

海藻源细菌群体感应抑制剂筛选及其活性的初步研究

刘尊英¹, 曾 惠², 曾名湧^{1*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003; 2. 青岛工学院食品工程系, 青岛 266300)

摘 要: **目的** 从海藻多酚提取物中筛选细菌群体感应抑制剂并研究其活性。**方法** 采用紫色杆菌 *Chromobacterium violaceum* CV026 琼胶扩散法及高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法检测海藻多酚群体感应抑制活性及其成分组成。**结果** 在选取的 25 种海藻中, 12 种海藻多酚具有群体感应抑制活性, 其中石莼、马尾藻、裙带菜多酚的抑制活性最强。在 1.0 mg/mL 多酚浓度下, 其形成的群体感应抑制圈直径分别为 25.18、21.61、20.43 mm。采用 HPLC 进一步对三种海藻多酚的成分进行检测, 结果显示三种海藻多酚均含有儿茶酚及表儿茶素。此外, 还含有少量的阿魏酸及芦丁。**结论** 石莼、马尾藻、裙带菜多酚具有群体感应抑制活性, 有望开发为新型群体感应抑制剂。

关键词: 海藻多酚; 群体感应抑制剂; 儿茶酚; 表儿茶素

Primary studies on screening of marine algae polyphenols for quorum sensing inhibitor and their activities

LIU Zun-Ying¹, ZENG Hui², ZENG Ming-Yong^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Department of Food Engineering, Qingdao Institute of Technology, Qingdao 266300, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the quorum sensing inhibitors activity of marine algae polyphenols. **Methods** Quorum sensing (QS) inhibition was measured by qualitative agar diffusion assay using the bacterial model of *Chromobacterium violaceum* CV026. The presence of phenolic compounds were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** Twelve out of 25 tested algae polyphenols possessed QS inhibitors activity. Polyphenols extracted from *Ulva lactuca*, *Sargassum vachellianum* and *Undaria pinnatifida* significantly reduced violacein production of *C. violaceum* CV026 at the concentration of 1.0 mg/mL, and the diameter of inhibitory violacein was 25.18, 21.61 and 20.43 mm, respectively. The presence of phenolic compounds were detected by HPLC, which revealed that the reduced violacein production of *C. violaceum* CV026 might be due to the high content of catechin and epicatechin with respect to their quorum sensing inhibitors activity. **Conclusion** The results suggested the inhibiting QS system of bacteria using algae polyphenols could lead to the development of new quorum sensing inhibitors.

KEY WORDS: algae polyphenols; quorum sensing inhibitor; catechol; epicatechin

基金项目: “十二五”科技支撑计划项目(2012BAD28B05)

Fund: Supported by the National Key Technology R&D Program(2012BAD28B05)

*通讯作者: 曾名湧, 教授, 主要研究方向为水产品高值化利用技术。E-mail: mingyz@ouc.edu.cn

*Corresponding author: ZENG Ming-Yong, Professor, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, 5 Yushan Road, Qingdao 266003, China. E-mail: mingyz@ouc.edu.cn

1 引言

群体感应(quorum sensing)是细菌的密度达到一定水平时才发生的反应现象,受系统内信号分子的诱导。已有研究表明,细菌生物膜的形成、生物发光、毒性基因表达、抗生素的产生等均受群体感应系统调控^[1,2]。由于调控细菌的群体感应系统不影响细菌的抗性与耐药性,因此,干扰或阻断细菌的群体感应逐渐成为防止细菌感染的新策略。群体感应抑制剂是一类干扰细菌群体感应的物质的统称,不能杀死细菌或抑制细菌生长,但能干扰细菌的群体感应系统,从而抑制相关基因的表达而达到抗感染或防腐败的目的^[3]。最近,已从植物、动物、微生物和真菌中分离出具有群体感应活性的物质^[4-6]。海洋生物由于其环境的特殊性,蕴藏着更多的天然活性物质^[7]。因此,本研究拟从海藻中筛选具有群体感应抑制活性的海藻多酚,为海藻在食品或医药工业中新的应用提供基础性研究数据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

马尾藻、总状蕨类、浒苔、小球藻、刺松藻、鼠尾藻、大叶藻、黄金水云、裂叶马尾藻、条斑紫菜、鹿角藻、石花菜、海带、红毛菜、龙须菜、裙带菜、掌状红皮藻、海茸、羊栖菜、枝管藻、麒麟菜、钝顶螺旋藻、坛紫菜、红蜈蚣藻、石莼(南京熊本海藻贸易有限公司)。供试菌株紫色杆菌(*C. violaceum* CV026)由美国德克萨斯州立大学 McLean J.C. 教授惠赠。群体感应信号分子 N-乙酰化高丝氨酸内酯(C_6 -HSL, AHLs 类似物)、二甲基亚砜(DMSO)(Sigma 公司);乙醇(分析纯,莱阳经济技术开发区精细化工厂);琼脂(青岛高科园海博生物技术有限公司)。

2.2 仪器与设备

超净工作台(苏净集团安泰公司);HPS-250 生化培养箱(哈尔滨市东明医疗仪器厂);LDZX-40 II 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械);电动匀浆机(国华科技有限公司);DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏仪器公司);pH 计:PHS-2C 型(上海大普仪器有限公司);低温恒温培养箱 SHP-2500(上海精宏仪器公司);Mutiskan MK3 酶标仪(Thermo 公司);高压液相色谱仪(安捷伦科技有

限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 海藻多酚的提取

海藻多酚提取参照 Bennamara 等^[8]的方法进行。将干海藻样品粉碎,过 40 目筛,用 85%乙醇溶液超声提取 10 min,海藻干粉和乙醇溶液用量约为 1:2(w:v, g/mL),室温置于摇床上避光提取 6 h,过滤除去残渣,残渣重复提取两次,合并 3 次滤液经过旋转蒸发仪除去乙醇后,所得溶液分别用 1/2 体积的石油醚及氯仿各洗涤两次,静置分层。弃去有机相,水相旋转蒸发浓缩后得海藻多酚粗提物。将该粗提液加入已处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂层析柱中,平衡后,用水先洗脱至无色为止。再用 85%的乙醇溶液洗脱,收集乙醇洗脱液,减压蒸馏除去乙醇后即得海藻多酚提取液。

2.3.2 群体感应抑制活性测定

利用紫色杆菌 CV026 生物模型,采用琼脂扩散法进行筛选测定^[2]。将报告菌 CV026 过夜活化两次后,按 2%接入量接种于含有 20 μ g/mL 卡那霉素新鲜 LB 肉汤中,150 r/min 振荡培养 16~18 h,与 100 mL 含有 10 μ mol/L C_6 -HSL、0.8 g/100 mL 琼脂的冷却 LB 培养基混合,倒平板,待凝固后用直径为 6 mm 的打孔器打孔,将上述海藻多酚提取液分别加入 100 μ L 到各孔中。将平板静置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h,观察紫色菌素的产生情况。有群体感应抑制活性的提取液将在平板上看到颜色变淡、不透明的生长环。用游标卡尺进行抑制圈的直径测定。

2.3.3 海藻多酚组成测定

海藻多酚总量采用文献^[9]的方法测定。海藻多酚组成采用液相色谱法: μ -Bondapak Phenyl (0.4 cm $\times$ 30 cm)柱;流动相:35%甲醇+65% H_2O (H_3PO_4 调 pH 至 4.5);流速:1 mL/min;检测器:UV254 nm $\times$ 0.1 AUFS;标样均为美国 Sigma 公司色谱纯;外标法定量,酚含量用 mg/100 g FW 表示。

3 结果与分析

3.1 海藻多酚细菌群体感应抑制活性研究

紫色杆菌紫色色素的产生是典型的细菌群体感应现象,利用该现象建立的筛选模型已广泛用于群体感应抑制剂的研究中。本研究通过该筛选模型,对 25 种海藻多酚进行了群体感应抑制活性筛选。结果

显示, 所选 25 种海藻中, 48%的海藻多酚表现出了群体感应抑制活性, 在琼脂平板上产生了大小不一、乳白色不透明的抑制圈(见图 1)。其中, 石莼、马尾藻、裙带菜多酚提取物对 CV026 的紫色色素产生抑制活性较大, 在 1.0 mg/mL 多酚浓度下, 其形成的抑制圈直径分别为 25.18、21.61、20.43 mm(表 1)。

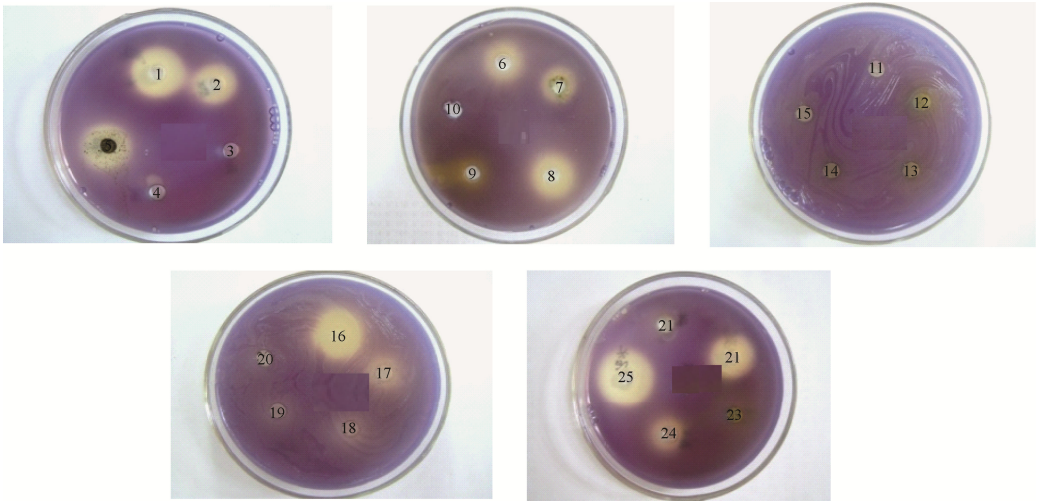


图 1 不同海藻多酚对对紫色杆菌 CV026 的群体感应抑制活性

1: 马尾藻; 2: 总状蕨类; 3: 浒苔; 4: 小球藻; 5: 刺松藻; 6: 鼠尾藻; 7: 大叶藻; 8: 黄金水云; 9: 裂叶马尾藻; 10: 条斑紫菜; 11: 鹿角藻; 12: 石花菜; 13: 海带; 14 红毛菜; 15 龙须菜; 16: 裙带菜; 17: 掌状红皮藻; 18: 海茸; 19: 羊栖菜; 20: 枝管藻; 21: 麒麟菜; 22: 钝顶螺旋藻; 23: 坛紫菜; 24: 红蜈蚣藻; 25: 石莼

Fig. 1 Inhibition of violacein production of *Chromobacterium violaceum* CV026 by algae polyphenols
1: *Sargassum vachellianum*; 2: *Caulerpa racemosa*; 3: *Enteromorpha prolifera*; 4: *Chlorella*; 5: *Codium fragile harti*; 6: *Sargassum thunbergii*; 7: *Herba zosterae Marinae*; 8: *Ectocapus Lyngbye*; 9: *Sargassum siliquastrum*; 10: *Porphyra yezoensis*; 11: *Chondrus ocellatus*; 12: *Gelidium vagum*; 13: *Laminaria japonica*; 14: *Bangia fuso-purpurea*; 15: *Gracilaria lemaneiformis*; 16: *Undaria pinnatifida*; 17: *Palmaria palmata*; 18: *Durvillaea antarctica*; 19: *Hizikia fusiformis*; 20: *Cladosiphon okamuranus*; 21: *Eucheuma muricatum*; 22: *Spirulina platensis*; 23: *Porphyra haihanensis*; 24: *Grateloupia filicina*; 25: *Ulva lactuca*

表 1 不同海藻多酚对紫色杆菌 CV026 紫色色素抑制圈的影响(n=3)

Table 1 Inhibition of violacein production of <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 by algae polyphenols (n=3)			
海藻名称	紫色抑制圈大小(mm)	海藻名称	紫色抑制圈大小(mm)
马尾藻	21.61±0.12 ^b	总状蕨类	16.83±0.09 ^{ab}
浒苔	-	小球藻	-
刺松藻	19.22±0.18 ^b	鼠尾藻	13.27±0.13 ^a
大叶藻	13.11±0.09 ^a	黄金水云	18.17±0.21 ^b
裂叶马尾藻	12.50±0.16 ^a	条斑紫菜	-
鹿角藻	-	石花菜	-
海带	-	红毛菜	-
龙须菜	-	裙带菜	20.43±0.14
掌状红皮藻	10.82±0.24 ^a	海茸	-
羊栖菜	-	枝管藻	-
麒麟菜	-	螺旋藻	19.21±0.19 ^b
坛紫菜	-	红蜈蚣藻	13.19±0.23 ^a
石莼	25.18±0.17 ^c		

注: 数据为三次重复平均值, 数字后不同字母表示处理间差异显著(P<0.05)。

已有研究表明,海藻多酚具有很强的抗菌活性^[10-12],但本研究结果显示,在给定的海藻多酚浓度范围内,琼脂平板并未出现透明的抗菌圈,而是呈现出乳白色不透明的生长圈。表明该浓度条件下,海藻多酚并未杀死细菌或抑制细菌生长,只是干扰了细菌的群体感应系统,使得在信号分子 C₆-HSL 存在的条件下,海藻多酚周围的紫色杆菌色素的产生受到了不同程度的抑制。

本研究还发现,在所选海藻中,相对于红藻,绿藻和褐藻多酚表现出了更强的群体感应抑制活性。9 种红藻中,只有红蜈蚣藻、掌状红皮藻具有群体感应抑制活性,而褐藻和绿藻中的大部分品种,如裙带菜、马尾藻、鼠尾藻、黄金水云、石莼、总状蕨类、钝顶螺旋藻等均有明显的色素抑制圈。

3.2 不同浓度海藻多酚群体感应抑制活性研究

选用石莼、马尾藻、裙带菜多酚研究其群体感应抑制活性的量效关系。结果显示,三种海藻的最小抑制浓度分别在 0.1~0.3 mg/mL 之间。三种海藻多酚的群体感应抑制活性均呈现出剂量依赖性,在 0.1~0.5 mg/mL 的浓度范围内,随海藻多酚含量增加,其抑制圈直径均增大(见图 2)。

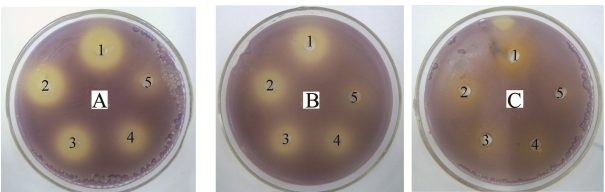


图 2 不同浓度海藻多酚对紫色杆菌 CV026 的群体感应抑制活性

A: 石莼; B: 马尾藻; C: 裙带菜
1: 0.5 mg/mL; 2: 0.4 mg/mL;
3: 0.3 mg/mL; 4: 0.2 mg/mL; 5: 0.1 mg/mL
Fig. 2 Inhibition of quorum-sensing by different concentrations of algae polyphenols
A: *Ulva lactuca*; B: *Sargassum vachellianum*; C: *Undaria pinnatifida*

目前已从植物、动物、微生物中分离得到了多种群体感应抑制剂^[13]。研究表明,群体感应抑制剂具有干扰或拮抗信号分子活性、阻断信号分子传导、调节 LuxR/LasR 基因表达等功能。本研究结果表明,在一定的浓度范围内,海藻多酚可干扰紫色杆菌紫色色素的产生,其干扰机制可能与海藻多酚拮抗信号分子 C₆-HSL 的活性有关。

3.3 海藻多酚的活性成分分析

多酚作为群体感应抑制剂已有报道^[14],比如,儿茶素、香豆酸、没食子酸丙酯、单宁等均具有群体感应抑制活性或影响细菌生物膜的形成。Santoso 等也从海藻中分离到具有群体感应抑制活性的表儿茶素、黄酮醇及黄酮醇苷^[15]。采用 HPLC 对石莼、马尾藻、裙带菜多酚的组成进行测定。结果显示,三种海藻均含有儿茶酚和表儿茶素。此外,石莼多酚里含少量的桑色素,裙带菜多酚里含少量的儿茶素,马尾藻多酚里含少量的儿茶素、阿魏酸及芦丁。三种海藻均不含槲皮素、没食子酸、绿原酸及香豆酸等(见表 2)。推测,三种海藻多酚的群体感应抑制活性可能与高含量的儿茶酚及表儿茶素有关。

表 2 海藻多酚组成测定结果
Table 2 The major phenolic acids in the algae polyphenols (mg/g)

	儿茶素	表儿茶素	儿茶酚	阿魏酸	芦丁	桑色素
石莼多酚	-	2.30	61.00	-	-	2.10
马尾藻多酚	1.95	9.60	43.98	0.63	0.23	-
裙带菜多酚	0.80	9.90	16.10	-	-	-

4 结 论

所选 25 种海藻中,褐藻和绿藻多酚的群体感应抑制活性比红藻多酚高,绿藻中的石莼、褐藻中的马尾藻和裙带菜多酚群体感应抑制活性较强,三种海藻多酚均含有高含量的儿茶酚和表儿茶素,可能是群体感应抑制剂的活性组分。海藻由于其海洋资源的特殊性,富含多酚类物质,有望成为群体感应抑制剂的新来源。但鉴于海藻多酚的多功能性,其详细的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] Brackman G, Hillaert U, Van Calenbergh S, et al. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia* [J]. Res Microbiol, 2009, 160: 144–151.
[2] Vattem DA, Mihalik K, Crixell SH, et al. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors [J]. Fitoterapia, 2007, 78: 302–310.
[3] Packiavathy IASV, Agilandewari P, Musthafa KS, et al. Antibiofilm and metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens [J]. Food Res Int, 2012, 45: 85–92.

- [4] Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R. Quorum sensing and phytochemicals [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 12607–12619.
- [5] Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, *et al.* Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species [J]. *Microbiol*, 2005, 151: 1325–1340.
- [6] Truchado P, Tomás-Barberán FA, Larrosa M, *et al.* Food phytochemicals act as quorum sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora* [J]. *Food Control*, 2012, 24: 78–85.
- [7] Li YX, Wijesekara I, Li Y, *et al.* Phlorotannins as bioactive agents from brown algae [J]. *Proc Biochem*, 2011, 46: 2219–2224.
- [8] Bennamara A, Abourriche A, Berrada M, *et al.* Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* [J]. *Phytochem*, 1999, 52: 37–40.
- [9] Automation and comparison with manual methods [J]. *Am J Enol Viticult*, 1977, 28: 49–55.
- [10] Liao WR, Lin JY, Shieh WY, *et al.* Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30: 433–439.
- [11] Kuda T, Kunii T, Goto H, *et al.* Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto peninsula Japan [J]. *Food Chem*, 2007, 103: 900–905.
- [12] Bansemir A, Blume M, Schröder S, *et al.* Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria [J]. *Aquacult*, 2006, 252: 79–84.
- [13] Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: An overview [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31: 224–245.
- [14] Huber B, Eberl L, Feucht W, *et al.* Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing [J]. *Z Naturforsch*, 2003, 58c: 879–884.
- [15] Santoso J, Yoshie Y, Suzuki T. The distribution and profile of nutrients and catechins of some Indonesian seaweeds [J]. *Fish Sci*, 2002, 68: 1647–1648.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刘尊英, 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为水产品高值化利用技术。
E-mail: liuzunying@ouc.edu.cn



曾名湧, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为水产品高值化利用技术。
E-mail: mingyz@ouc.edu.cn