

克氏螯虾壳聚糖对细菌表面作用机理研究

朱旭明, 郑铁生*

(江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏 镇江 212013)

摘要:目的:研究克氏螯虾壳聚糖对细菌表面的作用机理。方法:将不同浓度克氏螯虾壳聚糖与大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌作用 3.5h,检测细菌上清液中草酰乙酸氨基转移酶活性、总蛋白及核酸含量;用透射电镜观察细菌与壳聚糖作用 1h 后的形态变化;将 62.5mg/L 壳聚糖与含十二烷基磺酸钠的菌液作用,观察溶菌效果。结果:克氏螯虾壳聚糖与细菌作用后上清液中草酰乙酸氨基转移酶活性、总蛋白和核酸含量显著高于对照组($p < 0.01$);透射电镜下发现两种细菌都有菌内物质泄漏及形态变化发生;62.5mg/L 壳聚糖能增加十二烷基磺酸钠的溶菌作用($p < 0.01$)。结论:克氏螯虾壳聚糖能破坏细菌的表面结构,影响屏障功能,使菌内物质泄漏,并能协同 SDS 对细菌的溶菌作用。

关键词:壳聚糖;克氏螯虾;细菌表面;大肠埃希菌;金黄色葡萄球菌

Mechanism Analysis of Effect of Chitosan from Redswamp Crayfish on Bacterial Cell Surface

ZHU Xu-ming, ZHENG Tie-sheng*

(School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Effect of chitosan from redswamp crayfish on bacterial cell surface was investigated. *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were treated with chitosan solutions at varying concentrations for 3.5 h. The leakage of cellular content, the aspartate transaminase (AST) activity, total protein (TP) content and nucleic acid content in the supernatants of bacterial suspension treated with the chitosan solutions were analyzed as well as morphological alterations of bacteria using transmission electron microscope (TEM). Results indicated that AST activity and the contents of TP nucleotides in chitosan solutions were significant higher than those in control ($p < 0.01$). TEM image indicated the cellular content leakage and morphological alterations of both bacteria treated with chitosan. Chitosan was also found to significantly enhance SDS-induced bacteriolysis ($p < 0.01$). Our results suggested that chitosan from redswamp crayfish is able to damage the bacterial surface structure and lead to the loss of barrier function and the leakage of cellular content.

Key words: chitosan; redswamp crayfish; bacterial cell surface; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)09-0155-03

克氏螯虾壳聚糖(chitosan from redswamp crayfish)来源于克氏螯虾的外壳,在我国分布广泛,其结构与市售的壳聚糖基本相似^[1],是一种天然存在的碱性氨基多糖, pKa 为 6.3, 单体结构为 1,4-2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖,具有调节血脂^[2]、血糖^[3]及天然抗菌^[4]的作用。对其抗菌作用研究后发现,它不仅抗菌谱广泛^[4],临床应用前景也较好^[5-6],但其抗菌的机制尚未见报道。本课题研究了克氏螯虾壳聚糖对细菌表面的作用特性,以探讨其抗菌机理,为进一步研究开发新型保健食品提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

壳聚糖溶液:取一定量干燥克氏螯虾壳聚糖(由作者自己从克氏螯虾的外壳中提取^[1],脱乙酰度为 90%,平均分子量 5.5×10^5),用 1%(V/V)醋酸溶解,制成 10000mg/L 的壳聚糖溶液,再用 1% 醋酸依次稀释成浓度为 2500、625mg/L 的壳聚糖溶液,后用 1mol/L 氢氧化钠将壳聚糖溶液及 1% 醋酸调 pH 值到 5.4,备用。

大肠埃希菌(ATCC 25922)和金黄色葡萄球菌

收稿日期:2008-07-15

作者简介:朱旭明(1979-),男,硕士研究生,研究方向为生化制品及其应用。E-mail: zxm18@sohu.com

* 通讯作者:郑铁生(1948-),男,教授,研究方向为生化制品及其应用。E-mail: jsdxzts@163.com

(ATCC25923)质控菌株 江苏大学附属人民医院。

液体培养基(蛋白栋、酵母提取物等) Oxoid 公司; 十二烷基磺酸钠(SDS) Sigma-Aldrich 公司; 总蛋白(TP) 和草酰乙酸氨基转移酶(AST)检测试剂 上海科华公司; 其余试剂都为分析纯。

1.2 仪器与设备

JEM1010 透射电镜 日本 JEOL 公司; AU2700 全自动生化分析仪 日本 Olympus 公司; Biophotometer 核酸紫外监测仪、Centrifuge 54172 超速离心机 德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 物质泄漏实验

将实验菌分别在液体培养基中培养至对数期, 离心收集, 用生理盐水洗 2 次后制成菌体浓度为 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml 的菌悬液, 各取 0.8ml 菌液与 0.2ml 不同浓度的壳聚糖溶液或 1% 醋酸对照混合, 壳聚糖的终浓度分别为 2000、500、125mg/L, 整个体系的 pH 值为 5.6, 其后 37 条件下 220r/min 作用 3.5h, $10000 \times g$ 离心 5min, 吸取上清液, 用核酸紫外监测仪在波长 260nm 处测核酸含量(A_{260nm})、全自动生化分析仪测总蛋白(TP)含量及 AST 活性。每组实验均重复三次。

1.3.2 形态观察实验

参照 Chung 等^[7]的方法, 将实验菌分别在液体培养基中培养至 $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml, 各取 1ml 离心收集, 再清洗 3 次, 将细菌沉渣和 1ml 壳聚糖(2500mg/L)或 1% 醋酸对照在 220r/min 条件下离心 1h, 然后收集沉渣, 2.5% 戊二醛 4 固定 2h。其后用磷酸缓冲液洗 4 次, 每次 15min, 再用 1% 锇酸 4 固定 2h, 接着用磷酸缓冲液洗 2 次, 每次 5min, 然后依次用系列浓度的丙酮 4 下脱水, 再用 100% 丙酮与环氧树脂 618(1:1)于室温下浸渍 1h, 接着用环氧树脂 618 在 37 包埋 3h、60 包埋 36h, 超薄切片, 用醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 最后在透射电镜下观察。

1.3.3 协同溶菌实验

参照 HELANDER 等^[8]的方法, 将在液体培养基中生长良好的实验菌分别离心收集, 用生理盐水洗 2 次后各自制成 A_{600nm} 为 1.5 的菌悬液(pH5.6)。每种菌液分成三组, 分别加入 100 μ l 两种浓度的 SDS 及同一浓度 SDS 与 $MgCl_2$ 混合液, 再向各组加 100 μ l 体积的壳聚糖(625mg/L)或 1% 醋酸(对照), 最后每管加入 800 μ l 菌液。最终三组菌液分别含 0.1%SDS、1%SDS、1%SDS 与 20mmol/L $MgCl_2$ 混合液, 其中对照组含 0.1% 醋酸, 实验组含 62.5mg/L 壳聚糖。每管在 220r/min 速度下摇 10min, 后测 A_{600nm} 值。每组都重复做三次。

1.3.4 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 SPSS 软件作卡方分析或 t 检验。

2 结果与分析

2.1 细菌物质泄漏实验结果

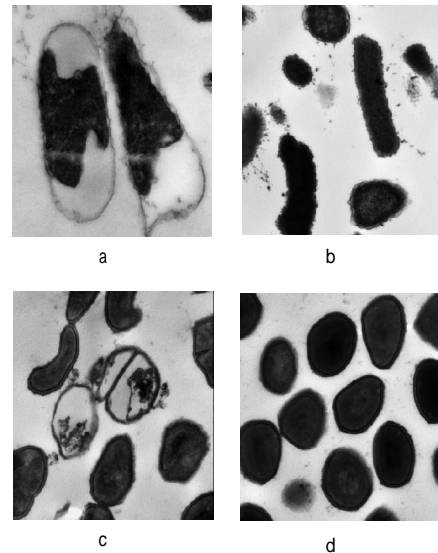
对细菌上清液检测后发现, 比起对照组, 壳聚糖组的上清液中含有 AST、TP 及核酸($p < 0.05$); 并且壳聚糖浓度越高, AST 活性、TP 及核酸含量也逐渐增高, 实验结果如表 1 所示。

表 1 不同浓度克氏螯虾壳聚糖引起实验菌物质泄漏的测定结果(n=3)
Table 1 AST activities, TP contents and nucleic acid content (absorbance at 260 nm) in supernatants of *E.coli* and *S.aureus* suspension treated with different concentrations of chitosan solution (n = 3)

壳聚糖 浓度 (mg/L)	大肠埃希菌			金黄色葡萄球菌		
	AST (U/L)	TP (g/L)	A_{260nm}	AST (U/L)	TP (g/L)	A_{260nm}
2000	$8.33 \pm 0.58^*$	$1.13 \pm 0.06^*$	$1.49 \pm 0.05^*$	$4.33 \pm 0.58^*$	$1.00 \pm 0.10^*$	$0.81 \pm 0.01^*$
500	$3.33 \pm 0.58^*$	$0.43 \pm 0.06^*$	$1.13 \pm 0.02^*$	$2.33 \pm 0.58^*$	$0.37 \pm 0.06^*$	$0.64 \pm 0.03^*$
125	$2.33 \pm 0.58^*$	0.13 ± 0.06	$0.71 \pm 0.01^*$	0.67 ± 0.58	0.17 ± 0.05	$0.51 \pm 0.01^*$
1% 醋酸对照	0.67 ± 0.58	0.00	$0.22 \pm 0.01^*$	0.33 ± 0.57	0.03 ± 0.06	0.21 ± 0.02
F	98.00	307.00	1017.60	30.25	107.94	526.68
p	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: *.与对照组相比, $p < 0.05$ 。

2.2 细菌形态观察实验结果



a. 大肠埃希菌与壳聚糖作用; b. 大肠埃希菌与醋酸对照作用; c. 金黄色葡萄球菌与壳聚糖作用; d. 金黄色葡萄球菌与醋酸对照作用。

图 1 克氏螯虾壳聚糖造成实验菌形态变化的电镜图($\times 4000$)
Fig.1 TEM images of *E.coli* and *S.aureus* treated with 2500 mg/L chitosan solution or 1% acetic acid (control) ($\times 4000$)

透射电镜下可看出, 对照组细菌细胞膜及细胞壁完整, 胞质均匀, 菌体形态规则(图 1b、d); 壳聚糖组

的细菌菌体形态变得不规则,部分细菌的胞质发生泄漏,胞内出现空隙(图1a、c)。

2.3 协同溶菌实验结果

相比对照组,62.5mg/L壳聚糖10min内就可提高SDS对于大肠杆菌的溶菌作用($p < 0.01$),但相同浓度的壳聚糖无法在10min内提高SDS对金黄色葡萄球菌的溶菌作用;另外,浓度较低的SDS组(0.1%)溶菌作用要优于浓度较高的组(1.0%),一定量 Mg^{2+} 的存在可以拮抗壳聚糖诱导的SDS溶菌效能(表2)。

表2 62.5 mg/L壳聚糖协同不同浓度SDS溶菌10min后的 A_{600nm} 检测结果(n=3)

Table 2 A_{600nm} synergistic effects of 62.5 mg/L chitosan (1% acetic acid as control) with 0.1% or 1% SDS (1%SDS plus 20 mol/L $MgCl_2$) on bacteriolysis of *E.coli* and *S. aureus* (n = 3)

溶菌物质浓度	大肠埃希氏菌		金黄色葡萄球菌	
	1% 醋酸对照	62.5mg/L壳聚糖	1% 醋酸对照	62.5mg/L壳聚糖
SDS(0.1%)	1.05 ± 0.04	0.42 ± 0.03*	1.16 ± 0.04	1.02 ± 0.02
SDS(1%)	0.97 ± 0.02	0.64 ± 0.05*	1.15 ± 0.03	1.10 ± 0.10
SDS(1%)+ $MgCl_2$ (20mmol/L)	0.94 ± 0.03	0.90 ± 0.08	1.24 ± 0.04	1.20 ± 0.04

注:*.与对照组相比, $p < 0.01$ 。

3 讨论

克氏螯虾为地产盱眙龙虾,学名克氏原螯虾。由于人为传播和它自身繁殖,目前已遍布长江中下游南北的每个角落,并成为我国自然水体的一个种群,资源十分丰富。实验用克氏螯虾的外壳作为原料,提取并制备了克氏螯虾壳聚糖^[1],发现其具有广谱的天然抗菌活性^[4]和较好的应用价值^[5-6],如果用于食品,不仅具有降糖降脂功能,而且还具有天然食品防腐作用。为了进一步探讨其抗菌机理,本实验研究了克氏螯虾壳聚糖对细菌表面的作用特性。

由物质泄漏实验发现,在微酸条件下,2000mg/L克氏螯虾壳聚糖与实验菌作用3.5h,细菌上清液含有较多的核酸、蛋白及AST,与对照组相比差异十分显著($p < 0.01$);同时,用透射电镜观察后发现,2500mg/L克氏螯虾壳聚糖可导致细菌胞内物质外泻,胞内出现空泡,整个菌体形态变得不规则。由此说明,克氏螯虾壳聚糖能破坏细菌表面结构,影响其屏障功能,使菌内物质泄漏。原因可能与克氏螯虾壳聚糖所带的氨基有关。由于克氏螯虾壳聚糖的等电点高达6.3,在微酸性条件下其氨基带正电荷,可以结合细菌表面(细胞壁、细胞膜)带负电荷的蛋白质及磷脂等重要大分子,破坏细菌表面结构,保护胞内物质的屏障功能丧失,导致菌内

物质大量漏出。对其他来源壳聚糖的抗菌机理研究,也有类似的报道^[7-10]。

SDS是一种有效的溶菌剂,作用部位是细菌表面的细胞壁,壳聚糖会通过破坏细菌细胞壁完整性,协同SDS发挥溶菌作用^[8]。本研究发现62.5mg/L克氏螯虾壳聚糖可协同SDS对实验菌的溶菌效应,但所需的时间不同,对大肠埃希菌10min内即可协同SDS发挥溶菌效应;而对金黄色葡萄球菌,10min则太短,需放置过夜后才能溶菌,可能是由于金黄色葡萄球菌的细胞壁要厚于大肠埃希菌,所需的作用时间较长的原因。本研究还发现,在相同克氏螯虾壳聚糖浓度下,浓度较低的SDS组(0.1%)的溶菌作用要优于浓度较高的组(1.0%),一定量 Mg^{2+} 的存在可以拮抗壳聚糖诱导的SDS溶菌效能。原因可能是随着SDS浓度的增大,克氏螯虾壳聚糖分子中的阳离子($-NH_3^+$)与SDS中的阴离子结合,减少了抑菌功能团的数量^[4],降低了协同溶菌作用;随着钠、镁离子浓度的增大,克氏螯虾壳聚糖可能与金属离子形成螯合物^[4],故SDS的溶菌效能下降。在应用中需要注意。

综上所述,克氏螯虾壳聚糖对细菌表面的作用机理是:破坏细菌的表面结构,使细胞壁屏障功能丧失,造成菌内物质泄漏;协同SDS对细菌的溶菌作用。至于克氏螯虾壳聚糖能否进入细菌内与细胞核等细胞器结合,影响其代谢,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 郑铁生,辛淮生,卞爱民,等. 地产龙虾壳甲壳素的提取和壳聚糖的制备[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(12): 1208-1209.
- [2] 郑铁生,王亚娜,宗爱萍. 壳聚糖对实验大鼠降血脂作用的初步研究[J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(6): 26-27.
- [3] 郑铁生,王亚娜,宗爱萍. 龙虾壳聚糖干预后糖尿病小鼠血糖和糖耐量的变化[J]. 中国临床康复, 2006, 31(10): 67-69.
- [4] 郑铁生,王亚娜,宗爱萍. 壳聚糖天然抗菌的活性及其稳定性[J]. 商场现代化, 2005(11): 188-189.
- [5] 郑铁生,王亚娜,宗爱萍. 壳聚糖体外抗幽门螺杆菌的作用及其影响因素[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(10): 993-996.
- [6] 丁恒生,王亚娜,宗爱萍,等. 龙虾壳聚糖抗皮肤浅表真菌的实验研究[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(1): 13-14.
- [7] CHUNG Y C, CHEN C Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan[J]. Bioresource Technol, 2008, 99: 2806-2814.
- [8] HELANDER I M, NURMIAHO E L, AHVENAINEN R, et al. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria[J]. Int J Food Microbiol, 2001, 71: 235-244.
- [9] LIU H, DU Y, WANG X, et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage[J]. Int J Food Microbiol, 2004, 95: 147-155.
- [10] JE J Y, KIM S K. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54: 6629-6633.