

文章编号:1000-0615(2012)06-0974-05

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27759

## 一种新型抗菌肽 APNT-6 的溶血性和急性毒性评价

孙力军<sup>1</sup>, 王雅玲<sup>1\*</sup>, 刘唤明<sup>1</sup>, 徐德峰<sup>1</sup>, 聂芳红<sup>1</sup>, 邹志飞<sup>2</sup>, 陈捷<sup>2</sup>, 励建荣<sup>3,4</sup>

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东出入境检验检疫局技术中心, 广东 广州 510623;

3. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310035;

4. 渤海大学辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁 锦州 121013)

**摘要:** 研究了一种以抗菌脂肽类物质 surfactin、iturin 和 fengycin 为主要成分的新型抗菌肽 APNT-6 的体外溶血和小鼠口服急性毒性, 为食品应用安全性提供初步评估。将抗菌肽作 100 倍稀释置于兔血琼脂平板上的牛津杯中观察溶血情况; 结果显示, 经 100 倍稀释的抗菌肽在体外对血细胞有较强的溶血毒性。将 60 只小鼠按雌雄各半随机分成 6 组, 分别以 8、40、200、1 000、5 000 mg 每千克体重剂量的抗菌肽对小鼠进行一次性灌胃, 7 d 内观察小鼠毒性体征并测定相关指标。结果表明, 当小鼠被给予该抗菌肽 5 000 mg/kg 剂量时, 观察 7 d 无任何毒性反应, 说明高剂量的抗菌肽经口服在小鼠体内不能达到有效溶血浓度, 其口服半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)大于 5 000 mg/kg 小鼠体重, 急性毒性评级属实际无毒级。根据以上结果可知, 新型抗菌肽 APNT-6 在体外有溶血毒性但经口服对小鼠没有急性毒性作用。

**关键词:** 抗菌肽; 小鼠; 溶血毒性; 口服急性毒性

中图分类号: S 948

文献标志码: A

水产品富含蛋白质和水分, 极易腐败, 使用一定方法进行保鲜十分重要。低毒的生物抗菌保鲜剂的使用是保鲜技术的一种重要手段和趋势。由于水产品基质多数呈现中性或碱性<sup>[1]</sup>, 而多数食品防腐剂在酸性条件下才起作用, 如山梨酸及其钾盐、苯甲酸及其钠盐、Nisin 等<sup>[2]</sup>。另外, 水产品的主要腐败菌 70% 以上是革兰氏阴性菌<sup>[1,3]</sup>, 而通常使用的生物防腐剂抑菌范围窄, 主要抑制革兰氏阳性菌如 Nisin<sup>[4]</sup>, 因此, 使用范围受到了限制。开发新的具有更加广谱范围的水产生物抗菌保鲜剂显得尤为迫切。作者的研究团队在前期的研究中从纳豆中分离了一株纳豆菌(*Bacillus subtilis* Natto)NT-6 菌株, 其发酵产物是抗菌肽类物质, 被命名为 APNT-6, 主要成分是表面活性素(surfactin)、芬芥素(fengycin)和伊枯草菌素(iturin) 三种抗菌脂肽同

系物的混合物。该抗菌肽具有广泛的抗菌谱, 对水产品常见食源性病原菌及主要腐败菌有显著的抑制作用, 在 pH 4~11 条件下抑菌活性稳定, 还有耐热(100 °C 30 min 稳定)和良好的水油两相溶解能力等特性, 对水产品防腐保鲜效果明显, 显示了在水产保鲜领域具有很好的应用开发前景<sup>[5-6]</sup>。抗菌脂肽是由芽孢杆菌产生的一种具有表面活性的脂肽类物质, 由于具有抗菌谱广, 酸碱适应范围大, 热稳定性好, 表面活性强, 乳化和起泡性能优良, 以及良好的抗粘附作用, 在食品工业领域中的应用独具优势, 已引起人们的高度关注<sup>[7-12]</sup>。

尽管纳豆菌来源于食品, 一般认为是无毒的<sup>[6,12]</sup>, 但其发酵产物是否安全无毒, 尚需进一步证实。由于国内外对纳豆菌抗菌脂肽的研究起步较晚, 研究还不够深入, 其口服毒性尚不明确, 影响了对其

收稿日期: 2011-10-07 修回日期: 2012-02-17

资助项目: 国家自然科学基金(30972287); 广东海大引进人才基金(1012068); 湛江科技计划(2011D02)项目; “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD29B06)

通讯作者: 王雅玲, E-mail: wangylchina@163.com

进一步的开发<sup>[6-7,12-13]</sup>。本研究拟对纳豆菌抗菌肽 APNT-6 的口服急性毒性进行评价, 为其进一步开发应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株<sup>[5]</sup>

纳豆菌 NT-6(*Bacillus subtilis* Natto), 广东海洋大学食品科技学院海洋有害微生物及毒素绿色控制(CAMT)研究室保存, 分离于纳豆, 经生理生化及 16S rDNA 鉴定(GenBank 登录号为 JN180628)。

### 1.2 培养基及培养条件<sup>[14]</sup>

LB 培养基 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, NaCl 5.0g, 蒸馏水 1000 mL。

Landy 培养基 葡萄糖 20.0 g, L-谷氨酸钠 5.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, KCl 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10g, Fe-SO<sub>4</sub> 0.15 mg, MnSO<sub>4</sub> 5.0 mg, CuSO<sub>4</sub> 0.16 mg, 蒸馏水 1 000 mL。

培养方法 将纳豆菌 NT-6 菌株活化, 接种于 LB 种子培养基, 培养 18~24 h, 按 5% 接入 Landy 培养基中, 装液量 80 mL/250 mL 三角瓶, 在 30 °C, 160 r/min, 振荡培养 48 h。

### 1.3 抗菌肽 APNT-6 的制备<sup>[5,14]</sup>

经培养 48 h 后的发酵液, 8 000 r/min 离心除菌, 上清液经盐酸调 pH 至 2, 静置过夜, 8 000 r/min 离心取沉淀, 用 90% 乙醇抽提 3 次, 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液浓缩后, 溶于生理盐水中, 经 HPLC 法测定, 计算出该样液抗菌肽的浓度, 按一定比例制得一定浓度的受试样品溶液, 4 °C 备用。

### 1.4 APNT-6 体外溶血试验<sup>[15]</sup>

将提取浓缩后的抗菌肽 100 倍稀释, 取 200 μL 加入置于兔血琼脂平板表面的牛津杯中, 室温过夜, 观察溶血情况。

### 1.5 小鼠口服急性毒性试验<sup>[16]</sup>

实验动物的选择和饲养 健康昆明种小白鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量(19±2) g, 由广东医学院实验动物中心提供。饲养温度控制在 20~25 °C, 相对湿度控制在 45%~65%, 室内照明为 12 h 明 12 h 暗, 以清洁固体饲料喂养, 自由饮水, 试验前预饲 3 d。

分组及染毒方法 按随机分配表, 将小白鼠随机分成 6 组, 每组 10 只, 雌雄各半。其中对照组灌服生理盐水, 受试、 、 、 组按照小鼠每千克体重(kg·BW)分别以 8、40、200、1 000、5

000 mg 剂量灌服抗菌肽, 各剂量组均给予 0.5 mL 受试样液。采用灌胃针灌服, 灌胃前对小鼠禁食 6 h, 灌胃 2 h 后复食。

毒性体征观察及指标测定 灌胃后观察小鼠的毒性体征、死亡情况, 连续观察 7 d。对死亡和观察结束后的小鼠进行剖检, 检查脏器及组织病理变化, 测定脏器指数、增重、采食量和饮水量。

(1) 一般体征观察。每天对出现严重中毒反应的小鼠进行重点观察, 灌胃后以死亡为主要观察指标, 并对小白鼠的体重、自主活动、精神状态、采食、呼吸、毛色、分泌物等一般状况进行观察, 及时记录其死亡前的症状及死亡时间。

(2) 增重、采食和饮水量。对每组小鼠在灌胃前后的体重、采食和饮水量进行统计。

(3) 脏器及组织病理检查。于实验结束后, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 解剖, 观察脏器及组织的病理变化, 包括大小、色泽、质地、表面光滑程度及胸腹腔有无积液、颜色深浅的变化、形态有无异常萎缩或肿大、质地是否正常、脏器和组织是否有变性或坏死等。

(4) 脏器指数的计算。对小鼠的肝脏、脾脏、肾脏、心脏和肺进行称重, 计算各自脏器指数。脏器指数按如下公式计算: 脏器指数=[脏器重(g)/体质量(g)]×100。

半数致死量(LD<sub>50</sub>)的计算和毒性分级<sup>[17]</sup> 饲喂一周后统计小白鼠死亡数, 计算 LD<sub>50</sub> 及 95% 的可信限, 并按 GB19153.1-2003《食品安全性毒理学评价程序》对受试抗菌肽进行毒性分级。

数据处理 数值用平均值和标准差表示, 受试组和对照组间的比较用 SPSS13.0 统计软件(SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)作方差分析, 使用一维方差分析(One-Way ANOVA)。

## 2 结果

### 2.1 体外溶血毒性

经 100 倍稀释的抗菌肽 APNT-6 在兔血平板中能形成直径 32 mm 的溶血圈(图 1), 说明 APNT-6 在体外对血细胞有较强的溶血毒性。

### 2.2 小鼠口服急性毒性体征及死亡情况

研究结果(表 1)表明, 小鼠灌胃后高剂量组小鼠短时间(4 h 内)出现趴伏少动、精神萎靡等轻微不良体征, 1~2 d 内排深褐色便(与保鲜剂颜色类似)及

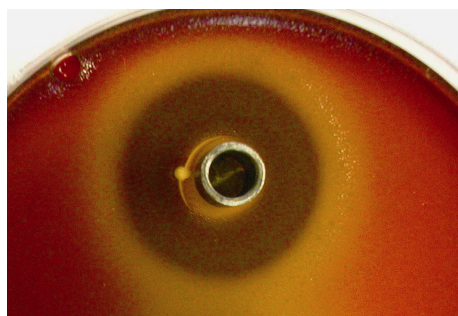


图1 抗菌肽 APNT-6 的溶血性

Fig.1 The hemolytic activities Antimicrobial peptide APNT-6

采食量和饮水量略有下降外, 其它组小鼠活动正常, 行为活泼, 毛发光润, 口角、眼鼻无分泌物, 也未见有其它明显异常表现, 7 d 内各组小鼠均健康存活。

### 2.3 小鼠增重、采食和饮水

从表 2 可以看出, 抗菌肽 APNT-6 对小鼠的采

食、饮水量无显著影响。对于增重指标, 除最大剂量组略低于对照组外, 其它组无显著变化。

### 2.4 脏器及组织病理变化

对各组小鼠的主要脏器, 包括肝、肾、肺、心、脾等器官组织进行病理检查的结果表明, 实验各组小鼠的脏器及组织未见有明显的病理变化。

### 2.5 脏器指数变化

实验结束后受试组和对照组小鼠的脏器指数(表 3)比较, 受试各组小鼠脾脏、肾脏、肺、心脏指指数在统计学上没有显著的差异。而超过 1 000 mg/kg 小鼠体重剂量组小鼠的肝脏指数高于对照组。

### 2.6 半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)及毒性分级

在小鼠灌胃后, 7 d 的观察过程中, 未见任何中毒体征和死亡, 说明抗菌肽 APNT-6 的口服半数致

表 1 小鼠毒性体征及死亡情况  
Tab.1 The toxicity signs and death of mice

指标 index	对照组 control	受试组 test group				
		10	10	10	10	10
小鼠 mice numbers	10	10	10	10	10	10
体质量/g body weight	19.45±1.71	19.71±1.44	19.54±1.86	19.48±1.55	19.64±1.62	19.61±1.54
剂量/(mg/kg) dose	0	8	40	200	1 000	5 000
异常体征 abnormal body sign	无	无	无	无	少动	轻微萎靡
死亡率/% death rate	0	0	0	0	0	0

表 2 各组小鼠增重、采食和饮水  
Tab.2 The body weight gain and food and water consumption of mice

指标 index	对照组 Contro	受试组 test group				
		4.17±0.29	4.25±0.72	4.42±0.83	3.98±0.47	3.75±0.58*
平均增重/g body weight gain	4.22±0.36	4.17±0.29	4.25±0.72	4.42±0.83	3.98±0.47	3.75±0.58*
采食量/(g/d) food consumption	4.34±0.22	4.38±0.34	4.42±0.15	4.71±0.23	4.18±0.27	4.07±0.15
采水量/(mL/d) water consumption	4.76±0.91	4.52±0.60	4.61±0.67	4.80±0.69	4.47±0.27	4.64±0.78

注: \*和对照组显著差异( $P<0.05$ )。

Notes: \* means the difference is significant( $P<0.05$ ).

表 3 各组小鼠脏器指数  
Tab.3 The organ coefficients of every group mice

器官 organs	对照 control	受试组 test group					%
		5.38±0.34	5.32±0.24	5.44±0.41	6.26±0.29*	6.57±0.37*	
肝脏 liver	5.36±0.26	5.38±0.34	5.32±0.24	5.44±0.41	6.26±0.29*	6.57±0.37*	
肾脏 kidneys	1.17±0.12	1.22±0.08	1.31±0.05	1.39±0.07	1.48±0.11	1.42±0.10	
脾脏 spleen	0.65±0.06	0.62±0.05	0.59±0.04	0.56±0.02	0.59±0.05	0.61±0.02	
肺 lung	0.68±0.02	0.67±0.04	0.72±0.03	0.71±0.02	0.65±0.05	0.71±0.04	
心脏 heart	0.55±0.07	0.56±0.04	0.57±0.04	0.64±0.01	0.58±0.07	0.61±0.05	

注: \*表示与对照组有显著差异( $P<0.05$ )。

Notes: \* means the difference is significant( $P<0.05$ ).

死剂量(LD<sub>50</sub>)大于 5 000 mg/kg 小鼠体质量。即按成人 60 kg 计算, 一次摄入该抗菌肽剂量为 300 g; 或按常见防腐剂(如苯甲酸)食品中的最大允许添加量 1 000 mg/kg 使用, 每日含该抗菌肽食物的摄入量为 1 kg 计算, 成人每天的可能摄入量为 1 000 mg, 这一剂量仅为最大实验剂量的 1/300, 也不会有中毒症状发生。综合以上结果, 按 GB19153.1-2003《食品安全性毒理学评价程序》评估, 抗菌肽 APNT-6 的急性毒性属实际无毒级。

### 3 讨论

据报道<sup>[7,11-12]</sup>抗菌脂肽具有表面活性作用, 对红细胞的细胞膜具有破坏作用。本研究结果也证实了该抗菌脂肽在体外具有溶血毒性。因此, 其溶血毒性是实际应用的可能障碍。但 Dehghan-Noudeh 等<sup>[18]</sup>的体外实验结果表明, 当 surfactin 达到较高浓度 40~60 mg/L 时才可以产生溶血。因而, 其毒性是由其在血液中的有效浓度决定的。Hwang 等<sup>[19]</sup>研究认为, 大鼠一次性口服 surfactin 2 500 mg/kg 剂量不会产生任何毒性。这一剂量如果全部被吸收, 在体内的浓度将远远大于产生溶血的最低浓度, 但实际口服却是无毒的, 由此, 可以判断 surfactin 在肠道内被吸收的较少或可以被消化酶消化, 最终到达血液中的浓度不足以对小鼠产生急性毒性。此外, 在 surfactin 的亚急性口服毒性试验研究中, 给大鼠连续 28 d 喂养 500 mg/kg 剂量的脂肽, 从毒性体征、病理变化到血液生化等指标均未发现异常变化<sup>[19]</sup>, 说明大剂量长期口服 surfactin 也是安全的。

本研究的新型抗菌肽是脂肽类物质 surfactin、fengycin、iturin 组成的混合物, 其毒性作用是三者共同作用的结果。该抗菌肽的主要成分是 surfactin<sup>[5]</sup>, 而 fengycin 和 iturin 在自然界中往往同时存在, 属于同一系列化合物, 其结构和 surfactin 十分相似<sup>[11, 15, 20]</sup>, 由此可以推测新型抗菌肽 APNT-6 可能具有很好的口服安全性。但, 由于对 fengycin 和 iturin 的毒性目前还没有相关的研究, 有关抗菌肽 APNT-6 的确切的长期口服毒性和体内代谢情况仍需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 林洪, 张瑾, 熊正河. 水产品保鲜技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [2] 黄文, 蒋予箭, 江志君, 等. 食品添加剂[M]. 北京: 中国

计量出版社, 2009.

- [3] 赵海鹏, 谢晶. 生物防腐剂在水产品保鲜中的应用[J]. 吉林农业科学, 2009, 34(4): 60-64.
- [4] Broughton J D. Nisin as a food preservative [J]. Food Australia, 2005, 57(12): 525-527.
- [5] 孙力军, 王雅玲, 刘唤明, 等. 纳豆芽孢杆菌 NT-6 菌株生产的复合抗菌肽及其生产方法: 中国, CN102321182A[P]. 2012-01-18.
- [6] 孙力军, 王雅玲, 陈宏. 芽孢杆菌抗菌肽应用于水产品安全控制研究展望[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(10): 127-130.
- [7] 曹小红, 廖振宇, 王春林, 等. *Bacillus natto* TK-1 产脂肽的纯化、抑菌活性及其表面活性剂特性[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(1): 44-48.
- [8] Huang X, Wei Z, Zhao G. Optimization of sterilization of *Escherichia coli* in milk by surfactin and fengycin using a response surface method [J]. Current Microbiology, 2008, 56(4): 376-381.
- [9] Gomes M Z V, Nitschke M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria [J]. Food Control, 2012, 25: 441-447.
- [10] Nitschke M, Costa S. Biosurfactants in food industry [J]. Trends in Food Science and Technology, 2007, 18(5): 252-259.
- [11] Shaligram N S, Singhal R S. Surfactin-A review on biosynthesis, fermentation, purification and applications [J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48(2): 119-134.
- [12] 张丽靖, 杨郁. 纳豆菌作为食品防腐剂的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(5): 188-189.
- [13] Banat I M, Franzetti A, Gandolfi I, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87 (2): 427-444.
- [14] Sun L J, Lu Z X, Bie X M, et al. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2006, 22(12): 1259-1266.
- [15] Dufour S, Deleu M, Nott K, et al. Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1726(1): 87-95.
- [16] 王心如, 周宗灿. 毒理学实验方法与技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [17] 中华人民共和国卫生部. GB19153.1-2003 食品安全性毒理学评价程序[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [18] Dehghan-Noudeh G, Housaindokht M, Bazzaz B S. Isolation, characterization and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633[J]. Journal of Microbiology,

- 2005, 43(3): 272–276.
- [19] Hwang Y H, Kim M S, Song I B, *et al.* Subacute (28 day) toxicity of surfactin C, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, in rats [J]. *Journal of Health Science*, 2009, 55 (3): 351 – 355.
- [20] Kim P I, Ryu J, Kim Y H, *et al.* Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(1): 138–145.

## Hemolytic and mice acute oral toxicity evaluation of a new antimicrobial peptide APNT-6

SUN Li-jun<sup>1</sup>, WANG Ya-ling<sup>1\*</sup>, LIU Huan-min<sup>1</sup>, XU De-feng<sup>1</sup>, NIE Fang-hong<sup>1</sup>,  
ZOU Zhi-fei<sup>2</sup>, CHEN Jie<sup>2</sup>, LI Jian-rong<sup>3,4</sup>

(1. College of Food Science Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China;

3. Key Laboratory of Food Safety of Zhejiang Province, College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China;

4. College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

**Abstract:** In this paper, the hemolytic and mice acute oral toxicity of a new antibacterial peptide APNT-6 with antibacterial lipopeptide surfactin, iturin and fengycin as the main components was evaluated. At first, hemolytic activity of the antibacterial peptide was studied *in vitro*; a 100-fold dilution of the antibacterial peptide was added to an Oxford cup placed on rabbit blood agar plate, after 37 °C overnight, the hemolytic activity was determined. The results showed that, 100-fold dilution of the antibacterial peptide in the Oxford cup formed 32 mm hemolytic circle on the plate medium, indicating that it has a strong hemolytic toxicity *in vitro* that is possible barriers to actual use. Meanwhile, a study for acute oral toxicity of the antibacterial peptide in mice was conducted, 60 male and female Kunming mice were randomly divided into six groups, with normal saline as a control, each group of mice was respectively fed 8, 40, 200, 1 000 and 5 000 mg/kg of the antibacterial peptide dose at one-time, within 7 d, observing toxicity body signs and death situation of mice and determining feed intake, water intake, weight gain and organ index, and examining pathological changes for the abnormal organs. The results showed that in each dose group of mice death and any signs of poisoning were not seen. The oral median lethal dose (LD<sub>50</sub>) is greater than 5 000 mg/kg body weight; feed intake and water intake of each group mice have no significant change; except that the highest dose group had slightly lower weight gain, there were no significant differences in weight gain between the other groups and the control group; the spleen, kidney, lung and cardiac index of each group had no statistically significant differences and liver index of more than 1 000 mg/kg dose group was higher compared with the control group; mice organs and tissues of each dose group have no obvious pathological changes. These results suggest that high doses of the antibacterial peptide by oral administration can not achieve an effective hemolytic concentration in mice; in accordance with the acute toxic standard of disinfectant, it really has no toxicity, and that oral administration of the antibacterial peptide in mice does not constitute significant acute toxic effects. Based on the above results, it can be concluded that the new antibacterial peptide APNT-6 has strong hemolytic toxicity *in vitro*, but no acute oral toxicity in mice.

**Key words:** antimicrobial peptide; mice; hemolytic toxicity; acute oral toxicity

**Corresponding author:** WANG Ya-ling. E-mail: wangylchina@163.com