

文章编号: 1004-7271(2000)02-0138-04

## 不同平均分子量的 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌作用

宋献周, 沈月新

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘 要:**本文就几种不同平均分子量( $\overline{MW} = 1.56 \times 10^4, 3.3 \times 10^4, 9.5 \times 10^4, 7.2 \times 10^5$ )的 $\alpha$ -壳聚糖对水产品中的几种常见菌(大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,枯草杆菌,产气荚膜杆菌)及鱼体表杂菌的抑制作用做了研究。结果表明:以上分子量的 $\alpha$ -壳聚糖对上述菌的生长都起了抑制作用,并且低分子量的 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌效果优于高分子量的 $\alpha$ -壳聚糖,即 $\overline{MW} = 1.56 \times 10^4$ 的抑菌作用最强, $\overline{MW} = 7.2 \times 10^5$ 的抑菌作用最弱。

**关键词:** $\alpha$ -壳聚糖;抑菌作用;分子量

**中图分类号:**S986.2 **文献标识码:**A

## The antibiotic activity of $\alpha$ -chitosan with different molecular weights

SONG Xian-zhou, SHEN Yue-xin

(College of Food Science, SFU, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** The antibiotic activities of  $\alpha$ -chitosan with different molecular weights ( $\overline{MW} = 1.56 \times 10^4, 3.3 \times 10^4, 9.5 \times 10^4$  and  $7.2 \times 10^5$ ) against such strains of bacteria as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Clostridium perfringens* commonly present in aquatic products as well as miscellaneous microbes on fish epidermis were studied in this paper. The experimental results demonstrated that  $\alpha$ -chitosan showed its antibiotic activity in different degree and the antibiotic activity was enhanced with the decrease of average molecular weight of  $\alpha$ -chitosan.  $\alpha$ -Chitosan with  $\overline{MW} = 1.56 \times 10^4$  inhibited the growth of experimental microbes more effectively than others with  $\overline{MW} = 3.3 \times 10^4, 9.5 \times 10^4$  and  $7.2 \times 10^5$ .

**Key words:**  $\alpha$ -chitosan; antibiotic activity; molecular weight

甲壳素(chitin)是地球上总量仅次于纤维素的天然生物资源,广泛存在于甲壳类动物、节肢动物、菌类中,提取方便且产品无毒副作用。甲壳素和 $\alpha$ -壳聚糖(chitosan,即脱乙酰甲壳素)的性能和应用近三四十年来在国外得到了广泛的研究和开发应用,诸如作为人造皮肤、果汁的絮凝剂、酶的固定载体以及食品包装膜等等。对 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌防腐作用也有所报导,但对其抑菌机理尚无明确定论,而且对不同分子量 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌效果的研究结果也不完全统一,如管云林<sup>[1]</sup>研究报导认为, $\alpha$ -壳聚糖对金黄色葡萄球菌的抑菌作用会随着分子量升高而减弱,而Youseok<sup>[2]</sup>的研究结果却相反,分子量为4万的 $\alpha$ -壳聚糖在浓度为0.5%时,对金黄色葡萄球菌的杀灭率为90%;分子量为18万的 $\alpha$ -壳聚糖在浓度为 $500 \times 10^{-6}$ 时,对金黄色葡萄球菌的杀灭率几乎为100%。为此,本文对不同平均分子量的 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌效果做了系统的研究,有助于 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌机理的探讨,更好地为 $\alpha$ -壳聚糖应用到食品、水产品的防腐保鲜提供理论依据。

收稿日期:2000-01-17

作者简介:宋献周(1974-),男,上海水产大学食品学院1997级研究生,从事水产品贮藏与加工方面的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

虾壳甲壳素由上海鱼品厂提供。实验菌种大肠杆菌(*Escherichia coli*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),枯草杆菌(*Bacillus subtilis*),产气荚膜杆菌(*Clostridium perfringens*)由上海水产大学渔业学院微生物教研室提供;鱼体表杂菌取自市售鲢鱼鳃。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $\alpha$ -壳聚糖的制备及脱乙酰度和平均分子量的测定

$\alpha$ -壳聚糖的制备采用碱法,用40%NaOH溶液,在90℃下反应10h;脱乙酰度的测定按照林瑞洵等<sup>[3]</sup>的方法;平均分子量的测定则采用乌氏粘度计稀释法<sup>[4]</sup>。本实验中获得平均分子量( $\overline{MW}$ )为 $7.2 \times 10^5$ 、脱乙酰度为80.7%的 $\alpha$ -壳聚糖120g。

#### 1.2.2 不同平均分子量的 $\alpha$ -壳聚糖的制备

采用浓盐酸降解法。

样品A。取以上 $\alpha$ -壳聚糖6g放入带冷凝回流装置的球形烧瓶中,加入浓HCl 80mL,在75℃水浴下反应3h后马上冷却,16 000g离心,去上清液得沉淀,所得沉淀物用10% HAC 500mL溶解,过滤去杂渣,滤液用40%NaOH溶液调pH值到10,4℃下放置过夜,再离心(16 000 g)回收沉淀物,将所得沉淀物反复用蒸馏水洗致中性,而后在60℃下烘干,直至恒重,取少量用粘度法测得平均分子量( $\overline{MW}$ )为 $1.56 \times 10^4$ 。

样品B。反应温度为70℃,时间为2h30min,其它处理同样品A,  $\overline{MW} = 3.3 \times 10^4$ 。

样品C。反应温度为40℃,时间为2h30min,其它处理同样品A,  $\overline{MW} = 9.5 \times 10^4$ 。

样品D。未经降解的 $\alpha$ -壳聚糖,  $\overline{MW} = 7.2 \times 10^5$ 。

#### 1.2.3 含 $\alpha$ -壳聚糖液态培养基的配制

称取样品A 0.1g,溶解于50mL 0.1MHAC-0.2MNaCl溶液,得浓度为0.2%的 $\alpha$ -壳聚糖溶液,再以此溶液配成普通肉汤(康乐培养基有限公司)液态培养基,并用40%NaOH调pH值到6.0,此即为含有 $\alpha$ -壳聚糖样品A的液态培养基。含有样品B、C、D的培养基的配制同上。

设立两个对照。对照1为50mL 0.1MHAC-0.2MNaCl溶液配制不含 $\alpha$ -壳聚糖的普通肉汤液态培养基,pH值6.0;对照2为蒸馏水配制不含 $\alpha$ -壳聚糖的普通肉汤液态培养基50mL,pH值7.0。

将以上所有培养基经121℃湿热灭菌后待用。

#### 1.2.4 菌种母液的培养

在无菌环境下,挑取一环经斜面培养复壮后的大肠杆菌到经事先灭菌的100mL普通肉汤液态培养基,37℃静置培养24h后供接种,此即大肠杆菌的菌种母液。

金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、产气荚膜杆菌的菌种母液的培养同大肠杆菌。

鱼体表杂菌菌种母液的培养:取20mL无菌水,浸入鲢鱼鳃一瓣,片刻后取出,再用灭过菌的移液枪移取1mL到经事先灭菌的100mL普通肉汤液态培养基,37℃静置培养24h后供接种,此即鱼体表杂菌的菌种母液。

#### 1.2.5 接种及生长曲线的测定

接种前先用显微镜直接计数法<sup>[5]</sup>测定每mL大肠杆菌菌种母液所含菌体的个数,用以换算接种量,而后用经灭菌的移液枪各移取0.5mL大肠杆菌菌种母液到事先准备好的含 $\alpha$ -壳聚糖的样品A、B、C、D及对照1、2的普通肉汤液态培养基,37℃静置培养,每隔24h对所有样品及对照品取样,用显微镜直接计数测定细菌生长量,直到所有样品及对照中的菌体数量不再增长,最后在同一图表中各自绘制生长曲线。

金黄色葡萄球菌、产气荚膜杆菌、枯草杆菌及鱼体表杂菌的接种和生长曲线的测定同上。

## 2 结果与讨论

### 2.1 α-壳聚糖的分子量对抑菌作用的影响

由图1~5可知,所有实验菌种均一致表现为:含α-壳聚糖样品组的菌体的生长要比不含α-壳聚糖对照组慢,对照组在24h到48h便可到达生长顶点(菌体数量超过 $1.0 \times 10^9$ 个/mL),而样品组中即便是菌体生长最快的样品D也要在48h到72h间才到达生长顶点,菌体生长在样品组与对照组间存在着显著性差异( $p < 0.01$ ),可见α-壳聚糖有抑菌作用。另外,所有实验菌种还均一致表现为:菌体在含有不同分子量α-壳聚糖样品A、B、C、D培养基中的生长相互间都存在着显著性差异( $p < 0.05$ ),并且菌体在含α-壳聚糖样品D培养基中生长最快,48h到72h间到达生长顶点(枯草杆菌在96h后到达生长顶点);在样品C、B培养基中的生长速度渐次;在样品A培养基中生长最慢,144h到168h间到达生长顶点(枯草杆菌在192h后到达生长顶点),可见α-壳聚糖样品A的抑菌作用最强,样品B、C渐次,样品D的抑菌作用最弱。

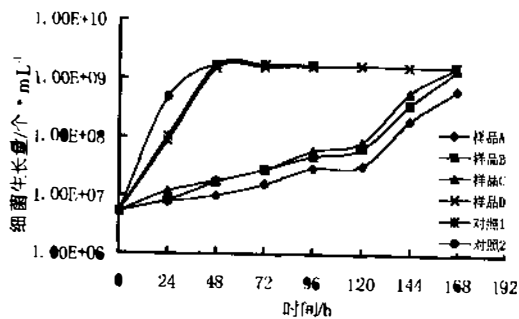


图1 大肠杆菌的生长比较

Fig.1 Comparison of Escherichia coli growth

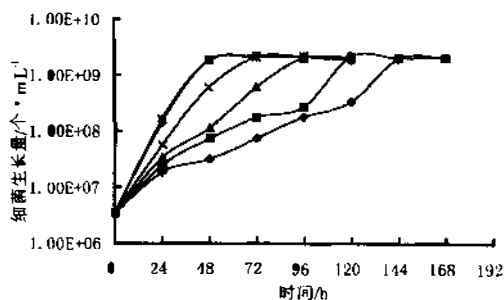


图2 金黄色葡萄菌的生长比较

Fig.2 Comparison of Staphylococcus aureus growth

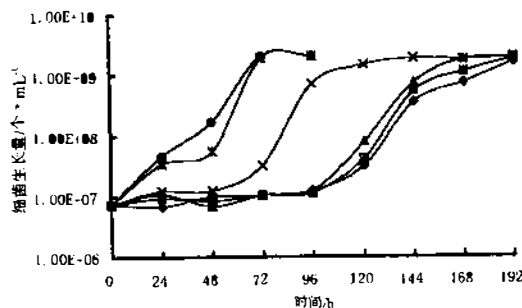


图3 枯草杆菌的生长比较

Fig.3 Comparison of Bacillus subtilis growth

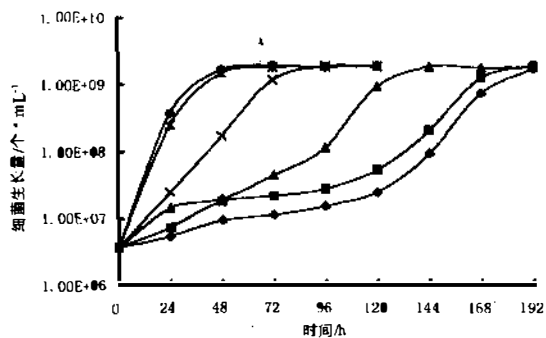


图4 产气荚膜杆菌的生长比较

Fig.4 Comparison of Clostridium perfringens growth

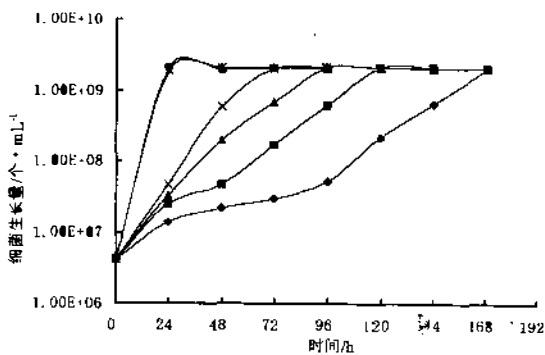


图5 鱼体表杂菌的生长比较

Fig.5 Comparison of bacteria growth of fish epidermis

## 2.2 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌机理的探讨

$\alpha$ -壳聚糖结构的特别之处,其一它是由氨基葡萄糖单体聚合而成的聚合物(含有一部分乙酰氨基葡萄糖),相互之间能以氢键等结合;其二是氨基葡萄糖单体的 $C_2$ 上有带正电荷氨基,能吸附一些带负电荷的物质。基于此,人们对 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌机理有着不同的解释。有人认为 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌作用与 $C_2$ 上的氨基有关联,而郑连英等<sup>[6]</sup>认为:对革兰氏阳性菌, $\alpha$ -壳聚糖主要通过菌体表面成膜,阻止营养物质的进入来达到抑菌目的;对革兰氏阴性菌, $\alpha$ -壳聚糖主要通过渗透进入到细菌体内,吸附阴离子物质,干扰细胞代谢来达到抑菌目的。本实验结果显示,无论是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌(*Escherichia coli*等),分子量低的 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌作用均优于分子量高的 $\alpha$ -壳聚糖。此结果虽不能排除 $\alpha$ -壳聚糖采取通过在菌体表面成膜来完成抑菌的可能性,但更多的支持了另外一种抑菌方式,即 $\alpha$ -壳聚糖通过某种途径进入到菌体细胞内,吸附结合一些带负电的细胞质,扰乱菌体细胞的正常生理代谢,从而抑制细菌生长。分子量相对低的 $\alpha$ -壳聚糖的抑菌作用优于分子量相对高的 $\alpha$ -壳聚糖,是因为低分子量的 $\alpha$ -壳聚糖更有可能穿过菌体细胞膜而与细胞质发生作用。或者说,平均分子量较低的 $\alpha$ -壳聚糖,含有较多的能穿过细胞膜的小分子量的 $\alpha$ -壳聚糖,因而有较强的抑菌作用。

## 3 结论

(1) $\alpha$ -壳聚糖有抑菌作用。

(2)小分子量的 $\alpha$ -壳聚糖的作用好过高分子量的 $\alpha$ -壳聚糖。

(3)抑菌机理: $\alpha$ -壳聚糖通过进入菌体细胞体内,与带负电荷的细胞质发生作用,扰乱细胞的正常代谢,从而实现抑菌作用。

## 参考文献

- [1] 管云林,付强,郎铁柱等.分子量对壳聚糖抗菌性的影响[A].中国甲壳资源研究开发应用学术研讨会论文集(下册)[C].青岛:中国药学会海洋药物专业委员会.1997.35-36.
- [2] Yousook Shin. The antibiotic effect of Chitosan on Bactereria of Varying Cell Well Composition[J]. Adv in Chitin Sci, 1997, (2):890-896.
- [3] 林瑞洵,蒋苏洪,张慕珊.脱乙酰度的测定方法[J].化学通报,1992,(4):59-61.
- [4] 陈鲁生,周武,姜云生. $\alpha$ -壳聚糖粘菌分子量的测定[J].化学通报,1996,(4):57.
- [5] 武汉大学,复旦大学.微生物学(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1987.229-230.
- [6] 郑连英,朱江峰,孙昆山.不同分子量壳聚糖的抗菌性能研究[A].杜子民.第二届甲壳素化学与应用研讨会论文集[C].中国化学会 1999.311-315