

不同分子量壳低聚糖抗菌作用的研究

孙晓文¹, 金蕴² (1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016; 2. 浙江大学医学院附属妇幼保健院, 浙江 杭州 310016)

摘要:目的 研究不同分子量的壳低聚糖抗金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的能力及其最低杀菌浓度。方法 分别测定及比较加有壳低聚糖的培养基及空白培养基的菌浓。结果 不同分子量、不同浓度的壳低聚糖的抗菌作用强弱不一, 同一规格壳低聚糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的作用强度不同。结论 壳低聚糖对金黄色葡萄球菌的抗菌作用随分子量的减小而增加, 随浓度的增加而增加, 对大肠杆菌作用很不明显, 且无规律可寻。

关键词:壳低聚糖; 纤维素酶; 金黄色葡萄球菌; 大肠杆菌

中图分类号: R282; R965 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2003)05-0351-03

Study on antibacterial effects of chitooligosaccharides with different molecular weight

SUN Xiaowen, JIN Yun (Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the antibacterial effects of chitooligosaccharides with different molecular weight (mol wt) to *St. aureus* and *E. coli*. Calculate the MICs. **METHOD** Measured the bacterial concentration in culture media with or without chitooligosaccharide. **RESULTS** The chitooligosaccharides with different mol. wt and in different concentration varied in antibacterial effects. The intensity of effects upon *St. aureus* and *E. coli* were also different. **CONCLUSION** The antibacterial effect of chitooligosaccharides upon *St. aureus* become stronger as their mol. wt and concentrations increase. The actions upon *E. coli* are not obvious and no regularities can be drawn.

甲壳素是一种天然的高聚物,广泛存在于虾壳,蟹壳,昆虫壳中,产量仅次于纤维素。其活性成分壳低聚糖具有强效抑菌活性^[1]。本次实验用纤维素酶降解壳聚糖,得到不同分子量的壳低聚糖及对不同分子量、不同浓度壳低聚糖的抑菌活性进行比较,从而得出壳低聚糖的最佳抑菌分子量和最佳抑菌浓度。

1 材料与仪器

1.1 材料

壳聚糖(玉环海洋生物化学有限公司 脱乙酰度 88.7%, 1%水溶液黏度为 135 mPa·s,黏均分子量 123.4 万);纤维素酶(自制 75 U/mg);金黄色葡萄球菌(ATCC 25923 本院检验科细菌室);大肠杆菌(ATCC 25922 本院检验科细菌室)

1.2 仪器

高压蒸汽消毒锅(AMSCO 美国);恒温玻璃水浴(上海精洪实验设备有限公司);血球计数器(贺利氏,德国);显微镜(贺利氏,德国);乌氏黏度计(浙江椒江玻璃仪器厂)

2 方法

2.1 细菌的培养及适合菌浓的确定

配制液体肉汤蛋白胨培养基 200 mL,分别对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行常规培养^[2]。取培养后的细菌原液 0.2 mL 按十倍稀释法操作得 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ... 10^{-8} 的各种稀释度的菌液。取不同规格的菌液分别进行培养,镜检得最佳菌浓分别是:金黄色葡萄球菌为 10^{-6} ,大肠杆菌为 10^{-4} 。

2.2 不同分子量壳低聚糖的制备

称取干燥壳聚糖 1.0g,加入 1.0 mL 冰醋酸,不断搅拌至完全溶解,再用蒸馏水定容至 100 mL。调节壳聚糖溶液至 pH 5.0,再放置过夜,使调 pH 时产生的气泡消失。将壳聚糖溶液在 55℃ 的摇床水浴中恒温 0.5h,加入 1.5g 纤维素酶,搅拌,使均匀分散。在此条件下,壳聚糖开始降解。控制降解时间得到不同分子量的壳低聚糖溶液,再经甲醇提取法提纯^[3]。用乌氏黏度计测定分子量,分别得到分子量为 14000, 11000, 5000, 3000, 1600, 700 的壳低聚糖。

2.3 壳低聚糖的抗菌试验

将分子量为 14000, 11000, 5000, 3000, 1600, 700 的壳低聚糖分别溶解于 0.5% 的醋酸溶液中灭菌后配成浓度为 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0% 的溶液备用。配制 100 mL 固体肉汤蛋白胨培养基,调 pH 值到 7.0~7.2,分装到两个 500 mL 的锥形瓶中,连同 200 mL 无菌水用高压蒸汽在 0.1 mPa 下灭菌 20 min,冷至 45℃ 左右后用无菌吸管吸取注入无菌平皿内,水平放置待凝,制成培养平板。取稀释度为 10^{-6} 的金黄色葡萄球菌液, 10^{-4} 的大肠杆菌液在培养平板上涂布均匀后,用无菌镊子将无菌滤纸片分别浸入各样品溶液中,取出并在试管内壁上除去多余溶液后,以无菌操作将纸片放入培养皿内,并使其铺满皿表面,重复 3 次。另取一不加菌种的空白培养皿,按上法加入含 0.25% 的壳低聚糖的样品液,同时做空白对照试验。在 37℃ 的培养箱内培养 24h。

2.4 壳低聚糖抑菌率的测定

菌体数量的测定采用血球计数器在显微镜下直接计数^[4]。在血球计数器的记数室上加上盖玻片,用滴管加一滴培养液到盖玻片边沿,使菌液自行渗入,在显微镜下数出一个中方格中两条对角线上 20 个小格中的总菌数,取平均值,按下式计算细菌浓度:

$$\text{细菌数/毫升} = 20 \times 10^5 \times A \times B$$

A 指 20 个小格中的总细菌数

B 指菌液的稀释度

分别测算含壳低聚糖的试验平板及空白对照平板的菌浓,再根据所得数据计算其抑菌率。

$$\text{抑菌率} = (1 - \text{试验平板菌浓} / \text{空白平板菌浓}) \times 100\%$$

2.5 pH 对抑菌作用的影响

以 1 mol/L 的盐酸调节固体肉汤蛋白胨培养基的 pH 分别为 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 并制成培养平板,依上法分别用壳低聚糖对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌进行抑菌试验。

3 结果

经实验结果如下:图中数据为壳低聚糖的抑菌率, $n = 5$, $P < 0.01$

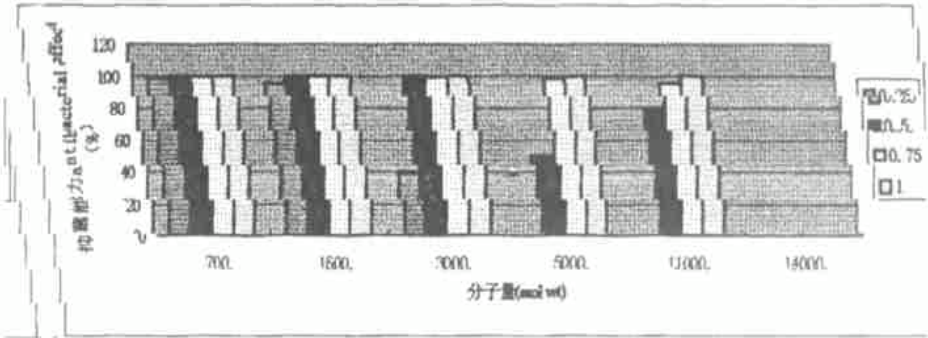


图 1 不同浓度不同分子量的壳低聚糖对金黄色葡萄球菌抑制能力试验结果

Fig 1 The antibacterial effects to *St. aureus* of chitooligosacchrides with different mol wt in different concentrations

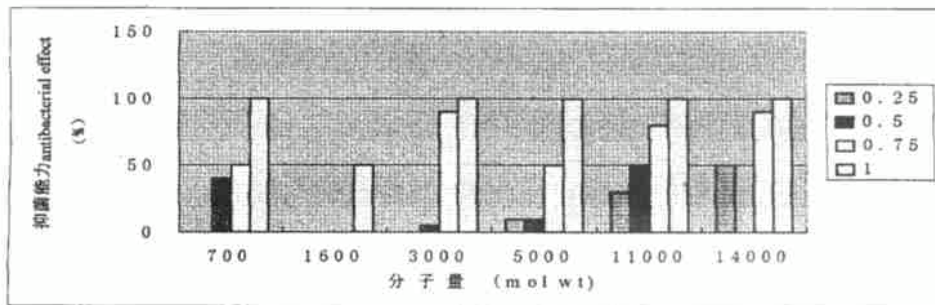


图2 不同浓度不同分子量的壳低聚糖对大肠杆菌的抑制能力试验结果($n = 5$)

Fig 2 The antibacterial effects to *E. coli* of chitooligosaccharides with different mol wt in different concentrations($n = 5$)

3.1 壳低聚糖的抑菌率

由图1可知,在一定的量级范围内,同一分子量的壳低聚糖随着浓度的增大,对金黄色葡萄球菌的抑菌效果越来越好。同一浓度的壳低聚糖随着分子量的减小,抑菌效果也越来越好。从图2可知,壳低聚糖对大肠杆菌的抑菌效果不明显。在同一浓度不同分子量的壳低聚糖抑菌能力没有规律可寻。空白对照试验中的培养平板上无菌落生长。因此,可以得出壳低聚糖对革兰氏阳性菌的抑制效果优于对革兰氏阴性菌。

3.2 不同 pH 的抑菌作用

在不同的 pH 值的平板上,结果显示,分子量为 14000, 11000, 5000, 3000 的壳聚糖在 pH 为 3, 4, 5 时抑菌作用较强,当 pH 大于 6 时,则抑菌作用明显下降。而分子量为 1600, 700 的壳低聚糖则在 pH 为 3, 4, 5, 6, 7 时均显示强效抑菌作用。pH 为 8, 9 时,抑菌作用下降明显。即小分子量的壳低聚糖在中性溶液中也显示较好的抑菌作用,而较大分子量的壳低聚糖只有在弱酸性条件下才能显示较强的抑菌作用。

4 讨论

4.1 目前甲壳素的应用虽较广泛,但取其抑菌活性这一特点的产品尚且不多,医学上有创伤愈合海绵,免拆手术缝合线等。其较强的抑菌活性,可应用于一些药品,尤其是用于

皮肤、创面感染的药物^[5]。

4.2 据报道,壳低聚糖的抗菌性还与脱乙酰度有关。壳低聚糖分子中的质子化铵与细胞膜作用,吸附而聚沉细菌。因此可以对不同脱乙酰度同一分子量、同一浓度的壳低聚糖进行抗菌性比较试验。

4.3 据报道, pH 值不同时,壳低聚糖的抗菌作用不同,这可能与不同 pH 值时壳低聚糖的溶解性能不同有关。壳低聚糖在液体培养基中的抗菌作用要比在固体培养基中高^[6]。因此,可以考虑将壳低聚糖制成一些皮肤用涂液,其优点是既有抗菌作用又无不良反应,既可药用又可作保健产品用。

参考文献

- [1] 刘万顺,陈西广,贺君,等.甲壳质的药用价值及研究进展[C].中国甲壳资源研究开发应用研讨会论文集,1997:22.
- [2] 夏水文.无锡轻工大学学报,1996,15(4):297.
- [3] 吴焱楠.甲壳低聚糖制取及其应用研究[D].1996.
- [4] Ghaouth AE, Arul J, Grenire J, et al. Phytopathology 1992, 82: 398.
- [5] 蒋玉燕,毕忆群,汪子伟等.聚氨基葡萄糖的体外抗菌活性[J].中国抗生素杂志,1996,21(1):54.
- [6] 徐君义.21世纪是甲壳素世纪吗[J].中国科技信息,1998,122(12):27.