

# 溶菌酶脂质体的制备及其对生物膜的剥离作用

徐 冉,王海峰,李风亭

(同济大学 污染控制与资源化研究国家重点实验室,上海 200092)

**摘要:** 采用逆向蒸发法制备了稳定的溶菌酶脂质体.在不锈钢表面培养出稳定生物膜后,分别利用溶菌酶和溶菌酶脂质体对其进行剥离.运用 Zeta 电位仪、扫描电子显微镜(SEM)和红外光谱(FT-IR)对脂质体和生物膜进行表征.结果表明制备的脂质体平均粒径为 80~100 nm,包封率为 82.4%.相同浓度下溶菌酶及其脂质体对混合菌种形成的生物膜剥离效率分别达到 62.4%和 86.5%.溶菌酶脂质体在 24 h 内对生物膜和水体中微生物去除率分别达到 89.6%和 99.6%.因此,溶菌酶脂质体能够有效控制不锈钢表面生物膜污染风险.

**关键词:** 脂质体;溶菌酶;生物膜剥离;微生物

**中图分类号:** X 172

**文献标识码:** A

## Lysozyme-liposome Synthesis and Its Capability in Biofilm Removal

XU Ran, WANG Haifeng, LI Fengting

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

**Abstract:** Stable lysozyme-liposomes were synthesized via reverse-phase evaporation. Lysozyme and its liposomes were separately used to remove the stable biofilms cultivated on stainless steel surface. The liposomes and biofilms were characterized by Zeta potential analyzer, transmission electron microscope (TEM), scanning electron microscope (SEM) and Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer. The experimental results show that the liposomes are of the average diameter of 80~100 nm and an average entrapment efficiency of 82.4%. Under the same concentration condition, free lysozyme and lysozyme-liposomes can effectively remove total biomass of the biofilm, which forms with a mixed bacterial consortium, up to 62.4 % and 86.5 %, respectively.

Lysozyme-liposome reduces bacterial in biofilm and solutions by 89.6% and 99.6%, respectively, in 24 hours. Therefore, lysozyme-liposome can effectively control the biofilm pollution on the stainless steel surface.

**Key words:** liposome; lysozyme; biofilm removal; microorganism

溶菌酶(lysozyme)是一种广泛作用于微生物细胞壁的水解酶,对各种微生物、真菌、病毒有很强的杀灭作用,并能够有效破坏微生物形成的致密生物膜结构<sup>[1]</sup>.影响溶菌酶效率的主要因素是渗透过程.由于溶菌酶很难进入生物膜内部从而限制了其在管道生物膜剥离中的应用<sup>[2]</sup>.脂质体(liposomes)具有磷脂分子构成的双分子结构,利用脂质体作为药物载体不仅具有缓释作用,增强药物的靶向性,同时利用脂质体的亲脂功能,运载药物穿透生物膜的胞外聚合物(EPS)到达生物膜内部,有效杀灭生物膜内微生物并剥离生物膜<sup>[3]</sup>. Vamvakaki 等人利用乙酰胆碱酯酶,证实了酶通过包埋后比自由酶有更高的活性与稳定性<sup>[4]</sup>.目前国内外对超细稳定型溶菌酶脂质体合成及其对混合菌种生物膜的剥离研究相对较少.

针对日益严重的生物膜污染导致的管道微生物腐蚀、管道水头损失、饮用水微生物安全等问题,脂质体包埋药物技术成为解决管道污染问题的重要途径<sup>[5]</sup>.溶菌酶作为管道生物膜控制的绿色试剂,具有低毒、高效、广谱等特性,可应用于饮用水系统中.文中利用逆向蒸发技术,优化合成参数,合成高效稳定的超细溶菌酶脂质体,使用 Zeta 电位/TEM/SEM 对脂质体性质进行表征.选择混合微生物作为生物膜来源,304 号不锈钢片作为生物膜构建载体,利用

收稿日期: 2009-10-19

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2009BAC62B00, 2009BAC62B03);高等学校博士学科点专项科研基金(200802471044);中国与乌克兰政府间科技合作项目(CU08-20);科技部国际科技合作项目(2009DFA90740)

第一作者: 徐 冉(1973—),女,副教授,工学博士,主要研究方向为环境友好型水处理制剂等. E-mail: carol.xuran@tongji.edu.cn

SEM 和 FT-IR 图像,研究溶菌酶脂质体与自由溶菌酶对生物膜的剥离作用及机理.

## 1 方法与材料

### 1.1 实验仪器与药品

脂质体合成选择逆向旋转蒸发法. 旋转蒸发仪(上海豫康科教仪器), 转速  $135 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 循环水式真空泵(SHB-III, 郑州长城), 循环水为冰水浴; UV-1700 岛津紫外分光光度计, 日本; 场发射扫描电镜(SEM, Hitachi); Zetasizer Nano Z 型 Zeta 电位分析仪(英国马尔文); KQ218 超声清洗器(50 Hz, 江苏昆山超声仪器设备厂); 傅里叶红外转换光谱(FT-IR, Nicolet, 570, USA).

大豆卵磷脂、胆固醇、溶菌酶、DNA 标准物质(D-核糖)均为生化级, 上海国药集团有限公司; 其他试剂均为分析纯.

### 1.2 溶菌酶脂质体的制备

以脂质体包封率和粒径分布为控制指标, 优化控制合成过程如下: 精密称取 1.2 g 大豆卵磷脂和 0.6 g 胆固醇, 溶于 10 mL 氯仿和 15 mL 乙醚混合溶剂中, 加入 8 mL 质量浓度为  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶菌酶磷酸盐缓冲溶液(以下简称 PBS 溶液,  $\text{pH} = 6.8$ , 过滤去除悬浮物), 水浴超声处理使之形成稳定的水/油型乳化液, 然后在 0.04 MPa,  $37 \sim 38 \text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下旋转蒸发 24 h 去除有机溶剂. 茄形旋转蒸发瓶内加入 60 mL PBS 溶液( $\text{pH} = 6.8$ )继续旋转 6~9 h, 得到淡黄色脂质体混悬液. 使用经过 PBS 溶液( $\text{pH} = 6.8$ )浸泡后的微孔滤膜(粒径为  $0.8 \mu\text{m}$ )过滤去除大颗粒杂质后, 放置于冰箱中  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用.

### 1.3 溶菌酶脂质体的性质表征

利用溶菌酶在紫外波长下的特征吸收峰(293.8 nm)测定溶菌酶浓度. 取 4 mL 1.2 节中制备的样品使用经过 PBS 溶液( $\text{pH} = 6.8$ )浸泡的透析带进行透析, 在摇床中转速为  $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 温度为  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下, 每 12 h 换一次外液, 透析时间为 36 h, 将所有混合外液使用  $0.18 \mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤, 计算透析外液中未包埋的溶菌酶量, 从而求出溶菌酶脂质体的包封率.

### 1.4 生物膜的培养、表征与处理

#### 1.4.1 生物膜培养

采用某污水处理厂二沉池出水作为微生物来源, 去除悬浮性颗粒物, 补充葡萄糖为碳源, 铵盐为氮源, 磷酸二氢钾为磷源, 控制  $w(\text{C}) : w(\text{N}) : w(\text{P}) =$

$100 : 5 : 1$ , 氨氮质量浓度维持在  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每天监测. 营养盐中还补充相关微量元素, 质量浓度为: 硫酸亚铁  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 碘化钾  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 硫酸镁  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 硫酸锰  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 主要菌种为链球菌和杆菌, 培养条件为  $(20 \pm 3) \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}$  为 6.86. 生物膜形成于表面积为  $1 \text{ cm}^2$ , 厚度为 0.75 mm 的 304 号不锈钢表面. 挂膜反应器为改进圆形反应器(ARs), 生物膜的生长周期为 7 d, 以得到机械强度相对稳定的生物膜. 304 号不锈钢主要物质质量分数为:  $w(\text{C}) \leq 0.05\%$ ,  $w(\text{Si}) \leq 1.00\%$ ,  $w(\text{P}, \text{S}) \leq 0.07\%$ ,  $w(\text{Ni})$  为  $8.0\% \sim 9.0\%$ ,  $w(\text{Cr})$  为  $18.0\% \sim 19.0\%$ .

#### 1.4.2 生物量、微生物测定

不锈钢载体表面形成的生物膜通过(10 min)超声清洗之后, 放入 20 mL 的平底玻璃瓶中待测 RNA 含量, RNA 含量使用改进地衣酚测定法测量, 微生物总数测量采用平板微生物计数法, 使用改性 R2A 培养基<sup>[6]</sup>.

#### 1.4.3 生物膜剥离

稳定后第 7 d 的生物膜, 使用蒸馏水震荡清洗两次后, 置于含有剥离剂的平底玻璃瓶中振荡 24 h, 温度  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 转速为  $125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ . 分别测量水体中与不锈钢表面的生物量. 生物膜的剥离效率表达式为: 生物膜剥离率  $C_a = C_{\text{rem}} / (C_{\text{rem}} + C_{\text{res}}) \times 100\%$ , 其中  $C_{\text{rem}}$  为剥离后水体中的生物量(以 RNA 含量表示);  $C_{\text{res}}$  为剥离后不锈钢载体表面剩余的生物量(以 RNA 含量表示).

#### 1.4.4 生物膜样品预处理

红外样品使用真空干燥箱烘干后进行压片处理. SEM 样品经过戊二醛(质量浓度: 2.5%)固定 60 min 后, 使用 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 的乙醇逐级脱水, 脱水时间为 20~30 min, 经乙醇脱水后样品使用乙醇-醋酸异戊酯(体积比为 1:1)进行置换 30 min, 最后使用醋酸异戊酯(质量分数为 100%)置换 30 min, 样品在常温( $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )下使用真空干燥箱进行干燥, 干燥时间为 12 h, 处理后样品使用电镜进行观察.

### 1.5 数据分析

实验数据采用 Origin 软件(版本 7.5)进行数据处理, 数据测量 3 次取平均值. 在 95% 的置信度区间内, 数据标准偏差不超过 4%.

## 2 结果与讨论

实验制备的溶菌酶脂质体的平均粒径在  $80 \sim$

100 nm 之间,最佳包封率为 82.4%。脂质体乳液置于冰箱中保存 40 d 后形态没有发生变化,没有分层现象出现,无肉眼可见的沉积物和团聚物体,颜色没有发生变化。

### 2.1 水浴超声对溶菌酶脂质体 Zeta 电位的影响

由图 1 可知,经过超声处理后的溶菌酶脂质体 Zeta 电位略有下降,但下降趋势非常轻微,说明脂质体未发生团聚现象;当超声时间超过 120 s 时,溶菌酶脂质体 Zeta 电位不再下降,说明无需后续分散超声处理,溶菌酶脂质体也能分散比较完整。整个超声处理过程中 Zeta 电位变化率小于 5%,说明本实验合成的脂质体具有比较好的均匀分散度。

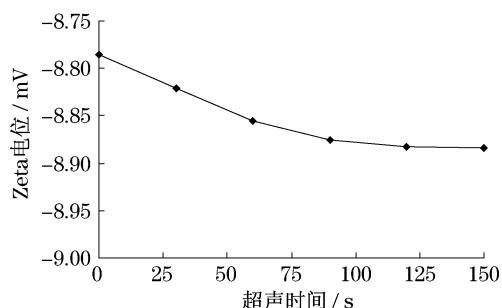


图 1 不同超声时间对 Zeta 电位的影响

Fig.1 Influence of different ultrasonic time on Zeta potential

### 2.2 溶菌酶脂质体与溶菌酶对生物膜的杀灭剥离作用

由图 2 可知,本实验培养的生物膜具有很高的稳定性,24 h 内仅仅有 12.5% 的生物量通过机械震荡而受到剥离(空白样品)。溶菌酶及其脂质体对生物膜的最佳剥离效率分别为 62.4% 和 86.5%。溶菌酶脂质体展现了比溶菌酶单独作用更为优越的生物膜剥离效率,这是因为溶菌酶脂质体比自由溶菌酶稳定,能够在长时间范围内保持酶的活性,并通过缓释作用控制溶菌酶的有效浓度,避免酶活性丧失后的微生物再恢复问题<sup>[7]</sup>,从而有效杀灭生物膜中的微生物并破坏生物膜稳定的三维结构。由于生物膜中还存在溶菌酶难以作用的其他糖类物质,溶菌酶效率不能够无限制提升,但溶菌酶脂质体剥离效率明显高于先前文献<sup>[8-9]</sup>。生物膜中的微生物受胞外物质(多聚糖、蛋白质)等包裹,具有较强的抗药剂能力,亦受固-液界面的扩散限制,生物膜中溶菌酶有效浓度低于体外溶菌酶的浓度,因此溶菌酶对生物膜中微生物的杀灭效率低于对溶液中微生物的杀灭效率。经检测,溶菌酶脂质体对生物膜中微生物去除率达到 89.6%,而单独使用溶菌酶时仅为 67.6%。因此,使用溶菌酶脂质体能够有效

抑制微生物的“再恢复”问题。溶菌酶脂质体对溶液中微生物具有 99.6% 的去除效率,而自由溶菌酶对水体中微生物只有 84.6% 的去除效率,体现了溶菌酶脂质体释放酶活性的长效性,能够实现对流体和管壁中微生物的协同控制。

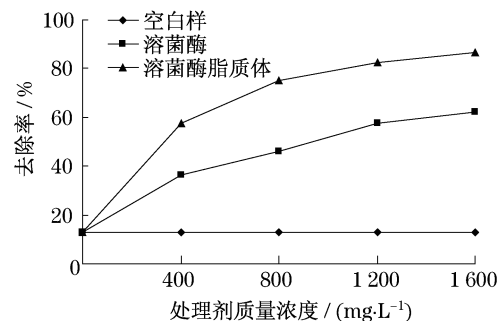


图 2 溶菌酶脂质体和溶菌酶对生物膜的杀灭剥离作用

Fig.2 Detachment of biofilm by lysozyme-liposome and free lysozyme

### 2.3 溶菌酶脂质体与溶菌酶剥离生物膜的 SEM 照片

图 3 为 7 d 时不锈钢表面的电镜照片,图片显示微生物膜非常致密,具有空间三维结构。Yang 等的研究表明不同厚度的生物膜并不受流体流动、传质影响<sup>[10]</sup>,微生物能够在生物膜中形成完善的团簇结构,并且能通过“群体效应”来协调它们的活动,从而有效地维持生物膜活性。

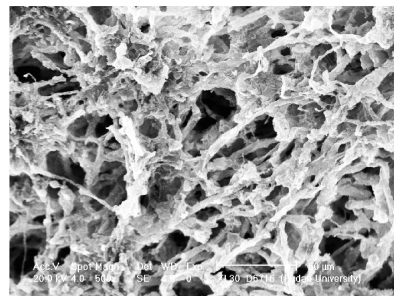
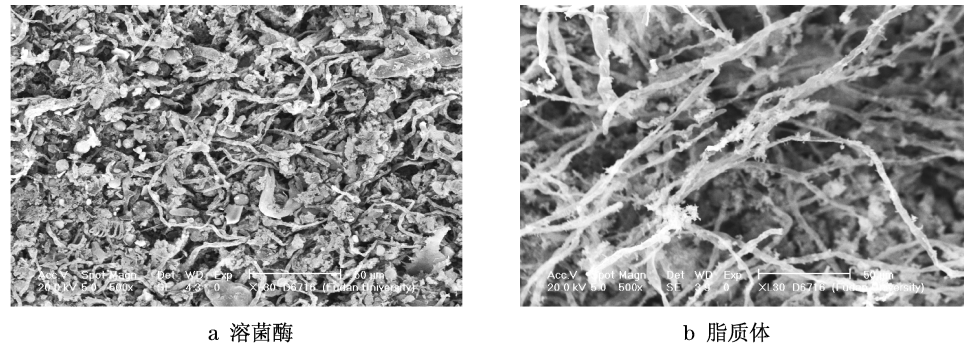


图 3 304 号不锈钢表面成熟生物膜的形态(×500)

Fig.3 Morphology of mature biofilm on 304 stainless steel(×500 magnitude)

由图 4 可知,自由溶菌酶处理后生物膜形貌受到破坏,但依然紧密地附着在钢片表面,膜表面形貌轻微改变。自由溶菌酶能够有效溶解生物膜中的有机物,并改变细胞壁的结构,却不能有效剥离生物膜。由图 4b 可见,表层生物膜受到巨大的破坏,显示了酶活性对深层微生物的杀灭作用,这可能是因为溶菌酶脂质体能够通过自身具有的亲脂性基团渗透至生物膜内部<sup>[11]</sup>,并溶解生物膜表面的有机质,促进了溶菌酶的传质渗透能力。

图4 处理后生物膜的形态学图( $\times 500$ )Fig.4 Morphology images of biofilm after treatment( $\times 500$ )

#### 2.4 溶菌酶剥离生物膜 FT-IR 分析

使用红外图谱探讨经过溶菌酶处理后的生物膜基团变化.图 5a 中与生物膜组成有关的基团包括:脂磷( $2\,950\text{ cm}^{-1}$ ),蛋白质( $1\,630\text{ cm}^{-1}$ ),含羧基的对称性物质( $1\,380\text{ cm}^{-1}$ ),多聚糖类、核酸物质( $900\sim 1\,150\text{ cm}^{-1}$ ),这些生物活性物质都是生物膜的主要组成部分<sup>[12]</sup>.经过溶菌酶处理后,多聚糖、核酸类物质峰几乎不存在,这类胞外聚合物的主要组成部分得到有效分解,由于核酸表示生物膜内部的活体细胞类物质,所以核酸类吸收峰削减,表明溶菌酶能够穿透至生物膜内部,有效杀灭微生物.蛋白质峰增强以及新出现的峰( $1\,540\text{ cm}^{-1}$ )主要由残留的

溶菌酶导致, $1\,230\text{ cm}^{-1}$ 处表示有磷酸盐生成,这可能是溶菌酶杀灭微生物后,脂磷分解生成无机磷酸盐导致.FT-IR 图谱表明溶菌酶能够有效剥离生物膜并杀灭生物膜中有机物.

### 3 结论

(1) 采用逆向旋转蒸发法,可以制备超细稳定型溶菌酶脂质体,包封率达到 82.4%. 平均粒径在 80~100 nm 之间,粒径分布不受超声水浴的影响.

(2) 溶菌酶能够有效去除核酸、多聚糖类物质并有效杀灭微生物.与溶菌酶溶液相比,溶菌酶脂质体在生物膜剥离过程中展现了一定的优势,最佳去除效率达到 86.5%,对水体中微生物具有三个级数的去除效率,有效控制了生物膜及水体中微生物的“再恢复”作用.

(3) 利用溶菌酶脂质体剥离生物膜为管道生物膜控制提供了新的处理思路,通过后续溶菌酶剥离机理的研究并辅以其他剥离剂的包埋,为管道生物膜控制提供了应用前景.

#### 参考文献:

- [1] Samaranayake Y H, Cheung B P K, Parahitiyawa N, et al. Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces[J]. Arch Oral Biol, 2009, 54(2): 115.
- [2] Frank K L, Patel R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species[J]. Diagn Microb Infec Dis, 2006, 57(4): 355.
- [3] Zhang L G, Hu J C, Lu Z H, et al. Preparation of liposomes with a controlled assembly procedure[J]. J Colloid Inter Sci, 1997, 190(1): 76.

(下转第 120 页)

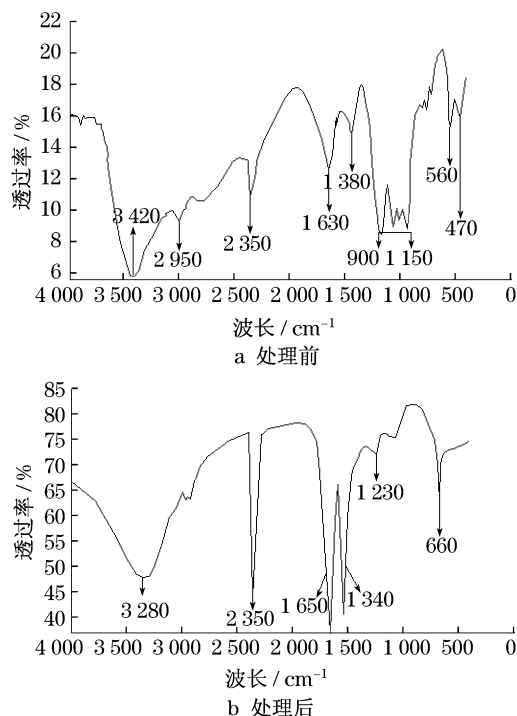


图5 溶菌酶处理前后生物膜的 FT-IR 分析

Fig.5 FT-IR analysis of biofilm before and after lysozyme treatment