

O-羧甲基壳聚糖的制备及对黑曲霉生长的影响

李小芳, 冯小强, 杨 声*

(天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741001)

摘 要: 采用红外光谱法对合成的 O-羧甲基壳聚糖(OCMC)进行表征, 研究壳聚糖及 OCMC 对黑曲霉生长的影响。结果表明: 当培养基中添加 OCMC, 作用第 1 天时, 可以有效的抑制黑曲霉菌落的生长; 当 OCMC 质量浓度为 1.0mg/mL 时, 对黑曲霉生长的抑制能力最强; 壳聚糖和 OCMC 能与 ct-DNA 发生相互作用, 导致 ct-DNA 双螺旋结构被破坏。

关键词: O-羧甲基壳聚糖; 黑曲霉; 抑制; DNA

Synthesis of O-Carboxymethyl Chitosan and Its Effect on the Growth of *Aspergillus niger*

LI Xiao-fang, FENG Xiao-qiang, YANG Sheng*

(College of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China)

Abstract: O-carboxymethyl chitosan (OCMC) was prepared and characterized by IR spectroscopy. The effect of OCMC on the growth of *Aspergillus niger* was also investigated. Results indicated that an obvious inhibitory effect of OCMC on the growth of *Aspergillus niger* was observed after 1 day of cultivation on agar plates with the addition of OCMC. OCMC at the concentration of 1.0 mg/mL exhibited the strongest inhibitory effect. The interaction between chitosan or OCMC and ct-DNA could result in the structural damage of ct-DNA.

Key words: O-carboxymethyl chitosan; *Aspergillus niger*; inhibitory activity; DNA

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)11-0077-04

壳聚糖(CTS)是甲壳素脱乙酰化的产物, 能有效抑制细菌和真菌的生长^[1-3]。此外, 与一般抑菌剂相比, 壳聚糖具有抑菌活性高、广谱、杀灭率高及对哺乳动物细胞毒性低等优点^[4]。由于壳聚糖只能溶解于酸性溶剂, 这极大地限制了它的应用范围, 因此, 制备能溶解于酸性和碱性生理环境的壳聚糖衍生物具有十分重要的意义。

目前, 对于壳聚糖及其衍生物抑菌性能的研究主要集中在对细菌的抑制方面^[5-7], 而对抑制真菌生长的研究较少。黑曲霉(*Aspergillus niger*)属半知菌亚门真菌, 菌落初为白色, 后为黑色, 分生孢子球形, 碳黑色, 能使水分较高的粮食霉变。本实验拟合成水溶性 O-羧甲基壳聚糖(OCMC), 研究其对黑曲霉生长的影响, 旨在为明确壳聚糖及其衍生物的抑制真菌机理提供参考。

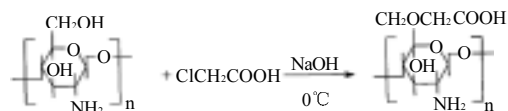
壳聚糖(相对分子质量 5×10^4 , 脱乙酰度 95%) 浙江玉环壳聚糖有限公司。

氯乙酸 天津市化学试剂一厂; 小牛胸腺 DNA (calf thy-mus DNA, ct-DNA) 美国 Sigma 公司; 马铃薯固(液)培养基。

UV-2450 紫外光谱仪 日本岛津公司; Spectrum One B 傅里叶红外分光光度计 Perkin Elmer 公司。

1.2 OCMC 的制备

1.0g 壳聚糖与 25mL 42% 的 NaOH 溶液加入到 100mL 的三口烧瓶中, 冰水浴搅拌 2h 使壳聚糖充分溶胀; 缓慢滴加含氯乙酸 2.0g 的异丙醇溶液 25mL, 控制在 30min 内滴加完, 在 0~15℃ 温度内继续搅拌 4h 后, 用浓盐酸调节 pH 值至 7.0, 抽滤、洗涤、真空烘干得到 OCMC。其反应机理为:



1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期: 2009-09-15

基金项目: 甘肃天水师范学院物理无机化学重点学科基金资助项目

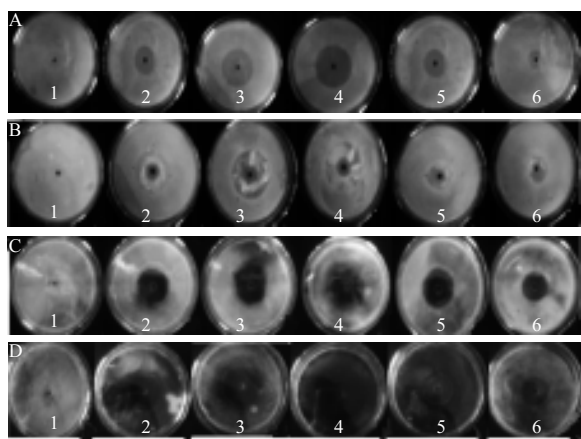
作者简介: 李小芳(1983—), 女, 助教, 硕士, 主要从事天然高分子生物活性研究。E-mail: lix_f06@tzu.cn

* 通信作者: 杨声(1963—), 男, 教授, 硕士, 主要从事天然高分子生物活性及电化学研究。E-mail: ysh@mail.tsnc.edu.cn

能够被抑制或延迟, 且随着 OCMC 质量浓度(0.1~1.0mg/mL)的增加, 培养基中央出现的透明圈逐渐增大, 黑曲霉菌落的径向生长减慢, 而当 OCMC 的质量浓度大于 1.0mg/mL 时, 随着 OCMC 质量浓度的增加, 培养基中央出现的透明圈却逐渐减小, 表明当 OCMC 的质量浓度为 1.0mg/mL 时, 对黑曲霉生长的抑制能力最强。

当黑曲霉培养至第2天(图2B),在透明圈内局部有浅黄色的菌落长出,且较外围的黑曲霉生长旺盛。这表明:一方面,OCMC抑菌作用的持续性与处理时间相关,OCMC对黑曲霉的抑制作用随处理时间的增加而降低。另一方面,当OCMC对黑曲霉作用一定时间后,不但没有抑菌作用,反而会促进其生长。

当黑曲霉培养至第3天时(图2C),在透明圈内部有大量的菌落长出,呈炭黑色,较外围的黑曲霉生长更加旺盛,而外围的黑曲霉少许呈炭黑色,表明OCMC能够刺激黑曲霉孢子的形成。当黑曲霉培养至第4天时(图2D),在透明圈内部黑曲霉菌落生长较外围更加旺盛茂密,大量孢子出现,几乎覆盖了整个培养基。



1~6. OCMC 质量浓度分别为: 0、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0mg/mL。

图2 OCMC对黑曲霉的抑制作用

Fig.2 Effect of OCMC on the growth of *Aspergillus niger*

有关壳聚糖对黑曲霉生长的影响,前期研究发现壳聚糖对黑曲霉的抑制作用与其相对分子质量和质量浓度有关。随壳聚糖相对分子质量的逐渐增大,对黑曲霉的抑制效果逐渐减弱;高相对分子质量和高质量浓度的壳聚糖对黑曲霉不仅没有抑制作用,反而会促使其生长;只有在适当低质量浓度下的一定相对分子质量壳聚糖才对黑曲霉有抑制作用。研究发现,质量浓度1.0mg/mL,相对分子质量为 5.0×10^4 的壳聚糖对黑曲霉的抑制作用最强,黑曲霉核内出现了明显的空腔,细胞外壁加厚,细胞内部发生了局部破损,对黑曲霉的抑制作用主要是由于抑制了黑曲霉孢子的萌发和抑制了DNA向RNA转

录引起的。而相对分子质量为 1×10^6 的壳聚糖与黑曲霉作用后,加速了黑曲霉的细胞分裂,对黑曲霉的生长不但没有抑制作用,反而促进了生长,细胞内腔一切完好无损^[9]。

已有研究表明:当培养基中添加壳聚糖时,真菌菌落的生长能够被抑制或延迟。如随着壳聚糖质量浓度(0.75~6.0mg/mL)的增加, *Alternaria alternata*、*Botrytis cinerea* 和 *Rhizopus stolonifer* 菌落的径向生长减慢^[10]。当壳聚糖的质量浓度从1g/100mL增加到4g/100mL时,在 *Sclerotinia sclerotiorum* 上也得到了相同的结果^[11]。同时还发现当壳聚糖的质量浓度从0.5mg/mL到6.0mg/mL逐渐增加时, *Rhizoctonia stolonii* 的生长呈线性降低^[12]。壳聚糖对不同病原物菌落生长的抑制质量浓度也存在差异。*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* 和 *Fusarium solani* f. sp. *pisi* 的菌落生长能在壳聚糖分别为12mg/mL和18mg/mL的低质量浓度下被抑制^[13-14],而要完全抑制 *F. oxysporum*、*R. Stolonifer*、*Penicillium digitatum* 和 *C. gloeosporioides* 的生长,质量浓度需高达3g/100mL^[15-17]。壳聚糖抑菌作用的持续性也与质量浓度和处理时间相关,如在低质量浓度下(1.0mg/mL和2.0mg/mL),壳聚糖对 *Fusariumoxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* 的抑制作用随处理时间的增加而降低^[18],而对 *A. niger* 壳聚糖的作用依赖于处理时间(168h)^[19]。同种类的真菌对壳聚糖的敏感性不同, *R. nigricans* 对壳聚糖不敏感,相反在含有壳聚糖的培养基上 *R. nigricans* 的生长被抑制^[20]。一般而言,壳聚糖处理的真菌产孢能力低于未处理的真菌。此外,有些研究报道壳聚糖处理后未发现孢子形成。壳聚糖对孢子形成的抑制已经在 *F. oxysporum*、*R. Stolonifer*、*C. gloeosporioides*、*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* 和 *A. niger* 进行了报道^[9,15,17,19,21]。同时研究还发现,1.5~100μg/g的壳聚糖能显著降低 *B. cinerea* 孢子活力^[22]。将预先经100~1000μg/g壳聚糖处理的 *Puccinia arachidis* 通过连续的蒸馏水冲洗,发现其孢子的萌发率降低,表明壳聚糖对孢子活力的抑制具有长效作用^[23]。

2.3 壳聚糖及 OCMC 与 ct-DNA 作用的紫外光谱

含有碱基生色团双螺旋结构的 DNA 分子, 其 UV-Vis 吸收光谱在波长 260nm 附近有强吸收峰, 某些小分子亦有吸收谱带, 可根据相互作用前后 DNA 或其他分子吸收谱带的变化对二者相互作用模式进行判断。对 DNA 的吸收光谱来说, 如果导致分子的轴向变化即其构象变化, 则产生减色效应及红移现象, 且作用越强减色效应越明显; 如果导致 DNA 双螺旋结构的破坏, 则产生增色效应^[24]。对于外来分子的特征吸收谱带, 若该分子与 DNA 发生嵌插作用, 则该分子的吸收光谱发生减色效应和红移现象, 且作用越强减色效应越明显; 若该分子与 DNA 发生静电作用, 紫外吸收光谱峰将出

现较小的红移,且减色效应不明显^[25]。

配制 1.0mg/mL 的 DNA 贮备液,其纯度为 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}=1.87$ 。如图 3 所示,壳聚糖和 OCMC 在波长 260nm 附近没有紫外吸收,ct-DNA 在波长 260nm 附近有一强的吸收峰。随着壳聚糖或 OCMC 的加入,其吸收峰强度与 ct-DNA 吸收峰强度相比明显增强。结果表明壳聚糖和 OCMC 与 ct-DNA 之间发生相互作用,导致 ct-DNA 双螺旋结构被破坏。

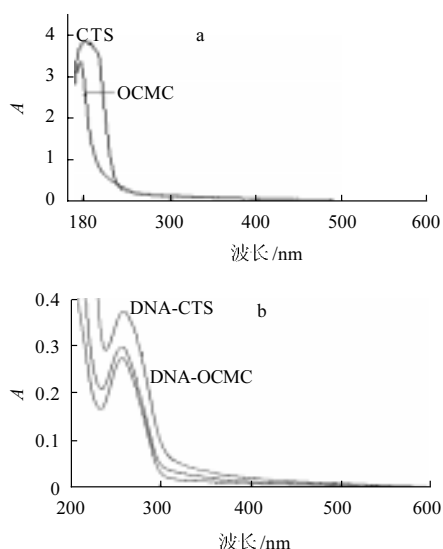


图3 壳聚糖及 OCMC 与 ct-DNA 作用的紫外光谱图

Fig.3 UV spectra of chitosan, OCMC and their respective complexes with ct-DNA

3 结 论

OCMC 和黑曲霉作用第 1 天,可以有效的抑制或延迟菌落的生长。OCMC 质量浓度为 1.0mg/mL 时,对黑曲霉生长的抑制能力最强;随着作用时间的延长,在透明圈内长出的菌落数逐渐增多,且较外围黑曲霉生长更加旺盛;当作用第 4 天时,有大量孢子出现。结果表明:OCMC 初始与黑曲霉作用能够抑制、延迟菌落的生长,随着作用时间的延长,能够刺激黑曲霉孢子的形成,使黑曲霉的生长相对更加旺盛。

壳聚糖和 OCMC 与 ct-DNA 之间发生相互作用,导致 ct-DNA 双螺旋结构被破坏,抑菌机理还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] CHUNG Yingchien, WANG Hueylan, CHEN Yenmeng, et al. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens[J]. Bioresource Technology, 2003, 88: 179-184.
- [2] RABEA E I, BADAWY M E T, STEVENS C V, et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action[J]. Biomacromolecules, 2003, 4(6):1457-1465.
- [3] LI Bin, WANG Xiao, CHEN Ruoxia, et al. Antibacterial activity of

- chitosan solution against *Xanthomonas pathogenic* bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(2): 287-292.
- [4] KIM C H, KIM S Y, CHOI K S. Synthesis and antibacterial activity of water-soluble chitin derivatives[J]. Polymers of Advanced Technologies, 1997(8): 319-325.
- [5] LI Yan, CHEN Xiguang, LIU Nan, et al. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 67(2): 227-232.
- [6] KONG Ming, CHEN Xiguang, LIU Chengsheng, et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 65(2): 197-202.
- [7] YANG Tsuichu, CHOU Chengchun, LI Chinfung. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 97(3): 237-245.
- [8] 陈凌云, 杜子民, 肖玲, 等. 羧甲基壳聚糖的取代度及保湿性[J]. 应用化学, 2001, 18(1): 5-8.
- [9] LI Xiaofang, FENG Xiaoqiang, YANG Sheng, et al. Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against *Aspergillus niger*[J]. Iranian Polymer Journal, 2008, 17(11): 843-852.
- [10] GHASOUTH A E I, ARUL J, ASSELIN A, et al. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*[J]. Mycological Research, 1992, 96(9): 769-779.
- [11] CHEAH L H, PAGE B B C, SHEPERD R. Chitosan coating for inhibition of clerotinia carrots[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1997, 25: 89-92.
- [12] WADE H E, LAMONDIA J A. Chitosan inhibits *Rhizoctonia fragariae* but not strawberry black root rot[J]. Advances in Strawberry Research, 1994, 13: 26-31.
- [13] HADWIGER L A, BEEKMAN J M. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions[J]. Plant Physiology, 1980, 66: 205-211.
- [14] KENDRA D F, HADWIGER L A. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation by *Pisum sativum*[J]. Experimental Mycology, 1984(8):276-281.
- [15] BAUTISTA S, HERNANDEZ-LOPEZ M, BOSQUEZ-MOLINA E, et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit[J]. Crop Protection, 2003, 22(9):1087-1092.
- [16] BAUTISTA-BAÑOS S, BRAVO-LUNA Y L. Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento[J]. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 2004, 6(1): 63-67.
- [17] BAUTISTA-BANOS S, HERNANDEZ-LOPEZ M, BOSQUEZ-MOLINA E. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts[J]. Mexican Journal of Phytopathology, 2004, 22:178-186.
- [18] BENHAMOU N, THERIAULT G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root pathogen *Fusarium oxysporum* sp. *radicis-lycopersici*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1992, 41(1): 33-52.
- [19] PLASCENCIA-JATOMEA M, VINIEGRA G, OLAYO R, et al. Effect of chitosan and temperature on spore germination on *Aspergillus niger* [J]. Macromolecular Bioengineering, 2003, 3(10): 582-586.
- [20] ALLAN C R, HADWIGER L A. The fungicidal effect on fungi of varying cell wall composition[J]. Experimental Mycology, 1979, 3(3): 285-257.
- [21] REDDY B M V, ARYL J, AIT-BARKA E, et al. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternate* sp. *lycopersici*[J]. Biocontrol Science and Technology, 1998, 8(1): 33-43.
- [22] BEN-SHALOM N, AIDI R, PINTO R, et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan[J]. Crop Protection, 2003, 22(2): 285-290.
- [23] SATHIYABAMA M, BALASUBRAMANIAN R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg[J]. Crop Protection, 1998, 17(4): 307-313.
- [24] 杜江燕, 黄晓华, 徐飞, 等. 碱基与 DNA 分子作用机理的光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(9): 1435-1438.
- [25] 张芳, 张前前, 祝陈坚, 等. 铜(II)-苏氨酸-邻菲罗啉配合物的合成及其与 DNA 作用的光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(9): 1439-1442.