于 110 mV 时, 孔道才能形成或处于开启状态。最近, Lockey 等^[14]通过电镜直接观察到抗菌肽在细胞膜上造成孔道, 为电势依赖通道的形成提供了直接证据。金属离子 Ba²⁺、Li⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Sr²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺对 R-1 的抑菌活性有促进作用, 推测是其能提高膜的电势, 从而提高 R-1 的

抑菌活性;同时 SDS 对 R-1 的抑菌活性有抑制作用,因为 SDS 是一种阴离子表面活性剂,减弱了膜的电势,从而降低了 R-1 的抑菌活性。

综上所述, R-1 通过含有带正电荷的 Lys 与带负电荷的磷脂分子结合,然后 R-1 的疏水端插入到指示菌的疏水区,改变膜的构象,从而导致菌体的死亡,同时能够提高细胞膜电势和提高细胞膜通透性的物质可以提高 R-1 的抑菌活性。

参考文献:

- [1] Attaway D H, Zaborsky O R. Marine biotechnology. Vol I, Pharmaceutical and bioactive natural products [M]. New York: Plenum Press, 1993.
- [2] 许实波. 海洋生理活性物质的研究及发展趋势[J]. 生物工程进展, 1996, 16(6): 25-33.
- [3] Yotsu M, Yamazaki T, Meguro Y, *et al.* Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas sp.* Isolated from the skin of the pufferfish [J]. *Toxicon*, 1987, 25: 225-228.
- [4] Okami Y. Marine micro-organisms as a source of bioactive agents [J]. *Microb Ecol*, 1986, 2: 65-78.
- [5] 任召珍, 郑媛, 孙谧, 等. 海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 抗菌活性物质的分离及特性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(6): 997-1 001.
- [6] 徐积恩, 朱明珍. 抗生素[M]. 北京: 科学出版社, 1982, 1 521.
- [7] Gluliano B, Andres H, Luigi C. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents[J]. *J Biotenology*, 2002, (5): 1-8.
- [8] 胡 剑, 赵永岐, 王岳五. 枯草杆菌 BS298 分泌的抗真菌蛋白的分离纯化及其部分性质的研究[J]. 微生物学通报, 1997, 24(1): 3-7.
- [9] Mastuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainin and tachyplesins as archetypes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1 462: 1-10.
- [10] Yangl Wwiss T M, Lehrer R I, *et al.* Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin [J]. *Biophys J*, 2000, 79: 2 002- 2 009 .
- [11] Shaj Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-heft-cal antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1 462: 55-70 .
- [12] Bar-lev S, Kirk T K. Effects of molecular oxygen on ligin degradation by *chrysosporum* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1981, 99: 373-378.
- [13] 周霞, 诸葛洪祥. 抗菌肽的分子生物学研究进展[J]. 国外医学·流行病学传染病学分册, 2002, 29(5): 310-313.
- [14] Timothy D, Lockey, Donald D. Ourth, purification and characterization of lysozyme from hemolymph of *Heliothis virescens* Larvae[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 220(3): 502-508.

Properties and bacteriostatic mechanism of the antimicrobial peptide R-1

REN Zhao-zhen¹, SUN Mi², ZHENG Yuan², LIU Jun-zhong², WANG Yue-jun², HAO Jian-hua², ZHANG Sheng-Jun³

(1. Shangdong Marine Food Nutrition Research Institute, Rongcheng 264309, China; 2. Laboratory of Marine Enzyme and Enzyme Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China; 3. Qingdao Environmental Monitoring Station, Qingdao 266071, China)

Received: Sep, 20, 2009

Key words: *Brevibacillus laterosporus*, peptide, Properties, Bacteriostatic mechanism

Abstract: We reported the properties and bacteriostatic mechanism of the antimicrobial peptide R-1 from marine *Brevibacillus laterosporus*. R-1 was very stable to keep the antibacterial activity even after incubation at 121 °C and in the pH rang of 11.0~12.0 for 1 hours. In addition, R-1 was insensitive to trypsin, chymotrypsin, and alkaline proteinase. R-1 activity was slightly enhanced by Ba²⁺, Li⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Sr²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, and Ca²⁺. R-1 showed good compatibility to many common chemical reagents, including EDTA and KH₂PO₄. Tween and SDS showed obvious effects. Amino acid analysis of R-1 showed that R-1 was composed of Leu, Tyr, Val, Ile, Lys, Gly, Met, Ser, and Ala. R-1 had broad-spectrum against many bacteria including a number of pathogens. Observation by scanning electron microscopy suggested that the bioactivity mechanism of R-1 lied in pertoration of cell membrane, leading to bacterium lysis and death.

(本文编辑: 康亦兼)