

文章编号:1673-1689(2008)02-0088-04

酶法制备壳低聚糖对细菌的抑制作用

卢玲妃, 陈建国, 郑连英*

(浙江大学 材料与化工学院, 浙江 杭州 310027)

摘要:研究了由壳聚糖内切酶、外切酶和混合酶降解制备的 5 种不同相对分子质量壳低聚糖在不同浓度下对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性。结果表明, 相对分子质量 2 100 的壳低聚糖对大肠杆菌抑制作用最明显。相对分子质量 9 000 的壳低聚糖对枯草芽孢杆菌抑菌效果最好。壳低聚糖对枯草芽孢杆菌抗菌作用随相对分子质量减小而逐渐减弱。壳低聚糖对两种菌的抑菌效果均随浓度的增加而增强。

关键词:壳低聚糖; 酶降解; 相对分子质量; 抗菌

中图分类号: TQ 314.1

文献标识码: A

Antibacterial Activity of Chitooligosaccharides Prepared by Enzymolysis

LU Ling-fei, CHEN Jian-guo, ZHENG Lian-ying*

(College of Materials Science and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: The antibacterial activity of chitooligosaccharides with different molecular weights and different concentrations was studied. The chitooligosaccharides were prepared by chitosanase, endo-chitosanase or exo-chitosanase hydrolysis. The result indicated that the chitooligosaccharide with MW(molecular weight) of 2 100 had the strongest antibacterial activity against *Escherichia coli* in 5 samples, while the chitooligosaccharide with MW of 9 000 had the strongest antibacterial activity against *Bacillus subtilis*. By decreasing the MW of chitooligosaccharides, the antibacterial activity against *Bacillus subtilis* was strengthened. The antibacterial activity of chitooligosaccharides could be improved by increasing the concentration.

Key words: Chitooligosaccharide; enzymolysis; molecular weight; antibacterial activity

壳低聚糖是氨基葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的相对分子质量低于 10 000 的低聚糖。低黏度和良好的水溶性使壳低聚糖比壳聚糖展现出更独特的生理活性和功能性质^[1]。抗菌抑菌作用是壳低聚糖的最主要活性之一^[1-2]。壳低聚糖在食品领域有广泛的用途。Enrique A^[3]等提出其可作为食

品天然防腐剂和添加剂。壳低聚糖具有柔和甜味, 可作为糖尿病和肥胖病的可食甜味剂。此外壳低聚糖还具有抗癌、降血脂、清除自由基、消除脂肪肝、降低胆固醇、增强人体免疫力等功能^[1,4]。在美国、韩国、日本等国家, 壳低聚糖已被广泛应用于食品领域。

收稿日期: 2007-03-28.

基金项目: 浙江省重点科技资助项目(2005C-22001)

作者简介: 卢玲妃(1984-), 女, 浙江缙云人, 生物化工硕士研究生.

* 通讯作者: 郑连英(1947-), 女, 浙江温州人, 教授, 主要从事生物工程的科研和教学工作.

Email: zhengly@zju.edu.cn

壳聚糖酶按酶切方式可以分为壳聚糖内切酶和外切酶。酶法降解壳聚糖是生产壳低聚糖的最佳方法^[5]。壳低聚糖对各种病原微生物的抗菌能力有所不同。Jeon^[6]等指出相对分子质量是壳低聚糖抑制微生物生长的最重要因素。作者就由壳聚糖内切酶、外切酶和混合酶降解制备的5种不同相对分子质量(范围在500~10 000)壳低聚糖对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抗菌活性进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验原材料

壳聚糖购于玉环澳兴甲壳素有限公司,脱乙酰度93%,相对分子质量290 000。

1.2 菌种和培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC25922)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC21366),由浙江大学生物工程研究所提供;高产壳聚糖酶生产菌 *Penicillium* sp. ZD. Z1(国家发明专利号 ZL0215988.0,菌种保藏号为 CGMCCNo. 0851),作者所在实验室筛选保藏。

发酵培养基成分(g/L):壳聚糖 30,葡萄糖 5,硫酸铵 1,尿素 1,磷酸二氢钾 0.6,硫酸镁 0.12;pH 值 5.0。

牛肉膏蛋白胨培养基成分(g/L):牛肉膏 3,蛋白胨 10,NaCl 5;pH 值 7.0。

1.3 实验仪器

AKTA prime 蛋白质纯化系统、HiTrap SP 阳离子交换柱;安玛西亚中国有限公司生产;Buchi B-250 型喷雾干燥设备;瑞士 BUCHI 实验室仪器公司产品;UV-120-02 型分光光度计;日本岛津公司产品;NDJ-1 型旋转黏度计;上海天平仪器厂生产。

1.4 壳低聚糖的制备

高产壳聚糖酶菌株接种至5 L的发酵罐中发酵培养,30 ℃、250 r/min,培养65~70 h后停止发酵。发酵液经抽滤后,用截留相对分子质量10 000的超滤膜滤除无机盐和大相对分子质量蛋白质。所得壳聚糖酶粗酶液经乙醇沉淀获得壳聚糖混合酶。壳聚糖混合酶经过 HiTrap SP 阳离子交换柱分离纯化得壳聚糖外切酶和壳聚糖内切酶。

分别用壳聚糖混合酶,壳聚糖外切酶和壳聚糖内切酶降解质量浓度1.00 g/dL壳聚糖。加酶量0.01 U/mL,反应条件为30 ℃、pH值为5.0,通过特性粘度控制反应时间。沸水浴加热中止反应。喷雾干燥,最终得壳低聚糖产品 S₁、S₂、S₃、S₄、S₅,相对分子质量分别为500、2 100、3 700、5 200、

9 000。S₁壳聚糖外切酶降解制备;S₃由壳聚糖内切酶降解制备;S₂、S₄、S₅均由壳聚糖混合酶降解制备。壳聚糖相对分子质量和特性黏度间的关系由MHS方程确定^[7-8]。

1.5 比浊法测定壳低聚糖对细菌生长速率的影响

称取一定量的壳低聚糖溶解于牛肉膏蛋白胨液体培养基中,配成质量浓度0.20 g/dL含药培养基,分装在三角瓶中(50 mL/瓶)。灭菌冷却后每瓶加1.0 mL菌悬液(菌浓度为1×10⁸ cfu/mL),置于空气浴摇床中,37 ℃、130 r/min培养,每隔4 h取样。分光光度计于610 nm处测定细菌培养液的吸光度。

1.6 牛津杯法测定壳低聚糖对大肠杆菌抑菌活性

配制不同质量浓度的壳低聚糖溶液,灭菌后备用。移取0.2 mL菌悬液到平板上,涂布均匀。放置3个无菌牛津杯于平板上。各移取0.2 mL壳低聚糖溶液加入牛津杯,以无菌水为对照。37 ℃恒温培养,24 h后测定抑菌圈直径。

1.7 壳低聚糖对枯草芽孢杆菌抑菌率的测定

每个平板加入0.1 mL适量浓度菌液和0.1 mL壳低聚糖溶液,涂布均匀,以无菌水为空白。37 ℃培养24 h后测定各个平板上的菌落数。抑菌率的计算公式为: $\eta = (N_1 - N_2) / N_1 \times 100\%$ 。其中N₁、N₂分别指空白平板和涂有壳低聚糖平板上的菌落数。

1.8 pH值对抑菌活性的影响

配制含质量浓度0.10 g/dL壳低聚糖S₃的液体培养基用于对大肠杆菌的实验。配制含质量浓度0.1 g/dL壳低聚糖S₅的液体培养基用于对枯草芽孢杆菌的实验。调培养基pH值至5.0、5.5、6.0、6.5和7.0。接种后37 ℃培养24 h。分光光度计于610 nm处测定细菌培养液的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 壳低聚糖对细菌生长曲线的影响

由图1可知,在8 h之内,5种壳低聚糖对大肠杆菌均有明显的抑菌效果。培养8 h之后,S₁、S₄和S₅的抑菌效果逐渐减弱。培养16 h之后S₁培养基中大肠杆菌的数量超过空白。原因是S₁由壳聚糖外切酶降解制备,含有大量的单糖,能被大肠杆菌作为碳源利用,促进其生长;S₄、S₅相对分子质量较高,高相对分子质量的壳低聚糖对大肠杆菌抑制作用不强^[9]。而S₃和S₂在整个过程中均保持强抑菌能力,S₂的抑菌能力比S₃强。添加S₃和S₂样品的培养基在培养8 h之后吸光度一直保持在较低的稳定

范围,表明 S_2 和 S_3 基本上完全抑制了大肠杆菌的生长。

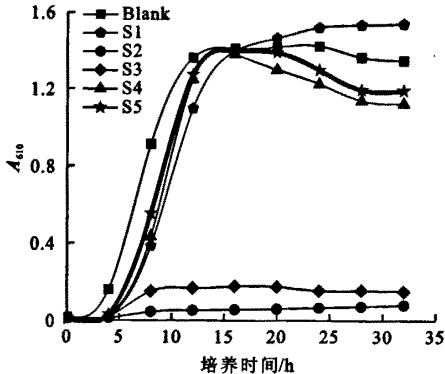


图 1 不同相对分子质量壳低聚糖对大肠杆菌生长的影响

Fig. 1 Effect of different molecular weight chitooligosaccharides on the growth of *Escherichia coli*

由图 2 可知,除 S_1 之外,其它 4 种壳低聚糖对枯草芽孢杆菌都具有较好的抑菌效果,其中 S_5 的抑菌效果最好。壳低聚糖的抑菌活性随相对分子质量的增大而增强。含有大量单糖的 S_1 样品在 12 h 之后大肠杆菌的数量开始超过空白。

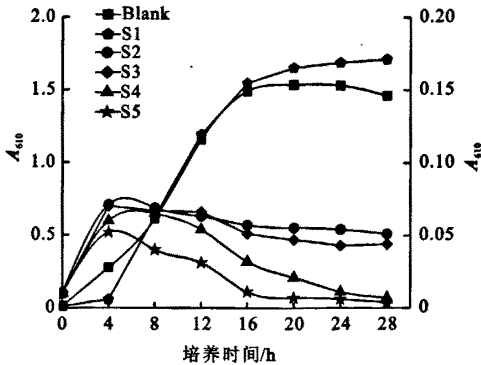


图 2 不同相对分子质量壳低聚糖对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig. 2 Effect of different molecular weight chitooligosaccharides on the growth of *Bacillus subtilis*

2.2 不同质量浓度壳低聚糖对大肠杆菌抑菌活性

由表 1 可知, S_2 、 S_3 、 S_4 、 S_5 对大肠杆菌均有抑菌活性,随着质量浓度提高抑菌活性增强。其抑菌能力大小排列如下: $S_2 > S_3 > S_4 > S_5$ 。 S_2 与 S_3 的抑菌能力相差不大,与 S_4 和 S_5 有较大差别。 S_1 对大肠杆菌无抑制作用。

2.3 不同质量浓度壳低聚糖对枯草芽孢杆菌抑菌率

由表 2 和图 3 可知, S_5 对枯草芽孢杆菌的抗菌作用最好。壳低聚糖的抗菌作用随相对分子质量

的增加而增强,同时随壳低聚糖质量浓度的增加而增强。壳低聚糖 S_4 和在质量浓度为 0.50 g/dL 时,对枯草芽孢杆菌的抑制率达到 90.0% 以上, S_3 在此质量浓度的抑菌率只有 76.0%。质量浓度为 1.25 g/dL 的 S_2 、 S_3 、 S_4 和 S_5 ,对枯草芽孢杆菌均达到 100% 抑制效果。 S_1 样品由于含有大量单糖,促进壳低聚糖的生长。

表 1 不同质量浓度壳低聚糖溶液的抑菌圈直径

Tab. 1 The bacteriostasis diameters of chitooligosaccharides with different concentration mm

壳低聚糖 质量浓度/ (g/dL)	d/mm				
	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
0.20	—	12.28	11.26	8.96	—
0.40	—	14.12	13.44	9.46	—
0.60	—	15.02	14.01	10.04	8.86
0.80	—	15.68	14.98	10.68	9.72
1.00	—	16.88	15.86	11.42	10.98

注:“—”表示无抑菌圈产生。

表 2 不同相对分子质量的壳低聚糖对枯草芽孢杆菌的抑菌率

Tab. 2 Bacteriostatic ratio of different molecular weight chitooligosaccharides on *Bacillus subtilis*

壳低聚糖 质量浓度/ (g/dL)	抑菌率/%				
	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
0.25	—34.4	73.1	75.5	79.0	87.2
0.50	—240.6	76.0	85.5	91.8	94.0
1.00	—390.6	93.8	94.4	95.3	99.5
1.25	—510.1	100	100	100	100

注:负号表示壳低聚糖对枯草芽孢杆菌有促进生长作用

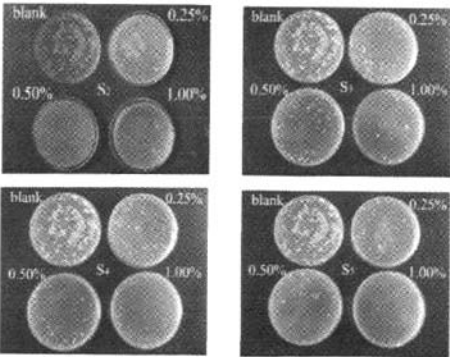


图 3 不同质量浓度壳低聚糖对枯草芽孢杆菌的抑菌效果

Fig. 3 The antibacterial activity of the chitooligosaccharides in different concentration on *Bacillus subtilis*

2.4 pH 值对壳低聚糖抑菌活性的影响

分别选取对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌抑菌效果最好的壳低聚糖进行实验。

表3 不同 pH 壳低聚糖溶液的抑菌活性

Tab. 3 The antibacteria activity of chitooligosaccharides at different pH value

pH 值	A _{610 nm}	
	S ₂ 抑制大肠杆菌	S ₅ 抑制枯草芽孢菌
5.0	0.098	0.054
5.5	0.086	0.042
6.0	0.062	0.059
6.5	0.080	0.065
7.0	0.091	0.071

由表3可知,在pH值6.0附近,壳低聚糖S₃对大肠杆菌抑制作用最好;在pH值5.5附近,壳低聚糖S₅对枯草芽孢杆菌抑制作用最强。

3 结 语

在供试样品中,相对分子质量2100的壳低聚糖对大肠杆菌(革兰氏阴性菌)抗菌作用最强。其抑菌作用随壳低聚糖质量浓度的增加而增强。初始pH值为6.0,壳低聚糖对大肠杆菌的抑菌效果最好。壳低聚糖对枯草芽孢杆菌(革兰氏阳性菌)抗菌作用随着相对分子质量增大逐渐增强,相对分子质量9000的壳低聚糖抑菌效果最好。质量浓度为1.25 g/dL的S₂、S₃、S₄和S₅,对枯草芽孢杆菌均达到100%抑制效果。初始pH值为5.5,壳低聚糖对枯草芽孢杆菌的抑菌效果最佳。

采用不同酶切方式制备壳低聚糖会影响壳低聚糖的抑菌活性,壳聚糖外切酶制备的样品含有大量的单糖,能促进细菌的生长。酶法降解所得壳低聚糖的相对分子质量大小是抑制细菌生长的主要影响因素。

参考文献(References):

- [1] Kim S K, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 64 (4): 357-368.
- [2] Roller S, Covill N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 47 (1-2): 67-77.
- [3] Enrique A, Marl'a S R, Viviana R, et al. Present and future role of chitin and chitosan in food[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2003, 3(10): 521-530.
- [4] Park P J, Je J Y, Kim S K. Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(3): 4624-4627.
- [5] 夏文水. 酶法改性壳聚糖的研究进展[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2001, 20(5): 550-554.
XIA Wen-shui. Advances in enzymatic modification of chitosan[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry(Journal of Food Science and Biotechnology)*, 2001, 20(5): 550-554. (in Chinese)
- [6] Jeon Y J, Park P J, Kim S K, et al. Antibacterial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 44(1): 71-76.
- [7] Kasaai M R, Arul J, Charlet C. Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan [J]. *Journal of Polymer Science(Part B): Polymer Physics*, 2000, 38(19): 2591-2598.
- [8] 方文建,隋斯光,郑连英. 壳聚糖相对分子质量的测定方法[J]化工进展, 2006, 25(4): 420-423.
FANG Wen-jian, SUI Si-guang, ZHENG Lian-ying. Determination of the relative molecular weight of chitosan[J]. *Chemical industry and engineering progress*, 2006, 25(4): 420-423. (in Chinese)
- [9] Gerasimenko D V, Avdienko I D, Bannikova G E. et al. Antibacterial effects of water-soluble low molecular weight chitosans on different microorganisms[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004, 40(3): 253-257.

(责任编辑:杨 萌)