

## Antibakterielle stoffer i fiskeslim fra Rødspette (*Pleuronectes platessa*)

Rapport fra forprosjekt

Kåre Haugan

Høgskolen i Nord-Trøndelag  
Utredning nr 38

Steinkjer 2002



**Antibakterielle stoffer i fiskeslim fra  
Rødspette (*Pleuronectes platessa*)**

Rapport fra forprosjekt

**Kåre Haugan**



**Høgskolen i Nord-Trøndelag**

Utredning nr 38

Avdeling for sykepleier-, ingeniør- og lærerutdanning

ISBN 82-7456-288-7

ISSN 0809-1706

Steinkjer 2002

## **Sammendrag.**

Økende grad av antibiotikaresistens hos ulike bakteriestammer isolert ved landets sykehus har etterhvert blitt et stort problem. En måte å møte dette problemet på er å behandle pasienter med nye preparattyper. Oppdagelse og utvikling av nye typer antibiotika er derfor av stor kommersiell interesse.

Det er funnet antibakterielle proteiner og peptider i slim fra mange ulike organismer bl.a. fisk. Disse stoffene er vist å kunne ha minst tre ulike virkemåter for å drepe bakteriecellene. Proteinene \ peptidene kan ha lysozomal aktivitet, proteaseaktivitet eller de kan punktere bakteriecellenes membran.

I overflateslimet på Rødspette er det minst to antibakterielle stoffer som er motsatt ladd ved pH 7,0. Det ene av disse er et glykoprotein større enn 30 kDa (muligens rundt 80 kDa) som sannsynligvis er et lysozym, protease eller membranpunkterende protein. Con-A affinitetskromatografi kan benyttes som et effektivt førstesteg for å rense opp dette glykoproteinet.

## **Innledning.**

Antibiotika er naturlige produkter som produseres av enkelte organismer for å hindre vekst av andre mikroorganismer. Mange av disse stoffene blir utnyttet kommersielt og lages bl.a. av bakteriegruppen *Streptomyces*, *Bacillus* og sopper som *Penicillium*. Det ligger et stadig økende behov for nye typer antibiotika i markedet for å møte resistens-problemet som etterhvert har gjort seg svært så gjeldende i sykehus etc.

Det er fra flere ulike kilder rapportert at slim fra fisk inneholder komponenter som har antimikrobiell aktivitet. Slike stoffer antas å beskytte fisken mot infeksjoner [10]. Det er bl.a. funnet poredannende proteiner fra fiskeslim som lyserer bakterier [1]. Det er også funnet antibakterielle og agglutinerende proteiner fra marine invertebrater der slimet fra en sjøanemone (*Metridium senile*) er godt karakterisert [2].

Det er videre isolert et indolderivat fra en marin bakterie, *Vibrio parahaemolyticus*, som igjen kommer fra slimet til ("boxfish") *Ostracion cubicus*. Dette indolderivatet har antibakteriell



virksomhet [3]. En antibakteriell komponent er også isolert fra slim produsert av snegle (*Achatina fulica*) [4]. I dette tilfellet viste det seg sannsynligvis å være et glykoprotein.

Glykoproteiner med poredannende egenskaper er funnet i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), ål (*Anguilla anguilla*) og ”tench” (*Tinca tinca*) [5]. Fra andre fiskearter som vinterflyndre (*Pleuronectes americanus*) og sjøtunge (*Paradichirus marmoratus*) er det funnet antibakterielle peptider på henholdsvis 25 og 33 aminosyrer [6,7].

Antibakterielle komponenter i fiskeslim har etterhvert vist seg å være proteiner eller peptider med lysozomal aktivitet, proteolytisk aktivitet eller membranpunkterende aktivitet [5]. Fra regnbueørret er det isolert og karakterisert 3 ulike lysozymer hver på ca. 14 kDa, og ett kationisk peptid på ca. 3 kDa [8]. Et enzym med peptidoglykandegraderende aktivitet på 23 kDa fra Japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*) er også isolert, karakterisert og genet for enzymet er klonet [9].

Det er naturlig med bakgrunn stor norsk havbruksaktivitet å se på muligheten for å studere og om mulig kommersialisere slike antimikrobielle kjemikalier. Slike stoffer kan bli viktige biprodukter for havbruksnæringa og er viktig å utforske med tanke på å oppnå eller øke lønnsomhet for næringa. Rødspette (*Pleuronectes platessa*) er en aktuell oppdrettsart i Norge, og dette arbeidet er et forprosjekt for å undersøke om det fins antibakterielle stoffer i overflateslimet på fisken. I tillegg til at slimet fra Rødspette ble analysert, fikk man samtidig etablert metoder for rensing og karakterisering av antibakterielle stoffer fra fiskeslim generelt.

## **Material og metode.**

### **Isolering av slim og tillaging av råekstrakt.**

Slim ble skrapet av fra ryggviden av dagfersk Rødspette (*Pleuronectes platessa*) med skje, samlet opp i sterile 50ml rør med skrukork og frosset ned ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . Slim (6,0 ml) ble tint opp, sentrifugert ved 8.000 rpm (3x), og supernatanten (4,0 ml) ble samlet opp. Gjenværende pellet ble reekstrahert med 6,0 ml 10 mM fosfatbuffer pH 7,0 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) og sentrifugert ved 8.000 rpm. Supernatant og ekstrakt ble slått sammen før affinitetskromatografi. Kun supernatant ble benyttet ved gelfiltrering.

### **Antibakterielt assay.**

To gram positive og to gram negative bakteriearter ble benyttet til uttesting av antibakteriell aktivitet {*Escherichia coli* JM109 (G<sup>-</sup>), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1161 (G<sup>-</sup>), *Bacillus subtilis* PY143 (G<sup>+</sup>) og *Staphylococcus aureus* (G<sup>+</sup>)}. En overnattekultur dyrket i LB-medium ble fortynnet til en konsentrasjon på 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> celler/ml, og 100 µl av fortynningen ble platet ut på en 9,0 cm petriskål med LA. 3,0 µl fra ekstrakt eller fraksjoner ble spottet på agaren, og platene ble satt til inkubering ved 37°C over natt. Antibakteriell aktivitet ble registrert som en sone av manglende bakterievekst der prøven ble avsatt. Ren buffer ble benyttet som positiv kontroll. Termostabilitet til antimikrobielle komponenter ble testet ved å koke prøvene i 10 min. for deretter å analysere på om stoffene fortsatt inhiberte bakterienes vekst.

### **Væskekromatografi.**

Gelfiltrering ble uttestet med to ulike filtreringsmedier [14]. En kolonne med Sephadex G-25 fine ble testet (høyde 58,7 cm og diameter 3,2 cm). 2,0 ml sterilfiltrert supernatant ble applisert og kromatografien ble utført med 10mM Tris-Cl buffer pH 8,0. Separasjonen gikk med en flowrate på 100mlh<sup>-1</sup>, og fraksjoner på 4,0 ml ble samlet opp.

En kolonne med Sephadex G-50 ble også testet (høyde 34,0 cm og diameter 3,2 cm) [14]. 2,0 ml sterilfiltrert supernatant ble applisert og kromatografien ble utført med 10mM Tris-Cl buffer pH 8,0. Separasjonen gikk med en flowrate på 100mlh<sup>-1</sup>, og fraksjoner på 2,0 ml ble samlet opp.

Con-A affinitetskromatografi ble uttestet [14]. 6,0 ml supernatant ble blandet med 4,0 ml ekstrakt og applisert på ei Con-A kolonne (høyde 5,0 cm og diameter 1,0 cm). Separasjonen ble utført med 10 mM fosfatbuffer pH 7,0 med en flow-rate på 6,0 mlh<sup>-1</sup>. Kolonna ble eluert med en lineær gradient av 10 mM fosfatbuffer pH 7,0 inneholdende 0,0 - 0,5 M α-D-metylmannopyranosid.



## SDS-PAGE.

Råekstrakt og proteinfraksjoner fra væskekromatografien ble analysert SDS-PAGE (10 %) ved bruk av Mini-Protean elektroforesecelle [11,12]. Standarder som ble benyttet var myosin (212 kDa),  $\alpha_2$ -macroglobulin (170 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), transferrin (76 kDa) og glutamic dehydrogenase (53 kDa) (Pharmacia).

## Proteinkonsentrasjonsbestemmelse.

Proteinkonsentrasjon ble bestemt ved Bio-Rad protein microassay [13]. BSA (5-20  $\mu$ g) ble benyttet som standard konsentrasjon ved målingene.

## Resultat og diskusjon.

Innledningsvis ble slim fra flere ulike fiskearter testet for antibakteriell aktivitet. Dette ble gjort for å få et bilde av variasjon i aktivitet mellom ulike fiskearter, og for å se om den antibakterielle aktiviteten hadde ulik effekt på ulike typer bakterier. For å teste det sistnevnte ble to gram negative og to gram positive bakterier analysert (tabell 1).

**Tabell 1.** Antibakteriell aktivitet i fiskeslim testet for sju ulike fiskearter i henhold til material og metode [15]. Antall (+) angir økende diameter på hemningssone: + = mindre kolonier i avsetningspunktet, ++ = total hemning i avsetningspunktet, +++ = total hemning i avsetningspunktet, samt hemningssone på 4 – 8 mm, ++++ = total hemning i avsetningspunktet, samt hemningssone på 8 - 20 mm, - = ingen observerbar veksthemmende effekt. Aktivitet i supernatanten etter koking i 10 min er angitt med parentes.

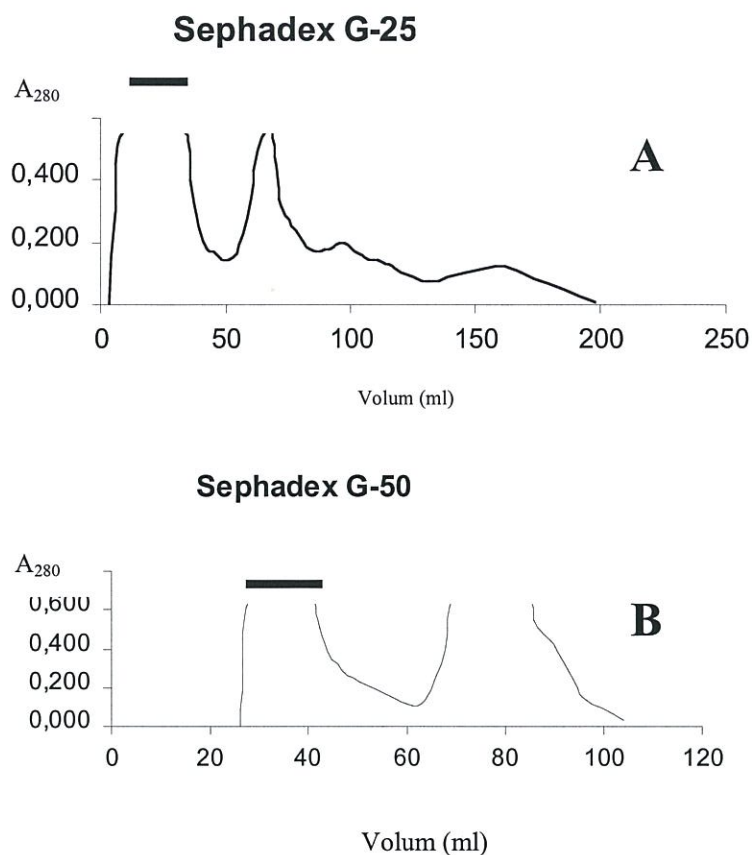
Fiskeart	Testorganisme			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Lomre ( <i>Microstomus kitt</i> )	- (-)	+++ (+)	++ (++)	+++ (-)
Sandflyndre ( <i>Limanda limanda</i> )	++	+++	+	++++
Rødspette ( <i>Pleuronectes platessa</i> )	++++	++++	+	++++
Skrubbe ( <i>Platicthys flesus</i> )	+	+	+	+
Gapeflyndre ( <i>Hippoglossoides platessoides</i> )	+	+++	+	+++
Kloskate ( <i>Raja radiata</i> )	-	-	-	-
Kveite ( <i>Hippoglossus hippoglossus</i> )	-	+++	+	++++

Tabell 1 viser at aktiviteten varierer mye fra fiskeart til fiskeart. Høy aktivitet kan observeres både fra kveite, lomre, rødspette og sandflyndre, og den antibakterielle effekten varierer mellom de ulike bakteriene som ble benyttet til testing. Slim fra rødspette er spesielt aktivt også med hensyn til ulike bakteriearter. Dette gjelder bla. mot bakterien *P. aeruginosa* hvor slim fra de andre fiskeartene har liten eller ingen effekt. Slim fra kloskate viser ingen observerbar antibakteriell effekt, og denne fiskearten skiller seg ut fra de andre ved at den er en bruskfisk i skatefamilien og tilhører en annen evolusjonsmessig grein enn de andre fiskene.

Slimet fra Lomre er spesielt fordi det er det eneste som beholdt antibakteriell aktivitet etter koking i 10 min. Dette kan tyde på at molekylerne som gir denne aktiviteten beholdes er peptider som kan refolde seg til en funksjonell struktur etter å ha vært denaturert [17]. Aktiviteten ble likevel litt redusert noe som kan tyde på at det er flere antibakterielle komponenter i slimet fra Lomre, og at noen av disse kan bli ødelagt av koking. Slim fra de andre fiskeartene mistet sin aktivitet etter koking i 10 min.

Videre arbeid ble fokusert mot Rødspette da slim fra denne arten viste høy antibakteriell aktivitet (tabell 1) og er relevant som kommersielt interessant oppdrettsart.

Tidligere studier ved HiNT viser at slimet fra Rødspette inneholder minst to ulike antibakterielle komponenter som er henholdsvis positivt og negativ ladet [15]. Arbeidshypotesen gikk ut på at slimet fra Rødspette (*Pleuronectes platessa*) inneholder antibakterielle peptider (MW < 10 kDa) da en nærstående art som *Pleuronectes americanus* ("vinterflyndre") er vist å produsere et 25 aminosyre stort antibakterielt peptid (pleurocidin) [6]. For å teste ut dette ble supernatant fra rødspetteslim gelfiltert gjennom en Sephadex G-25 og en Sephadex G-50 kolonne (figur 1).



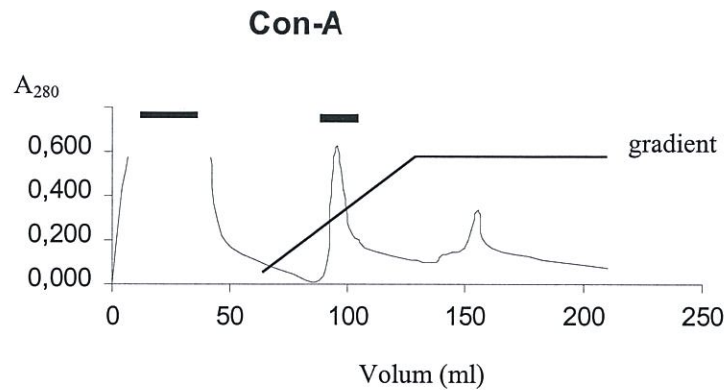
**Figur 1.** Kromatogram for gelfiltrering med Sephadex G-25 (A) og Sephadex G-50 (B) (Pharmacia). 2,0 ml sterilfiltrert supernatant ble applisert og kromatografien ble utført med 10mM Tris-Cl buffer pH 8,0. Separasjonen gikk med en flowrate på 100mlh<sup>-1</sup>. Fraksjoner med antimikrobiell aktivitet er angitt med ( — ).

Figur 1 viser at all påvisbar aktivitet kommer ut i void volum. Dette betyr at de antibakterielle komponentene sannsynligvis har en størrelse på over 30 kDa som er øvre grense for hva som kan retarderes av globulære molekyler for Sephadex G-50 [14]. Den øvre grense for Sephadex G-25 er 15 kDa.

Resultatet fra kromatografien tyder på at rødspette ikke produserer peptider (< 10 kDa) som en del av sitt ytterside infeksjonsforsvar.

Affinitetskromatografi er en svært effektiv måte å separere proteiner på [14], og viskøse proteinløsninger som fiskeslim inneholder ofte ett eller flere glykoproteiner [4,5]. Med bakgrunn i dette ble Con-A affinitetskromatografi (Pharmacia) testet ut som mulig separasjonsprinsipp. Concanavalin A er et lectin med affinitet for  $\alpha$ -D-mannopyranosyl,  $\alpha$ -D-glukopyranosyl og sterisk like sukkerrester [14]. Con-A affinitetskromatografi ble utført og resultatet er vist i figur 2.

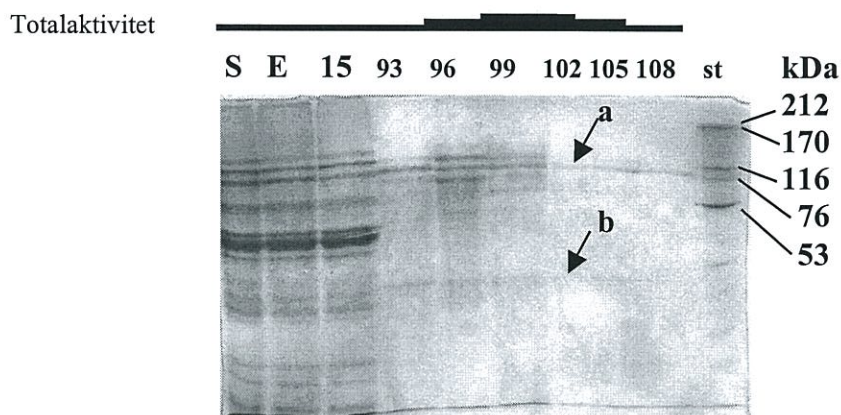




**Figur 2.** Et kromatogram som viser Con-A affinitetskromatografi av supernatant og ekstrakt (10 ml). Separasjonen ble utført med 10 mM fosfatbuffer pH 7,0. Bundne komponenter ble eluert med en lineær gradient 0 – 0,5 M  $\alpha$ -D-mannopyranosid (60 – 120 ml). Kolonna ble vasket med 0,5 M NaCl (60 – 210 ml). Fraksjoner med antibakteriell aktivitet er angitt med strek ( — ).

Separasjon ved Con-A affinitetskromatografi viser at noe av aktiviteten går gjennom kolonna, og noe som sannsynligvis er et glykoprotein binder seg til matriksen. At ikke alt binder seg til matriksen kan skyldes en eksperimentell unøyaktighet ved oppsettet, eller det kan tyde på at flere aktive antibakterielle komponenter er i slimet der en komponent ikke har en kjemisk natur som naturlig binder ConA, mens den andre ser ut til å være et glykoprotein. Denne duale situasjonen kan være analog til det som er observert ved ionebytterkromatografi der slim fra Rødslette ser ut til å inneholde minst to aktive stoffer der det ene er positivt ladd og det andre er negativt ladd ved pH 7,0 [15].

For videre analyse ble råekstrakt og fraksjoner etter Con-A affinitetskromatografi analysert ved SDS-PAGE. Resultatet er vist i figur 3.



**Figur 3.** SDS-PAGE av supernatant (S), ekstrakt (E) og ulike volumpunkter fra Con-A affinitetskromatografien (figur 2) der tallene angir ml på den horisontale aks for figur 2. Standard (st) er angitt, og interessante bånd er avmerket med pil og a/b symbol. Appliserte mengder av prøvene var S og E (3  $\mu$ l) og fraksjoner (15  $\mu$ l). Aktivitet er angitt med ( — ), og tykkelsen på strekene er økende for økt totalaktivitet.

Ved elektroforese (figur 3) kommer det fram mange og sterke proteinbånd, og av de fraksjonene med aktivitet (93 – 108 ml) er det ved 102 ml en proteinkonsentrasjon på 0,1 mg/ml (se tabell 2). Lav proteinkonsentrasjon sammenholdt med at det ved volum 99-102 ml er høyest totalaktivitet (figur 3) gir oss høyest spesifikk aktivitet i fraksjon 102 ml (aktivitet ikke kvantifisert).

**Tabell 2.** En oversikt over proteinkonsentrasjoner målt ved Bio-Rad protein assay for ulike fraksjoner (volum) ved Con-A affinitetskromatografi (se figur 2).

Fraksjon (volum, ml)	Proteinkonsentrasjon (mg/ml)	Total mengde protein i fraksjonen (mg)
Råekstrakt	18,9	189
9	7,9	4,8
12	20,7	12,4
15	21,8	13,1
18	23,1	13,9
21	23,0	13,8
30	17,6	10,6
33	8,8	5,29
36	3,5	2,09
39	0,5	0,33
93	4,4	2,63
96	12,7	7,59
99	4,8	2,86
102	0,4	0,24

Fraksjon 102 ml har to markerte bånd og flere svake. De markerte proteinbåndene er på henholdsvis ca. 80 kDa (bånd a) og ett mindre på 20-30 kDa (bånd b). Det er sannsynlig at bånd a eller a og b tilsammen utgjør glykoproteinet som gir den antibakterielle aktiviteten. Det er usannsynlig at b alene gir oss aktiviteten fordi gelfiltreringsforsøkene viser at molekylet sannsynligvis er større enn ca. 30 kDa.

### Konklusjon.

I overflateslimet på Rødspette er det minst to antibakterielle stoffer som er motsatt ladd ved pH 7,0. Det ene av disse er et glykoprotein større enn 30 kDa (muligens rundt 80 kDa) som sannsynligvis er et lysozym, protease eller membranpunkterende protein.

## Videre satsing.

Det er naturlig å føre dette arbeidet videre med følgende fokus:

- etablere et godt kvantitativt bioassay for den antibakterielle aktiviteten.
- etablere assay for lysozomal- og proteaseaktivitet.
- vise at antibakteriell aktivitet skyldes proteiner
- isolere og karakterisere de kjemiske komponentene i slimet som er ansvarlig for den antibakterielle aktiviteten vi observerer.
- innlede genetiske studier mot genene til proteinene
- det er et mål å få flere studenter til å ta oppgaver på prosjektet.
- teste ut andre slimtyper fra naturen.
- på lang sikt: Se på muligheten for patentering/kommersialisering i samarbeid med næringslivet.

Undertegnede ønsker å takke kjemiingeniørene Signe Seem og Trine Altø som gjennom sin studentoppgave ga et signifikant bidrag til dette forprosjektet. Jeg ønsker også å takke SND og NFR (FUNN-ordningen) for finansiell støtte til prosjektet.

## Referanser.

- [1] Ebran, N., Julien, S., Orange, N., Saglio, P., Lemaitre, C. and Molle, G. (1999). Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus on fish. *Comp. Bio. Phys. Part A* 122: 181-189.
- [2] Astley, M. R. and Ratcliffe, N. A. (1989). Marine invertebrate mucus – agglutinating and antibacterial activity, with emphasis on *Metridium senile*. *Society of experimental biology*.
- [3] Bell, R. and Carmeli, S. (1994). Vibrindole A, a metabolite of the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*, isolated from the toxic mucus of the boxfish *Ostracion cubicus*. *J. Nat. Prod.* 57: 1587-1590.
- [4] Kubota, Y., Watanabe, Y., Otsuka, H., Tamiya, T., Tsuchiya, T. and Matsumoto, J. J. (1985). Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus. *Comp. Biochem. Physiol.* 82C: 345-348.



- [5] Ebran, N., Julien, S., Orange, N., Auperin, B. and Molle, G. (2000). Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities. *Bio. et bio. acta.* 1467: 271-280.
- [6] Cole, A. M., Weis, P. and Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of Pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.* 272: 12008-12013.
- [7] Oren, Z., Shai, Y. (1996). A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *Eur. J. Biochem.* 237: 303-310.
- [8] Smith, V. J., Fernandes, J. M. O., Jones, S. J., Kemp, D. G. and Tatner, M. F. (2000). Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Imm.* 10: 243-260.
- [9] Hilima, J., Minagawa, S., Hirono, I. and Aoki, T. (2001). Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. *Bio et bio. acta.* 1520: 35-44.
- [10] Ellis, A. E. (2001). Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Imm.* 25: 827-839.
- [11] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-682.
- [12] Bio-Rad Mini-Protean II Electrophoresis Cell Instruction Manual.
- [13] Bio-Rad (1994). Bio Rad protein assay manual.
- [14] Pharmacia. Principles and methods. Gelfiltration and affinity chromatography.
- [15] Seem, S. og Altø, T. (2001). Antibiotika i fiskeslim. Hovedoppgave ved Ingeniørutdanningen, Høgskolen i Nord-Trøndelag (HiNT).
- [16] Methews, C. K., van Holde, H. E., Ahern, K. G. (1999). Biochemistry, 3rd edit. Addison Wesley Longman.

## Tidsforbruk våren 2002 for Kåre Haugan.

Tabellen under viser anslått tidsforbruk for undertegnede ved arbeid på prosjekt ”

Antibakterielle stoffer i fiskeslim fra Rødspette (*Pleuronectes platessa*)” våren 2002.

Uke nr.	Aktivitet	Antall timer
3-11	<ul style="list-style-type: none"><li>• Innhenting og lesing av artikler, fagstoff</li><li>• Etablere antibakterielt assay</li><li>• Utvikle ekstraksjon</li><li>• Prelimenær uttesting av enzymassay (for lysozym, protease)</li></ul>	10 uker x 20 t = 200 timer
12- 23	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kromatografi</li><li>• Gelfiltrering</li><li>• Affinitetskromatografi</li><li>• Eablering og kjøring av SDS-PAGE</li><li>• Måling av proteinkonsentrasjoner</li><li>• Rapportskrivning</li></ul>	11 uker x 30 = 330 timer
	<b>Totalt antall timer</b>	<b>ca. 530 timer</b>

*Kåre Haugan*

Røstad 10. juni 2002.

# Publikasjoner fra Høgskolen i Nord-Trøndelag

**HiNT - Rapport**

**HiNT - Utredning**

**HiNT - Arbeidsnotat**

**HiNT - Kompendium**

Opplysninger om publikasjonsserien fås ved henvendelse  
HiNT, Biblioteket i Steinkjer, Serviceboks 2501, 7729 Steinkjer  
telefon: 74 11 20 65  
telefax: 74 11 20 03  
e-post: [bibsteinkjer@hint.no](mailto:bibsteinkjer@hint.no)

---

## **Høgskolen i Nord-Trøndelag**

Serviceboks 2501, 7729 Steinkjer  
Kongens gate 42, 7713 Steinkjer  
telefon: 74 11 20 00  
telefax: 74 11 20 01

### **Avdeling for samfunn, næring og natur, Steinkjer**

Serviceboks 2501, 7729 Steinkjer  
Kongens gate 42, 7713 Steinkjer  
telefon: 74 11 20 00  
telefax: 74 11 21 01/22 01

### **Avdeling for sykepleier-, ingeniør- og lærerutdanning, Levanger**

Røstad, 7600 Levanger  
telefon: 74 02 25 30  
telefax: 74 02 29 02

### **Avdeling for helsefag, Namsos**

Postboks 354, 7801 Namsos  
Jernbanegt. 2, 7800 Namsos  
telefon: 74 21 23 30  
telefax: 74 21 23 01