

# 壳聚糖及其金属锌配位络合物的抑菌性能研究

吴慧清, 吴清平\*, 石立三, 陈 威, 张菊梅

(广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070)

**摘 要:** 本研究在合成一种壳聚糖锌配合物后, 测试了合成的壳聚糖锌、合成原材料壳聚糖的抑菌效果, 以及不同 pH 条件对抑菌效果的影响, 并比较了壳聚糖锌和常见的食品防腐剂苯甲酸钠、山梨酸钾对大肠杆菌 ATCC8099、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、枯草杆菌黑色变种 ATCC9372、白色念珠菌 ATCC10231 和黑曲霉 ATCC16404 的最低抑菌浓度。结果表明: 合成的壳聚糖锌与合成前的壳聚糖相比抑菌性能大大提高; 合成后的壳聚糖锌对细菌的抑菌效果与常见的食品防腐剂苯甲酸钠、山梨酸钾相当, 但对真菌的抑制时效没有苯甲酸钠、山梨酸钾好。同时系统的 pH 对壳聚糖锌和壳聚糖都有较大的影响, 酸性条件下抑菌效果较好。

**关键词:** 壳聚糖锌; 抑菌性能; 苯甲酸钠; 山梨酸钾

## Study on Antimicrobial Capability of Chitosan-Zn Complex and Chitosan

WU Hui-qing, WU Qing-ping\*, SHI Li-san, CHENG Wei, ZHANG Ju-mei

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** One kind of chitosan-Zn complex was synthesized in this research, antimicrobial effect of the synthesized chitosan-Zn and the chitosan were tested under different pH condition, and the lowest antimicrobial concentration of the chitosan-Zn complex, sodium benzoate and sorbic acid potassium to *Escherichia coli* (ATCC8099), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Bacillus subtilis* (ATCC9372), *Candida albicans* (ATCC10231), *Aspergillus niger* (ATCC16404) were compared. The results showed that the antimicrobial effects of chitosan-Zn complex enhanced greatly and that were equivalent to sodium benzoate and sorbic acid potassium, but the antifungal effect of chitosan-Zn complex were some lower. Simultaneously systematic pH had tremendous influence to the antimicrobial effect of chitosan-Zn complex and chitosan, the antimicrobial effects were better under acidic condition.

**Key words:** chitosan-Zn; antimicrobial effect; sodium benzoate; potassium sorbate

中图分类号: O539.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)12-0075-04

壳聚糖是一种部分脱乙酰基的N-乙酰氨基葡萄糖聚合物, 本质上是一种具有特殊功能的天然可溶的纤维素衍生物。壳聚糖一般是从几丁质里提取出来, 而几丁质又是自然界中含量非常丰富的聚合糖类物质, 在自然界中含量仅低于纤维素, 可以从甲壳类动物、真菌、昆虫、环节动物、软体动物、腔肠动物中取得, 因此, 壳聚糖的来源非常广泛。1850年壳聚糖被发现以来, 许多科学家对其物理化学性质及功能进行了大量的研究, 但是早期的研究收效甚微。直到1970年, 科学家们又重新将目光集中到壳聚糖上, 研究它的各种功能以及应用。壳聚糖及其衍生物具有多种功能, 使它可

以在食品、医疗、化妆品、农业、环境保护、以及垃圾处理等许多领域得到应用。而且, 壳聚糖具有生物可降解性、无毒并且不会引起过敏反应, 使壳聚糖成为了一种非常有潜力的生物活性物质<sup>[1]</sup>。

壳聚糖和甲壳质有不同的化学结构, 但分子链上均有活性基团, 如氨基和羟基, 因此可修饰活化偶联生成各种衍生物, 化学修饰包括羟甲基化、羟基化、烷基化、酰基化、硫酸酯化、缩合反应、接枝与交联反应等。壳聚糖主要的衍生物主要包括羟甲基壳聚糖、壳聚糖的季铵盐、对羟基苯甲酸酯、壳聚糖的乳酸盐、壳聚糖的金属配合物及壳聚糖衍生物的金属配合物等<sup>[2]</sup>。

收稿日期: 2006-07-12

\*通讯作者

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B10501010)

作者简介: 吴慧清(1967-), 副研究员, 主要从事食品安全中微生物快速检测与控制技术研究。

通过化学修饰作用,在壳聚糖分子结构中引入了各种功能团,改善了它们的物化性质,从而具有不同的功能及效应,进一步拓宽了壳聚糖的使用范围<sup>[3]</sup>。

壳聚糖残基在C<sub>2</sub>位上有一个NH<sub>2</sub>基,C<sub>3</sub>位上有一个OH基,从构象上说,都是平伏键,这种特殊的结构,使它们对某些金属具有很强的螯合作用<sup>[4]</sup>,如硒、铜、锌、铅、铬等,Wang等发现壳聚糖金属离子配合物的抑菌活性优于壳聚糖<sup>[5]</sup>。其中壳聚糖锌是一种较为理想的补锌剂,壳聚糖硒是一种有机硒化合物,作为补硒剂,毒性较小,硒化壳聚糖对癌细胞具有明显的抑制作用<sup>[6]</sup>。本文对不同分子量的壳聚糖、壳聚糖锌配合物和常见的化学型食品防腐剂苯甲酸钠、山梨酸钾的抑菌性能进行比较,探讨将壳聚糖、壳聚糖锌配合物作为食品防腐剂的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

壳聚糖A(简称CSA) 上海伯奥生物科技有限公司,粘度<100cps,脱乙酰度90.0%;壳聚糖B(简称CSB) SCRC 国药集团化学试剂有限公司,粘度50.0~800.0 mPa·s;苯甲酸钠(简称B-N)(食品添加剂,食品级) 广东环凯微生物科技公司;山梨酸钾(简称S-K)(食品添加剂,食品级) 广东环凯微生物科技公司。

ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O及其它试剂均为国产分析纯。

营养琼脂、营养肉汤、沙氏琼脂、液体沙氏培养基 广东环凯微生物科技公司。

### 1.2 测试菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC8099、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC6538、枯草芽孢杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis*)ATCC9372、白色念珠菌(*Candida albicans*)ATCC10231、黑曲霉(*Aspergillus niger*)ATCC16404。

### 1.3 仪器

通风橱、可加热型磁力搅拌机、冷凝装置、真空干燥箱等、常规微生物培养与灭菌设备。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 壳聚糖锌的合成

0.5g CSA、0.5g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O和0.5g水合柠檬酸加入到50ml冰乙酸中,用氨水调pH至4.5左右,磁力搅拌器上80℃恒温搅拌3h,冷却至室温,混合物倒入200ml丙酮中,过滤,沉淀用200ml 95%乙醇洗涤,再用200ml去离子水洗涤,60℃真空干燥至恒重,备用。

#### 1.4.2 菌悬液的制备

培养好的斜面试管种,用生理盐水洗下菌苔,显微计数,稀释到合适浓度后备用。

#### 1.4.3 试管法测试抑菌性能

待测样品用0.3%(V/V)盐酸溶液加热溶解配成10g/L,121℃、15min灭菌后加入无菌试管营养肉汤或液体沙氏培养基中,并用培养基进行对倍稀释至0.0156g/L,每管2ml,接种0.1ml菌悬液,细菌于37℃培养,真菌于30℃培养,肉眼观察指示菌的生长状态;

待测样品用0.3%盐酸水溶液加热溶解配成10g/L,并用0.3%盐酸水溶液稀释至0.0156g/L,培养基配成双料,灭菌后按1:1比例加入不同浓度的抑菌物质,每管5ml,接种0.1ml菌悬液,细菌于37℃培养,真菌于30℃培养,肉眼观察指示菌的生长状态。

## 2 结果与分析

### 2.1 壳聚糖、壳聚糖锌的抑菌性能测试

用试管法测试壳聚糖A、CS-Zn的抑菌性能,2.0ml含抑菌物质的试管中加0.1ml菌悬液,系统中指示菌浓度为5.0×10<sup>6</sup>cells/ml。结果见表1。

表1 壳聚糖、壳聚糖锌的抑菌性能测试结果(MIC, g/L)  
Table 1 Antimicrobial results of chitosan-Zn complex and chitosan(MIC, g/L)

材料	测试菌株		
	8099	6538	9372
CS-Zn	0.625	0.313	0.625
CS(A)	1.25	2.5	2.5

结果表明:壳聚糖锌的抑菌性能比合成它的壳聚糖的抑菌性能提高了2~8倍。为了证明壳聚糖、壳聚糖锌是否具有杀菌功能还是只有抑菌效果,将上述各管均取1ml倒平板,结果均有菌生长,证明上述浓度为抑菌临界值,并不是具备杀菌功效。

### 2.2 不同pH条件下壳聚糖及金属锌复合物的抗菌效果测试

营养肉汤培养基用0.1mol/L柠檬酸溶液调节pH到5.0、5.5和6.0,营养肉汤培养基的自然pH为7.0,试验采用试管法A。2.0ml含抑菌物质的试管中加0.1ml菌悬液,系统中指示菌为大肠杆菌ATCC8099,浓度为5.0×10<sup>6</sup>cells/ml,不同pH条件下壳聚糖和壳聚糖锌的抑菌性能见表2。

结果表明:pH对壳聚糖和壳聚糖锌配合物抑菌效果均有较大的影响,酸性pH条件下,两者的抑菌性能均比7.0时有较大的提高,而对壳聚糖锌来说,随着时间的延长更加显示出抑菌性能的优势。

### 2.3 酸性条件下壳聚糖及金属锌复合物的抑菌性能

营养肉汤培养基用0.1mol/L柠檬酸溶液调节pH到5.5,试验采用试管法A,2.0ml含抑菌物质的试管中加0.1ml菌悬液,系统中指示菌浓度约为5.0×10<sup>6</sup>cells/ml,

表2 不同pH对壳聚糖及金属锌复合物抑菌效果测试结果(MIC, g/L)  
Table 2 Effect of pH value on antimicrobial results of chitosan-Zn complex and chitosan(MIC, g/L)

材料	pH	培养时间(h)		
		18	42	112
CS-Zn	5.0	0.156	0.156	0.156
	5.5	0.156	0.156	0.625
	6.0	0.156	0.156	0.313
	7.0	0.625	1.25	2.5
CSA	5.0	0.156	0.156	0.156
	5.5	0.156	0.313	0.625
	6.0	0.156	0.625	> 2.5
	7.0	> 2.5	> 2.5	> 2.5

测试壳聚糖和壳聚糖锌复合物对大肠、金葡和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度(g/L)变化,测试结果见表3。

表3 不同培养时间壳聚糖及金属锌复合物抑菌效果测试结果(MIC, g/L)

Table 3 Antimicrobial results of chitosan-Zn complex and chitosan at different culture time (MIC, g/L)

材料	菌株	培养时间(h)		
		18	42	112
CS-Zn	ATCC8099	0.156	0.156	0.625
	ATCC 6538	0.156	0.156	0.313
	ATCC 9372	0.156	0.156	0.156
CS(A)	ATCC 8099	0.156	0.313	0.625
	ATCC 6538	0.156	0.156	> 2.5
	ATCC 9372	0.156	0.156	> 1.25

结果表明:随着时间的延长可看出壳聚糖锌和壳聚糖对三种指示菌的抑制有所差异,壳聚糖锌具有较好的抑菌性能,特别是对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌。

#### 2.4 不同壳聚糖抑菌性能比较

在pH7.0液体肉汤培养基中以试管法A测试两种壳聚糖的最小抑菌浓度,结果见表4。

表4 不同壳聚糖抑菌性能比较结果(MIC, g/L)  
Table 4 Antimicrobial results of different chitosans(MIC, g/L)

种类	培养时间(d)		
	1	2	3
CS(A)	2.5	2.5	> 2.5
CA(B)	> 2.5	> 2.5	> 2.5

结果表明:两种不同壳聚糖的抑菌性能有差异,这与壳聚糖的分子量和纯度有关。

#### 2.5 壳聚糖锌复合物与常见食品防腐剂苯甲酸钠和山梨酸钾的抑菌性能比较

用试管法(B)测试壳聚糖锌、苯甲酸钠(B-N)和山梨酸钾(S-K)对5种指示菌的抑菌性能,双料营养琼脂按1:1比例加入0.3%盐酸水溶液后,通过精密pH试纸测得的pH值为4.5左右,双料沙氏液体培养基按1:1比例加入0.3%盐酸水溶液后的pH值为3.0左右,抑菌结果

表5 壳聚糖锌复合物和苯甲酸钠、山梨酸钾对大肠杆菌(ATCC8099)的抑制效果(MIC, g/L)

Table 5 Antimicrobial results of chitosan-Zn complex, sodium benzoate and sorbic acid potassium to *Escherichia coli* ATCC8099(MIC, g/L)

名称	培养时间(d)			
	1	2~4	6	7
CS-Zn	0.156	0.156	> 0.625	> 0.625
S-K	< 0.313	< 0.313	0.625	0.625
B-N	< 0.313	< 0.313	< 0.313	0.625

表6 壳聚糖锌复合物和苯甲酸钠、山梨酸钾对金黄色葡萄球菌(ATCC6538)的抑制效果(MIC, g/L)

Table 6 Antimicrobial results of chitosan-Zn complex, sodium benzoate and sorbic acid potassium to *Staphylococcus aureus* ATCC6538(MIC, g/L)

名称	培养时间(d)					
	1	2	3	4	6	7
CS-Zn	0.078	0.078	0.078	0.078	0.156	0.156
S-K				< 0.313		
B-N				< 0.313		

表7 壳聚糖锌复合物和苯甲酸钠、山梨酸钾对枯草杆菌(ATCC9372)的抑制效果(MIC, g/L)

Table 7 Antimicrobial results of chitosan-Zn complex, sodium benzoate and sorbic acid potassium to *Bacillus subtilis* ATCC9372(MIC, g/L)

名称	培养时间(d)					
	1	2	3	4	6	7
B-N				< 0.313		
S-K				< 0.313		
CS-Zn	0.078	0.078	0.078	0.078	0.156	0.156

表8 壳聚糖锌复合物和苯甲酸钠、山梨酸钾对黑曲霉(ATCC16404)的抑制效果(MIC, g/L)

Table 8 Antimicrobial results of chitosan-Zn complex, sodium benzoate and sorbic acid potassium to *Candida albicans* ATCC16404(MIC, g/L)

名称	培养时间(d)					
	1	2	3	4	6	7
CS-Zn	0.625	1.25	> 1.25	> 1.25	全长菌圈	全长菌圈
S-K	1.25	5	5.0	5.0	> 5.0	> 5.0
B-N	0.625	0.625	> 5.0	> 5.0	> 5.0	> 5.0

表9 壳聚糖锌复合物和苯甲酸钠、山梨酸钾对白色念珠菌(ATCC10231)的抑制效果(MIC, g/L)

Table 9 Antimicrobial results of chitosan-Zn complex, sodium benzoate and sorbic acid potassium to *Aspergillus niger* ATCC10231(MIC, g/L)

名称	培养时间(d)					
	1	2	3	4	6	7
B-N	0.625	0.625	2.5	2.5	> 5.0	> 5.0
S-K	0.625	0.625	5.0	5.0	> 5.0	> 5.0
CS-Zn	0.625	1.25	> 1.25	全长菌圈	全长菌圈	全长菌圈

见表5~9。系统菌量均为 $1 \times 10^6$  cell/s/ml。

表5~9实验结果表明:CS-Zn对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌性能最好,对大肠杆菌的抑菌效果次之,这与常见的食品防腐剂苯甲酸钠、山梨酸钾差不多,但对真菌的抑制时效比苯甲酸钠、山梨酸钾稍差。

### 3 讨 论

本研究合成的壳聚糖锌与合成前的壳聚糖相比抑菌性能大大提高,抑菌时间大大延长,与文献报道相符<sup>[7,8]</sup>,合成后的壳聚糖锌对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌抑菌性能最好,对大肠杆菌抑菌效果次之,与常见的食品防腐剂苯甲酸钠、山梨酸钾相当,但对真菌的抑制时效没有苯甲酸钠、山梨酸钾好。另外抑菌性能测试效果与测试方法本身及系统中的指示菌浓度有关,合成的壳聚糖锌的抑菌效果在不同实验中显示出抑菌性能的差异,与已有的报道也有一定的出入<sup>[9~11]</sup>,但同样显示出了壳聚糖金属配合物的抑菌性能较合成前的壳聚糖有明显的改进,壳聚糖锌和壳聚糖抑菌效果均与系统的pH有关,酸性条件下抑菌效果较好。

壳聚糖是一种安全无毒、具有生物相容性、生物降解性和生物黏附性的高分子材料,是自然界中存在的唯一高分子碱性氨基多糖。利用其对金属离子的吸附性,可合成壳聚糖锌配合物,它不仅是一种有机补锌产品,还具有优良的抑菌防腐性能,有望在功能性食品中作为天然防腐剂。合成后的壳聚糖锌比原来的壳聚糖溶解度增加,对细菌的抑菌效果增强,但对真菌的

抑菌性能比常规化学型防腐剂差一些,可通过复配方法解决。

### 参考文献:

- [1] 钟振兵,陈克利.壳聚糖的研究进展及在医药食品上的应用[J].云南中医中药杂志,2005,26(5):48-50.
- [2] 赵玉清,邵金凤,海华,等.壳聚糖的抑菌性研究[J].中国生物工程杂志,2005,25(5):67-70.
- [3] 熊远珍,湛学军,柳喆.羧甲基壳聚糖银、锌、铈的合成及抑菌实验的研究[J].药物生物技术,2004,11(6):361-363.
- [4] 林友文,陈伟,罗红斌,等.羧甲基壳聚糖对锌离子的吸附作用研究[J].海峡药学,2000,112(3):70-72.
- [5] 曹佐英,赖声礼,曹珍年.微波辐射下壳聚糖Zn配合物的合成[J].现代化工,1999,19(11):24-27.
- [6] 况伟.低聚水溶性壳聚糖与锌的络合[J].食品与机械,2006,22(1):15-17.
- [7] Li an-Ying Zheng, Ji ang-Feng Zhu. Study on anti mi cro bi al acti vi ty of chi to san wi th di fferent mol e cul ar wei ghts[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54: 527-530.
- [8] Cai qin, Hui rong Li, Qi xiao, et al. Water-solubility of chi to san and its anti mi cro bi al acti vi ty[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 63: 367-374.
- [9] S Rol ler, Ncovi l l. The anti fungal properties of chi to san in laboratory medi a and appl e jui ce[J]. Internati onal J ourna l of Food Mi cro bi ol ogy, 1999, 47: 67-77.
- [10] Xi aohui Wang, Yumi n Du, Hui Li u. Preparati on, characteri zati on and anti mi cro bi al acti vi ty of chi to san-Zn compl ex[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 56: 21-26.
- [11] Xi aohui Wang, Yumi n Du, Li hong Fan, et al. Chi to san-metal compl exes as anti mi cro bi al agent: synthesi s, characteri zati on and structure-acti vi ty study[J]. Polymer Bul l et i n, 2005, 55: 105-113.



## 信 息

# 木糖醇有助于孕妇及婴儿防龋齿

食用木糖醇有助预防龋齿。日本专家最新证实,孕妇从怀孕到产后如果经常摄取木糖醇,孩子出生后受龋齿菌感染的几率就会降低。

龋齿菌分解糖分产生酸,这种酸可溶解牙齿造成龋齿。之前有报告说,当婴儿开始长乳牙时,就会出现感染龋齿菌的危险。婴儿一旦被感染,日后出现龋齿的可能性就很大,而越迟感染龋齿菌,将来就越不易患龋齿。

据日本《读卖新闻》报道,冈山大学研究人员在实验中将感染龋齿菌数量较多的84名孕妇分成两组,一组每天咀嚼含木糖醇的口香糖4次以上,每次持续约5min,而另一组则完全不摄取木糖醇。两组孕妇从怀孕6个月起参与实验,一直坚持到孩子出生后9个月。

结果显示,不摄取木糖醇的一组中,其孩子到1岁时有76.9%感染龋齿菌,到1岁半时,则有91.7%的孩子受到感染。相比之下,摄取木糖醇的一组中,其孩子在1岁和1岁半时感染龋齿菌的概率分别只为15%和42.9%。

婴儿感染龋齿菌的主要原因是,患龋齿的母亲用自己嚼烂的食物喂孩子或与孩子共用餐具。此前,芬兰专家研究认为,母亲在产后头两年每天咀嚼木糖醇口香糖,能明显减少把龋齿菌传染给婴儿的危险。而日本专家的这次研究还证实,孕妇坚持这么做对预防婴儿龋齿同样有效。