

# 壳寡糖抑菌作用的研究

张筠<sup>1</sup>, 杜鹏<sup>2</sup>, 张亚东<sup>1</sup>

(1. 黑龙江东方学院, 黑龙江哈尔滨 150086)

2. 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:** 研究了壳寡糖对原料乳中常见细菌的抑制作用, 采用牛津杯抑菌环法研究壳寡糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑制作用, 采用稀释涂布法测定壳寡糖对细菌总数、芽孢数、耐热芽孢数、嗜冷菌数的抑制作用, 并研究了不同浓度的壳寡糖对原料乳中的美兰还原变色时间的影响, 结果显示: 壳寡糖对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有显著的抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 对原料乳中细菌总数和嗜冷菌数均有显著的抑制作用 ( $P < 0.05$ ) 并明显延长原料乳中美兰的变色时间, 对芽孢总数和耐热芽孢数影响不显著。

**关键词:** 壳寡糖, 抑菌作用, 原料乳

## Study on the bacteriostasis of Chito-oligosaccharide

ZHANG Yun, DU Peng, ZHANG Yandong

(1. Heilongjiang East College Harbin 150086, China)

2. Food College Northeast Agricultural University Harbin 150030, China)

**Abstract:** The bacteriostasis of Chito-oligosaccharide in raw milk was studied. Diameter of inhibiting loop assay was used to determine the bacteriostasis to *Staphylococcus aureus* and the *Escherichia coli* spreading inoculation was used to determine the inhibition of Chito-oligosaccharide against the medium bacterial count, psychrophile bacillus, the motile bacillus, the time of methylene blue test in raw milk was also studied. The research results obtained were as follows: both of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* could be apparently inhibited by Chito-oligosaccharide ( $P < 0.05$ ). The medium bacterial count and the psychrophile were significantly inhibited ( $P < 0.05$ ). It could prolong the time of the methylene blue test obviously. The inhibition of Chito-oligosaccharide against bacillus and the motile bacillus were insignificant.

**Key words:** Chito-oligosaccharide; bacteriostasis; raw milk

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)01-0088-03

壳寡糖 (Chito-oligosaccharide) 又名几丁寡糖, 是壳聚糖经降解后聚合度为 2~10 的产物, 其水溶性好, 容易被吸收利用, 壳寡糖在人体内吸收率近 100%, 且生物活性比壳聚糖更强<sup>[1]</sup>。它和壳聚糖一样, 具有抑制肿瘤细胞的生长, 增强机体免疫力<sup>[2]</sup>, 强化肝脏功能, 防止胃溃疡, 降低血压、血糖、血脂, 吸附胆固醇及抗菌作用等<sup>[3]</sup>。在乳品工业中, 用于奶粉、酸奶以及液态奶生产的原料乳的保鲜通常是用低温来控制微生物的生长, 但是抑菌效果不是很好, 经常出现原料乳变质现象。而壳寡糖来源天然可靠, 同时具有抑菌作用, 可以作为天然防腐剂添加于乳饮料中, 既能发挥其抑菌防腐剂的功能, 同时还可以起到增强宿主机体健康的作用。本文研究了壳寡糖对原料乳中常见细菌的抑制作用, 旨在为壳寡糖在原料乳中的应用提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

壳寡糖 分子量 2000 食品级, 济南海得贝海洋生物公司; 原料乳 市售; 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 黑龙江东方学院实验室提供。

IRH-250 型生化培养箱, DHG-9140 A 型电热恒温鼓风干燥箱, SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台, DSX-280 A 型不锈钢手提式灭菌锅, JF 型精密电子天平。

### 1.2 实验方法

1.2.1 壳寡糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑制作用 分别将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌以无菌操作稀释一定倍数, 取 0.1 mL 涂布于固体培养基, 放入牛津杯, 每个杯中分别注入浓度为 0、2、4、5、10、20、40、50 g/L 的壳寡糖溶液 0.2 mL, 置于 37°C 培养 24 h 后, 测量抑菌环大小<sup>[4]</sup>。

1.2.2 壳寡糖对原料乳中细菌总数的抑制作用 在原料乳中分别添加浓度为 0、2、4、5、10、20、40、50 g/L 的壳寡糖, 调节 pH 为 6, 将乳样放入 4°C 的冰箱中,

收稿日期: 2008-08-26

作者简介: 张筠 (1976-) 女, 讲师, 硕士, 研究方向: 食品功能性。

基金项目: 黑龙江省教育厅项目 (11513081)

放置 8 h 后取出, 涂布于普通营养琼脂培养基, 37℃ 培养 24~48 h 后, 测定细菌总数。

1.2.3 美兰还原实验 将分别加入浓度为 0.2、4、5、10、20、40、50 g/L 的壳寡糖的乳样放置 8 h 各取 10 mL 移至大试管中, 每个试管加入 1 mL 美兰标准溶液, 37℃ 水浴, 记录美兰变色时间。

1.2.4 壳寡糖对芽孢、耐热芽孢的抑制作用 将含壳寡糖浓度分别为 0.2、4、5、10、20、40、50 g/L 的乳样 10 mL 放入大试管中, 采用柴彤涛<sup>[5]</sup>的方法测定奶样中的芽孢总数、耐热芽孢数。分别测定原料乳中的初始耐热芽孢数和加入不同浓度的壳寡糖放置 8 h 后的耐热芽孢总数。

1.2.5 壳寡糖对嗜冷菌抑制作用实验 以稀释涂布法测定原料乳的初始嗜冷菌数<sup>[6]</sup>, 然后将含壳寡糖浓度分别为 0.2、4、5、10、20、40、50 g/L 的乳样放入 4℃ 冰箱中, 放置 8 h 后取出乳样, 稀释涂布于嗜冷菌计数培养基, 21℃ 培养 25 h 后菌落计数。

### 1.3 数据处理

采用 SPSS 13.0 软件的 LSD 多重比较模块进行差异显著性检验。各项指标均数与标准差以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较采用 F 检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 壳寡糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑制作用

将放有牛津杯的平板 37℃ 培养 24 h 取出, 测量抑菌环的大小, 结果见表 1。

表 1 壳寡糖对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌环直径 ( $\bar{x} \pm SD$ )

浓度 (g/L)	抑菌环直径 (mm)		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	
空白组	0	8.17 ± 0.023	8.00 ± 0.007
	2	8.34 ± 0.041	8.67 ± 0.038
	4	9.13 ± 0.042*	9.33 ± 0.017*
	5	9.53 ± 0.033*	9.36 ± 0.032*
	壳寡糖组	10	11.03 ± 0.031* (**)
	20	12.10 ± 0.024* (**)	11.60 ± 0.007* (**)
	40	12.17 ± 0.015* (**)	12.12 ± 0.029* (**)
	50	12.50 ± 0.007* (**)	12.83 ± 0.033* (**)

注: 同列 \* 表示差异显著 (P < 0.05), 括号内标 \* 表示差异极显著 (P < 0.01), 表 2 表 4 表 5 同。

由表 1 可以看出, 壳寡糖对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌都有抑制作用。壳寡糖组与空白组相比, 除了 2 g/L 浓度外, 抑菌环直径均显著增大 (P < 0.05); 壳寡糖浓度大于 10 g/L 后, 抑菌环直径增加极显著 (P < 0.01), 且随着壳寡糖浓度的升高, 抑菌能力逐渐增强。

### 2.2 壳寡糖对原料乳中细菌总数的抑制作用

在冷藏条件下, 不同浓度的壳寡糖作用于原料乳 8 h 后测定细菌总数, 结果见表 2。

从表 2 可以看出: 与空白组相比, 壳寡糖组除了 2 g/L 浓度外, 细菌总数均显著降低 (P < 0.05); 壳寡糖浓度大于 5 g/L 后, 细菌总数降低极显著 (P < 0.01), 且随着壳寡糖浓度的升高, 抑菌能力逐

渐增强。

表 2 壳寡糖对原料乳中细菌总数的抑制作用结果 ( $\bar{x} \pm SD$ )

	浓度 (g/L)	细菌总数 (cfu/mL)
空白组	—	5.489 ± 0.037
	2	5.486 ± 0.026
	4	5.375 ± 0.019*
	5	5.334 ± 0.021* (**)
	壳寡糖组	10
	20	5.292 ± 0.008* (**)
	40	5.253 ± 0.023* (**)
	50	5.104 ± 0.014* (**)

### 2.3 美兰还原实验结果

在冷藏条件下, 不同浓度壳寡糖作用于原料乳 8 h 后进行美兰还原实验, 结果如表 3。

表 3 美兰还原实验结果

	浓度 (g/L)	美兰变色时间 (min)
空白组	—	28
	2	33
	4	50
	5	62.5
	壳寡糖组	10
	20	98.5
	40	117
	50	122

由表 3 看出, 加入壳寡糖后可以明显延长美兰变色时间, 且随壳寡糖浓度的升高, 变色时间逐渐增加。美兰是一种氧化还原作用指示剂, 在厌氧环境中, 它将被还原成无色。如果牛乳中有细菌生长繁殖, 必将造成其中溶解氧的减少, 牛乳样品中的氧化—还原电势降低。通过加入其中的美兰颜色变化的速度, 可鉴定该牛乳的质量<sup>[7]</sup>。通过美兰变色实验进一步证明了壳寡糖的抑菌作用, 并且结果与刘芳<sup>[8]</sup>实验中的结果相一致。这也证明了壳寡糖对还原菌的抑制作用。

### 2.4 壳寡糖对芽孢、耐热芽孢的抑制作用

原料乳中初始芽孢数、耐热芽孢数分别为 300 个 /mL 和 30 个 /mL, 冷藏 8 h 后芽孢及耐热芽孢计数结果如表 4 所示。

表 4 壳寡糖对原料乳中芽孢、耐热芽孢的抑制作用结果 ( $\bar{x} \pm SD$ )

	浓度 (g/L)	芽孢总数 (cfu/mL)	耐热芽孢总数 (cfu/mL)
空白组	—	2480 ± 0.066	1.489 ± 0.086
	2	2484 ± 0.051	1.483 ± 0.041
	4	2476 ± 0.073	1.486 ± 0.063
	5	2445 ± 0.056*	1.440 ± 0.056*
	壳寡糖组	10	2461 ± 0.081*
	20	2483 ± 0.061	1.486 ± 0.062
	40	2497 ± 0.092	1.501 ± 0.071
	50	2503 ± 0.095	1.503 ± 0.085

由表 4 可以看出, 芽孢及耐热芽孢总数偏小, 由方差分析表明, 随着壳寡糖浓度的增加, 芽孢及耐热芽孢数除了 5 g/L 和 10 g/L 剂量组外, 其他各剂量组与空白组比较变化不显著 (P > 0.05)。因此可以认为, 壳寡糖的加入对原料乳中芽孢、耐热芽孢数的影

响不大。

目前认为壳寡糖的抑菌机理是 $-NH_2^+$ 与细胞壁内的电负性物质结合后,改变了微生物细胞膜的流通性和通透性,而抑制微生物的生长<sup>[9]</sup>。可能是因为原料乳中芽孢数量太少,并且芽孢有多层致密的壁保护,还有致密不透水的薄膜,可以阻止外界物质的渗入,因而导致芽孢及耐热芽孢数变化不显著。

## 2.5 壳寡糖对嗜冷菌的抑制作用

将添加不同浓度壳寡糖的原料乳在 $4^\circ\text{C}$ 的冰箱中放置8h后取出,稀释涂布于嗜冷菌计数培养基, $21^\circ\text{C}$ 培养25h后菌落计数,结果如表5所示。

表5 壳寡糖对原料乳中嗜冷菌的抑制作用结果( $\bar{x}\pm\text{SD}$ )

	浓度(g/L)	嗜冷菌总数( $\lg\text{cfu/mL}$ )
空白组	—	$4.272\pm 0.037$
	2	$4.262\pm 0.026$
	4	$4.213\pm 0.019$
	5	$4.201\pm 0.021^{**}$
	10	$4.167\pm 0.043^{**}$
壳寡糖组	20	$4.140\pm 0.008^{**}$
	40	$4.114\pm 0.023^{**}$
	50	$4.079\pm 0.014^{**}$

由表5可知,与空白组相比,壳寡糖组除了 $2\text{g/L}$ 浓度外,嗜冷菌总数均显著降低( $P<0.05$ );壳寡糖浓度大于 $5\text{g/L}$ 后,嗜冷菌总数降低极显著( $P<0.01$ ),且随着壳寡糖浓度的升高,抑制嗜冷菌效果越显著。

## 3 结论

壳寡糖对原料乳中常见致病菌金黄色葡萄球菌

(上接第87页)

过程控制不当、二次污染导致的<sup>[15]</sup>。

## 3 结论

山梨糖醇及其他混合辅料的菌落总数高,对加工产品初始菌数的控制不利。加工用水、包装材料所带菌数较少。经过不同蒸煮工艺和条件处理后的样品细菌种类均为革兰氏阳性,细菌相也比较单一,均主要包括芽孢杆菌、葡萄球菌、微球菌。所有不同蒸煮工艺及条件中,一次蒸处理 $6\text{min}$ 样品水分含量较高,但菌落总数和耐热菌落总数均较低,热杀菌效果比较明显,为最佳处理方法。

### 参考文献:

- [1] 杨宪时,许钟.高水分扇贝调味干制品保质栅栏的模式及其强度[J].水产学报,2000,24(1):68~71.
- [2] 杨宪时,许钟,郭全有.耐贮藏高水分水产调味干制品加工技术[J].海洋渔业,2003,25(4):204~206.
- [3] 许钟,杨宪时.调味扇贝半干制品适宜水分含量的研究[J].水产学报,1998,22(2):190~192.
- [4] 杨宪时,许钟,郭全友.提高扇贝制品安全水分含量的初步研究[J].中国水产科学,2003,10(3):258~261.
- [5] 周彩华,许钟,郭全友,等.常温贮藏软烤扇贝品质及潜在病原菌分析[J].海洋渔业,2006,28(3):222~227.
- [6] 大连轻工业学院,等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [7] 李博.GDL豆腐中的主要腐败菌的研究及HACCP的建立

和大肠杆菌有显著的抑制作用( $P<0.05$ ),且浓度越高,作用越明显;对原料乳中细菌总数、嗜冷菌总数有显著抑制作用( $P<0.05$ ),且浓度越高,作用越明显;对原料乳美兰变色时间有影响,且浓度越高,变色时间越长;对原料乳中芽孢数、耐热芽孢数影响不显著。

### 参考文献:

- [1] 严钦,沈月新,等.壳寡糖的制备及其抑菌性能研究[J].食品研究与开发,2003,4(2):26~29.
- [2] David A Zharoff et al.Chitosan solution enhances both humoral and cell mediated immune responses to subcutaneous vaccination[J].Vaccine,2007,19(6):2085~2094.
- [3] Rabea et al.Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action[J].Biomacromolecules,2003(4):1457~1465.
- [4] YANG T C, CHOU C C, LIC F. Antibacterial activity of N-acetylated disaccharide chitosan derivatives[J].Int J Food Microbiol,2005,97:237~245.
- [5] 柴形涛.原料奶中芽孢、耐热芽孢、嗜冷菌及抗生素残留的测定[J].中国乳业,2002(3):28~30.
- [6] 王克新,房玉国,张丽宏.液体乳中嗜冷菌的测定[J].中国乳品工业,2001,29(5):31~32.
- [7] 沈萍等.微生物学实验[M].高等教育出版社,2004,7.
- [8] 刘芳,杜鹏,霍贵成.壳寡糖对原料乳中微生物抑制作用的研究[J].中国乳品工业,2005,33(6):28~30.
- [9] 魏新林,夏文水.甲壳低聚糖的生理活性研究[J].中国药理学通报,2003,19(6):164~167.

- [10] 中国农业大学博士学位论文,2001,17.
- [8] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册(第一版)[M].北京:科学出版社,2001.
- [9] 须山三千三,鸿巢章二.水产食品学[M].东京:恒星社厚生阁,1987,111~118.
- [10] E F Baer, A P Duran, H V Leisinger, R B Read et al. Microbiological Quality of Frozen Breaded Fish and Shellfish Products[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1976(3):337~341.
- [11] 陈忘名,孙凤英,吴红星.出口冻煮熟淡水龙虾肉加工过程中微生物污染控制的研究[J].食品工业科技,1996(2):27~32.
- [12] 单衡明.出口冻煮熟淡水螯虾肉生产中细菌污染控制的探讨[J].冷饮与速冻食品工业,1996(4):14~17.
- [13] Grmur Valmarsson, Hårljeifur Einarsson, Bjma Gudbjámsdóttir, Hannes Magnússon. Microbiological quality of Icelandic cooked-peeled shrimp (*Pandalus borealis*) [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 45(2):157~161.
- [14] Hollingsworth T A, J K Kaysner C A et al. Chemical and microbiological analysis of vacuum packed pasteurized flaked imitation crabmeat [J]. Journal of Food Science, 1991, 56(1):164~167.
- [15] 鶴木隆文,吉村浩三,下野かおり, et al. 魚肉ねり製品の品質保持に関する研究 [J]. 鹿児島県工業技術センター研究報告, 1998, 12: 23~28.