

水溶性壳低聚糖抑菌性能研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2019.04.002

黄海波^{1,2,3} 姚进²
曾广胜^{1,2} 李知函^{1,2}

1. 湖南工业大学
包装与材料工程学院
湖南 株洲 412007
2. 湖南工业大学
生物质纤维功能材料湖南省重点实验室
湖南 株洲 412007
3. 广西大学
轻工与食品工程学院
广西 南宁 530004

摘要:壳聚糖及其衍生物壳低聚糖均具有广谱抑菌性能,但相对分子质量对壳聚糖衍生物抑菌活性的影响仍存在分歧。选取几种不同相对分子质量的水溶性壳低聚糖对金黄色葡萄球菌(*staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*escherichia coli*)和黑曲霉菌(*aspergillus niger*)进行抑菌实验,探究相对分子质量对壳低聚糖抑菌活性的影响。实验结果表明:相对分子质量对水溶性壳低聚糖的抑菌活性有一定影响,但无特定的变化规律,其中相对分子质量为 2.00×10^3 的壳低聚糖表现出相对较好的抑菌活性;壳聚糖及其壳低聚糖对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最好,黑曲霉菌次之,对大肠杆菌的抑菌活性最差。

关键词:壳聚糖;水溶性壳低聚糖;相对分子质量;抑菌性能

中图分类号: O636.9 **文献标志码:** A

文章编号: 1674-7100(2019)04-0010-06

引文格式: 黄海波,姚进,曾广胜,等.水溶性壳低聚糖抑菌性能研究[J].包装学报,2019,11(4):10-15.

1 研究背景

壳聚糖(chitosan)是甲壳素(chitin)部分或完全脱乙酰基的衍生产物,广泛存在于虾、蟹等海洋节肢动物的甲壳中,也存在于昆虫外壳、藻类菌类及高等植物的细胞壁中。壳聚糖是天然多糖中唯一的碱性多糖,具有广谱抑菌性;是天然无毒、绿色环保的生物抑菌剂,可应用于包装保鲜等领域^[1-3]。

目前,关于壳聚糖及其衍生物壳低聚糖的抑菌机理还没有明确的阐明和验证,主要有两种解释^[4-9]:1)大分子壳聚糖的氨基在酸性溶液中容易发生质子化电离而显正电性,通过静电引力的作用与细菌表面带负电荷的细胞壁和细胞膜相结合,在菌体细胞壁表面形成一层壳聚糖膜,从而改变细菌细胞膜的选择透

性,进而破坏细胞膜内外的渗透平衡,阻断营养物质进入菌体细胞,抑制正常的新陈代谢,最终导致菌体死亡。2)小分子壳低聚糖通过细菌的细胞膜进入细胞体内部,与细菌的DNA相互作用进而破坏mRNA的转录和复制,与细胞内部菌体生存所必需的成分(如蛋白质)结合,抑制细菌的生长和繁殖。

自1979年C. R. Allan等^[10]首次对壳聚糖的抑菌活性进行报道以来,科研工作者陆续对壳聚糖的抑菌菌属的种类^[11-12]、影响壳聚糖抑菌活性的因素^[13-16](分子质量、脱乙酰度、溶液的pH值、溶液的离子浓度、正电荷密度等)和壳聚糖抑制微生物生长的机理^[17-18]作了比较深入的研究。研究发现壳聚糖对细菌、真菌等多种微生物都有抑制作用,但是对于壳低

收稿日期:2019-06-14

基金项目:湖南省科技厅重点研发计划基金资助项目(2017WK2042),湖南省教育厅基金资助项目(17C0461)

作者简介:黄海波(1988-),女,广西平乐人,湖南工业大学助理研究员,广西大学博士生,主要研究方向为生物质化学与工程,E-mail:huanghaibo2012@126.com

通信作者:李知函(1987-),男,湖南洞口人,湖南工业大学讲师,博士,主要从事生物质资源绿色应用研究,E-mail:lizh,@hut.edu.cn

聚糖相对分子质量是否影响其抑菌活性的研究仍然存在分歧。如 Y. J. Jeon^[19]、F. S. Kittur^[20] 和梁健^[21] 等的研究表明, 随着壳低聚糖的相对分子质量下降, 其抑菌活性减弱。而 Xia W. S.^[22] 和 No H. K.^[23] 等分别制备了不同相对分子质量的壳低聚糖并对革兰氏阴性菌进行抑菌测试, 结果表明, 随着壳低聚糖相对分子质量的下降, 其抑菌活性反而增强, 其中相对分子质量为 1.5×10^3 和 1×10^3 的壳低聚糖的抑菌活性最好。与此同时, Tokura S. 等^[24] 的研究却发现相对分子质量为 9.3×10^3 的壳低聚糖可以抑制大肠杆菌的生长, 而相对分子质量为 2.2×10^3 的壳低聚糖不但不具有抑菌性能, 反而会促进大肠杆菌的生长。因此, 有关相对分子质量对壳低聚糖抑菌性能的影响, 不能一概而论。

本文采用不同相对分子质量的水溶性壳低聚糖对金黄色葡萄球菌 (*staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*escherichia coli*) 和黑曲霉菌 (*aspergillus niger*) 进行抑菌实验, 通过观察各壳低聚糖对 3 种细菌的作用情况, 探究相对分子质量对水溶性壳低聚糖抑菌活性的影响。

2 实验

2.1 实验材料与设备

1) 实验材料

壳聚糖, 脱乙酰度为 85%, 相对分子质量为 5.00×10^6 , 山东济南海得贝海洋生物工程有限公司; 水溶性壳低聚糖, 脱乙酰度为 90%~95%, 相对分子质量分别为 1.45×10^4 , 1.25×10^4 , 9.00×10^3 , 7.90×10^3 , 4.20×10^3 , 2.00×10^3 , 实验室自制; 营养肉汤, 广东环凯微生物科技有限公司; 固体琼脂, 广东环凯微生物科技有限公司; 金黄色葡萄球菌 (*staphylococcus aureus* ATCC6538)、大肠杆菌 (*escherichia coli* ATCC8739) 和黑曲霉菌 (*aspergillus niger* ATCC16404), 均取自广东省微生物菌种保藏中心。

2) 实验设备

高压灭菌锅, BXM-30R 型, 上海博讯实业有限公司; 台式恒温摇床, TS-100C 型, 无锡玛瑞特科技有限公司; 扫描电子显微镜 (scanning electron microscop, SEM), EVO-18 型, 德国 Zeiss 公司。

2.2 实验过程

1) 培养基的配制

营养肉汤液体培养基: 称取营养肉汤 18 g 置于 2

L 的烧杯中, 加入 1 L 蒸馏水, 搅拌加热煮沸, 直至肉汤完全溶解, 分装至三角瓶中, 用纱布封口, 121 °C 高压灭菌 30 min, 冷却后转移至无菌操作台中备用。

营养肉汤固体培养基: 称取营养肉汤和固体琼脂各 18 g 置于 2 L 的烧杯中, 加入 1 L 蒸馏水, 搅拌加热煮沸, 直至两者完全溶解, 分装至三角瓶中, 用纱布封口, 121 °C 高压灭菌 30 min, 待高压灭菌锅内温度低于 60 °C, 取出三角瓶在无菌操作平台上倒入培养皿中, 等待自然冷却凝固备用。

2) 菌悬液的制备

测试菌种接种于固体培养基上, 在生化恒温培养箱中活化一定时间后转管两次复壮; 复壮后的测试菌种用接种环挑取单独菌落于营养肉汤液体培养基中, 在恒温空气摇床中振荡培养得到 10^8 CFU/mL 的菌悬液备用。

3) 抑菌活性的测定

采用平板菌落计数法判定壳聚糖及壳低聚糖的抑菌活性。首先通过梯度稀释法对菌悬液进行稀释并进行平板涂布, 在生化培养箱中培养 24~36 h 后对平板进行菌落计数, 选取平板中长出 60~300 个菌落时的稀释倍数为最适稀释倍数。然后将壳聚糖原料和相对分子质量为 1.45×10^4 , 1.25×10^4 , 9.00×10^3 , 7.90×10^3 , 4.20×10^3 , 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖分别编号为样品 1~7, 并以质量分数为 1.0% 的乙酸溶液和去离子水作为溶剂, 将每个样品配制成质量分数为 0.010%, 0.025%, 0.050%, 0.100%, 0.250%, 0.500%, 1.000% 的溶液。分别将 0.1 mL 细菌悬浮液和 0.1 mL 待测抑菌溶液均匀涂布在培养基平板上, 空白样为只添加菌悬液而不添加样品溶液。所有平板在一定温度的生化恒温培养箱中培养 24 h 后取出, 观察各个平板上的细菌生长情况, 计算抑菌率。实验重复 3 次取其平均值。

抑菌率 (inhibition rate, IR) 的计算公式为^[25]

$$IR = \left[\frac{N_0 - N_1}{N_0} \right] \times 100\% ,$$

式中: N_0 为空白样品平板中的菌落数目;

N_1 为涂抹抑菌溶液后平板中的菌落数目。

4) 细菌的扫描电镜观察

在 5 mL 菌落总数为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌悬液中, 分别加入 2 mL 质量分数为 0.1% 的样品 7 (相对分子质量为 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖) 溶液, 在 37 °C 空气摇床中振荡培养

12 h, 取出于 3 000 r/min 下离心 10 min, 去除上清液; 再用浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) (pH=7.0) 将菌体清洗数次后用质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液浸泡, 并置于 4 ℃ 冰箱中固定过夜。再用 PBS 洗涤菌体 6 次, 每次 20 min; 然后在 4 ℃ 条件下, 分别用质量分数为 30%, 50%, 70%, 90% 的乙醇溶液对菌体进行梯度脱水; 接着用无水丙酮洗涤菌体 3 次, 每次 15 min; 之后, 又用乙酸异戊酯洗涤 2 次, 每次 15 min; 最后, 样品在临界点干燥 3 h 后喷金处理, 进行 SEM 观察。

3 实验结果与分析

3.1 壳聚糖和水溶性壳低聚糖对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

壳聚糖及不同相对分子质量的水溶性壳低聚糖对金黄色葡萄球菌的抑菌测试结果如图 1 所示。由图可知, 随着样品质量分数的增大, 各样品对金黄色葡萄球菌的抑菌率逐渐升高; 在同一质量分数下, 相对分子质量为 1.45×10^4 , 1.25×10^4 , 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖对金黄色葡萄球菌的抑菌率高于壳聚糖, 其抑菌活性有所提升, 其中相对分子质量为 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖在质量分数为 0.100% 时, 抑菌率为 57%, 对金黄色葡萄球菌有明显的抑菌效果。在样品质量分数为 0.010% 时, 相对分子质量为 7.90×10^3 , 4.20×10^3 的水溶性壳低聚糖对金黄色葡萄球菌的抑菌率为负值, 其原因可能是样品浓度过低, 对金黄色葡萄球菌几乎没有抑菌活性, 反而被菌体当作碳源吸收利用, 从而促进了金黄色葡萄球菌的生长。

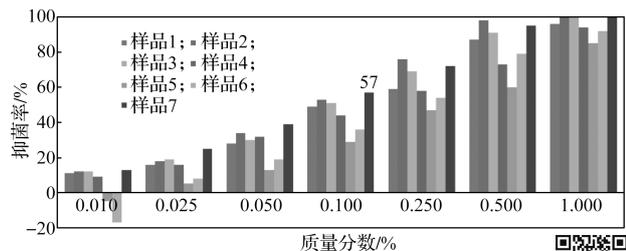


图 1 壳聚糖和水溶性壳低聚糖对金黄色葡萄球菌的抑菌活性测试结果

Fig. 1 Results of antibacterial activities of chitosan and low molecular weight of water-soluble chitosans against *staphylococcus aureus*

3.2 壳聚糖和水溶性壳低聚糖对黑曲霉菌的抑菌活性

壳聚糖及不同相对分子质量的水溶性壳低聚糖对黑曲霉菌的抑菌测试结果如图 2 所示。由图可知,

随着样品质量分数的增大, 壳聚糖及水溶性壳低聚糖对黑曲霉菌的抑菌率逐渐升高; 在同一质量分数下, 相对分子质量为 1.45×10^4 和 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖对黑曲霉菌的抑菌率均高于壳聚糖, 且相对分子质量为 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖在质量分数为 0.100% 时, 具有 57% 的抑菌率, 对黑曲霉菌的抑菌活性较好。

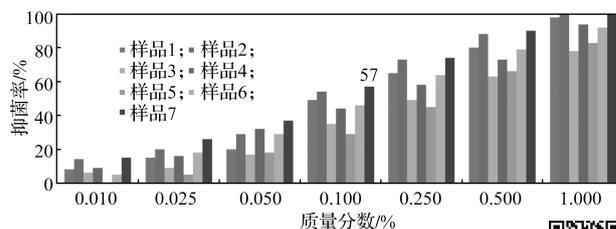


图 2 壳聚糖和水溶性壳低聚糖对黑曲霉菌抑菌活性测试结果

Fig. 2 Results of antibacterial activities of chitosan and low molecular weight of water-soluble chitosans against *aspergillus niger*

3.3 壳聚糖和水溶性壳低聚糖对大肠杆菌的抑菌活性

壳聚糖及不同相对分子质量的水溶性壳低聚糖对大肠杆菌的抑菌测试结果如图 3 所示。由图可知, 样品的抑菌率随样品质量分数的增大而增大。其中, 相对分子质量为 1.25×10^4 , 9.00×10^3 , 7.90×10^3 的水溶性壳低聚糖样品的抑菌率较壳聚糖低, 其对大肠杆菌的抑菌活性较差; 并且当加入质量分数为 0.010% 的样品溶液时, 抑菌率为负值, 即该相对分子质量的水溶性壳低聚糖在较低浓度时促进了大肠杆菌的生长, 其原因也可能是在较低浓度时, 相对分子质量为 1.25×10^4 , 9.00×10^3 , 7.90×10^3 的水溶性壳低聚糖作为碳源被大肠杆菌吸收利用。而相对分子质量为 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖, 其在不同质量分数时的抑菌率均高于壳聚糖, 对大肠杆菌有较好的抑菌活性。

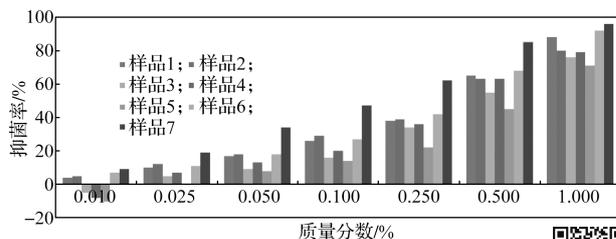


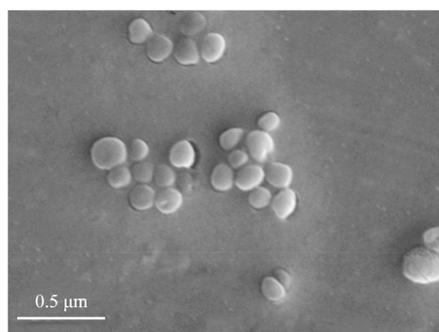
图 3 壳聚糖和水溶性壳低聚糖对大肠杆菌抑菌活性测试结果

Fig. 3 Results of antibacterial activities of chitosan and low molecular weight of water-soluble chitosans against *escherichia coli*

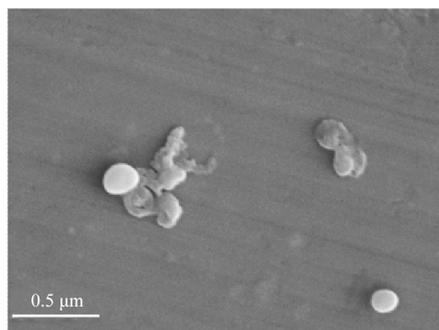
结合图 1~3 可知, 相对分子质量对于壳聚糖和水溶性壳低聚糖的抑菌活性存在着一定的影响, 但并无特定规律可循。总体而言, 相对分子质量为 2.00×10^3 的样品 7 表现出最好的抑菌活性。而在被测试的 3 种菌株中, 壳聚糖和水溶性壳低聚糖对金黄色葡萄球菌的抑菌活性要好于大肠杆菌, 而对黑曲霉菌的抑菌活性则介于二者之间。因而, 本试验选取经相对分子质量为 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖处理前后的金黄色葡萄球菌及大肠杆菌进行扫描电镜观察。

3.4 细菌扫描电镜观察

图 4~5 是经相对分子质量为 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖处理前后的金黄色葡萄球菌及大肠杆菌 SEM 观察结果。从图中可以明显看到, 未经处理的金黄色的葡萄球菌(图 4a)和大肠杆菌(图 5a)细胞表面光滑, 保持细胞完整的形态特征; 而经相对分子质量为 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖溶液处理后的细菌菌体结构出现变形, 细胞表面有坍塌和破裂的现象。根据壳聚糖及其壳低聚糖对微生物的抑菌机理可知, 其原因可能是由于壳低聚糖溶液显正电性, 与菌体细胞膜表面的负电荷相互作用, 从而改变了细胞膜的选择透过性, 进而破坏细胞膜内外的渗透平衡, 导致菌体死亡。

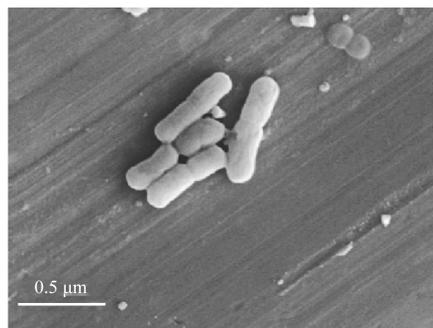


a) 处理前

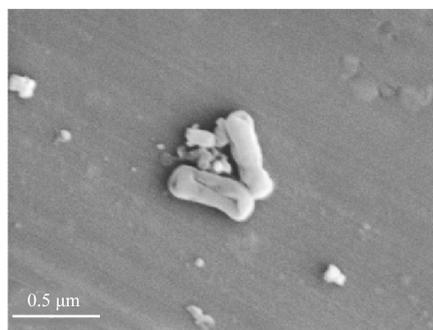


b) 处理后

图 4 金黄色葡萄球菌处理前后的 SEM 图
Fig. 4 SEM images of *staphylococcus aureus*



a) 处理前



b) 处理后

图 5 大肠杆菌处理前后的 SEM 图
Fig. 5 SEM images of *escherichia coli*

4 结论

本文通过选取不同相对分子质量的水溶性壳低聚糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和黑曲霉菌进行抑菌实验, 探究了壳低聚糖分子质量对其抑菌活性的影响, 具体结论如下:

1) 相对分子质量对水溶性壳低聚糖的抑菌活性有一定影响, 但无特定规律可循; 其中, 相对分子质量为 2.00×10^3 的水溶性壳低聚糖表现出相对较好的抑菌活性。

2) 随着壳聚糖及其水溶性壳低聚糖溶液的质量分数增大, 其对金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌以及大肠杆菌的抑菌活性逐渐增强; 其中, 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最好, 对黑曲霉菌次之, 对大肠杆菌的抑菌活性最差。

参考文献:

- [1] KIM C H, CHOI J W, CHUN H J, et al. Synthesis of Chitosan Derivatives with Quaternary Ammonium Salt and Their Antibacterial Activity[J]. Polymer Bulletin, 1997, 38(4): 387-393.

- [2] 黄海波, 曾广胜, 陈一, 等. 水溶性壳低聚糖快速制备的方法及其性能表征[J]. 包装学报, 2018, 10(2): 1-7.
HUANG Haibo, ZENG Guangsheng, CHEN Yi, et al. Preparation and Characterization of Water-Soluble Chitooligosaccharides Produced by a Facile Method[J]. Packaging Journal, 2018, 10(2): 1-7.
- [3] 李知函, 姚进, 黄海波, 等. 壳聚糖衍生物改性磷酸铝自组装纳米材料的制备及抑菌性能研究[J]. 包装学报, 2017, 9(6): 16-24.
LI Zhihan, YAO Jin, HUANG Haibo, et al. Preparation and Antimicrobial Property of Self-Assembly Nanocomposites of Chitosan Derivatives/Zirconium Phosphate[J]. Packaging Journal, 2017, 9(6): 16-24.
- [4] LIU H, DU Y M, WANG X H, et al. Chitosan Kills Bacteria Through Cell Membrane Damage[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 95(2): 147-155.
- [5] CHUNG Y C, SU Y P, CHEN C C, et al. Relationship Between Antibacterial Activity of Chitosan and Surface Characteristics of Cell Wall[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2004, 25(7): 932-936.
- [6] SEBTI I, MARTIAL-GROS A. Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film Against *Aspergillus Niger* Contamination[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(2): 100-104.
- [7] LIU X F, GUAN Y L, YANG D Z, et al. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2001, 79(7): 1324-1335.
- [8] TOKURA S, UENO K, MIYAZAKI S, et al. Molecular Weight Dependent Antimicrobial Activity by Chitosan[J]. Macromolecular Symposia, 1997, 120(1): 1-9.
- [9] BADAWY M E I. Structure and Antimicrobial Activity Relationship of Quaternary N-Alkyl Chitosan Derivatives Against some Plant Pathogens[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 117(2): 960-969.
- [10] ALLAN C R, HADWIGER L A. The Fungicidal Effect of Chitosan on Fungi of Varying Cell Wall Composition[J]. Experimental Mycology, 1979, 3(3): 285-287.
- [11] EATON P, FERNANDES J, PEREIRA E, et al. Atomic Force Microscopy Study of the Antibacterial Effects of Chitosans on *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*[J]. Ultramicroscopy, 2008, 108(10): 1128-1134.
- [12] HAMDINE M, HEUZEY M C, BÉGIN A. Effect of Organic and Inorganic Acids on Concentrated Chitosan Solutions and Gels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37(3): 134-142.
- [13] KONG M, CHEN X G, XING K, et al. Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(1): 51-63.
- [14] PARK S C, NAH J W, PARK Y. pH-Dependent Mode of Antibacterial Actions of Low Molecular Weight Water-Soluble Chitosan (LMWSC) Against Various Pathogens[J]. Macromolecular Research, 2011, 19(8): 853-860.
- [15] PALMA-GUERRERO J, LOPEZ-JIMENEZ J A, PÉREZ-BERNÁ A J, et al. Membrane Fluidity Determines Sensitivity of Filamentous Fungi to Chitosan[J]. Molecular Microbiology, 2010, 75(4): 1021-1032.
- [16] CHANG S H, LIN H T V, WU G J, et al. pH Effects on Solubility Zeta Potential, and Correlation Between Antibacterial Activity and Molecular Weight of Chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 134: 74-81.
- [17] TAYEL A A, MOUSSA S, OPWIS K, et al. Inhibition of Microbial Pathogens by Fungal Chitosan[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 47(1): 10-14.
- [18] HOSSEINNEJAD M, JAFARI S M. Evaluation of Different Factors Affecting Antimicrobial Properties of Chitosan[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 85: 467-475.
- [19] JEON Y J, SHAHIDI F, KIM S E K. Preparation of Chitin and Chitosan Oligomers and Their Applications in Physiological Functional Foods[J]. Food Reviews International, 2000, 16(2): 159-176.
- [20] KITTUR F S, PRASHANTH K V H, SANKAR K U, et al. Characterization of Chitin, Chitosan and Their Carboxymethyl Derivatives by Differential Scanning Calorimetry[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(2): 185-193.
- [21] 梁健. 低分子量壳聚糖纳米粒的制备及其体内分布研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
LIANG Jian. Preparation and Biodistribution of Low-Molecular-Weight Chitosan Nanoparticles[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003.
- [22] XIA W S, LIU P, ZHANG J L, et al. Biological Activities of Chitosan and Chitooligosaccharides[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2): 170-179.
- [23] NO H K, PARK N Y, LEE S H, et al. Antibacterial

- Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 74(1/2): 65-72.
- [24] TOKURA S, UENO K, MIYAZAKI S, et al. Molecular Weight Dependent Antimicrobial Activity by Chitosan[M]//New Macromolecular Architecture and Functions. Berlin: Springer, 1997: 199-207.
- [25] QIN C Q, DU Y M, XIAO L. Effect of Hydrogen Peroxide Treatment on the Molecular Weight and Structure of Chitosan[J]. Polymer Degradation and Stability, 2002, 76(2): 211-218.

(责任编辑: 邓光辉)

Study on Antimicrobial Activity of Water-Soluble Chitooligosaccharides

HUANG Haibo^{1,2,3}, YAO Jin², ZENG Guangsheng^{1,2}, LI Zhihan^{1,2}

- (1. College of Packaging and Materials Engineering, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China;
2. Hunan Key Laboratory of Biomass Fiber Functional Materials, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China;
3. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: The relative molecular mass has a positive influencing effect on the antibacterial activity of chitosan derivatives as chitosan and its derivatives have broad-spectrum antimicrobial properties. Several different molecular weights of water-soluble chitosan oligosaccharides were used to conduct antibacterial experiments on *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* and *aspergillus niger*, and the effects of relative molecular mass on the bacteriostatic activity of chitooligosaccharides were explored. The experimental results showed that relative molecular mass had certain effects on the antibacterial activity but with no regularity, and the water-soluble chitooligosaccharides with molecular weight of 2.00×10^3 performed better in the antibacterial activity. Chitosan and its different molecular weight of water-soluble chitooligosaccharides showed the best antibacterial activity against *staphylococcus aureus*, followed by *aspergillus niger* and the poorest antibacterial activity against *escherichia coli*.

Keywords: chitosan; water-soluble chitooligosaccharides; relative molecular mass; antimicrobial activity