

文章编号:1673-1689(2005)04-0066-03

脱镁叶绿酸 *a* 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑制作用

徐磊, 唐蕾*, 邵蔚蓝, 张峰, 陈蕴, 吴亢

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 以叶绿素为提取物, 进行化学修饰得到光敏活性剂—脱镁叶绿酸 *a*。其对微生物生长影响的研究表明: 在光照条件下, 脱镁叶绿酸 *a* 对金黄色葡萄球菌的生长和大肠杆菌原生质体的再生有明显的抑制作用; 在暗培养条件下, 脱镁叶绿酸 *a* 的抑制作用减弱。

关键词: 脱镁叶绿酸 *a*; 金黄色葡萄球菌; 大肠杆菌

中图分类号: R 969

文献标识码: A

The Inhibition of Pheophorbide *a* on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

XU Lei, TANG Lei*, SHAO Wei-lan, ZHANG Feng, CHEN Yun, WU Kang

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Effective, safe and environmental friend inhibitors are necessary for the purpose of bacteria inhibition. In the present study, the results showed that, the pheophorbide *a* had the efficacy in repressing the growth of *Staphylococcus aureus* and the protoplast regeneration of *Escherichia coli* under light cultural condition, whereas it had little effect in the dark cultures.

Key words: pheophorbide *a*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*

卟啉类化合物作为叶绿素、细胞色素和辅基, 广泛存在于自然界中。该类化合物具有较强的光学活性, 在恶性肿瘤的诊断和光动力治疗中发挥了较为重要的作用^[1,2]。近年来, 由于抗生素的大量使用, 使得许多病菌产生抗药性, 因而, 寻找新型抑菌剂显得十分重要。卟啉作为一类天然光敏活性剂^[3]有潜在的应用前景。光敏活性剂在有氧和光照条件下, 会吸收光子, 首先跃迁到单重态, 然后系间窜到三重态, 和底物发生电子或氢原子转移, 产生自由基或自由基离子, 继而通过对底物的氧化作用杀死目标分子。

脱镁叶绿酸 *a* (pheophorbide *a*) 是一种叶绿素衍生物, 是由叶绿素分子脱去镁离子后进一步水解而形成的化合物。脱镁叶绿酸 *a* 在 600~700 nm (Q-band) 和 400~500 nm (Soret band) 处均有较强的吸收光谱, 且在 Q-band 的吸收较其它卟啉更高, 使得其在采用更长波长的激光照射光敏化中占有优势。

作者对叶绿素进行酸法水解, 制得脱镁叶绿酸 *a*, 并采用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作为供试菌, 鉴定脱镁叶绿酸 *a* 的光敏抗菌活性。

收稿日期: 2004-09-07; 修回日期: 2004-10-27.

作者简介: 徐磊 (1979-), 女, 河北唐山人, 发酵工程硕士研究生, * 通讯作者。

1 材料与方法

1.1 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*):作者所在实验室保存。

1.2 培养基

营养肉汤培养基:牛肉浸膏 3 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L, 固体培养基另加 15~20 g/L 琼脂。

LB 培养基:酵母抽提物 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L。

上述两种培养基 pH 值为 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 高渗缓冲液

HBS-20 溶液: 20 mmol/L Tris-HCl 中含有蔗糖 0.4 mol/L, KCl 0.7 mmol/L, NaCl 5 mmol/L, Na_2HPO_4 137 mmol/L, pH 7.1, 微孔滤膜过滤灭菌。

1.4 主要仪器设备

UV-2100 紫外可见分光光度计, 上海龙尼柯仪器公司制造; MULTI-RF 多用途高速冷冻离心机: 美国 Thermo - IEC 公司制造; 720 型回转式振荡恒温培养箱: 台湾 TSAO HSIN 公司制造。

1.5 脱镁叶绿酸a的制备

在叶绿素的乙醚溶液中加入 30% 的预冷盐酸(4 °C), 振荡摇匀, 静置 1 h, 收集酸层。在醚层中再加入 30% 的盐酸, 振荡、静置分层; 收集酸层并与第一次所得酸层合并, 弃去醚层。于酸层中加入等体积的乙醚和水, 边搅拌边加氨水, 色素由酸层转入醚层。在醚层中加入 16% 的盐酸(4 °C), 静置分层; 酸层中再加入等体积的乙醚和水, 静置分层, 酸层弃去, 将醚层中的溶剂挥发干净, 称量产物质量, 并溶于丙酮中, 制成脱镁叶绿酸a贮备液^[4,5]。

1.6 脱镁叶绿酸a的抑菌作用

将斜面菌种接入营养肉汤培养基, 37 °C 过夜培养。移接 1 mL 过夜培养物至 15 mL 新鲜液体培养基中, 37 °C 振荡培养至对数生长期; 添加一定体积脱镁叶绿酸a-丙酮贮备液(空白对照组中则添加相同体积的丙酮溶液), 37 °C 光照及暗培养数小时, 稀释涂布平板, 37 °C 培养。通过计算平板上存活的菌落形成单位(CFU), 判断脱镁叶绿酸a的抑菌效果。

1.7 脱镁叶绿酸a对大肠杆菌原生质体再生的作用

1.7.1 大肠杆菌原生质体制备 大肠杆菌过夜培养物以体积分数 0.5% 接种于 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C, 180 r/min 振荡培养 6 h 至对数生长中后期, 活菌数达 10^9 CFU/mL。4 000 r/min 离心菌悬液 10 min, HBS-20 溶液洗涤菌体沉淀一次。以 HBS-20 溶液悬浮菌体沉淀制成浓度为 10^9 CFU/mL 的菌悬液, 添加溶菌酶(终质量分数为 0.3%), 37 °C 保温 60 min, 制得原生质体。

1.7.2 脱镁叶绿酸a对大肠杆菌原生质体再生的影响 在上述原生质体悬液中, 加入脱镁叶绿酸a贮备液至终浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (空白对照组中不含脱镁叶绿酸a), 37 °C 振荡培养 3 h。将上述原生质体悬液分别用 HBS-20 溶液或无菌水稀释涂布再生培养基平板, 37 °C 培养 3~4 d, 统计再生菌落形成数。

2 结果与讨论

2.1 Hynninen 法制备脱镁叶绿酸a

采用 Hynninen 法制备脱镁叶绿酸, 该法是根据叶绿素a与叶绿素b的水解能力不同, 以 30% 盐酸选择性水解叶绿素a的植醇基酯键, 再通过盐酸-乙醚分级分离, 得到脱镁叶绿酸a, 见图1。

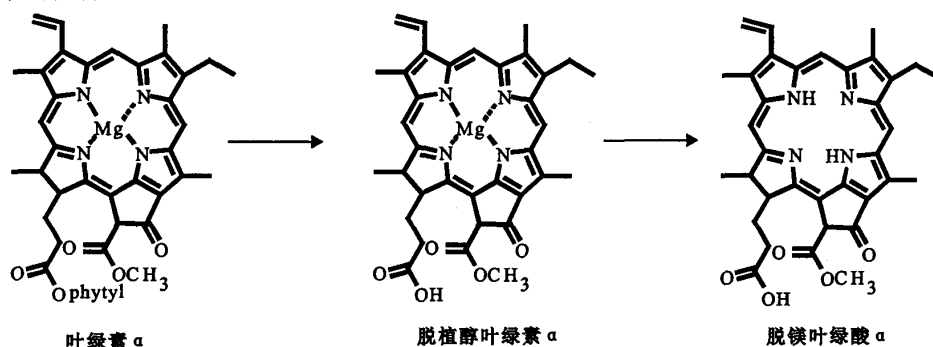


图1 脱镁叶绿酸a的制备

Fig.1 Preparation of pheophorbide a

光谱分析的结果见图2。脱镁叶绿酸 a 的形状和波长与文献报道一致,主要吸收峰位于408 nm与667 nm处,且二者的消光比值为2.1。

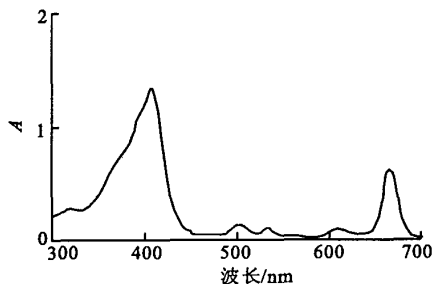


图2 脱镁叶绿酸 a 紫外可见吸收光谱

Fig. 2 UV-Vis spectrum of pheophorbide a

2.2 脱镁叶绿酸 a 对金黄色葡萄球菌生长的抑制

在对数生长期,添加脱镁叶绿酸 a ,并且持续作用3 h,结果见表1。在光照条件下,脱镁叶绿酸 a 能够显著抑制革兰氏阳性菌——金黄色葡萄球菌的生长,并且随着脱镁叶绿酸 a 质量浓度的增大,致死率显著提高。在非光照条件下,虽有类似的抑制趋势,但效果明显弱于光照培养(表1为两次实验的平均值)。

表1 脱镁叶绿酸 a 质量浓度及光照条件对金黄色葡萄球菌生长的影响

Tab. 1 Effect of concentration and light condition on the growth of *Staphylococcus aureus*

质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	菌落数/(CFU/mL)	
	光照	避光
0	5.55×10^{11}	4.30×10^{11}
0.01	1.69×10^{10}	3.20×10^{10}
0.1	3.94×10^7	6.85×10^9
1	3.67×10^5	7.20×10^8
10	1.05×10^4	1.05×10^8

2.3 脱镁叶绿酸 a 对大肠杆菌生长的抑制

在与金黄色葡萄球菌相同的条件下处理革兰氏阴性菌——大肠杆菌,结果发现,无论光照与否,脱镁叶绿酸 a 对大肠杆菌的生长均无显著影响,见

表2(表2结果为两次实验的平均值)。

表2 脱镁叶绿酸 a 质量浓度及光照条件对金黄色葡萄球菌生长的影响

Tab. 2 Effect of concentration and light condition on the growth of *Staphylococcus aureus*

质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	菌落数/(CFU/mL)	
	光照	避光
0	5.7×10^7	9.8×10^7
0.01	5.5×10^7	9.3×10^7
0.1	4.8×10^7	8.6×10^7
1	3.5×10^7	7.8×10^7

2.4 脱镁叶绿酸 a 对大肠杆菌原生质体再生的抑制

基于上述实验结果,考虑到革兰氏阴性菌与阳性菌的主要差别之一是细胞壁结构的不同,推断大肠杆菌对脱镁叶绿酸 a 处理的非敏感可能是由于其细胞壁对脱镁叶绿酸 a 的渗透性阻碍,因而即使在光照条件下,光敏剂依然没有杀伤作用。为此,进一步对大肠杆菌细胞进行了预处理,即加入溶菌酶,使其成为原生质体,然后再加入脱镁叶绿酸 a (终质量浓度为 $0.1 \mu\text{g/mL}$),光照3 h,原生质体的再生数有所减少,由 1.72×10^9 CFU/mL减少到 9.8×10^8 CFU/mL。

3 结 论

卟啉化合物是一类生理活性很强的化合物,在生物机体的物质代谢中起着重要的作用。作为一种天然光敏抗菌物质,其来源广泛且安全有效^[6]。

国内研究了一些卟啉化合物作为绿色除草剂和抗微生物药剂。卟啉化合物不仅用作抗生素,而且在食品、保健、医药等方面均有应用,国外利用卟啉的光敏活性来治疗癌症。

实验结果表明,叶绿素的降解产物——脱镁叶绿酸 a ,在光照条件下能有效地抑制金黄色葡萄球菌生长,并影响大肠杆菌原生质体再生,有望成为另一种卟啉抑菌剂。

参考文献:

- [1] 金小敏,吴健. 卟啉类光敏药物的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2002, 12(1): 52-56.
- [2] Koshiro Umimura, Nagahiko Yumita, Ryuichiro Nishigaki, et al. Photodynamically induced antitumor effect of pheophorbide a [J]. *Cancer Letters*, 1996, 102: 151-157.
- [3] Prapai Wongsinkongman, Arnold Brossi, Wang H K, et al. Pheophorbide- a derivatives as photo-independent cytotoxic agents[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10: 583-591.
- [4] Hynnien P H. Preparation of phorbins derivatives from chlorophyllin mixture utilizing the principle of selective hydrolysis[J]. *J Synthesis*, 1980, (7): 539-541.
- [5] 纪平雄,张廿六,陈芳艳. 三种脱镁叶绿酸 a 的分离与鉴定方法探讨[J]. 中国蚕业, 2001, 22(1): 13-14.
- [6] 董润安,邱勇,宋心琦,等. 卟啉类化合物对生物分子的光敏化氧化[J]. 化学进展, 1998, 10(1): 44-54.

(责任编辑:李春丽)