

壳聚糖抑菌作用位点的研究

王月慧¹, 余雄伟¹, 徐远阳¹, 夏文水²

(1. 武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023;

2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用异硫氰酸荧光素标记3种分子质量(3kD、300~400kD与700kD)壳聚糖, 体外检测荧光标记壳聚糖的抑菌活性, 并运用激光共聚焦显微镜研究荧光标记壳聚糖对大肠杆菌的抑菌作用位点。结果表明: 荧光标记壳聚糖依然具有抑菌活性, 但相对未标记壳聚糖而言, 3种壳聚糖的抑菌活性分别减小了4.22%、19.56%和14.54%。小分子质量(3kD)壳聚糖能进入细菌内部, 其抑菌位点可能为细菌细胞内某物质, 大分子质量(300~400kD和700kD)壳聚糖则不能进入细菌内部, 其抑菌位点可能为细菌细胞膜。

关键词: 壳聚糖; 作用位点; 大肠杆菌

Antibacterial Action Sites of Chitosans

WANG Yue-hui¹, YU Xiong-wei¹, XU Yuan-yang¹, XIA Wen-shui²

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Chitosans with different molecular weights (3, 300 — 400 kD and 700 kD) were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC-CT) and tested for their antibacterial activity *in vitro*. Besides, confocal laser scanning microscope was used to study the antibacterial action sites of fluorescently labeled chitosans in *E. coli*. The results indicated that all 3, 300—400 kD and 700 kD fluorescently labeled chitosans had antibacterial activity, although their inhibitory rates were decreased by 4.22%, 19.56% and 14.54%, respectively compared to their corresponding non-labeled counterparts. The antibacterial action site of 3 kD chitosan, which could enter bacterial cells, may be a given substance in bacterial cells, while 300—400 kD and 700 kD chitosans could not enter bacterial cells so that their antibacterial action site was presumably the surface of bacterial cell membrane.

Key words: chitosan; action sites; *E. coli*

中图分类号: TQ929.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)13-0092-04

异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)能与含氨基多糖连接形成稳定的FITC-多糖偶联物, 该偶联物在体内比较稳定, FITC不会先于糖链断裂而脱落, 因此, 对壳聚糖的荧光标记多采用异硫氰酸荧光素。Onishi等^[1]用FITC标记了脱乙酰度为50%、相对分子质量较高的水溶性壳聚糖, 研究了其体外生物降解以及对小鼠进行腹腔注射后, 壳聚糖在体内的降解、组织分布和尿液排泄情况。刘静娜^[2]用异硫氰酸荧光素对降脂效果最佳的一种壳聚糖(脱乙酰度为90%, 相对分子质量为 4.99×10^5)进行了标记, 获得了标记率为2.5%的产品, 并研究了该荧光标记壳聚糖(FITC-CIS)在小鼠体内的组织分布、代谢和排泄情况。

壳聚糖是甲壳素脱乙酰基的产物, 其抑菌性能引起

了国内外多位学者的广泛关注与研究^[3-7], 但关于壳聚糖抑菌机理的研究却没有统一的认识^[8-10]。FITC纯品为黄色或橙黄色结晶粉末, 易溶于水和酒精溶剂, 最大吸收光波长为490~495nm, 最大发射光波长为520~530nm, 呈现明亮的黄绿色荧光。FITC能与含氨基多糖连接形成稳定的FITC-多糖偶联物, 在化学修饰中, 常被连接到多糖分子上, 起到示踪作用。因此, 对壳聚糖的荧光标记多采用异硫氰酸荧光素。

本研究用FITC标记3种分子质量的壳聚糖, 研究荧光标记壳聚糖的抑菌活性, 通过激光共聚焦显微镜观察荧光标记壳聚糖作用后大肠杆菌的形态变化。对壳聚糖作用于大肠杆菌的具体作用位点进行探讨, 旨在为进一步研究壳聚糖的抑菌机理提供依据和思路。

收稿日期: 2011-05-22

基金项目: 江苏省重大科技成果转化项目(BA2009082)

作者简介: 王月慧(1971—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为谷物科学与工程。E-mail: whwangyh@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

壳聚糖 I: 分子质量 3kD, 脱乙酰度 85%; 壳聚糖 II: 分子质量 300~400kD, 脱乙酰度 86%; 壳聚糖 III: 分子质量 700kD, 脱乙酰度 90%, 均由江南大学提供。

大肠杆菌(*E.coli*) 武汉工业学院生物与制药工程学院; 荧光素异硫氰酸酯(FITC) 美国 Sigma 公司; 无水甲醇 国药集团化学试剂有限公司。

营养琼脂(pH7.4)、营养肉汤培养基(每 250mL 含有牛肉膏 1.25g、蛋白胨 2.5g、氯化钠 1.25g、磷酸氢二钾 0.25g, pH7.4)。

1.2 仪器与设备

FV 4500 激光共聚焦显微镜 日本 Olympus 公司; DELTA320 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; YX280A 手提式蒸汽灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司; SW-CJ-2FD 无菌操作台 苏州净化设备有限公司; LRH-150-S 恒温恒湿培养箱 广东医疗器械厂。

1.3 方法

1.3.1 荧光标记壳聚糖的制备^[11]

将 3 种不同分子质量的壳聚糖溶解在 1mol/L 醋酸溶液中, 磁力搅拌下, 用 0.1mol/L NaOH 调节溶液 pH6.8 左右, 形成絮状沉淀。将无水甲醇溶解的质量浓度为 2.0mg/mL 的 FITC 缓缓加入到壳聚糖的絮状沉淀中, 冰点下避光搅拌, 絮状沉淀于 12000r/min 离心 10min, 用 70% 的甲醇反复冲洗、离心, 直至上清液在荧光显微镜下无荧光。用乙醇漂洗, 晾干, 得到 FITC-壳聚糖标记物(质量比为 10:1), 其反应过程见图 1 所示。

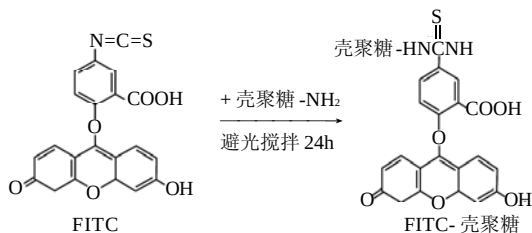


图 1 FITC-壳聚糖合成示意图

Fig.1 Schematic illustration of the chemical synthesis of FITC-labeled chitosan

1.3.2 荧光标记壳聚糖的抑菌活性测定

取直径 6mm 的灭菌滤纸片放入质量浓度 1.0g/100mL 荧光标记壳聚糖溶液(1mol/L 醋酸溶液为溶剂)中浸泡 0.5h, 晾干后用无菌镊子取出 5 片贴于事先涂布好的平皿中, 以上操作均在无菌条件下进行。然后将培养皿置于恒温培养箱中 37℃ 条件下培养 24~48h, 用游标卡尺记录抑菌圈直径(含滤纸), 以抑菌圈直径的大小表示抑菌活性的大小, 每个质量浓度重复 3 次, 空白对照采用相应的溶剂。

1.3.3 激光共聚焦荧光显微镜观察

将生长旺盛的大肠杆菌培养液接种于灭菌营养肉汤中, 37℃ 条件下培养 6~8h, 离心收集沉淀后用灭菌生理盐水配制浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 菌悬液, 将质量浓度为 1.0g/100mL 荧光标记壳聚糖溶液(1mol/L 醋酸溶液为溶剂)与上述菌悬液混合均匀, 调节溶液 pH6.0 左右, 37℃ 恒温培养 0.5、2、12h, 之后离心收集细菌残渣, 用生理盐水反复漂洗, 配制合适质量浓度的菌悬液后, 滴在无荧光玻片上, 用激光共聚焦显微镜观察荧光现象。

2 结果与分析

2.1 荧光标记壳聚糖的抑菌性能

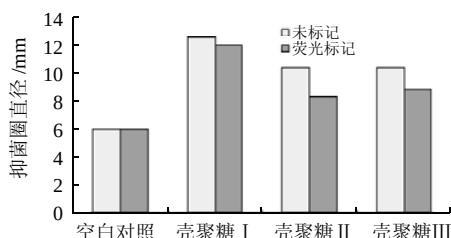


图 2 荧光标记与未标记壳聚糖对大肠杆菌的抑菌活性

Fig.2 Antibacterial activities of fluorescently labeled and non-labeled chitosans

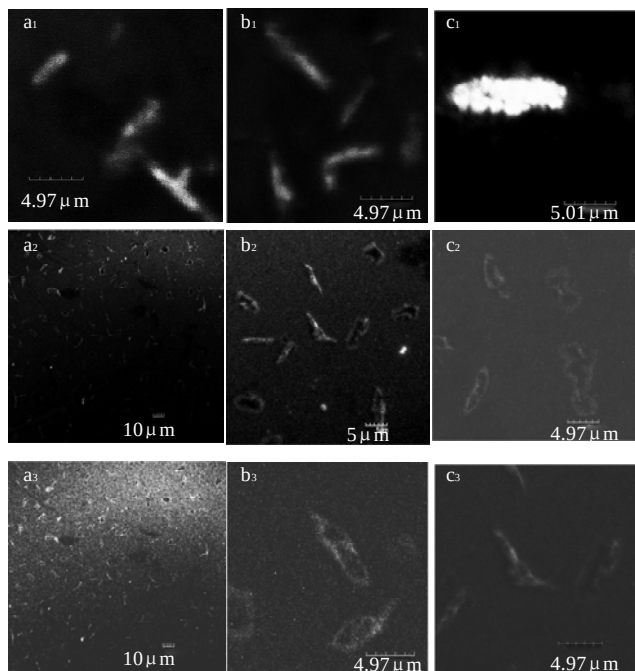
由图 2 可知, 荧光素标记后的壳聚糖, 依然保留了一定的抑菌活性, 但是与未标记荧光物质的壳聚糖相比, 3 种壳聚糖抑菌活性分别减小了 4.22%、19.56% 和 14.54%。由图 1 可知, 荧光素主要与壳聚糖分子中的氨基结合形成荧光标记物, 而氨基则是壳聚糖发挥抑菌作用的活性基团, 随着荧光素与壳聚糖上氨基的结合, 荧光标记壳聚糖的抑菌效果必然会降低。

朱旭明^[12]以大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌作为实验菌株, 用荧光试剂 5(6)-羧-四甲基罗丹明-5-马来酰亚胺对克氏螯虾壳聚糖进行荧光标记, 然后用游离荧光试剂、标记上荧光的壳聚糖及未标记荧光的壳聚糖进行抗菌实验, 观察荧光标记物对壳聚糖抗菌活性的影响。抗菌实验表明, 相比未标记荧光壳聚糖, 荧光标记壳聚糖的抗菌活性有所降低; 当壳聚糖与荧光物质质量比为 9:1 时, 壳聚糖的抗菌活性保留 50%。与本实验结论有所差异, 可能是两者合成过程中采用了不同的比例所致。

2.2 激光共聚焦荧光显微镜下大肠杆菌的形态分析

由图 3a₁ 可知, 大肠杆菌通体呈现出绿色荧光, 表示壳聚糖 I 能够快速进入到大肠杆菌的细胞内部。图 3b₁ 中大肠杆菌菌体轮廓明显, 细胞膜完好无损, 表示作用时间在 2h 内时, 壳聚糖 I 还没有对细菌产生作用。

图 3c₁ 中大肠杆菌依然保留了原有的杆状轮廓,但是从荧光素分布来看,整个细胞已略微散开,证明此时细胞完整结构已经遭到了破坏,细菌已经解体。



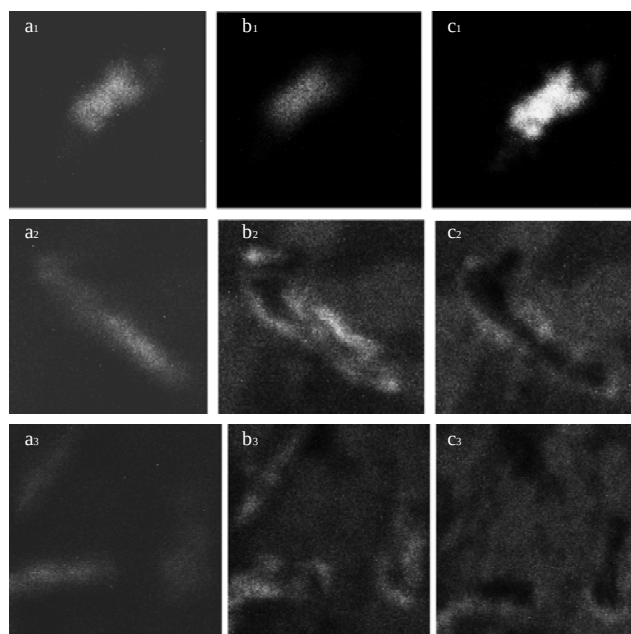
a、b、c 分别表示表示荧光标记壳聚糖作用大肠杆菌 0.5、2、12h 后的激光共聚焦显微镜照片;下脚标 1、2、3 分别为壳聚糖 I、II、III。

图 3 荧光标记壳聚糖作用大肠杆菌后荧光照片

Fig.3 Confocal laser scanning microscopic observations of *E.coli* cells treated with fluorescently labeled chitosans with different molecular weights for different hours

由图 3a₂ 可知, FITC 包围形状多为杆状或者棒状,但中心却没有荧光现象,表示壳聚糖 II 在 0.5h 内不能够进入到大肠杆菌的细胞内部;图 3b₂ 中大肠杆菌菌体轮廓明显, FITC 包围中心依旧没有荧光现象,图 3c₂ 中大肠杆菌原有的杆状轮廓开始扭曲变形,甚至开始分散,但中心依旧没有荧光现象。以上实验结果表明,壳聚糖 II 不能够进入到大肠杆菌的细胞内部,但是作用 12h 后,依然对大肠杆菌细胞完整结构起到了破坏作用,导致菌体死亡。

由图 3a₃ 可知, FITC 荧光背景较深,但其包围中心没有荧光现象;图 3b₃ 中菌体轮廓明显, FITC 包围中心依旧没有荧光现象,图 3c₃ 中大肠杆菌原有的棒状轮廓开始扭曲变形,甚至开始分散,但 FITC 包围中心依旧没有荧光现象。以上结果表明,壳聚糖 III 也不能够进入到大肠杆菌的细胞内部,但是随着作用时间的延长,依然能破坏大肠杆菌细胞完整结构,并最终导致菌体解体死亡。



a~c.从左到右依次表示细菌由外及里的截面断层扫描;下脚标 1、2、3 分别为壳聚糖 I、II、III。

图 4 荧光标记壳聚糖作用大肠杆菌断层扫描(× 600)

Fig.4 Tomographic observations of *E.coli* cells treated with fluorescently labeled chitosans with different molecular weights(× 600)

由图 4a₁~c₁ 可知,经壳聚糖 I 作用后,大肠杆菌菌体由外到里的荧光强度逐渐加强,表明壳聚糖已经进入到大肠杆菌细胞内部;经壳聚糖 II(图 4a₂~c₂)与壳聚糖 III(图 4a₃~c₃)作用后,大肠杆菌菌体由外到里的荧光强度逐渐减弱,荧光现象只是存在于菌体的外围部分,菌体内部并没有荧光产生,表明壳聚糖 II 与壳聚糖 III 并不能进入到菌体内部。

实验表明不同分子质量壳聚糖之间抑菌效果存在差异,对于低分子质量的壳聚糖而言,在短时间内迅速进入到菌体的内部,可能与细胞内核酸或者重要的蛋白质结合,影响菌体代谢,进而破坏细胞膜完整性,最终导致菌体死亡,对于大分子质量的壳聚糖而言,虽然不能进入到菌体的内部,但依然导致了细菌的死亡,推测可能在细菌表面形成了高分子膜,阻断了细胞内外营养物质的传递与运输^[13]。通过长时间的覆盖与包裹作用改变细胞膜的通透性,导致细胞膜结构与功能的瓦解,最终引起细菌死亡。但小分子质量壳聚糖是通过结合带有负电的 DNA,影响 mRNA 的复制和某些蛋白的合成^[14-16],或者通过与其他细胞器作用最终导致菌体死亡依然没有明确的证据。同时,大分子质量壳聚糖与细胞膜之间是通过物理的吸附作用还是化学的结合也需要大量的实验进行验证。

3 结 论

荧光标记壳聚糖依然具有抑菌活性,但其抑菌活性相对未标记壳聚糖而言,抑菌活性降低。3种壳聚糖抑菌活性分别减小了4.22%、19.56%和14.54%,3种标记壳聚糖中壳聚糖Ⅰ抑菌活性最强,壳聚糖Ⅱ与壳聚糖Ⅲ次之。壳聚糖Ⅰ在短时间内(0.5h)进入到菌体的内部,而壳聚糖Ⅱ和壳聚糖Ⅲ则不能进入到菌体的内部,只能聚集在细菌细胞膜的表面。

参考文献:

- [1] ONISHI H, MACHIDA Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice[J]. *Biomaterials*, 1999, 20: 175-182.
- [2] 刘静娜. 壳聚糖降脂作用机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [3] ZHENG Lianying, ZHU Jiangfeng. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 54(4): 527-530.
- [4] 夏文水, 张帆, 何新益. 甲壳低聚糖抗菌作用及其在食品保藏中的应用[J]. *无锡轻工大学学报*, 1998, 17(4): 10-14.
- [5] 覃彩芹, 龙晶, 李会荣, 等. 壳聚糖抗庭院植物病原真菌的活性[J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2005, 51(4): 489-492.
- [6] TSAI G J, HWANG S P. *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria[J]. *Fisheries Science*, 2004, 70(4): 675-681.
- [7] 冯小强. 壳聚糖降解、抑菌性能及应用研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [8] 孙昆山, 朱江峰, 郑连英. 壳聚糖的抗菌性能研究[J]. *材料科学与工程*, 2000, 18(2): 22-24.
- [9] LIU Hui, DU Yumin, WANG Xiaohui, et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage[J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 95(2): 147-155.
- [10] 朱旭明, 郑铁生. 克氏螯虾壳聚糖对细菌表面作用机理研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(9): 155-157.
- [11] 李小芳. 壳聚糖抑菌活性及其机理研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [12] 朱旭明. 克氏螯虾壳聚糖抗菌机制的初步研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2009.
- [13] TOKURA S, UENO K, MIYAZAKI S, et al. Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan[J]. *Macromolecular Symposia*, 1997, 120: 1-9.
- [14] JEON Y J, PARK P J, KILN S K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 44(1): 71-76.
- [15] WANG Guanghua. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan[J]. *J Food Prot*, 1992, 55(11): 916-919.
- [16] 刘晓非, 李琳, 宋琳, 等. 低分子质量壳聚糖及其水溶性衍生物对质粒DNA和mRNA的影响[J]. *应用化学*, 2007, 24(8): 893-898.