

壳聚糖抑菌性能研究进展

Development of antibacterial activity of chitosan

刘楠, 陈西广, 刘成圣, 孟祥红, 于乐军

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q81 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)10-0090-03

壳聚糖又名甲壳胺, 是甲壳素脱乙酰的产物, 学名为 1, 4-2-氨基-2-脱氧- β -D 葡萄糖。壳聚糖来源于甲壳动物和昆虫的外骨骼, 在地球上含量及为丰富。作为一种天然的多阳离子化合物, 由于其具有良好的生物降解性、生物相溶性、无毒性和广谱抗菌性等特点, 近年来越来越受到人们的重视, 尤其在壳聚糖的抑菌方面, 关于壳聚糖的抑菌机理抑菌效果和构效关系等方面都进行了大量的研究, 由于壳聚糖的水溶性较差, 限制了它的应用范围, 根据这一特点, 人们开始致力于其水溶性衍生物的开发和抑菌方面的研究与应用, 取得了不少新的研究进展, 为壳聚糖在抗菌方面的应用提供了大量的基础理论。作者就以上几个方面的问题进行了综述。

1 壳聚糖的抑菌机理

近年来, 人们对于壳聚糖的抑菌机理的认识已经有了长远的发展。但是, 就其确切的抑菌机理来讲至今还不太清楚, 可以说是众说纷纭。可能的原因是影响实验的因素较多。例如: 实验所用的菌种的不同、采用的壳聚糖的分子质量的不同、脱乙酰度的不同和应用不同的实验方法等都可以造成实验结果的不同。而且人们的观察角度也有所不同, 因此在抑菌机理方面还存在不同的看法。普遍认为壳聚糖的抑菌机理有以下几种可能:

(1) 壳聚糖干扰菌体细胞膜的功能, 从而达到抑菌的效果。这种机制主要对革兰氏阳性菌起主导作用。革兰氏阳性菌细胞壁主要是由肽聚糖形成的网状结构组成, 特点是厚度大(20~80 nm), 含有 90% 的肽聚糖和 10% 的磷壁酸。大分子的壳聚糖容易形成致密的外膜, 抑制了细胞膜的通透性, 能够阻止营养物质进入细菌的细胞内, 因此随着分子质量的逐渐增大, 其抗菌作用是逐渐增强的。而革兰氏阴性菌其细胞壁肽聚糖层较薄(2~3 nm), 含量约占细胞壁总质量的 10%, 不含有磷壁酸。含有丰富的脂多糖, 其厚度大约有 8~10 nm。壳聚糖容易进入到细胞壁的空隙结构内, 干扰细胞正常的新陈代谢, 从而达到

杀菌的目的^[1]。

(2) 壳聚糖直接与菌体 DNA 和 mRNA 作用。Liu^[2] 在测试壳聚糖的抑菌能力的实验中用 FITC(异硫氰酸荧光素) 来标记低分子质量的壳聚糖, 并与大肠杆菌一起培养。结果经过荧光检测发现, 在大肠杆菌的细胞体内存在大量被标记的分子质量为 8 000 u 和 4 000 u 的壳聚糖。推测可能是由于低分子质量的壳聚糖可以通过渗透的方式进入到细菌的细胞体内。带有正电荷的壳聚糖与带有负电荷的 DNA 发生了相互作用, 影响了 RNA 的转录和蛋白质的合成, 从而实现了抑菌的目的。

(3) 壳聚糖激活几丁质酶, 达到抑菌的目的。壳聚糖作为几丁质酶的底物, 在其大量存在的条件下, 病原真菌的几丁质酶的活性可以被激发出来。对于大多数病原真菌来讲, 当壳聚糖浓度很高时, 病原真菌体内的几丁质酶就被过分的表达。从而导致了对其自身细胞壁几丁质的降解。而几丁质是真菌细胞壁的重要组成部分, 因此病原菌的细胞壁也就被破坏了, 这样就达到了杀菌的效果^[3]。

(4) 壳聚糖上的胺基起抑菌作用。王鸿等^[4] 用不同脱乙酰度的壳聚糖做抑菌研究, 推测认为是壳聚糖上带正电荷的胺基与细菌的细胞壁结合而阻碍了细菌的增殖。革兰氏阴性菌的细胞壁的最外层是一层较厚的类脂多糖物质, 有吸附阳离子的作用。吸附了质子化的壳聚糖后, 与 Ca^{2+} 结合的可能性就减少, 脂多糖结构的稳定性变差, 内壁层肽聚糖暴露出来, 容易被溶菌酶水解。革兰氏阳性菌的细胞壁含有丰富的磷壁酸, 其所带的负电荷可与环境中的 Mg^{2+} 结合以保证细胞膜上一些合成酶维持高活性的需要。

收稿日期: 2003-07-02; 修回日期: 2004-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370344)

作者简介: 刘楠(1979), 辽宁海城人, 硕士研究生, 从事海洋生物材料抗菌性的研究, E-mail: lnykliunan@hotmail.com; 陈西广, 通讯作者, E-mail: xgchen@ouc.edu.cn



在壳聚糖的酸性溶液中, 单体分子上带正电荷的氨基就可能与磷壁酸结合, 扰乱其生理功能, 使细菌的繁殖受阻。

(5) 壳聚糖与细胞质发生作用。宋献周等^[5]测定了不同分子质量的 α -壳聚糖的抑菌效果。认为低分子质量的壳聚糖可以通过渗透的方式进入菌体细胞内, 与带负电的细胞质发生作用, 吸附在带有阴离子的细胞质上, 使细胞质发生絮凝作用, 扰乱了细胞的正常生理代谢, 从而实现了抑菌的作用。

2 影响壳聚糖抑菌效果的因素

经过研究发现, 壳聚糖的抑菌效果受到多方面因素的影响。其中主要影响因素有: 壳聚糖的分子质量、脱乙酰度、浓度和 pH 值等。下面就以上所提到的几个方面进行详细的讨论。

2.1 分子质量对壳聚糖抑菌活性的影响

Jeon^[6]对壳聚糖和壳低聚糖的抑菌活性做了大量的研究, 认为壳聚糖的抑菌效果要好于壳低聚糖, 而且它们的抑菌效果都与分子质量有关。Liu^[2]测定了分子质量从 5 000 ~ 1.08×10^6 u 的 7 种壳聚糖的抑制大肠杆菌的能力, 认为当壳聚糖的分子质量在 5 000 ~ 9.16×10^4 u 时, 其抑菌能力是随分子质量的增加而增加的; 当壳聚糖的分子质量在 9.16×10^4 ~ 1.08×10^6 u 时, 其抑菌能力是使分子质量的增加而下降的。夏文水等^[7]采用大肠杆菌作为实验菌株, 发现随分子质量上升抑菌效果逐渐下降, 而且通过试验测定分子质量为 1 500 u 的壳聚糖抑菌效果最强。Yousook^[8]报道分子质量为 40 000 u 的壳聚糖在质量分数为 0.5% 时, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的杀灭率为 90%; 分子质量为 180 000 u 的壳聚糖在质量分数为 500×10^{-6} 时, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的杀灭率几乎为 100%。Hong^[9]的结论认为从整体上来说, 壳聚糖对革兰氏阳性菌的抑制效果要好于革兰氏阴性菌。这与 Jeon 等^[6]的实验结果是一致的。所有的这些实验都说明壳聚糖的抑菌效果是受到其分子质量影响的, 而且因为其针对的菌的特性不同影响效果不同。对于革兰氏阴性菌来讲壳聚糖的抑菌能力是随着分子质量的上升而增加的, 但增加到一定的分子质量之后其抑菌能力将不再增加; 而对于革兰氏阳性菌来讲, 低分子质量的壳聚糖的抑菌效果较好。

2.2 浓度对壳聚糖抑菌活性的影响

不同浓度的壳聚糖的抑菌效果是不同的, 许多研究已经证明了这一点。例如: 刘艳如等^[10]测定了分子质量为 1 900 u 的壳聚糖在 5 种不同质量分数 (0.001, 0.003, 0.005, 0.01, 0.015) 时的抑菌效果。Liu^[2]测定了粘均分子质量为 5.14×10^4 u 的壳聚糖,

质量分数在 0.01% ~ 0.1% 之间的抑菌效果; 以及分子质量为 5 000 u 的壳聚糖, 质量分数在 0.01% ~ 0.5% 之间的抑菌效果。谢勇等^[11]测定了在 2 种不同 pH 值条件下的 8 种不同质量分数 (0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03, 0.035, 0.04, 0.05) 的壳聚糖的抑菌效果。所有实验都表明随着壳聚糖浓度的增加, 其抑菌效果是逐渐增强的。原因归结为壳聚糖分子中的 $-NH_2$ 基团的存在, 随着壳聚糖浓度的增加溶液中 $-NH_2$ 的浓度的也将增加, 从而抑菌的效果也就增强了。由于壳聚糖在中性及碱性溶液中不能溶解, 所以在应用中大多将壳聚糖溶解在酸性溶液中, 一般实验中采用的大多是醋酸。而醋酸本身也具有抑菌的功能, 所以实验的结果在一定程度上是会受到影响的。

2.3 脱乙酰度对壳聚糖抑菌活性的影响

甲壳素经浓碱液处理后, 分子中乙酰基大部分水解脱离, 当分子中半数以上的乙酰基被脱除便成为壳聚糖, 就可以在酸中溶解。当壳聚糖溶解在酸性溶液中单体分子上的游离氨基 ($-NH_2$) 质子化而带正电 ($-HN_3^+$) 变成阳离子聚合物, 能吸附一些带负电荷的物质。基于此, 人们对壳聚糖的抑菌机理有着不同的解释。夏文水等^[7]曾对分子质量较小的甲壳低聚糖 ($M_r = 1 500$ u) 其脱乙酰度与抑菌率的关系作过研究。王鸿等^[4]曾用较大分子质量的壳聚糖 (9.3×10^5 ~ 9.8×10^6 u) 中 3 种不同脱乙酰度的抑菌性进行了研究, 结果认为随着脱乙酰度的升高, 壳聚糖抑菌能力是增强的。Liu 等^[2]也测定了 5 种不同脱乙酰度的壳聚糖的抑菌效果, 实验得到的结论也是相同的。原因是高的脱乙酰度的壳聚糖使 NH_2 的浓度增加, 使得更多的带正电的 $H-N_3^+$ 吸附到带负电的细菌表面上, 从而干扰了细胞的正常的生长、繁殖。

2.4 pH 值对抑菌效果的影响

谢勇等^[11]在测定 pH 值对壳聚糖抑菌效果的研究中测定了在 3 种不同 pH 值下壳聚糖的抑菌效果。结果表明随着 pH 值的降低壳聚糖的抑菌作用是增强的。Liu^[2]测试了在 pH 值从 3~8 的培养基壳聚糖的抑菌能力。发现 pH 值为 6.3 时的抑菌作用是最明显的。推测可能是由于 pH 值为 6.3 时恰好也是壳聚糖的等电点, 有利于壳聚糖解离出大量的 NH^+ 离子, 沉积到菌体细胞的表面, 从而达到抑菌的目的。

3 壳聚糖衍生物的抑菌效果

近来研究发现, 对壳聚糖分子的各基团的进行不同修饰, 可以改变其某些性质, 并使壳聚糖的抑菌效果得到提高。

3.1 羧甲基壳聚糖

壳聚糖分子内存在的羟基、氨基被化学改性。取



代基团发生 O-位则生成 O-羧甲基壳聚糖; 取代基团发生 N-位则生成 N-羧甲基壳聚糖; 取代基团同时发生 O-位和 N-位即生成 N, O-羧甲基壳聚糖(NOCC)。NOCC 在水溶液中易形成牢固的薄膜对气体有选择性的通透, 不利于细菌和大部分真菌的生长, 特别适合于作水果的保鲜剂。但是, 与壳聚糖相比较, 它的 $-NH_2$ 减少了, 抑菌能力将有所下降。可以在不改变 $-NH_2$ 的基础上, 将 $-OH$ 羧甲基化, 这样 $-NH_2$ 的数量没有减少, 而且由于分子间和分子内的作用解离的 $-HN_3^+$ 的数量增多, 使壳聚糖的抑菌能力增强了。陈凌云等^[12]测定了 N, O-羧甲基壳聚糖的抑菌效果。实验表明, NOCC 对金黄色葡萄球菌的抑制作用要好于大肠杆菌的抑制作用。而且随着分子质量的下降, 其抑菌效果有所升高。

3.2 甲基壳聚糖银

羧甲基壳聚糖银是用羧甲基壳聚糖钠盐溶液于搅拌下加入 $AgNO_3$, 在磁力搅拌器上反应 1 h, 反应液用丙酮结晶后, 先以质量分数为 85% 甲醇洗涤, 再用甲醇多次洗涤, 60℃ 真空干燥。用原子吸收分光光度计可测定 Ag^+ 浓度^[13]。经实验测定, 合成的羧甲基壳聚糖银可抑制金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌, 抑菌率分别为 88%、80.2% 和 75.3%。而羧甲基壳聚糖仅对大肠埃希菌有抑制作用, 是 Ag^+ 增加了合成物的抑菌能力。这表明合成后的羧甲基壳聚糖银比羧甲基壳聚糖的抗菌能力提高了。

3.3 壳聚糖的季铵盐

用缩水甘油三甲基氯化铵对壳聚糖进行化学结构修饰, 可在壳聚糖分子中引入季铵盐基团, 制得壳聚糖季铵盐^[14]。Jia^[15]对壳聚糖季铵的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)进行了测定, 发现壳聚糖季铵盐的抑菌能力与其分子质量有关。而且, 壳聚糖季铵盐在醋酸溶液中的抑菌能力要好于在水中的抑菌能力, 其抑菌能力是随着醋酸浓度的增加而增加的。同时也发现, 壳聚糖季铵盐对大肠杆菌的抑菌效果要好于壳聚糖。这说明壳聚糖季铵盐在壳聚糖衍生物的抑菌作用方面的研究将越来越受到重视。

4 小结

经过上述的大量实验, 虽然壳聚糖及其衍生物的抑菌活性的研究取得了以上的进展, 如抑菌的效果与其分子质量、浓度、脱乙酰度、pH 值等非生物因素有关。然而, 对其抑菌的机制还没有一个明确的机理, 对其抑菌趋势还没有一个统一的认识, 因此在以后的实验中应该加强对其规律性的研究, 从而认识其抑菌机理。但是, 壳聚糖及其衍生物的抑菌活性是可以肯定的。尤其是通过改变壳聚糖的化学结构, 可

以导致其化学和物理性质的改变, 这样不仅可以提高它的抑菌活性, 也使其应用范围更加广泛。而且通过进一步大量的实验研究和新的实验方法的应用, 可以使人们更加明确其抑菌机理, 这将对推动其理论研究和应用研究起到重要的作用。

参考文献:

- [1] 郑连英, 朱江峰, 孙昆山. 壳聚糖的抗菌性能研究[J]. 材料科学与工程, 2000, 18(2): 22-24.
- [2] Liu Xiaofei, Guan Yue-lin, Li Dong-zhi, et al. Antibacterial action of chitosan [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, 79: 1 324- 1 335.
- [3] 黎军英, 李红叶. 壳聚糖对桃褐腐病菌的抑菌作用[J]. 电子显微学报, 2002, 21(2): 38-140.
- [4] 王鸿, 沈月新. 不同脱乙酰度壳聚糖的抑菌性[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(4): 380-382.
- [5] 宋献周, 沈月新. 不同平均分子量的 α -壳聚糖的抑菌作用[J]. 上海水产大学学报, 2000, 9(2): 138-141.
- [6] Jeon Y J, Park P J, Kim S K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 44: 71-76.
- [7] 夏文水. 甲壳低聚糖功能性质[J]. 无锡轻工大学学报, 1996, 15(4): 297-303.
- [8] Yousook S. The antibiotic effect of chitosan on bacteria of varying cell wall composition [J]. *Adv in Chitin Sci*, 1997, 2: 890-896.
- [9] Hong K N, Park N Y, Lee S H, et al. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weight [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 74: 65-72.
- [10] 刘艳如, 余萍, 郑怡. 水溶性壳聚糖的抑菌作用研究[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(2): 42-44.
- [11] 谢勇, 周南进, 李弼民, 等. 不同浓度和 pH 值的壳聚糖对幽门杆菌作用的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(1): 13-14.
- [12] 陈凌云, 杜予民, 刘义. 羧甲基壳聚糖的结构与抗菌性能研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 2000, 46(2): 191-194.
- [13] 湛学军, 熊远珍, 柳磊, 等. 羧甲基壳聚糖银的合成及抑菌实验的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(3): 142-144.
- [14] 许晨, 路灿辉. 壳聚糖季铵盐的合成及结构表征[J]. 功能高分子学报, 1997, 10(1): 51-55.
- [15] Jia Zhishen, Shen Dong-feng, Xu Wei-liang. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan [J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 333: 1-6.

(本文编辑: 张培新)