

林蛙抗菌肽的制备及抑菌活性研究

李兰洲¹, 张爽², 王娟¹, 滕利荣¹, 曹尚¹, 王迪^{1*}

(1. 吉林大学生命科学学院, 长春 130012; 2. 长春中医药大学研究生学院, 长春 130117)

摘要: **目的** 超声波方法提取林蛙表皮多肽, 对其氨基酸组成和抑菌活性进行分析。 **方法** 以 pH 4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液为提取溶剂, 超声波方法提取林蛙表皮多肽, 超高效液相色谱(UPLC)方法分析其氨基酸组成, 同时采用活菌计数和滤纸片方法测定其抑菌活性。 **结果** 超声波方法提取林蛙多肽, 提取率为 19.81%, 多肽分子量在 3000~5000 Da, 该活性多肽作用 2 min 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、铜绿假单胞菌抑菌率均可达 85%以上, 作用 5 min 抑菌率可达 100%; 其对 4 株菌抑菌圈直径均可达 10 mm 以上。 **结论** 采用超声波方法可以从中国林蛙皮中提取抗菌肽物质, 该抗菌肽为碱性多肽, 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌均具有很强的抑菌活性。

关键词: 林蛙抗菌肽; 超声波提取; 氨基酸; 抑菌

Study on preparation and *in vitro* antibacterial activity of polypeptide from the epidermis of *Rana chensinensis*

LI Lan-Zhou¹, ZHANG Shuang², WANG Juan¹, TENG Li-Rong¹, CAO Shang¹, WANG Di^{1*}

(1. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China;

2. Graduate School, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: Objective Active peptides from the epidermis of *Rana chensinensis* were extracted by ultrasonic wave, amino acid and antibacterial activity were researched. **Methods** With ultrasonic wave and pH 4.5 acetic acid-sodium acetate buffer as extraction solvent, skin peptides from the frog were extracted, the amino acid composition and antibacterial activity of polypeptides were analyzed by ultra performance liquid chromatography, colony counting and filtering paper. **Results** Under ultrasonic wave conditions, extraction rate and molecular weight of polypeptides was 19.81% and 3000~5000 Da. The antimicrobial rate of polypeptides to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* were more than 85% when acting 2 min, and 100% when 5 min., the predictive best diameter of the inhibitory zone for the antimicrobial peptides was 1812 mm. **Conclusion** Ultrasound method can be used to extracted antibacterial peptide from *Rana chensinensis* skin material. The antibacterial peptides were alkaline polypeptides, and had a better inhibition for both gram-positive bacteria and gram-negative bacteria .

KEY WORDS: antimicrobial peptides; ultrasonic extraction; amino acid; antimicrobial activity

基金项目: 国家自然科学基金项目(81402955)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (81402955)

*通讯作者: 王迪, 讲师, 主要研究方向为微生物与生化药学。E-mail: jluwangdi@outlook.com

*Corresponding author: WANG Di, Lecturer, College of Life Science, Jilin University. E-mail: jluwangdi@gmail.com

1 引言

食品腐败变质主要由于微生物因素导致食品质量下降或失去食用价值引起^[1],目前食品防腐剂主要有化学防腐剂和天然防腐剂两种,化学防腐剂因其成本低、原料广泛成为目前主要食品防腐剂,但化学防腐剂对人们身体健康存在较大危害,寻找新的高效、安全的天然防腐剂成为目前食品研究领域热点^[2]。

中国林蛙(*Rana chensinensis*)是我国重要经济蛙类,主产于东北地区,东北林蛙,亦称为哈什蚂,是我国集药用、食补、美容功能于一体的珍稀类两栖动物^[3]。研究过程中,人们发现中国林蛙皮肤具有破损后不易感染、自愈速度快、修复能力强等特点^[4]。随着分子生物学研究深入,证实这些现象都与中国林蛙皮肤中所含有的活性肽有关,林蛙抗菌肽提取分离纯化及作为食品保鲜剂研究已有报道^[5],但目前林蛙抗菌肽提取工艺复杂,严重限制了其产业化应用。

超声波辅助提取法是利用机械效应、空化效应及热效应加强胞内物质的释放、扩散及溶解^[6,7],提取时间短、提取温度低、回收率高、氧化损耗小,在中草药等天然物质有效成分提取中应用广泛^[8-10],目前超声波技术已广泛应用于电子、机械、轻工等行业^[11]。

本研究采用超声波工艺提取制备林蛙表皮多肽,深入分析多肽氨基酸组分及抑菌活性,为林蛙抗菌肽产业化应用提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 仪器

精密酸度计(pHs-2c,上海第三仪器分析厂);恒温水浴锅(GSY-II,北京市医疗设备厂);紫外可见分光光度计(752,上海分析仪器厂);超声清洗仪(KS-500D,宁波科技仪器厂);超净工作台(VS1300V,苏州安泰空气技术有限公司);自动高压灭菌锅(MLS-3750,日本SANYO公司);全温振荡培养箱(HZQ-F160,哈尔滨东联电子公司);全自动菌落分析仪(杭州迅数公司);循环水式多用真空泵(SHB-III,郑州长城科工贸公司);高速冷冻离心机(CentrifuGe5810R,德国Eppendorf公司)。

2.2 实验菌株

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginos*, CMCC(B) 10104)
大肠杆菌(*Escherichia coli*, CMCC(B) 44102)
金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, CMCC(B) 26003)
白色念珠菌(*Candida albicans*, CMCC(F) 98001)

2.3 试剂

氢氧化钠、碳酸钠、冰乙酸、NaCl、硫酸铜、钼酸钠、硫酸锂、酒石酸钾钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);蛋白胨、酵母浸粉、琼脂(生化试剂,北京奥博星生物技术有限公司);磷酸、盐酸(分析纯,北京化工厂)。

2.4 实验方法

2.4.1 林蛙抗菌肽的制备

取林蛙干皮,按液料比(mL:g)为50:1比例加入5%醋酸溶液超声波提取1h,过滤,收集滤液,煮沸10min,提取液5000r/min,离心10min,收集上清液,37℃减压浓缩,冻干,得林蛙抗菌肽干粉,干粉提取率为19.81%。

2.4.2 林蛙抗菌肽多肽含量测定^[12]

取林蛙抗菌肽干粉,采用去离子水溶解,制备得1mg/mL抗菌肽溶液,采用Follin法测定溶液中多肽含量,计算林蛙抗菌肽干粉多肽含量为37.5%,经Tricine-SDS-PAGE测定,其多肽分子量在3000~5000Da(图1)。

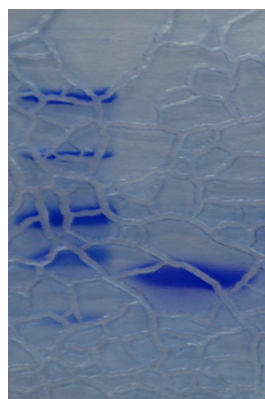


图1 蛙抗菌肽电泳实验结果

Fig. 1 Electrophoresis experiment of antimicrobial peptide

2.4.3 林蛙抗菌肽氨基酸含量分析^[13]

称取样品1mL(蛋白质含量5~10mg/mL)于水解瓶中,1mL过甲酸(纯甲酸:30%过氧化氢=9:1)处理后,

加入 1 mL 盐酸 110 °C 水解 22~24 h, 水解物采用 UPLC 方法测定氨基酸含量。

2.4.4 林蛙抗菌肽抑菌活性测定

分别采用平板活菌计数法^[14]和滤纸片方法^[15]测定林蛙抗菌肽对临床常见四种致病菌抑菌活性进行测定。

(1) 平板活菌计数法测定林蛙抗菌肽抑菌率。将试验菌 24 h 斜面培养物用 PBS 洗下, 制成菌悬液(要求的浓度为: 用 100 μL 滴于 5 g 样品上, 回收菌数 $(1\sim9)\times 10^4$ cfu/mL 取林蛙抗菌肽提取液样品(去离子水稀释至多肽浓度为 1 mg/mL, 采用醋酸维持提取液原始 pH 值 4.0, 灭菌处理)和对照样品(不含抗菌材料的 pH 为 4.0 的醋酸水溶液, 且经灭菌处理)各 4 管。

取上述菌悬液, 分别在每个被试样品和对照样品内均匀滴加 100 μL, 均匀混匀, 开始计时, 作用 2、5、10、20 min, 往被试样品内投入 5 mL PBS, 充分混匀, 做适当稀释, 然后取其中 2~3 个稀释度, 分别吸取 0.5 mL, 置于 2 个平皿中, 用冷却至 40~45 °C 的营养琼脂培养基(细菌)或沙氏琼脂培养基(真菌)15 mL 作倾注, 转动平皿, 使其充分均匀, 琼脂凝固后翻转平板, (35±2) °C 培养 48 h(细菌)或 72 h(白色念珠菌、黑曲霉), 作活菌菌落计数。

试验重复 3 次, 按下式计算抑菌率:

$$X = \frac{N_C - N_S}{N_C} \times 100\%$$

式中: X 为抑菌率, %; N_C 为对照样品平均菌落数, cfu/片; N_S 为被试样品平均菌落数, cfu/片。

(2) 滤纸片测定林蛙抗菌肽抑菌圈直径^[15]。采用 5 mm 直径滤纸片进行。

3 结果与分析

3.1 林蛙皮抗菌肽的氨基酸组分分析

由图 2 可以看出, 对比标准氨基酸图谱, 林蛙抗菌肽中氨基酸主要有: His、Ser、Arg、Gly、Asp、Glu、Thr、Ala、Pro、Cys、Lys、Tyr、Met、Val、Ile、Leu、Phe, 其中含量最高的为碱性氨基酸 Lys, Ser、His 与 Arg 含量也显著高于其余 14 种氨基酸, 因此, 判断林蛙抗菌肽为碱性多肽。

3.2 林蛙抗菌肽抑菌实验结果分析

林蛙抗菌肽样品作用 2 min, 对四种致病菌抑菌率均可达 85% 以上, 作用 5 min, 对四种致病菌抑菌率可达 100%, 抑菌效果显著, 具有很高应用前景(见表 1)。

滤纸片结果显示(图 3), 林蛙抗菌肽提取液对四株菌抑菌圈直径均大于 10 mm(4 组平行滤纸片), 而相同 pH 醋酸水溶液无抑菌圈出现(中间滤纸片), 证明林蛙抗菌肽对四株菌均有很强的抑菌活性。

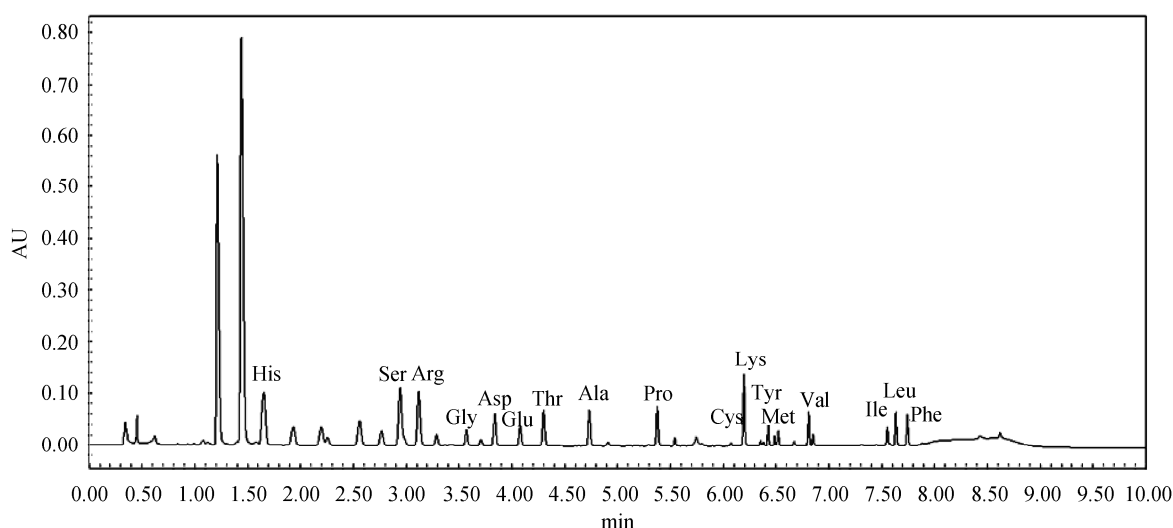


图 2 林蛙抗菌肽水解液氨基酸分析

Fig. 2 Composition of amino acid from peptide hydrolysate of antibacterial forest frog

表1 林蛙抗菌肽对抑菌率实验结果
Table 1 Bacteriostatic rate of the antimicrobial peptide

作用时间	2 min	5 min	10 min	20 min	抑菌圈直径(mm)
白色念珠菌	89.75%	100%	100%	100%	10.55
铜绿假单胞菌	93.92%	100%	100%	100%	18.12
大肠杆菌	90.58%	100%	100%	100%	13.54
金黄色葡萄球菌	99.13%	100%	100%	100%	15.57



A 白色念珠菌抑菌实验结果

A. Bacteriostatic ring of *Candida albicans*



B 铜绿假单胞菌抑菌实验结果

B. Bacteriostatic ring of *Pseudomonas aeruginosa*



C 大肠杆菌抑菌实验结果

C. Bacteriostatic ring of *Escherichia coli*



D 金黄色葡萄球菌抑菌实验结果

D. Bacteriostatic ring of *Staphylococcus aureus*

图3 林蛙抗菌肽抑菌实验结果

Fig. 3 Bacteriostatic ring of the antimicrobial peptide

4 讨论

本研究采用超声波方法提取林蛙多肽, 保证多肽高抑菌活性前提下, 显著提高提取率, 为林蛙多肽产业化推广提供了可靠的实验基础。

抗菌肽原指昆虫体内经诱导而产生的一类具有抗菌活性的碱性多肽物质。这类活性多肽多数具有强碱性、热稳定性以及广谱抗菌等特点^[16]。采用 UPLC 对林蛙表皮多肽氨基酸组成进行分析, 结果发现, 林蛙多肽含有 17 中氨基酸, 其中三种碱性氨基酸 Lys、Ser、Arg 含量最高, 这与先前林蛙抗菌肽为碱性多肽研究一致^[17]。卢学敏^[18]蛋白酶降解获得活性抑菌肽进一步证明抗菌肽为碱性多肽。

论文采用平板活菌计数法和滤纸片方法对超声波方法制备林蛙多肽抑菌活性进行分析, 结果表明, 林蛙多肽作用 5 min 条件下抑菌率即可达 100%, 保证醋酸水溶液无抑菌活性前提下, 相同 pH 林蛙抗菌肽提取液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、铜绿假单胞菌抑菌圈直径均达 10 mm 以上, 证明林蛙抗菌肽为活性多肽, 具有很高抑菌活性, 适合产业化应用。

在食品安全日益紧张的今天, 天然食品防腐剂是目前研究热点, 林蛙多肽是从东北林蛙表皮提取的活性多肽, 安全无毒且抗菌性强, 超声波辅助提取方法简化林蛙多肽制备工艺, 为林蛙多肽产业化应用提供可靠保障, 林蛙多肽在未来食品工业领域中必将扮演重要角色。

参考文献

- [1] 冯炜炜, 陈志伟. 天然食品防腐剂的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(18): 11015-11017, 11177.
Feng WW, Chen ZW. Research progress of the natural food preservative [J]. J Anhui Agric Sci, 2011, 39(18): 11015-11017, 11177.
- [2] 邱芳萍, 周杰, 李向晖, 等. 天然食品保鲜防腐剂-林蛙皮抗菌肽[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 279-280.
Qiu FP, Zhou J, Li XH, et al. Natural preservative - antimicrobial peptides from *Rana temporaria* [J]. Food Sci, 2002, 23(8): 279-280.
- [3] 李玉环, 安金双, 张超, 等. 中国林蛙皮抗菌肽响应面法优化提取条件[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(8): 576-579.
Li YH, An JS, Zhang C, et al. Optimization of the conditions for extraction of antimicrobial peptides from *Rana chensinensis* skin by response surface analysis method [J]. Chin J Pharm, 2010, 41(8): 576-579.
- [4] 金莉莉, 丁忠福, 王秋雨. 中国林蛙皮抗菌肽提取条件的优化研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 233.
Jin LL, Ding ZF, Wang QY. Optimization of extraction conditions for antimicrobial peptides from skin of *Rana chensinensis* [J]. Food Sci, 2008, 29(10): 233.
- [5] 刘红玉, 崔洪斌. 中国林蛙蛙皮抗菌肽的制备及抗菌作用研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3): 217-221.
Liu HY, Cui HB. Preparation of antibiotic peptide from skin of *Rana chensinensis* and study of its antibacterial activity [J]. Chin J Food Hyg, 2007, 19(3): 217-221.
- [6] 宋传奎, 肖斌, 王艳丽, 等. 超声波辅助提取茶多酚工艺条件的优化[J]. 西北农林科技大学学报, 2011, 39(5): 133-146.
Song CK, Xiao B, Wang YL, et al. Optimizing of ultrasonic wave-assisted extraction process of tea-polyphenols substance from green tea [J]. J Northwest A&F Univ (Nat. Sci. Ed.), 2011, 39(5): 133-146.
- [7] 严伟, 李淑芬, 田松江. 超声波协助提取技术[J]. 化工进展, 2002, 21(9): 649-651.
Yan W, Li SF, Tian SJ. Ultrasound-assisted extraction technology [J]. Chem Ind Eng Prog, 2002, 21(9): 649-651.
- [8] 何泊为, 赵培城. 龙井绿茶茶多酚提取工艺研究[J]. 江苏调味副食品, 2009, 26(6): 11-14.
He BW, Zhao PC. Study on the extraction of teapolyphenols from lung-ching green tea [J]. Jiangsu Cond Subsidiary Food, 2009, 26(6): 11-14.
- [9] 曾里, 夏之宁. 超声波和微波对中药提取的促进和影响[J]. 化学研究与应用, 2002, 14(3): 245-249.
Zeng L, Xia ZN. The improvement and influence of ultrasonic and microwave irradiation on the extraction of traditional Chinese medicine [J]. Chem Res Appl, 2002, 14(3): 245-249.
- [10] 夏涛, 时思全, 宛晓春. 微波、超声波对茶叶主要化学成分浸提效果的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(6): 170-173.
Xia T, Shi SQ, Wan XC. Effects of microwave and ultrasound assisted extraction of main chemical components of tea [J]. Trans CSAE, 2004, 20(6): 170-173.
- [11] 邓红, 仇农学, 孙俊, 等. 超声波辅助提取文冠果籽油的工艺条件优化[J]. 农业工程学报, 2007, 23(11): 249-254.
Deng H, Qiu NX, Sun J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction technology of oil from *Xanthoceras sorbifolia burge* seeds [J]. Trans CSAE, 2007, 23(11): 249-254.
- [12] 王爱军, 王凤山, 王友联, 等. 低浓度蛋白质测定方法的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(24): 78-80.
Wang AJ, Wang FS, Wang YL, et al. Study on a method for determining the protein content of low concentration solution [J]. Chin J Biochem Pharm, 2003, 24(24): 78-80.
- [13] 李煜, 金瓯, 郑国钢, 等. 氨基酸分析仪法(过氧酸氧化)测定复方氨基酸注射液(18AA)中胱氨酸的含量[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(7): 871-874.
Li Y, Jin O, Zheng GG, et al. Determination of the content of cystine in compound amino acids injection (18AA) with performic acid oxidation by amino acid analyzer [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2014, 31(7): 871-874.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[M]. 北京: 卫生部卫生法制与监督司印编, 2002.
Health Organization of the People's Republic of China. Technical standard for disinfection [M]. Beijing: the ministry of health, health legal system and supervision department, 2002.
- [15] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[M]. 卫生部卫生法制与监督司印编, 2002: 106.
Health Organization of the People's Republic of China. Technical standard for disinfection [M]. Beijing: the ministry of health, health legal system and supervision department, 2002: 106.
- [16] 黎观红, 洪智敏, 贾永杰, 等. 抗菌肽的抗菌作用及其机制. 动物营养学报[J]. 2011, 23(4): 546-555.
Li GH, Hong ZM, Jia YJ, et al. Activities and mechanisms of action of antimicrobial peptides [J]. Chin J Anim Nutr, 2011, 23(4): 546-555.
- [17] 李玉环, 安金双, 张超, 等. 中国林蛙皮抗菌肽用响应面法优化提取条件[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 41(8): 576-579.
Li YH, An JS, Zhang C, et al. Optimization of the conditions for

extraction of antimicrobial peptides from *Rana chensinensis* skin by response surface analysis method [J]. Chin J Pharm, 2010, 41(8): 576-579.

- [18] 卢学敏, 王颀林, 蓝晓燕, 等. 牡蛎活性多肽的抑菌作用与抗氧化性能研究[J]. 中国酿造, 2013, 32(2): 77-80.

Lu XM, Wang QL, Lan XY, *et al.* Study on the antimicrobial and antioxidant activities of bioactive peptides from oyster [J]. China Brewing, 2013, 32(2): 77-80.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



李兰洲, 男, 本科, 主要研究方向为生物制药专业

E-mail: llz1604397692@163.com



王迪, 讲师, 主要研究方向为微生物与生化药学。

E-mail: jluwangdi@outlook.com