

槐糖脂对金黄色葡萄球菌的抑菌机理

胡 静, 赵小慧, 朱春玉, 胡风庆, 回 晶*

(辽宁大学生命科学院生物材料与生物制药实验室, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要: 通过测定槐糖脂抑制金黄色葡萄球菌最低抑菌质量浓度和生长曲线, 探讨槐糖脂对金黄色葡萄球菌的抑菌机理, 同时利用扫描电镜和透射电镜观察金黄色葡萄球菌显微形态。结果表明: 槐糖脂能有效抑制金黄色葡萄球菌生长, 且抑制作用体现质量浓度依赖特性, 最小抑菌质量浓度(MIC)为 1.5625mg/mL。酸性和高温条件不影响槐糖脂抑菌性, 表明其具有很好的稳定性。电镜结果表明, 槐糖脂对金黄色葡萄球菌的抑制可能源于其对菌体细胞壁和细胞膜的破坏作用。

关键词: 槐糖脂; 抑菌; 最小抑菌质量浓度; 扫描电镜; 透射电镜

Inhibitory Effect and Mechanisms of Sophorolipids against *Staphylococcus aureus*

HU Jing, ZHAO Xiao-hui, ZHU Chun-yu, HU Feng-qing, HUI Jing*

(Laboratory of Biomaterials and Biopharmaceuticals, School of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: To explore antibacterial mechanisms of sophorolipids against *Staphylococcus aureus*, the minimum inhibitory concentration (MIC) of sophorolipids against *S. aureus* and the growth curves of *S. aureus* were determined. The microscopic structure of *S. aureus* was observed through scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM). Results showed that sophorolipids effectively inhibited the growth of *S. aureus*. The inhibitory effect of sophorolipids was a concentration-depended mode, and the MIC of sophorolipids was 1.5625 mg/mL. However, the inhibitory effect of sophorolipids was stable at acid and high temperature condition, indicating that it had excellent stability. Furthermore, sophorolipids should pay antibacterial role through destroying cell membrane and cell wall according to SEM and TEM.

Key words: sophorolipids; antibacterial; MIC; scanning electron microscope (SEM); transmission electron microscope (TEM)

中图分类号: Q935

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)05-0033-04

槐糖脂是由球拟酵母属(*Torulopsis*)和假丝酵母属(*Candida*)的一些酵母菌产生的糖脂表面活性剂, 由于其产量较高, 具有很好的表面性能, 并且低毒、生物可降解等很多优点, 在食品、医药、石油、化工和环境修复等许多领域中得到了不同程度的应用^[1]。现代研究表明槐糖脂具有抗肿瘤、抑菌、抗炎、抗病毒^[2-8]等多种生物活性。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种可引起人类和动物化脓感染的重要致病菌, 也是造成人类食物中毒的常见致病菌之一^[9]。本实验基于槐糖脂的相关报道^[3-6], 针对常见的病原细菌和植物病原菌, 对槐糖脂的抑菌作用及在不同温度和 pH 值条件下槐糖脂的稳定

性进行研究, 并针对槐糖脂对金黄色葡萄球菌的抑菌机理进行探究, 旨在为今后槐糖脂的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、菌株与培养基

槐糖脂: 由假丝酵母菌(*Candida bombicola*)利用葡萄糖为底物发酵产生。发酵液经乙酸乙酯抽提后, 减压干燥, 正己烷洗涤, 干燥得到槐糖脂^[10]。

病原细菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、单增李

收稿日期: 2011-03-14

基金项目: 沈阳市发展与改革委员会高技术研发基金项目(2010-16); 辽宁省教育厅科学基金项目(L2010150); 辽宁大学青年基金项目(2009LDQN25)

作者简介: 胡静(1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: hujing628@163.com

* 通信作者: 回晶(1977—), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为生物制药与生物材料。E-mail: huijing@lnu.edu.cn

斯特菌(*Listeria monocytogene*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为本实验室保存。

植物病原菌: 番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、茄子黄萎病菌(*Verticillium daliae*) 沈阳农业大学植物病理系。

LB 培养基: 氯化钠 10g、胰蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、琼脂粉 15g、水 1000mL, pH7.0; PDA 培养基: 马铃薯 200g、葡萄糖 20g、琼脂粉 20g、水 1000mL, 自然 pH 值。

1.2 仪器与设备

KYKY-EM3200 数字化扫描电子显微镜 北京中科科仪技术发展有限责任公司; H-7650 透射电镜 日本日立公司。

1.3 菌株的培养条件

除特殊指出的影响因素以外, 抑菌作用研究中所有条件均为菌体生长的最适条件, 即细菌均采用 LB 培养基, *E.coli*, 37℃; *S.aureus*, 37℃; *P.putida*, 30℃; *L.monocytogenes*, 37℃^[11]; 植物病原菌均采用 PDA 培养基, 28℃^[12]。

1.4 槐糖脂对各供试菌株的抑菌作用

利用滤纸片法^[13]和液体倍比稀释法^[14]对病原微生物的抑菌作用及最小抑菌质量浓度(MIC)进行测定。

1.5 pH 值与温度对槐糖脂抑制金黄色葡萄球菌的影响

1.5.1 pH 值

测定槐糖脂在 3、4、5、6、7、8、9 共 7 种不同 pH 值情况下对 *S.aureus* 的抑菌作用, 以槐糖脂质量浓度为 0 时作为对照。

1.5.2 温度

测定槐糖脂分别在 60、100、120℃ 的条件下保温 30min 后对 *S.aureus* 的抑菌作用, 以未处理的样品作对照^[15]。

1.6 槐糖脂对金黄色葡萄球菌的抑菌机理分析

1.6.1 对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

将 *S.aureus* 培养到对数生长期, 分成实验组和对照组。实验组加入 3.125mg/mL 槐糖脂, 之后与对照组同

步继续培养, 用分光光度计检测槐糖脂作用后 *S.aureus* 菌量的变化, 绘制生长曲线^[16]。

1.6.2 扫描及透射电镜观察

菌体制备同 1.6.1 节, 设定药物作用时间分别为 4h 和 8h, 取 1.5mL 样品溶液, 按扫描电镜^[17]及透射电镜生物样品制备法^[18]制样, 在电镜下观察菌体外观形态及超微结构。

2 结果与分析

2.1 槐糖脂对病原微生物的抑菌作用

从表 1 可以看出, 槐糖脂对大肠杆菌、嗜水气单胞菌和植物病原菌没有抑制作用。对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、恶臭假单胞菌、单增李斯特菌具有较好的抑制作用, 其中对 *S.aureus* 的抑菌作用最明显, 最低抑菌质量浓度为 1.5625mg/mL。Yoo 等^[4]也报道了槐糖脂能够强烈抑制革兰氏阳性菌如 *Bacillus*、*Staphylococcus* 和 *Streptococcus* sp. 的生长, 但对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的生长没有抑制作用。这主要是由于细菌细胞壁组成及结构的差异, 生物表面活性剂对革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌有更显著的抑制作用^[19]。

2.2 pH 值和温度对槐糖脂抑制金黄色葡萄球菌的影响

2.2.1 pH 值对槐糖脂抑菌作用的影响

槐糖脂是一种可降解的生物表面活性剂, 具有较高的选择性, 其表面活性受极端温度、pH 值、盐度等条件影响小^[20]。如表 2 所示, 槐糖脂对 *S.aureus* 的 MIC 表现为: 酸性及中性情况抑菌作用稳定, 碱性情况抑菌作用次之。分析其原因, 可能是 pH 值呈碱性时改变了槐糖脂的结构。不同类型的槐糖脂有共同的结构特征, 每个分子由亲水性和疏水性两部分构成, 亲水性部分是槐糖, 疏水性部分是饱和或不饱和的长链 ω -(或 $\omega-1$) 羟基脂肪酸。区别在于它们所含脂肪酸碳链的长度不同、饱和程度不同、乙酰化程度不同以及是否存在内酯化作用^[20]。当 pH 值呈碱性时, 一方面有可能与脂肪酸形成酯, 另一方面有可能使原有的内酯化作用破坏。因此, 槐糖脂宜在酸性条件下使用, 其抑菌 pH 值范围为 3~7。

表 1 槐糖脂对不同病原微生物的抑菌作用
Table 1 Antibacterial activity of sophorolipids against different pathogenic microorganisms

菌株	槐糖脂质量浓度/(mg/mL)									最小抑菌质量浓度/(mg/mL)
	0	0.5	1	2.5	5	10	25	50	100	
<i>B. subtilis</i>	6.00	6.40	6.54	7.40	7.49	8.70	9.26	9.12	9.50	1.5625
<i>S. aureus</i>	6.00	6.70	6.70	7.20	7.79	8.62	8.69	9.34	10.81	1.5625
<i>P. putida</i>	6.00	6.44	6.48	6.78	7.17	7.48	7.72	8.05	8.40	3.125
<i>L. monocytogenes</i>	6.00	6.00	6.00	7.68	7.70	7.78	8.00	8.28	8.56	3.125

表2 pH值对槐糖脂抑菌活性的影响

Table 2 Effect of pH on antibacterial activity of sophorolipids against *Staphylococcus aureus*

pH	槐糖脂质量浓度/(mg/mL)						
	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0
3.0	—	—	—	—	+	+++	+++
4.0	—	—	—	—	+	+++	+++
5.0	—	—	—	—	++	+++	+++
6.0	—	—	—	—	++	+++	+++
7.0	—	—	—	—	++	+++	+++
8.0	—	+	++	++	+++	+++	+++
9.0	—	+	++	+++	+++	+++	+++

注: +++, 菌体很多; ++, 菌体多; +, 菌体较少; —, 无菌生长。表3同。

2.2.2 温度对槐糖脂抑菌作用的影响

表3 温度对槐糖脂抑菌活性的影响

Table 3 Effect of temperature on antibacterial activity of sophorolipids against *Staphylococcus aureus*

温度/℃	槐糖脂质量浓度/(mg/mL)			
	3.125	1.5625	0.78125	0.390125
未处理	—	—	+	+
60	—	—	+	+
100	—	—	+	+
120	—	—	+	+

由表3可知, 槐糖脂经不同温度处理后接种的平板未见菌落长出, 且与处理前样品的最小抑菌质量浓度一样。说明经热处理后槐糖脂仍然具有很好的抑菌效果, 表明槐糖脂具有良好的耐热性, 高温处理并不改变槐糖脂的性质。

2.3 槐糖脂抑制金黄色葡萄球菌机理分析结果

2.3.1 槐糖脂对金黄色葡萄球菌生长的影响

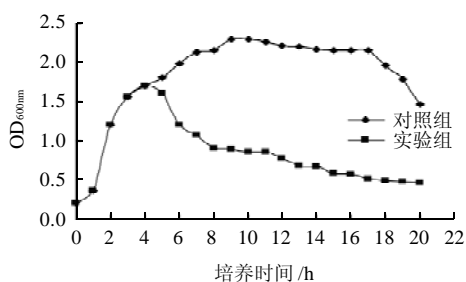


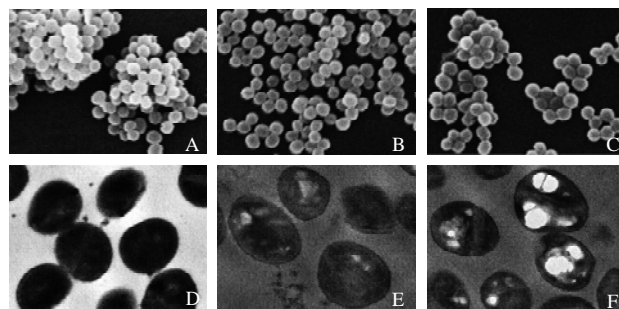
图1 槐糖脂对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

Fig.1 Effect of the growth curve of sophorolipids against *Staphylococcus aureus*

如图1所示, 与正常 *S.aureus* 相比, 当加入槐糖脂后其生长曲线明显变化。正常 *S.aureus* 20h 内呈正常生长曲线, 实验组不能形成生长曲线, 且作用明显。该对比生长曲线表明, 槐糖脂主要抑制了 *S.aureus* 对数

生长期的菌体分裂^[21]。在细菌生长到对数生长期时加入槐糖脂, 菌体数目显著减少, 并没有达到正常的生长高峰, 之后进入衰亡期, 其菌量仅达到了正常生长菌的 1/4。

2.3.2 槐糖脂对金黄色葡萄球菌超微结构的影响



A. 金黄色葡萄球菌($\times 2000$); B. 槐糖脂处理 4h 金黄色葡萄球菌($\times 2000$); C. 槐糖脂处理 8h 金黄色葡萄球菌($\times 2000$); D. 金黄色葡萄球菌($\times 30000$); E. 槐糖脂处理 4h 金黄色葡萄球菌($\times 30000$); F. 槐糖脂处理 8h 金黄色葡萄球菌($\times 30000$)。

图2 扫描和透射电镜下金黄色葡萄球菌的形态结构

Fig.2 Morphology of *S. aureus* examined by scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM)

细胞超微结构的观察是研究抑菌机理不可缺少的直接证据。扫描电镜下观察, 正常的 *S.aureus* 细胞表面光滑、圆润, 呈球状, 细胞与细胞间界限分明, 细胞排列呈明显的葡萄串状(图2A), 与文献报道一致^[22]。经槐糖脂处理 4h 后, 金黄色葡萄球菌的排列变得松散, 无规律, 不能聚集成葡萄状(图2B)。经槐糖脂处理 8h 后, 细胞间的界限略变模糊, 部分菌体发生结团现象(图2C)。细胞间的界限变模糊, 说明部分菌体细胞壁已经被破坏, 细胞壁的降解物多糖类物质在菌体细胞附近聚集, 从而使细胞黏结成团块状。

透射电镜下观察, 正常的 *S.aureus* 菌体饱满近圆形, 边缘清晰, 细胞质分布均匀(图2D)。经槐糖脂处理 4h 后的菌体, 菌体有些变形, 位于细胞膜区出现一些小的空泡(图2E)。经槐糖脂处理 8h 后, 金黄色葡萄球菌细胞质固缩, 空腔增大, 细胞质内出现许多空腔, 细胞严重受损(图2F)。这表明, 槐糖脂能够导致 *S. aureus* 细胞质固缩, 形成空洞, 细胞代谢无法正常进行, 最终导致菌体死亡。

3 结 论

抑菌实验表明槐糖脂对大肠杆菌、嗜水气单胞菌和植物病原菌没有抑制作用。对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、恶臭假单胞菌、单增李斯特菌具有较好的抑制作用, 其中金黄色葡萄球菌的作用最明显, 最低

抑菌质量浓度为 1.5625mg/mL。槐糖脂的最佳抑菌 pH 值范围为 3~7, 且热稳定性良好。

槐糖脂对金黄色葡萄球菌的抑菌机理实验表明, 槐糖脂抑菌主要是在细菌的对数生长期, 经槐糖脂作用后的菌体出现细胞质固缩、凝集成块, 出现空腔等现象, 说明菌体细胞膜和细胞壁被破坏是槐糖脂抑菌的机理之一。

参考文献:

- [1] 陈静, 张云瑞, 宋欣. 槐糖脂的生产及其应用研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 525-528.
- [2] CHEN Jing, SONG Xin, ZHANG Hui, et al. Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae*, induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells[J]. Appl Microbiol Biot, 2006, 72(1): 52-59.
- [3] KIM K J, YOO D S, KIM Y B, et al. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent[J]. J Microbiol Biotechnol, 2002, 12(2): 235-241.
- [4] YOO D S, LEE B S, KIM E K. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus[J]. J Microbiol Biotechnol, 2005, 15(6): 1164-1169.
- [5] SHAV V, BADIA D, RATSEP P. Sophorolipids having enhanced antibacterial activity[J]. Antimicrob Agents Ch, 2007, 51(1): 397-400.
- [6] 陈静, 宋欣, 曲音波, 等. 酵母胞外槐糖脂产生条件优化及其抑菌作用[J]. 山东大学学报: 理学版, 2005, 40(3): 116-120.
- [7] NAPOLITANO L M. Sophorolipids in sepsis: anti-inflammatory or antibacterial[J]. Crit Care Med, 2006, 34: 258-259.
- [8] SHAH V, DONCEL G F, SEYOUM T, et al. Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities[J]. Antimicrob Agents Ch, 2005, 49(10): 4093-4100.
- [9] 何洋, 周黎黎, 刘红露. 应用基因芯片技术检测食品中金黄色葡萄球菌[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(6): 108-110.
- [10] RICHARD D A, JONATHAN A Z, DANIEL K Y. et al. Biopolymer scaffolds for use in delivering antimicrobial sophorolipids to the acne-causing bacterium *Propionibacterium acnes*[J]. New Biotechnol, 2011, 28(1): 24-30.
- [11] 郑春英, 陆欣媛, 王满玉, 等. 药用植物五味子内生真菌的分离及其抑菌活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(9): 661-664.
- [12] 朱春玉, 朱俊丰, 马杰良, 等. 生防链霉菌 F-15 摇瓶发酵条件的优化[J]. 植物保护, 2010, 36(6): 58-61.
- [13] 宋发军, 吴士筠, 梁建军. 巴东冬凌草的抗菌活性研究[J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2002, 23(4): 9-11.
- [14] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 210-215.
- [15] 陈静. 槐糖脂产生菌的筛选及槐糖脂抑菌和抗肿瘤作用的研究[D]. 济南: 山东大学, 2006.
- [16] 潘凌子, 邢杰, 邢卓, 等. 蜂毒肽对农作物病原菌的抑杀作用[J]. 科学通报, 2007, 52(3): 291-296.
- [17] 李文镇. 图解扫描电子显微镜技术[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 1-50.
- [18] 张景强, 朴英杰, 蔡福筹, 等. 生物电子显微技术[M]. 广州: 中山大学出版社, 1987: 113-132.
- [19] 何海洋, 陆利霞, 姚丽丽, 等. 糖脂类生物表面活性剂的性质及其潜在应用进展[J]. 化工进展, 2011, 30(3): 607-612.
- [20] 刘青芝, 郭学平, 朱希强. 槐糖脂的微生物合成及其应用研究进展[J]. 食品与药品, 2009, 11(11): 51-55.
- [21] 韩永斌, 朱洪梅, 顾振新, 等. 紫甘薯花色苷色素抑制金黄色葡萄球菌作用初探[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 59-62.
- [22] 于庆华, 殷文政, 艾启俊, 等. 鹿蹄草素对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌的抑制效果观察[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 90-93.