

甲壳低聚糖抗菌作用及其在食品保藏中的应用

夏文水 张帆 何新益

(无锡轻工大学食品学院, 无锡 214036)

摘要 报道了甲壳低聚糖对食品中一些常见的细菌、霉菌、酵母菌的抗菌作用, 其抑菌率明显超过对照组, 相应最小抑菌质量浓度为 $1 \sim 10 \text{ g/L}$, 随着甲壳低聚糖质量浓度增加, 抑菌作用逐渐变强。并探讨了甲壳低聚糖抗菌活性与结构之间的关系, 结果表明甲壳低聚糖的抗菌活性与氨基含量和氨基质子化以及相对分子质量大小有关。此外, 当甲壳低聚糖作为防腐剂应用于苹果原汁保藏时, 在果汁中含 4 g/L 甲壳低聚糖可使果汁的保藏期由对照实验中 37°C 时 9 d 增加到 70 d , 显示了很好的防腐效果。

关键词 甲壳低聚糖; 抗菌作用; 食品保藏; 防腐剂

分类号 TS202.8

0 前言

甲壳低聚糖(chitooligosaccharides)是一类由 N-乙酰氨基葡萄糖或氨基葡萄糖通过 β -1, 4 糖苷键连接起来的低聚合度水溶性的糖类。可由甲壳素或壳聚糖经酸水解或酶水解而制得。甲壳低聚糖不仅具有重要的生理活性, 而且还有许多独特的功能性质, 在食品、医药、农业、化妆品等领域显示了广阔的应用前景。

前文^[1]曾报道了甲壳低聚糖的优越保湿性、吸湿性和抗菌活性, 特别在抗菌活性方面与国内外文献[2~4]报道的壳聚糖具有抗菌作用的结果相一致。但对甲壳低聚糖抗菌活性的定量测定和广谱性以及其结构与抗菌活性之间的关系均未有其他报道。此外, 到目前为止, 对壳聚糖的抗菌作用机理还没有定论。

在食品工业中, 壳聚糖的抗菌作用已受到关注^[5~6]。防腐保鲜是食品加工的关键问题之一, 在食品中添加防腐剂是一种延长保存期的重要措施。现有防腐剂还不能满足食品工业迅速发展的需要, 因而研究甲壳低聚糖的抗菌作用, 探讨甲壳低聚糖抗菌活性与其结构的关系, 对开发天然食品防腐剂提高食品质量具有重要的现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 甲壳低聚糖和壳聚糖 甲壳素来自虾壳, 由江苏启东和连云港甲壳素工厂提供, 灰分 $< 3\%$, 水分 $< 12\%$. 将甲壳素按文献[7]方法制备成不同脱乙酰化度(Degree of deacetylation DD)的壳聚糖, 再根据文献[8]方法制备得到一系列不同相对分子质量和不同 DD 的甲壳低聚糖. 其相对分子质量 M_r 以还原糖值计算和凝胶过滤法测定^[8]. 用酸碱滴定法测定脱乙酰化度^[7]. 5 种甲壳低聚糖 M_r 为 1500, DD 分别为 64%, 68%, 78%, 85% 和 92%. 壳聚糖及其低聚物 M_r 分别为 44×10^4 , 15×10^4 , 5×10^4 , 1×10^4 , 4×10^3 和 1.5×10^3 , 其 DD 为 $(78 \pm 2)\%$.

1.1.2 菌种 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、四联球菌 (*Micrococcus tetragenus*)、腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、根霉 (*Rhizopus sp*)、毛霉 (*Mucor sp*)、青霉 (*Penicillium sp*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、赤酵母 (*Rhodotorula sp*), 由本校食品学院微生物教研室提供. 细菌于营养琼脂培养基斜面上活化, 37℃ 培养 24 h. 霉菌和酵母于沙氏培养基斜面上活化, 30℃ 培养 72 h.

1.1.3 苹果汁 原果汁含量 100%, 由中外合资无锡橙宝食品有限公司提供, 可溶性固形物含量 12%, pH 3.5, 0~5℃ 下保存期 8 周.

1.2 方法

1.2.1 抑菌试验 将甲壳低聚糖溶解于少量 0.2 mol HAc-NaAc pH 4.5 缓冲液, 配制一系列含不同浓度甲壳低聚糖的培养基. 细菌制成含合适菌落数的菌悬液, 接种于平板于 37℃ 培养. 酵母菌和霉菌接种于沙氏液体培养基于 30℃ 摇床培养. 以含有等量 HAc-NaAc 缓冲液的培养基作对照实验, 以纯培养基作空白实验, 每个浓度试验作 2 个平行样.

1.2.2 抑菌率计算 细菌按稀释分离平板菌落计数法, 酵母菌用美兰染色液处理后在显微镜下直接计数, 抑菌率 = $(n_0 - n_1) / n_0 \times 100\%$, 式中 n_0 为空白条件下的细菌数, n_1 为某甲壳低聚糖浓度下细菌数. 霉菌以干重法计算, 将三角瓶中培养液菌体用定量滤纸抽滤收集后, 于 105℃ 烘至恒重, 抑菌率 = $(m_0 - m_1) / m_0 \times 100\%$, 式中 m_0 为空白条件下的菌体干质量 (g), m_1 为某甲壳低聚糖浓度下菌体干质量 (g).

1.2.3 最低抑菌质量浓度 ($\rho_{\min}$) 测定 将脱乙酰化度 (DD) 相同而相对分子质量 (M_r) 不同的甲壳低聚糖或壳聚糖对大肠杆菌进行抑菌试验, 采用 2 倍系列稀释法测定最低抑菌浓度. $M_r > 10\,000$ 的壳聚糖低聚物, 先用稀 HAc 溶解后, 用 NaAc 调节 pH, 与培养基混合均匀.

1.2.4 溶解性测定 将甲壳低聚糖和壳聚糖按质量浓度 10 g/L 溶解于 1% HAc 中, 然后用稀 NaOH 调不同 pH 值, 在 uv-754 分光光度计上于波长 660 nm 处测定溶液的透光率, T% 表示不同 pH 值时样品的溶解性, 以 HAc-NaAc 溶液作空白.

1.2.5 pH 对抑菌作用的影响 配制培养基时用 1 mol/L HCl 调节 pH 在 3.5, 4.5, 5.2, 6.0 和 7.0 处, 用甲壳低聚糖和壳聚糖对大肠杆菌进行抑菌试验, 同时进行空白对照试验.

1.2.6 苹果汁保藏试验 在无菌条件下, 将甲壳低聚糖按不同浓度加入到含有苹果汁的试管中, 振摇溶解后密封, 以原果汁为空白, 分别于 30, 37, 45℃ 下培养, 定期取果汁测定菌数, 以菌数 > 100 个/mL 为变质.

2 结果与讨论

2.1 甲壳低聚糖的抗菌作用

用甲壳低聚糖(M_r 为 1500, DD 为 68 %) 对食品中一些常见的细菌、霉菌和酵母菌进行抗菌试验。表 1 列出了甲壳低聚糖在不同质量浓度下对细菌的抑菌率。甲壳低聚糖对 4 种受试细菌有抑制作用, 其抑菌率明显超过对照组, 并随着质量浓度的增加其抑菌

率逐渐变大。在甲壳低聚糖质量浓度 1 g/L 时, 已完全抑制了大肠杆菌、四联球菌和枯草芽孢杆菌的生长; 质量浓度为 2 g/L 时, 腊状芽孢杆菌的生长完全受到抑制。表 2 是甲壳低聚糖对酵母菌的抑菌率, 甲壳低聚糖对这 2 种酵母菌的最低抑菌质量浓度为 3 g/L。对霉菌的抑菌率的结果见表 3, 在受试 4 种霉菌中, 青霉和毛霉易受到抑制, 最小抑菌质量浓度为 4 g/L; 而对根霉和黑曲霉抑制作用则相对弱些。甲壳低聚糖质量浓度需增加到 8 g/L 和 10 g/L。综合上述, 随着甲壳低聚糖质量浓度的增加, 对各种菌的抑菌作用都相应增强。但不同受试菌对甲壳低聚糖抑制作用的敏感性不同, 细菌易被抑制, 酵母菌其次, 而对霉菌则抑制作用略小, 这可能与甲壳低聚糖的抗菌机理有关。

表 1 甲壳低聚糖对细菌的抑菌率 %

菌 种	对 照	甲壳低聚糖质量浓度/(g/L)		
		0.5	1	2
枯草芽孢杆菌	31.6	57.9	100	100
腊状芽孢杆菌	34.4	50.5	62.5	100
四联球菌	36.0	60.0	100	100
大肠杆菌	37.0	59.3	100	100

表 2 甲壳低聚糖对酵母菌的抑菌率 %

菌 种	对 照	甲壳低聚糖质量浓度/(g/L)		
		1	2	3
啤酒酵母	27.8	85.8	98	100
赤酵母	29.4	71.7	86	100

表 3 甲壳低聚糖对霉菌的抑菌率 %

菌 种	对 照	甲壳低聚糖质量浓度/(g/L)				
		1	2	4	8	10
青霉	17.3	68.5	94.8	100	100	100
毛霉	14.6	72.7	95.6	100	100	100
根霉	9.6	33.8	46.0	69.6	99.4	100
黑曲霉	2.2	2.9	23.1	56.9	92.9	99.2

2.2 抗菌活性与结构之间关系

壳聚糖与纤维素结构不同之处在于 C_2 上存在氨基, 从而引起它们在性质和功能上的差异。壳聚糖具有抗菌作用显然应与氨基有关。壳聚糖游离氨基含量的多少可由脱乙酰化度的高低来反映。其次, 相对分子质量的大小也是影响其活性的重要因素。为此, 采用一系列不同脱乙酰化度而具有相同相对分子质量大小的甲壳低聚糖, 或具有相同脱乙酰化度而相对分子质量大小不同的壳聚糖和水解低聚物, 对大肠杆菌进行抑菌试验, 其结果如图 1 和图 2。由图可知, 当脱乙酰化度增加时, 即游离氨基含量增加, 其抑菌率增大, 而随着相对分子质量的增大, 最小抑菌浓度有逐渐增高的趋势, 即抑菌作用减弱, 这说明壳聚糖氨基的存在和相对分子质量大小对其抗菌活性都产生了重要的影响。当在不同 pH 条件下测定甲壳低聚糖和壳聚糖对大肠杆菌的抑菌作用, 结果如图 3。从图中可看出, 相对分子质量为 1 500 的甲壳低聚糖(DD78%), 质量浓度 1 g/L 和 pH6.0 时, 其抑菌效果很好, 但 $pH > 6.0$ 时, 其抑菌率开始减小并有所下降, 而相对分子质量为 440 000 的壳聚糖(DD78%), 质量浓度为 2.5 g/L 时, 在 pH5.2 以下, 抑菌作用基本上与 1 g/L 的甲壳低聚糖相当, 但在 $pH > 5.2$ 时, 则抑菌率从 91% 下降较快, 当达到 pH7.0 时, 抑菌作用很小或消失。壳聚糖的抑菌率与甲壳低聚糖相当时的 pH 值下降了 0.8 和 pH7 时抑菌作用消失, 其原因主要与壳聚糖的溶

解性有关。从图 4 溶解性与 pH 的关系可看出, 壳聚糖在 $\text{pH} > 5.5$ 时, 溶解性开始下降, 产生不溶性混浊, 但甲壳低聚糖在 $\text{pH} 7$ 以下时溶解性较高, 两者在不同 pH 值时的抑菌率与其溶解性相一致的。而两者在 $\text{pH} < 7$ 时的溶解性又与其氨基在酸液中的质子化相关。这也说明壳聚糖及其低聚物的抗菌作用与游离氨基的质子化作用直接有关, 是否为阳离子与微生物细胞大分子相互作用而引起膜功能紊乱达到抗菌作用尚待进一步证实。

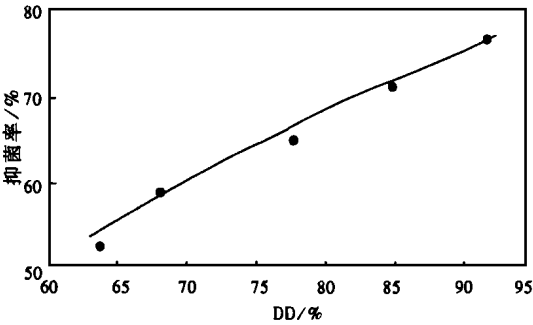


图 1 甲壳低聚糖脱乙酰化度对抗菌活性的影响
 M_r 1500, 0.5 g/L 大肠杆菌

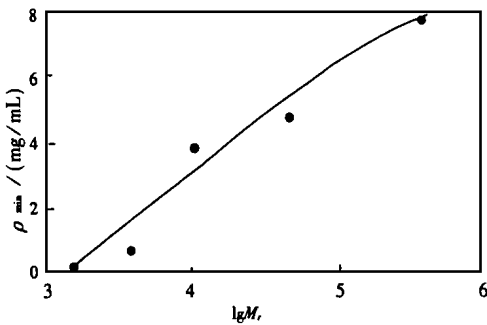


图 2 壳聚糖及其低聚物分子量对抗菌活性的影响
DD78%, 大肠杆菌, $\text{pH} 6.0$

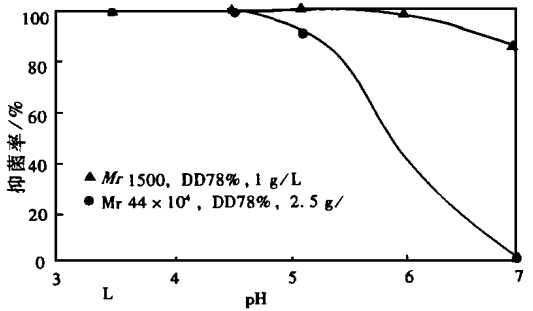


图 3 pH 对抗菌活性的影响

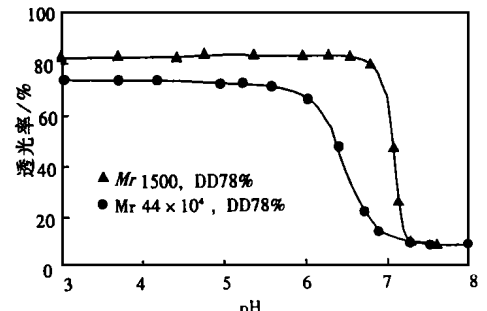


图 4 溶解性与 pH 的关系

壳聚糖和甲壳低聚糖在酸性介质中, 两者虽然都显示了较强的抗菌作用, 但在食品中实际使用时却有差别。因为壳聚糖溶解性差, 使用时需先用醋酸或一些有机酸溶解后才能添加, 这样就不可避免地带来酸味或不良风味, 特别是对要保持自然风味的食品, 使用时就会受到限制或不能使用。而甲壳低聚糖水溶性好, 可直接添加于 $\text{pH} < 7.0$ 以下的食品中, 对食品无任何不良影响, 为应用提供了方便, 并可确保食品品质。

2.3 甲壳低聚糖作防腐剂在苹果原汁保藏中的应用

天然原果汁以其丰富的营养价值和纯正的风味在市场上深受消费者欢迎。这类果汁通常只能在低温 $0 \sim 5^\circ\text{C}$ 下保存数周, 使其销售受到一定的限制。若通过高温加热灭菌虽可提高保藏期, 但风味会受到影响, 因此添加天然无毒防腐剂是一条有效途径。甲壳低聚糖不但具有优良的抗菌作用, 而且又有很高的水溶性, 这就为开发甲壳低聚糖作为食品防腐剂提供了可能。为此, 将甲壳低聚糖用于苹果汁保藏试验, 其结果如表 4。从表 4 中可看出, 空白的苹果汁在 30°C 条件下, 保存期只有 7 d, 当果汁中含 1 g/L 甲壳低聚糖时, 则保存期达到 54 d, 其防腐效果非常明显; 若添加量达 4 g/L 时, 保藏期延长到 100 d 以上。如果温度升高, 微生物生长繁殖快, 当温度达 45°C 时, 果汁保藏期只有 3 d, 而添加 1 g/L 的甲壳低聚糖时, 保

藏期为 8 d, 当添加量达到 4 g/L 时, 保藏期在 70 d 以上。这说明甲壳低聚糖的抗菌作用对苹果汁的保藏发挥了很好的防腐效果。

壳聚糖在我国作为保健食品已于 1997 年获卫生部批准, 以这种安全无毒天然多糖为原料而制得的甲壳低聚糖, 将有可能成为新型的天然食品防腐剂。这种甲壳低聚糖作为防腐剂不仅可推广应用到其他果汁中, 而且又特别适合应用于酸性或低酸性的食品保藏。

表 4 甲壳低聚糖对苹果原汁的保藏天数 d

温度/	空白	对照	甲壳低聚糖质量浓度/(g/L)			
			1	2	4	6
30	7	13	54	76	> 100	> 100
37	6	9	19	30	> 70	> 70
45	3	3	8	17	> 70	> 70

参 考 文 献

1 夏文水, 吴焱楠. 甲壳低聚糖功能性质. 无锡轻工大学学报, 1996, 15(4): 297 ~ 302

2 Uchida Y. Antibacterial activity of chitin and chitosan. Gekkan Fudo Kemikran, 1988, (4): 22

3 Muzzarelli R A A. Tarsi R, Filippini O, etal. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan, Antimicrob. A-gents Chemother, 1990, 34(10): 2019 ~ 23

4 蒋玉燕, 毕忆群, 汪子伟, 等. 聚氨基葡萄糖的体外抗菌活性. 中国抗生素杂志, 1996, 21(1): 54 ~ 56

5 于广利, 娄小红, 王师, 等. 不同聚合度甲壳胺对鲜猪肉保鲜作用. 中国海洋药物, 1994, (3): 45

6 王光华, 乔晓玲. 壳聚糖醋酸混合液对 30 贮藏的鲜猪肉上各种腐败菌生长的影响. 食品与发酵工业, 1993, (3): 45 ~ 50

7 夏文水, 王璋. 脱乙酰化反应条件对壳聚糖性能的影响. 无锡轻工业学报, 1992, 11(2): 104 ~ 110

8 夏文水, 吴焱楠, 张帆, 等. 非专一性复合水解酶解聚壳聚糖的研究. 中国甲壳资源研究开发应用学术研讨会, 青岛, 1997

Antimicrobial of Chitooligosaccharides and its
Application to Food Preservation

Xia Wenshui Zhang Fan He Xinyi

(School of Food Science Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract The antimicrobial activity of chitooligosaccharides against some of bacterial , moulds and yeast , which are usually present in food , was explored. Their antimicrobial ratio is higher than that of control test , the minimal inhibition concentrations rang from 1 g/L to 10 g/L. The antimicrobial action is increased as the increase in the concentration of chitooligosaccharides. The correlation between activity and structure of chi-tooligosaccharides was discussed. The results showed that the antimicrobial activity is de-pendent upon amino content, protonization and molecular weight in chitooligosaccharides. When chitooligosaccharides as preservative agent was used to preserve natural apple juice, its concentration of 4 g/L can increase shelf-life of the juice from 9 days to 70 days during storage at 37 .

Key words chitooligosaccharides; antimicrobial agent; food preservation; perservative a-gent