

文章编号: 1004 - 7271(2001)04 - 0380 - 03

·研究简报·

## 不同脱乙酰度壳聚糖的抑菌性

### The antibiotic activities of chitosan with different deacetyl degrees

王 鸿, 沈月新

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

WANG Hong, SHEN Yue-xin

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 壳聚糖; 抑菌性; 脱乙酰度

Key words: chitosan; antibiotic activity; deacetyl degree

中图分类号: S986.2 文献标识码: A

甲壳素又称无水-N-乙酰基-D-氨基葡萄糖缩聚体,许多乙酰胺葡萄糖单体通过1,4糖苷键连接在一起。甲壳素经浓碱液处理后,分子中乙酰胺基会部分水解脱除,当分子中半数以上的乙酰基脱除便成为壳聚糖。由于甲壳素单体C<sub>2</sub>位上乙酰胺基取代了羟基,它不溶于稀酸稀碱和有机溶剂,其性质类似纤维素。当半数以上的乙酰基被脱除就可以在酸中溶解<sup>[1]</sup>。当壳聚糖溶解在酸性溶液中,单体分子上的游离胺基(-NH<sub>2</sub>)质子化而带正电(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)变成阳离子聚合物,能吸附一些带负电荷的物质。基于此,人们对壳聚糖的抑菌机理有着不同的解释,也研究了不同的分子量壳聚糖的抑制效果,但对不同脱乙酰度壳聚糖的抑菌性研究甚少。夏文水等<sup>[2]</sup>曾对分子量较小的甲壳低聚糖(M<sub>r</sub> = 1500)其脱乙酰度与抑菌率的关系作过研究。本实验就分子量较大的壳聚糖(9.3 × 10<sup>5</sup> ~ 9.8 × 10<sup>5</sup>)中三种不同脱乙酰度的抑菌性进行研究,以有助于壳聚糖机理的探讨,更好地为壳聚糖应用于水产品、果蔬等食品的防腐、保鲜提供理论依据。

## 1 材料与方 法

壳聚糖: M<sub>r</sub> = 9.83 × 10<sup>5</sup>, D. D = 81.8%; M<sub>r</sub> = 9.64 × 10<sup>5</sup>, D. D = 78.4%; M<sub>r</sub> = 9.26 × 10<sup>5</sup>, D. D = 61.3%。由浙江省玉环县天宝壳聚糖有限公司提供。

菌种: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由上海水产大学渔业学院微生物教研室提供。

液体蛋白胨培养基: 中国医药(集团)上海化学试剂公司生产。

壳聚糖分子量的测定: 采用乌氏粘度剂稀释法,参考文献[3]。三种壳聚糖的分子量分别为 M<sub>r</sub> = 9.83 × 10<sup>5</sup>, M<sub>r</sub> = 9.64 × 10<sup>5</sup>, M<sub>r</sub> = 9.26 × 10<sup>5</sup>。

脱乙酰度的测定: 采用碱量法测定壳聚糖的胺基含量,据文献[4]。三种壳聚糖的脱乙酰度分别为 81.8%, 78.4%, 61.3%。

菌种母液的制备: 参考文献[5]。在无菌条件下,挑取一环经斜面复壮的 *E. coli*、*St. aureus* 菌种分

收稿日期: 2001-05-21

作者简介: 王 鸿(1970-),女,新疆石河子人,本校1999级研究生,专业方向为食品冷冻科学。

别放到经事先灭菌的 100mL 蛋白胨液体培养基中,置于电热培养箱中,30℃培养 24h 后供接种<sup>[6]</sup>,即为菌种母液。接种前用显微镜计数法测定每 mL 菌种母液所含菌体的个数,用以换算成接种量。

含不同脱乙酰度壳聚糖培养基的配制:分别称取不同脱乙酰度的壳聚糖各 0.1g,将三种壳聚糖均溶解在 50mL、0.2NHAC - NaCl 溶液中制成浓度为 0.2% 的壳聚糖溶液,然后将壳聚糖溶液与液体蛋白胨培养基混合,用 40% 的 NaOH 调溶液的 pH 值为 6.0,即成为含不同脱乙酰度的壳聚糖样品 A( $M_r = 9.26 \times 10^5$ , D.D=61.3%)、B( $M_r = 9.64 \times 10^5$ , D.D = 78.4%)、C( $M_r = 9.83 \times 10^5$ , D.D = 81.8%) 的液态培养基。对照样品为等量不含壳聚糖溶液的液体蛋白胨培养基。所有培养基经 121℃ 湿热灭菌后备用。

生长曲线的测定:据文献<sup>[5]</sup>。逐次将菌种母液用移液枪取 1mL 加入对照样品和样品 A、B、C 中,然后将含有菌液的样品置于培养箱中,在 30℃ 条件下培养,每隔 24h 取样,稀释,用显微镜直接计数法测定细菌生长量<sup>[6]</sup>。直到所有样品及对照中的菌体数量不再增长,在图中绘制不同样品中细菌的生长曲线。

## 2 结果和讨论

### 2.1 不同脱乙酰度壳聚糖的抑菌性

图 1,图 2 为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌在三种不同脱乙酰度壳聚糖液态培养基(A、B、C)和对照组中的生长曲线。由图可知,大肠杆菌在样品 A、B、C 中的生长量都要比对照组低,说明三种壳聚糖都有抑菌作用。24h 后明显出现不同脱乙酰度样品 A、B、C 中生长量依次递减的现象(A > B > C),这种趋势持续到 48h 时最大,即随脱乙酰度增加抑菌性能增强。其后又逐渐减小,96h 后趋于接近。从图 2 的金黄色葡萄球菌生长曲线可知,三种不同脱乙酰度的壳聚糖对金黄色葡萄球菌均有明显的抑菌作用,但三者之间的差异在 48h 内不明显,到 72h 才表现出来。从 120~144h 的时间段来看,样品 A 中的生长量与样品 B 之间有较大差别,而样品 B、C 之间差别不大。

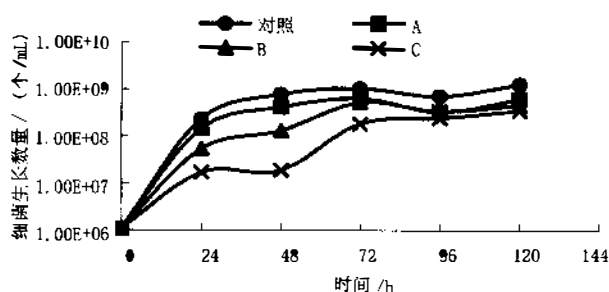


图 1 大肠杆菌的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *Escherichia coli*

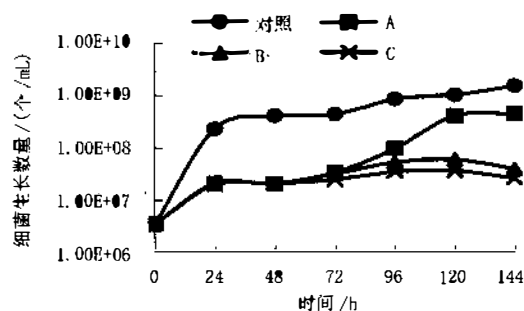


图 2 金黄色葡萄球菌的生长曲线

Fig.2 Growth curves of *Staphylococcus aureus*

分别将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌在四种培养基中的生长量进行方差分析<sup>[7,8]</sup>,见表 1。比较大肠杆菌各时间在含 A、B、C 样品的培养基中生长量,24~48h 存在显著性差异,72h 时,这种趋势减小,大肠杆菌在含样品 B、C 的培养基中生长量仍存在显著性差别。比较金黄色葡萄球菌各时间点含对照样品、A、B、C 样品的培养基中生长量,24~96h 时对照与 A、B、C 样品中生长量均存在显著差异,说明三种不同脱乙酰度的壳聚糖对金黄色葡萄球菌均有显著抑菌作用,120~144h 时金黄色葡萄球菌在含 A、B 样品的培养基中生长量存在显著性差异,但两个脱乙酰度接近的样品 B、C 中没有显著差异。

### 2.2 抑菌机理初探

对于壳聚糖的抑菌机理,目前有着不同的解释。Hadwiger 等<sup>[9]</sup>推测壳聚糖上带正电荷的游离胺基与细菌的细胞壁结合而阻碍细菌的增殖,从而起到抑菌作用。Leuba 和 Stessel<sup>[10]</sup>推测可能是壳聚糖干扰了细菌的细胞膜功能造成细菌体内物质的流失。郑连英<sup>[11]</sup>考察了不同分子量壳聚糖的抑菌性能,认

为对革兰氏阳性菌,壳聚糖的分子量增大,抗菌作用增强,因为大分子形成致密外膜,阻止营养物质进入细菌细胞。对革兰氏阴性菌,随壳聚糖分子量减小,抗菌作用增强,因为分子量越小,越容易进入细胞壁的空隙结构内,干扰细胞的新陈代谢,达到杀菌的目的。宋献周和沈月新<sup>[12]</sup>推测可能是低分子量的壳聚糖通过进入菌体细胞内,与带负电荷的细胞质发生作用,扰乱细胞正常代谢,从而实现抑菌作用。

本实验的结果显示,三种不同脱乙酰度的壳聚糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的生长均表现有抑制作用。不同脱乙酰度对壳聚糖抑菌性的影响,两个菌种在不同时间段都有表现。大肠杆菌在 24~48h 时间段,样品 A、B、C 中的生长量出现依次递减的现象(图 1)。金黄色葡萄球菌在 96~144h 时间段,也出现在样品 A、B、C 中的生长量依次递减的现象(图 2)。这说明在某些时间段,即随壳聚糖脱乙酰度的增加,其抑菌性增强。这与夏文水研究的不同脱乙酰度甲壳低聚糖( $M_n = 1500$ )所得出的结论相似,脱乙酰度大,抑菌性强<sup>[2]</sup>。关于抑菌机理,本文推测大分子量的壳聚糖抗菌活性不仅与氨基含量和氨基质子化有关,可能还与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞壁结构有关。大肠杆菌的细胞壁最外层是一层较厚的类脂多糖类物质,有吸附  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  等阳离子以提高这些离子在细胞表面的浓度的作用<sup>[5]</sup>,如类脂多糖类物质已吸附了质子化的阳离子聚合物壳聚糖,则与  $Ca^{2+}$  离子结合的可能性就减小,脂多糖结构的稳定性变差,内壁层肽聚糖暴露出来,容易被溶菌酶水解。如脱乙酰度高,单体分子上的游离胺基就多,与类脂多糖类物质的结合也多。金黄色葡萄球菌的细胞壁含有丰富的磷壁酸(接近细胞壁重的 50%),其所带有的负电荷可与环境中的  $Mg^{2+}$  阳离子结合以保证细胞膜上一些合成酶维持高活性的需要<sup>[5]</sup>,壳聚糖溶解在酸性溶液中,单体分子上带正电荷的游离胺基就可能与磷壁酸结合,扰乱其的生理功能,使细菌的繁殖受阻。因而脱乙酰度高的壳聚糖,其抑菌性会增强。但是这种特性为什么在某些的时间段才明显表现出来,其原因还不太清楚,有待于今后进一步深入研究。

天宝壳聚糖有限公司为实验无偿提供原料,谨致谢忱。

### 参考文献:

- [1] 谢雅明.可溶性甲壳质的制造和用途[J].化学世界,1983,24(4):118-121.
- [2] 夏文水,张帆,何新益.甲壳低聚糖抗菌作用及其在食品保藏中的应用[J].无锡轻工大学学报,1998,17(4):10-14.
- [3] 陈鲁生,周武,姜云生.壳聚糖粘均分子量的测定[J].化学通报,1996,(4):57.
- [4] 汪志君.碱量法测定壳聚糖中的胺基[J].化学世界,1986,27(1):22-23.
- [5] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,1993.21-25.
- [6] 蔡同一.食品卫生监督管理与执法全书[M].北京:中国环境科学出版社,1999.1689.
- [7] 无锡轻工学院.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1992.367-369.
- [8] 中科院数学研究组.方差分析[M].北京:科学出版社,1997.8-18.
- [9] Haalwiger L A, Firstensky B, Riggelman, R C. Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions increases crop yields [A]. *Cman Chitsanand Related Enzymes* [M]. New York: Academic Press, 1984. 291.
- [10] Ceuba J L, Stosel, P. Chitosan and other polyamines: antifungal activity and interaction with biology membranes [A]. *Chitin in Nature and Technology* [M]. New York: Plenum Press, 1986. 215.
- [11] 郑连英,朱江峰,孙昆山,等.不同分子量壳聚糖的抗菌性能研究[A].第二届甲壳素化学与应用研讨会论文集[C].武汉:中国化学会,1999,311-315.
- [12] 宋献周,沈月新.不同分子量的  $\alpha$ -壳聚糖抑菌作用[J].上海水产大学学报,2000,9(2):138-141.

表 1 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌生长差异显著性比较

Tab.1 Comparison of significant difference of growth of *E. coli* and *S. aureus*

时间 h	大肠杆菌生长差异显著性比较			金黄色葡萄球菌生长差异显著性比较		
	对照-A	A-B	B-C	对照-A	A-B	B-C
24	无	显著	显著	显著	无	无
48	无	显著	显著	显著	无	无
72	无	无	显著	显著	无	无
96	无	无	无	显著	无	无
120	无	无	无	显著	显著	无
144				显著	显著	无

注:检验水平  $\alpha = 0.05$ 。