

壳聚糖及其衍生物抗菌活性的研究进展

薛金玲, 李健军, 白艳红, 许 昭*

(西安交通大学理学院, 西安 710049)

摘要:壳聚糖是自然界目前发现的唯一碱性多糖, 具有自然来源丰富, 生物相容性好, 可被生物降解, 安全无毒和抗菌性强等许多天然的优良特性, 现其广谱抗菌性已得到广泛的认可, 但较差的水溶性限制了它的进一步应用。因此, 通过一定的改性方法制备壳聚糖衍生物以提高其水溶性, 是目前壳聚糖研究方面的热点之一。本论文就近年来几种常见的壳聚糖亲水改性方法及其衍生物在抗菌方面的应用进展进行综述, 以期对壳聚糖的深入研究提供参考。

关键词:壳聚糖衍生物; 水溶性; 抗菌性

引言

壳聚糖是甲壳素部分脱乙酰基后的产物, 具有无毒、生物相容性好、可生物降解性和抗菌性强等^[1~7]优良性能。壳聚糖是自然界目前发现的唯一碱性多糖, 它不溶于水和大多数有机溶剂, 仅溶于较稀的醋酸或稀盐酸溶液。另一方面, 壳聚糖结构中具有活泼位点的氨基和羟基基团, 容易发生化学反应, 可以通过引入不同基团进行化学修饰改变其溶解性, 得到多种不同性能的衍生物。目前, 壳聚糖衍生物已被广泛地应用在医用材料、抗菌材料、抗肿瘤、组织工程等领域^[8~12]。本论文就近年来壳聚糖常见的几种水溶性较好的化学改性方法及其衍生物在抗菌领域的应用进展进行综述。

1 壳聚糖及其衍生物

壳聚糖, 化学名为聚(1,4)-2-氨基-脱氧- β -D-葡聚糖, 是氨基葡萄糖和 N-乙酰氨基葡萄糖残基以 β -1,4 糖苷键缩合而成的聚合物^[13~15], 结构式如图 1 所示。壳聚糖主要来源于甲壳素, 是甲壳素部分脱乙酰化后的产物。虽然壳聚糖自然来源丰富, 但由于壳聚糖分子内存在 N、O 原子, 很容易形成分子内或分子间氢键, 故不溶于水和大多数有机溶剂, 只溶于较稀的醋酸或稀盐酸溶液。通过化学改性方法, 改善壳聚糖的水溶性, 可以有效提高其抗菌性能。目前, 众多的研究者在提高壳聚糖水溶性改性方面已做了大量研究, 取得一定的进展, 这些改性方法主要包括酰化反应、酯化反应、羧基化反应、季铵化反应、烷基化反应等。

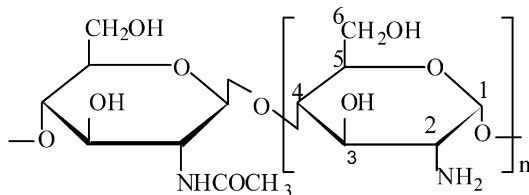


图 1 壳聚糖的结构式

Figure 1 Structures of chitosan

1.1 酰化反应

壳聚糖含有氨基和羟基两种基团, 由于氨基的活性较强, 故酰化反应一般在氨基(N-酰化)上进行。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2017.11.003

收稿: 2016-12-22; 修回: 2017-08-01;

基金项目: 中国博士后科学基金(2014M562394);

* 通讯联系人, E-mail: xu.zhao@xjtu.edu.cn.

通过与酰氯或者酸酐反应,在其大分子链上导入不同分子量的脂肪族或者是芳香族酰基,可以有效提高产物在水中或有机溶剂中的溶解度。Ying^[16]通过加入不同链长的酰化试剂制备出不同酰基链长的 *N*-酰化壳聚糖,其酰化的过程如图 2 所示。

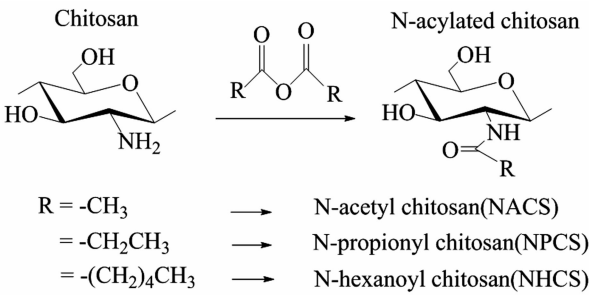


图 2 不同酰基链长的 *N*-酰化壳聚糖的制备

Figure 2 Preparation of different acyl chain length *N*-acylated chitosan

实验证实,壳聚糖酰化产物的溶解性得到显著提升,其生物相容性良好,特别是 *N*-己酰化壳聚糖。该方法的不足之处在于:壳聚糖中的一OH 基团也可与酸酐发生取代得到一种全部取代的壳聚糖衍生物,致使壳聚糖衍生物活性大大降低。

1.2 酯化反应

壳聚糖分子链的糖残基中含有多个羟基,因此可以与各种酸发生酯化反应,其中由硫酸酯化制备的磺化壳聚糖衍生物是目前研究热点之一^[17,18]。壳聚糖残基中的羟基可分为两类:C₆-OH 为 1°羟基和 C₃-OH 为 2°羟基,由于 2°羟基的空间位阻大、不可自由旋转和反应活性弱等原因,在 C₆-OH 进行酯化改性是最常见的。一般使用三氧化硫、浓硫酸、氯磺酸等磺化试剂。谭敏^[8]通过氯磺酸途径在常温条件下,制备 C_{3,6} 和 C₆ 两种定位磺化壳聚糖氯磺酸,反应快速简单,而且硫酸酯化修饰的位点有较强的选择性。Maria^[19]研究表明采用氯磺酸/浓硫酸混酸体系可以制得 C₆ 定位磺化壳聚糖,其磺化过程如图 3 所示。由于空间位阻以及氢键的影响,壳聚糖的三个羟基位点中 C₃-OH 的活性最低,制备只有 C₃-OH 被硫酸酯化的壳聚糖较为困难,目前尚没有一种方法可以直接 C₃ 定位硫酸酯化制得磺化壳聚糖衍生物。

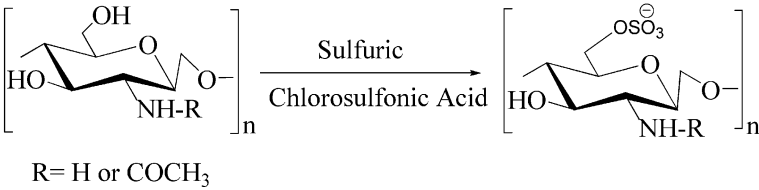


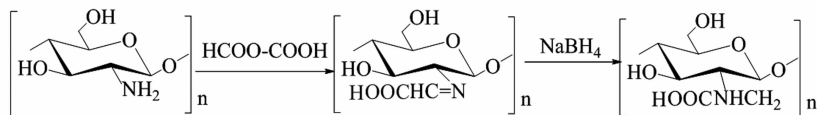
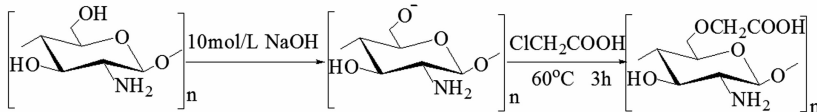
图 3 C₆-磺化壳聚糖的制备

Figure 3 Preparation of sulfonated C₆-chitosan

1.3 羧基化反应

壳聚糖的羧甲基化既可以在氨基上进行,也可以在羧基上进行,得到的羧甲基壳聚糖衍生物可分为 *O*-羧甲基化壳聚糖、*N*-羧甲基化壳聚糖、*N,O*-羧甲基化壳聚糖和 *N,N*-羧甲基化壳聚糖,其中 *N,O*-羧甲基化壳聚糖最为普遍。王钦权^[20]利用苯甲醛对壳聚糖的氨基进行保护,反应结束后利用盐酸水解脱去保护基,选择性的制得 *O*-羧甲基化壳聚糖。黄攀^[21]以乙醛酸为羧基化试剂,在弱酸性条件下反应,制备 *N*-羧甲基壳聚糖,制备过程如图 4 所示^[22]。宋舒苹^[23]通过氯乙酸与壳聚糖,在弱碱性条件下反应,制备出高取代度、良好水溶性的 *N,O*-羧甲基壳聚糖,制备过程如图 5 所示^[24]。

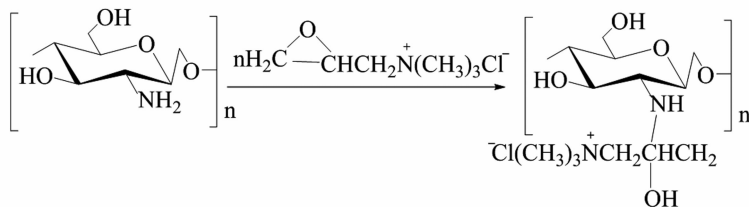
壳聚糖分子中羧甲基的取代位置与其生物活性密切相关,通过控制羧甲基基团的定向取代,可以制备诸多不同生物活性的产物。在上述两种制备过程中,*N*-羧甲基壳聚糖的制备以水为分散介质,而 *N,O*-羧甲基壳聚糖的制备以丙烯醇为分散介质。使用有机溶剂为分散介质对壳聚糖有一定的活化作用,但

图 4 *N*-羧甲基壳聚糖的制备Figure 4 Preparation of *N*-carboxymethyl chitosan图 5 *N,O*-羧甲基壳聚糖的制备Figure 5 Preparation of *N,O*-carboxymethyl chitosan

是会使生产成本提高并造成环境污染等问题。

1.4 季铵化反应

近年来,壳聚糖的季铵化改性研究发展迅速,主要包括直接季铵化和接枝季铵化。改性后得到的衍生物生物活性和水溶性均较壳聚糖有明显提高。季铵化的改性一般有两种方法:(1)直接用卤代烷与壳聚糖的氨基在碱性条件下反应,制备季铵盐壳聚糖;(2)引入带有季铵盐基团的小分子。壳聚糖的 *N*-烷基化反应可得到完全水溶性的衍生物。刘振儒^[25]将壳聚糖在碱性条件下与碘甲烷反应,逐步甲基化,直接合成了 *N*-碘化三甲基壳聚糖季铵盐。Lim^[26]将季铵盐基团引入到壳聚糖分子链的氨基上,合成了水溶性的季铵盐化的壳聚糖。图 6 描述了季铵化壳聚糖的制备过程^[27]。

图 6 *N*-季铵化壳聚糖的制备过程。Figure 6 Preparation *N*-quaternized chitosan

1.5 烷基化反应

壳聚糖烷基化反应是指在壳聚糖的氨基或羟基部分引入烷基,制备成 *O*-烷基化壳聚糖、*N*-烷基化壳聚糖、*N,O*-烷基化壳聚糖三种类型的衍生物。由于氨基活泼性比羟基高,所以在制备 *O*-烷基化壳聚糖时,要先对氨基进行保护,最常用的保护氨基的方法是希夫碱法:先将壳聚糖与醛反应形成希夫碱,再用卤代烷进行烷基化反应,然后在醇酸溶液中脱去保护基,得到只有 *O*-取代的衍生物。王爱勤^[28]使用希夫碱法制备出 *O*-丁烷基壳聚糖。李方^[29]用不同碳链长度的卤代烷与壳聚糖反应制成 *N*-烷基化壳聚糖。裴立军^[30]将壳聚糖与卤代烷在碱性条件下直接反应,制备出 *N,O* 位同时取代的衍生物。*O*-烷基化壳聚糖类衍生物由于自由氨基的存在,广泛用于金属离子吸附方面。*N*-烷基化壳聚糖因其具有液晶性、良好的成膜成纤性能,故广泛用于纺织、环保、材料、医药和化妆品等领域^[31~35]。*N,O*-烷基化壳聚糖类衍生物具有较好的生物相容性,在医用材料方面得到广泛的应用。

壳聚糖的这几种典型反应中,酰化壳聚糖衍生物有很好的生物相容性,是一种潜在的医用生物高分子。羧甲基化壳聚糖是壳聚糖研究最早最深入的改性方法,因其良好的水溶性和绿色环保性可在环保、水处理、医药和化妆品等领域得到应用。高分子季铵盐作为阳离子表面活性剂、絮凝剂、抗菌剂等,在水处理、食品、医疗卫生和包装材料等领域发挥重要作用。烷基化壳聚糖及其衍生物具有良好的保湿性、成

膜性、增粘性、防静电和防尘性,主要应用于化妆品工业。

2 壳聚糖及其衍生物的抗菌作用

2.1 壳聚糖及其衍生物的抗菌作用

壳聚糖经改性后,其衍生物水溶性得到了很大的改善,良好的水溶性可以使壳聚糖在抗菌方面发挥更强的功效,在制菌剂的应用方面将发挥更广泛的作用。表 1 列举了壳聚糖衍生物抗菌活性的实验结果。

表 1 壳聚糖衍生物抗菌性活性结果
Table 1 Antimicrobial activity of chitosan derivatives

壳聚糖衍生物		大肠杆菌	枯草杆菌	金黄色葡萄球菌
羧甲基壳聚糖	<i>N</i> -羧甲基壳聚糖	+	+	+
	<i>O</i> -羧甲基壳聚糖	+	+	+
	<i>N,O</i> -羧甲基壳聚糖	+	+	+
季铵化壳聚糖	季铵化壳聚糖	+		+
磺酸酯化壳聚糖	磺化壳聚糖	+	+	+
低分子量壳聚糖	低分子量壳聚糖	+	+	+
烷基化壳聚糖	烷基化壳聚糖	+		+
	<i>N</i> -酰化壳聚糖	+		+
	<i>O</i> -酰化壳聚糖	+	+	+
	<i>N,O</i> -酰化壳聚糖	+	+	+

注:表中加号:对菌体有抗菌性,不代表强弱;空:抗菌性很弱或未作研究。

2.1.1 羧甲基壳聚糖 羧甲基壳聚糖是壳聚糖羧甲基化后的产物,各种羧甲基壳聚糖可以直接抑制多种微生物的生长,通常情况下,*N*-羧甲基壳聚糖在所有 pH 范围内均为可溶;*O*-羧甲基壳聚糖的溶解性能受到温度的影响,在反应温度 0~20℃时,*O*-羧甲基壳聚糖在所有 pH 范围内都可溶;当反应温度>20℃时,*O*-羧甲基壳聚糖在 pH=7 出现不溶区,*N,O*-羧甲基壳聚糖除在 pH=2~6 不溶外,其它 pH 条件下均可溶解^[36]。羧甲基壳聚糖水溶性的增加使得其在抗菌方面的应用价值大大提升。

相比于壳聚糖,*O*-羧甲基壳聚糖具有更好的抗真菌活性,这主要是因为 *O*-羧甲基壳聚糖的活性氨基数并没有因为对羟基的取代而减少,而是破坏了壳聚糖自身羟基和氨基分子内和分子间的部分氢键,使抗真菌活性基团—NH₂ 的数量增多。李治^[37]的研究结果表明,*O*-羧甲基壳聚糖的抗菌活性明显高于壳聚糖,抗菌效果会随着浓度的上升先增加后降低。苏云等^[38]考察了不同条件下的 *N,O*-羧甲基壳聚糖对大肠杆菌、枯草杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果,结果表明,*N,O*-羧甲基壳聚糖有很强的抑菌作用,且抑菌活性随质量浓度的增大而增加。Liu 等^[39]对比壳聚糖、*N,O*-羧甲基壳聚糖、*O*-羧甲基壳聚糖的抗菌活性,发现其中 *O*-羧甲基壳聚糖的抗菌活性最强。*N*-羧甲基壳聚糖由于氨基含量减少而导致了抗菌活性的降低。目前,羧甲基壳聚糖应用在抗菌方面以抗菌纸、抗菌复合材料、抗菌剂和抗菌膜等形式出现。

2.1.2 季铵化壳聚糖 季铵化壳聚糖是一种阳离子型高分子电解质,可以在整个 pH 范围内溶解,水溶性显著提高,这主要是因为壳聚糖分子中的氨基被季铵盐基团取代后减少了分子内的氢键作用,不但破坏壳聚糖的晶体结构,而且增加正电荷数量,从而提高了水溶性。季铵盐基团的取代增加了壳聚糖的正电荷密度,更容易破坏带负电荷的细菌细胞壁,提高其抑菌活性。陈燕燕^[40]在 *N,N,N*-三甲基壳聚糖上引入小分子季铵盐,得到 *O*-(2-羟丙基三甲基氯化铵)-*N,N,N*-三甲基壳聚糖,抗菌实验结果表明,引入小分子季铵盐后增强了 *N,N,N*-三甲基壳聚糖的抗菌性,并且随季铵化度的增加抗菌活性增强。

Mourya^[41]在壳聚糖分子链上引入了季铵基团,得到的壳聚糖季铵盐既保持了壳聚糖阳离子性,又改善了其水溶性,增强了壳聚糖抗菌性。李淑荣^[42,43]对大肠杆菌(革兰氏阴性菌)和金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)的抗菌性做了研究,发现壳聚糖季铵盐衍生物有较强的灭菌作用。高分子季铵盐抗菌剂已经广泛应用于水处理、食品、医疗卫生和包装材料等领域。

虽然经过羧甲基和季铵化改性后的壳聚糖都在较宽的 pH 范围内有良好的水溶性^[44~45],但是这些衍生物在中性条件下就会丧失抑菌活性,这有可能是壳聚糖的抑菌性与氨基在酸性条件下发生质子化而携带正电荷有直接关系。

2.1.3 磺酸酯化壳聚糖 壳聚糖一般在 C₆-OH 改性得到磺酸酯化衍生物,磺酸酯化产物与肝素相似,已经有研究证明其具有抗凝血作用^[46~50]。而磺化壳聚糖的另一个生物活性就是抗菌性,由于壳聚糖磺化后会引入很多亲水基团,如一CH₂—O—SO₃H 和—NH—SO₃H,并且在磺化过程中,氯磺酸分解生成的盐酸会促进壳聚糖水解,导致分子量降低,所以磺化壳聚糖比羟乙基壳聚糖和 O-羧甲基壳聚糖具有更好的水溶性^[51]。试验结果显示,壳聚糖及其磺化衍生物随着溶液浓度增加,抑菌能力增强,对细菌、霉菌和酵母菌均有一定的直接抑制作用,不同的衍生物,其抑菌能力相差不大^[52]。

2.1.4 低分子量壳聚糖 将壳聚糖降解制备低分子量壳聚糖。降解方法主要包括酶降解法、酸水解法、氧化降解法、物理法等^[53~55]。研究人员^[56,57]研究了不同分子量的 α-壳聚糖的抑菌效果,实验结果表明 α-壳聚糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和产气荚膜杆菌等的生长都起了抑制作用,低分子量的 α-壳聚糖的抑菌效果优于高分子量的 α-壳聚糖。当分子量在 500~2000 之间时,高脱乙酰度的低分子量壳聚糖具有好的抑菌效果,对应不同的病原菌所需的有效壳聚糖浓度不同^[58]。覃彩芹^[59]用热量法来测量降解壳聚糖对金黄色葡萄球菌的抑菌作用,同时用平板法测水溶性壳聚糖抑制多种细菌的活性,结果表明 2% 浓度水溶性产物可以完全抑制这些细菌的生长。程国军^[60]用⁶⁰Co γ 射线辐照对壳聚糖作了降解,并引入羟丙基三甲基氯化铵对低分子量壳聚糖进行化学结构修饰,得到完全溶于水的壳聚糖季铵盐。抗菌研究表明,低分子量壳聚糖季铵盐对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌明显大于未降解的壳聚糖。冯小强^[61]对不同分子量壳聚糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌等六种常见的菌体的抑菌活性作了研究,发现低分子量壳聚糖抑菌活性强于高分子量壳聚糖。

2.1.5 酰化壳聚糖 酰化壳聚糖中的酰基破坏了壳聚糖分子内和分子间的氢键,改变了它们的晶态结构,提高了壳聚糖本身的水溶性,这对壳聚糖的抗菌功能起着十分重要的作用,说明通过引入酰基也可以改变壳聚糖的抗菌性能。Mohamed^[62]制备了 N,O-酰化壳聚糖,研究发现,酰化产物对真菌的抑制效果明显优于壳聚糖。Xing^[63]制备了 O-油酰化壳聚糖纳米粒子(OCNP),并研究其抗菌活性,结果表明 OCNP 对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌也有很好的抑菌效果。

酰化改性能够提高壳聚糖的抑菌活性,但改性后的酰化壳聚糖的水溶性还是远远达不到实际中的需求,很大程度地限制了其应用。为了增加酰化壳聚糖的水溶性,提高其抗菌活性,王朝^[64]先用 O-甲基化-N,N,N-三甲基壳聚糖季铵盐提高水溶性,再用己酰氯改性,得到 N,N,N-三甲基-O-己酰化壳聚糖季铵盐(TMHC)。抗菌实验表明,经过两次改性制备的己酰化壳聚糖季铵盐抗菌活性高于壳聚糖季铵盐,并且发现经过季铵化后,TMHC 的抗菌活性随着酰化度的提高而上升^[64,65]。

2.1.6 烷基化壳聚糖 壳聚糖的烷基化衍生物主要针对 2-NH₂ 进行烷基化修饰^[66,67]。当壳聚糖引入烷基后,分子间的氢键作用被显著减弱,抗菌性大大改善。王爱勤^[28]用卤代烷与壳聚糖反应,制备了具不同长度烷基取代基的壳聚糖衍生物,结果发现,烷基取代基的引入削弱了壳聚糖分子间的氢键作用,可改善其溶解性能,随着烷基取代基的增长,抗菌性增加。因为长链脂肪族的取代基通过疏水作用与细胞壁上的蛋白质相互作用,加强了聚合物对微生物细胞的吸附^[68]。

Yang^[69,70]研究发现,经小分子的烷基化修饰壳聚糖水溶性增加,中性条件下对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性显著高于壳聚糖。由于小分子疏水性基团的引入提高了壳聚糖对细胞膜通透性作用,为壳聚糖抑菌衍生物分子设计提供了新的思路。过多的烷基化,由于导入疏水的烷基链过多,就会导致

壳聚糖衍生物更难溶于水。

对壳聚糖 2-NH₂ 烷基化取代,取代少了,没有完全破坏结晶结构,不易溶于水;取代多了,形成规整结构,又容易结晶,也不溶于水。必须将它的脱乙酰度控制在 50%~60%。烷基化壳聚糖是壳聚糖改性常用的方法之一,可通过在壳聚糖分子上先引入烷烃,再将它做一些亲水性的改性,作为一种两性性衍生物,从而提高其水溶性。研究发现,芳化季铵化壳聚糖对大肠杆菌的抗菌活性略有增强。抗菌性结果表明,与亲水基团相比,疏水取代基(如 *N*-苄基)的存在增强了产物的抗菌活性^[71~73]。因为壳聚糖的分子内和分子间作用力非常强,反应要求条件较苛刻,所以壳聚糖烷基改性工作研究还需要进一步深入。

2.2 壳聚糖及其衍生物抗菌作用机理

壳聚糖及其衍生物具有广谱的抗菌性^[74~78]。研究人员^[51,79~83]已对它的抗菌机理进行了大量研究,初步推测壳聚糖的抗菌机理有以下三种可能。

第一种观点是认为壳聚糖的抑菌作用主要源于壳聚糖 C-2 位上的氨基,在 pH<6 时带正电荷,而细菌的细胞带负电荷,正负电荷的相互作用,改变了细胞的通透性,使壳聚糖在细菌细胞表面形成一层高分子膜,从而阻碍了细菌获取养分的通道,如图 7 所示。Liu^[84]通过壳聚糖醋酸盐和 AAPDB 复合物对大肠杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等菌体的抗菌活性的研究,认为带正电性的大分子壳聚糖覆盖在微生物表面会形成一层致密膜,封闭了菌体表面的营养物质或代谢废物交换的通道,进而抑制了菌体生长。Kanatt^[85]通过壳聚糖与葡萄糖络合物对大肠杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌等菌体研究,认为壳聚糖分子的正电荷和细菌细胞膜上负电荷的相互作用,使细胞内蛋白酶和其它成分泄漏,从而达到抗菌的作用。

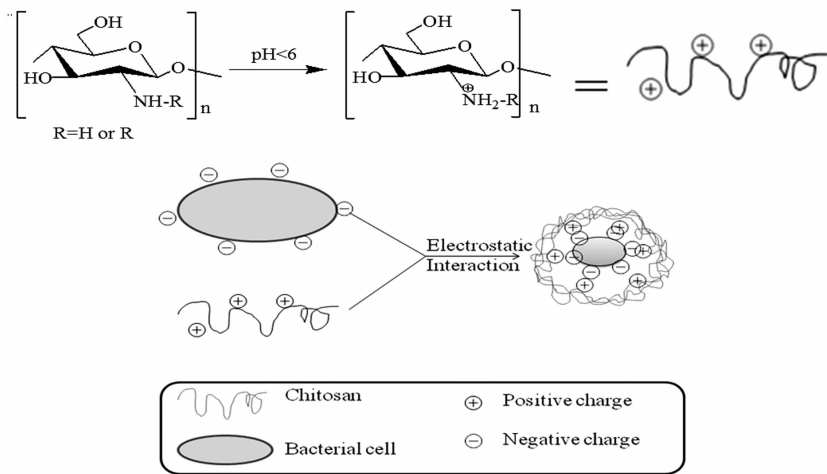


图 7 壳聚糖的抑菌机理一

Figure 7 The process of chitosan antibacterial mechanism (first point)

第二种观点是认为低分子量的壳聚糖分子侵入到微生物细胞内,阻碍了微生物的遗传密码由 DNA 向 RNA 的转录,扰乱了细胞正常的生理活动,从而阻碍了微生物的繁殖,最终起到抗菌的目的^[86],具体途径如图 8 所示。刘晓非^[87]做了大肠杆菌体内转化实验,结果表明,低分子量壳聚糖可以侵入细胞内部,不仅可以通过与 DNA 结合而使之不能转化,而且还可以直接阻碍正常质粒 DNA 向大肠杆菌的转化过程。Helander 等^[88]对壳聚糖与以植物水解酶为宿主的真菌病原体间的作用做了研究,发现壳聚糖可渗透进真菌细胞核内,通过影响 RNA 和蛋白质的合成,抑制真菌的生长。

第三种观点是壳聚糖及其衍生物分子中有一-OH 和一-NH₂,从构象上看,它们都是平伏键,在一定的 pH 值条件下,这种特殊结构使它们对一定离子半径的金属离子具有螯合作用。具体途径如图 9 所示。壳聚糖能螯合细菌生长所必需的金属元素如锌,从而抑制其生长^[89,90]。这种机制更适用于解释壳聚糖在

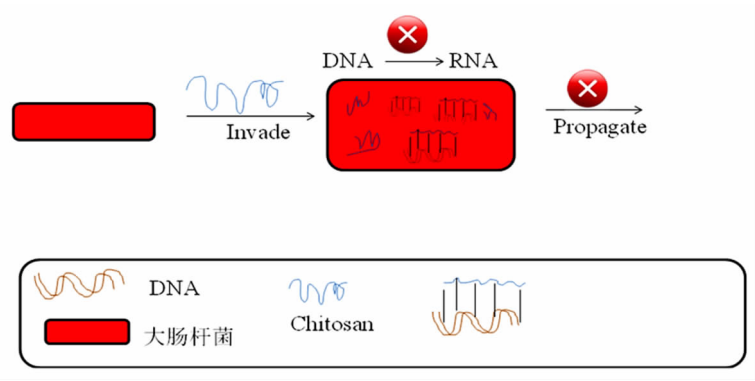


图 8 壳聚糖的抑菌机理二

Figure 8 The process of chitosan antibacterial mechanism (second point)

高 pH 值条件下的抑菌活性。高 pH 下,未发生质子化的氨基以及脱质子化的羟基上都有未共用电子,可作为金属离子的电子供体。金属离子作为电子受体,连接一条或多条壳聚糖,形成复合物,附着在细胞表面,阻断营养物质的进出细胞,最终导致微生物死亡^[91]。Cuero^[92]认为,由于壳聚糖分子内含有丰富的羟基和氨基,可以作为螯合剂选择性地螯合微量金属,从而抑制毒素的产生和微生物的生长。Chung 等^[93]将壳聚糖的抗菌作用模式与 EDTA 进行比较,壳聚糖表现出相似的络合抗菌机制。

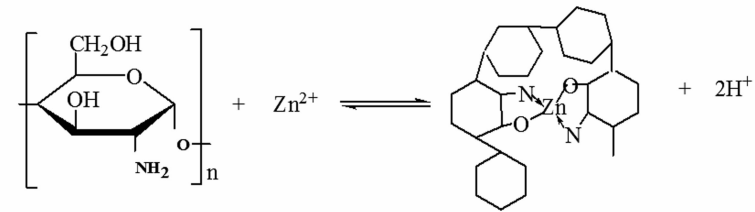


图 9 壳聚糖螯合 Zn^{2+} 的过程

Figure 9 The process of chitosan chelate Zn^{2+}

3 影响壳聚糖及其衍生物抗菌性能的主要因素

壳聚糖的抗菌性主要受到内在因素(M_w 、DD、浓度)和环境因素(介质的 pH 值、温度)的影响。

3.1 分子量的影响

壳聚糖的抗菌活性与其分子量(M_w)有很大关系,不同分子量的壳聚糖对于细菌的抑制活性机制不同,整体上抑菌活性随分子量的升高而呈降低趋势。低分子量的壳聚糖抗菌活性主要是由于其分子量较小,可以侵入到微生物细胞内,扰乱了微生物细胞的正常的代谢,从而达到抗菌目的。高分子量的壳聚糖抗菌活性主要是壳聚糖分子的有效基团 $-\text{NH}_2$ 被包埋,且壳聚糖具有成膜性,会降低对菌体的吸附及杀菌能力。陈威等^[94]提出,不同分子量的壳聚糖对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌都具有较好的抑菌效果,然而大分子量的壳聚糖引起钾离子和 ATP 的渗漏大约比小分子量壳聚糖多 2 到 4 倍,这也说明小分子量壳聚糖与大分子量壳聚糖很可能存在不同的抑菌机制。夏文水^[95]对几种不同平均分子量的低聚壳聚糖的抑菌性进行了研究,壳聚糖最低分子量为 1500 抑菌效果最强,随着分子量上升,抑菌效果逐渐下降。但是 Jeon^[96]却发现,高聚壳聚糖比低聚壳聚糖对细菌的生长具有更高的抑制作用。从目前大量关于壳聚糖分子量对抑菌活性影响的研究中,可看出大家的研究看法有很大不同,仍然没有统一的结论,这也可能与壳聚糖来源及生产过程没有标准化有关。因此,这需要对不同来源、不同分子量的壳聚糖进行多角度的全面分析,分子量大小对抗菌活性机理影响的研究需要进一步深入。

3.2 脱乙酰度(DD)的影响

脱乙酰度(DD)对壳聚糖抗菌性有很大的影响。当 *N*-脱乙酰度为 40%~50% 时,在任意 pH 条件下,壳聚糖都可溶于水^[97],相应抗菌性也较好。*N*-脱乙酰度为 70%~95%,壳聚糖抗菌活性与壳聚糖脱乙酰化度成正线性关系。Gerasimenko^[98] 也指出,当 *N*-脱乙酰度为 55%~85% 时,脱乙酰度越高,壳聚糖的抗菌活性越强。韩婧^[99] 认为 DD 越高,壳聚糖 C-2 位上的氨基—NH₂ 数目越多,壳聚糖的抗菌性就会越强。脱乙酰度增加意味着壳聚糖中游离氨基增加,其结果是在酸性条件下壳聚糖质子化氨基数量增加,并能够完全溶于水中,导致了壳聚糖与微生物带负电细胞壁之间相互作用的机会增多。

3.3 壳聚糖浓度的影响

壳聚糖的浓度是影响壳聚糖抗菌性的另一主要因素。大部分研究人员认为,壳聚糖抗菌性来源于 C-2 位上的氨基,抗菌性随着壳聚糖浓度的增加而增加。当壳聚糖浓度增加,氨基的数目随之增加,在一定的条件下,—NH₂ 与微生物细胞发生静电作用,达到抗菌的目的。但是,Sudarshan^[100] 认为适当低浓度的壳聚糖的抑菌能力最强。因为适当低浓度的壳聚糖可以中和细菌细胞表面所带的负电荷,使细菌细胞胶合在一起,而高浓度的壳聚糖可能使细菌表面带一定数量的正电荷,从而使细菌处于悬浮状态,不能起到杀菌作用。可见浓度对抗菌活性的影响还是存在争议的,所以需要更多的实验研究资料支持。

3.4 pH 和温度的影响

壳聚糖的抑菌性受 pH 值影响很大。pH 值大于 7 时,壳聚糖 C-2 位上带正电荷的—NH₂ 质子化程度和壳聚糖的溶解性降低,抗菌活性减弱^[100]。吴远根^[101] 研究发现,壳聚糖在 pH=5.5~6.0 左右能够发挥最强的抑菌作用;pH<5.0 时即使不加壳聚糖,细菌的生长也会受到抑制;而 pH>6.0 时,壳聚糖的溶解度大大降低,此时壳聚糖很难发挥较强的抑菌作用。

壳聚糖的抑菌性也受温度的影响,在一定的温度范围内,随着温度的升高,抗菌活性增强。在相对较低的温度,可能使壳聚糖在细菌表面的相互作用位点减少,改变了细菌表面的结构,降低了壳聚糖和细菌的反应速率。

4 展望

虽然壳聚糖来源十分丰富,但是由于壳聚糖溶解性的问题和壳聚糖产品质量不统一问题,极大地限制了壳聚糖的广泛应用。基于以上综述情况我们认为,壳聚糖的改性和应用研究需要更多的研究资料支持。

在壳聚糖水溶性改性方面,可以通过在壳聚糖中引入疏水性的官能团,增加壳聚糖分子与细菌细胞壁的相互作用,为壳聚糖衍生物在抗菌方面的应用提供新的改性方法。另外,通过多次不同类型的改性,以达到增加溶解性,提高抗菌作用的改性研究可能是未来研究的方向之一。如先季铵化改性,再酰化。在壳聚糖抗菌活性研究方面,除了通过对壳聚糖改性来提高其抗菌活性之外,通过提高电荷浓度或引入其它抑菌基团的方法来提高抗菌活性的研究思路,既能丰富壳聚糖衍生物体系,又能为其作为抗菌剂的研究提供了更多的可能性。

在壳聚糖及其衍生物抗菌机理研究方面,由于壳聚糖衍生物的抗菌机理目前尚未有定论,在实际中壳聚糖衍生物的抗菌性并不仅仅是以上对抗菌机理猜测的那么简单。因此,需要借助各种化学及生物学手段获取更多的壳聚糖分子结构与抑菌活性关系的信息,进一步阐明壳聚糖的抑菌机理,这也需要更深入的研究。

总之,具有抗菌活性的壳聚糖及其衍生物,已经被广泛地应用在医药、农业及纺织等领域中,如人工皮肤、手术缝合线、药用辅料、抗凝血剂、植物病害抑制剂、植物生长抑制剂和纺织品整理剂等等。随着人们对壳聚糖及其衍生物的不断深入研究和功能开发,它所具有的无毒及生物相容性等优势必将使它在抗菌剂方面得到更广泛的应用。

参考文献:

- [1] Baldrick P. Regul Toxicol Pharm, 2010, 56(3): 290~299.
- [2] Molinaro G, Leroux J C, Damas J, Adam A. Biomaterials, 2002, 23(13): 2717~2722.
- [3] Huo M, Zhang Y, Zhou J, Zou A, Li J. Carbohydr Polym, 2011, 83(4): 1959~1969.
- [4] Zhou B, Hu Y, Li J, li B. Int J Biol Macromole, 2014, 64(2):402~408.
- [5] Burkatovskaya M, Tegos G P, Swietlik E, Demidova T N, Castano A P, Hamblin M R. Biomaterials, 2006, 27(22):4157.
- [6] Pattnaik S, Nethala S, Tripathi A, Saravanan S, Moorthi A, Selvamurugan N. Int J Biol Macromol, 2011,49:1167~1172.
- [7] Lee K Y, Wan S H, Park W H. Biomaterials, 1995, 16(16): 1211~1216.
- [8] 王浩. 发酵科技通讯, 2015, 44(1):58~61.
- [9] Landriscina A, Rosen J, Friedman A J. Nanomedicine, 2015, 10(10):1609~1619.
- [10] Riva R, Ragelle H, Rieux A D, Duhem N, Jérôme C, Préat V. Adv Polym Sci, 2011, 244(1):19~44.
- [11] 李东华, 王鸿, 颜剑波, 熊文说, 易喻, 梅建凤, 应国清. 亚太传统医药, 2010, 6(4):143~147.
- [12] Santos J C C, Mansur A A P, Mansur H S. Molecules, 2013, 18(6):6550~72.
- [13] 谭敏. 磺化壳聚糖改性硅基材制备生物功能材料. 苏州:苏州大学硕士学位论文, 2014.
- [14] Azuma K, Ifuku S, Osaki T, Okamoto Y, Minami S. J Biomed Nanotechnol, 2014, 10(10):2891.
- [15] Li P, Zhao J, Chen Y, Cheng B, Yu Z Y, Zhao Y, Yan X T, Tong Z G, Jin S H. Carbohydr Polym, 2016.
- [16] Hu Y, Du Y, Yang J H, Tang Y F, Li J, Wang X Y. Polym, 2007, 48(11):3098~3106.
- [17] Jayakumar R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. Int J Biol Macromol, 2007, 40(3):175~181.
- [18] Suginta W, Khunkaewla P, Schulte A. Chem Rev, 2013, 113(7):5458~79.
- [19] Terbojevich M, Carraro C, Cosani A, Foher B, Naggi A M, Torri G. Macromol Chem Phys, 1989, 190(11):2847~2855.
- [20] 王聪, 王远红, 刘潇潇, 孟适秋, 吕志华. 中国海洋大学学报自然科学版, 2011, 40(S1):356~358.
- [21] 黄攀. N-羧甲基壳聚糖的制备及其生物相容性评价. 青岛:中国海洋大学硕士学位论文, 2009.
- [22] Muzzarelli R A A, Tanfani F, Emanuelli M, Mariotti S. Carbohydr Res,1982, 107(2):199~214.
- [23] 宋舒苹, 郑雪, 余颖, 张浩, 蒲俊文, 吕卫军. 西南林业大学学报, 2013, 33(1):105~108.
- [24] Chen L, Du Y, Zeng X. Carbohydr Res, 2003, 338(4):333~340.
- [25] 刘振儒, 赵江霞. 青岛科技大学学报:自然科学版, 2006, 27(6):509~511.
- [26] Sang-Hoon Lim, Samuel M. Hudson. Carbohydr Res, 2014, 339(36):3572~3580.
- [27] 许晨, 易瑞灶, 卢灿辉. 中国海洋药物, 2000, 19(2):28~31.
- [28] 王爱勤, 俞贤达. 功能高分子学报, 1998(1):83~86.
- [29] 李方, 刘文广, 薛涛, 姚康德. 化学工业与工程, 2002, 19(4):281~285.
- [30] 裴立军, 蔡照胜, 商士斌, 宋湛谦. 化学试剂, 2013, 35(10):897~903.
- [31] 王旭颖, 董安康, 林强. 化学世界, 2010, 51(6):370~374.
- [32] Cooney M J, Petermann J, Lau C, Minter S D. Carbohydr Polym, 2009,75(3), 428~435.
- [33] Zhang C, Qu G, Sun Y, Wu X L, Yao Z, Guo Q L, Ding Q L, Yuan S T, Shen Z L, Ping Q E, Zhou H P. Biomaterials, 2008, 29(9):1233~1241.
- [34] 辛梅华, 李明春, 兰心仁. 应用化学, 2005, 22(12):1357~1359.
- [35] Kurita K, Yoshino H, Nishimura S I, Ishii S. Carbohydr Polym, 1993, 20(20):239~245.
- [36] 赵丽瑞, 孙多先, 刘满英. 高分子通报, 2007(8):43~47.
- [37] 李治, 刘晓非, 管云林. 日用化学工业, 2000, 30(3):10~11.
- [38] 苏云, 孙艳辉, 刘克忠, 王果. 滁州学院学报, 2009, 11(6):116~117.
- [39] Xiao F L, Yun L G, Dong Z Y, Li Z, Yao K D. J Appl Polym Sci, 2001, 79(7):1324~1335.
- [40] 陈燕燕. 含海因壳聚糖衍生物的制备及其抗菌性能研究. 泉州:华侨大学硕士学位论文, 2014.
- [41] Mourya V K, Inamdar N N. React Funct Polym, 2008, 68(6):1013~1051.
- [42] 李淑荣. 信阳师范学院学报:自然科学版, 2008, 21(4):509~511.
- [43] Wiarachai O, Thongchul N, Kiatkamjornwong S, Hoven V P. Colloid Surface B, 2012, 92(92), 121~129.
- [44] Anitha A, Rani V V D, Krishna R, Sreeja V, Selvamurugan N, Nair S V, et al. Carbohydr Polym, 2009, 78(4):672~677.
- [45] Zhong Z, Li P, Xing R, Liu S. Int J Biol Macromol, 2009, 45(2):163~168.
- [46] 张虹. 壳聚糖的改性及其抗凝血活性研究. 芜湖:安徽工程大学硕士学位论文, 2014.

- [47] Zhong Z, Ji X, Xing R, Liu S, Guo Z Y, Chen X L, Li P C. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(11):3775~3782.
- [48] Vikhoreva G, Bannikova G, Stolbushkina P, Panov A, Drozd N, Makarov V, Varlamov V, Gal'braikh L. *Carbohydr Polym*, 2005, 62(4):327~332.
- [49] 刘少华, 刘安军, 范艳丽. 现代食品科技, 2010, 26(6):594~597.
- [50] 丁开国. 定位磺化壳聚糖生物活性的研究. 苏州:苏州大学硕士学位论文, 2015.
- [51] 李松晔. 水溶性壳聚糖衍生物的合成与抗菌机理研究. 天津:天津大学硕士学位论文, 2004.
- [52] 黎碧娜, 王奎兰, 吴勇, 王霞. 香料香精化妆品, 2003(1):16~18.
- [53] 朱孔营, 渠荣遴, 李方. 高分子通报, 2006(2):41~45.
- [54] 苏庆席. 壳聚糖降解、抑菌性能及其机理的初步研究. 青岛:青岛科技大学硕士学位论文, 2015.
- [55] 王喆. 低分子量壳聚糖的制备. 长春:长春工业大学硕士学位论文, 2011.
- [56] 宋献周, 沈月新. 上海海洋大学学报, 2000, 9(2):138~141.
- [57] Qian B, Jung J, Zhao Y. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 175(6):2972~2985.
- [58] 胡健, 姜涌明, 殷士学. 扬州大学学报:自然科学版, 2000, 3(2):42~44.
- [59] 覃彩芹, 杜予民, 刘义, 肖玲. 湖北工程学院学报, 2001, 21(6):9~13.
- [60] 程国君, 陈水平, 吴国忠, 林宝凤, 钟磊. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, 25(3):137~140.
- [61] 冯小强, 杨声, 李小芳, 付国庆, 王廷璞, 苏中兴. 天然产物研究与开发, 2008, 20(2), 146~149
- [62] Badawy M E I, Rabea E I, Rogge T M, Stevens C V, Smagghe G, Steurbaut W, Höfte M. *Biomacromolecules*, 2004, 5(2): 589-595.
- [63] Ke X, Xi G C, Ming K, Liu C S, Dong S C, Park H J. *Carbohydr Polym*, 2009, 76(1):17~22.
- [64] 王朝, 辛梅华, 李明春, 林水森. 功能材料, 2013, 44(15):2148~2151.
- [65] Li Z, Yang F, Yang R. *J Appl Polym Sci*, 2015, 132(43).
- [66] 周天(鐸), 唐文琼, 沈青. 高分子通报, 2008(11):54~65.
- [67] Sahariah P, Sigurjonsson O E, Sørensen K K, Thygesen M B, Jensen K J, Másson M. *Biomacromolecules*, 2015, 16(5), 1449.
- [68] Tikhonov V E, Stepnova E A, Babak V G, Yamskov I A, Palma-Guerrero J, Jansson H B, et al. *Carbohydr Polym*, 2012, 64(1): 66~72.
- [69] Yang T C, Chou C C, Li C F. *Int J Food Microbiol*, 2005, 97(3):237~245.
- [70] Yang T C, Chou C C, Li C F. *Food Res Int*, 2002, 35(8):707~713.
- [71] Sajomsang W, Tantayanon S, Tangpasuthadol V, Daly W H. *Carbohydr Polym*, 2008, 72(4):740~750.
- [72] Wiaracha O, Thongchul N, Kiatkamjornwong S, Hoven V P. *Colloids Surf B*, 2012, 92, 121~129.
- [73] Sajomsang W, Gonil P, Saesoo S. *Eur Polym J*, 2009, 45(8):2319~2328.
- [74] 林水森, 李明春, 辛梅华, 王朝. 化学通报, 2014, 77(3): 220~226.
- [75] Raafat D, Sahl H G. *Microb Biotechnol*, 2009, 2(2):186~201.
- [76] 何乃普, 宋鹏飞, 王荣民, 张慧, 王云普. 高分子通报, 2004(3):14~18.
- [77] Zhong Z, Li P, Xing R, Liu S. *Int J Biol Macromol*, 2009, 45(2):163~168.
- [78] Ong S Y, Wu J, Mochhala S M, Tan M H, Lu J. *Biomaterials*, 2008, 29(32):4323~4332.
- [79] Coma V, Martialgros A, Garreau S, Copinet A, Salin F, Deschamps A. *J Food Sci*, 2002, 67(3), 1162~1169.
- [81] Du W L, Xu Y L, Xu Z R, Fan C L. *Nanotechnology*, 2008, 19(88):3155-3156
- [82] 李明春, 许涛, 辛梅华. 化工进展, 2011, 30(1):203~209.
- [83] Qin C, Li H, Qi X, Liu Y, Zhu J, Du Y. *Carbohydr Polym*, 2006, 63(3):367~374.
- [84] Liu H, Du Y, Yang J, Zhu H. *Carbohydr Polym*, 2004, 55(3):291~297.
- [85] Kanatt S R, Chander R, Sharma A. *Food Chem*, 2008, 106(2):521~528.
- [86] Liu X, Song L, Li L, Li S, Yao K. *J Appl Polym Sci*, 2007, 103(6):3521~3528.
- [87] 刘晓非, 李琳, 宋琳, 肖梅. 应用化学, 2007, 24(8):893~898.
- [88] Helander I M, Nurmiaho-Lassila E L, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. *Int J Food Microbiol*, 2002, 71(2/3):235~244.
- [89] Mayanar R, Ngah W S W, Endud C S. *React Funct Polym*, 2002, 50(2):181~190.
- [90] Du W L, Niu S S, Xu Y L, Xu Z R, Fan C. *Carbohydr Polym*, 2009, 75(3): 385~389.
- [91] Goy R C, Britto D D, Assis O B G. *Polímeros*, 2009, 19(3):241~247.
- [92] Osuji G, Washington A. *Biotechnol Lett*, 1991, 13(6):441~444.
- [93] Chung Y C, Chen C Y. *Bioresour Technol*, 2008, 99(8):2806~2814.
- [94] 陈威, 吴清平, 张菊梅, 吴慧清. 微生物学报, 2008, 48(2):164~168.

[95] 夏文水, 吴焱楠. 无锡轻工大学学报:食品与生物技术, 1996(4):297~302.

[96] Jeon Y J, Park P J, Kim S K. Carbohydr Polym, 2001, 44(1):71~76.

[97] Kubota N, Tatsumoto N, Sano T, Toya K. Carbohydr Res, 2000, 324(4):268~274.

[98] Gerasimenko D V, Avdienko I D, Bannikova G E, Zueva O Y, Varlamov V P. Appli Biochem Microbiol. 2004, 40(3):253~257.

[99] 韩婧. 壳聚糖及其衍生物作为药物控释载体和支架材料的研究. 北京:北京化工大学硕士学位论文, 2011.

[100] N. R. Sudarshan, D. G. Hoover, D. Knorr. Food Biotechnol, 2009, 6(3):257~272.

[101] 吴远根, 叶丹, 邱树毅, 王啸, 王朝宇. 贵州工业大学学报:自然科学版, 2005, 34(1):52~55.

Research Development of Chitosan and its Derivatives in Antibacterial Activity

XUE Jin-ling, LI Jian-jun, BAI Yan-hong, XU Zhao*
(School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract:Chitosan is the only alkaline polysaccharide found in nature, due to its natural sources rich, biocompatibility, biodegradability, non-toxic, antibacterial strong and other good properties. Now, its broad-spectrum antibacterial has been widely recognized, but it’s further application is limited because of its sparingly solubility in water. Therefore, chitosan derivatives has been one of the hot spots in the research of chitosan, which has been modified by some modification methods to improve its solubility. In this paper, several common hydrophilic chitosan modification methods and application of its derivatives in antibacterial fields were reviewed, which could provide the reference in the further activity study of chitosan.

Key words:Chitosan derivatives; Water solubility; Antibacterial activity