

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計 畫 \*  
\* : 中草藥抑制 Malassezia 菌 lipase 之研究 \*  
\* 名 稱 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 譚恩琪  
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-032-B  
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月  
指導教授： 賴雯玲

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 99年04月02日

## 一、摘要

*Malassezia* 為一種親脂性酵母菌，在人或犬貓的皮膚角質層或毛囊為正常菌株，通常分布於油脂分泌旺盛的部位。

*Malassezia* 常被視為一些皮膚病的條件致病性真菌，例如頭皮屑、汗斑、脂漏性皮膚炎與某些異位性皮膚炎等。由於 *Malassezia* 為親脂性酵母菌，因此 lipase 是此菌種賴以維生的重要外泌型酵素，且 lipase 作用之後的產物被認為是一種過敏原，此種過敏原可能是引起宿主皮膚產生病變的原因之一，因此認為抑制此菌種的 lipase 將有助於改善相關疾病症狀。本研究目的即在於測試中草藥對病原菌 *Malassezia* 的抑菌作用與對 lipase 之抑制效果。

本實驗利用敏感性試驗，篩選中草藥的精油對 *Malassezia* 的抑菌效果，分析效果最顯著的精油的組成成分，並確認其主成分 -citral，在 250 mg/ml 的確有明顯的抑菌作用。另一方面建立 lipase 抑制物活性篩選平台，利用 *M. globosa* 的菌體 lipase 粗萃取液，在 1 mM pNPP 受質下的微量分析方法，有最佳判讀依據，同時分析 citral 對 lipase 活性之影響，發現對 lipase 活性的抑制效果遠不及抑菌作用，顯示 citral 有其他的抑制機制，有待進一步釐清。

## 二、背景介紹

中草藥富含許多活性成分，近年來應用於天然保養品中佔有廣大的消費市場，在本草綱目記載中也不乏許多天然植物可作為治療皮膚病，防止皮膚龜裂、紫外線傷害、增強皮膚健康、預防色素沈澱、皺紋產生以及美白的效果等。

*Malassezia* 菌屬是唯一在正常人體表皮共生的親脂性酵母

菌(2)，其lipase之作用產物被認為可引起多種的皮膚病變，如汗斑(pityriasis versicolor)、毛囊炎(folliculitis)、異位性皮膚炎(atopic dermatitis)、脂漏性皮膚炎(seborrhoeic dermatitis)、頭皮屑(dandruff)、乾癬(psoriasis)等。若污染人工導管，亦會導致系統性的疾病，產生腹膜炎或菌血症；同時也會造成許多寵物的皮膚炎。(1, 3)

在*Malassezia* 菌屬中，只有*M. pachydermatis*不需外來油脂才能生長(4)，這種油脂依賴性乃是菌體無法合成myristic acid，而導致無法和成長鏈脂肪酸。因此參與油脂代謝的酵素對於*Malassezia* 菌之生長與致病力是必須的，所以此類酵素可視為是*Malassezia*菌重要致病因子(virulence factors)(5)。

Lipases (EC 3.1.1.3) 可水解三酸甘油酯的酯鍵，而釋出游離的脂肪酸，而*Malassezia* 菌屬需要外來的油脂才能存活，所以lipase的活性是這類微生物存活的關鍵，目前有*M. furfur* (6)以及*M. pachydermatis* (7)的lipase 基因被選殖出來。為了利用外來的油脂，*Malassezia* 菌屬的基因組中含有高量的分泌型的lipases (有13 種) 與 phospholipases (有9 種)基因存在；從RT-PCR 與proteomics 的實驗結果發現，在頭皮上有數種lipase與phospholipase 基因之表現(8)。因此我們針對*Malassezia* 菌種賴以維生的重要酵素作抑制測試，從中草藥精油中篩選可能抑制lipase 的活性物質，了解其對病原菌*Malassezia* 的抑菌作用與對lipase 之抑制效果。

### 三、實驗方法

#### 1. 敏感性試驗(Susceptibility testing)

*Malassezia* 菌種於30 °C，modified Dixon agar (含1.0% Tween 40, 0.2% glycerol, 2.0 % desiccated oxbile 0.6% peptone, 0.2% oleic acid, 3.6 % malt extract broth and 1.2% bacto agar)上培養。

取單一菌落培養於30°C，modified Dixon broth中48hr，以DMSO稀釋各種中草藥精油，將菌液1/100稀釋後，再加入1/100反應體積的各種中草藥精油，使精油最終稀釋1000倍，DMSO最終稀釋100倍，並培養於96 well盤中48hr後，取50  $\mu$ l培養於modified Dixon agar上，30°C培養48hr。

## 2. Lipase酵素活性測定法

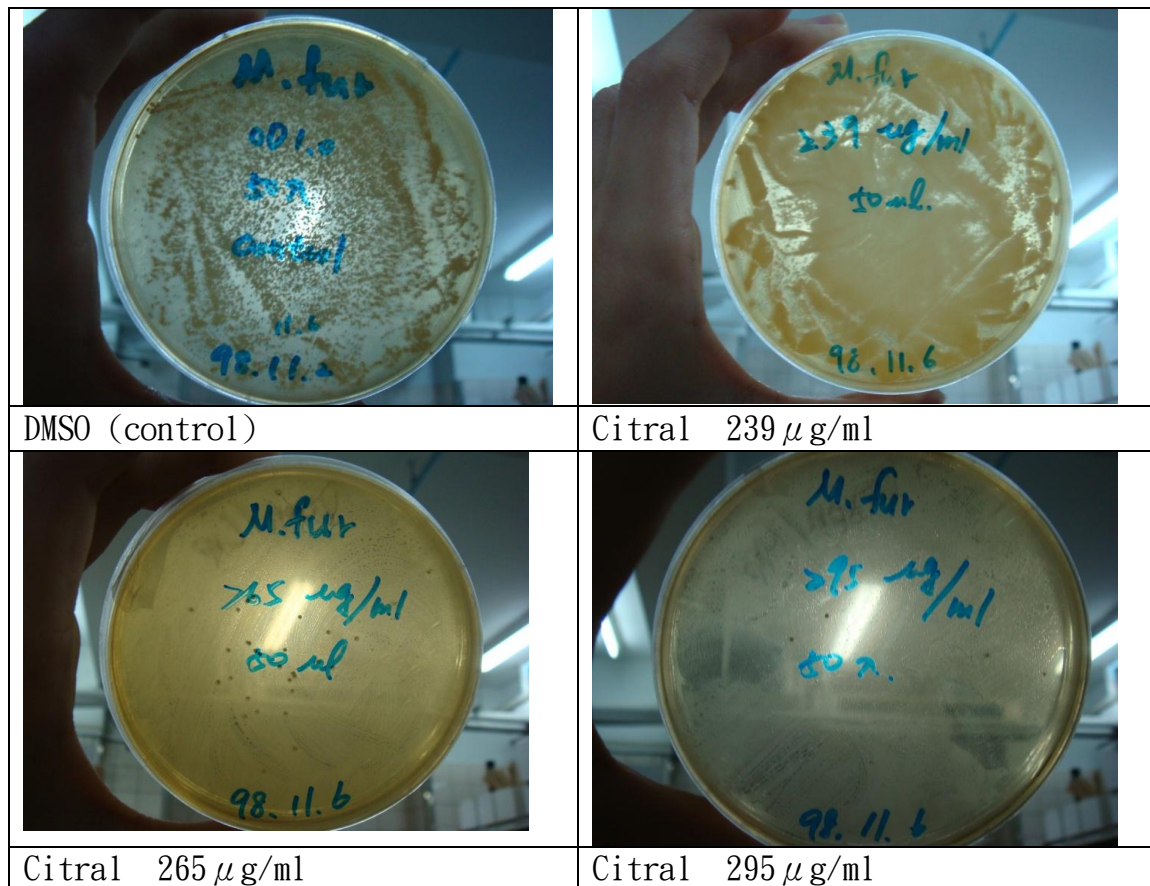
以p-nitrophenyl palmitate (pNPP)法測定lipase酵素之活性，於37°C進行反應，並以分光光度計監測405 nm波長之吸光變化。將菌種於modified Dixon broth培養，離心分別收集菌體與上清液。取菌體與3 ml緩衝液(MES 10mM, 1% Triton X-100; pH 5.5)使之破菌，取上清液即為酵素粗萃取液。取適當濃度之酵素粗萃取液，加入不同濃度的篩選物後，與100  $\mu$ l反應緩衝液(MES 10mM, 1% Triton X-100, 2 mM pNPP; pH 5.5)混合，於37°C反應1小時，測量405 nm波長之吸光變化。

## 四、實驗結果

### 1. 抑菌作用

藉由敏感性試驗，經過多種精油的篩選之後，發現精油中有一種較為明顯，進而分析其主成分為citral，因此進一步分析

citral對*M. furfur*的抑菌作用。結果顯示citral大概在239  $\mu\text{g/ml}$ 與265  $\mu\text{g/ml}$ 濃度間有明顯的抑菌作用（圖一），藉此推測其最低抑菌濃度約為250  $\mu\text{g/ml}$ ，且citral對*M. furfur*的抑菌與殺菌濃度範圍似乎相當狹窄，在295  $\mu\text{g/ml}$ 時可見到菌落所剩無幾。

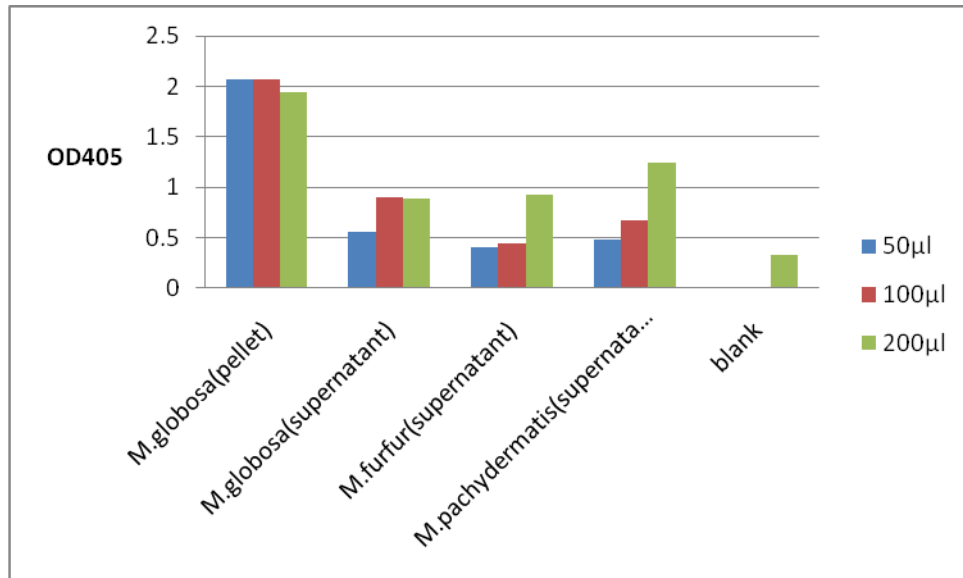


圖一、citral對*M. furfur*的抑菌作用。

## 2. *Malassezia* lipase抑制物活性篩選

為建立*Malassezia* lipase活性測試平台，乃先選擇*M. globosa*、*M. furfur*與*M. pachydermatis*測試其lipase活性；*Malassezia*培養於modified Dixon broth至混濁後（5-10天），分別收下菌體(pellet)與上清液(supernatant)，以2 mM之pNpp進行活性測試，結果以*M. globosa*的菌體lipase活性最容易偵測（圖二），考量到實驗準備難易度，因此決定利用*M. globosa*的菌體

lipase進行抑制物活性篩選。

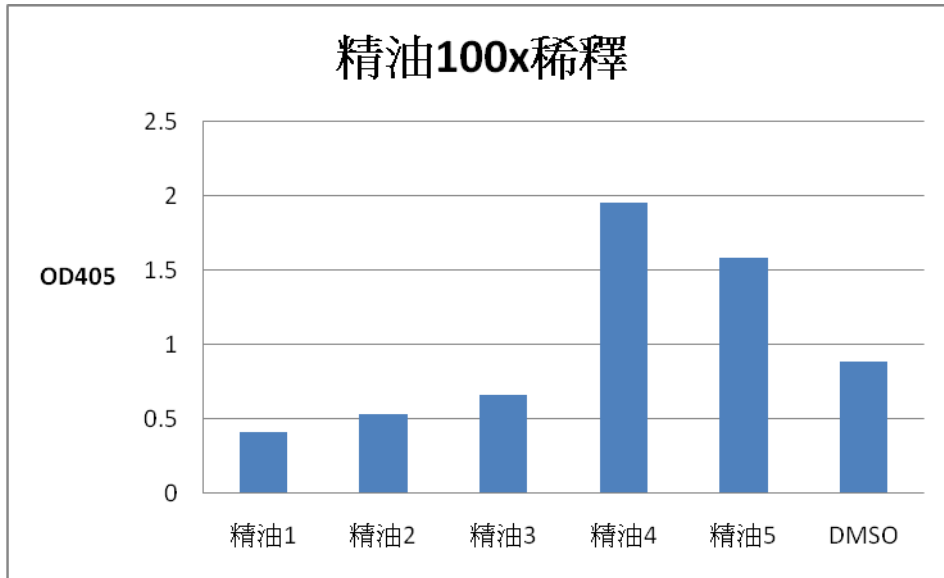


圖二、各菌株lipase活性測試。以2 mM pNPP，加入不同量的粗萃取酵素液(50 μl, 100 μl, 200 μl)進行活性測試。Blank未加酵素粗萃取液，以作為濁度對照組。

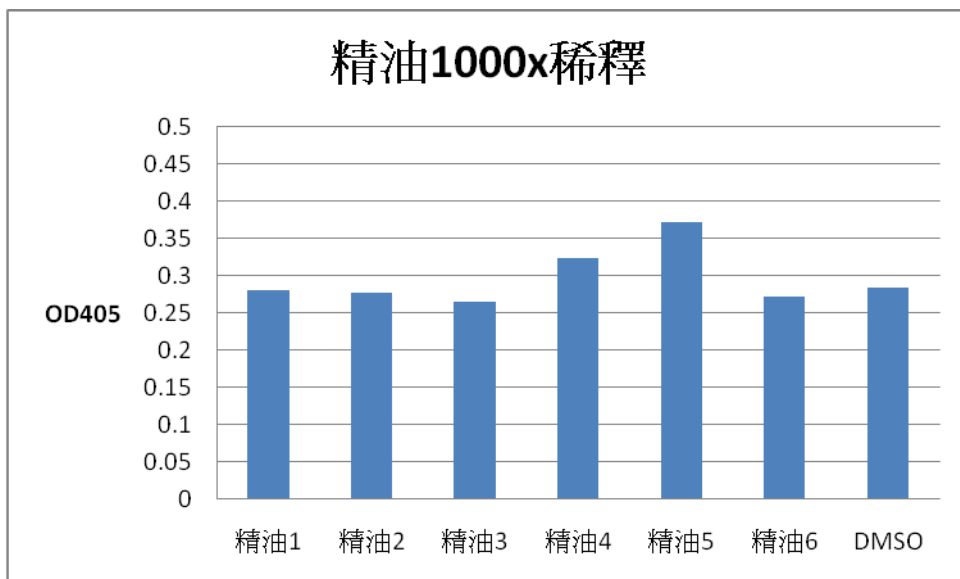
為建立*Malassezia* lipase抑制物活性篩選平台，首先以2 mM pNPP進行活性篩選，篩選物為各種精油，發現加入1/100反應體積的精油後，整個反應液呈現混濁現象，而干擾吸光值的偵測，推測酵素受質-pNPP與精油皆為疏水性物質，雖然反應緩衝液中含有1% Triton X-100，但溶解度仍低，因此降低酵素受質-pNPP的濃度，改以1 mM pNPP進行lipase抑制物活性篩選，結果發現精油1-3對lipase活性，似乎有一點抑制效果（圖二）。雖然溶解度問題有所改善，但發現許多精油帶有顏色，在最終稀釋濃度為100倍下，仍有明顯的顏色會干擾吸光值判讀，因此進一步再降低精油的濃度，重新篩選。

先將精油利用DMSO稀釋10倍，再加入1/100反應體積的精油，使精油最終稀釋濃度為1000倍，而DMSO最終稀釋濃度為100

倍。在此情況下，認為精油顏色的吸光干擾有變小的現象(圖三)，因此以此為篩選平台，進行後續的lipase抑制物活性分析。



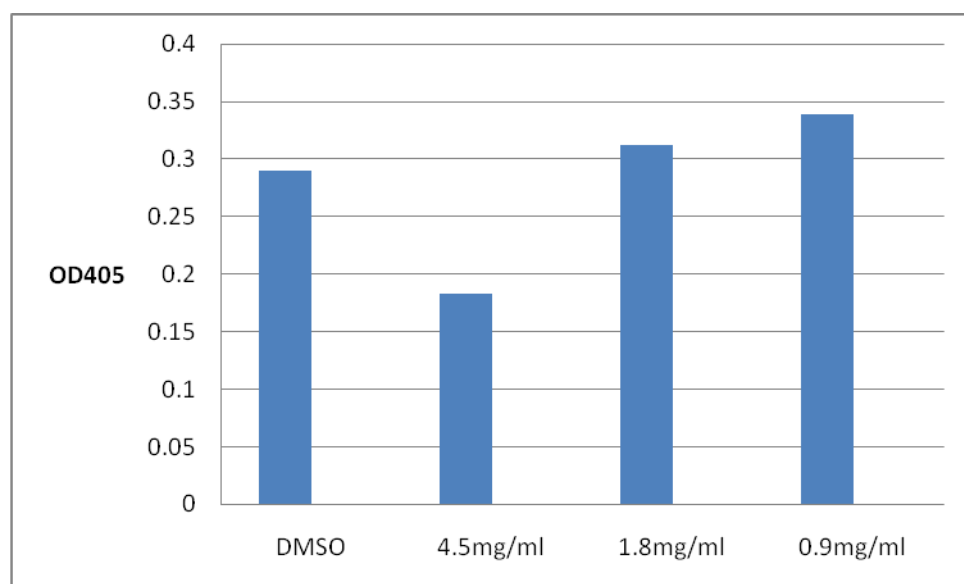
圖三、lipase抑制物活性篩選。以1 mM pNPP，50  $\mu$ l酵素粗萃取液，分別加入各種精油，使最終稀釋100x。



圖四、lipase抑制物活性篩選。以1 mM pNPP，50  $\mu$ l酵素粗萃取液，分別加入各種精油，使最終稀釋1000x。

### 3. Citral對lipase活性之影響

藉由敏感性試驗篩選，發現Citral對*M. furfur*有明顯的抑菌效果，因此進一步分析其對lipase活性之影響；結果發現，當Citral的濃度提高至4.5 mg/ml時，對於lipase的確有抑制作用(圖四)。



圖五、Citral對lipase活性之影響。以1 mM pNPP，50  $\mu$ l酵素粗萃取液，加入不同濃度citral

## 五、討論

由於*Malassezia* 菌屬的生長速度不一，因此本研究中主要以*Malassezia furfur* 及*Malassezia globosa*為主要的研究菌株。在本次研究中，篩選出中草藥之精油內有一活性物質，即為Citral，對於*Malassezia* 菌屬有抑菌的效果，在較高濃度下，對於lipase也有抑制其活性的效果，但citral對lipase活性的抑制效果遠不及抑菌作用，顯示citral有其他的抑制機制，有待進一步釐清。*Malassezia* 菌屬對於Citral有一定的感受性，可作為之後的研究方向，了解Citral對*Malassezia* 菌屬的抑菌機制為何，進而瞭解



*Malassezia* 菌屬的致病機制，希望可以作為治療此類皮膚病變的新途徑。

## 六、參考資料

1. **M. J. CRESPO,\* M. L. ABARCA, AND F. J. CABANES.**1999, Isolation of *Malassezia furfur* from a Cat,JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,, p. 1573–1574
2. **Ashbee, H. R., and E. G. Evans.** 2002. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clin Microbiol Rev **15**:21-57.
3. **Gupta, A. K., R. Batra, R. Bluhm, T. Boekhout, and T. L. Dawson, Jr.** 2004. Skin diseases associated with *Malassezia* species. J Am Acad Dermatol **51**:785-98.
4. **Guillot, J., S. Hadina, and E. Gueho.** 2008. The genus *Malassezia*: old facts and new concepts. Parasitologia **50**:77-9.
5. **Batra, R., T. Boekhout, E. Gueho, F. J. Cabanes, T. L. Dawson, Jr., and A. K. Gupta.** 2005. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. FEMS Yeast Res **5**:1101-13.
6. **Brunke, S., and B. Hube.** 2006. MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. Microbiology **152**:547-54.
7. **Shibata, N., N. Okanuma, K. Hirai, K. Arikawa, M. Kimura, and Y. Okawa.** 2006. Isolation, characterization and molecular cloning of a lipolytic enzyme secreted from *Malassezia pachydermatis*. FEMS Microbiol Lett **256**:137-44.
8. **Dawson, T. L., Jr.** 2007. *Malassezia globosa* and *restricta*: breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis. J Investig Dermatol Symp Proc **12**:15-9.