(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2018 年 3 月 1 日 (01.03.2018)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2018/035892 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 7/06 (2006.01) *A23L 3/3526* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/098420

(22) 国际申请日: 2016 年 9 月 8 日 (08.09.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610728511.4 2016年8月25日 (25.08.2016) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 陆健(LU, Jian); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 蔡国林(CAI, Guolin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 王娟(WANG, Juan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 朱德伟(ZHU, Dewei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO.,LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E501耿晓岳, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** ANTIBACTERIAL HEXAPEPTIDE FROM PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种乳酸片球菌来源的抗菌六肽及其制备方法

(57) **Abstract:** An antibacterial hexapeptide from pediococcus acidilactici and a preparation method therefor, relating to the field of bioengineering. An amino acid sequence of the antibacterial peptide lactein R16 is ENGEEE, the antibacterial peptide lactein R16 has good pH stability and good heat stability, has inhibiting effects on escherichia coli, listeria monocytogene and staphylococcus aureus, and can effectively reduce the number of escherichia coli in soybean meal. The antibacterial peptide lactein R16 has a certain proliferative effect on saccharomyces cerevisiae and lactobacillus plantarum, and has a certain removal capacity to hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, DPPH free radicals and superoxide anions. The antibacterial peptide lactein R16 can be used for biological control, can be used as a feed additive and will play an important role in replacing antibiotics and resolving a feed safety problem in the future.

(57) 摘要: 一种乳酸片球菌来源的抗菌六肽及其制备方法，属于生物工程领域。所述抗菌肽乳酸菌素R16的氨基酸序列为ENGEEE，其pH稳定性和热稳定性好，对大肠杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌均有抑制作用，能够有效降低豆粕中大肠杆菌的数量。抗菌肽乳酸菌素R16对于酿酒酵母和植物乳杆菌具有一定的增殖作用，对过氧化氢、羟自由基、DPPH•自由基和超氧阴离子具有一定的清除能力。抗菌肽乳酸菌素R16可作为生物防治使用，可作为饲料添加剂使用，在将来替代抗生素和解决饲料安全问题中发挥重要作用。

WO 2018/035892 A1

一种乳酸片球菌来源的抗菌六肽及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种乳酸片球菌来源的抗菌六肽及其制备方法，属于生物工程领域。

背景技术

目前，亚治疗剂量的抗生素作为饲料添加剂被广泛应用于禽畜饲料中，其在促进动物生长、预防某些疾病发生方面发挥着重要作用，但是，随着抗生素滥用事件频繁发生，让人们对抗生素的副作用有了进一步的认识。滥用抗生素不仅会引起动物内源性感染，产生耐药菌株，而且会使畜禽免疫功能下降，更严重的是，残留于畜禽产品中的抗生素会通过不同渠道而流入人体，并对人体造成危害。

欧盟监管委员会决定，自 2006 年 1 月起在动物养殖业中禁用抗生素生长促进剂。从 2013 年 12 月开始，美国 FDA 发布了《兽医饲料指令》，要求有执照的兽医监督抗生素的使用，计划从 2014 年起，用 3 年时间禁止在牲畜饲料中使用预防性抗生素，最大限度地减少食用牲畜带给消费者抗生素耐药性问题。韩国也将在 2018 年 7 月全面禁止饲用抗生素的使用。

随着细菌对抗生素耐药性和抗生素的残留问题日益严重，研究和开发绿色饲料添加剂产品已经成为世界性的研究课题，大量研究表明，中草药提取物、微生物制剂、酶制剂、益生元、抗菌肽、酸化剂等新型饲料添加剂能有效减少或者替代饲用抗生素的使用。其中，抗菌肽由于具有较好的抗菌和免疫调节的活性，且不易残留、没有副作用、没有抗药性，对环境不产生不良影响等优点，成为了抗生素潜在的有效替代物。

发明内容

为了解决上述问题，本发明从能够抑制大肠杆菌生长的乳酸菌的发酵液中分离得到一种对细菌具有抑制作用的乳酸菌素，通过液相色谱-质谱联用技术（liquid chromatography-mass spectrometry，LC-MS）初步鉴定该乳酸菌素的分子量大小为 705.63 Da，等电点为 3.58，氨基酸序列为 ENGEEE。本发明还通过化学合成的方法确认该乳酸菌素对多种革兰氏阳性菌具有抑制作用，将其命名为乳酸菌素 R16。

本发明的第一个目的是提供一种抗菌肽，所述抗菌肽的氨基酸序列为：ENGEEE（如 SEQ ID NO.1 所示），命名为乳酸菌素 R16。

所述抗菌肽，是从能够抑制大肠杆菌生长的乳酸菌的发酵液中分离得到的。

本发明的第二个目的是提供编码所述抗菌肽的核苷酸片段。

本发明的第三个目的是提供一种能够表达所述抗菌肽的重组载体或者基因工程菌。比如，

可以将若干（如 20）个该抗菌肽的编码基因首尾连接，在每两段基因中间添加凝血酶酶切位点，整段基因与载体连接得到重组载体，转化入宿主菌表达。表达产物经凝血酶酶切即可得到该抗菌肽。

在本发明的一种实施方式中，所述载体可以是 pPIC9K。

在本发明的一种实施方式中，所述宿主菌可以是毕赤酵母 GS115。

本发明的第四个目的是提供含有所述抗菌肽的组合物。

在本发明的一种实施方式中，所述组合物为饲料添加剂、饲料、生物防腐剂。

本发明的第五个目的是提供所述抗菌肽、编码所述抗菌肽的核苷酸片段、能够表达所述抗菌肽的重组载体或者能够表达所述抗菌肽的基因工程菌的应用。

在本发明的一种实施方式中，所述应用，是作为饲料添加剂或者生物防腐剂。

本发明的第六个目的是提供一种抑制细菌的方法，是使用所述的抗菌肽。

在本发明的一种实施方式中，所述细菌为革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌。

在本发明的一种实施方式中，所述细菌包括：大肠杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌等。

本发明还提供一种所述抗菌肽的制备方法，是将乳酸片球菌发酵得到的发酵上清液先由超滤进行粗提，然后经阴离子交换色谱柱 Hitrap Q FF 和凝胶过滤色谱 Superdux Peptide 10/300GL 分离，最后用反相柱 Phenomenex Luna/ C_{18} 分离纯化得到抗菌六肽。

在本发明的一种实施方式中，所述超滤是超滤（截留分子量 3000 Da）浓缩 8~10 倍，得到粗提液。

在本发明的一种实施方式中，所述制备方法具体是：

（1）超滤粗提：超滤（截留分子量 3000 Da）浓缩 8~10 倍，得到粗提液；

（2）经阴离子交换色谱 Hitrap Q FF 的分离：粗提液上样于 Hitrap Q FF 色谱柱分离得到 2 个洗脱峰，收集对大肠杆菌有抑菌作用的活性峰 L2，透析后冷冻干燥；

（3）经凝胶过滤色谱 Superdux Peptide 10/300GL 的分离：将阴离子交换色谱的洗脱峰 L2 上样于 Superdux Peptide 10/300GL 凝胶过滤层析柱，分离得到 2 个洗脱峰，收集对大肠杆菌有抑菌作用的活性峰 N2，透析后冷冻干燥；

（4）反相 C_{18} 柱分离：将上一步冷冻干燥的样品用 5%的乙腈（含 0.1% TFA，下同）溶解，并经 5%的乙腈平衡的 Phenomenex Luna/ C_{18} 柱，用浓度为 5-50%的线性梯度递增的乙腈洗脱，收集活性洗脱峰 II，并经旋转蒸发和冷冻干燥后，得到最终产品。

本发明的有益效果：

（1）本发明的抗菌肽 ENGEEE，与抗菌肽数据库（The Antimicrobial Peptide Database）等数据库比对，此种抗菌肽是首次被报道。

（2）本发明利用超滤和色谱等技术，制备对革兰氏阳性菌具有明显抗性的活性肽乳酸菌素 R16。本发明的制备工艺简单、分离效果好、操作条件温和、快速高效、产品纯度高，经 MS 鉴定其纯度可达 95%以上。

（3）本发明中的获得的抗菌肽乳酸菌素 R16 的 pH 稳定性和热稳定性好，对大肠杆菌和单增李斯特菌的最小抑菌浓度为 6.4 $mg{\cdot}mL^{-1}$，对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 3.4 $mg{\cdot}mL^{-1}$。

（4）本发明的抗菌肽乳酸菌素 R16 对于酿酒酵母和植物乳杆菌具有一定的增殖作用，对其他对益生菌的影响很小。

（5）本发明的抗菌肽乳酸菌素 R16 对过氧化氢、羟自由基、DPPH·自由基和超氧阴离子具有一定的清除能力，清除率分别为 25.65%、70.13%、79.42%和 10.11%。

（6）本发明的抗菌肽乳酸菌素 R16 可作为生物防治使用，是对已测氨基酸序列的乳酸菌素库的有效补充。可作为饲料添加剂使用，在将来替代抗生素和解决饲料安全问题中发挥重要作用。

附图说明

图 1：六肽的质谱鉴定图；

图 2：不同 pH 值对乳酸菌素 R16 的影响；

图 3：温度对乳酸菌素 R16 的影响；

图 4：乳酸菌素 R16 对益生菌生长的影响；

图 5：抑菌活性物质对羟自由基、DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除能力。

具体实施方式

本发明所涉及的各种缓冲液配方均可以在实验手册中查到。

实施例 1：乳酸菌素 R16 的制备

按照下面的方法制备抗菌六肽乳酸菌素 R16：

1. 抗菌六肽经乳酸片球菌发酵而来，发酵上清液经离心之后，收集上清液超滤（截留分子量 10000 Da）浓缩 8~10 倍，得到粗提液。

2. 经阴离子交换色谱 Hitrap Q FF 的分离：粗提液上样于 Hitrap Q FF 色谱柱分离得到 2 个洗脱峰，收集对大肠杆菌有抑菌作用的活性峰，并将收集的活性峰 L2 经 Mill-Q 水充分透析后冷冻干燥。

3. 经凝胶过滤色谱 Superdux Peptide 10/300GL 的分离：将阴离子交换色谱的洗脱峰 L2 上样于 Superdux Peptide 10/300GL 凝胶过滤层析柱，分离得到 2 个洗脱峰，收集对大肠杆菌有抑菌作用的活性峰，并将收集的活性峰 N2 经 Mill-Q 水充分透析后冷冻干燥。

4. 反相 C_{18} 柱的分离：将上一步冷冻干燥的样品用 5%的乙腈（含 0.1% TFA，下同）溶解，并经 5%的乙腈平衡的 C_{18} 柱，用浓度为 5-50%的线性梯度递增的乙腈洗脱，收集活性洗脱峰 H3，并经旋转蒸发和冷冻干燥后，最终得到产品。

5. LC-MS 的鉴定：将上述步骤得到的具有抑菌活性的冷冻干燥样品，用 Mill-Q 水溶解后经 LC-MS 鉴定，流动相为 A(乙腈:水:甲酸= 30: 970: 1 (V: V: V))和 B(乙腈:水:甲酸= 700: 300: 1 (V: V: V))；洗脱程序为 0-10 min，100% A，0% B；20 min，70% A，30% B；30 min，0% A，100% B；35 min，100% A，0% B；flow rate，1 mL/ min；柱温 30 ℃。质谱条件：毛细管电压，3.88 kV；圆锥体电压，20 V；离子源温度，120 ℃；去溶温度，300 ℃；流速，1 mL /min；分流比，50: 1。结果用软件 MassLynx 4.1 分析。

质谱鉴定此抗菌肽的分子量为 705.17 Da，其氨基酸序列为 E-N-G-E-E-E（序列如 SEQ ID NO.1 所示）。

经与抗菌肽数据库（The Antimicrobial Peptide Database）等数据库比对，此种抗菌肽并未见报道。

实施例 2：乳酸菌素 R16 的生物学特性

（1）乳酸菌素 R16 在 pH 中的稳定性

取 10 份浓度为 100 $mg \cdot mL^{-1}$ 纯化过后的活性物质乳酸菌素 R16，用 1.0 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH 和 1.0 $mol \cdot L^{-1}$ HCl 将其 pH 分别调成 1.0~10.0，置于 37℃的水浴锅处理 2 h，后将其 pH 调至 4.5[62]，做抑菌实验，观察其对大肠杆菌的抑制情况。结果如图 2 所示。

图 2 显示，在 pH 3.0~5.0 时，乳酸菌素 R16 的抑菌活性达到最大。在 pH 6.0~8.0 时，乳酸菌素 R16 的抑菌活性逐步降低，且降低趋势缓慢，残留活性维持在 75%左右，说明乳酸菌素 R16 在此 pH 条件下稳定性有一定降低，但此 pH 对乳酸菌素 R16 的稳定性影响不大。

（2）乳酸菌素 R16 的热稳定性

取 8 份浓度为 100 $mg \cdot mL^{-1}$ 纯化过后的活性物质乳酸菌素 R16，分别置于 40、50、60、70、80、90、100℃中处理 30 min，121℃高压灭菌 15 min，做抑菌实验，观察其对大肠杆菌的抑制情况。结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出，乳酸菌素 R16 具有一定的热稳定性，在 40、50、60、70、80℃处理 30 min，乳酸菌素 R16 的抑菌活性无明显变化，在 90℃和 100℃处理 30 min 后，乳酸菌素

R16 的抑菌活性仅仅分别损失了 21.95%和 49.47%。121℃处理 15 min，乳酸菌素 R16 的抑菌活性损失了 59.98%。在温度为 75~85℃，持续时间为 1~2 min 的制粒过程中，其活性能够达到 100%的保留。

（3）乳酸菌素 R16 的抑菌谱

取 8 份浓度为 100 mg·mL^{-1} 纯化过后的活性物质乳酸菌素 R16，运用牛津杯法，检测其对大肠杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用。

饲料在运输、储存过程中容易携带大肠杆菌、单增李斯特菌等病原微生物，这些病原微生物随着饲料进入动物体内，会引起动物肠道传染病，对动物的健康构成严重威胁。乳酸菌素 R16 对常见动物致病菌的抑制作用如表 1 所示。

表 1　乳酸菌素 R16 的抑菌谱

菌种	抑菌程度
大肠杆菌 K99(*E.Coli* K99)	++
大肠杆菌 JM109(*E.Coli* JM109)	++
大肠杆菌(*E.Coli* ATCC 25922)	+
单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes* CMCC(B)54002)	++
金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)	+++

注：“+++”为强抑制；“++”为较强抑制；“+”为抑制；“-”为无抑制

从表 1 可知，乳酸菌素 R16 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 K99，大肠杆菌 JM109 和单增李斯特菌表现出较强的抑菌活性，其中对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最强。

（4）乳酸菌素 R16 的最低抑菌浓度

采用最小抑菌浓度法（minimum inhibitory concentration，MIC）检测抗菌活性，操作如下：

（a）将菌种按 1%接种量接种于 LB 液体培养基中，37℃，200 r·min^{-1} 摇床培养过夜。

（b）将上述培养液按 1%接种量接种于 20 mL LB 液体培养基中，37℃，200 r·min^{-1} 摇床培养至 OD_{600}=0.5 左右。

（c）将 OD_{600}=0.5 的菌悬液按 1‰接种量接种于 10 mL LB 液体培养基中，震荡摇匀，使细菌密度在 1×10^5~5×10^5 CFU·mL^{-1}，测定 MIC。

（d）将抑菌活性物质进行梯度稀释，使其终浓度为 256、128、64、32、16、8、4、2 和 1 mg·mL^{-1}。

（e）向无菌组织培养板中加入 450 μL 制备好的菌悬液，再分别加入 50 μL 相应浓度的

抑菌活性物质稀释液，待测抑菌活性物质的浓度分别为 25.6、12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 和 0.1 mg·mL^{-1}。以 500 μL 菌悬液为阳性对照，以 500 μL LB 液体培养基为阴性对照，37℃恒温培养箱培养 18~24 h。

（f）观察各个孔底部是否有细菌沉淀，无肉眼可见细菌沉淀的最小浓度为该抑菌活性物质的 MIC。

乳酸菌素 R16 对大肠杆菌，单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度如表 2 所示，从表 2 可以看出抑菌活性物质对大肠杆菌和单增李斯特菌的最小抑菌浓度为 6.4 mg·mL^{-1}，对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 3.2 mg·mL^{-1}。

表 2　乳酸菌素 R16 对菌种的最低抑菌浓度

菌种	MIC/mg·mL^{-1}
大肠杆菌 K99(*E.Coli* K99)	6.4
金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)	3.2
单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes* CMCC(B)54002)	6.4

（5）乳酸菌素 R16 对益生菌的影响

将各益生菌进行二级活化，按 1%的接种量接种于含有抑菌活性物质为 6.4 mg·mL^{-1} 的 MRS 培养基中，以接种于 MRS 培养基中的益生菌为对照，37℃恒温培养 24 h。采用活菌计数法进行涂板计数。结果如图 4 所示。

微生态制剂作为绿色饲料添加剂的一种，被广泛应用于饲料中，其中以酵母菌，乳酸菌和芽孢菌构成的复合型微生态制剂更为常见，其不仅能够降解和软化粗纤维，提高蛋白含量，还能够改善饲料的适口性，调节动物肠道微生态平衡，促进消化吸收和生长。本发明选取酿酒酵母、戊糖片球菌、屎肠球菌，植物乳酸菌和枯草芽孢杆菌作为研究对象，研究了乳酸菌素 R16 对其的影响，结果见图 4 所示。

由图 4 可知，乳酸菌素 R16 对酿酒酵母和植物乳杆菌有一定的增殖作用，其中对酿酒酵母的增殖作用更为明显，酿酒酵母的数量与对照相比，增加了 24.50%。乳酸菌素 R16 对屎肠球菌和枯草芽孢杆菌有一定的抑制作用，但抑制幅度较低，屎肠球菌和枯草芽孢杆菌与对照相比，其细菌总数分别减少了 6.92%和 4.03%，且在生长 24 h 之后，其细菌总数都能够达到 10^8 CFU·mL^{-1} 左右。与对照相比，戊糖片球菌的细菌总数无明显的变化，可见乳酸菌素 R16 对戊糖片球菌无影响。

（6）乳酸菌素 R16 的抗氧化能力

饲料中存在一定量的不饱和脂肪、脂肪酸、脂溶性维生素、类胡萝卜素及其他脂溶性物质，在饲料存放过程中极易被氧化，特别是脂肪和脂肪酸，其会被氧化酸败产生醛、醇、脂、

酸等不同化合物，这些物质可能对产生各种异味，严重影响饲料的适口性，有些化合物本身具有一定的毒性，对动物会产生不良影响。乳酸菌素 R16 对过氧化氢、羟自由基，DPPH·自由基和超氧阴离子的抗氧化能力如图 5 所示。

从图 5 可见，乳酸菌素 R16 对过氧化氢、羟自由基，DPPH·自由基和超氧阴离子都有一定的清除能力，其中对 DPPH·自由基的清除的能力最强，清除率达到了 79.42%，其次是羟自由基，清除率为 70.13%，对超氧阴离子和过氧化氢的清除能力最差，清除率仅为 10.11%和 25.65%。

实施例 3：乳酸菌素 R16 的应用

应用方法：

（A）将豆粕用刀片粉粹机进行粉粹，取 4 份，每份 40 g 加入 500 mL 发酵瓶中，编号为组 5，组 6，组 7，组 8，于 105℃灭菌 10 min。

（B）发酵条件见表 3。

表 3　含乳酸菌素 R16 的豆粕初始发酵条件

发酵条件	参数水平			
	对照	组 3	对照	组 4
装样量/g	40	40	40	40
抑菌活性物质添加量/g	0	0.512	0	0.512
浓度为 10^3 CFU·mL^{-1} 大肠杆菌接种量/mL	1	1	1	1
料液比	1:0.8	1:0.8	1:0.12	1:0.12
发酵温度/℃	37	37	37	37
发酵时间/h	48	48	48	48

（C）采用饲料中大肠菌群的测定国标测定大肠杆菌的数量。

通过向灭菌过后的豆粕中添加大肠杆菌，研究了乳酸菌素 R16 对豆粕中大肠杆菌的抑制效果。结果显示，在没有添加乳酸菌素 R16 时，大肠杆菌的数量由发酵前 1380 个·100 g^{-1} 增加到了发酵后 4×10^6 个·100 g^{-1}，在添加了乳酸菌素 R16 之后，大肠杆菌的数量由发酵前 1380 个·100 g^{-1} 降低到了 123 个·100 g^{-1}，说明，乳酸菌素 R16 在有效降低大肠杆菌数量的同时，能够大幅度的去除豆粕中的大肠杆菌，其去除率达到了 33.44%。

考虑到工业乳酸菌发酵豆粕与实验室有一定区别，本发明在原有的实验基础上，将 1:0.8 的料水比改为 1:0.12，其他实验条件保持不变，进行了豆粕发酵实验，结果显示乳酸菌素 R16 对豆粕中大肠杆菌的去除率由 33.44%增加到了 56.64%，这说明工业条件下，乳酸菌素 R16 更能够充分作用于大肠杆菌。

实施例 4：乳酸菌素 R16 的应用

乳酸菌素作为目前被唯一允许使用在食品防腐的细菌素，可以被添加到牛奶、肉制品等食品中抑制杂菌生长，延长货架期等应用。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

序列表

<110> 江南大学

<120> 一种乳酸片球菌来源的抗菌六肽及其制备方法

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 1

Glu Asn Gly Glu Glu Glu
1 5

权 利 要 求 书

1、一种抗菌肽，其特征在于，所述抗菌肽的氨基酸序列为如 SEQ ID NO.1 所示。

2、一种组合物，其特征在于，所述组合物含有权利要求 1 所述的抗菌肽。

3、根据权利要求 2 所述的组合物，其特征在于，所述组合物为饲料添加剂、饲料或者生物防腐剂。

4、编码权利要求 1 所述的抗菌肽的核苷酸片段。

5、一种能够表达权利要求 1 所述的抗菌肽的重组载体或者基因工程菌。

6、权利要求 1 所述的抗菌肽、权利要求 4 所述的核苷酸片段、权利要求 5 所述的重组载体，或者是权利要求 5 所述的基因工程菌的应用。

7、根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于，所述应用是作为饲料添加剂或者生物防腐剂。

8、一种抑制细菌的方法，其特征在于，所述方法是使用权利要求 1 所述的抗菌肽。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述细菌包括大肠杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌。

10、一种权利要求 1 所述的抗菌肽的制备方法，其特征在于，所述方法是将乳酸片球菌发酵得到的发酵上清液先由超滤进行粗提，然后经阴离子交换色谱柱 Hitrap Q FF 和凝胶过滤色谱 Superdux Peptide 10/300GL 分离，最后用反相柱 Phenomenex Luna/ C_{18} 分离纯化得到抗菌六肽。

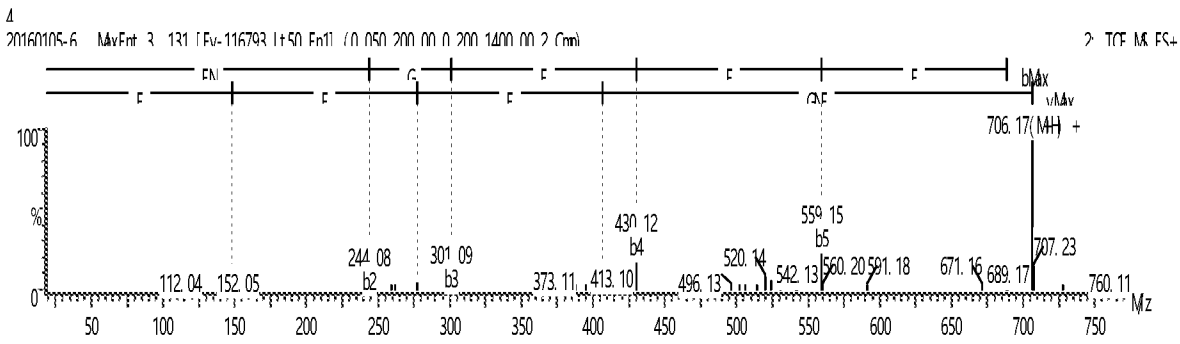

706.17(MH) +
559.15
b5
430.12
b4
301.09
b3
244.08
b2
112.04
152.05
373.11
413.10
496.13
520.14
542.13
560.20
591.18
671.16
689.17
707.23
760.11
m/z

图 1

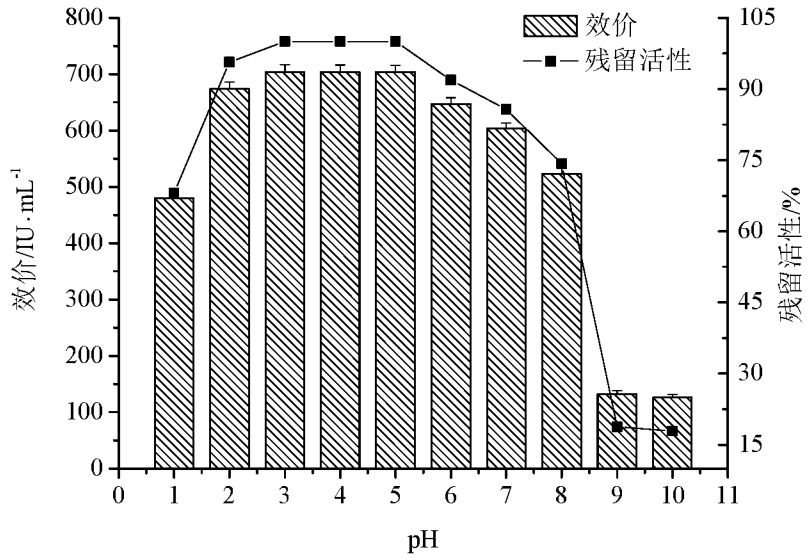

效价
残留活性
效价/IU·mL-1
残留活性/%
pH

图 2

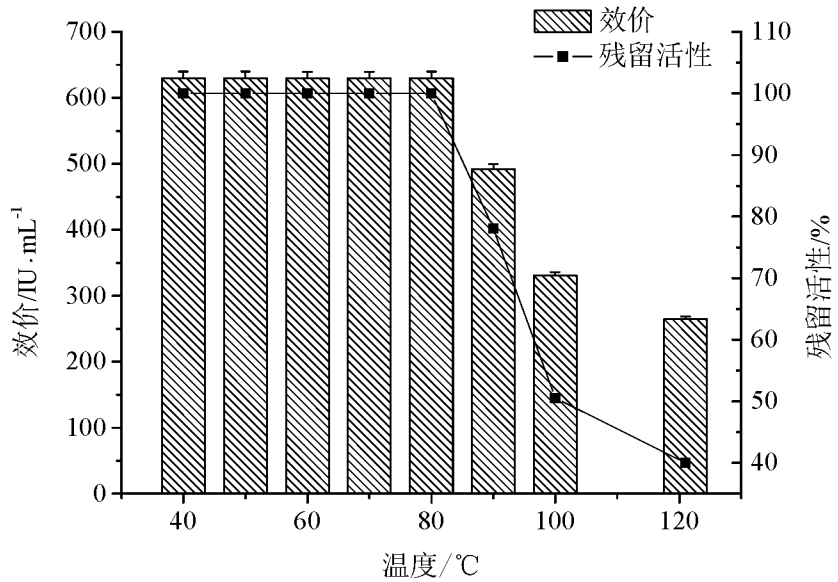

效价
残留活性
效价/IU·mL-1
残留活性/%
温度/℃

图 3

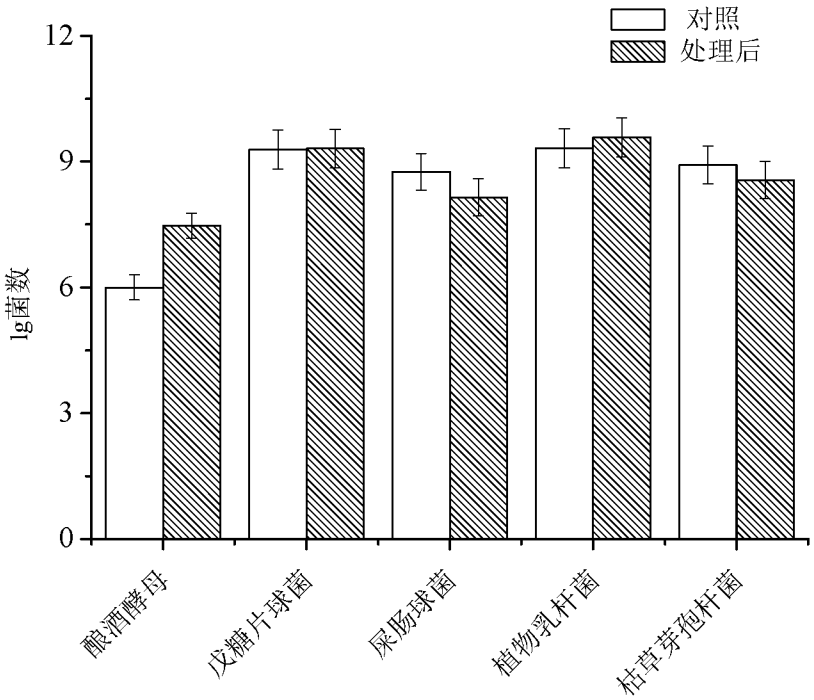

对照
处理后
lg菌数
12
9
6
3
0
酿酒酵母
戊糖片球菌
屎肠球菌
植物乳杆菌
枯草芽孢杆菌

图 4

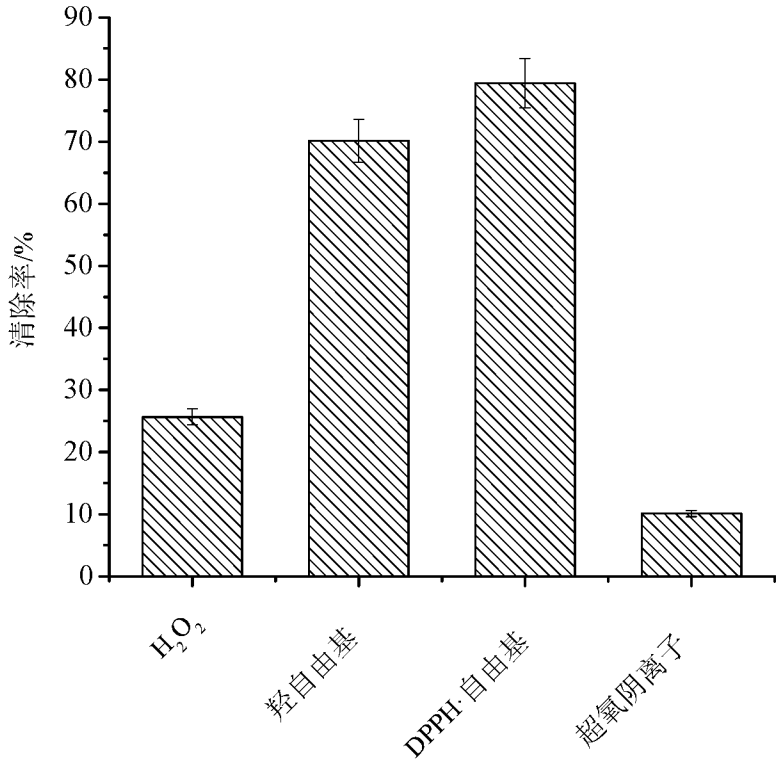

清除率/%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
H_2O_2
羟自由基
DPPH·自由基
超氧阴离子

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/098420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06 (2006.01) i; A23L 3/3526 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CNMED; CPRSABS; CNTXT; EPTXT; CNABS; TWMED; DWPI; TWTXT; HKABS; USTXT; WOTXT; SIPOABS; CNKI; GOOGLE SHCOLAR; PUBMED; ELSEVIER; NCBI GenBank; EBI; STN: 抗菌肽, 细菌素, 乳酸菌素, 片球菌素, 乳酸片球菌, 六肽, ENGEEE; anti?microbial, bacteriocin, lacticin, lactein, pediocin, pediococcus acidilactici, hexapeptide, GLU?GLN?GLY?GLU?GLU?GLU

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105816912 A (SHANGHAI NINTH PEOPLE'S HOSPITAL AFFILIATED SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE), 03 August 2016 (03.08.2016), entire document	1-10
A	WO 2016044683 A1 (TENSIVE CONTROLS, INC.), 24 March 2016 (2016-013-24), entire document	1-10
A	US 2014178353 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.), 26 June 2014 (26.06.2014), entire document	1-10
A	王培培, "乳酸片球菌 16SrRNA 基因和片球菌素基因的克隆及序列分析",中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, no. 04, 15 April 2009 (15.04.2009), A006-99, the main body, pages 21-25 (WANG, Peipei, "Cloning and Sequence Analysis of Pedicoccus Acidilactici 16SrRNA Gene and Pediocin Gene", BASIC SCIENCES, CHINA MASTER'S THESES FULL-TEXT DATABASE)	1-10
A	朱双等, "细菌素及其在动物生产中的应用",动物营养学报, 26(2), 31 December 2014 (31.12.2014), pages 327-333 (ZHU, Shuang et al., "Bacteriocins and Their Application in Animal Production", CHINESE JOURNAL OF ANIMAL NUTRITION)	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 May 2017	15 May 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHONG, Hui Telephone No. (86-10) 62413728

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/098420

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/098420

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LOZANO, J.CN. et al., "Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici", JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 138, 31 December 1992 (31.12.1992), pages 1985-1990	1-10
A	HENDERSON, J.T. et al., "Purification and Primary Structure of Pediocin PA-1 Produced by Pediococcus acidilactici PAC-1.0", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 295(1), 15 May 1992 (15.05.1992), pages 5-12	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/098420

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105816912 A	03 August 2016	None	
WO 2016044683 A1	24 March 2016	None	
US 2014178353 A1	26 June 2014	US 9353359 B2	31 May 2016
		US 2016287677 A1	06 October 2016

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/098420

A. 主题的分类

C07K 7/06(2006.01)i; A23L 3/3526(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A23L

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNMED;CPRSABS;CNTXT;EPTXT;CNABS;TWMED;DWPI;TWTXT;HKABS;USTXT;WOTXT;SIPOABS; CNKI;GOOGLE SHCOLAR; PUBMED;ELSEVIER;NCBI GenBank;EBI;STN:抗菌肽、细菌素、乳酸菌素、片球菌素、乳酸片球菌、六肽、ENGEEE; anti?microbial, bacteriocin, lacticin, lactein,pediocin,pediococcus acidilactici,hexapeptide,GLU?GLN?GLY?GLU?GLU?GLU

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 105816912 A (上海交通大学医学院附属第九人民医院) 2016年 8月 3日 (2016-08-03) 全文	1-10
A	WO 2016044683 A1 (TENSIVE CONTROLS, INC.) 2016年 3月 24日 (2016-03-24) 全文	1-10
A	US 2014178353 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.) 2014年 6月 26日 (2014-06-26) 全文	1-10
A	王培培. "乳酸片球菌16SrRNA基因和片球菌素基因的克隆及序列分析" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 基础科学辑, 第04期，2009年 4月 15日 (2009-04-15)， A006-99，正文第21-25页	1-10
A	朱双等. "细菌素及其在动物生产中的应用" 动物营养学报, 第26卷，第2期，2014年 12月 31日 (2014-12-31)， 第327-333页	1-10

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2017年 5月 2日	2017年 5月 15日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	钟辉
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62413728

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	LOZANO, J.C.N.等. "Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici" JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 第138卷，1992年 12月 31日 (1992-12-31)，第1985-1990页	1-10
A	HENDERSON J.T.等. "Purification and Primary Structure of Pediocin PA-1 Produced by Pediococcus acidilactici PAC-1.0" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 第295卷，第1期，1992年 5月 15日 (1992-05-15)，第5-12页	1-10

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/098420

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☑ 电子形式

b. (提交时间)

☑ 含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/098420

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105816912	A	2016年 8月 3日	无			
WO	2016044683	A1	2016年 3月 24日	无			
US	2014178353	A1	2014年 6月 26日	US	9353359	B2	2016年 5月 31日
				US	2016287677	A1	2016年 10月 6日