

• 研究论文 •

脱乙酰壳多糖抑制真菌生长的构效关系

杨典洱 林晓怡 向本琼 杨照罡 王海龙 魏 群*

(北京师范大学生化与分子生物学系 北京市重点实验室 北京 100875)

摘要 本研究目标是研究脱乙酰壳多糖的化学结构(乙酰化程度 DA 和聚合程度 DP)与它的抑制真菌生长能力之间的构效关系. 选用了 12 个分属于 3 个系列、化学结构相关而又不同的、结构清晰的脱乙酰壳多糖和 3 种不同的真菌(*Fusarium solani*, *Fusarium graminearum* 和 *Ustilago maydis*). 通过分别测定每个脱乙酰壳多糖对 3 种真菌的生长曲线和最低抑制浓度(MIC, minimum inhibitory concentration); 比较各个系列脱乙酰壳多糖的 MIC 和它的化学结构(DA 和 DP)之间的关系. 结果显示对同一种真菌, 不同脱乙酰壳多糖的抑制真菌生长曲线形态和 MIC 是各不相同的; 同样同一脱乙酰壳多糖, 对不同真菌也有其特殊的生长曲线和 MIC; 通常随着脱乙酰壳多糖中 DA 的递增, MIC 是增加的, 其抑制真菌的活性是降低的; 在 DA 相同的条件下, 随着 DP 的递增, MIC 也是增加的, 其抑制真菌的活性是减低的. 所以可以说, 脱乙酰壳多糖抑制真菌生长的能力与其化学结构紧密相关, 在本实验的条件下, 脱乙酰壳多糖分子越小, 分子中的自由氨基越多, 抑制真菌的活性越大.

关键词 脱乙酰壳多糖; 抑制真菌活性; *Fusarium solani*(腐皮镰孢); *Fusarium graminearum*(禾谷镰孢); *Ustilago maydis*(玉蜀黍黑粉菌)

Structure-Function Relationship of Chitosan against Phytopathogenic Fungi

YANG, Dian-Er LIN, Xiao-Yi XIANG, Ben-Qiong YANG, Zhao-Gang
WANG, Hai-Long WEI, Qun*

(College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract The objective of this study was to investigate the relation between anti-fungal activity and their chemical structure (DA, degree of acetylation or DP, degree of polymerization) of chitosans. 12 different chemical structure chitosans with well characterized DA and DP were tested against three different phytopathogenic fungi (*Fusarium solani*, *Fusarium graminearum* and *Ustilago maydis*) respectively. MIC (minimum inhibitory concentration) of every chitosan against every fungus was determined with micro plate reader, and then these MIC data were analyzed and correlated with their chemical structure (DA or DP). The results showed that anti-fungal activity MIC of every chitosan was different against even the same fungus, and then also against different fungi; but it was increased with decreasing both DP and DA of chitosan.

Keywords chitosan; anti-fungal activity; *Fusarium solani*; *Fusarium graminearum*; *Ustilago maydis*

壳多糖是一个全部 N 乙酰化的[β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose]多聚化合物, 脱乙酰壳多糖是部分 N 乙酰化的多聚化合物, 它们主要来自自然界壳类的动植物外壳如螃蟹和虾, 是自然界第二大丰富的自然

产物^[1]. 现在脱乙酰壳多糖及其衍生物已经被广泛应用到从药品、化妆品到农产品等各个领域^[2]. 脱乙酰壳多糖通常以其 N 氨基被乙酰化程度(DA, degree of acetylation)或者单元结构的聚合程度(DP, degree of polymeri-

* E-mail: weiq@bnu.edu.cn; Tel: 010-58807365; Fax: 010-58807365.

Received January 17, 2005; revised April 6, 2005; accepted May 23, 2005.

zation)来表示它的一些化学或物理特征. DA 一定程度上代表着该脱乙酰壳多糖骨架上自由氨基的数目, DA 值越大, N 氨基被乙酰化的程度越高, 自由氨基数目越少; DP 代表着该脱乙酰壳多糖分子的大小^[3]. 所以一定程度上 DA 和 DP 影响着该脱乙酰壳多糖的物理化学性质和生物学活性.

至今已发现脱乙酰壳多糖具有多种抗微生物活性, 如抑制细菌、藻类、真菌和病毒的生长^[4]. 同时大多数科学家认为抑制微生物活性与脱乙酰壳多糖的化学结构有关, 但是来自不同的实验室的结果有些差异. 例如 Cuero^[5]认为抗微生物活性与脱乙酰壳多糖分子的大小紧密相关, DP 在 8 和 9 大小的脱乙酰壳多糖活性明显好于其他大小的脱乙酰壳多糖; Savard 等^[6]认为中等分子量 5 kD 的脱乙酰壳多糖要比小分子量 1.2 kD 的抑制微生物能力好得多, 他认为抑制微生物的能力与分子量有关; 另有一些科学家依脱乙酰壳多糖的不同 DA 来试验, 还有一些科学家将脱乙酰壳多糖进行化学改造而后进行活性测定获得一些比天然效果更好的脱乙酰壳多糖类型^[5,7-9]. 另外在他们的实验中所用的脱乙酰壳多糖通常是一个混合组分(如 DA 从 20%~30%或 DP 从 50~60), 所以很难得到精确的脱乙酰壳多糖抑制微生物能力与其化学结构的相互关系^[10]. 另外目前脱乙酰壳多糖应用到微生物研究最多的是脱乙酰壳多糖与细菌的相互作用, 有关脱乙酰壳多糖化学结构与抑制真菌能力之间的构效关系未见报道.

在本研究中我们选用 8 个化学结构清楚, 而且它们化学结构之间又有相互联系的脱乙酰壳多糖, 为高、低分子量两个系列, DP 基本一致, 仅仅 DA 不同(1%, 15%, 49%和 60%), 而且乙酰化的氨基是完全随机分布的. 同时我们选择了有代表性的 3 个来自不同属的种真菌 *Fusarium solani*(腐皮镰孢), *Fusarium graminearum*(禾谷镰孢)和 *Ustilago maydis*(玉蜀黍黑粉菌)^[11]进行试验, 所得的结果更具代表性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 脱乙酰壳多糖

8 个脱乙酰壳多糖分别来自低分子量(在此称为系列 1), 高分子量系列(在此称为系列 2), 同一系列分子量或 DP 基本相同, 唯一差别是 DA 的不同(见表 1); 还有 4 个脱乙酰壳多糖, DA 均一致为 0%, 在此称为系列 3, 但是它们之间的 DP 依次递增(见表 2).

1.1.2 微生物及其准备

真菌 *Fusarium solani* 和 *Fusarium graminearum* 首先

表 1 低分子量和高分子量系列脱乙酰壳多糖(Norway)
Table 1 Chitosan list of low/high molecular weight (Norway)

脱乙酰壳多糖	系列 1	系列 2
DA (%)	DP(聚合度)	DP(聚合度)
1	190	1100
15	320	1100
49	121	540
60	210	970

表 2 同 DA 不同 DP 的系列 3 脱乙酰壳多糖
Table 2 Chitosan list of series 3 (same DA, different DP)

DA (%)	DP(聚合度)
0	200
0	591
0	1955
0	2402

在 PDA (plate dextrose agar)平板上 28 °C 黑暗培养 7 d, 取 3 块 0.5 g 的含真菌的培养基分别置 50 mL CM (common medium)培养液中, 28 °C 黑暗轻摇 5 d. 取其中 1~50 mL 孢子 SP 培养液 28 °C 黑暗培养 7 d. 用无菌棉花过滤 2 次, 收集过滤液; 滤液 3000 g 离心 10 min, 弃滤液; 沉淀用无菌水混匀, 离心, 重复 3 次; 最后在显微镜下用红细胞计数器调整真菌数为 1000 个/ μL , 4 °C 贮存备用.

Ustilago maydis 除培养温度为 25 °C 外, 其它同上述方法制备, 备用.

1.2 方法

1.2.1 微生物的不同处理

在无菌 96 孔板, 每个样品作 3 次重复(如 A→C 或 E→G), 一个对照(D 或 H), 同时在另一相同平板上进行一次重复(见表 3). 首先用 12 道加样器, 在每孔加上 10 μL 的孢子混悬液, 接着加 150 μL CM 培养液和 40 μL 的不同浓度的脱乙酰壳多糖溶液. 使得脱乙酰壳多糖的浓度在从 1 到 12 的孔中间分别是 0(杀真菌剂), 1.0, 5.0, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ (见表 3).

1.2.2 真菌处理后的培养和吸光值的测定

制备完的平板加盖密封, 以空白平板为对照, 在紫外-可见多道波长酶联免疫分光光度计上测定各平板各个孔的吸光值, 并在计算机上自动将 3 孔中的数值求均值. 在 28/25 °C 黑暗环境下轻摇, 连续测定 8 d, 每天同一时间测定吸光值确定真菌的生长情况^[12,13].

1.2.3 数据统计处理和生长曲线制备

所有吸光值数据被输入 Microsoft Excel 进行处理分析, 并以时间为横坐标, 吸光值为纵坐标得到真菌

表3 96孔板中每个孔中的各组分含量
Table 3 Composition and content of every vowel in 8×12 plate

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A ↓ C	Medium/ μL	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
	Chitosan/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	0	0	1.0	5.0	10	25	50	75	100	200	400	800
	Fungicide/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Spore S/ μL	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
D	Medium/ μL	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
	Chitosan/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	0	0	1.0	5.0	10	25	50	75	100	200	400	800
	Fungicide/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	H ₂ O/ μL	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
E ↓ G	Medium/ μL	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
	Chitosan/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	0	0	1.0	5.0	10	25	50	75	100	200	400	800
	Fungicide/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Spore S/ μL	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
H	Medium/ μL	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
	Chitosan/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	0	0	1.0	5.0	10	25	50	75	100	200	400	800
	Fungicide/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	H ₂ O/ μL	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

数字1~12表示96孔板上边沿注明的编号,分别正对着12列孔;字母A~H表示96孔板左侧边缘注明的编号,分别代表着8行孔。A→C/E→G表示3个同样的重复。

的生长曲线,并从生长曲线可以得到最少抑制浓度MIC。

2 结果

2.1 不同化学结构的脱乙酰壳多糖对同一真菌的生长曲线是不同的

首先不同化学结构的脱乙酰壳多糖对同一种真菌的生长曲线基本上都不相同,如低分子量系列的脱乙酰壳多糖L_DA 1%和L_DA 60%,尽管它们之间的分子大小基本相似,对真菌 *Fusarium graminearum* 的生长曲线(见图1)有明显的差异。即使在相同的时间,它们之间各个孔的吸光值是有所不同的,说明在这些孔中真菌生长受抑制的程度是有差别的,这些在生长曲线中得到体现。如脱乙酰壳多糖L_DA 1%的生长曲线,当脱乙酰壳多糖L_DA 1%的浓度超过12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,真菌 *Fusarium graminearum* 的生长被完全抑制,所以推测脱乙酰壳多糖L_DA 1%的MIC是25 $\mu\text{g}/\text{mL}$;而脱乙酰壳多糖L_DA 60%的浓度需要超过100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 才能完全抑制该真菌的生长,它的MIC为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,生长曲线形状和MIC在两个脱乙酰壳多糖之间有明显的不同。

2.2 不同真菌在同一脱乙酰壳多糖中的生长曲线

本实验中所用的3种真菌 *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum* 和 *Ustilago maydis* 用脱乙酰壳多糖

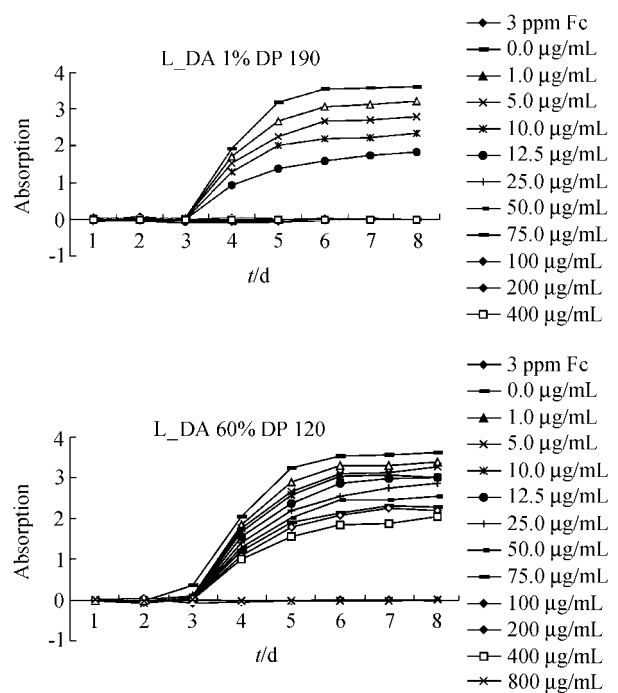


图1 *Fusarium graminearum* 在脱乙酰壳多糖L_DA 1%与L_DA 69%中的生长曲线

上图为在L_DA 1%中的生长曲线,其中MIC为12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,下图为L_DA 69%中的生长曲线,其中MIC为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Figure 1 Growth pattern of *Fusarium graminearum* in chitosan L_DA 1% and L_DA 69% respectively

Up: growth pattern in L_DA 1%, MIC is 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Down: growth pattern in L_DA 69%, MIC is 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

H_DA 60% DP 970 进行试验, 获得的生长曲线有很大的不同(见图 2)。首先在没有脱乙酰壳多糖的对照组中, 他们之间的生长曲线没有明显差异, 说明此实验对比的前提是可靠的; 第二, 他们之间的 MIC 有很大的差别, H_DA 60% DP 970 的 MIC 对 *Fusarium solani* 是 50 $\mu\text{g/mL}$, 对 *Ustilago maydis* 是 100 $\mu\text{g/mL}$, 对 *Fusarium graminearum* 是 200 $\mu\text{g/mL}$ 。

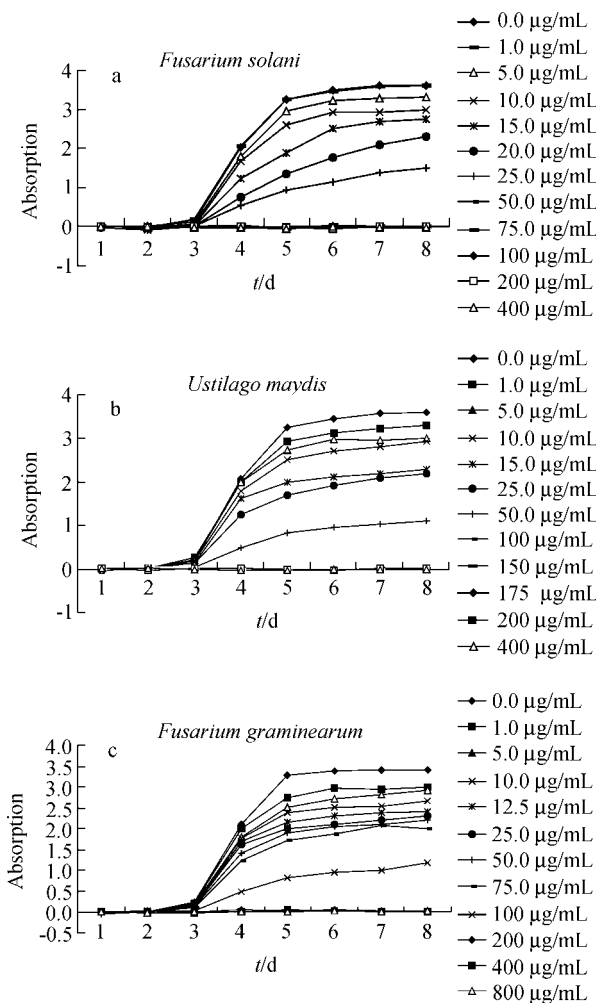


图 2 3 种不同的真菌在脱乙酰壳多糖 H_DA 60% DP 970 中的生长曲线

Figure 2 Growth patterns of three different fungi in H_DA 60% DP 970

2.3 MIC 与脱乙酰壳多糖的化学结构的关系

2.3.1 分子量基本一致的同一系列内, 随 DA 依次增加时, MIC 依次递增

在低和高 DP 系列中 4 个脱乙酰壳多糖中(系列 1 和 2), 同一系列内它们的 DP 基本接近, 分子量相似, 它们间的唯一差别是 DA 不同, 随着 DA 增加, MIC 增加, 这个结果在 4 个真菌间是一致的. 图 3 显示的是低分子量系列的 4 个脱乙酰壳多糖对真菌 *Fusarium graminearum* 的结果, 这 4 个脱乙酰壳多糖的 DA 分别是 1%, 15%,

49%和 60%, 其 MIC 依次递增, 分别是 25, 50, 75 和 400 $\mu\text{g/mL}$. 图 4 显示的是高分子量系列的 4 个脱乙酰壳多糖对真菌 *Fusarium solani* 的结果, 结果与低分子量系列的一致.

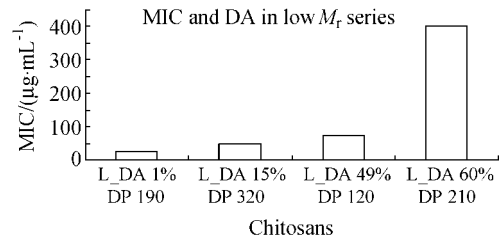


图 3 低分子量系列的 4 个不同化学结构的脱乙酰壳多糖与抑制 *Fusarium graminearum* 的 MIC 关系

Figure 3 MIC of four different chemical structural chitosans against *Fusarium graminearum*

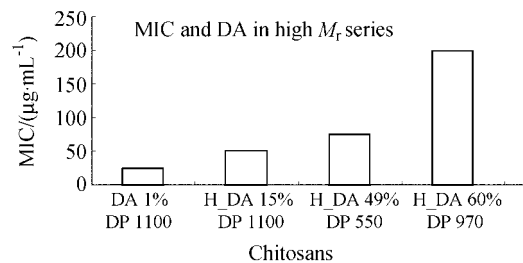


图 4 高分子量系列的 4 个不同化学结构的脱乙酰壳多糖与抑制 *Fusarium solani* 的 MIC 关系

Figure 4 MIC of four different chemical structural chitosans against *Fusarium solani*

2.3.2 DA 基本一致的同一系列内, DP 依次增加时, MIC 依次递增

在 DA 一致均为 0% 的同一组内的 4 个脱乙酰壳多糖, 随着 DP 依次从 200, 591, 1955 到 2402 的增加, MIC 依次从 10, 10, 15 到 25 $\mu\text{g/mL}$ 递增. 图 5 显示的是此系列脱乙酰壳多糖对真菌 *Ustilago maydis* 的 MIC 随 DP 改变的情况.

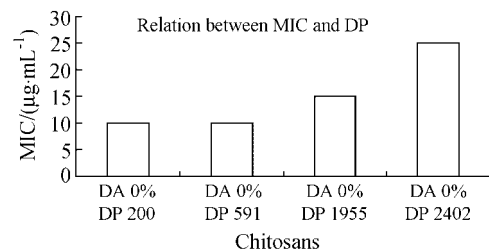


图 5 系列 3 中的 4 个不同化学结构的脱乙酰壳多糖与抑制 *Ustilago maydis* 的 MIC 关系

Figure 5 MIC of four different chemical structural chitosans against *Ustilago maydis*

3 结果与分析

近年来, 脱乙酰壳多糖被广泛地用作抗菌剂进行研究和应用^[14,15]. 由于脱乙酰壳多糖本身结构特点是多分子聚合物, 制备单一纯度的纯品需要专一性很高的单克隆抗体酶, 费用很高, 所以一般通常的研究和应用的都是混合物. 而在本研究中我们采用单克隆抗体酶切得到的单一组分的脱乙酰壳多糖, 在所用的 12 个脱乙酰壳多糖中, 分成 3 个系列, 各个系列内结构上有一定的相互关系. 用这样的成系列的脱乙酰壳多糖来研究构效关系, 得到的结果可能会更加准确、可靠.

另外在本研究中, 所应用的真菌来自两大类真菌 (Ascomycota 和 Basidiomycota) 中, 具有一定的代表性^[11]; *Fusarium* (*Fusarium solani* and *Fusarium graminearum*) 来自 Ascomycota; *Ustilago maydis* 来自 Basidiomycota. 所以我们的结果具有一定的代表性, 对所有真菌可能都适用^[4,16].

我们的结果显示: 对于不同的脱乙酰壳多糖, 即使是同一真菌也得到不同的脱乙酰壳多糖生长曲线和 MIC, 说明脱乙酰壳多糖的化学结构与抑制真菌生长能力有直接的关系, 那它们之间的关系又是如何的呢?

我们采用 2 大系列(低、高分子量)的脱乙酰壳多糖, 比如高分子量系列, 它们的分子量基本接近, 分子大小差不多, 唯一差别是分子中的乙酰化程度(DA)/百分比不同. 从实验结果看, 随着分子中 DA 的百分比的增加, 脱乙酰壳多糖抑制真菌生长的能力降低(MIC 增大). 这个结论在 2 个系列的脱乙酰壳多糖, 分别对 3 个不同的真菌的实验中得到证实. 所以在我们现在的已知条件 (DA 从 1%~60%, DP 从 121~1100) 下, 脱乙酰壳多糖的 DA 越高, 抑制真菌生长的能力越低. 也就是说, 同一脱乙酰壳多糖, 假如它带有的自由氨基越多, 抑制真菌的活性越高, 这是我们首次提出脱乙酰壳多糖抑制真菌生长的构效关系.

另外我们采用同样 DA (DA 均为 0%), DP 不同的脱乙酰壳多糖, 发现脱乙酰壳多糖的 DP 与抑制真菌活性也存在一定的关系, 在我们的条件下 (DP 从 200~2402), 脱乙酰壳多糖抑制真菌的活性随着 DP 的增加而降低, 即 DA 相同, 分子越大, 抑制活性越小. 这个结果与其他实验室报告的抑制细菌实验结果相似^[5,6].

所以, 在目前已知的条件下, 我们发现脱乙酰壳多糖抑制真菌的活性随着 DA 的增加, DP 的减少而增加. 现在我们正在对实验结果进行进一步的分析推断, 改变各种真菌生长适应条件, 为阐明脱乙酰壳多糖抑制真菌生长机制作进一步研究.

致谢 本实验得到德国 Muenster 大学的 Nour Eddine 博士, Bruno Moerschbacher 教授的极大资助和帮助, 在此表示感谢!

References

- 1 Goosen, M. F. A. *Application of Chitin and Chitosan*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, **1997**, pp. 45~80.
- 2 Shahidi, F.; Bal, A. K.; McKenzie, D. B. *Food Chem.* **1999**, 66, 43.
- 3 Muzzarelli, R. A. A.; Peter, M. G. *Chitin Handbook*, European Chitin Society, Italy, **1997**, pp. 442~452.
- 4 Chirkov, S. N. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2002**, 31, 1.
- 5 Cuero, R. G. *EXS* **1999**, 87, 315.
- 6 Savard, T.; Beaulieu, C.; Boucher, I.; Champagne, C. P. *J. Food Prot.* **2002**, 65, 828.
- 7 Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Tarsi, R.; Miliani, M.; Gabbanelli, F.; Cartolari, M. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 165.
- 8 Morimoto, M.; Saimoto, H.; Usui, H.; Okamoto, Y.; Minami, S.; Shigemasa, Y. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 1133.
- 9 Preyanat, V.; Warayut, S.; Watchara, K. *ScienceAsia* **2003**, 29, 115.
- 10 Pochanavanich, P.; Suntomsuk, W. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, 35, 17.
- 11 Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; Blackwell, M. *Introductory Mycology*, John Wiley & Sons, Inc, New York, **1996**, pp. 2~13.
- 12 Pijls, C. F. N.; Shaw, M. W.; Parker, A. *Plant Pathol.* **1994**, 43, 726.
- 13 Suty, A.; Kuck, K. H. In *Proceeding of Brighton Crop Protection Conference_Pests & Diseases*, **1996**, pp. 689~694.
- 14 Oh, H. I.; Kim, Y. J.; Chang, E. J.; Kim, J. Y. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, 65, 2378.
- 15 Taha, S. M.; Swailam, H. M. *Nahrung* **2002**, 46, 337.
- 16 Tsai, G. J.; Su, W. H. *J. Food Prot.* **2002**, 65, 828.

(A0501175 CHENG, B.; DONG, H. Z.)