

文章编号: 1004 - 7271(2002)04 - 0348 - 05

β -甲壳质及其脱乙酰衍生物的特性

蒋霞云, 王 慥, 李兴旺

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘 要:对 β -甲壳质及其脱乙酰衍生物的特性与 α -甲壳质及其脱乙酰衍生物进行了比较研究。结果表明:红外光谱和 X-衍射图谱都可以用来表征甲壳质,但只有 X-衍射图谱可以区分其 α 和 β 型结构; β -壳聚糖和 α -壳聚糖在高浓度(大于 0.01%)时对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有明显的抑菌作用,而在低浓度(0.001%)下,由于本试验所用的 β -壳聚糖兼有高粘度和高脱乙酰度,抑菌作用强于 α -壳聚糖。

关键词: β -甲壳质; β -壳聚糖; 红外光谱; X-衍射; 抑菌作用

中图分类号: S986.2 **文献标识码:** A

The characteristics of β -chitin and its deacetyl derivative

JIANG Xia-yun, WANG Zao, LI Xing-wang

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Some characteristics of β -chitin and its deacetyl derivative were studied compared with α -chitin and its deacetyl derivative. The results showed that chitin could be identified by its IR spectrum and X-ray diffraction pattern. Only the latter could distinguish two different crystal types (α or β); Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, both β -chitosan and α -chitosan had antibiotic activity obviously when the concentrations were more than 0.01%. While the concentrations were low (0.001%), β -chitosan showed stronger antibiotic activity than α -chitosan because of its high viscosity and high degree of deacetylation.

Key words: β -chitin; β -chitosan; IR spectrum; X-ray diffraction patterns; antibiotic activity

甲壳质分布广泛,大量存在于海洋无脊椎动物、昆虫、真菌、酵母和低等植物中,在自然界的含量仅次于纤维素。壳聚糖是由甲壳素经脱乙酰化反应得到的生物高分子物质。甲壳质有三种晶形,即 α 、 β 和 γ -壳二糖聚合体^[1], α -甲壳质远较其它两种形态多见,它的晶胞为斜方晶型,其相继片层以反向平行方式排列;甲壳质中数量占第二位的是 β -甲壳质,它的晶胞为单斜晶型,前后片层排列成平行式; γ -甲壳质的特征最不明显,重复结构是由 2 个平行片加一个反向平行片层构成,比另两种形态含有较多的乙酰成分。用发烟硝酸或硫酸锂可使 γ -甲壳质转化为 α -甲壳质。甲壳质的应用已成为当今科技领域的热点之一,但已开发的应用绝大部分是针对 α -甲壳质及壳聚糖展开的,至今人们对 β -甲壳质的化学性质及应用开发的研究极为有限。

收稿日期: 2002-07-05

基金项目: 上海市高等教育发展基金(98-12)

作者简介: 蒋霞云(1974-),女,江苏无锡人,硕士,从事水产品加工与贮藏研究。E-mail: Jiangxy@shfu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 β -壳聚糖的制备

羽状壳由中国水产上海公司提供, 主要从太平洋褶柔鱼 (*Todarodes pacificus*) 和阿根廷短鳍枪乌贼 (*Illex argentinus*) 中采集。壳聚糖的制备参照蒋霞云等的方法^[2]。

实验中用作对比的 α -壳聚糖的制法: 从上海鱼品厂购买的粗 α -甲壳质, 用 1.5 mol/L 的盐酸浸泡过夜, 再用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液煮三次, 每次煮 8h, 水洗至中性, 烘干后粉碎至 40 目, 再经过 47% NaOH (甲壳质: NaOH 溶液的质量体积比为 1:10)、在 90℃ 以上, 10h 的条件下脱乙酰基^[3], 然后水洗至中性, 烘干, 即得 α -壳聚糖。

1.2 测定方法

脱乙酰度的测定: 采用自动电位滴定法^[4]。

特性粘度和粘均分子量的测定^[5]: 以 0.1 mol/L 醋酸/0.2 mol/L 氯化钠作为溶剂系统, 用乌氏粘度计法测得特性粘度, 按以下公式计算粘均分子量:

$$[\eta] = 1.81 \cdot 10^{-3} \cdot M^{0.93}$$

红外光谱: 用美国 NICOLET 公司的 FT-IR 5DX 型红外光谱仪测定。

X-衍射: 用日本 Rigaku 株式会社的转靶 X-射线衍射仪 D/max- γ B 扫描分析。

1.3 实验方法

菌种来源: 实验中所用的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 均由上海水产大学渔业学院微生物实验室提供。

培养液的制备: 将含有 1%、0.1%、0.01% 及 0.001%、0.0001% 壳聚糖 (α 或 β) 以及不含壳聚糖的营养肉汤各 100mL 放入三角瓶中, 先用醋酸将所加入壳聚糖溶解, 再用氢氧化钠溶液调节 pH 值为 5.5, 经高压灭菌冷却后, 分别接入实验菌。

细菌的培养和检测: 将已接入细菌的培养液置 35℃ 培养。每天把培养液摇匀后取出 0.5mL, 进行细菌总数测定。

2 结果与讨论

2.1 α 和 β -甲壳质的红外光谱图

根据 α 和 β -甲壳质红外光谱图 (图 1), 对照童兴龙^[6]、Takai^[7] 及 Kurita^[8] 的结果, α -甲壳质与文献基本一致, 而图中 α 和 β -甲壳质的红外光谱极为相似, 表明两者在基本结构上是相同的。

图中 3600~3200 cm^{-1} 区域内的 O—H 的伸缩振动峰宽有些差别, 表明了两者的分子间和分子内氢键有所不同, 这与理论^[1]是相符的。

由此可知, 红外光谱可用来表征甲壳质, 但无法区分其不同的晶型。

2.2 α 和 β -甲壳质的 X-衍射图谱

比较 α 、 β 甲壳质的 X-衍射图谱 (图 2), 可见以下情况: (1) α -甲壳质的衍射峰较多且明显, 而 β -甲壳质的衍射峰较少; (2) 两者在接近 8~9° 及 20° 处, 各有两个明显主峰。 α -甲壳质两个主峰在 $2\theta = 19.1^\circ$ 及 9.0° , 而 β -甲壳质的两个主峰分别为 $2\theta = 19.4^\circ$ 及 8.0° 。以上结果与 Goycoolea 等^[9] 对 α -甲壳质 (由虾壳制备) 和 β -甲壳质 (由鱿鱼羽状壳制备) 的 X-衍射实验结果几乎完全一致。根据以上 X-衍射实验结果可以推断, α -甲壳质的结晶度高于 β -甲壳质, 在 β -甲壳质的聚态结构中, 具有更多的无定形部分, 同时, 结果表明 X-衍射图谱可用于表征甲壳质的结构, 并区别 α 、 β 甲壳质的不同晶型。

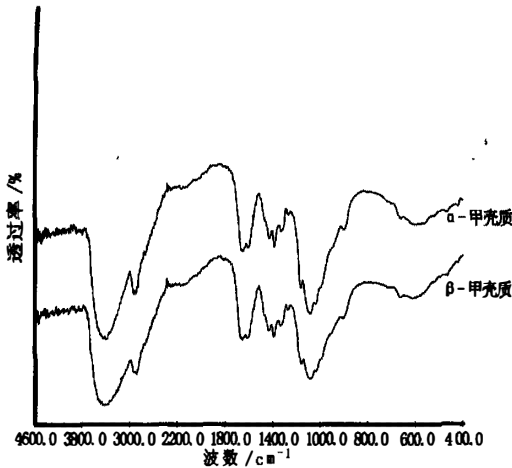


图1 α 和 β -甲壳质的红外光谱
Fig.1 IR spectrum of α and β -chitin

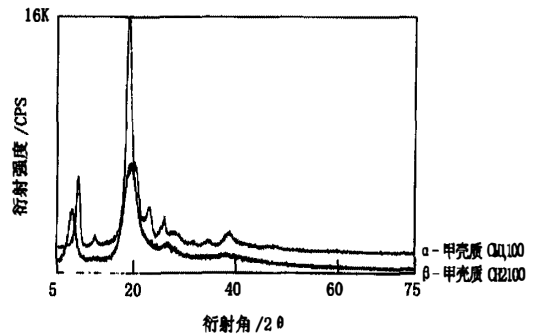


图2 α 和 β -甲壳质 X-衍射光谱图
Fig.2 X-ray diffraction patterns of α and β -chitin

2.3 α 和 β -壳聚糖的脱乙酰度、特性粘度和粘均分子量比较

由于 β -甲壳质的聚态结构中无定形成分较多,结构相对疏松,脱乙酰基反应较易进行,要求的反应条件也比较温和,反应过程中大分子降解少,故在脱乙酰基程度较高($>90\%$)条件下,仍能保持高的分子量。因此从制备高脱乙酰度、高粘度(高分子量)的壳聚糖的角度讲,相比于 α -甲壳质, β -甲壳质无疑具有一定优势。

表1 两种壳聚糖的脱乙酰度、特性粘度和粘均分子量

Tab.1 Degree of deacetylation, intrinsic viscosity and viscosity-average relative molecular mass of two kinds of chitosan

壳聚糖类型	脱乙酰度(%)	特性粘度($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	粘均分子量
α -壳聚糖	87.7	507	7.2×10^5
β -壳聚糖	92.1	1433	2.2×10^6

β -壳聚糖较高的特性粘度,表示 β -壳聚糖大分子在溶液中占有较大的流体力学体积,反映其大分子具有相对较柔顺的构象。一般认为乙酰基的存在,由于其空间位阻及相邻残基间的氢键作用,会增加壳聚糖大分子的刚性^[9]。因此高脱乙酰度有利于大分子的柔顺性。同时分子链中存在的大量质子化胺基,由于相互间的静电斥力造成分子链的扩展。上述因素导致 β -壳聚糖呈现明显高于 α -壳聚糖的特性粘度。

2.4 β -壳聚糖的抑菌性研究

2.4.1 壳聚糖对金黄色葡萄球菌生长的影响

当壳聚糖浓度不小于0.1%时, α 和 β -壳聚糖均对金黄色葡萄球菌有很强的抑制作用,实验期间均未检测到细菌数;当壳聚糖浓度在0.001% - 0.01%之间时, α 和 β 壳聚糖仍对金黄色葡萄球菌有抑制作用,且 β -壳聚糖,与 α -壳聚糖相比,对金黄色葡萄球菌的抑制作用稍强(图3、图4)。

当壳聚糖浓度为0.0001%时,两种壳聚糖均对金黄色葡萄球菌无抑制作用。

2.4.2 壳聚糖对大肠杆菌生长的影响

当壳聚糖浓度不小于0.1%时, α 和 β -壳聚糖均对大肠杆菌有很强的抑制作用,实验期间均未检测到细菌数;当壳聚糖浓度为0.01%时, α 和 β 壳聚糖均仍对大肠杆菌有明显的抑制作用,两者抑菌作用的差别不明显(图5);当壳聚糖浓度为0.001%时, β -壳聚糖对大肠杆菌的抑制作用仍很明显,但 α -壳聚糖表现的抑菌作用很弱(图6),所以,在这个浓度上 β -壳聚糖较之 α -壳聚糖呈现更强的抑菌作用;当壳

聚糖浓度为 0.0001% 时,两种壳聚糖对大肠杆菌均无抑制作用。

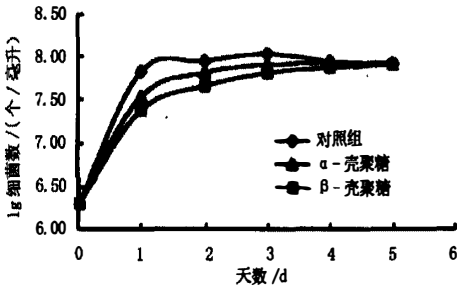


图 3 壳聚糖(0.01%)对金黄色葡萄球菌生长的影响
Fig.3 The influence of chitosan(0.01%) to the growth of *Staphylococcus aureus*

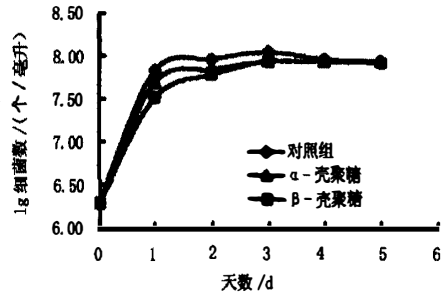


图 4 壳聚糖(0.001%)对金黄色葡萄球菌生长的影响
Fig.4 The influence of chitosan(0.001%) to the growth of *Staphylococcus aureus*

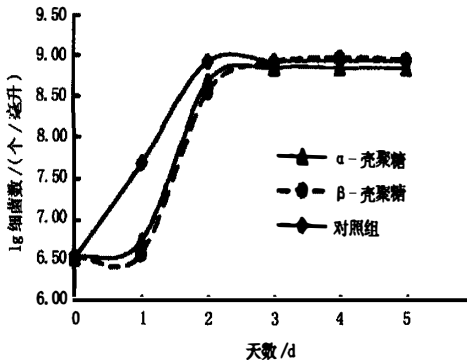


图 5 壳聚糖(0.01%)对大肠杆菌生长的影响
Fig.5 The influence of chitosan(0.01%) to the growth of *Escheria coli*

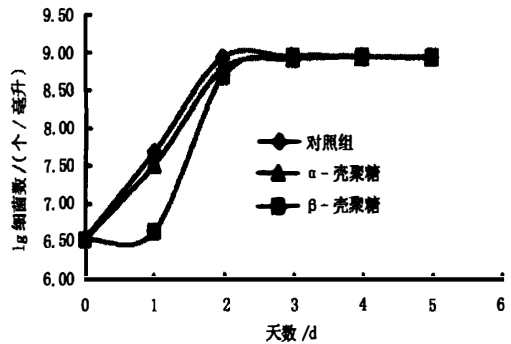


图 6 壳聚糖(0.001%)对大肠杆菌生长的影响
Fig.6 The influence of chitosan(0.001%) to the growth of *Escheria coli*

2.4.3 讨论

关于壳聚糖的抑菌机理,存在很多的争议。主要的观点认为:质子化胺基和分子量是影响壳聚糖抗菌性的关键因素。一方面,质子化胺基与细菌带负电荷的细胞膜作用,在菌体表面成膜,阻止营养物质的进入;另一方面,分子量小的壳聚糖可能穿过损伤的细胞膜进入细胞内部,与细胞内物质进一步作用,这两方面都能扰乱细菌的合成和代谢,以达到抗菌的目的^[10]。

在本实验中, β -壳聚糖同 α -壳聚糖一样对两种细菌有着显著的抑制作用,且在低浓度(0.001%)时存在一定的差别,即 β -壳聚糖的抑菌作用更明显。造成此现象的可能原因为:两种壳聚糖的分子量都比较大,且当壳聚糖的浓度较低时,只有极少量的壳聚糖分子可能穿过细胞膜而进入细胞内部,因此,菌体表面成膜成为抑菌的主导原因,故壳聚糖脱乙酰度越高、分子量及浓度越大,在细菌周围形成了的膜就越致密,从而阻止了营养物质进入细菌细胞,抗菌效果便愈明显。

由于 β -壳聚糖有高粘度和高脱乙酰度的特点,与 α -壳聚糖相比,在抑菌作用上有其优越性。这与 Shimojoh 等^[11]的观点相似。

3 结论

红外光谱、X-衍射图谱都可以用来表征甲壳质,但只有 X-衍射图谱可以区分其 α 和 β 型结构; β -壳聚糖对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌两种菌均有一定的抑制作用,由于 β -壳聚糖有高粘度和高脱乙酰度的特点,在抑菌作用上较 α -壳聚糖表现出更强的抑菌活性。

参考文献:

- [1] 黄志斌. 水产品综合利用工艺学[M]. 北京:中国农业出版社, 1996. 159 - 164.
- [2] 蒋霞云,王 愷. β -壳聚糖的制备工艺研究[J]. 上海水产大学学报, 2000, 9(1):89 - 91.
- [3] 曾名男. 关于壳聚糖制备条件的研究[J]. 水产科学, 1992, 11(10): 9 - 13.
- [4] 林瑞洵,蒋亦洪,张慕珊. 脱乙酰度的测定方法[J]. 化学通报,1992, (3): 39 - 42.
- [5] 陈鲁生,周 武,姜云生. 壳聚糖粘均分子量的测定[J]. 化学通报, 1996,(4):57.
- [6] 童兴龙, 杨建平. 甲壳素和壳聚糖的制备条件对其质量及性能的影响[J]. 海洋科学, 1999, (2):11 - 14.
- [7] Takai T, Shimizu K, Hayaashi M. Physical properties of chitin sheet from loligo pen[C]. Orlando: Academic Press, 1984. 475 - 478.
- [8] Kurita K, Tomita K, Tada T, et al. Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation Behavior and characteristic properties[J]. Journal of polymer science: Part A: Polymer chemistry, 1993, 31:485 - 491.
- [9] Goycoolea F, Arguelles-Monal M, Peniche C, et al. Chitin and chitosan[A]. Macromolecules in Food Systems[C]. Elsevier Science B. V: Doxaftakis and Kioseoglou, 2000, 265 - 308.
- [10] 管云林,付 强,郎铁柱,等. 分子量对壳聚糖抗菌性的影响[A]. 中国甲壳资源研究开发应用学术研讨会论文集(下册)[C]. 青岛:中国药学会海洋药物专业委员会,中国海洋湖沼学会药物学分会, 1997. 35 - 36.
- [11] Shimojoh M, Manabu K, Kurita K, et al. Bactericidal effects of chitosan from squid pens on oral streptococci[J]. Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 1996, 70(7): 787 - 792.