

doi:10.16055/j.issn.1672-058X.2020.0003.002

壳聚糖稳定性及抑菌作用研究*

宋俊梅^{1,2}, 张 昕¹, 高玉荣¹

(1. 巢湖学院 化学与材料工程学院, 合肥 238000;

2. 上海海虹实业(集团)巢湖今辰药业有限公司, 合肥 238000)

摘 要:研究壳聚糖在不同处理条件下,其稳定性和抑菌作用的变化;以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为实验菌种,主要考察的影响因素包括:壳聚糖浓度(壳聚糖浓度范围 0~20 g/L)、温度(冰浴,25 ℃,60 ℃,121 ℃)、金属离子种类(NaCl,MgCl₂,FeCl₃)和浓度(0.1 mol/L,0.2 mol/L,0.3 mol/L,0.4 mol/L,0.5 mol/L)、酸溶剂(HAc、HCl、柠檬酸),滤纸片琼脂扩散法测定各影响因素下,壳聚糖的稳定性及抑菌作用的变化;结果表明:随着壳聚糖浓度的增加,抑菌作用逐渐增强;不同温度下,壳聚糖均能保持较好的稳定性;金属离子种类和浓度对壳聚糖的性能有一定的抑制作用;不同酸溶剂溶解壳聚糖时,其稳定性和抑菌作用存在一定的差异。

关键词:壳聚糖;稳定性;抑菌作用;影响因素

中图分类号:Q93

文献标志码:A

文章编号:1672-058X(2020)03-0017-06

0 引 言

几丁质(chitin)在碱性条件下脱 N-乙酰基,且达到一定的脱乙酰度时称之为壳聚糖(chitosan),壳聚糖又称几丁聚糖,且壳聚糖只溶解于某些酸^[1]。壳聚糖广泛存在,作为一种天然产物,在生活中的多个领域应用广泛。壳聚糖具有良好的组织相容性、无毒性,特别是壳聚糖具有减少体内胆固醇、降低血压、修复组织的作用,是医药研究和开发的重要资源^[2-3];目前,壳聚糖也是食品中的重要添加剂,起到抑制食品微生物生长、澄清、保鲜等作用^[4-6]。随着人们对壳聚糖的深入研究,工业中利用壳聚糖的吸附作用和螯合作用,使水污染中的金

属离子与其形成螯合物,达到降低水污染中的离子浓度的作用^[7-9]。主要研究壳聚糖的稳定性和抑菌作用,受试菌选择大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,研究壳聚糖浓度、处理温度、金属离子、酸溶剂对壳聚糖的影响。通过琼脂培养基培养受试菌,利用滤纸片琼脂扩散法进行稳定性和抑菌性的测定,采用十字交叉方法测定不同条件下的抑菌圈大小,评价壳聚糖的稳定性和抑菌作用的变化。

1 材料与amp;方法

1.1 菌 种

实验过程中使用的大肠杆菌(CCTCC AB 93154)、金黄色葡萄球菌(CCTCC AB 91093)从中国

收稿日期:2018-12-26;修回日期:2019-11-06.

* 基金项目:巢湖学院 2019 年度校级科学研究项目(XLY-201912);安徽省高等学校自然科学研究重点项目(KJ2018A0459);巢湖学院 2018 年度校级质量工程项目(CH18JXYJ27).

作者简介:宋俊梅(1992—),女,安徽阜阳人,助教,硕士,从事生物药物开发与研究.

典型培养物保藏中心购买。琼脂固体培养基配置流程如下:电子天平分别称取 5 g 蛋白胨,1.5 g 牛肉浸膏,2.5 g 氯化钠,加纯化水 500 mL 使其溶解后,再使用电子天平称取 7.5 g 琼脂,将琼脂边搅拌边加入上述溶液中,待琼脂完全熔化后,用 20% 的 NaOH 溶液调节配制的培养基 pH,使 pH 在 7.2 ~ 7.4 左右,待用^[10]。液体培养基配置流程如下:电子天平称取 10 g/LB 肉汤培养基,加 500 mL 纯化水,缓慢加热使其熔化。

1.2 试剂材料

壳聚糖购于上海麦克林生化科技有限公司;牛肉浸膏、NaCl 购于国药集团化学试剂有限公司;蛋白胨购于南京茂捷微生物科技有限公司;琼脂购于北京索莱宝生物科技有限公司;LB 肉汤购于北京奥博星生物技术有限责任公司;MgCl₂、柠檬酸购于天津博迪化工股份有限公司;乙酸购于江苏强盛功能化学股份有限公司;HCl 购于西陇科学股份有限公司;FeCl₃、NaOH 购于天津市大茂化学试剂厂。

1.3 仪器及设备

单人单面洁净工作台(型号: SJ-CJ-1D),购自苏州苏洁净化设备有限公司;智能光照培养箱(型号: GZL-P250A),购自合肥华德利科学器材有限公司;数显恒温水浴锅(型号: HH-4),购自常州普天仪器制造有限公司;高压蒸汽灭菌锅(型号: LDZF-75KB),购自上海申安医疗器械厂;电热恒温鼓风干燥箱(型号: DHG-9070AE),购自常州普天仪器制造公司。

1.4 研究方法

1.4.1 不同浓度壳聚糖稳定性及抑菌性实验

(1) 在已灭菌的超净台上,取适量直径为 6 mm 的已灭菌的圆形滤纸片,置于已灭菌的培养皿中,然后向放有滤纸片的培养皿中加入适量不同浓度的壳聚糖溶液(电子天平称取不同质量的壳聚糖,分别溶解于 1% HAc 溶液,配制成浓度为 20 g/L、10 g/L、5 g/L、2.5 g/L、1.25 g/L 的壳聚糖溶液),浸泡 40 min 左右。

(2) 将上述配置好的固体培养基在适当条件下使其熔化,于无菌环境下进行倒平板,待其冷却成型后,使用移液枪移取 20 μ L 菌悬液于固体培养基

中,无菌涂布棒事先灭菌,然后用其将菌悬液均匀涂布于上述配置的培养基中。放置几分钟,用无菌镊子夹取 1.4.1 项下制备的滤纸片(浸有不同浓度的壳聚糖溶液),在各培养基中间隔一定距离贴 3 到 5 片^[10],以相同 pH 的 HAc/NaOH 混合液为对照组,将上述处理过的培养基倒放于 37 $^{\circ}$ C 左右的恒温培养箱中恒温培养 24 h。培养完成后测量各组培养基中抑菌圈大小并记录抑菌圈实验数据。

1.4.2 温度对壳聚糖稳定性及抑菌作用影响实验

由于壳聚糖的独特特性,其存在多种用途,所以实验选取了壳聚糖应用过程中的几个常用温度来处理壳聚糖,观察壳聚糖在不同温度下稳定性和抑菌性的变化。量取 4 份 10 mL 5 g/L 的 1% HAc 壳聚糖溶液于具塞量筒中,分别在 121 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、冰浴等不同温度条件下处理 30 min 左右^[11],立即拿出,取出适量浸泡圆形滤纸片 40 min,然后以 1.4.1 项下操作进行实验,最后进行抑菌圈的大小比较。

1.4.3 金属离子对壳聚糖的稳定性及抑菌作用影响实验

取 3 份 10 mL 的 5 g/L 的 1% HAc 壳聚糖溶液于具塞量筒中,分别加 1 mL 金属离子溶液(0.1 mol/L NaCl、0.1 mol/L MgCl₂、0.1 mol/L FeCl₃),摇晃使其充分混匀,作用 1 h 后分别浸泡若干圆形滤纸片^[12],以未加金属离子的 5 g/L 的 1% HAc 溶解的壳聚糖溶液为对照组,然后按 1.4.1 项下操作进行实验,实验结束后,测量并记录抑菌圈的大小,进行数据分析。根据不同金属离子对壳聚糖稳定性及抑菌作用的影响,实验进一步探究了金属离子浓度对壳聚糖的影响。在金属离子浓度对壳聚糖的影响实验中,主要选择 FeCl₃ 和 MgCl₂ 作为影响因素,金属离子浓度分别设定为 0.1 mol/L、0.2 mol/L、0.3 mol/L、0.4 mol/L、0.5 mol/L,实验菌种选择金黄色葡萄球菌,通过测定抑菌圈大小,探究壳聚糖在不同浓度的 Fe³⁺ 和 Mg²⁺ 干扰下,其稳定性和抑菌作用的变化,为壳聚糖的进一步应用提供实验依据。

1.4.4 酸溶剂对壳聚糖稳定性和抑菌作用影响实验

根据壳聚糖只能溶于某些稀酸的性质,实验选

取 HAc、HCl、柠檬酸来配制壳聚糖溶液^[13-14], 以此探究壳聚糖的稳定性和抑菌作用, 同时设置不加壳聚糖的溶剂为平行对照组, 实验过程中不同酸溶剂浓度固定在 1%。

将不同酸溶剂配置的壳聚糖溶液以及对照组溶液取适量浸泡圆形滤纸片 40 min 左右, 按 1.4.1 项下操作进行实验, 最后根据所得数据进行壳聚糖稳定性和抑菌作用的研究。

2 结果分析

2.1 不同浓度壳聚糖抑菌作用

测定不同浓度壳聚糖溶液对实验受试菌(大肠杆菌和金黄色葡萄球菌)产生的抑菌圈直径(图 1)。根据实验数据可知, 随着壳聚糖浓度从 0 ~ 20 g/L 的增加, 壳聚糖对金黄色葡萄球菌产生的抑菌圈随之增大了 0.86 cm (对大肠杆菌产生的抑菌圈增大了 0.8 cm), 其抑菌作用有较为明显的增强。这个现象可能是因为壳聚糖分子具有氨基, 使壳聚糖分子携带正电, 当携带正电荷的壳聚糖分子与细菌接触时, 可与菌体中的负电荷物质(如细胞壁中的磷壁酸)结合而发生相互作用, 导致维持细菌生长的物质减少甚至缺失, 进而对菌体的生长繁殖产生阻碍作用。随着壳聚糖浓度的增加, 游离氨基增加, 壳聚糖分子携带的正电荷增加, 对菌体的生长繁殖产生的阻遏作用增强, 从而其抑菌效果增强^[15]。

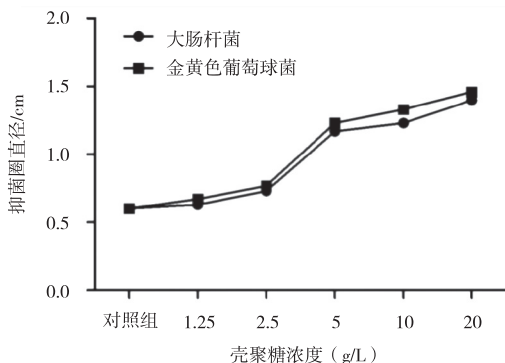


图 1 不同浓度壳聚糖稳定性及抑菌作用影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of chitosan on stability and bacteriostatic action

2.2 不同温度处理的壳聚糖的稳定性及抑菌作用

对不同温度处理的壳聚糖的实验结果进行测

定和记录, 从图 2 看出不同温度条件下, 壳聚糖稳定性和抑菌作用受到的影响较小。数据表明: 不论是大肠杆菌还是金黄色葡萄球菌, 即使在高温 121 °C 或者冰浴条件下处理 30 min, 壳聚糖的稳定性和抑菌性能没有明显变化(抑菌圈只改变了 0.04 cm)。数据说明经过不同温度的处理, 壳聚糖不易产生变性, 稳定性较好, 对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的抑菌作用基本无影响^[12]。这个特点表明: 当应用在食品或其他方面, 壳聚糖即使是需要加热或冷藏, 在一段时间内, 壳聚糖也可保持一定的稳定性、抗菌性, 这一特性有利于扩大壳聚糖的使用范围, 提高壳聚糖的应用价值。

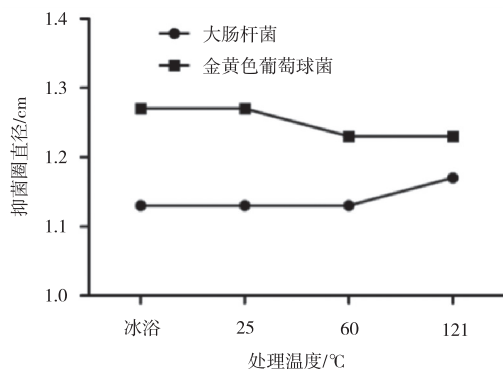


图 2 温度对壳聚糖稳定性和抑菌作用的影响

Fig. 2 Effect of temperature on stability and bacteriostatic action of chitosan

2.3 金属离子对壳聚糖稳定性和抑菌作用的影响

经不同金属离子作用后, 壳聚糖溶液对实验菌种产生的抑菌性测定实验结果如图 3 所示。由实验数据可以看出, 金属离子的加入对壳聚糖的稳定性和抑菌性有阻碍作用, 在相同浓度条件下, 随金属离子电荷的增加, 对壳聚糖的抑菌性能的抑制作用明显增加, 抑菌圈呈减小的趋势(相同浓度下, 壳聚糖在不同金属离子溶液中抑菌能力排名: $\text{NaCl} < \text{MgCl}_2 < \text{FeCl}_3$ 。这可能与壳聚糖的螯合特性以及壳聚糖与不同金属离子的亲和性不同有关^[16], 壳聚糖作为一种螯合物质, 在金属离子存在时, 能与其形成螯合物从而降低自身的稳定性和抑菌性能。这一特性表明, 壳聚糖在使用过程中, 如果使用壳聚糖的环境中含有某些金属离子, 应考虑其使壳聚糖稳定性和抑菌能力下降的问题。

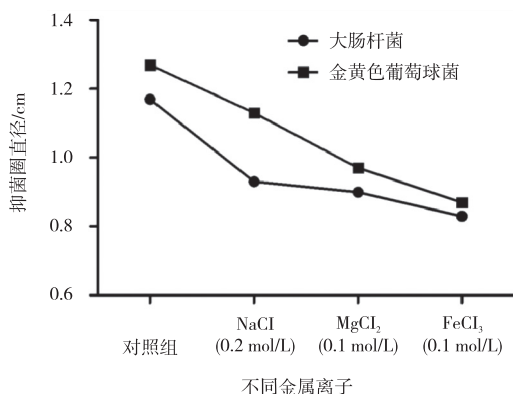


图 3 不同金属离子对壳聚糖稳定性和抑菌作用的影响

Fig. 3 Effect of different metal ions on stability and bacteriostatic action of chitosan

图 3 实验数据表明了不同金属离子对壳聚糖抑菌作用存在一定的影响,但影响程度不同,为进一步探究金属离子浓度对壳聚糖抑菌作用的影响,实验选择金黄色葡萄球菌为受试菌种,探究金属离子浓度对壳聚糖抑菌作用的影响。从图 4 可以看出:随金属离子浓度的增加, Fe^{3+} 和 Mg^{2+} 对金黄色葡萄球菌产生的抑菌圈分别下降了 0.54 cm 和 0.51 cm,壳聚糖的抑菌活性有降低的趋势^[12]。可能是由于金属离子与壳聚糖形成螯合物,随着金属离子浓度的升高,与金属离子螯合的壳聚糖消耗量增多,使壳聚糖的稳定性和抑菌性呈现下降的趋势。

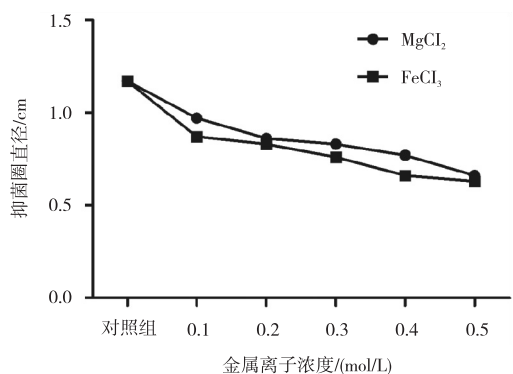


图 4 金属离子浓度对金黄色葡萄球菌抑菌的影响

Fig. 4 Effect of metal ion concentration on inhibition of *Staphylococcus aureus*

2.4 酸溶剂对壳聚糖稳定性和抑菌作用的影响

对不同酸溶剂溶解的壳聚糖溶液对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌产生的抑菌作用的实验结果进行测定和记录。通过数据可知,不同的酸溶剂溶解壳聚糖后,对壳聚糖的抑菌活性存在不同影响,但

不同酸溶剂溶解的壳聚糖其抑菌作用均强于空白对照组^[13,17]。这是由于壳聚糖在酸溶剂中产生游离氨基,使抑菌作用有所增强,同时这种抑菌作用的差异与酸溶剂本身的抑菌性能有一定的关系。其中,用醋酸作为溶剂的溶液较盐酸和柠檬酸作溶剂效果更好,以 1% 的 HAc 作为溶剂溶解壳聚糖时,壳聚糖溶液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别达到 1.17 cm 和 1.27 cm。Freese^[18] 等发现有些酸可以降低膜的通透性,有利于壳聚糖分子的进入和结合,而表现出较强的抑菌作用,如图 5 所示。根据这一特性,壳聚糖在使用过程中,系统中存在相应的酸溶液,对壳聚糖的黏性及稳定性有一定的影响,抑菌作用存在差异,在使用过程中应特别注意。

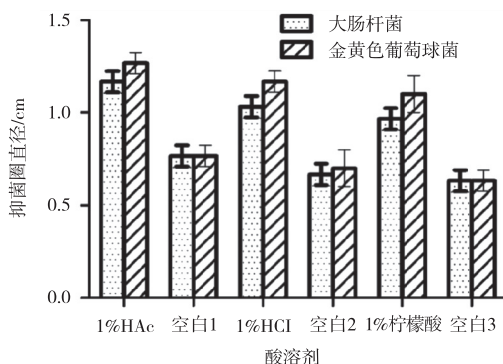


图 5 溶剂对壳聚糖稳定性和抑菌作用的影响

Fig. 5 Effect of solvent on stability and bacteriostatic action of chitosan

3 结论

实验菌种选择大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为实验受试,通过滤纸片琼脂扩散法测量抑菌圈大小,探究了壳聚糖浓度、温度、金属离子种类和浓度、酸溶剂等因素对壳聚糖稳定性和抑菌作用的影响,通过实验数据,得出以下结论,为以后壳聚糖的应用和相关研究提供实验依据。

(1) 随着壳聚糖浓度的增加,壳聚糖对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的抑菌作用有增强趋势。

(2) 壳聚糖的热稳定性较好,在 121 °C 和冰浴条件下,壳聚糖稳定性及抑菌作用区别不大,为壳聚糖的广泛使用提供了有利条件。

(3) 金属离子的加入,会阻碍壳聚糖的抑菌性能,降低壳聚糖的稳定性,且随着金属离子价位的升高,影响更明显;此外,金属离子浓度对壳聚糖抑菌性能亦存在影响,且抑菌性能随着金属离子浓度的增高有增强的趋势。

(4) 壳聚糖的特点是溶于某些稀酸,但不同的酸溶剂对壳聚糖的稳定性和抑菌能力有一定的影响,用醋酸作为溶剂的溶液较盐酸和柠檬酸作溶剂效果更好。

(5) 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有不同的细胞壁,所以壳聚糖对两者的抑菌作用存在差异。

参考文献(References):

[1] 薛金玲,李健军,白艳红,等.壳聚糖及其衍生物抗菌活性的研究进展[J].高分子通报,2017,41(1):4—5
XUE J L, LI J J, BAI Y H, et al. Research Development of Chitosan and Its Derivatives in Antibacterial Activity [J]. Polymer Bulletin, 2017, 41(1):4—5(in Chinese)

[2] 于玛丽,李丽梅,郭家智,等.壳聚糖在组织工程中的应用[J].中国高科技,2019,39:104—107
YU M L, LI L M, GUO J Z, et al. Application of Chitosan in Tissue Engineering [J]. China Hi-Technology, 2019, 39:104—107(in Chinese)

[3] 刘扬,吴琼华.壳聚糖载药系统及其在骨组织工程中的应用[J].口腔医学,2019,39(4):350—352
LIU Y, WU J H. The Chitosan Drug Delivery System and Its Application in Bone Tissue Engineering [J]. Stomatology, 2019, 39(4):350—352(in Chinese)

[4] 毕继才,姜宗伯,张亚征,等.壳聚糖在食品工业中的应用[J].河南科技学院学报(自然科学版),2018,46(5):35—37
BI J C, JIANG Z B, ZHANG Y Z, et al. Application of Chitosan in Food Industry [J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Science Edition), 2018, 46(5):35—37(in Chinese)

[5] 董红兵,詹小芸.壳聚糖的抗菌活性在酱腌菜中的应用[J].湖北农业科学,2019,58(12):130—133
DONG H B, ZHAN X Y. Application of Antibacterial Activity of Chitosan in Pickles [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2019, 58(12):130—133(in Chinese)

[6] 谢文娟.壳聚糖在食品方面的应用[J].食品安全导

刊,2018,30(127):158—159

XIE W J. The Application of Chitosan in Food [J]. China Food Safety Magazine, 2018, 30(7):158—159 (in Chinese)

- [7] 张金生,田中禾,李丽华.壳聚糖及其衍生物在水处理中的应用[J].化工新型材料,2019,47(2):52—54
ZHANG J S, TIAN Z H, LI L H. Application of Chitosan and Its Derivative in Water Treatment [J]. New Chemical Materials, 2019, 47(2):52—54(in Chinese)
- [8] 杨振彦,李巧玲.壳聚糖膜的改性及其在废水处理中的应用进展[J].应用化工,2018,47(9):1992—1993
YANG Z Y, LI Q L. Modification of Chitosan Membrane and Its Application in Wastewater Treatment [J]. Applied Chemical Industry, 2018, 47(9):1992—1993 (in Chinese)
- [9] 周历涛,孙美乔.壳聚糖及其衍生物在水处理中的研究现状[J].辽宁化工,2018,47(7):693—694
ZHOU L T, SUN M Q. Research Status of Chitosan and Its Derivatives Applied in Water Treatment [J]. Liaoning Chemical Industry, 2018, 47(7):693—694 (in Chinese)
- [10] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2015
SHEN P, CHEN X D. Microbiology Experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 2015 (in Chinese)
- [11] 唐红枫,夏琪,刘群,等.甲壳素提取工艺条件比较及壳聚糖抑菌作用研究[J].科学技术与工程,2017,17(10):58—61
TANG H F, XIA Q, LIU Q. Comparison of Extraction Technology Conditions and Antibacteria about Chitin and Chitosan [J]. Science Technology and Engineering, 2017, 17(10):58—61 (in Chinese)
- [12] 叶磊,何立千,高天洲,等.壳聚糖的抑菌作用及其稳定性研究[J].北京联合大学学报(自然科学版),2004,18(1):79—82
YE L, HE L Q, GAO T Z et al. Studies on the Antibiotic Activity and Its Stability of Chitosan [J]. Journal of Beijing Union University (Natural Sciences), 2004, 18(1):79—82 (in Chinese)
- [13] 蔡金萍.新型壳聚糖酯的制备及抑菌性能研究[D].青岛:中国海洋大学,2015
CAI J P. The Preparation of Novel Chitosan Esters and Antimicrobial Performance Study [D]. Qingdao: Ocean

- University of China, 2015(in Chinese)
- [14] 苏婧. 不同溶剂对壳聚糖稳定性及生物学性能的影响 [D]. 青岛:中国海洋大学,2013
- SU J. Effects of Different Solvents on the Stability and the Biological Properties of Chitosan [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013(in Chinese)
- [15] 武大引. 甲壳低聚糖的制备及性能测定 [D]. 山东:青岛科技大学,2017
- WU D Y. Preparation and Properties of Chitooligosaccharide [D]. Shandong: Qingdao University of Science & Technology, 2017(in Chinese)
- [16] 苏庆席,苏忠亮. 壳聚糖抑菌活性的研究进展 [J]. 农产品加工,2015(1)66—67
- SU Q X, SU Z L. Progress of Antibacterial Activity of Chiosan [J]. Farm Products Processing, 2015 (1) 66—67 (in Chinese)
- [17] 苏庆席. 壳聚糖降解抑菌性及其机理的初步研究 [D]. 山东:青岛科技大学,2015
- SU Q X. A Preliminary Research of Chitosan Degradation. Antimicrobial Properties and Mechanism [D]. Shandong: Qingdao University of Science & Technology, 2015 (in Chinese)
- [18] FREESE E, SHEU C W, GALLIERS E. Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives [J]. Nature, 1973(24):321—32

Study on Stability and Antibacterial Activity of Chitosan

SONG Jun-mei^{1,2}, ZHANG Xin¹, GAO Yu-rong¹

(1. Chaohu University, School of Chemistry and Material Engineering, Anhui Chaohu 238000, China;
2. Shanghai Haihong Group Chaohu C-dragon Pharmaceutical Co., Ltd, Anhui Chaohu 238000, China)

Abstract: The stability and bacteriostatic effects of chitosan under different treatment conditions were studied. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were used as experimental bacteria. The main influencing factors include chitosan concentration (chitosan concentration from 0 to 20 grams per liter), temperature (ice bath, 25°C, 60°C, 121°C), Metal ion species (NaCl, MgCl₂, FeCl₃) and concentration (0.1 mol/L, 0.2 mol/L, 0.3 mol/L, 0.4 mol/L, 0.5 mol/L), acid solvent (HAc, HCl, citric acid). The antibacterial effect of each influencing factor was determined by filter paper agar diffusion. The results show that with the increase of chitosan concentration, the bacteriostatic effect was enhanced, and chitosan has good stability at different temperatures. Metal ion species and concentration have certain inhibiting effect on the properties of chitosan. The chitosan dissolved in different acid solvent, its stability and antibacterial effect were different.

Key words: chitosan; stability; bacteriostasis; influence factor

责任编辑:田 静

引用本文/Cite this paper:

宋俊梅, 张昕, 高玉荣. 壳聚糖稳定性及抑菌作用研究 [J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2020, 37(3): 17—22

SONG J M, ZHANG X, GAO Y R. Study on Stability and Antibacterial Activity of Chitosan [J]. Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2020, 37(3): 17—22