

# 非生物性因素对壳聚糖抗菌活性的影响

吴 俊, 夏文水 \*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘 要:** 以具有代表性的两类病原菌: 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为实验菌种, 研究了不同的酸溶液、金属离子、离子强度和pH等非生物性因素对壳聚糖抗菌活性的影响。结果表明: 在壳聚糖的酸溶液中, 低碳数的有机酸比高碳数的有机酸和常见的无机酸更有利于壳聚糖抗菌活性的发挥; 在pH6.0的环境中, 壳聚糖的抗菌活性最强; 由于与壳聚糖的螯合作用,  $Zn^{2+}$  的加入对于壳聚糖的抗菌效率影响最大,  $Mg^{2+}$  的影响相对最小; 离子强度的增大可以更好地提高壳聚糖的抗菌活性。

**关键词:** 壳聚糖; 非生物性因素; 抗菌活性; 病原菌

## Study on Abiotic Factors Effect on Antibacterial Activities of Chitosan

WU Jun, XIA Wen-shui \*

(Food College of Southern Youtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** The effects of abiotic factors such as acid solvent, metal ion, ion strength and pH on the antibacterial activities of chitosan were investigated by using two kinds of typical pathogens: *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as test microorganisms. The results showed that organic acids with low carbon number are better solvents for chitosan than those inorganic acid. pH6.0 was optimum to the antibacterial activity of chitosan owing to the chelating capacity of chitosan toward metal ions. The addition of  $Zn^{2+}$  ions inhibited the antibacterial activity of chitosan the most, while the addition of  $Mg^{2+}$  ions inhibited the antibacterial activity of chitosan the least. The antibacterial activity of chitosan increased with ionic strength.

**Key words:** chitosan; abiotic factor; antibacterial activity; pathogen

中图分类号: 063

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)07-0052-05

壳聚糖是一种甲壳素经过脱乙酰化处理后的聚合物, 由于其资源丰富, 无毒且具有良好的生物相容性和可降解性, 在很多应用领域里, 它的开发研究进展很快。壳聚糖具有良好的抗菌活性, 因此, 它作为一种抗菌剂, 在食品中的应用也得到了广泛的关注<sup>[1]</sup>。

壳聚糖的抗菌作用固然在很大程度上受到其本身纯度、分子量、脱乙酰度、浓度等的影响, 但食品中复杂的化学组分以及各种特定的环境因素也可能对壳聚糖的抗菌作用产生影响。本文针对壳聚糖在食品中的应用, 深入地研究了壳聚糖抗菌活性的非生物性影响因素。通过两种典型病原菌所受到的抑制作用, 从环境因素的角度探讨了壳聚糖对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌不同的抗菌活性, 以期食品防腐抗菌剂的开发提供理论指导依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

壳聚糖由浙江玉环生物有限公司提供; 脱乙酰度为85%, 分子量约为260kDa(粘度法测定)。金黄色葡萄球菌和大肠杆菌由江南大学食品学院食品生物实验室提供。

营养肉汤培养基: 蛋白胨10g, 牛肉膏5g, 氯化钠5g, 去离子水定容到1000ml, 调节pH值至7.2, 121℃下灭菌15min后备用。将斜面培养上的大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)菌种接种到250ml三角瓶的营养肉汤培养基中, 在振荡培养箱中以120r/min的转速和37℃的温度下培养24h后, 移出1ml菌液在相同条件下重复培养相同时间, 得到初始菌液。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 抗菌活性的测定

将经过培养的试验菌液梯度稀释, 通常选择2~3个

收稿日期: 2003-10-08

\*通讯作者

基金项目: 江苏省科技发展计划(高新技术研究)项目(BG2003315); 无锡市科技发展计划项目(D102003)

作者简介: 吴俊(1978-), 男, 研究生, 研究方向为食品科学与工程。

稀释度为宜, 分别在作 10 倍递增稀释的同时, 即以吸取该稀释液的定量刻度吸管 1ml 稀释液灭菌平皿中, 每个稀释度做两个平皿。及时将冷却到 46℃ 的培养基注入平皿, 混合均匀, 待凝固后翻转平皿, 置 37℃ 恒温箱中培养 48 ± 2h 取出, 计算平皿中菌落数目, 乘以稀释倍数, 即得到每个样品所含细菌数量。抗菌活性的高低以细菌减少百分率高低来衡量。

$$\text{细菌减少百分率}(\%) = (A - B) / B \times 100\%$$

式中: A — 被试样品起始平均菌落数; B — 被试样品培养后平均菌落数。

### 1.2.2 不同酸溶液对壳聚糖抗菌活性的影响

所用的酸分为两大类, 无机酸是盐酸和硝酸; 有机酸是甲酸、乙酸、丙酸、柠檬酸(羟基丙三酸)、酒石酸(二羟基丁二酸)和苹果酸(羟基丁二酸)。将壳聚糖先溶解在配好的酸溶液中, 待壳聚糖完全溶解后, 取一定量的壳聚糖溶液与肉汤培养基混合, 使酸浓度为 0.2mol/L, 壳聚糖的浓度为 50mg/L; 调节 pH 值至 5.0, 每类酸的壳聚糖与培养基混合物配制 150ml, 每 50ml 装入 250ml 三角瓶中, 做成三个平行样。实验另设空白对照样品组, 将每种酸和培养基混合, 不加壳聚糖, 其余条件与上述相同。把金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别接种入经过灭菌的壳聚糖和培养基混合物, 保持细菌浓度在  $10^6 \sim 10^7$  CFU/ml。然后把实验样品组和对空白样品组的三角瓶放入振荡培养箱, 以 120r/min 的速度在 37℃ 下振荡培养。1h 后, 拿出三角瓶, 用平板计数法统计细菌活菌数, 并计算每种酸溶液的抗菌活性。

### 1.2.3 pH 值对壳聚糖抗菌活性的影响

将配制好的壳聚糖浓度为 1% 的醋酸溶液和肉汤培养基按照 1/9 的体积比混合后, 得到稀释 10 倍的混合物; 每个三角瓶装 50ml 培养基, 壳聚糖浓度为 1000mg/L; 用 10% NaOH 溶液分别调整 pH 值至 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5。每个 pH 值水平做三个平行样品, 另设一组空白对照样品, 不加壳聚糖, pH 调整至 4.0, 其余条件与上述相同。将两种病原菌分别接种入经过灭菌的混合物培养基, 细菌浓度保持在  $10^6$  CFU/ml 左右。在 610nm 波长下测试每组样品的初始吸光度值, 然后把两组样品放入振荡培养箱, 以 120r/min 的速度在 37℃ 下振荡培养, 分别在经过 4、12 和 24h 后, 测定样品的吸光度值, 用吸光度值的变化反应浓度的变化, 也就是细菌数量的变化。

### 1.2.4 金属离子对壳聚糖抗菌活性的影响

将一定量的壳聚糖溶于 1% 的醋酸溶液中后, 取一定量醋酸壳聚糖溶液与肉汤培养基混合; 分别加入一定量的  $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $ZnCl_2$  和  $MnCl_2$  溶液, 使每种金属离子的浓度都为 0.025mol/L, 壳聚糖浓度为 1000mg/L;

用 0.1mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 5.0, 以免金属离子沉淀析出。另设一组对照空白样品, 不加金属离子, 其余条件同上。含每种金属离子的实验样品以及空白对照样品都做三个平行试样。将大肠杆菌接种入经过灭菌的壳聚糖和培养基的混合物, 保持细菌浓度在  $10^6$  CFU/ml 左右。细菌培养方法以及细菌数量测定方法同以上 1.2.3 的方法。

### 1.2.5 离子强度对壳聚糖抗菌活性的影响

将一定量的壳聚糖溶于 1% 的醋酸溶液后, 取一定量醋酸壳聚糖溶液与肉汤培养基混合; 调整 pH 值至 5.2, 在三份样品中分别加入氯化钠, 使氯化钠浓度分别为 0.2、0.4 以及 0.6mol/L; 另设一组空白对照样品, 不加氯化钠, 其余条件与上述样品相同; 每个离子强度的样品和空白对照样品都做三个平行试样。将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别接种入经过灭菌的混合物培养基, 保持细菌浓度在  $10^6$  CFU/ml 左右。细菌培养方法以及细菌数量测定方法同以上 1.2.3 的方法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同酸溶液对壳聚糖抗菌活性的影响

壳聚糖的抗菌活性只有在它处于溶解状态后才能体现, 这一个溶解过程实际上壳聚糖在稀酸中成盐的过程, 酸只是起到提供质子的作用<sup>[2]</sup>。不同种类酸因酸性质不同以及解离度不同, 对壳聚糖成盐有着不同的影响。图 1 显示的是有壳聚糖的酸溶液对金黄色葡萄球菌的不同抗菌活性。

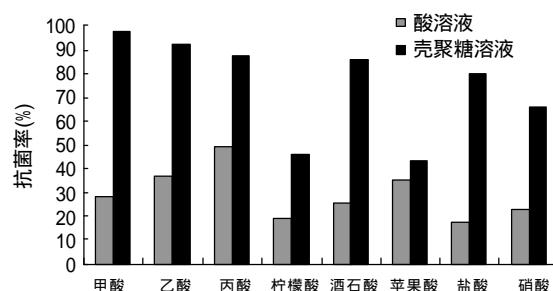


图1 不同酸溶液对壳聚糖作用金黄色葡萄球菌抗菌率的影响

对于不加壳聚糖的无机酸溶液对照实验, 硝酸要比盐酸更能抑制金黄色葡萄球菌的生长。属于一元羧酸的丙酸的抑菌性能最好, 乙酸其次, 甲酸最差。而在多元羧酸中, 苹果酸的抗菌性能最好, 酒石酸其次, 柠檬酸最差。总体而言, 有机酸较无机酸的抗菌性能要强, 而一元羧酸比多元羧酸更能抑制葡萄球菌的生长, 可能是因为小分子量的有机酸能渗透进入菌体细胞, 改变细胞膜的通透性, 进而影响细菌物质代谢并导致其死亡。

加入壳聚糖后,培养液对细菌的抑制作用大大增强。甲酸等一元羧酸的抗菌率接近了100%,这说明壳聚糖确实有抗菌活性。与单纯的溶剂酸抗菌活性相反,壳聚糖的甲酸溶液对金黄色葡萄球菌的抗菌活性达97.4%;壳聚糖乙酸溶液其次;壳聚糖丙酸溶液最弱,为87.6%。加入了壳聚糖的甲酸溶液有着极强的抗菌活性,这是因为甲酸能提供更多壳聚糖溶解所需的质子的原因<sup>[3]</sup>。三种多元羧酸中,壳聚糖的酒石酸溶液为85.9%,壳聚糖的柠檬酸和苹果酸溶液的抗菌率分别为45.9%和43.3%。这可能还是壳聚糖在不同酸溶液中溶解度不同造成的。壳聚糖的无机酸溶液比一元有机酸溶液的抗菌活性弱,但要强于柠檬酸和苹果酸两种多元有机酸,其中,壳聚糖的盐酸溶液的抑制作用强于硝酸溶液。无机酸本身无抗菌作用,它只是起到提供质子的作用,盐酸溶液比硝酸溶液更适合溶解壳聚糖,它的抗菌性也得到了更大的提高。壳聚糖酸溶液对大肠杆菌的抑制和以上情况大致相似。

## 2.2 pH 值对壳聚糖抗菌活性的影响

pH 值是溶液的重要性质,对于壳聚糖的可溶解性以及抗菌活性而言,pH 值也是至关重要的因素。由于强酸性对细菌生长本身具有一定的抑制作用,为了排除这一影响,实验的pH范围选定为4~6.5,在这个范围内,壳聚糖是可溶解的<sup>[4]</sup>。图2和图3分别是金黄色葡萄球菌和大肠杆菌培养液中pH值与吸光度值变化的关系图,图中显示,在培养的前12h内,除pH6的大肠杆菌培养液的浊度在下降以外,两种细菌培养液的浊度都在上升;12h以后的生长趋势却正好相反,金黄色葡萄球菌培养液的浊度还在上升,但大肠杆菌培养液却在下降,以此可以看出,革兰氏阳性菌和阴性菌对壳聚糖敏感性有着明显差异,壳聚糖对大肠杆菌的抑制有效性要强于对金黄色葡萄球菌的抑制效果。当pH=6.0时,两种细菌的浊度变化值都处于最小,也就是在这一条件下的壳聚糖其抗菌效果最佳。

壳聚糖是一种弱碱性聚电解质,它分子中 $-NH_3^+$ 的 $pK_a=6.2$ ,当环境pH高于6.2时,其有效抑菌基团会

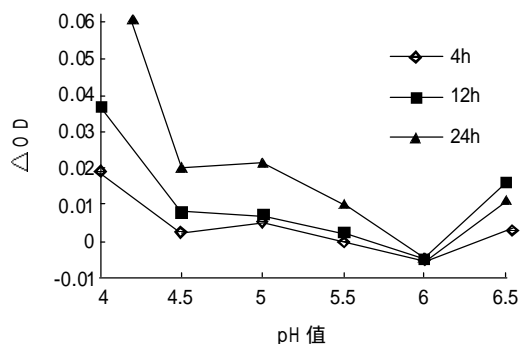


图2 pH值与金黄色葡萄球菌培养液吸光度变化值的关系

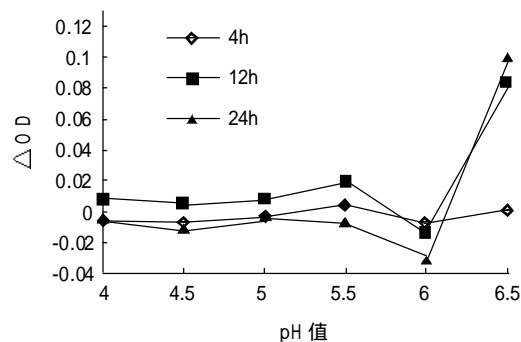


图3 pH值与大肠杆菌培养液吸光度变化值的关系

因为被中和而数量下降,这就造成抗菌活力下降;当环境pH低于6.2时,壳聚糖带有正电荷,它会在带有负电荷的细菌表面吸附,并与之反应,引起细菌表面电荷干扰而抑制其生长和繁殖<sup>[5]</sup>。但是,当环境pH过低时,由于大量的 $H^+$ 也会在细菌表面吸附,从而对壳聚糖的吸附产生抑制,同样造成了抑菌活性的下降<sup>[1]</sup>。pH 值对抗菌活性的影响可能与壳聚糖在细菌上的吸附有关。

## 2.3 金属离子对壳聚糖抗菌活性的影响

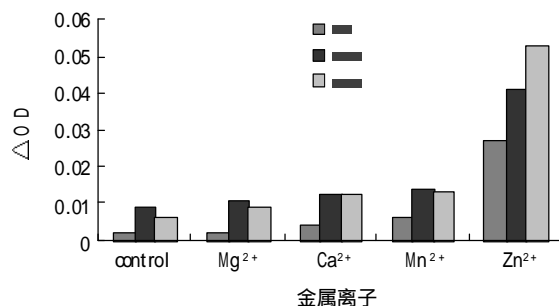


图4 金属离子与大肠杆菌培养液OD值变化的关系

图4表明金属离子与壳聚糖对大肠杆菌抗菌作用的影响,如图所示,随着培养时间的延长,培养基中的细菌浊度都在增大,金属离子的加入影响了壳聚糖的抑菌效果,其中 $Mg^{2+}$ 的影响最弱,而 $Zn^{2+}$ 的影响最明显, $Ca^{2+}$ 和 $Mn^{2+}$ 的影响介于两者之间, $Zn^{2+}$ 的影响已使壳聚糖的抑制作用完全失去,这种减弱作用主要是由于壳聚糖与上述多种金属离子发生螯合作用,而金属离子之间影响力的差别是与壳聚糖之间的螯合强度存在差异有关<sup>[2]</sup>。Bassi等人通过实验得出, $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 与壳聚糖的螯合浓度依次为90、48、43和32mg/g<sup>[3]</sup>,这与实验中得到影响强弱次序是一致的。由于金属离子对革兰氏阳性菌的抑制作用很强,在实验中,基本上观察不到金黄色葡萄球菌的数量有明显增加,这很大程度上干扰了对单纯的壳聚糖抗菌活性的研究,所以这里没有对金黄色葡萄球菌进行同样的实验。

## 2.4 离子强度对壳聚糖抗菌活性的影响

壳聚糖的抑菌作用多发生在溶液环境下,溶液中存

在着大量的离子化合物,由此引起的离子强度对壳聚糖的抑菌作用也有着很大的影响。实验证实,没有壳聚糖存在的情况下,0.6mol/L离子强度对于细菌生长没有明显的抑制作用,在有壳聚糖存在的情况下,随着培养液中离子强度的增大,壳聚糖的抗菌活性也在增强。图5和图6分别是离子强度与金黄色葡萄球菌和大肠杆菌培养液OD值变化的关系图,从图中可以看出,在刚开始培养的4h内,两种细菌数量都在上升,只是离子强度越高,细菌浊度上升越小;但经过更长时间的培养,有些培养液的浊度开始下降,也就是细菌数量开始减少,这一趋势在离子强度为0.6mol/L的培养液中最为显著。

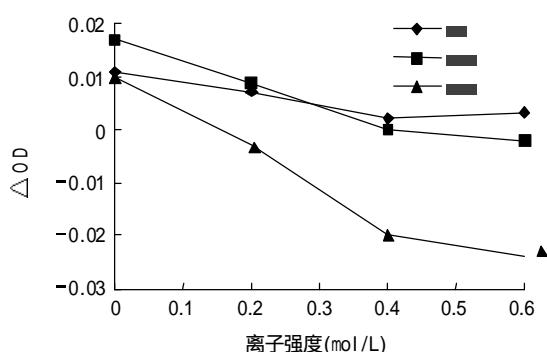


图5 离子强度(氯化钠)与金黄色葡萄球菌培养液吸光度值变化的关系

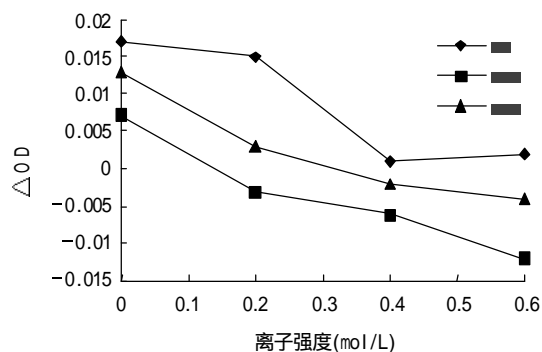


图6 离子强度(氯化钠)与大肠杆菌培养液吸光度值变化的关系

壳聚糖在pH值为5.2的条件下是以电解质的形式存在,高离子强度可以干扰壳聚糖分子间氢键的形成,分子间氢键越多,越不利于壳聚糖分子中 $-NH_3^+$ 的作用,这也说明壳聚糖的抑菌作用可能是通过 $-NH_3^+$ 的作用进

行的。同时高离子强度也降低了结晶区域的形成<sup>[6]</sup>,从而促进了壳聚糖的可溶解性,提高了其在培养液中的抗菌活性。有数据显示,0mol/L NaCl溶液中壳聚糖的溶解度为0.86g/L;0.6mol/L NaCl溶液中壳聚糖的溶解度上升至1.24g/L,实验结果与之是相符合的。

### 3 结论

(1)溶剂酸的种类对壳聚糖溶液的抗菌性能有着重要的影响。实验结果表明,有机酸比无机酸更有利于提高抗菌率,其中,碳数越少的一元有机酸对于增强壳聚糖溶液的抗菌率效果越明显。从提高抗菌效果这一角度讲,食品中常用的几种作为酸味剂使用的有机酸中,酒石酸最适用于作为壳聚糖的溶剂。(2)当pH在6.0时,最有利于发挥壳聚糖抗菌活力。(3)壳聚糖对锌离子的整合能力最强,它对壳聚糖抗菌性能的减弱作用也最为明显。(4)其它条件不变,壳聚糖溶液的离子强度越高,其抗菌效率也越高。

通过研究不同的非生物性因素对壳聚糖抗菌活力的影响,可以看出,壳聚糖是一种极具潜力的抗菌活性物质,它所具有的很多优势必将使它在食品领域得到更广泛的应用。

### 参考文献:

- [1] 杨冬芝,刘晓非,等.壳聚糖抗菌活性的影响因素[J].应用化学,2000,(6):598-602.
- [2] 夏文水.壳聚糖的生理活性及其在保健食品中的应用[J].中国食品学报,2003,(3):77-81.
- [3] Ying-Chien Chung, Huey-Lan Wang, et al. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens [J]. Bioresource Technology, 2003, 88: 179-184.
- [4] 刘艳如,余萍,郑怡.水溶性壳聚糖的抗菌作用研究[J].中国海洋药物,2001,(2):42-44.
- [5] I M Helander, E-L Nurmiaho-Lassila. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71: 235-244.
- [6] Hong Kyoom No, Na Young Park, et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 74: 65-72.