

抗菌肽F1高产菌株筛选鉴定及其对多重耐药菌生物膜形成的抑制作用

王群, 吴嘉诺, 叶铸明, 刘静乐, 王娟, 杨志杰, 曹庸*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 该研究以 *L. paracasei* subsp. *Tolerans* FX-6 为出发菌株, 经过 ^{60}Co γ 射线辐照诱变, 筛选出一株高产抗菌肽 F1 的突变菌株 (菌 26)。对菌 26 进行 16S rDNA 序列比较分析发现其与 FX-6 具有高度相似性。进一步对菌 26 的牛奶发酵粗提物进行分离纯化, 成功富集抗菌肽 F1。通过抑菌实验发现, 菌 26 的牛奶发酵粗提物对 *E. coli* 的最低抑菌质量浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 为 3.16 mg/mL, 较 FX-6 牛奶发酵粗提物的 MIC 降低了 75%, 同时抗菌肽 F1 的产量也提高了 3.03 倍, 初步推断抗菌肽 F1 质量浓度与菌株的抑菌活性之间可能存在正相关关系。前期研究已经发现抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 的 MIC 为 320.0 $\mu\text{g/mL}$, 该实验进一步研究表明当抗菌肽 F1 的质量浓度达到 $2\times\text{MIC}$ 时, 可抑制 50% 以上的黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 生物膜的形成。基于以上研究结果表明, 菌 26 比出发菌株具有更高的产抗菌肽 F1 能力, 且抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 的生物膜形成具有显著的抑制作用。该研究为高产抗菌肽菌株的获得提供研究思路, 并有望为多重耐药菌感染的防控提供物质基础。

关键词: 抗菌肽 F1; 辐照诱变; 黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45; 抑菌活性; 生物膜

文章编号: 1673-9078(2024)10-351-361

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1183

Screening and Identification of A High Yield Antimicrobial Peptide F1-producing Strain and Biofilm Formation Inhibition in Multidrug-resistant Bacteria

WANG Qun, WU Jianuo, YE Zhuming, LIU Jingle, WANG Juan, YANG Zhijie, CAO Yong*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6, as the original starting strain, was mutated through ^{60}Co γ -ray irradiation. A strain (Strain 26) producing antimicrobial peptide F1 at high yield was identified from the mutated strains. High similarity between FX-6 and strain 26 was revealed through comparative analysis of their 16S rDNA sequences. The crude extract of milk fermented by Strain 26 was further purified to successfully enrich antimicrobial peptide F1. Bacteriostatic experiments showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude extract of milk fermented by Strain 26 on *Escherichia coli* was 3.16 mg/mL, which was 75% lower than the MIC of the crude extract of milk fermented by FX-6, and the yield

引文格式:

王群, 吴嘉诺, 叶铸明, 等. 抗菌肽 F1 高产菌株筛选鉴定及其对多重耐药菌生物膜形成的抑制作用 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 351-361.

WANG Qun, WU Jianuo, YE Zhuming, et al. Screening and identification of a high yield antimicrobial peptide F1-producing strain and biofilm formation inhibition in multidrug-resistant bacteria [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 351-361.

收稿日期: 2023-10-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972018)

作者简介: 王群 (1989-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品功能因子的挖掘及其活性机制研究, E-mail: wq0401@scau.edu.cn

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品功能因子的挖掘及其活性机制研究, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

of antimicrobial peptide F1 by Strain 26 was 3.03-fold that by FX-6. The results preliminarily indicate a possible positive correlation between the concentration of antimicrobial peptide F1 and the antimicrobial activity of the strain. Our preliminary results have shown that the MIC of antimicrobial peptide F1 against colistin-resistant *E. coli* SHP45 was 320.0 $\mu\text{g/mL}$, and the results of this study further demonstrated that the biofilm formation in colistin-resistant *E. coli* SHP45 was inhibited by over 50% when the concentration of antimicrobial peptide F1 reached $2\times$ MIC. These findings indicate that Strain 26 exhibited a stronger ability to produce antimicrobial peptide F1 than FX-6 and that antimicrobial peptide F1 significantly inhibited biofilm formation in colistin-resistant *E. coli* SHP45. This study offers insights into obtaining strains producing antimicrobial peptide F1 at high yield and is expected to serve as a material basis for the prevention and control of multidrug-resistant bacterial infections.

Key words: antimicrobial peptide F1; radiation mutagenesis; colistin-resistant *E. coli* SHP45; inhibitory activity; biofilm

抗生素的误用和滥用,致使多重耐药性革兰氏阴性细菌感染问题日益严重,亟需安全有效的防控手段^[1]。抗菌肽是一类具有高生物活性的小分子肽类^[2],具有广泛的抗菌谱^[3]、高抗菌活性、不易产生耐药性^[4]、独特的作用机理、热稳定、良好的水溶性以及对高等动物正常细胞无毒害作用等显著优点^[5]。抗菌肽的杀菌机理多种多样,主要包括破坏细菌细胞膜、干扰细菌 DNA 和 RNA 的合成、抑制蛋白质合成等。其中 α -螺旋型抗菌肽以垂直膜表面的方式插入细菌细胞膜,形成孔道或导致膜破坏,从而使泄露细胞内容的细菌死亡; β -折叠抗菌肽能在平行方向上与细菌细胞膜结合,干扰膜的完整性,导致细胞死亡^[6]。目前许多研究也报道了多种抗菌肽的杀菌模型,用以解释抗菌肽通过改变细菌细胞膜通透性的杀菌机理,包括桶板模型、毯式模型、环形孔模型等^[7]。总体而言,抗菌肽通过多种机制对抗细菌的生长和繁殖,具有广泛的抗菌活性,有望成为解决多重耐药防控问题的理想活性物,有着广阔的开发应用前景^[8,9]。2015年,我国发现了一株从猪粪便中分离得到的含有 *mcr-1* 基因的大肠杆菌—黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45,其基因 *mcr-1* 以质粒的形式在不同菌株之间水平转移,导致其他细菌获得含 *mcr-1* 基因的质粒,从而赋予细菌对多黏菌素类抗生素的抵抗能力,这不仅对人类健康构成严重威胁,也给全球公共卫生带来全新挑战^[10,11]。因此,开发天然安全、对黏菌素耐药细菌有强抑制作用且不易产生耐药性的新型抗菌物质具有重要意义,而作为天然来源的抗菌肽有望成为行之有效的候选物。

在前期的研究中,从可食性西藏开菲尔粒中分离出安全的产抗菌肽菌株 *L. paracasei* FX-6 (简称:菌株 FX-6),通过活性追踪法,经液相色谱分离得到天然安全的抗菌肽单体 F1^[12],并经 MALDI-TOF-

MS 等方法分析确定其为含四个非正常氨基酸的新型多肽,氨基酸序列为 Thr-DAP-Asn-Thr-PEA-Gln-Ala-Arg-Ser-Lys-Gln-Asp- PEA-CySH-Val-Asn-PEA-Tau^[13]。抗菌肽 F1 的抗菌谱广,对大多数细菌和霉菌具有抑菌作用,同时具有极高的耐热性、耐酶性和耐酸碱性的^[14],并且能有效抑制细菌产生耐药性的能力^[15]。在前期研究中,发现抗菌肽 F1 能破坏黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 的磷脂双层结构,从而显著抑制其生长^[16]。然而,出发菌株 FX-6 的抗菌肽 F1 产率极低(约占 FX-6 牛奶发酵粗提物质量的 1%),并且目前仅对抗菌肽 F1 在抑制黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 生长方面进行了研究^[16],其对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 生物膜形成的影响仍然未知。为了解决上述问题,拟采用 ⁶⁰Co γ 射线辐照诱变技术对菌 FX-6 进行处理,以期获得高产抗菌肽 F1 菌株,并对其进行了分离和纯化,富集抗菌肽 F1。进一步研究抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 生物膜形成的抑制作用。该研究将为高产抗菌肽菌株筛选及多重耐药细菌感染的防控提供解决策略和研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株 FX-6 (*L. paracasei* subsp. *Tolerans* FX-6),由西藏开菲尔粒中分离纯化获得, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存于华南农业大学食品学院;指示菌 *E. coli* ATCC 25922,保存于华南农业大学食品学院;指示菌株黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45,由华南农业大学兽医学院动物微生物抗药性国家风险评估实验室储存。

MHB 肉汤、MRS 肉汤、MRS 琼脂、LB 肉汤、蛋白胨、牛肉膏、酵母粉,广东环凯生物技术有限

公司; 伊利牛奶, 伊利集团; 葡萄糖、 $\phi=33\%$ 冰乙酸, 天津福晨化学试剂厂; TFA, Aladdin® 公司; 分析纯乙腈、分析纯甲醇, 天津富宇精细化工; 色谱纯乙腈、色谱纯甲醇, 美国 J.T.Baker 公司; 结晶紫, 上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

BS200S 万分之一天平, 德国 Sartorius 公司; F-90 千分之一天平, 浙江台州粮仪厂; KDDC-40 十分之一天平, 科大创新股份有限公司; LC-15C 高效液相色谱分析仪, 岛津(中国)有限公司。冷冻干燥机, 北京德天佑科技发展有限公司; R204B3/RE-52AA 旋转蒸发器, 上海申生科技有限公司; 500E 超声波清洗器, 江苏昆山市超声清洗器厂; HH-S 数显恒温水浴锅, 江苏省金坛市医疗仪器厂; SYDLAB-TFC 通风橱, 青岛仪航实验设备有限公司; 电热恒温鼓风干燥机, 厦门德仪设备有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏州净化; LDZM-40KCS 高压灭菌锅, 上海申安; UV3010 紫外可见分光光谱仪, 日立; HZQ-C 摇床, 常州澳华仪器厂; Enspire 2300 多功能酶标仪, 美国 PE 公司; 磁力水浴锅, 上海析达仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株 FX-6 的 ^{60}Co γ 射线辐照诱变

将保藏于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 甘油管中的菌株 FX-6 接种到 MRS 液体培养基中, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床中过夜活化。将活化后的菌株再次接种于新鲜的 MRS 液体培养基中, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床中培养 12 h。将新鲜无菌 MRS 液体培养基稀释菌悬液至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$, 放入培养皿中备用。

分别使用 300、500、700 Gy 的 ^{60}Co γ 射线进行 30 min 的辐照诱变, 辐照结束后取 100 μL 涂布于 MRS 琼脂培养基, 在二氧化碳培养箱中恒温培养 24 h 待单菌落长出。

1.3.2 高抑菌活性菌株的筛选

1.3.2.1 菌株培养、发酵及抗菌肽粗提物制备

分别将 1.3.1 中所得的单菌落菌株, 进行编号, 并接种到 MRS 液体培养基中, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床中过夜活化后, 用新鲜无菌 MRS 液体培养基稀释菌悬液至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.2$, 转接至纯牛奶中, 条件为: 接种量为质量分数 9%, 葡萄糖添加量为质量分数 3.44%, 酵母粉添加量为质量分数 2%, 混匀并调节其 pH 值为 6.84, 放置于 $32\text{ }^\circ\text{C}$ 的培养箱中密封静态发酵 72 h。发酵结束后, 取发酵液离心 (4 000 r/min, 15 min), 除去沉淀。上清液用抽滤装置过 0.45 $\mu\text{mol/L}$ 的滤

膜后, 真空冷冻干燥处理得到冻干样品(称: 抗菌肽粗提物)待用。其制备流程如图 1 所示。

1.3.2.2 发酵产物的抑菌活性评价

从 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存的试管斜面指示菌 (*E. coli* ATCC 25922) 中挑取单个菌落, 加入 5 mL LB 肉汤培养基中, 并在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下恒温摇床 (150 r/min) 中过夜培养。将过夜培养活化的指示菌液稀释至菌质量浓度为 1×10^8 CFU/mL, 备用。用无菌水将冻干样品配置成 50.0 mg/mL 母液过 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜, 转移到 96 孔板第 1 列板孔中, 每孔加入 100 μL , 在第 2-10 列中加入 100 μL 无菌水, 接着在第 2 列中加入 100 μL 母液混合均匀后取 100 μL 混合液至第 3 列中, 如此类推, 直到第 10 列, 第 10 列取出的 100 μL 丢弃。在第 1~10 列和第 12 列加入 100 μL 1×10^8 CFU/mL 待测菌液并在第 12 列中补加 100 μL 无菌水。11 列中只加入 MH 肉汤培养基 200 μL 。加样后加盖振荡 1 min, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱培养 6~8 h。用酶标仪检测在 600 nm 处光密度 (OD) 值。光密度值表示被检测物吸收的光密度, 可以反映菌液中细菌的数量。在实验中, OD 值越小, 说明抑菌效果越好, 即菌液中的细菌数量越少。

1.3.3 高产抗菌肽 F1 菌株的确定

根据 1.3.2.2 抑菌活性评价方法挑选出抑菌效果好的菌株, 按 1.3.2.1 中所述方法进行发酵后, 将发酵粗提物配置成 20 mg/mL 的水溶液, 经 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜过滤, 上分析型高效液相色谱 (LC-10A, Shimadzu) 分析。

色谱条件如表 1 所示。

通过对比相同浓度菌 FX-6 与高抑菌活性菌株发酵粗提物的液相图谱, 进而确定该高抑菌活性菌株是否为高产抗菌肽 F1 菌株。

1.3.4 高产抗菌肽 F1 菌株的稳定性研究

将高产抗菌肽 F1 菌株进行 8 次稳定传代, 并根据 1.3.2.2 所述方法评价发酵粗提物的抑菌活性, 分析菌株产抗菌肽 F1 能力的稳定性。

1.3.5 高产抗菌肽 F1 菌株鉴定

将高产抗菌肽 F1 菌株送往上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rDNA 测序, 使用 DL2000 DNA Marker 进行分析。序列测定结果经 Vector.NTI. Advance.v11 软件分析, 通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 Blast (Basic Local Alignment Search Tool) 程序将得到的 16S rDNA 序列与 GenBank 中已知的菌 FX-6 的 16S rDNA 序列进行对比分析。

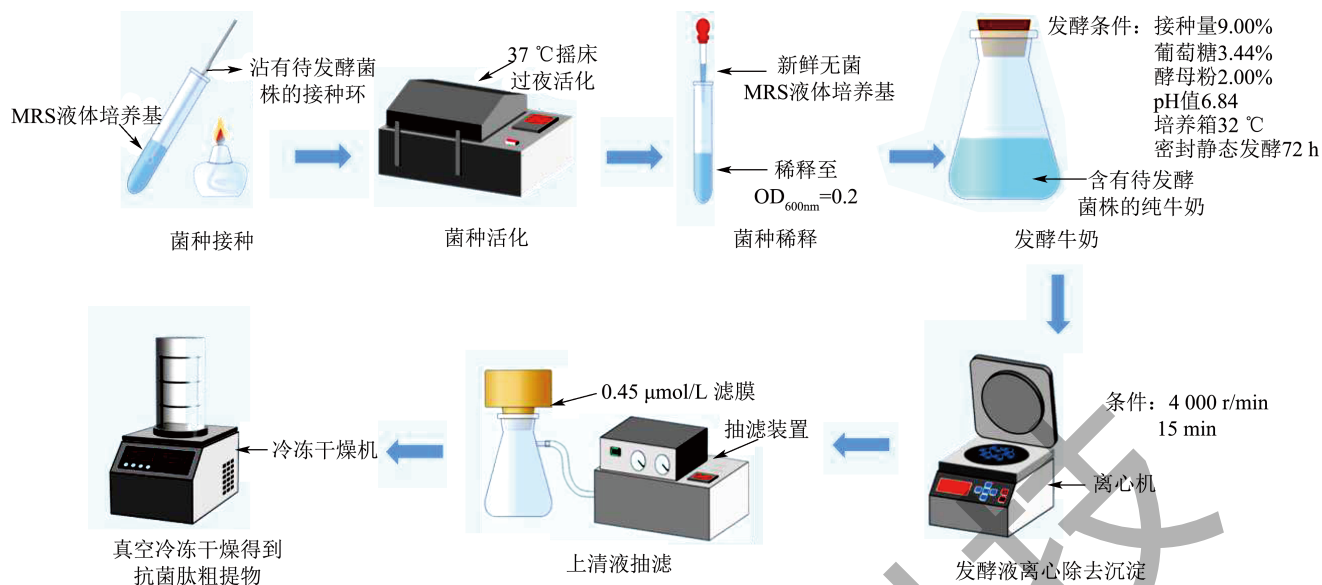


图 1 抗菌肽粗提物制备流程图

Fig.1 The extraction process of crude antimicrobial peptide

表 1 鉴别高抑菌活性菌株的色谱条件

Table 1 Determine the chromatographic conditions for strains with high antibacterial activity

色谱柱	流动相	进样量	流量	检测波长	洗脱条件
ECOSIL C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μmol/L, Lubex, Japan)	A: 水 (含 0.1% TFA) B: 甲醇	20 μL	0.5 mL/min	280 nm 214 nm	水 100% (45 min)

表 2 分离纯化及富集抗菌肽F1的色谱条件

Table 2 Chromatographic conditions for isolation, purification and enrichment of the antimicrobial peptide F1

次序	色谱柱	流动相	进样量	流量 (mL/min)	检测波长 /nm	洗脱条件
1	自组装玻璃柱 20 mm × 450 mm, C18 填料 (10 μmol/L, 300 Å, Macherey Nagel, France)	A: 水 (含 0.1% TFA) B: 乙腈	5 mL	10	280 214	4%~10% 乙腈 (60 min)
2	Shimadzu PRC-ODS(K) 柱 (30 mm × 250 mm, 15 μmol/L, Shimadzu)	A: 水 (含 0.1% TFA) B: 甲醇	0.5 mL	10	280 214	甲醇 5.5% (80 min)
3	ECOSIL C18 钢柱 (300 mm × 20 mm, 10 μmol/L, Germany)	A: 水 (含 0.1% TFA) B: 甲醇	5 mL	10	280 214	超纯水 100% (40 min)
4	ECOSIL C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μmol/L, Lubex, Japan)	A: 水 (含 0.1% TFA) B: 甲醇	20 μL	1	280 214	水 100% (45 min)

1.3.6 抗菌肽F1粗提物制备

高产抗菌肽 F1 菌株经活化后, 参考 1.3.2.1 所述方法制备抗菌肽粗提物。

1.3.7 抗菌肽F1的分离纯化及富集

参考曹庸^[17]、Miao 等^[18]的方法稍作修改, 对 1.3.2.1 中所制备的抗菌肽粗提物进行分离纯化得到抗菌肽 F1, 每一步都采用 1.3.2.2 所述方法进行活性筛选, 具体分离纯化参数如下:

1.3.7.1 制备型高效液相色谱一次分离纯化抗菌活性组分

抗菌肽粗提物用超纯水溶解, 配置成 100 mg/mL 的溶液, 经 0.45 μmol/L 滤膜过滤后, 用制备型高效液相色谱 (LC-8A, Shimadzu) 对抗菌肽 F1 进行初步分离。收集抑菌活性峰 1, 55 °C 旋转浓缩后冻干, 待用。

1.3.7.2 制备型高效液相色谱二次分离纯化抗菌活性组分

将第一次分离获得的冻干样品, 用超纯水溶

解, 配置成 50 mg/mL 的溶液, 经 0.45 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜过滤后, 用高效制备液相色谱 (LC-8, Shimadzu, Japan) 进行二次分离。收集抑菌活性峰 2, 55 $^{\circ}\text{C}$ 旋转浓缩后冻干, 待用。

1.3.7.3 制备型高效液相色谱三次分离纯化抗菌活性组分

将第二次分离获得的冻干样品, 用超纯水溶解, 配置成 50 mg/mL 的溶液, 经 0.45 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜过滤后, 用制备型高效液相色谱进行第三次分离纯化。收集抑菌活性峰 3, 55 $^{\circ}\text{C}$ 旋转浓缩后冻干, 待用。

1.3.7.4 分析型高效液相色谱分离纯化抗菌活性组分

将第三次分离获得的冻干样品, 用超纯水溶解, 配置成 20 mg/mL 的溶液, 经 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜过滤后, 用分析型高效液相色谱 (LC-10A, Shimadzu) 分析。

四次分离色谱条件分别如表 2 所示。

1.3.8 抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 生物膜形成的影响

取对数生长期的待测菌液 (黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45), 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, PBS 缓冲液清洗 3 次后, 用新鲜无菌的 MB 肉汤培养基重悬至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.2$ 。将 100 μL 的菌液加入无菌 96 孔板中, 再加入不同浓度的抗菌肽 F1 (用无菌 MH 配置), 使抗菌肽的终浓度分别为 8 MIC、4 MIC、3 MIC、2 MIC 和 1 MIC。使用 200 μL 菌液作为阳性对照组, 200 μL 的 MH 肉汤作为阴性对照组。将 96 孔板置于恒温培养箱中培养 24 h 后弃除培养液, 用无菌水小心洗去细胞培养板中的浮游态细菌和培养液, 共清洗 2 次, 每孔加入 200 μL 的甲醇进行固定, 固定时间为 15 min, 然后吸出培养孔中的甲醇, 自然风干。每孔添加质量分数为 0.1% 的结晶紫染液 200 μL , 进行生物膜染色, 染色时间为 30 min。注意避光。用无菌水洗去多余的结晶紫染液, 洗涤 3 遍, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干 / 自然晾干 (0.5 h)。每孔添加质量分数为 33% 的冰乙酸溶液 200 μL , 将 96 细胞培养板转移至微孔振荡器中使结晶紫染料充分溶解 20 min。利用酶标仪测定波长 590 nm 条件下各孔的 OD 值, 与阳性对照的 $\text{OD}_{590\text{nm}}$ 进行对比分析, 计算出抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 生物膜生成的抑制率。

1.3.9 数据统计分析

所有试验均重复三次及以上, 取测量结果的平均值。采用 Excel 2019、SPSS 软件处理数据, 采用 Origin 2018 (Origin Lab, MA, USA)、GraphPad Prism 8 绘制图表。 $P < 0.05$ 时表示具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 菌株 FX-6 的 ^{60}Co γ 射线辐照诱变

^{60}Co γ 射线是一种高能电磁波, 通过不同辐照时间和剂量, 能够产生电离作用, 从而改变 DNA 的结构。因此 ^{60}Co γ 射线被广泛应用于微生物育种中^[19]。陈龙等^[20]使用 ^{60}Co γ 射线对酵母菌进行辐照诱变, 结果显示其胞内谷胱甘肽产率比出发菌株提高了 45.8% 以上。而费笛波等^[21]则利用 ^{60}Co γ 射线对芽孢杆菌进行辐照诱变, 发现其 β - 葡聚糖酶活性比出发菌株提高了 30% 以上。为了改良 FX-6 菌株并提高其产抗菌肽 F1 的能力, 本实验用 300、500、700 Gy 剂量的 ^{60}Co γ 射线对 FX-6 菌株进行辐照诱变以引发遗传变异并筛选出具有改良特性的突变菌株。实验结果表明, 500 Gy 剂量组共获得 59 株单菌落, 700 Gy 剂量组获得 21 株单菌落, 300 Gy 剂量组因致死率太低而放弃。因此, 对 FX-6 菌株进行 ^{60}Co γ 射线辐照诱变后共得到 80 株单菌落, 标号为 Gy 500 菌 1-59、Gy 700 菌 1-21。

2.2 高产抗菌物质的菌株筛选

2.2.1 辐照所得菌株的牛奶发酵粗提物的抑菌活性评价

评价辐照诱变后得到的菌株所产抗菌物质的抑菌效果, 可筛选获得高产抗菌物质的菌株。本实验先将辐照诱变所得菌株在牛奶中进行发酵, 得到发酵粗提物, 经 96 孔板微量稀释法测定粗提物对 *E. coli* 的 OD_{600} 值, 来评估菌株对 *E. coli* 的抑菌效果。通过对比辐照所得菌株发酵粗提物和 FX-6 菌株发酵粗提物对 *E. coli* 的抑菌活性, 可以筛选出抑菌效果明显优于 FX-6 的菌株, 本实验初步挑选出的高产抗菌物质的菌株为 Gy 500 菌 1-59 中的菌 26 号, 以及 Gy 700 菌 1-21 中的菌 10、15、16 和 18 号 (图 2 中用 * 标出)。这些菌株的发酵粗提物在抑菌活性方面表现出明显优于菌 FX-6 发酵粗提物的效果。

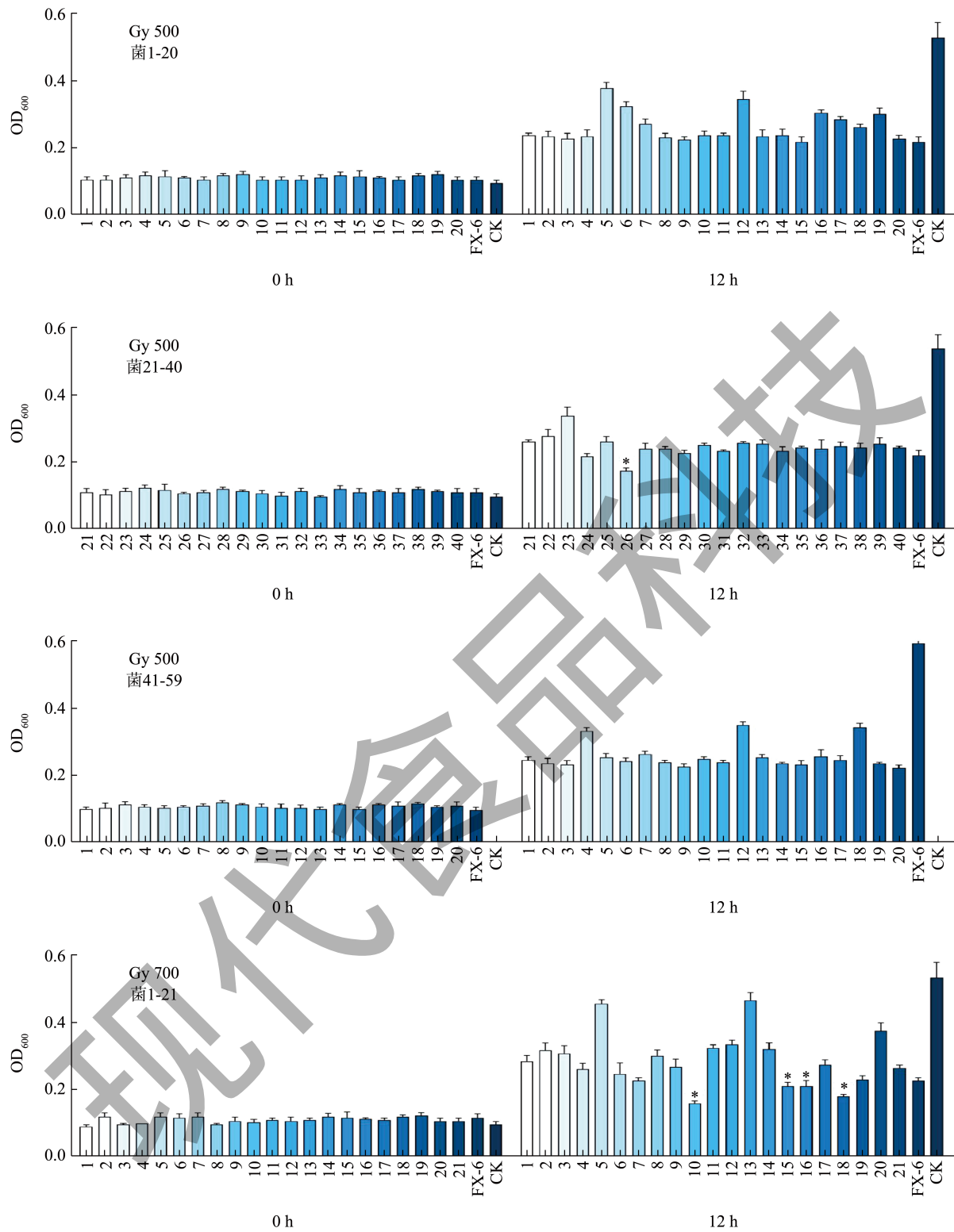


图 2 辐照所得菌株对 *E.coli* 的抑菌活性

Fig.2 Antibacterial activity of irradiated strains against *E. coli*

2.2.2 高产抗菌物质菌株的发酵牛奶粗提取物对 *E. coli* 的最低抑菌浓度

通过第一次筛选，得到了 5 株高产抗菌物质的菌株，分别是 10、15、16、18、26 号。为了确定

这些菌株的牛奶发酵粗提取物对 *E. coli* 的最低抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)，进一步评估菌株的抑菌效果。本实验通过测定菌 10、15、16、18、26 号牛奶发酵粗提取物对 *E. coli* 的 MIC(如

表3所示),发现菌26在这五种菌株发酵粗提物中具有最低的MIC。再将菌26与菌FX-6发酵粗提物进行对比,发现菌26发酵粗提物对*E. coli*的MIC(3.16 mg/mL)相比菌FX-6发酵粗提物对*E. coli*的MIC(12.50 mg/mL)降低了75%,说明菌26发酵粗提物在抑制*E. coli*生长方面表现出更强的效果。因此本实验最终筛选出菌26作为高产抗菌物质的菌株。

表3 所挑菌株发酵粗提物对*E. coli*的MIC

Table 3 MIC of the selected strains fermented the crude extracts to *E. coli*

菌株	MIC/(mg/mL)
10	6.25
15	6.25
16	6.25
18	6.25
26	3.16
FX-6	12.50

2.3 高产抗菌肽F1菌株的确定

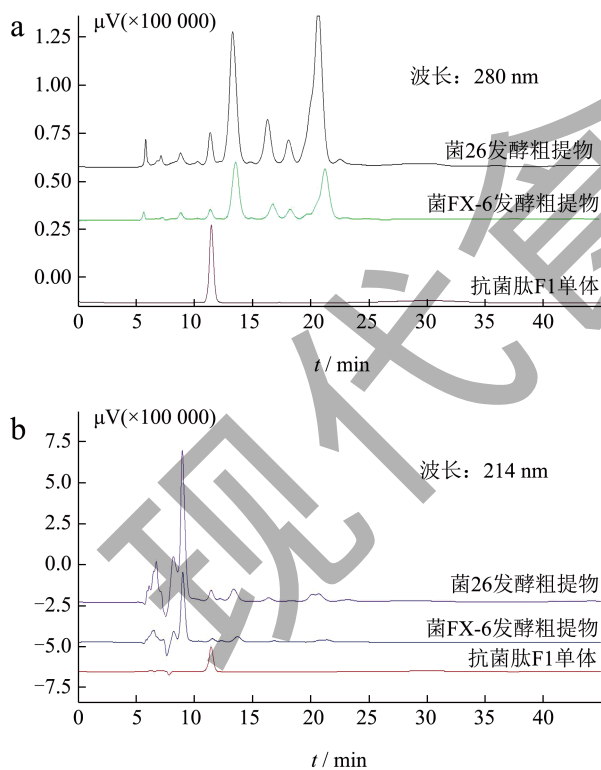


图3 菌26发酵粗提物与FX-6发酵粗提物液相色谱图对比图

Fig3 Comparison of liquid chromatograms between the crude fermentation extract of strain 26 and the crude fermentation extract of FX-6

为了验证高产抗菌物质的菌株菌26具有比出发菌株菌FX-6更强的产抗菌肽F1的能力,本实验

采用液相色谱法分析菌FX-6和菌26牛奶发酵粗提物中抗菌肽F1的产量^[22]。通过使用抗菌肽F1单体标品进行外标法对比分析,可以将菌FX-6发酵粗提物和菌26发酵粗提物中的抗菌肽F1浓度与已知浓度的标准物质进行比较,以确定菌FX-6发酵粗提物和菌26发酵粗提物中抗菌肽F1的相对含量。根据液相图谱的分析结果(如图3所示),发现菌26的抗菌肽F1产量相比菌FX-6提高了3.03倍。因此,确定菌26为高产抗菌肽F1菌株。结合2.2的实验结果:菌株26牛奶发酵粗提物的抑菌效果优于菌株FX-6发酵粗提物,且对*E. coli*的MIC最低,可以初步推断抗菌肽F1浓度与菌株的抑菌活性之间可能存在正相关关系。

2.4 高产抗菌肽F1菌株的稳定性研究

由于诱变菌株存在遗传性能不稳定的潜在风险,随着传代次数的增加,其产生抗菌肽的能力可能出现下降趋势^[23],而菌株在传代过程中的抗菌活性不稳定可能会降低其在抗菌肽开发和应用中的可靠性。为了评估菌株在连续传代过程中特定遗传性状的稳定性,本实验对菌26进行遗传稳定性测定,经8次传代后,测定其牛奶发酵粗提物对*E. coli*的抑菌活性,发现菌26发酵粗提物对*E. coli*的最低抑菌浓度稳定在3.16 mg/mL。这表明菌株菌26是一株遗传性状非常稳定的突变菌株,这增加了菌26在抗菌肽F1开发和应用中的可靠性和可行性。

2.5 高产抗菌肽F1菌株的鉴定

为了探究菌株26和菌株FX-6在基因组上的差异,利用GenBank数据库的Blast程序,将测得的16S rDNA序列与已知菌株FX-6的16S rDNA序列进行比对。如图4可知,菌26与菌FX-6在16S rDNA水平具有100%的相似度,这表明它们在基因组水平上基本一致,可能属于同一物种或亚种。然而,16S rDNA只是细菌分类和进化研究中的一种标记基因,它在菌株之间具有高度保守性。但抗菌肽的产生和调控涉及多个基因和途径,而这些基因可能在16S rDNA检测范围之外^[24]。因此,菌株26和菌株FX-6可能在其他基因上存在差异,这些基因可能参与了抗菌肽的合成、调控或分泌,从而导致菌26具有明显高于菌FX-6的产抗菌肽F1能力。进一步的研究可以考虑分析这些基因或调控因子的差异,以探究菌26产抗菌肽F1能力高于菌FX-6的作用机制。

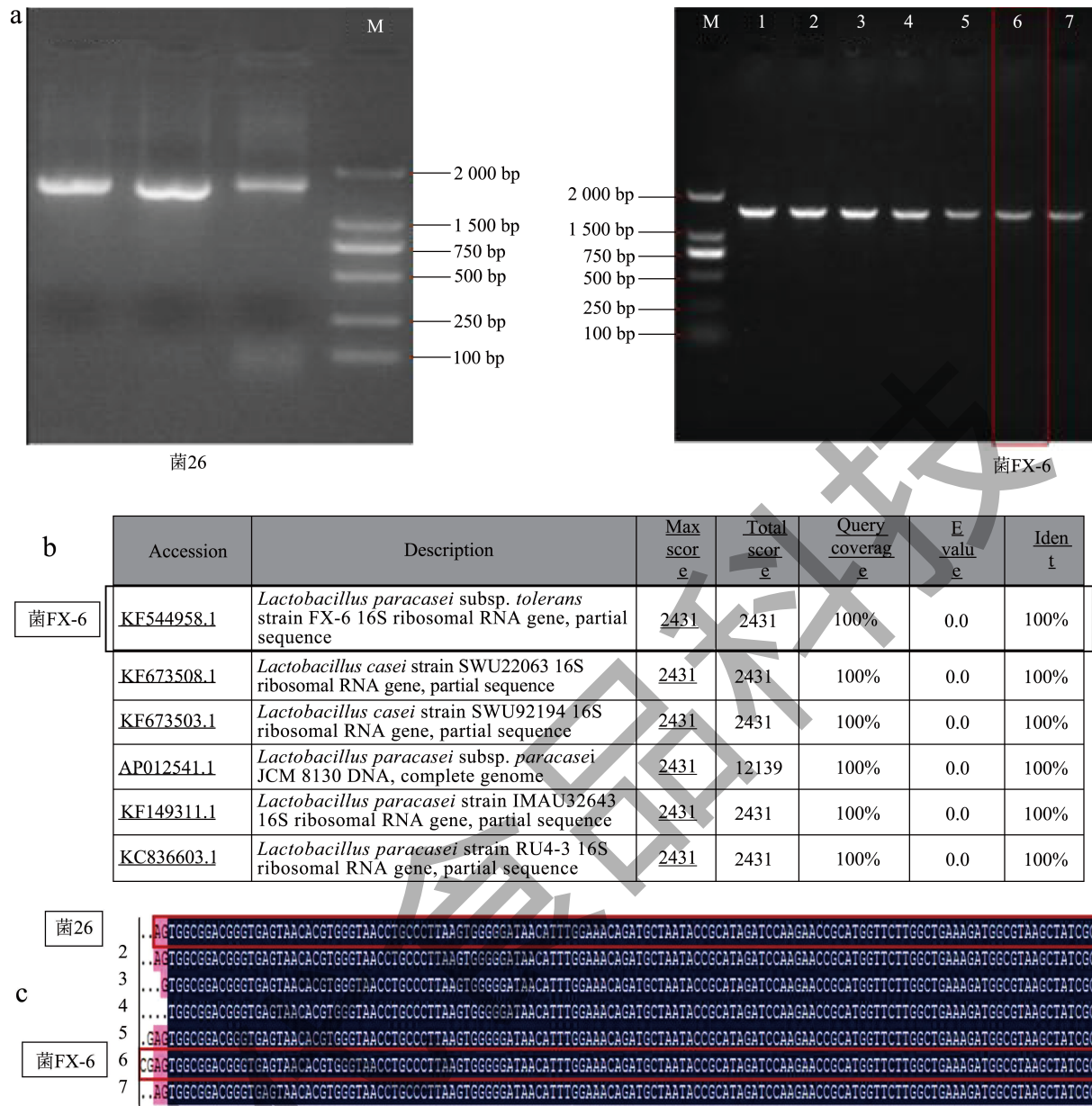


图4 菌26与FX-6电泳条带、BLAST及序列同源性比对图

Fig.4 Comparison of electrophoretic bands, blast and sequence homology between strain 26 and FX-6

2.6 抗菌肽F1的分离纯化及富集

为了富集抗菌肽F1，本实验改良了Miao等^[12]的方法，用于纯化菌26牛奶发酵粗提物中的抗菌肽F1。为了评估其抗菌活性，采用了活性追踪法和96孔板微量稀释法，并以*E. coli*作为指示菌，根据1.3.7分离方法和色谱条件，逐步分离抗菌活性组分。在使用C18玻璃层析柱进行第一次分离纯化时，液相色谱出现了两个波峰（如图5），对分离得到的各组分进行抑菌活性分析，发现目标峰1表现出最强抑菌活性，因此选择其组分作为冻干样品，用于第二次分离纯化。用Shimadzu PRC-ODS(K)制

备钢柱进行第二次分离纯化时，液相色谱出现了五个波峰（如图6），对分离得到的各组分进行抑菌活性分析，发现目标峰2表现出最强抑菌活性，因此选择其组分作为冻干样品，用于第三次分离纯化。用ECOSIL C18制备水柱进行第三次分离纯化时，液相色谱出现了四个波峰（如图7），我们对分离得到的各组分进行抑菌活性分析，发现目标峰3表现出最强抑菌活性，因此选择其组分作为冻干样品，并与抗菌肽F1单体进行比对。通过这三次分离步骤，成功分离纯化出抗菌肽F1活性单体400 mg。该抗菌肽F1单体是通过选取液相色谱分离过程中抑菌

活性最强的组分得到的。观察发现，在所有组分中抗菌肽 F1 的抑菌活性最强，且其含量最高。结合 2.3 的推断，可以得出结论：在菌 26 牛奶发酵粗提取物中，抑菌活性主要来自抗菌肽 F1，而非其他抑菌活性物质。

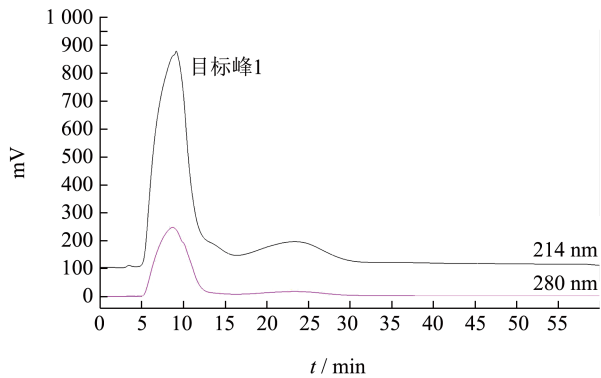


图 5 抗菌肽粗提取物过 C18 玻璃柱层析后液相色谱图
Fig.5 HPLC spectrogram of crude antimicrobial peptide after C18 glass column chromatography

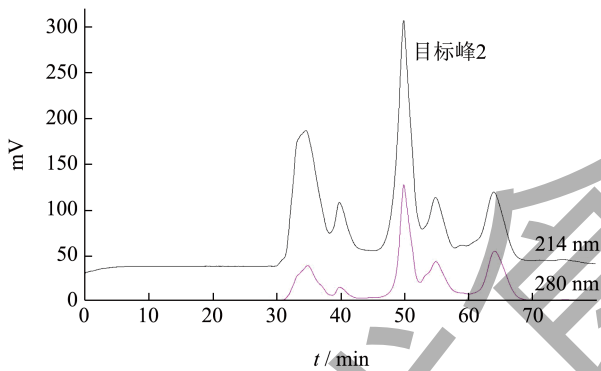


图 6 抗菌肽粗提取物过 PRC-ODS(K) 制备柱后液相色谱图
Fig.6 HPLC spectrogram of crude antimicrobial peptide after passing PRC-ODS(K) preparative column

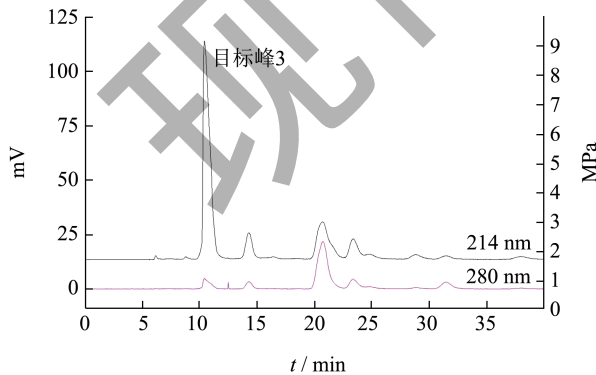


图 7 抗菌肽粗提取物过 ECOSIL C18 制备柱后液相色谱图
Fig.7 HPLC spectrogram of crude antimicrobial peptide after C18 glass column chromatography

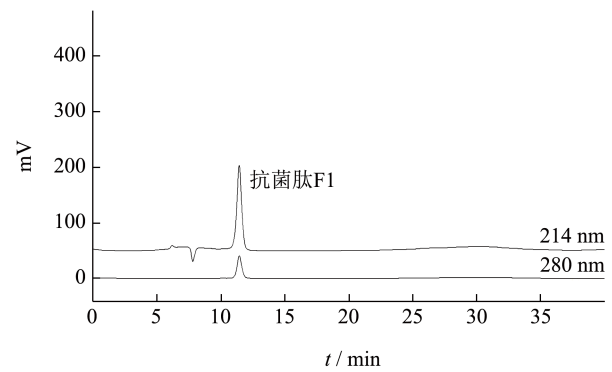


图 8 抗菌肽单体 F1 的液相色谱图

Fig.8 HPLC spectrogram of antibacterial peptide F1

2.7 抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 生物膜形成的抑制作用

在前期的研究中，已经发现抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 的最低抑菌质量浓度为 320.0 $\mu\text{g/mL}$ ，并且发现抗菌肽 F1 可通过破坏细菌的内外膜结构，显著抑制黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 的生长^[16]。但是细菌通常以聚集成菌落的形式存在，并在菌落表面形成生物膜，这种生物膜可以保护细菌免受抗菌肽等抗菌活性物质的攻击，从而增强细菌的耐药性^[25]。因此除了研究抗菌肽 F1 对单个黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 的抑制作用外，还需要探究抗菌肽 F1 是否能够抑制黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 的生物膜形成，以进一步验证其作为潜在的抗多重耐药细菌策略的有效性。本实验采用结晶紫生物膜测定方法研究抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 形成的生物膜的抑制作用，结果显示抗菌肽 F1 可显著抑制黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 生物膜的形成，作用效果与抗菌肽 F1 的质量浓度呈正相关，当抗菌肽 F1 质量浓度达到 $2\times\text{MIC}$ 及以上时，能抑制 50% 以上的细菌生物膜的形成（如图 9 所示）。因此，抗菌肽 F1 不仅对单个黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 的生长具有很强的抑制作用^[16]，还推测抗菌肽 F1 的作用机制之一可能是通过抑制细菌的繁殖来减少生物膜的形成，因为生物膜的形成通常需要细菌的繁殖和聚集。为了验证这一推测还需要进一步研究，并探究抗菌肽 F1 对细菌繁殖以及生物膜形成的抑制机制，这将有助于更深入地理解抗菌肽 F1 的抑菌机制和其在抗菌治疗中的潜在应用。

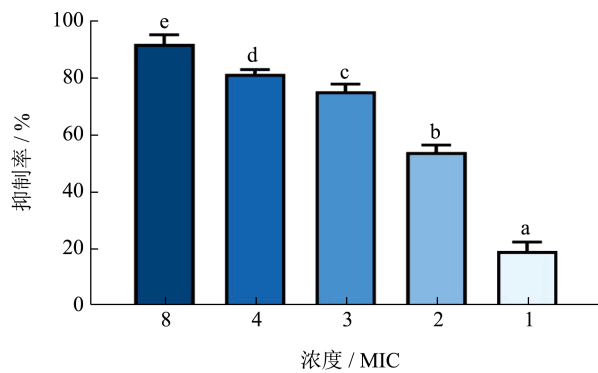


图9 抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 生物膜形成抑制作用

Fig.9 Antimicrobial peptide colistin-resistant *E. coli* F1 inhibits SHP45 biofilm formation

注: 不同上标字母表示的均值为显著差异 ($P < 0.05$)。

3 结论

经过 ^{60}Co γ 射线辐照诱变后, 从 *L. paracasei* subsp. *Tolerans* FX-6 获得了 80 株单菌落。通过对这些菌株的发酵粗提物与菌 FX-6 发酵粗提物进行抑菌活性评价和液相图谱对比, 筛选出一株高产抗菌肽 F1 的菌株, 命名为菌 26。菌 26 发酵粗提物中抗菌肽 F1 含量较 FX-6 发酵粗提物提高了 3.03 倍, 同时对 *E. coli* 的最低抑菌质量浓度也降低了 3.96 倍。这些实验结果表明, 突变菌株 (菌 26) 相比出发菌株 (菌 FX-6) 在产抗菌肽 F1 方面具有更高的能力。菌 26 通过发酵牛奶, 获得了抗菌肽粗提物。抗菌肽粗提物通过 C18 玻璃层析柱、Shimadzu PRC-ODS(K) 制备钢柱、ECOSIL C18 制备水柱的分析纯化, 成功富集得到了抗菌肽 F1 活性单体 400 mg, 为后续实验提供物质保证, 以便进一步研究抗菌肽 F1 的性质和应用。通过结晶紫生物膜测定方法研究抗菌肽 F1 对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 形成的生物膜的抑制作用。结果显示, 当抗菌肽 F1 的质量浓度达到 $2 \times \text{MIC}$ 及以上时, 能够抑制 50% 以上的细菌生物膜的形成。这些发现表明, 抗菌肽 F1 不仅对黏菌素耐药大肠杆菌 SHP45 的生长具有抑制作用, 而且还能影响其形成具有抵御作用的生物膜。这为抗菌肽 F1 在抗菌治疗和生物膜控制方面的应用提供了重要的依据。

参考文献

- [1] KHAMENEH B, DIAB R, GHAZVINI K, et al. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 95: 32-42.
- [2] 方玉航, 陈树溢, 耿倩, 等. 抗菌肽的研究及其应用进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, 533(17): 9-12.
- [3] BHATTARAI K, BASTOLA R, BARAL B. Chapter six-antibiotic drug discovery: challenges and perspectives in the light of emerging antibiotic resistance [J]. Academic Press, 2020, 105: 229-292.
- [4] CARDOSO P, GLOSSOP H, MEIKLE TG, et al. Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities [J]. *Biophysical Reviews*, 2021, 13(1): 35-69.
- [5] CAO G H, YAN J H, NING X X, et al. Antibacterial and antibiofilm properties of graphene and its derivatives [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 200: 111588.
- [6] 孙振龙, 闫顺杰, 周容涛, 等. 基于抗菌肽的智能型抗菌涂层研究进展 [J]. *应用化学*, 2020, 37(8): 865-876.
- [7] 单安山, 田昊天, 邵长轩, 等. 抗菌肽抗细菌机理研究进展 [J]. *东北农业大学学报*, 2018, 49(3): 84-94.
- [8] LI J G, KOH J J, LIU S P, et al. Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11: 73.
- [9] DA CUNHA NB, COBACHO NB, VIANA JFC, et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts [J]. *Drug Discovery Today*, 2017, 22(2): 234-248.
- [10] LIU Y Y, WANG Y, WALSH TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(2): 161-168.
- [11] 王秀娜, 张会敏, 孙坚, 等. 多黏菌素耐药 MCR-1: 公共卫生领域的新挑战 [J]. *科学通报*, 2017, 62(10): 1018-1029.
- [12] MIAO J Y, LIU G, KE C, et al. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli* [J]. *Food Control*, 2016, 65: 63-72.
- [13] MIAO J Y, ZHOU J L, LIU G, et al. Membrane disruption and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cell induced by a novel antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 [J]. *Food Control*, 2016, 59: 609-613.
- [14] 陈飞龙, 刘渔珠, 彭勃, 等. 抗菌肽 F1 对金黄色葡萄球菌的胞内作用机制 [J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 36-41.
- [15] MOLLOY E M, FIELD D, O'CONNOR P M, et al. Saturation mutagenesis of lysine 12 leads to the identification of derivatives of nisin A with enhanced antimicrobial activity [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8: e58530.
- [16] WANG Q, MIAO J Y, FENG K L, et al. Antibacterial action of peptide F1 against colistin resistance *E. coli* SHP45 (*mcr-1*) [J]. *Food Funct*, 2020, 11(11): 10231-10241.

- [17] 曹庸.一种以副干酪乳杆菌发酵乳为原料分离纯化抗菌肽的方法:中国,201410128502.2 [P]. 2014-04-02.
- [18] MIAO J Y, GUO H X, OU Y W, et al. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China [J]. Food Control, 2014, 42: 48-53.
- [19] 王付转,梁秋霞,李宗伟,等.诱变和筛选方法在微生物育种中的应用[J].洛阳师范学院学报,2002,21(2):95-99.
- [20] 陈龙,袁宏丽,陈栋梁,等.⁶⁰Co辐照诱变选育谷胱甘肽(GSH)高产菌株[J].中国酿造,2008,197(20):62-64.
- [21] 费笛波,冯观泉,李孝辉,等. β -葡聚糖酶高产菌株BS9418F的选育及其发酵条件的研究[J].微生物学杂志,2002, 1:29-31.
- [22] 郑天,屠春燕.高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用技术在食品工业上的应用[J].南京工业大学学报(自然科学版),2004,2:99-105.
- [23] 辛国芹,董佩佩,汪祥燕,等.产葡萄糖氧化酶菌株的诱变筛选及遗传稳定性研究[J].中国酿造,2016,35(11):69-72.
- [24] RODRIGUEZ-R LM, CASTRO JC, KYRPIDES NC, et al. How much do rRNA gene surveys underestimate extant bacterial diversity? [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(6): e00014-18.
- [25] 王文军,王文华,黄亚冰,等.生物膜的研究进展[J].环境科学进展,1999,5:43-51.

现代食品科技