



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115786197 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 19

(21) 申请号 202211479989.X

(22) 申请日 2022.11.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115786197 A

(43) 申请公布日 2023.03.14

(83) 生物保藏信息
CGMCC No. 25792 2022.09.28

(73) 专利权人 浙江万里学院
地址 315100 浙江省宁波市鄞州区钱湖南
路8号

(72) 发明人 于晨 管峰 袁勇军

(74) 专利代理机构 宁波奥圣专利代理有限公司
33226

专利代理师 谢潇

(51) Int. Cl.

- C12N 1/20 (2006.01)
- C07K 14/335 (2006.01)
- C07K 7/06 (2006.01)
- C07K 1/30 (2006.01)
- C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A23L 3/3571 (2006.01)

A23B 4/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 110205266 A, 2019.09.06

KR 20200056897 A, 2020.05.25

US 2010196341 A1, 2010.08.05

US 8470583 B1, 2013.06.25

CN 101451158 A, 2009.06.10

(续)

审查员 孙彦珂

权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图7页

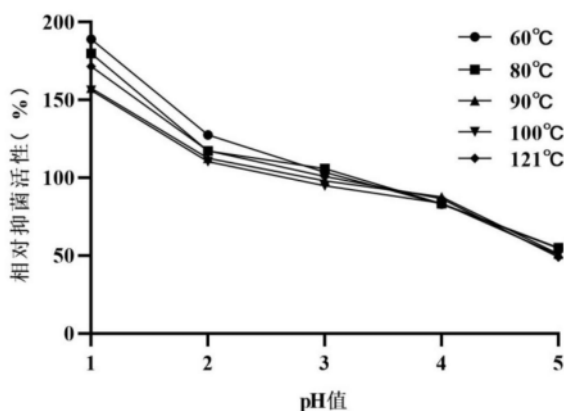
(54) 发明名称

副干酪乳杆菌及其细菌素的制备方法和应用、抗菌肽及其鉴定方法和应用

(57) 摘要

本发明公开的副干酪乳杆菌命名为副干酪乳杆菌LP-A1,于2022年9月28日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,登记注册编号为CGMCC No.25792。该副干酪乳杆菌的代谢产物经分离纯化后获得细菌素粗提物LP-A1和精提物LP-A1_s。LP-A1_c具有良好的广谱抑菌能力、抗氧化能力、热稳定性、辐照稳定性和酶解稳定性,可应用于广谱抑菌剂、杀菌过程中的益生菌佐剂、食品防腐保鲜剂的制备。LP-A1_s可高效拮抗副溶血性弧菌,应用于副溶血性弧菌拮抗剂的制备。质谱鉴定捕获的4种抗菌肽对副溶血性弧菌呈现良好的抑菌活性,可应用于水产养殖

病害防控抗生素替代品或水产食品防腐保鲜剂的制备。



CN 115786197 B

[接上页]

(56) 对比文件

郝彦利;汪立平;黄宇良;薛美翠;崔云云;赵勇;李立;王正全.副溶血性弧菌拮抗菌的筛选鉴定及抑菌物质特性研究.食品与机械.2018,(第06期),

郝彦利;汪立平;黄宇良;薛美翠;崔云云;赵勇;李立;王正全.副溶血性弧菌拮抗菌的筛选鉴定及抑菌物质特性研究.食品与机械.2018,(第06期),参见摘要.

1. 副干酪乳杆菌,其特征在於,命名为副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) LP-A1, 于2022年9月28日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 登记入册编号为CGMCC No.25792。

2. 副干酪乳杆菌的细菌素,其特征在於,所述的副干酪乳杆菌的细菌素的粗提物命名为LP-A1_C, LP-A1_C的制备方法为:以权利要求1所述的副干酪乳杆菌LP-A1的无细胞发酵上清液为粗提原始样品,将硫酸铵固体加至粗提原始样品中,磁力搅拌溶解后,至硫酸铵的饱和度为70%, 4℃静置过夜, 8000r/min离心10min取沉淀,用粗提原始样品体积2%的无菌水复溶沉淀,即获得粗提物LP-A1_C。

3. 根据权利要求2所述的副干酪乳杆菌的细菌素,其特征在於,所述的粗提原始样品的制备方法为:取副干酪乳杆菌LP-A1的单菌落制备种子液,再将种子液以2%体积比的接种量接种于MRS液体培养基, 37℃静置发酵30h后,在4℃的环境温度下, 8000r/min离心10min,即获得所述的粗提原始样品。

4. 根据权利要求2所述的副干酪乳杆菌的细菌素,其特征在於,所述的副干酪乳杆菌的细菌素的精提物命名为LP-A1_S, LP-A1_S的制备方法为:以粗提物LP-A1_C为精提原始样品,将精提原始样品与正丁醇按3:4的体积比混合, 25℃下磁力搅拌2h后, 55℃下旋蒸挥干正丁醇,得到固体物,以无菌水复溶固体物至精提原始样品体积,过0.22μm滤膜,所得滤液即为精提物LP-A1_S。

5. 权利要求2所述的副干酪乳杆菌的细菌素的粗提物LP-A1_C在制备广谱抑菌剂中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在於,所述的广谱抑菌剂针对的致病菌为白色念珠菌、单核增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌、大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、马红球菌、蜡样芽孢杆菌、荧光假单胞菌、副溶血性弧菌、哈维氏弧菌、溶藻性弧菌和嗜水气单胞菌中的一种或多种。

7. 权利要求4所述的副干酪乳杆菌的细菌素的精提物LP-A1_S在制备副溶血性弧菌拮抗剂中的应用。

8. 抗菌肽,其特征在於,所述的抗菌肽来源于权利要求4所述的副干酪乳杆菌的细菌素的精提物LP-A1_S,所述的抗菌肽选自序列分别为EVPCGKKPL、KQYVLT、TAKKAYQN和EVPPFKK的肽段中的一种或多种。

9. 权利要求8所述的抗菌肽的鉴定方法,其特征在於,采用LC-MS/MS质谱鉴定方法,具体方法为:以权利要求4所述的副干酪乳杆菌的细菌素的精提物LP-A1_S为质谱鉴定样品,对该质谱鉴定样品进行前处理,即:将该质谱鉴定样品经ZipTip C₁₈柱除盐浓缩,以20μL含0.1%甲酸、5%乙腈的溶解液溶解,充分震荡涡旋,在4℃的环境温度下, 10000r/min离心20min,取8μL上清液进行质谱鉴定;其中,质谱鉴定条件为:流动相A含0.1%甲酸,流动相B含0.1%甲酸和80%乙腈,流速500nL/min;流动相参数为:0~3min, 95~90%A, 3%B; 3~4.5min, 90~72%A, 3~8%B; 4.5~28min, 72~62%A, 8~32%B; 28~31min, 62~0%A, 32~44%B; 31~40min, 99%B。

10. 权利要求8所述的抗菌肽单独应用于或与其他药物复配应用于制备水产养殖病害防控抗生素替代品或水产食品防腐保鲜剂。

副干酪乳杆菌及其细菌素的制备方法和应用、抗菌肽及其鉴定方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物新资源及生物与医药领域,具体是一种副干酪乳杆菌及其细菌素的制备方法和应用、抗菌肽及其鉴定方法和应用。

背景技术

[0002] 副溶血性弧菌为水产品中较为普遍的致病性弧菌,可引起水产品短时间内的爆发性死亡,由其引起的急性肝胰腺坏死综合症曾造成中国、越南、泰国等对虾主产国对虾产量减半,成为影响全球对虾产业的重要水产致病菌之一。近年来,市售水产品普遍存在副溶血性弧菌污染且分离菌株均表现一定程度耐药性,寻找天然抗菌药物已成为减少水产致病菌获得耐药性的关键环节之一。自2008年部分国家禁止在水产养殖中使用抗生素类化学药物后,益生菌防治因具有环境友好、生物安全等优点逐渐兴起。目前关于乳酸菌生物学特性及安全性评价的文章报道相对较少,但已有研究结果显示,部分乳酸菌存在耐药性和可转移耐药性。筛选出安全性高,生长旺盛、代谢稳定,对外周环境具有良好适应能力的乳酸菌菌株是乳酸菌筛选过程中的关键问题,决定着乳酸菌及其相关制剂的作用效果与应用前景。

[0003] 细菌素通常是一类对相关致病菌具有良好抑制效果的大分子蛋白或小肽类物质,乳酸菌代谢产物中的细菌素类物质因安全性高、副作用小、活性作用时间长而备受研究者广泛青睐。已有研究结果显示,细菌素BM173和乳杆菌细菌素BM1300均能有效抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长,肠球菌细菌素Durancin GL能够有效抑制单增李斯特氏菌的生长,目前,越来越多产细菌素乳酸菌的研究报道集中于乳酸链球菌和乳酸杆菌,但对于副干酪乳杆菌源细菌素的报道仍然相对较少且不够全面,且目前关于细菌素对副溶血性弧菌抗菌模式方面的研究仍然有限,挖掘能应用于水产致病菌防控的乳酸菌出发菌株并了解其代谢产物中细菌素成分的抗菌模式有利于打开水产药物研发的新大门。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是,针对现有技术的不足,提供一种副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)LP-A1及其细菌素的制备方法和应用、抗菌肽及其鉴定方法和应用。该副干酪乳杆菌的细菌素粗提物LP-A1_c具有良好的广谱抑菌能力、抗氧化能力、热稳定性、辐照稳定性和酶解稳定性;精提物LP-A1_s可高效拮抗副溶血性弧菌。经LP-A1_s的LC-MS/MS质谱鉴定捕获的4种抗菌肽(EVPCGKKPL、KQYVLT、TAKKAYQN、EVPPFKK)对副溶血性弧菌呈现良好的抑菌活性。

[0005] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:副干酪乳杆菌,命名为副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)LP-A1,于2022年9月28日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(北京市朝阳区北辰西路1号院3号),登记入册编号为CGMCC No.25792,其16S rDNA的碱基序列如SEQ ID NO.1所示。

[0006] 副干酪乳杆菌的细菌素,所述的副干酪乳杆菌的细菌素的粗提物命名为LP-A1_c,

LP-A1_c的制备方法为:以副干酪乳杆菌LP-A1的无细胞发酵上清液为粗提原始样品,将硫酸铵固体加至粗提原始样品中,磁力搅拌溶解后,至硫酸铵的饱和度为70%,4℃静置过夜,8000r/min离心10min取沉淀,用粗提原始样品体积2%的无菌水复溶沉淀,即获得粗提物LP-A1_c。

[0007] 具体地,所述的粗提原始样品的制备方法为:取副干酪乳杆菌LP-A1的单菌落制备种子液,再将种子液以2%体积比的接种量接种于MRS液体培养基,37℃静置发酵30h后,在4℃的环境温度下,8000r/min离心10min,即获得所述的粗提原始样品。

[0008] 副干酪乳杆菌的细菌素,所述的副干酪乳杆菌的细菌素的精提物命名为LP-A1_s,LP-A1_s的制备方法为:以粗提物LP-A1_c为精提原始样品,将精提原始样品与正丁醇按3:4的体积比混合,25℃下磁力搅拌2h后,55℃下旋蒸挥干正丁醇,得到固体物,以无菌水复溶固体物至精提原始样品体积,过0.22μm滤膜,所得滤液即为精提物LP-A1_s。

[0009] 上述副干酪乳杆菌的细菌素的粗提物LP-A1_c在广谱抑菌剂、杀菌过程中的益生菌佐剂、食品防腐保鲜剂中的应用。在pH值1~5范围内,LP-A1_c经121℃处理30min,对副溶血性弧菌的抑菌活性变化<5.70%,具有良好的热稳定性。此外,LP-A1_c经100~500J辐照能量处理15s,相对抑菌活性均>80%,具有良好的辐照稳定性;LP-A1_c的浓度≥300μg/mL时,其DPPH自由基清除率高于对应浓度的抗坏血酸,具有良好的抗氧化能力;经α-淀粉酶、β-淀粉酶、脂肪酶、透明质酸酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、α-胰凝乳蛋白酶、过氧化氢酶和蛋白酶处理后,其相对抑菌活性均>95%,具有良好的酶解稳定性。

[0010] 具体地,所述的广谱抑菌剂针对的致病菌包括白色念珠菌、单核增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌、大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、马红球菌、蜡样芽孢杆菌、荧光假单胞菌、副溶血性弧菌、哈维氏弧菌、溶藻性弧菌和嗜水气单胞菌中的一种或多种。可见LP-A1_c对所列的包括革兰氏阳性菌(马红球菌、单核增生李斯特氏菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌)、革兰氏阴性菌(阪崎肠杆菌、大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、溶藻性弧菌、哈维氏弧菌、嗜水气单胞菌、副溶血性弧菌、荧光假单胞菌)和真菌(白色念珠菌)在内的13种致病菌均呈现良好抑菌活性。

[0011] 上述副干酪乳杆菌的细菌素的精提物LP-A1_s在副溶血性弧菌拮抗剂中的应用。LP-A1_s对副溶血性弧菌的最小抑菌浓度为750μg/mL。

[0012] 抗菌肽,所述的抗菌肽来源于权利要求4所述的副干酪乳杆菌的细菌素的精提物LP-A1_s,所述的抗菌肽包括序列分别为EVPCGKKPL、KQYVLT、TAKKAYQN和EVPPFKK的肽段中的一种或多种。EVPCGKKPL、KQYVLT、TAKKAYQN、EVPPFKK的分子量分别为969.53Da、750.43Da、964.50Da、843.49Da,对副溶血性弧菌的最小抑菌浓度分别为1.5mg/mL、3mg/mL、3mg/mL、1.5mg/mL。

[0013] 上述抗菌肽的鉴定方法,采用LC-MS/MS质谱鉴定方法,具体方法为:以权利要求4所述的副干酪乳杆菌的细菌素的精提物LP-A1_s为质谱鉴定样品,对该质谱鉴定样品进行前处理,即:将该质谱鉴定样品经ZipTip C₁₈柱除盐浓缩,以20μL含0.1%甲酸、5%乙腈的溶解液溶解,充分震荡涡旋,在4℃的环境温度下,10000r/min离心20min,取8μL上清液进行质谱鉴定;其中,质谱鉴定条件为:流动相A含0.1%甲酸,流动相B含0.1%甲酸和80%乙腈,流速500nL/min;流动相参数为:0~3min,95~90%A,3%B;3~4.5min,90~72%A,3~8%B;4.5~28min,72~62%A,8~32%B;28~31min,62~0%A,32~44%B;31~40min,99%B。

[0014] 上述抗菌肽单独应用于或与其他药物复配应用于水产养殖病害防控抗生素替代品或水产食品防腐保鲜剂。

[0015] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:本发明公开的副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)LP-A1为自健康婴儿粪便分离得到的一株新的副干酪乳杆菌,其代谢产物经分离纯化后获得细菌素粗提物LP-A1_c,经进一步纯化后获得细菌素精提物LP-A1_s。LP-A1_c具有良好的广谱抑菌能力、抗氧化能力、热稳定性、辐照稳定性和酶解稳定性,可应用于广谱抑菌剂、杀菌过程中的益生菌佐剂、食品防腐保鲜剂的制备。LP-A1_s可高效拮抗副溶血性弧菌,应用于副溶血性弧菌拮抗制剂的制备。经LP-A1_s的LC-MS/MS质谱鉴定捕获的4种抗菌肽(EVPCGKKPL、KQYVLT、TAKKAYQN、EVPPFKK)对副溶血性弧菌呈现良好的抑菌活性,可应用于水产养殖病害防控抗生素替代品或水产食品防腐保鲜剂的制备。

附图说明

- [0016] 图1为副干酪乳杆菌LP-A1的菌落形态图;
- [0017] 图2为副干酪乳杆菌LP-A1的革兰氏染色镜检图;
- [0018] 图3为LP-A1_c的热稳定性图;
- [0019] 图4为LP-A1_c的辐照稳定性图;
- [0020] 图5为LP-A1_c的酶解稳定性图;
- [0021] 图6为LP-A1_c的DPPH自由基清除率图;
- [0022] 图7为EVPCGKKPL肽段的二级质谱图;
- [0023] 图8为KQYVLT肽段的二级质谱图;
- [0024] 图9为TAKKAYQN肽段的二级质谱图;
- [0025] 图10为EVPPFKK肽段的二级质谱图。

具体实施方式

[0026] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0027] 1、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)LP-A1的分离鉴定

[0028] 从健康婴儿粪便中分离LP-A1:取粪便稀释液涂布于MRS琼脂平板,37℃厌氧培养48h,挑取菌落典型特征较强的单菌落连续划线培养至菌落特征一致;挑取已纯化的单菌落于MRS肉汤中37℃,静置培养24h,得到LP-A1菌株,其菌落形态图见图1,革兰氏染色镜检图见图2。该菌株革兰氏染色呈阳性,短杆状,菌落呈乳白色圆形,菌落边缘整齐,有凸起,易挑取,菌落直径为1.0~1.5mm。

[0029] 以LP-A1菌株的DNA作为模板,进行16S rDNA扩增,正向引物27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3',反向引物1492r:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。PCR反应条件:94℃预变性5min;94℃变性1min,55℃复性1min,72℃延伸90s,30次循环;72℃延伸10min。将PCR产物回收测序,其16S rDNA的碱基序列如SEQ ID NO.1所示。

[0030] 2、LP-A1的细菌素的粗提物LP-A1_c的制备及广谱抑菌能力测试

[0031] (1)LP-A1_c的制备

[0032] 以副干酪乳杆菌LP-A1的无细胞发酵上清液为粗提原始样品,将硫酸铵固体加至粗提原始样品中,磁力搅拌溶解后,至硫酸铵的饱和度为70%,4℃静置过夜,8000r/min离

心10min取沉淀,用粗提原始样品体积2%的无菌水复溶沉淀,即获得粗提物LP-A1_c。

[0033] 其中副干酪乳杆菌LP-A1的无细胞发酵上清液的制备方法为:取副干酪乳杆菌LP-A1的单菌落制备种子液,再将种子液以2%体积比的接种量接种于MRS液体培养基,37℃静置发酵30h后,在4℃的环境温度下,8000r/min离心10min,即获得副干酪乳杆菌LP-A1的无细胞发酵上清液。

[0034] (2)LP-A1_c的广谱抑菌能力测试

[0035] 将表1所列包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌在内的13种致病菌活化培养至对数期,调节菌液浓度为 1×10^7 CFU/mL,通过抑菌试验,获得LP-A1_c抑菌谱,见表1。

[0036] 表1:LP-A1_c抑菌谱

指示菌株	抑菌圈直径 (mm)	抑菌效果
白色念珠菌	16.75 ± 0.13	+++
马红球菌	15.97 ± 0.29	+++
单核增生李斯特氏菌	14.81 ± 0.06	++
蜡样芽孢杆菌	17.27 ± 0.12	+++
金黄色葡萄球菌	14.28 ± 0.03	++
阪崎肠杆菌	11.58 ± 0.10	+
[0037] 大肠埃希氏菌	16.46 ± 0.03	+++
鼠伤寒沙门氏菌	13.27 ± 0.02	++
溶藻性弧菌	15.53 ± 0.10	+++
哈维氏弧菌	18.27 ± 0.04	+++
嗜水气单胞菌	16.78 ± 0.02	+++
副溶血性弧菌	17.72 ± 0.03	+++
荧光假单胞菌	17.15 ± 0.05	+++

[0038] 注:+++ ,表示抑菌圈直径15 ~ 20mm; ++ ,表示抑菌圈直径12 ~ 15mm; + ,表示抑菌圈直径7.8 ~ 12mm。

[0039] 如表1所示,LP-A1_c具有广谱抑菌潜力,对包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌在内的13种致病菌呈现抑菌活性,对5种常见水产致病菌(溶藻性弧菌、哈维氏弧菌、嗜水气单胞菌、副溶血性弧菌、荧光假单胞菌) 抑菌活性尤其优良,抑菌圈直径均大于15mm,具有作为广谱抑菌剂的优良潜力。

[0040] 3、LP-A1_c的热稳定性及辐照稳定性测试

[0041] (1)LP-A1_c的热稳定性测试

[0042] 取pH值分别为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0的LP-A1_c样品,分别在60℃、70℃、80℃、90℃、100℃、121℃中加热30min,置于4℃冰箱骤冷稳定1h,以未做处理的LP-A1_c为空白对照组,通过牛津杯抑菌试验检测各样品相对抑菌活性,探讨分析LP-A1_c不同pH值条件下的热

稳定性。

[0043] (2)LP-A1_c的辐照稳定性测试

[0044] 取等量LP-A1_c分别在1HZ闪烁频率,100J、200J、300J、400J、500J的单脉冲能量下闪烁15次,以未做处理的LP-A1_c为空白对照组,通过牛津杯抑菌试验检测各样品相对抑菌活性,探讨分析LP-A1_c的辐照稳定性。

[0045] 结果如图3、图4所示,在pH值1~5范围内,LP-A1_c经60~121℃处理,相对抑菌活性均大于80%;LP-A1_c经121℃处理30min,对副溶血性弧菌的抑菌活性变化<5.70%,热稳定性良好,可作为热杀菌过程中的益生菌类佐剂。LP-A1_c经100~500J辐照能量处理15s,相对抑菌活性均>80%,具有良好的辐照稳定性,可作为冷杀菌过程中的益生菌类佐剂。

[0046] 4、LP-A1_c的酶解稳定性及抗氧化能力测试

[0047] (1)LP-A1_c的酶解稳定性测试

[0048] 取等量LP-A1_c分别加入终浓度为1mg/mL的过氧化氢酶、蛋白酶K、 α -胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶溶液,在各酶最适温度下温浴2h,100℃水浴5min使酶灭活,以未经酶处理的LP-A1_c为空白对照组,以相同浓度的酶溶液为干扰对照组,通过牛津杯抑菌试验检测各样品的相对抑菌活性,探讨分析LP-A1_c的酶解稳定性。

[0049] (2)LP-A1_c的抗氧化能力测试

[0050] 配置浓度为12mg/mL的LP-A1_c母液,将LP-A1母液梯度稀释,分别获得浓度为6000、2400、1200、600、300、150、75、15、7.5、3、1、0.25 μ g/mL的样品稀释液。分别取各稀释度样品溶液2mL,加入1mL 0.2mmol/L的DPPH-无水乙醇溶液,均匀混合后避光反应30min,在OD_{517nm}处测量吸光度值,计算各样品DPPH自由基清除能力,以相同浓度的抗坏血酸为对照,探讨分析LP-A1_c抗氧化能力。

[0051] 结果如图5、图6所示,LP-A1_c经 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、脂肪酶、透明质酸酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、 α -胰凝乳蛋白酶、过氧化氢酶和蛋白酶处理后,其相对抑菌活性均>95%,具有良好的酶解稳定性;当LP-A1_c浓度大于300 μ g/mL时,其DPPH自由基清除率高于对应浓度的抗坏血酸,具有良好的抗氧化能力,有作为食品防腐保鲜剂的应用潜力。

[0052] 5、LP-A1的细菌素的粗提物LP-A1_s的制备及抑菌能力测试

[0053] (1)LP-A1_s的制备

[0054] 以粗提物LP-A1_c为精提原始样品,将精提原始样品与正丁醇按3:4的体积比混合,25℃下磁力搅拌2h后,55℃下旋蒸挥干正丁醇,得到固体物,以无菌水复溶固体物至精提原始样品体积,过0.22 μ m滤膜,所得滤液即为精提物LP-A1_s。

[0055] (2)LP-A1_c与LP-A1_s纯化条件比较

[0056] 采用BCA试剂盒分别测定副干酪乳杆菌LP-A1的无细胞发酵上清液、LP-A1_c、LP-A1_s的蛋白含量,按(式1)计算蛋白得率,按(式2)计算蛋白比活力,同时采用微量肉汤二倍稀释法测定LP-A1_c与LP-A1_s对副溶血性弧菌的最小抑菌浓度。

[0057] 得率(%) = 纯化前干物质重量/纯化后干物质重量 \times 100 (式1)

[0058] $IU = [\Delta A / (0.01 \times t)] \times D/m$ (式2)

[0059] 式中:

[0060] IU-比活力

[0061] ΔA -反应时间内吸光值变化

- [0062] t-反应时间,min
 [0063] D-提取的总酶液为反应系统内酶液的倍数
 [0064] m-反应蛋白的质量,mg
 [0065] 表2:纯化效果比较

	纯化条件	IU	纯化倍数	得率 (%)	相对抑菌活 (%)	MIC (mg/mL)
[0066]	硫酸铵沉淀(LP-A1 _c)	770	28	37	100	6
	正丁醇萃取(LP-A1 _s)	1766	64	8	88	0.75

[0067] 结果如表2所示,经硫酸铵沉淀,LP-A1_c获得28倍纯化,蛋白比活力为770IU,最小抑菌浓度为6mg/mL;经正丁醇萃取,LP-A1_s获得64倍纯化,蛋白比活力为1766IU,最小抑菌浓度为750μg/mL,对副溶血性弧菌呈现高效拮抗能力,具有应用于水产疾病防控的巨大潜力。

[0068] 6、4种抗菌肽的制备及抗副溶血性弧菌活性

[0069] (1)4种抗菌肽的制备

[0070] 4种抗菌肽由LP-A1_s经LC-MS/MS质谱鉴定捕获。样品经ZipTip C₁₈柱除盐浓缩,以20μL含0.1%甲酸、5%乙腈的溶解液溶解,充分震荡涡旋,在4℃的环境温度下,10000r/min离心20min,取8μL上清液进行质谱鉴定;其中,质谱鉴定条件为:流动相A含0.1%甲酸,流动相B含0.1%甲酸和80%乙腈,流速500nL/min;流动相参数为:0~3min,95~90%A,3%B;3~4.5min,90~72%A,3~8%B;4.5~28min,72~62%A,8~32%B;28~31min,62~0%A,32~44%B;31~40min,99%B。通过单次全扫描获得350~1550m/z的初级质谱,通过阶跃归一化碰撞能量获得次级质谱数据。序列采用PEAKS软件进行数据库检索,按照质谱可信度与肽性质筛选抗菌肽序列。

[0071] (2)4种抗菌肽的最小抑菌浓度测定

[0072] 将筛选而得的抗菌肽反向合成,采用微量肉汤二倍稀释法测定其最小抑菌浓度。

[0073] 表3:抗菌肽最小抑菌浓度

合成肽序列	浓度 (mg/mL)							
	6	3	1.5	0.75	0.38	0.19	0.094	0.047
[0074] EVPCGKKPL	-	-	-	+	+	+	+	+
KQYVLT	-	-	+	+	+	+	+	+
TAKKAYQN	-	-	+	+	+	+	+	+
EVPPFKK	-	-	-	+	+	+	+	+

[0075] 结果如表3和图7~图10所示,共筛选出4条对副溶血性弧菌呈现抑菌效果的抗菌肽,分别为EVPCGKKPL (969.53Da)、KQYVLT (750.43Da)、TAKKAYQN (964.50Da)、EVPPFKK (843.49Da),对副溶血性弧菌的最小抑菌浓度分别为1.5mg/mL、3mg/mL、3mg/mL、1.5mg/mL,有应用于新型小分子肽类抑菌药物开发的良好潜力。

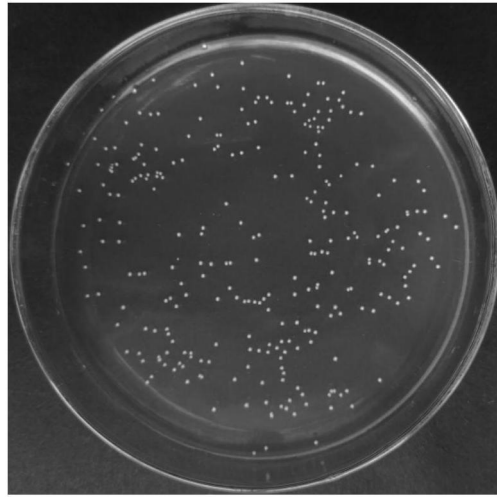


图1



图2

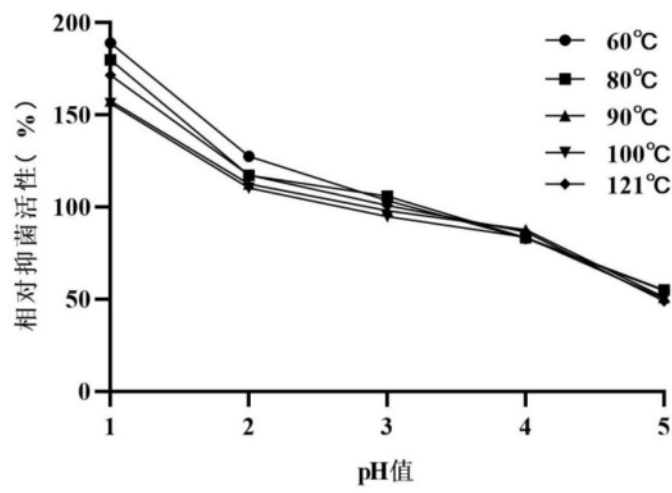


图3

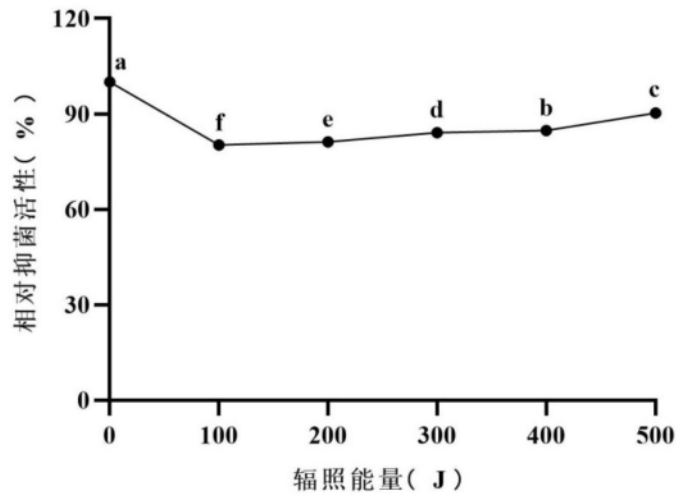


图4

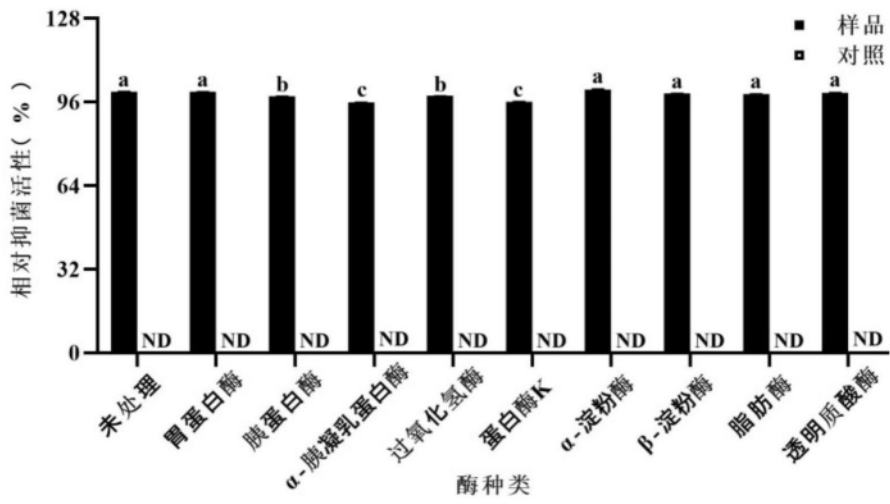


图5

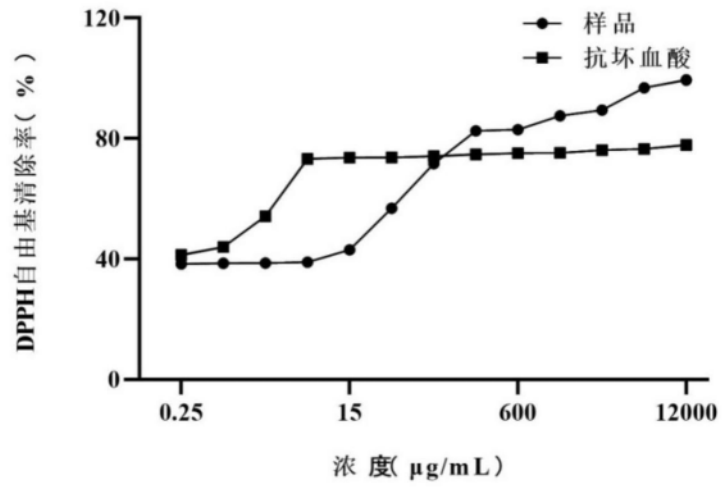


图6

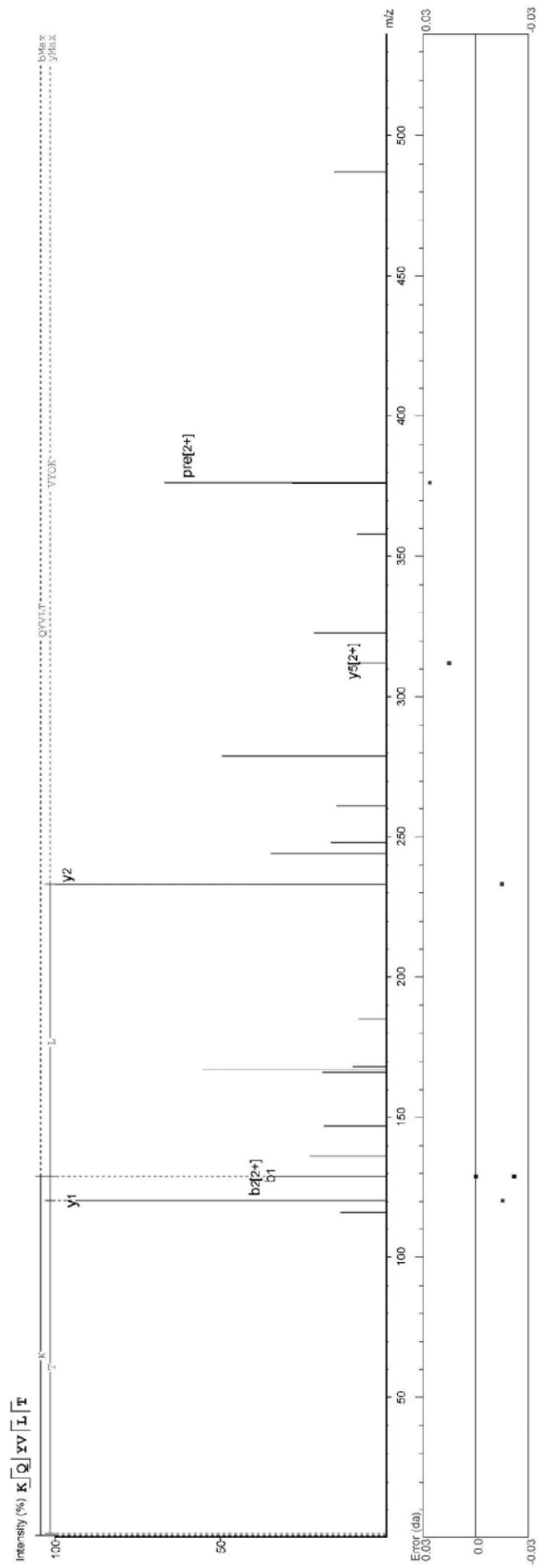


图8

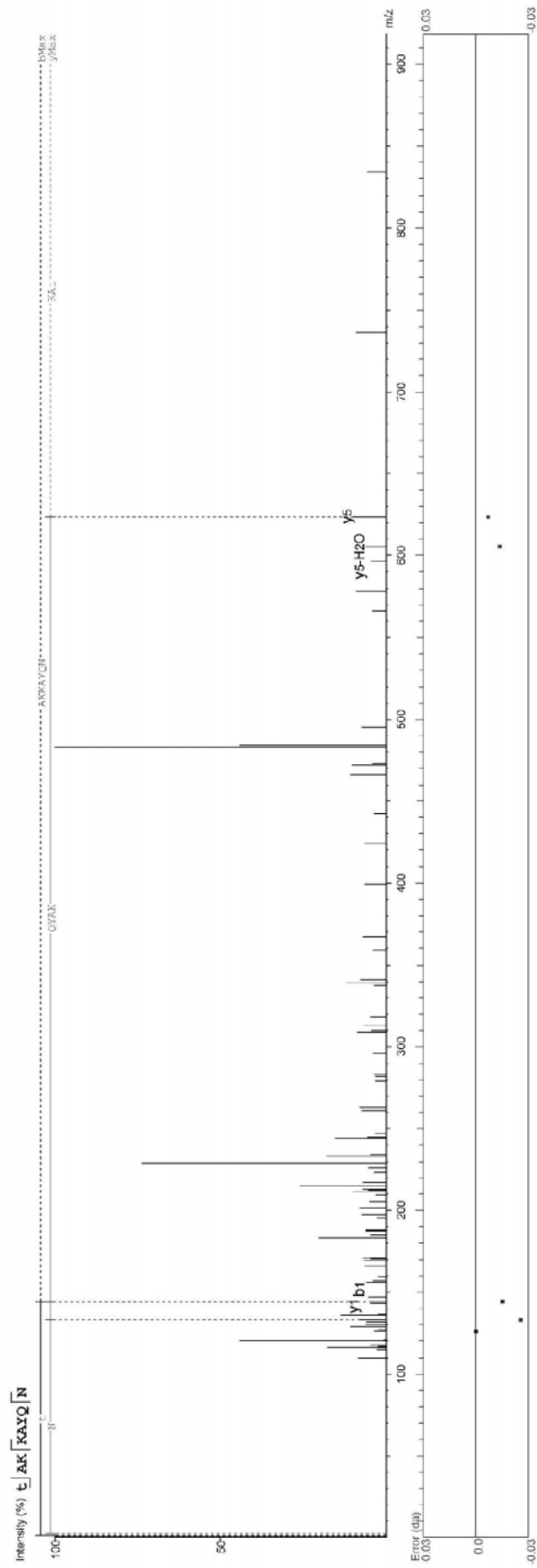


图9

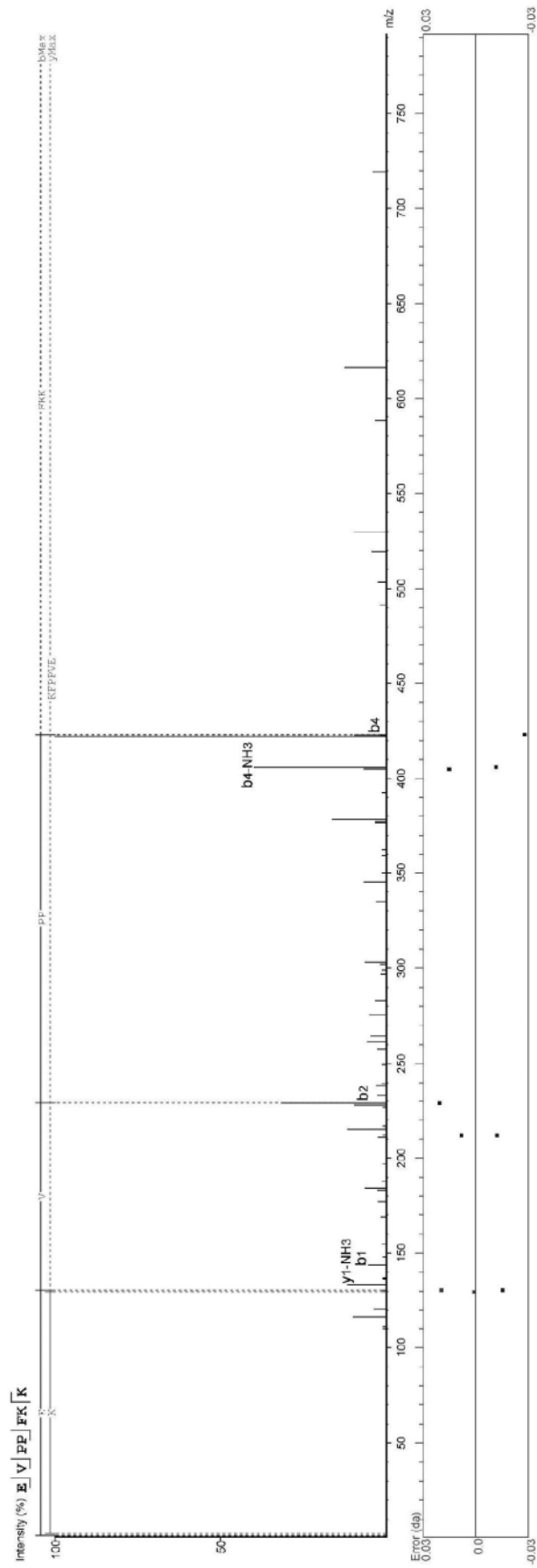


图10