

## 壳聚糖抑菌机制的初步研究

陈威<sup>1,2,3</sup>, 吴清平<sup>2\*</sup>, 张菊梅<sup>2</sup>, 吴慧清<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

(<sup>2</sup> 广东省微生物研究所菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070)

(<sup>3</sup> 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 壳聚糖在医学、食品、环保、日化用品等领域有着广泛而重要的应用。近年来, 壳聚糖由于对不同的菌类都具有良好的抑菌效果而被研究者们密切关注。然而, 有关壳聚糖抑菌机制的研究却并不多, 其抑菌机制也没有被完全阐明。在本研究中, 我们发现很多金属离子可以对壳聚糖的抑菌效果产生影响, 高浓度金属离子(0.5%)可以使壳聚糖完全丧失抑菌活性。还发现金黄色葡萄球菌和白色念珠菌在壳聚糖的作用下会发生钾离子和 ATP 的渗漏, 而且五万分子量的壳聚糖引起钾离子和 ATP 的渗漏大约比五千分子量壳聚糖多 2 到 4 倍。不同分子量的壳聚糖对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌都具有较好的抑菌效果, 但是引起钾离子和 ATP 的渗漏量却存在很大差异, 这说明小分子量壳聚糖很可能存在与大分子量壳聚糖不同的抑菌机制。

**关键词:** 壳聚糖; 金属离子; 抑菌活性; 机制

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 02-0164-05

壳聚糖是氨基葡萄糖和 N-乙酰氨基葡萄糖通过  $\beta$ -1, 4 键连接而成的一种多用途天然聚合物糖类, 可通过几丁质脱去乙酰基获得。壳聚糖除了具有很好的抑菌活性外, 还具有良好的生物降解性及生物相容性、抗菌谱广、对哺乳动物细胞毒性低、能降低血液中胆固醇、降低血压、抗感染、控制关节炎、抗癌、抗溃疡、抗凝血、减肥等作用<sup>[1-3]</sup>。因此, 很多研究者认为壳聚糖是一种非常有潜力的新型天然防腐剂。对壳聚糖抑菌活性影响因素以及抗菌机理的研究可以促进壳聚糖作为一种新型天然防腐剂的实际应用, 意义重大。

已有的研究发现, 壳聚糖的抑菌活性和很多因素有关。不同分子量的壳聚糖抑菌活性不同, 对于不同的菌壳聚糖的最佳抑菌分子量也不同<sup>[4]</sup>。壳聚糖只有在酸性溶液中才具有抑菌活性, 并且溶液的 pH 值越低抑菌活性越强。壳聚糖的抑菌活性也受到其脱乙酰度的影响, 脱乙酰度越高, 壳聚糖的抑菌活性越

强。对壳聚糖抑菌机制的研究发现, 壳聚糖可以破坏革兰氏阴性菌的外膜结构<sup>[5]</sup>。本论文研究了不同分子量壳聚糖对几种常见致病菌的抑菌作用, 并评估了 4 种金属离子对壳聚糖抑菌活性的影响。同时, 研究了不同分子量壳聚糖引起金黄色葡萄球菌钾离子和 ATP 渗漏的情况, 推测大分子量壳聚糖和小分子量壳聚糖可能存在不同的抑菌机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 实验使用的菌株分别是大肠杆菌 (*Escherichia coli*)ATCC8099、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)ATCC6538、白色念珠菌 (*Candida albicans*)ATCC10231、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)CMCC10104、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)ATCC9372。菌株都来源于广东省菌种保藏中心。

基金项目: 广东省科技计划项目(2006A10601002, 2007B01100006)

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-20-87688132; E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

作者简介: 陈威(1983-), 男, 湖北武汉人, 硕士研究生。E-mail: frog18575@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-09-17; 修回日期: 2007-10-23

**1.1.2 培养基:**白色念珠菌使用沙氏琼脂培养基和沙氏肉汤培养,其它菌使用营养琼脂培养基和营养肉汤培养,培养基均由广东环凯微生物科技有限公司生产。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**乙酸、NaOH、ATP 检测试剂盒等由广东环凯微生物科技有限公司生产。分子量分别为 5kDa、10kDa、20kDa、50kDa、100kDa 的壳聚糖订购于浙江金壳生物化学有限公司,壳聚糖脱乙酰度达到 90%以上。SHG-C 生物化学发光测量仪由上海市上立分析仪器厂生产。

## 1.2 不同分子量壳聚糖抑菌活性的检测

壳聚糖的抗菌活性采用平板涂布法检测。不同分子量的壳聚糖分别使用 0.5%的醋酸溶液溶解,分别配制成浓度(W/V)为 1%、0.5%、0.25%、0.125%、0.063%、0.031%的壳聚糖醋酸溶液。然后,使用 10mol/L 的 NaOH 溶液调整壳聚糖醋酸溶液的 pH 值至 5.5。取经过营养肉汤过夜培养处于对数生长期细菌菌液分别加入到不同浓度的壳聚糖醋酸溶液中(白色念珠菌使用沙氏肉汤培养),使细菌浓度控制在  $10^5$ cfu/mL 左右,对照使用 0.5%的醋酸水溶液(pH 值调整至 5.5)代替壳聚糖溶液,混匀后分别取 0.1mL 加入到营养平板(白色念珠菌使用沙氏营养平板)中并用无菌玻璃涂棒涂布均匀,每个样品分别做 3 个平行,在 37℃温箱中培养 24h 后观察结果<sup>[6]</sup>。壳聚糖的抑菌率:  $B=(O-A)/O \times 100\%$ , O 为对照板中生长的菌数,A 为不同浓度壳聚糖板中生长的菌数。

## 1.3 金属离子对壳聚糖抑菌活性的影响

方法与壳聚糖抗菌活性的检测方法相同。实验使用 50kDa 分子量的壳聚糖醋酸溶液,浓度为 0.5%。在壳聚糖溶液中分别加入浓度(W/V)分别为 0.5%、0.25%、0.125%、0.063%、0.031%、0.016%的钠离子、钾离子、镁离子和钙离子,对照使用 0.5%的醋酸溶液代替壳聚糖溶液同样加入对应浓度的金属离子,并调整 pH 值至 5.5。在各浓度含金属离子溶液体系中再加入不同受检菌液,同样控制菌浓度在  $10^5$ cfu/mL 左右,每个样品分别做 3 个平行,混匀后取 0.1mL 涂板,培养 24h 后观察结果,计算抑菌率。

## 1.4 不同分子量壳聚糖引起金黄色葡萄球菌和白色念珠菌钾离子渗漏的研究<sup>[7]</sup>

实验使用了两种不同分子量壳聚糖溶液,分别为 5kDa 分子量浓度为 1%壳聚和 50kDa 分子量浓度为 1%壳聚糖溶液,对照为 0.5%的醋酸溶液, pH 都调整至 5.5。经过夜培养的金黄色葡萄球菌和白色念珠菌离心收

集后再用去离子水清洗 2 次。然后使用分光光度计检测菌液浓度,使用去离子水将菌浓度调整至  $OD_{600}=0.9$ 。收集细菌,并分别加入两种不同分子量的壳聚糖溶液,对照中加入 0.5%的醋酸溶液,悬浮菌液,并分别在 15min、30min、1h、2h、4h、8h 后取样,离心去除细菌,上清液迅速在  $-30^\circ\text{C}$  条件下冻结待测,每个样品分别做 3 个平行。上清液钾离子的浓度送广州分析检测中心检测。

## 1.5 不同分子量壳聚糖引起金黄色葡萄球菌和白色念珠菌 ATP 渗漏的研究<sup>[7]</sup>

本实验方法同钾离子渗漏研究的处理方法,处理时间分别为 1min、2min、5min、10min、20min,离心去除细菌,上清液迅速在  $-30^\circ\text{C}$  条件下冻结待测,每个样品分别做 3 个平行。上清液使用广东省环凯微生物科技有限公司的 ATP 检测试剂盒处理,用 4SHG-C 生物化学发光测量仪检测 ATP 浓度。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同分子量壳聚糖的抑菌活性

从图 1 中可以看出,不同分子量的壳聚糖溶液都具有较好的抑菌效果,对不同的菌来说,不同分子量的壳聚糖溶液抑菌效果不同。不同分子量的壳聚糖溶液对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌具有很好的抑菌效果,较小分子量的壳聚糖溶液对枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌具有较好的抑菌效果。对某些菌而言,并不是壳聚糖溶液浓度越高抑菌效果就一定越好,这可能与壳聚糖的抑菌机制有关,高浓度的壳聚糖溶液由于含有过多的壳聚糖与细菌膜结合,完全黏附在膜外,会影响细胞内容物的渗漏,一定程度上会影响抑菌效果,所以即使很高浓度的壳聚糖也不能完全抑制某些细菌的生长。

### 2.2 金属离子对壳聚糖溶液抑菌效果的影响

50kDa 分子量浓度为 0.5%的壳聚糖溶液对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均具有很好的抑菌效果,在壳聚糖溶液中加入不同浓度的金属离子后,壳聚糖溶液的抑菌效果明显受到影响(图 2),当金属离子浓度达到一定程度时,壳聚糖溶液完全失去抑菌活性。钠离子对壳聚糖抑制金黄色葡萄球菌生长的影响很小,而对壳聚糖抑制白色念珠菌生长的影响效果明显。实验结果显示二价金属离子对壳聚糖的抗菌活性影响大于一价的金属离子。金属离子对壳聚糖抑菌效果的影响可能是因为金属离子的存在干扰了壳聚糖与细菌细胞膜的结合,使壳聚糖无法对细菌细胞膜结构造成破坏。

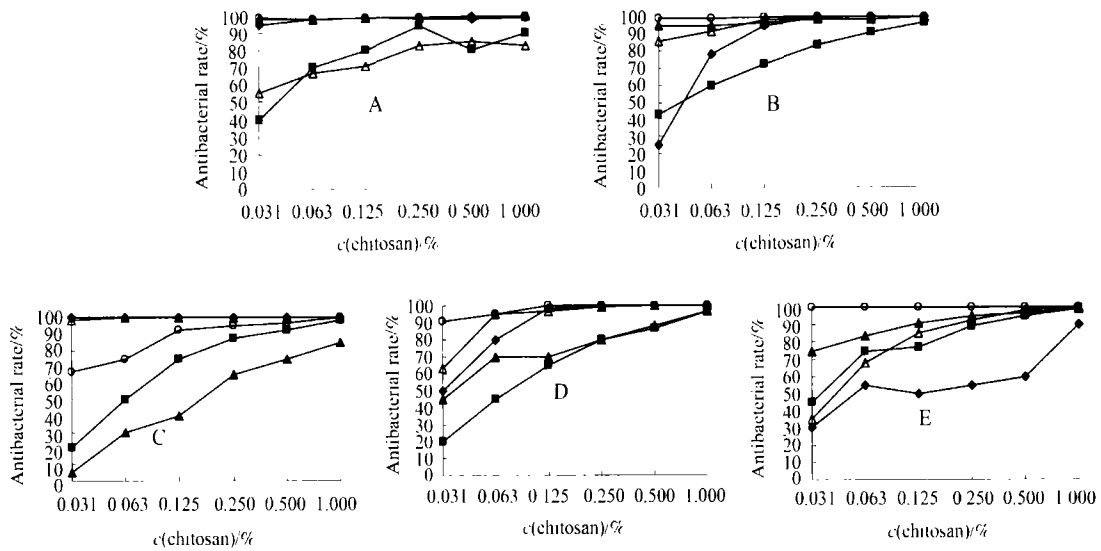


图 1 不同分子量壳聚糖的抑菌活性

Fig. 1 Antibacterial activity of chitosan. A: 5kDa; B: 10kDa; C: 20kDa; D: 50kDa; E: 100kDa. (◆): *Pseudomonas aeruginosa*; (■): *Escherichia coli*; (▲): *Bacillus subtilis*; (○): *Staphylococcus aureus*; (△): *Candida albicans*.

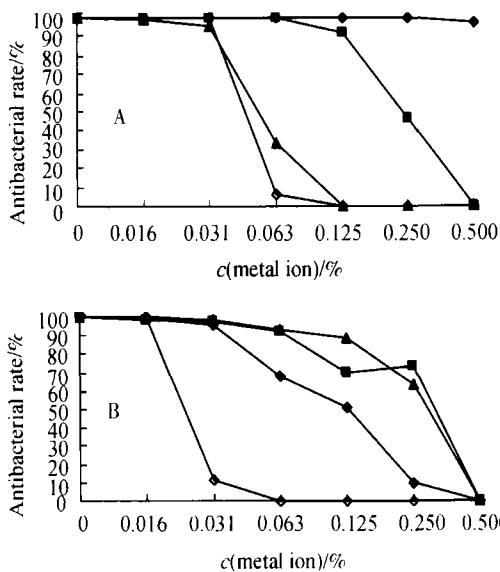


图 2 金属离子对壳聚糖抑制金黄色葡萄球菌(A)和白色念珠菌(B)效果的影响

Fig. 2 Influence of metal ion to antibacterial activity of chitosan against *Staphylococcus aureus* (A) and *Candida albicans* (B). (■):  $K^+$ ; (◆):  $Na^+$ ; (▲):  $Mg^{2+}$ ; (◇):  $Ca^{2+}$ .

### 2.3 壳聚糖溶液引起金黄色葡萄球菌和白色念珠菌钾离子的渗漏情况

金黄色葡萄球菌和白色念珠菌分别经过 5kDa 分子量和 50kDa 分子量浓度为 1% 的壳聚糖溶液处理后, 钾离子有明显的渗漏(图 3)。由于 0.5% 的乙酸(pH 调整到 5.5)本身就对金黄色葡萄球菌有一定的抑菌效果, 因此, 它也可以引起一定量钾离子的渗漏。而白色念珠菌比较耐乙酸, 因此 0.5% 的乙酸溶液引起白色念珠菌钾离子的渗漏量比较低。5kDa 分子量浓度为

1% 的壳聚糖溶液引起的钾离子渗漏量比 0.5% 的乙酸溶液略多, 而 50kDa 分子量浓度为 1% 的壳聚糖溶液引起的钾离子渗漏量明显大于前两者。可以看出, 大分子量壳聚糖对细菌膜结构的破坏程度明显大于小分

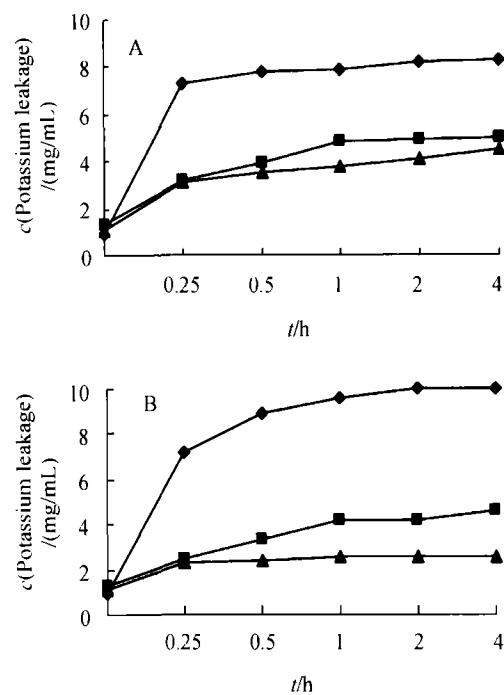


图 3 金黄色葡萄球菌(A)和白色念珠菌(B)经过壳聚糖处理后钾离子渗漏情况

Fig. 3 Leakage of potassium of *Staphylococcus aureus* (A) and *Candida albicans* (B) treated by chitosan. (◆): 50kDa; (■): 5kDa; (▲): 0.5% acetic acid.

子量壳聚糖。对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌而言,钾离子的渗漏量是比较大的(使用三氯乙酸处理过的相应浓度的金黄色葡萄球菌钾离子渗漏量为 11mg/mL,白色念珠菌为 10.5mg/mL),所以大分子量壳聚糖引起金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的钾离子渗漏可能是其抑制细菌生长的重要因素。而小分子量的壳聚糖引起的钾离子渗漏量较小,因此小分子量壳聚糖可能还存在其它的未知抑菌机制。

#### 2.4 壳聚糖溶液引起金黄色葡萄球菌和白色念珠菌 ATP 渗漏的情况

经 1%浓度的壳聚糖溶液处理后,金黄色葡萄球菌和白色念珠菌都有 ATP 的渗漏(图 4)。其中 50 kDa 分子量的壳聚糖引起 ATP 的渗漏量明显比 5kDa 分子量壳聚糖大。在实验过程中,由于渗漏出来的 ATP 在溶液中会有一定程度的降解,时间越长降解量越大,所以出现了一定时间后 ATP 渗漏量降低的现象。可以看出,大分子量壳聚糖对细胞膜结构的破坏明显比小分子量壳聚糖大,有大量的 ATP 渗漏出来,这一现象与钾离子的渗漏情况类似,进一步说明大分子量壳聚糖可能是通过破坏细胞膜结构来抑制细菌的生长,而小分子量壳聚糖可能还存在其他的抑菌机制。

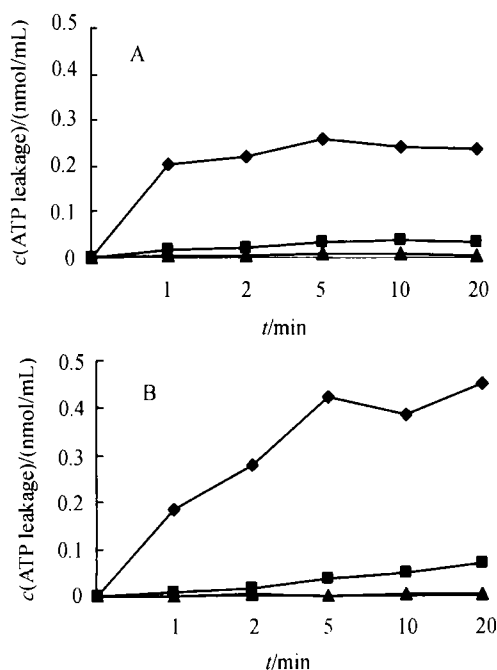


图 4 金黄色葡萄球菌(A)和白色念珠菌(B)经过壳聚糖溶液处理后 ATP 渗漏情况

Fig. 4 Leakage of ATP of *Staphylococcus aureus* (A) and *Candida albicans* (B) treated by chitosan.(◆): 50kDa ; (■): 5kDa; (▲): 0.5%acetic acid.

### 3 讨论

壳聚糖对不同的受检菌株都具有较好的抑菌效果,特别是对金黄色葡萄球菌抑菌效果最好。壳聚糖抑菌效果受金属离子的影响很大,这与其他研究者的研究结果相符<sup>[8]</sup>,当金属离子浓度达到一定程度时,壳聚糖完全失去抑菌活性。这可能与壳聚糖的抑菌机制有关,壳聚糖在酸性条件下带正电荷,可以与细胞膜上带负电荷的物质结合,通过这种吸附作用破坏细胞膜的功能,当有大量金属离子存在时,带正电荷的金属离子干扰了壳聚糖与细胞膜的结合作用,使壳聚糖失去抑菌效果。壳聚糖对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抑菌效果并没有明显差别。壳聚糖与细菌的结合主要与细菌外膜结构中所含有带阴离子分子的数量有关系,膜结构中含有带阴离子的分子数量越多,越容易与壳聚糖结合。细胞膜表面所含的带阴离子分子数量与该菌是革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌无关。电镜下观察发现,在壳聚糖的作用下,细菌形态会发生明显的改变<sup>[9]</sup>,同时细胞内部也会发生一些明显的变化<sup>[10, 11]</sup>,这些可能是由细胞内容物渗漏造成的,也有可能是较小分子量的壳聚糖进入细胞内造成的。革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌在壳聚糖作用下,都有相似的形态上的变化。从电镜照片上分析壳聚糖对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抑菌机制可能并无差异。

大分子量壳聚糖在与细胞结合后,会引起大量钾离子和 ATP 的渗漏,渗漏量明显大于小分子量壳聚糖,这说明大分子量壳聚糖对细胞膜结构的破坏要远大于小分子量壳聚糖。小分子量壳聚糖与大分子量壳聚糖一样具有很好的抑菌效果,这说明小分子量的壳聚糖可能存在与大分子量壳聚糖不同的抑菌机制。有研究者认为小分子量壳聚糖(分子量小于 5kDa)在细胞膜结构被一定程度破坏后可以进入细胞内<sup>[12]</sup>,是否壳聚糖进入细胞后会引起细胞内蛋白质和核酸物质的絮凝,或者通过与核酸以及酶的结合来破坏 DNA 的表达和蛋白质的合成?这些都将是以后壳聚糖抑菌机制研究的热点。

### 参 考 文 献

- [1] Kim SK, Niranjan R. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 62: 357-368.
- [2] Wang XH, Du YM, Fan LH, et al. Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization

- and Structure-activity study. *Polymer Bulletin*, 2005, 55: 105–113.
- [3] Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*, 1997, 14: 535–542.
- [4] Zheng LY, Zhu JF. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 54: 527–530.
- [5] Helander IM, Ahvenainen R, Rhoades J. *et al.* Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 71: 235–244.
- [6] Gerasimenko DV, Avdienko ID, Bannikova GE, *et al.* Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004, 40: 253–257.
- [7] Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, *et al.* Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97: 104–113.
- [8] 荆迎军, 郝友进, 渠晖, 等. 壳聚糖的抑菌活性分析及其抑菌机理的研究. 中国抗生素杂志 (*Chinese Journal of Antibiotics*), 2006, 31(6): 361–365.
- [9] Carlos P, Waldo AM, Hazel P, *et al.* Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromol Biosci*, 2003, 3: 511–520.
- [10] Wang XH, Du YM, Fan LH, *et al.* Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study. *Polymer Bulletin*, 2005, 55: 105–113.
- [11] 吴迪, 蔡伟民. 壳聚糖对细菌细胞壁的影响. 黑龙江大学自然科学学报 (*Journal of Natural Science of Heilongjiang University*), 2003, 20: 101–103.
- [12] Tokura SK, Ueno S, Nishi N, *et al.* Molecular weight dependent antimicrobial activity of chitosan. *Macromol Symp*, 1997, 120: 1–9.

## Antibacterial mechanism of chitosan

Wei Chen<sup>1, 2, 3</sup>, Qingping Wu<sup>2\*</sup>, Jumei Zhang<sup>2</sup>, Huiqing Wu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071, China)

(<sup>2</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

(<sup>3</sup> Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

**Abstract:** In this study, we found that many metal ions could affect the antibacterial activity of chitosan, such as K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. High concentration (about 0.5%) of metal ions could make chitosan completely lose its antibacterial activity, except for the effect of Na<sup>+</sup> on the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. We also found that chitosan could weaken the barrier function of the outer membrane of different microorganisms. Large amount of K<sup>+</sup> and ATP leakages were observed during exposure of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to chitosan. Both 50kDa chitosan and 5kDa chitosan had good antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, but the 50kDa chitosan could make nearly two to four times amount of K<sup>+</sup> and ATP leakages than the 5kDa chitosan. There might have been different antibacterial mechanisms of high-molecular-weight and low-molecular-weight chitosan.

**Keywords:** chitosan; metal ion; antibacterial activity; mechanism

Supported by the Programs for Science and Technology Development of Guangdong Province (2006A10601002, 2007B01100006)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-87688132; E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

Received: 17 September 2007/Revised: 23 October 2007