

壳多糖抑制细菌生长的构效关系

杨典洱, 林晓怡, 王艳丽, 杨照昱, 魏 群

(北京师范大学生物化学与分子生物学系, 北京市重点实验室, 北京 100875)

摘要 运用化学结构已清楚, 分属 4 大系列的 29 种壳多糖, 以 4 种不同类型的细菌(革兰氏阳性菌 *E. coli* K1、革兰氏阴性菌 *Bacillus cereus*、*Bacillus megaterium* 和 *Staphylococcus aureus*) 为研究对象, 进行了壳多糖抑菌能力构效关系的研究. 在实验中采用 96 孔平板, 用计算机-吸光值读数仪直接测定每个孔的吸光值, 获得了各个细菌在不同壳多糖浓度中的生长曲线和壳多糖抑制细菌生长的最低抑制浓度(MIC, Minimum inhibit concentration). 通过比较同一(各个)系列的壳多糖在这些相同(不同)细菌的 MIC 变化规律与壳多糖的化学结构的关系, 发现同一壳多糖对不同的细菌的 MIC 值是不相同的, 因而壳多糖抑制细菌生长的能力首先与细菌本身特点有关, 但与是否为革兰氏阳性菌或阴性菌无直接的相关性; 同一细菌对不同化学结构的壳多糖有一定的相关性, 在壳多糖的聚合程度(DP)相同的条件下, 壳多糖中氨基被乙酰化(DA)的程度越低, 壳多糖抑制细菌生长的 MIC 值越低, 壳多糖抑制细菌生长的能力就越强; 同样, 在 DA 相同的情况下, 分子越小, 壳多糖抑制细菌生长的 MIC 值越低, 抑制细菌生长的能力越强. 根据上述实验结果, 初步推测壳多糖抑制细菌生长的机制可能与其在溶液中所带的正电荷多少有关.

关键词 壳多糖; 抑制细菌活性; 最低抑制浓度; 细菌

中图分类号 O629; Q539

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)07-1277-05

壳多糖[β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy-*D*-glucopyranose]是一个 N-氨基乙酰化的多聚化合物, 主要来自于自然界壳类的动植物外壳如螃蟹和虾^[1]. 壳多糖及其衍生物已被广泛应用^[2]. 壳多糖通常以其 N 氨基乙酰化程度(DA, Degree of acetylation)和/或者糖单元结构的聚合程度(DP, Degree of polymerization)来表示其一些化学或物理特征. 在一定程度上, DA 代表着某一壳多糖骨架上自由氨基的数目多少, DA 值越大, 壳多糖骨架上自由氨基被乙酰化的百分比越大, 自由氨基的百分率越低; DP 代表着某一壳多糖分子的大小, DP 值越大, 说明该壳多糖分子是由更多的单糖分子构成, 分子量更大; 在一定质量时, 壳多糖的 DP 越大, 其所含的壳多糖分子个数越少^[3]. 因此, 在一定程度上 DA 和 DP 影响着壳多糖的物理化学性质和生物学活性.

壳多糖具有多种抗微生物活性^[4]. 一般认为, 抑制微生物活性与壳多糖的化学结构有关, 但是来自不同实验室的结果有些差异甚至矛盾. Cuero^[5]认为, 抗微生物活性与壳多糖分子的大小紧密相关, DP = 8 或 9 的脱乙酰壳多糖活性明显高于其它 DP 值的壳多糖^[6]; 将壳多糖进行化学改造后进行活性测定, 发现了一些比天然产物效果更好的壳多糖类型^[5,7-9]. 尽管壳多糖结构比较稳定, 但是很难获得化学结构单一的“纯净”化合物, 因此很难得到精确的壳多糖抑制微生物能力与其化学结构的相互关系^[10]. 目前, 壳多糖应用到微生物研究中最多的还是壳多糖与细菌的相互作用, 但有关壳多糖的化学结构与抑制细菌生长的能力之间的构效关系尚未见报道.

本文选用化学结构已清楚, 而且从化学结构中又可以相互区分和联系的 4 大系列的 29 个壳多糖, 如高/低分子量系列的壳多糖, 它们之间的 DP 基本一致, 但 DA 值不同, DA 从 1%, 15%, 49% 递增到 60%, 而且乙酰化的氨基是完全随机分布的. 同时选择了有代表性的革兰氏阳性菌 *E. coli* K1、革兰氏阴性 *Bacillus cereus*、*Bacillus megaterium* 和 *Staphylococcus aureus*^[11] 进行试验. 这些细菌分别来自不同属和种, 所得的结果具有一定的代表性.

收稿日期: 2005-09-21.

基金项目: 国家“九七三”计划(批准号: 2004CB719906)资助.

联系人简介: 魏 群(1946 年出生), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事生物大分子结构功能研究. E-mail: wei@bnu.edu.cn

1.4 平板的培育和测定

将制备完的平板加盖密封,以空白平板为对照测定各平板的吸光值 $A_{650\text{ nm}}$,在 37 °C 黑暗环境下轻摇,连续 12 h(Bio-Rad, Richmond, CA, USA),每 1 h 测定吸光值,确定细菌的生长情况并获得生长曲线^[12].在预实验中分别测定 450, 490, 590, 650 和 750 nm 下的吸光值,650 nm 是最敏感的波长^[11].

1.5 数据处理

将所有吸光值数据被输入 Microsoft Excel 进行数据处理分析,并以时间为横坐标,吸光值为纵坐标得到细菌的生长曲线.从生长曲线可以得到壳多糖抑制细菌生长的最低抑制浓度 MIC.

1.6 壳多糖抑制细菌生长能力与其结构之间的构效关系

比较同一系列不同壳多糖的 MIC,获得 MIC 与化学结构之间的关系.同时比较不同细菌对同一或不同结构壳多糖的构效关系.

2 结果与讨论

2.1 同一壳多糖的抑制细菌生长能力(MIC)与细菌本身特点的关系

图 1(A)和(B)分别为革兰氏阴性菌 *Bacillus cereus* 和阳性菌 *E. coli* K1 在不同质量浓度的 HF(DA = 8%, DP 400)下的生长曲线.比较图 1(A)和(B)可以发现其生长曲线明显不同;壳多糖 HF(DA = 8%, DP 400)对 *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *E. coli* K1 和 *Staphylococcus aureus* 的最低抑制质量浓度分别是 10, 30, 40 与 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.比较其间的 MIC 可以发现,壳多糖 HF(DA = 8%, DP 400)对革兰氏阳性 *E. coli* K1 的 MIC 介于革兰氏阴性菌 *Bacillus cereus* 和 *Staphylococcus aureus* 之间,与文献[11]报道的结果不同.比较革兰氏阴性菌 *Bacillus cereus* 在这 29 种壳多糖中的生长曲线可以发现,其生长曲线是不同的.图 2(A)和(B)给出了壳多糖 L_DA1% 和 L_DA69% 对细菌 *Bacillus cereus* 的生长曲线, MIC

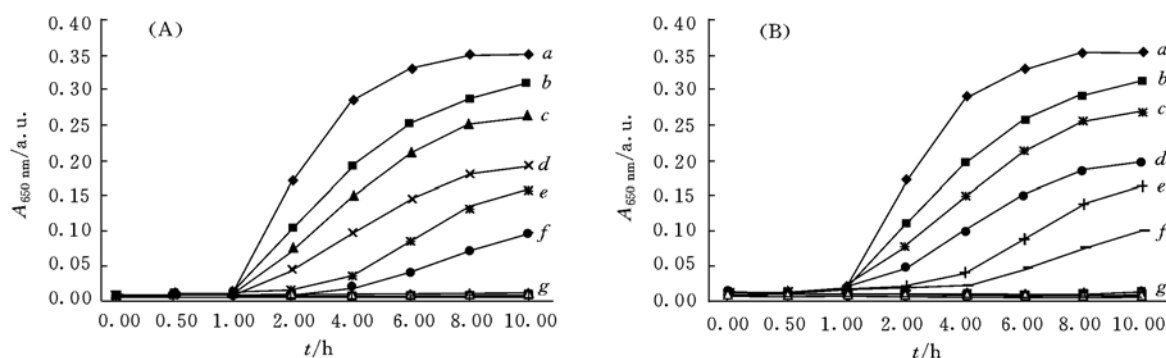


Fig. 1 Growth curves of *Bacillus cereus*(A) and *E. coli* K1(B) in HF[DA = 8%, DP 400] with different mass concentrations

(A) $\rho(\text{HF})/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$: a. 0; b. 1.0; c. 5.0; d. 7.5; e. 10.0; f. 15.0; g. 20.0—200.0;

(B) $\rho(\text{HF})/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$: a. 0; b. 1.0; c. 10.0; d. 15.0; e. 20.0; f. 30.0; g. 40.0—200.0.

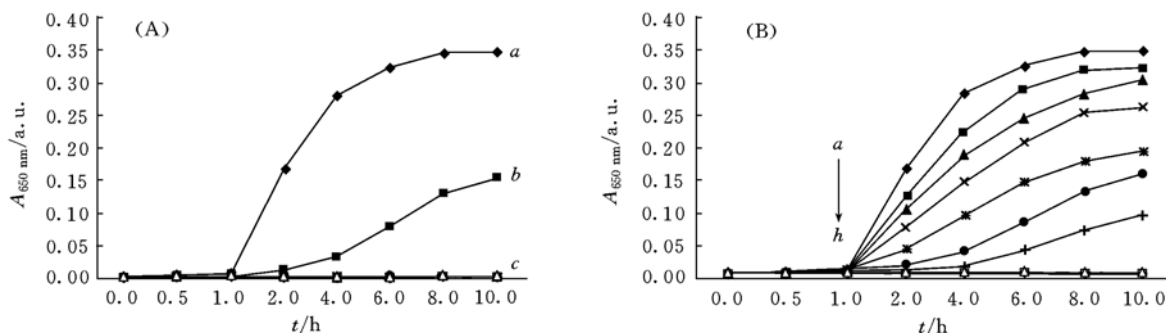


Fig. 2 Growth curves of gram positive bacterium *Bacillus cereus* in different mass concentrations of L_DA 1%, DP 190(A) and L_DA 69%, DP 224(B)

$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$: (A) a. 0; b. 1.0; c. 15—200; (B) a. 0; b. 1.0; c. 5.0; d. 7.5; e. 10.0; f. 15.0; g. 20.0; h. 30.0—200.0.

分别是 5 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

其它细菌结果相同, 这种抑制壳多糖细菌生长的能力与壳多糖本身结构有关.

2.2 壳多糖化学结构与其最低抑制细菌生长能力的关系

通过比较分析 4 大系列的 29 种壳多糖的抑菌生长曲线及 MIC 与其化学结构之间的关系, 可知:

(1) 低分子量系列的壳多糖[见图 3(A)], 随着 DA 的质量分数从 1% 递增到 69%, 抑制革兰氏阴性菌 *Bacillus cereus* 的 MIC 从 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 递增到 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 抑制革兰氏阳性菌 *Ecoli K1* 的 MIC 从 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 递增到 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 由此可见, 对不同类型的细菌(革兰氏阴性菌 *Bacillus cereus* 和革兰氏阳性菌 *Ecoli K1*), 低分子量系列的壳多糖抑制细菌生长的能力随着 DP 数的增加而减弱.

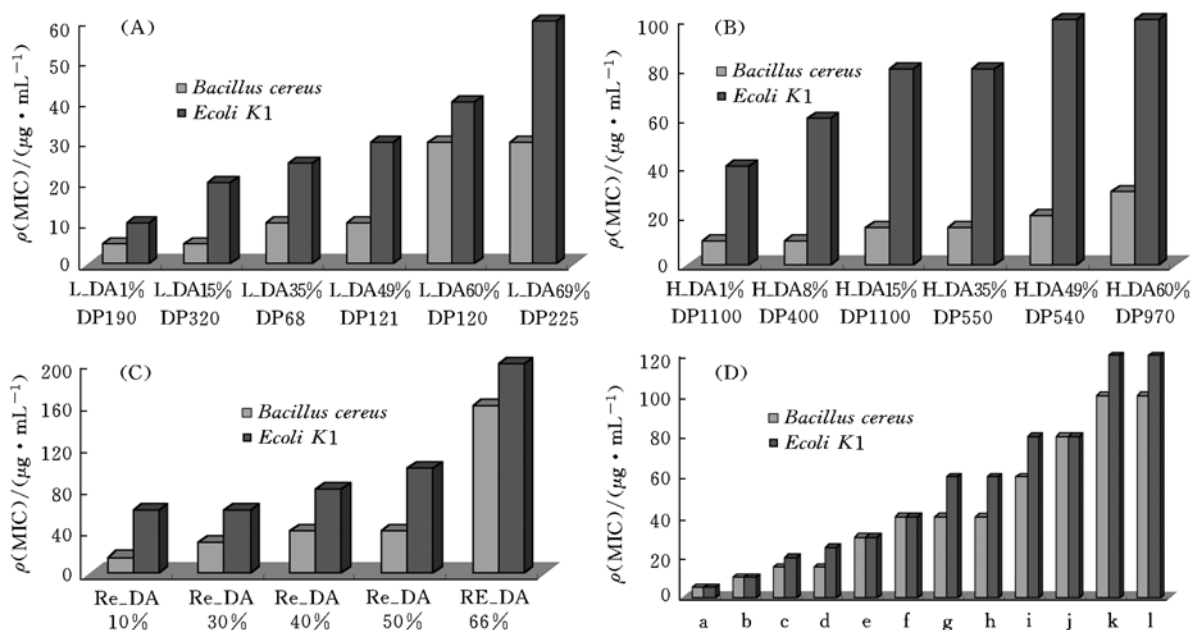


Fig. 3 MICs of chitosan from low molecular weight series(A) and high molecular weight series(B) and reacylated series(C) against *Bacillus cereus* and *Ecoli K1*, MIC of chitosans against *Bacillus cereus* and *Ecoli K1* in Alain Domard series(D)

a. AD_DA0%, DP200; b. AD_DA0%, DP503; c. AD_DA0%, DP591; d. AD_DA0%, DP807; e. AD_DA0%, DP1955; f. AD_DA0%, DP2059; g. AD_DA0%, DP2317; h. AD_DA0%, DP2354; i. AD_DA0%, DP2402; j. AD_DA0%, DP2483; k. AD_DA0%, DP2532; l. AD_DA0%, DP3964.

(2) 从高分子量系列(分子量基本相同, DA 不同)和后乙酰化的 Agarolor 系列[图 3(B)和(C)], 发现, 壳多糖抑制这两种细菌生长的能力随着壳多糖化学结构中的 DA 增加而 MIC 增加, 即随着 DA 的增加, 抑制细菌生长的能力减弱.

(3) Alain Domard 系列的 DA 基本一致(0%, 除壳多糖 3D 的 DA 是 2.3% 外), 随着 DP 从 200 递增到 3964, 分子逐渐变大, 其抑制 *Bacillus cereus* 的 MIC 逐渐从 AD_DA 0% 和 DP 200 的 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 递增到 AD_DA 2.3% 和 DP 3964 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [图 3(D)]; 而抑制 *Ecoli K1* 的 MIC 也是逐渐递增的. 因此, 在现有的条件下, 壳多糖抑制细菌生长的能力与壳多糖化学结构紧密相关, 抑制能力随壳多糖链中的 DA 和 DP 的降低而增强.

根据相关实验, 初步推测壳多糖的抑菌能力可能与壳多糖带有的正电荷多少有关. 因为在同样条件下, 壳多糖中自由氨基数目与其电荷数成正比; 对于同样大小的壳多糖(即 DP 相同), DA 值越大, 壳多糖分子中自由的氨基越少, 该壳多糖带有的正电荷就相应减少, 所以抑制细菌的活性就越低. 当 DA 相同时(意味着自由氨基的百分比相同), 而对于同样质量的壳多糖, 分子越大(DP 值越大)的壳多糖, 其所含的分子数/摩尔数就越少, 该壳多糖所含的自由氨基越少, 所带的总正电荷就越少, 抑菌能力就越低. 因此我们推测壳多糖抑制细菌生长的机制可能是由壳多糖所带的正电荷引起的, 所带的正电荷越多, 抑制能力越强, 但这还需要进一步的其它实验来证实.

参 考 文 献

- [1] Goosen M. F. A. . Application of Chitin and Chitosan[M], Lancaster Pa: Technomic Publishing Co. , Inc. , 1997: 45—80
- [2] Shahidi F. , Bal A. K. , Mckenzie D. B. . Food Chemistry[J], 1999, **66**: 43—46
- [3] Muzzarelli R. A. A. , Peter M. G. . Chitin Handbook[M], Italy: European Chitin Society, 1997: 442—452
- [4] Chirkov S. N. . Applied Biochemistry and Microbiology[J], 2002, **31**: 1—5
- [5] Cuero R. G. . EXS[J], 1999, **87**: 315—320
- [6] Savard T. , Beaulieu C. , Boucher I. *et al.* . J. Food Prot. [J], 2002, **65**: 828—832
- [7] Muzzarelli R. A. A. , Muzzarelli C. , Tarsi R. *et al.* . Biomacromolecules[J], 2001, **2**: 165—168
- [8] Morimoto M. , Saimoto H. , Usui H. *et al.* . Biomacromolecules[J], 2001, **2**: 1133—1136
- [9] Preyanat V. , Warayat S. , Watchara K. . Science Asia[J], 2003, **29**: 115—117
- [10] Pochanavanich P. , Suntomsuk W. . Letters in Applied Microbiology[J], 2002, **35**: 17—24
- [11] Alexopoulos C. J. , Mims C. W. , Blackwell M. . Introductory Mycology[M], New York: John Wiley & Sons Inc. , 1996: 2—13
- [12] Pijl C. F. N. , Shaw M. W. , Parker A. . Plant Pathology[J], 1994, **43**: 726—731

Structure-Functional Relationship of Chitosans Against Bacteria

YANG Dian-Er, LIN Xiao-Yi, WANG Yan-Li, YANG Zhao-Gang, WEI Qun*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University,
Beijing Key Laboratory, Beijing 100090, China)

Abstract The relationship between antibacterial activity of chitosans and their chemical structure (DA, degree of acetylation and DP, degree of polymerization) was investigated. MICs (minimum inhibiting concentration) of four different series of 29 different “pure” chitosans whose DA and DP were well characterized against four different bacteria (gram-positive bacterium *E. coli* K1, gram-negative bacteria *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* and *Staphylococcus aureus*) were determined with micro plate reader. The growth and MICs of these 29 chitosans against these bacteria were different for different bacteria. Antibacterial activity of chitosan depended on bacterium itself even though it was independent directly of the gram-positive or gram-negative bacterium. Every growth pattern and MIC against two bacteria (*E. coli* K1 and *Bacillus cereus*) were analyzed and compared with their chemical structure (DA and DP). The results show that antibacterial activity (or MIC) of every chitosan was different even against the same bacterium, and the antibacterial activity of every chitosan against different bacteria was different. The antibacterial activity of a chitosan depended on the chemical structure of the chitosan, the antibacterial activity of the chitosans was increased with decreasing DA of the chitosans when DP of the chitosans was the same, and that antibacterial activity was increased with decreasing DP of the chitosans when DA of the chitosans was the same. These results suggest that static electricity might be the main force of antibacterial activity of a chitosan.

Keywords Chitosan; Antibacterial activity; MIC; Bacterium

(Ed. : W, Z)