

大豆过氧化物酶 – 过氧化氢 – 碘化钾体系杀菌作用

金建玲, 张为灿*, 李瑜, 赵越, 王飞, 高培基*

山东大学生命科学学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要:【目的】研究豆壳过氧化物酶(SBP)-H₂O₂-KI 三元体系杀菌作用及其可能的杀菌机制。【方法】以细菌生长的浊度(*OD*₆₀₀)为指标检测 SBP-H₂O₂-KI 体系的抑菌作用;以活细胞计数(CFU)为指标检测 SBP-H₂O₂-KI 体系的杀菌作用;以最低抑菌浓度(MIC)为指标检测亚致死剂量的 SBP-H₂O₂-KI 体系作用下连续传代细菌的敏感性变化;以物理和化学方法检测 SBP-H₂O₂-KI 体系中活性氧基团等功能基团的生成与否,以期解释 SBP-H₂O₂-KI 体系的杀菌机制。【结果】SBP-H₂O₂-KI 体系对多种细菌有高效、快速杀菌作用,作用时间仅为几分钟。在亚致死剂量浓度下连续培养的细菌悬液对体系的耐受能力(MIC)没有显著性变化,从中也不能分离到抗性/耐性突变株。物理和化学方法检测结果表明 SBP-H₂O₂-KI 反应过程中无羟基自由基产生;化学方法检测结果表明 SBP-H₂O₂-KI 反应过程中无超氧阴离子自由基产生;而有单线态氧和单质碘的产生。【结论】根据实验结果可以推测:SBP-H₂O₂-KI 体系的杀菌力可能主要来源于单线态氧和碘的活性中间态,而不是羟基自由基和超氧阴离子。此外,SBP-H₂O₂-KI 体系所具备的高效、快速的杀菌作用,以及细菌对其不易产生抗性的特点,预示此体系在医疗以及植保等方面有广泛的应用前景。

关键词:过氧化物酶, 杀菌作用, 抗性, 过氧化物酶 – H₂O₂ – KI, 细菌

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0393-09

细菌对抗生素的耐药性问题已成为威胁人类健康的世界性难题,特别是多重耐药/抗药性菌株的出现^[1–3]。尽管对耐药菌株的耐药机理的研究已相当深入,但研究工作大都集中在不同细菌对不同抗生素产生抗性的抗性基因、抗性机制、抗性基因表达调控等相关的分子水平上的研究。这些工作有利于针对特异性位点的新药开发,但不能从根本上给出控制细菌抗药性难题的解决策略。临床上对细菌性感染施加抗生素治疗时,在药物存在的选择性条件下,因为抗性菌具有生长优势而得以竞争性生长,增加了抗性细胞在群体中所占的比例,进一步导致了药物治疗的困难。由于各种抗性菌株已在人群中广泛

分布,怎样防治耐/抗药菌株的扩增已成为医疗、农业、环保都关注的重大问题^[4–7]。因此,筛选一种新的快速杀菌体系,它在有效杀灭细菌的同时又使细菌对其不易产生抗性突变,将是解决细菌抗药性难题的行之有效的措施之一。

对豆壳过氧化物酶(SBP, Soybean peroxidase, Ec 1.11.1.7)催化机理的系统研究^[8–11],表明 SBP 是以血红素为辅基的过氧化物酶,它较已得到广泛应用的辣根过氧化物酶有更宽的底物范围、耐热性、和较宽的 pH 活力范围,在大豆种皮中含量丰富,易于提取和制备。本室还发现 SBP-H₂O₂-KI 系统具有快速杀菌作用,这与文献报导的过氧化物酶

基金项目:国家自然科学基金(81041089);山东省自然科学基金(ZR2009BM020, Y2007D35)

* 通信作者。Tel: +86-531-88369495; Fax: +86-531-88565610; E-mail: weican@sdu.edu.cn, gaopj@sdu.edu.cn

作者简介:金建玲(1965–),女,副教授,研究方向为细菌抗药性及抗菌药物研发。E-mail: jinjianling@sdu.edu.cn

收稿日期: 2010-10-20; **修回日期:** 2010-12-21

能催化卤化物(Cl^- , I^- , Br^-)发生氧化反应而抑制细菌增值的结果一致^[12-14]。而且具有在亚致死剂量下连续培养不能诱导耐性菌株形成的特点,这为细菌抗药性问题的解决提供了启示。本文报导了SBP- H_2O_2 -KI杀菌动力学,对17株细菌的杀菌试验,亚致死剂量诱导试验,以及自由基检测等试验结果,并探讨了这一结果进入临床应用的前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株:见表1。本室保存。其中,*Escherichia coli* ATCC 25922 和 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 是国际上通用的抗生素药敏实验的标准敏感菌株。

1.1.2 药品和试剂:大豆过氧化物酶(SBP),本室制备,制备方法、纯度检测等参考文献[10-11]进行。盐酸新霉素,愈创木酚,硫代巴比妥酸(TBA),氮蓝四唑(NBT),二苯卡巴肼(DPCI),二甲基吡啶N-氧化物(DMPO)等,购于SIGMA公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基:细菌培养用MH培养基(购于北京兰桥生物制品有限公司)。

1.2 大豆过氧化物酶酶活测定

以愈创木酚为底物,反应体系为:3.0 mL的50 mmol/L醋酸缓冲液中含8 mmol/L愈创木酚、0.5 mmol/L过氧化氢、0.1 mL酶液。30℃下检测470 nm吸收以表征愈创木酚氧化产物的变化。四邻甲氧基联酚消光系数 $\varepsilon = 26.6 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{cm})$,以每min转化1 μmol 底物定义为一个酶活力单位。

1.3 过氧化氢浓度的测定

参考文献[13]进行。

1.4 SBP- H_2O_2 -KI体系的抗菌作用

抑菌作用测定:从试管斜面上挑取菌体,接种于100 mL MH液体培养基中,37℃摇床过夜培养12 h。取1%的菌悬液转接于添加有不同浓度的SBP、 H_2O_2 、KI的培养基中,每隔1 h取样,以分光光度计测定菌液的浊度值 OD_{600} ,表征菌的生长和受抑制的动力学过程,进而表征SBP- H_2O_2 -KI体系的抑菌作用。

杀菌作用测定:从试管斜面上挑取菌体,接种于100 mL MH液体培养基中,37℃摇床过夜培养12 h。离心收集菌体,用50 mmol/L pH 6.5 磷酸缓冲液洗

涤2次,再加入缓冲液,制备成含合适浓度的细胞悬液,备用。在试管中加入缓冲液、大豆过氧化物酶、菌液,置于37℃孵育10 min,使SBP充分吸附于菌体上,然后加入KI、 H_2O_2 ,置于37℃摇床上反应一定时间后,涂布平板,统计存活细菌数(CFU, colony forming unit),为SBP- H_2O_2 -KI体系的杀菌作用。

1.5 检测SBP- H_2O_2 -KI体系中单质碘的产生

50 mmol/L pH6.2的磷酸缓冲液,含SBP终浓度3 U/mL, H_2O_2 终浓度2 mmol/L, KI 终浓度0.3 mmol/L,加入0.5%淀粉溶液数滴,振摇观察其颜色的变化。

1.6 检测SBP- H_2O_2 -KI体系中羟自由基的产生

采用硫代巴比妥酸(TBA)法检测羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的产生。2-脱氧-D-核糖在 $\cdot\text{OH}$ 作用下发生明显降解,降解产物与TBA起显色反应,在532 nm处有光吸收。10 mL反应体系中含有1.6 U/mL SBP,0.1 mmol/L H_2O_2 ,1 mmol/L KI,5 mmol/L 2-脱氧-D-核糖,37℃振荡30 min,取1 mL反应液加入1 mL 1% (w/v) TBA溶液(TBA溶在50 mmol/L NaOH溶液中)和1 mL 2.8% (w/v) 三氯乙酸,煮沸20 min,冷却后测量532 nm处的吸光值,532 nm下的吸收表明有羟自由基产生。

1.7 检测SBP- H_2O_2 -KI体系中超氧阴离子自由基的产生

采用氮蓝四唑(NBT)还原法测定超氧阴离子自由基的产生。超氧阴离子自由基可将氮蓝四唑(NBT)氧化为非水溶性的蓝黑色物质,后者可经二氧六环萃取得到,并在580 nm波长处产生光吸收。通过对二氧六环萃取物溶液在580 nm的比色,测定被还原的NBT,从而间接代表体系中的超氧阴离子自由基的量。10 mL反应体系中含有1.6 U/mL SBP,0.1 mmol/L H_2O_2 ,1 mmol/L KI,0.5 mmol/L NBT,37℃振荡30 min,然后用二氧六环萃取,测量580 nm处的吸光值。

1.8 检测SBP- H_2O_2 -KI体系中单线态氧的产生

二苯卡巴肼(DPCI)氧化光度法检测单线态氧:单线态氧会与二苯卡巴肼(DPCI)反应,生成二苯卡巴肼(DPCO),DPCO被苯-四氯化碳萃取的有机相,在563 nm处有强吸收,从而可以检测单线态氧的产生及其相对产量。10 mL反应体系中含有1.6 U/mL SBP,0.1 mmol/L H_2O_2 ,1 mmol/L KI,2.5 mmol/L DPCI,37℃振荡30 min,然后用苯-四氯化碳萃取,测量563 nm处的吸光值。

1.9 电子顺磁共振波谱仪 (ESR) 检验羟基自由基的产生

在 50 mmol/L pH6.2 的磷酸缓冲液,SBP 终浓度 9 U/mL, H_2O_2 终浓度 2 mmol/L, KI 终浓度 0.3 mmol/L,二甲基吡啶 N-氧化物 (DMPO, 5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) 终浓度 160 mmol/L,室温条件下在 ESP300 电子顺磁共振波谱仪 (Bruker, 德国) 进行 ESR 测试。

2 结果

2.1 SBP- H_2O_2 -KI 体系抑菌作用及其组分的优化

SBP- H_2O_2 -KI 是一个 3 元体系,预备试验表明,在本研究用的浓度范围内 (SBP 0.1 - 10 U/mL, H_2O_2 0.01 - 10 mmol/L, KI 0.001 - 10 mmol/L),任何单一组分都无抑菌作用,2 组分组合时没有或可能仅有微弱的抑菌作用。任何单一组分含量的变化都可能对三元体系中的抑菌效力有影响。根据本实验室过去工作^[15],如对 3 因素进行了全面组合,由多元非线性回归求得优化结果,工作量至为繁大,而用等值线图法确定 2 个变量的协同作用是一有效方法^[16]。本文采用顺序进行等值线图法以求得 SBP, H_2O_2 和 KI 的杀菌作用的优化值,即顺序固定 2 个变量,改变另一个变量,顺序进行 3 次测试。以菌液浓度的 OD_{600} 的减少为目标近似表征体系的抑菌力。以此为据,得到的 2 维等值线图 (略)。等值线上的数值为在 2 个因素复合作用下变动另一因素的 OD_{600} 值为代表的抑菌力。等值线图结果显示在 SBP > 0.7 U/mL, H_2O_2 > 0.6 mmol/L, KI > 0.7 mmol/L 时,在 2 h 内即可达到近 80% 以上的抑菌效果。由于还缺少把这 3 个图归一化的方法,所以显示的结果必然有一定的局限性,但它作为 SBP- H_2O_2 -KI 体系设计进行抑菌/杀菌试验的设计依据仍然是可行的。此外,浊度值是处于生长状态的细菌和处于非生长状态的细菌的加合值^[15-16],因此可表征抑菌力。而 CFU 为生长状态的细菌形成的菌落数,可表征杀菌力。

2.2 SBP- H_2O_2 -KI 体系对不同类型细菌的杀菌作用

根据上述试验结果,选择 SBP 1 U/mL, H_2O_2 0.8 mmol/L, KI 1 mmol/L 的体系进行杀菌效果测定,初始时细菌悬液浓度为: $>1 \times 10^8$ /mL CFU,试验结果见表 1。从表 1 中结果可以看出:SBP- H_2O_2 -KI 对不同细菌的杀菌效果有差异。根据在试验条

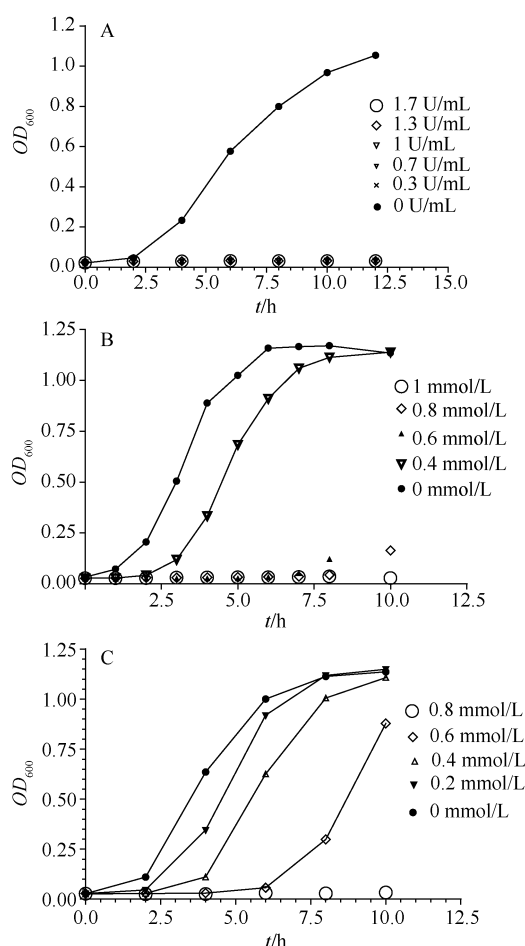


图 1 SBP- H_2O_2 -KI 体系中各组分浓度变化对 *E. coli* ATCC 25922 生长的抑制作用

Fig. 1 The antibacterial action when the concentration changes of the three components in SBP- H_2O_2 -KI system. A: SBP concentration changed, H_2O_2 0.8 mmol/L and KI 1 mmol/L did not change. B: H_2O_2 concentration changed, SBP 1 U/mL and KI 1 mmol/L did not change. C: KI concentration changed, but SBP 1 U/mL and H_2O_2 0.8 mmol/L did not change.

件下的杀菌作用不同,可以分为以下几类:第一类,对 SBP- H_2O_2 -KI 体系不敏感的细菌 (30 min 内不表现杀菌作用),如链球菌,变性杆菌,假单胞菌等。第二类,对 SBP- H_2O_2 -KI 体系不太敏感的细菌 (20 min 内不表现杀菌作用,30 min 有微弱杀菌作用),如腊样芽孢杆菌,弗氏柠檬酸杆菌,肠炎沙门氏菌等。第三类,对 SBP- H_2O_2 -KI 体系比较敏感的细菌 (10 min 内杀菌不完全,30 min 细菌被全部杀死),如鼠伤寒沙门氏菌,单胞李斯特菌,志贺菌,唾液链球菌,葡萄球菌等。第四类:对 SBP- H_2O_2 -KI 体系敏感 (10 min 内被全部杀死),如大肠杆菌,肺炎

克雷伯菌等。其中,同属不同种的细菌,对 SBP- H_2O_2 -KI 体系敏感性有较大差异。如缓症链球菌对 SBP- H_2O_2 -KI 体系不敏感,而唾液链球菌则较敏感;鼠伤寒沙门氏菌(模式菌株)的敏感性高于肠炎沙门氏菌(临床分离菌株),等,这一敏感性差异的机制值得深究。

2.3 SBP- H_2O_2 -KI 体系的抑菌动力学和杀菌动力学

从以上试验结果可以得知:不同细菌对 SBP- H_2O_2 -KI 体系的敏感性不同(表 1)。选取 3 种敏感性不同的细菌进行 SBP- H_2O_2 -KI 体系抑菌动力学试验。图 1 中数据表明,调整 SBP- H_2O_2 -KI 体系中各

组分的浓度,可以改变其杀菌效果。因此,通过预备试验可以确定 10 min 内对所选细菌能达 99.99% 抑菌作用的 SBP- H_2O_2 -KI 体系的组成成分;然后按照此浓度进行抑菌动力学试验(图 2)。结果显示:KI 单独作用几乎没有任何抑菌作用,与对照极为接近; H_2O_2 -KI 联合作用与 H_2O_2 单独作用的抑菌效果也极为接近(葡萄球菌稍有差别);只有 SBP- H_2O_2 -KI 共同作用才表现出强烈的抑菌作用。此外,图中结果还显示:SBP- H_2O_2 -KI 完整体系或其组成成分对不同细菌的抑菌作用有差异。

表 1 SBP- H_2O_2 -KI 体系的杀菌作用*
Table 1 The antibacterial action of SBP- H_2O_2 -KI system for 17 bacterial strains

Strains	G ⁺ /G ⁻	Time(min)			
		0	10	20	30
<i>Streptococcus mitis</i> CMCC 32232	G ⁺	+++	+++	+++	+++
<i>Proteus vulgaris</i> pm2	G ⁻	+++	+++	+++	+++
<i>Vibrio fluvialis</i>	G ⁻	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonsa fluorescens</i> CMCC 53518	G ⁻	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonsa solanacearum</i>	G ⁻	+++	+++	+++	+++
<i>Bacillus cereus</i> CMCC63301	G ⁺	+++	+++	+++	+
<i>Citrobacter freundii</i>	G ⁻	+++	+++	+++	+
<i>Salmonella enteritidis</i> CMCC50336	G ⁻	+++	+++	+++	+
<i>Salmonella Typhimurium</i> CMCC50013-6	G ⁻	+++	+++	+	-
<i>Shigella flexneri</i> 301	G ⁻	+++	+++	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> CMCC50043	G ⁺	+++	+++	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i> CMCC 32231	G ⁺	+++	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	G ⁺	+++	+	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i>	G ⁺	+++	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	G ⁻	+++	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 31343	G ⁻	+++	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G ⁻	+++	-	-	-

+++ : Bacterial survival ratio >90% ; + : Bacterial survival ratio <1% ; - : Bacterial survival ratio =0 or <1⁰⁰/₀₀.

此外,测定了在较高浓度 SBP- H_2O_2 -KI 体系作用下的杀菌动力学,结果见图 3。图 3 结果显示:SBP- H_2O_2 -KI 抗菌体系作用 *E. coli* 后,2 min 内 CFU 由 10⁸/mL 迅速降至 0。SBP- H_2O_2 -KI 抗菌体系处理 *S. aureu* 后,CFU 在第 8 min 时由 10⁸/mL 迅速降至 0。此结果说明 SBP- H_2O_2 -KI 体系的杀菌速度是非常快速的,也与表 1 结果相符合。

2.4 在亚致死剂量下连续传代过程中细菌对 SBP- H_2O_2 -KI 体系敏感性的变化

选取大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为试验菌株,测定在亚致死剂量的 SBP- H_2O_2 -KI 体系中连续传代后,细菌对 SBP- H_2O_2 -KI 体系的敏感性变化情况。图 1 中的数据已经表明,SBP- H_2O_2 -KI 体系中

任一组分的浓度变化,都能影响整个体系的抑菌杀菌效果。因此,试验中固定两种组分的浓度(SBP 3 U/mL, H_2O_2 2 mmol/L),测定 30 min 可以杀死试验细菌的 KI 浓度。以此浓度的 1/2 和 2/3 为亚致死剂量,进行细菌传代培养:即以 1‰体积菌悬液接种含相同亚致死剂量 SBP- H_2O_2 -KI 体系的新鲜培养基,继续培养,为一次传代。在一次传代过程中,细菌数量增长 1000 倍,生长约 10 代(2¹⁰ = 1024)^[17],如此连续传代。传代过程中,定时取样测定菌悬液对 SBP- H_2O_2 -KI 体系的敏感性(即 SBP 3 U/mL, H_2O_2 2 mmol/L 条件下,30 min 杀死试验细菌的 KI 浓度)。试验结果见图 4。表中数据显示:大肠杆菌在两种亚致死剂量的 SBP- H_2O_2 -KI 体系中连续生长

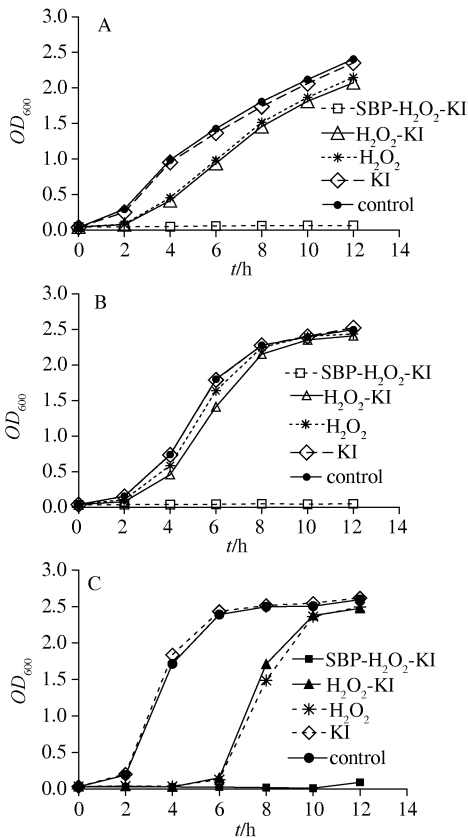


图2 SBP-H₂O₂-KI体系的抑菌动力学

Fig. 2 Inhibition kinetics of SBP-H₂O₂-KI system for three different bacterial strains. A: *Escherichia. coli* ATCC 25922; SBP 1 U/mL, H₂O₂ 0.8 mmol/L, KI 1 mmol/L; B: *Staphylococcus aureu* ATCC 25923; SBP 2.5 U/mL, H₂O₂ 1.6 mmol/L, KI 1.4 mmol/L; C: *Pseudomonas solanacarum*. SBP 2 U/mL, H₂O₂ 1.2 mmol/L, KI 2.5 mmol/L.

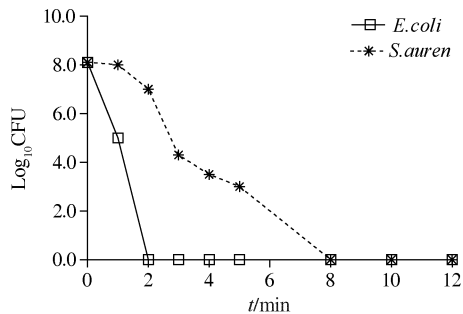


图3 SBP-H₂O₂-KI体系的杀菌动力学

Fig. 3 Sterilization kinetics of SBP-H₂O₂-KI system for two bacterial types (G⁺ and G⁻). SBP 9 U/mL, H₂O₂ 10 μmol/L, KI 1.0 mmol/L.

150代的过程中,其敏感性没有显著变化(图4);金黄色葡萄球菌在两种亚致死剂量的SBP-H₂O₂-KI体系中生长150代,除第1次传代时(生长约10代)敏

感性显著下降(原因有待以后深入研究),其后的传代过程中虽有波动,但敏感性未有持续下降的趋势(图4)。

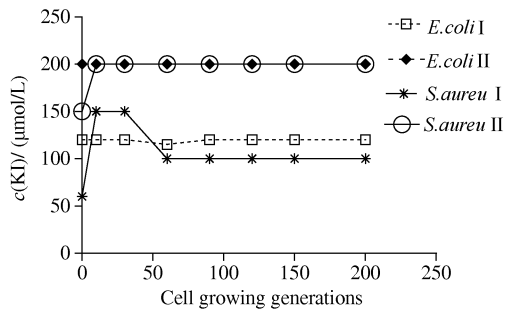


图4 细菌在亚致死剂量SBP-H₂O₂-KI体系中连续传代其敏感性变化情况

Fig. 4 The variances of the sensitivity for four bacterial populations growing in sub-lethal doses SBP-H₂O₂-KI system. The sub-lethal doses I of *Escherichia. coli* ATCC 25922 was SBP 3 U/mL, H₂O₂ 2 mmol/L, KI 0.12 mmol/L, the doses II was SBP 3 U/mL, H₂O₂ 2 mmol/L, KI 0.2 mmol/L. The sub-lethal doses I of *Staphylococcus aureu* ATCC 25923 was SBP 3 U/mL, H₂O₂ 2 mmol/L, KI 0.06 mmol/L, the doses II was SBP 3 U/mL, H₂O₂ 2 mmol/L, KI 0.15 mmol/L.

为了突出表明细菌在亚致死剂量的SBP-H₂O₂-KI体系中连续传代其敏感性没有明显下降的优势,做了细菌在亚致死剂量抗生素中连续传代的敏感性变化情况的对照试验。结果见图5。图5中数据表明,大肠杆菌在含亚致死剂量新霉素(1/2MIC)的培养基中连续传代^[18],随着细菌生长代数的不断增加,存活细菌对新霉素的敏感性不断下降(即对新霉素的MIC值不断增加)。

为了阐明图5中大肠杆菌在含亚致死剂量新霉素的培养基中连续传代,对新霉素的敏感性不断下降这种现象出现的原因,还检测了传代过程中细菌群体中抗性突变细菌的产生及其在群体中所占的比例,结果表明:大肠杆菌在亚致死剂量的新霉素环境中连续培养200代时,其菌悬液中新霉素抗性突变细菌(定义为在4MIC及以上的新霉素浓度下可稳定生长)占细菌总数的比率达10⁻⁵。即很容易筛选到新霉素抗性突变菌。

抗生素抗性突变菌的筛选,一般采用等于或高于4×MIC的药物浓度作为筛选条件,能在4×MIC或更高的药物浓度下生长者为抗性突变菌。因此,参照抗生素抗性菌的筛选,细菌在亚致死剂量SBP-H₂O₂-KI体系的传代过程中(50代,100代,150代,

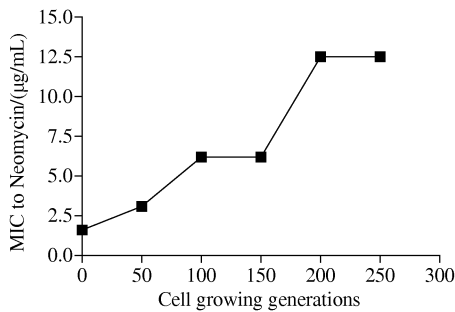


图5 大肠杆菌 ATCC 25922 在亚致死剂量新霉素中连续传代其敏感性变化情况

Fig.5 The sensitivity of bacterial population growing in sub-lethal doses neomycin. The MIC of *Esherichia. coli* ATCC 25922 to neomycin was 1.56 μg/mL, the sub-lethal doses used for this experiment was 0.78 μg/mL.

200代时),分别从1/2MIC的大肠杆菌传代培养物、2/3MIC的大肠杆菌传代培养物、1/2MIC的金黄色葡萄球菌传代培养物、2/3MIC的金黄色葡萄球菌传代培养物中各取细菌悬液5mL,离心浓缩菌体后,置于4×MIC的SBP-H₂O₂-KI体系中处理30min(注:4×MIC的SBP-H₂O₂-KI体系是:SBP和H₂O₂的浓度与传代培养时的浓度没有变化,但KI浓度是传代浓度的4倍),多次实验都无法得到存活细菌,

因而无法进一步得到SBP-H₂O₂-KI体系的抗性细菌。由于实验中所取菌悬液达5mL,其中的细菌细胞总数约10¹⁰CFU,仍然没有得到能抵抗4×MIC的SBP-H₂O₂-KI的抗性细胞。由此可以得出,在本实验所选取的亚致死剂量的SBP-H₂O₂-KI体系中连续传代,药敏实验的标准敏感细菌-大肠杆菌25922和金黄色葡萄球菌25923都没有诱导产生明显的抗性突变。

2.5 SBP-H₂O₂-KI体系杀菌机理的探讨

根据以往过氧化物酶-H₂O₂-KI体系杀菌的可能机理,设计了相关试验以检测SBP-H₂O₂-KI体系产生的活性功能基团,结果见表2。试验结果表明,在本试验检测方法的灵敏度范围内,SBP-H₂O₂-KI体系不产生羟自由基,不产生超氧阴离子,只产生单线态氧。ESR检测结果进一步证明了SBP-H₂O₂-KI体系不产生羟基自由基(图6-A),与此相反,产生羟基自由基的典型体系-Fenton反应(Fe²⁺-H₂O₂)则能产生明显的羟自由基(图6-B),但其杀菌作用很弱(表3)。此外,在SBP-H₂O₂-KI体系中加入可溶性淀粉溶液,溶液变成蓝色且颜色逐渐加深,说明SBP-H₂O₂-KI抗菌体系中产生了单质碘。

表2 检测 SBP-H₂O₂-KI 体系中羟自由基、超氧阴离子和单线态氧的产生

Table 2 Detection the occurring of hydroxyl radical, superoxide anion and singlet oxygen in SBP-H ₂ O ₂ -KI system				
Detection contents		SBP-H ₂ O ₂ -KI	H ₂ O ₂ -KI	Control(Water)
OD ₅₂₃	Hydroxyl radical	0.066 ± 0.003	0.071 ± 0.004	0.061 ± 0.008
OD ₅₈₀	Superoxide anion	0.023 ± 0.004	0.013 ± 0.004	0.017 ± 0.005
OD ₅₆₃	Singlet oxygen	0.652 ± 0.003	0.060 ± 0.024	0.034 ± 0.003

表3 SBP-H₂O₂-KI 体系与 Fe²⁺-H₂O₂ 体系杀菌力比较 (30 min)

Table 3 Comparison of the bactericidal effect during reacts in 30 minutes of SBP-H ₂ O ₂ -KI system and Fe ²⁺ -H ₂ O ₂ system						
Groups		Fe ²⁺	H ₂ O ₂	Fe ²⁺ -H ₂ O ₂	SBP-H ₂ O ₂ -KI	Control(water)
CFU	<i>E. coli</i>	1. 72 × 10 ⁸	1. 87 × 10 ⁸	1. 86 × 10 ⁸	0	1. 58 × 10 ⁸
	<i>S. aureu</i>	8. 70 × 10 ⁸	1. 23 × 10 ⁹	7. 50 × 10 ⁸	0	1. 88 × 10 ⁹

Fe²⁺ 0.2 mmol/L, SBP 3 U/mL, H₂O₂ 2 mmol/L, KI 0.3 mmol/L.

3 讨论

3.1 SBP-H₂O₂-KI 体系的抑菌和杀菌机制

本文结果表明羟基自由基不是SBP-H₂O₂-KI体系的主要杀菌力,这与传统观点“在H₂O₂或H₂O₂-KI体系中羟基自由基是其主要杀菌力之一”的结论不同^[19-23, 25-26]。羟基自由基作为一种高活性氧化基团,能作用于微生物细胞壁,可改变微生物的通透性,使微生物肿胀变形;能氧化蛋白质和酶分子中的

巯基基团,使蛋白质变性,酶的活性和代谢功能丧失;还能氧化核酸,破坏DNA和RNA等;多种机制共同作用最终导致微生物生长抑制或死亡^[18-22]。过氧化物酶-H₂O₂-KI抗菌系统中含有H₂O₂,因此研究者一般推测其抗菌机理之一是由于其产生了羟自由基对生物大分子造成了损伤。化学法(TBA法)和物理法(ESR)检测羟自由基的产生,结果均表明SBP-H₂O₂-KI体系中无羟基自由基产生。在试验过程中同时测定了产生羟基自由基的典型体系—

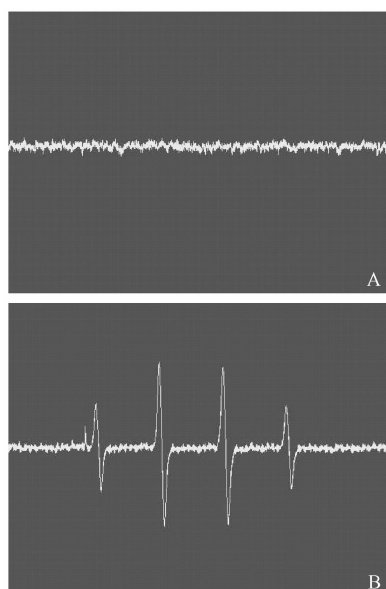


图6 ESR波谱法检测羟基自由基的产生

Fig.6 Detection the occurring of hydroxyl radical in SBP-H₂O₂-KI system by EPR spectrum. A: SBP-H₂O₂-KI system with SBP 3U/mL, H₂O₂ 2 mmol/L, KI 0.3 mmol/L. B: Fe²⁺-H₂O₂ system with Fe²⁺ 0.2 mmol/L, H₂O₂ 2 mmol/L.

Fe²⁺-H₂O₂体系(Fenton反应体系),证实了Fe²⁺-H₂O₂体系能产生羟基自由基。结合表3结果,可以说明:检测到羟基自由基产生的Fe²⁺-H₂O₂体系,H₂O₂的杀菌力很弱;相反地,SBP-H₂O₂-KI体系中没有检测到羟基自由基的产生,却有极强的杀菌力。因此,推断羟基自由基不是SBP-H₂O₂-KI体系的主要杀菌因素。同理,SBP-H₂O₂-KI体系中也检测不到超氧阴离子的产生,因此,推断超氧阴离子也不是SBP-H₂O₂-KI体系的主要杀菌力。

依据化学比色法检测活性氧的实验结果,可以推断SBP-H₂O₂-KI抗菌体系中产生了单线态氧。此外,还检测到了SBP-H₂O₂-KI体系中有单质碘的产生。因此,推测碘以及碘氧化物、单线态氧,以及目前没有检测到的其它活性成分,可能是SBP-H₂O₂-KI体系的主要杀菌力所在。因为碘及其氧化性中间产物可以卤化菌体蛋白,产生沉淀,使微生物死亡;单线态氧等高活性氧化基团与羟基自由基类似,也能作用于微生物细胞壁,改变微生物的通透性,使微生物肿胀变形;也能氧化蛋白质和酶分子中的巯基基团,使蛋白质变性,酶的活性和代谢功能丧失;也能氧化核酸,破坏DNA和RNA等;多种机制共同作用最终导致微生物生长抑制或死亡^[19-23]。

3.2 SBP-H₂O₂-KI体系对不同细菌的杀菌强度有差异

表1结果显示SBP-H₂O₂-KI体系对不同细菌的杀菌强度有差异。但是,在实验条件下,对SBP-H₂O₂-KI体系具有不同敏感性的四组细菌中,每组菌中都包含革兰氏阳性菌和阴性菌。这说明细菌的细胞壁组分及结构不是影响SBP-H₂O₂-KI体系杀菌效力的重要因素。推测菌体表面的成分(如多糖的多寡,荚膜成分的有无,蜡质成分的存在与否,等)及通透性与其对SBP-H₂O₂-KI杀菌体系的敏感性有关。

3.3 细菌对SBP-H₂O₂-KI体系不产生抗性的原因

分析细菌对SBP-H₂O₂-KI体系不产生抗性的原因,首先在于该体系快速的杀菌能力。在几min或几十min之内将细菌全部或绝大部分杀死,使细菌失去了产生突变所需要的时间;即使极少数细胞存活,也会因为细菌群体达不到突变发生的活细胞数量而不会产生突变(或者说在很小的存活细菌群体中产生突变的概率极小)。其次,鉴于SBP-H₂O₂-KI体系的抑菌和杀菌作用涉及多种机制,因此作用靶点多,作用途径多,微生物难以同时产生针对多途径多靶点的突变;即使产生相应的突变,也可能因为这些突变涉及到细菌生长繁殖的某些必须功能基因而成为致死性突变,因此试验过程中不能分离得到抗性细菌。相反地,涉及单一靶点单一抑菌途径的抗生素(如新霉素)则容易产生抗性突变^[18,24]。

3.4 SBP-H₂O₂-KI是一种强杀菌体系

相对于H₂O₂,SBP-H₂O₂-KI是一种强杀菌体系,其杀菌力源于其分解产生的羟基自由基和活性氧等氧化性功能基团。作为消毒剂,常用3%-6%浓度;作为灭菌剂,常用10%-25%浓度溶液^[25]。市售分析纯的H₂O₂溶液(32.5%),经测定H₂O₂含量为9.57 mol/L,由此推算3%的H₂O₂溶液其H₂O₂含量约900 mmol/L。SBP-H₂O₂-KI体系中的H₂O₂含量常用1-10 mmol/L,在通常条件下没有任何抑菌或杀菌活性(数据略)。因此,相对于H₂O₂,SBP-H₂O₂-KI是一种强杀菌体系。碘是活性很强的元素,碘液中起杀菌作用的主要是碘元素本身。碘元素可直接卤化菌体蛋白质,产生沉淀,使微生物死亡。通常,皮肤及手术部位消毒用的碘酊中碘浓度为3%-5%^[26]。已知3%的碘液约为236 mmol/L,在SBP-H₂O₂-KI体系中,KI浓度一般

采用 0.1 – 3 mmol/L。因此,相对于碘类消毒剂,SBP-H₂O₂-KI 是一种强杀菌体系。相对于产羟基自由的 Fe²⁺-H₂O₂ 体系,SBP-H₂O₂-KI 更是一种强杀菌体系(表 3)。

3.5 SBP-H₂O₂-KI 杀菌体系的应用前景展望

本文试验结果显示,SBP-H₂O₂-KI 是一种强杀菌体系,在实验条件下细菌对 SBP-H₂O₂-KI 体系不产生抗性突变。这提示 SBP-H₂O₂-KI 杀菌体系在治疗表面创伤或其它局部感染的用药方面,以及用于医疗器械的消毒杀菌方面,都有极大应用价值。还可为解决严峻的细菌耐药性难题提供参考。

过氧化物酶-H₂O₂-KI 作为一种强杀菌体系,其强杀菌能力毋庸置疑。制约过氧化物酶-H₂O₂-KI 体系开发利用的关键在于过氧化物酶的来源和制备成本。目前,国内外仅有辣根过氧化物酶作为商品化制剂出售,其它的过氧化物酶,如乳过氧化物酶、髓过氧化物酶、嗜酸性粒细胞过氧化物酶以及唾液过氧化物酶等,都因为来源局限和制备成本过于昂贵而仅限于实验室制备和研究。本文采用的大豆过氧化物酶来源于豆皮,属工业下脚料,原料成本便宜,且来源丰富;加上基本的制备成本之后,仍然具备进入实际应用领域的可能。

参考文献

- [1] Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*, 2010, 467:83-86.
- [2] Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular cell*, 2010, 37 (3):311-320.
- [3] Torres JA, Villegas MV, Quinn JP. Current concepts in antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Expert review of anti-infective therapy*, 2007, 5(5):833-43.
- [4] 戴自英,翁心华. 合理使用抗菌药物. 内科急危重症杂志(*Journal of internal intensive medicine*), 2009, 5 (3):99-102.
- [5] 张小林,汪复. 抗菌药物对肠道大肠杆菌耐药性的影响. 中华传染病杂志(*Chinese journal of infectious diseases*), 1998, 16(1):52-56.
- [6] Nie G. Goal and task of integrated Chinese and Western medicine study on infectious disease. 中国中西医结合杂志(*Chinese journal of integrated traditional and western medicine*), 2006, 26(9):842-845.

- [7] Pinn G. Herbal medicine in infectious disease. *Australian family physician*, 2001, 30(7):681-4.
- [8] Zhang WC, Dai XH, Zhao Y, Lu XM, Gao PJ. Comparison of the different types of surfactants for the effect on activity and structure of soybean peroxidase. *Langmuir*, 2009, 25 (4), 2363-2368.
- [9] 张为灿,戴旭慧,赵越,高培基,卢雪梅. 十二烷基磺酸钠对大豆过氧化物酶活性和构象的影响. 化学学报(*Acta Chimica Sinica*), 2008, 66(6): 669-674.
- [10] 刘稳,李杨,段新源,高培基,卢雪梅. 改良的大豆种皮过氧化物酶纯化方法及酶的底物氧化特性研究. 山东大学学报(自然科学版) [*Journal of Shandong University (Natural science)*], 2001, 36(1):78-83.
- [11] 刘稳,方靖,高培基. 豆壳过氧化物酶的分离纯化及其性质研究. 中国生物化学与分子生物学报(*Chinese journal of biochemistry and molecular biology*), 1998, 14 (5):577-582.
- [12] Hogg BY, Jago G. The antibacterial action of lactoperoxidase. *Biochemical journal*, 1970, 117:779-790.
- [13] Klebanoff J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *Journal of bacteriology*, 1968, 95 (6):2131-2138.
- [14] Adak S, Mazumda A, Banerjee R. Low catalytic turnover of horseradish peroxidase in thiocyanate oxidation. *Biochemical journal*, 1997, 272(17):11049-11056.
- [15] Wang LS, Zhang HQ, Yong H, Gao PJ. Quantitative estimate of the cellulose components during degradation of cotton fibers. *Carbohydrate research*, 2004, 339:819-824.
- [16] Zhang HQ, Zhao Y, He XL, Gao PJ. A novel approach for assessing the susceptibility of Escherichia coli to antibiotics. *Science China(Section C)*, 2010, 53:1346-1355.
- [17] 金建玲,杨维强,张辉,高培基. 突变率计算中细菌群体生长不同步系数的修正. 微生物学通报(*Microbiology*), 2009,36(3):446-452.
- [18] 孟甄,金建玲,高培基. 细菌耐药性的诱导与消除. 中国药理学通报(*Chinese pharmacological bulletin*), 2003, 19(9):1047-1051.
- [19] Hippeli, S. & Elstner, E. F. OH-radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH-radical and peroxynitrite toxicity. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 1997, 52c: 555-563.

- [20] Spiegeller P, Sermon J, Vanoirbeek K, Aertsen A, Wichiels C. Role of porins in sensitivity of *Escherichia coli* to antibacterial activity of the lactoperoxidase enzyme system. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71(7):3512-3518.
- [21] Wright C, Bowie J, Gary G, Nelson R. Candidacidal activity of myeloperoxidase: Mechanisms of inhibitory influence of soluble cell wall mannan. *Infection and immunology*, 1983, 42(1):76-80.
- [22] Thomas E, Aune T. Oxidation of *Escherichia coli* sulfhydryl components by the peroxidase-hydrogen peroxide-iodide antimicrobial system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1978, 13(6):1006-1010.
- [23] Britigan B, Ratcliffe H, Buettner G, Rosen G. Binding of myeloperoxidase to bacteria: effect on hydroxyl radical formation and susceptibility to oxidant-mediated killing. *Biochimica et biophysica acta*, 1996, 1290:231-240.
- [24] 金建玲,高培基. 选择条件下细菌突变研究进展. 自然杂志 (*Nature magazine*), 2002, 25(5):319-323.
- [25] 薛广波. 实用消毒学. 北京:人民军医出版社, 1986.
- [26] 孙俊. 消毒技术与应用. 北京:化学工业出版社, 2003.

Bactericidal effect of soybean peroxidase-hydrogen peroxide-potassium iodide system

Jianling Jin, Weican Zhang*, Yu Li, Yue Zhao, Fei Wang, Peiji Gao*

State Key Laboratory of Microbial Technology, School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: [Objective] To study the bactericidal effect and the possible mechanisms of the three components system [soybean peroxidases (SBP)-hydrogen peroxide (H_2O_2)-potassium iodide (KI), SBP- H_2O_2 -KI]. [Methods] The inhibition and bactericidal effect of SBP- H_2O_2 -KI system to bacteria was detected by OD_{600} and the number of live bacteria (CFU). The sensitivity was tested by comparing the minimum inhibitory concentration (MIC) of bacterial cultures before and after cultured under sub-lethal dose of SBP- H_2O_2 -KI system. Oxidizing activity groups were detected with physical and chemical methods in order to explain the bactericidal mechanisms of SBP- H_2O_2 -KI system. [Results] SBP- H_2O_2 -KI ternary system had rapid and high efficient bactericidal effect to a variety of bacterial strains in just several minutes. The MICs had no significant changes when bacterial cultures continuously cultured in sub-lethal dose of SBP- H_2O_2 -KI system, and no resistance / tolerance mutant strains could be isolated from them. Both physical and chemical test results showed that no hydroxyl radical produced in SBP- H_2O_2 -KI reaction system, chemical test results showed that no superoxide anion but a singlet oxygen and iodine produced in SBP- H_2O_2 -KI reaction system. [Conclusion] These results suggested that singlet oxygen and iodine or the iodine intermediate state may possible be the main sterilization factors for SBP- H_2O_2 -KI system, and hydroxyl radical and superoxide anion not. In addition, the both characteristics of SBP- H_2O_2 -KI system: rapid and high efficient bactericidal effect, and bacteria difficultly resisting to it, indicated it would have a good potential application in medical and plant protection area.

Keywords: peroxidase, bactericidal mechanism, resistance, peroxidase- H_2O_2 -KI, bacteria

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81041089), and by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2009BM020, Y2007D35)

* Corresponding author. +86-531-88369495; Fax: +86-531-88565610; E-mail: weican@sdu.edu.cn, gaopj@sdu.edu.cn

Received: 20 October 2010 / Revised: 21 December 2010