

# 黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌的 抑菌性能研究

孙 涛,周可鹏,谢 晶,薛 斌,邵则淮

(上海海洋大学食品学院,上海市临港新城沪城环路 999 号,上海 201306)

**摘 要:**碱性条件下对黄原胶进行氧化降解,透析得到三种黄原胶寡糖(XGO-A, XGO-B 和 XGO-C),对产物进行 FT-IR 表征, GPC 法测定其分子量分别为 3600、7500 和 10100。三种黄原胶寡糖的丙酮酸含量分别为 5.7%、5.3% 和 4.8%;还原糖含量分别为 23.7%、22.5% 和 21.1%。采用琼脂平板打孔法、最低抑菌浓度以及生长曲线方法,考察了三种黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌的抑菌能力;同时检测了三种寡糖对野油菜黄单胞菌细胞膜通透性的影响。结果表明,分子量为 7500 的 XGO-B 具有更好的抑菌性能。而当丙酮酸和还原糖含量相近时,对野油菜黄单胞菌的抑菌性能可能与黄原胶寡糖的分子量有关;随着分子量的上升,寡糖对野油菜黄单胞菌细胞膜破坏增强,这表明破坏细胞膜通透性是抑菌机理之一。

**关键词:**黄原胶,氧化降解,抑菌性

## Antibacterial activities of Xanthan Oligosaccharides against *Xanthomonas campestris*

SUN Tao, ZHOU Ke-peng, XIE Jing, XUE Bin, SHAO Ze-huai

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Three xanthan oligosaccharides (XGO-A, XGO-B and XGO-C) were prepared by oxidative degradation in alkaline condition. The products were characterized by FT-IR, and the molecular weights of the products determined by GPC method were 3600, 7500 and 10100, respectively. The pyruvate acid contents of the three xanthan oligosaccharides were 5.7%, 5.3% and 4.8%, respectively, and reducing sugar contents were 23.7%, 22.5% and 21.1%, respectively. The antibacterial activity of three xanthan oligosaccharides against the *X. campestris* was investigated by the inhibition zone, minimal inhibitory concentration (MIC) and the influence on the growth of *X. campestris*. Effects of xanthan oligosaccharides on electric conductivity of liquid medium of *X. campestris* were also determined. The results indicated that XGO-B exhibited higher antibacterial activity than XGO-A and XGO-C. It meant that the antibacterial effect of xanthan oligosaccharides may be related to their molecular weight. The effect of xanthan oligosaccharides on the cell membrane permeability of *X. campestris* became stronger when the molecular weight of xanthan oligosaccharides increased. It indicated that the damage of cell membrane of *X. campestris* is one of the antibacterial mechanisms to *X. campestris*.

**Key words:** xanthan; oxidative degradation; antibacterial activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)09-0091-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.09.010

黄原胶,又称单胞多糖,是一种由野油菜黄单胞菌(*X.campestris*)分泌的胞外多糖,由 D-葡萄糖、D-甘露糖、D-葡萄糖醛酸、乙酸、丙酮酸组成的“五糖重复单元”构成<sup>[1]</sup>。由于黄原胶分子之间靠氢键作用而形成规则螺旋和保护,使得黄原胶的官能团被包围在内部,只有水溶性较好的低分子量黄原胶才会表现出一些生物活性。黄单胞菌属是植物病原

菌,危害一百多种单子叶植物和数百种双子叶植物。其中野油菜黄单胞菌是引起十字花科植物黑腐病的重要病原菌,会严重影响甘蓝、白菜、花椰菜、芥菜和萝卜等植物的产量和质量,对蔬菜产业影响重大<sup>[2-3]</sup>。酶降解得到的黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌具有较好的抑制能力,其效果与粘度与还原糖比值有关<sup>[4-5]</sup>。化学降解是赋予多糖生物活性的重要手段,研究表明,碱性条件下氧化降解的黄原胶寡糖具有较好的抗氧化能力<sup>[6]</sup>,但是其抑菌性能及机理的研究罕见报道。

本文将黄原胶在碱性条件下进行氧化降解,得到了还原糖与丙酮酸含量相近,分子量不同的三种

收稿日期: 2013-09-22

作者简介: 孙涛(1970-),女,博士,副教授,研究方向:天然多糖。

基金项目:“十二五”国家支撑计划项目(2012BAD38B04);上海海洋大学研究生科研基金资助。

黄原胶寡糖,并考察了三种寡糖对野油菜黄单胞菌的抑制作用,以及对野油菜黄单胞菌细胞膜通透性的影响,为了解黄原胶寡糖抑菌机理提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

黄原胶 食品级,上海联合食品添加剂有限公司;野油菜黄单胞菌 上海海洋大学食品学院提供,其它试剂为分析纯。

YXQ-SG46-280S 型手提式压力蒸汽灭菌锅 上海博迅实业有限公司;SW-CJ-1F 型净化工作台 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;THZ-82N 型台式恒温振荡器 上海跃进医疗器械厂;PYX-DHS-40X50BS 型隔水式电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂;DELTA-320-S 型 pH 计 梅特勒-托利多仪器上海有限公司;WFZ UV2000 型紫外分光光度计 上海合利仪器有限公司;METTLER AE200 型电子分析天平;DDSJ-308A 型电导率仪 上海仪电科学仪器股份有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 黄原胶降解产物制备 将 30g 黄原胶(XG)溶于 1600mL 的 pH 为 12.0 的水中,并向其中加入 50mL 30%  $H_2O_2$ ,于 80℃ 下降解 5d 直至由胶状变为溶液,冷却,用 0.1mol/L HCl 调节溶液 pH 至 7.0,先通过微孔过滤器(0.45 $\mu$ m),然后在蒸馏水中透析(3500,7000,14000)6d,冷冻干燥后分别得到三种黄原胶寡糖均约 1.0g<sup>[7]</sup>。

1.2.2 测试表征 红外光谱在 EQUINOX55 傅里叶红外-拉曼光谱仪上进行,采用 KBr 压片法制样,测定波数范围为 400~4000 $cm^{-1}$ ,分辨率为 0.8 $cm^{-1}$ 。采用 GPC 法测定黄原胶降解产物的相对分子质量及其分布。GPC 测试条件如下:柱子:TOSOH BIOSEP G4000SWXL;流动相:0.2mol/L 醋酸钠溶液;色谱仪:Waters 515 型凝胶色谱仪;检测器:Waters 2410 示差折光检测器;进样量:50 $\mu$ L;柱温:40℃。标准物质:葡聚糖,分子量分别为 473000、188000、76900、43200、10500<sup>[8]</sup>。

采用紫外分光光度法,在波长条件为 320nm 下对黄原胶降解产物的丙酮酸含量进行测定<sup>[9]</sup>。采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定黄原胶降解产物中还原糖的含量<sup>[10]</sup>。

1.2.3 琼脂平板打孔法测定抑菌作用 抑菌圈法是衡量抑菌剂效果的一种方式,通过抑菌剂在琼脂平板上的扩散能力来初步定性或半定量抑菌效果。用接种环挑取少许野油菜黄单胞菌菌体于 20mL 胰蛋白胨大豆肉汤培养基中,37℃,200r/min 摇床培养 12h。稀释至终浓度  $10^6$ CFU/mL 左右的菌悬液,备用。

向平板中倾注 15~20mL 的营养琼脂培养基,并摇匀。待凝固后加入 0.1mL 菌悬液,用无菌涂布棒涂布均匀,静置片刻,然后在平皿中用无菌 6mm 牛津杯打孔,并用无菌牙签挑出多余培养基,分别吸取 0.2mL 两种浓度(10.00,5.00g/L)的三种分子量的无菌黄原胶寡糖注入已打好的孔中。于 37℃ 下培养 24h,测量抑菌圈大小。以 2.00g/L 的头孢曲松钠作

阳性对照,无菌水做空白对照,平行实验 3 次。将菌悬液稀释 10 倍,重复以上步骤<sup>[11]</sup>。

1.2.4 最低抑菌浓度(MIC)的测定 配制胰蛋白胨大豆肉汤液体培养基,121℃ 高压灭菌。利用胰蛋白胨大豆肉汤进行平板连续稀释得头孢曲松钠、XGO-A、XGO-B、XGO-C 的浓度分别为 10.00、7.50、5.00、2.50、1.25、1.00g/L,然后在每一系列平板培养基中接种野油菜黄单胞菌,每个浓度三次平行,并置于 37℃ 下培养 24h,之后观察生长情况。将平板利用划线法接种、培养,观察各实验菌的生长情况,以平板中没有细菌生长的最低浓度即为最低抑菌浓度 MIC<sup>[12]</sup>。

1.2.5 生长曲线测定 将活化后菌落总数为  $10^6$ CFU/mL 的野油菜黄单胞菌液以 3% 接种量接入含有 2.50g/L 黄原胶寡糖的胰蛋白胨大豆肉汤培养基中,分装试管,分别在 0、3、6、9、12、15、18、21h 测定溶液 OD<sub>600</sub> 的值<sup>[13]</sup>。

1.2.6 黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌细胞膜通透性的影响 取菌落总数为  $10^6$ CFU/mL 的野油菜黄单胞菌液 5mL 与等体积浓度为 5g/L 的黄原胶寡糖溶液混合,使三种黄原胶寡糖浓度达到 2.50g/L,于 37℃、150r/min 条件下振荡培养。分别在 0、20、40、60、80、100、120、140、180min 时取样,测定培养液的电导率值,对照组用无菌水代替黄原胶寡糖溶液<sup>[14]</sup>。

1.2.7 数据分析 采用 OriginPro 8 作图,并用 SPSS 20.0 对数据进行分析( $n=3, p<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 原料黄原胶及其寡糖的结构表征

图 1 是原料黄原胶 XG 以及寡糖 XGO-A 的红外光谱图,另外两种寡糖的红外图谱与 XGO-A 相仿。由图可知,碱性条件下氧化降解得到的寡糖保留了黄原胶的特征吸收峰,即 2920 $cm^{-1}$ 处  $-CH_2$  伸缩振动吸收峰;1623 $cm^{-1}$ 处丙酮酸酯中  $-C=O$  伸缩振动吸收峰;1418 $cm^{-1}$ 处羧酸盐中  $-C-O$  伸缩振动吸收峰及 894 $cm^{-1}$ 处  $\beta$ -吡喃糖环中 C1-H 弯曲振动吸收峰,这表明降解后的黄原胶基本结构单元未被破坏。XG 的  $-OH$  伸缩振动吸收峰出现在 3436 $cm^{-1}$ 处,而寡糖的伸缩振动吸收峰出现在 3410 $cm^{-1}$ 处,表明降解后的黄原胶寡糖形成了更多的分子内或分子间氢键,这可能是由于降解使得更多羟基暴露出来<sup>[15]</sup>。

GPC 测试结果表明:三种黄原胶寡糖 XGO-A、XGO-B 和 XGO-C 相对分子质量分别为 3600、7500 和 10100。三种黄原胶寡糖 XGO-A、XGO-B 以及 XGO-C 的丙酮酸含量分别为 5.7%、5.3% 和 4.8%;还原糖含量分别为 23.7%、22.5% 和 21.1%。

### 2.2 黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌的抑菌效果

三种黄原胶寡糖的抑菌圈结果见表 1。在菌悬液原液及其 10 倍稀释液中,随着寡糖的浓度增加,其作用的抑菌圈直径也增大;当三种寡糖浓度均为 10.00g/L 时,在菌悬液原液中,XGO-A、XGO-B 和 XGO-C 的抑菌圈直径分别为 10.0、20.2 和 14.3mm,即分子量为 7500 的 XGO-B 的抑菌圈最大,抑菌效果最好,而 XGO-A 的抑菌效果最差。当寡糖浓度均为 5.00g/L 或是菌液浓度为 10 倍稀释液时,抑菌效

表1 黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌的抑菌效果  
Table 1 The inhibitory effect of xanthan oligosaccharides on *X.campestris*

抑菌剂	抑菌圈直径 (mm)			
	菌悬液原液		菌悬液 10 倍稀释	
	10.00g/L	5.00g/L	10.00g/L	5.00g/L
无菌水	6.0 ± 0.00 <sup>e</sup>	6.0 ± 0.00 <sup>e</sup>	6.0 ± 0.00 <sup>e</sup>	6.0 ± 0.00 <sup>e</sup>
XGO-A	10.0 ± 0.01 <sup>d</sup>	8.7 ± 0.03 <sup>d</sup>	12.4 ± 0.02 <sup>d</sup>	9.6 ± 0.02 <sup>d</sup>
XGO-B	20.2 ± 0.01 <sup>b</sup>	16.2 ± 0.01 <sup>b</sup>	20.5 ± 0.02 <sup>b</sup>	17.0 ± 0.03 <sup>b</sup>
XGO-C	14.3 ± 0.02 <sup>c</sup>	12.8 ± 0.01 <sup>c</sup>	14.1 ± 0.04 <sup>c</sup>	13.5 ± 0.01 <sup>c</sup>
头孢曲松钠	44.0 ± 0.02 <sup>a</sup>	41.0 ± 0.03 <sup>a</sup>	52.0 ± 0.02 <sup>a</sup>	42.0 ± 0.03 <sup>a</sup>

注:表中同一列的不同字母代表各组之间存在显著差异( $p < 0.05$ )。

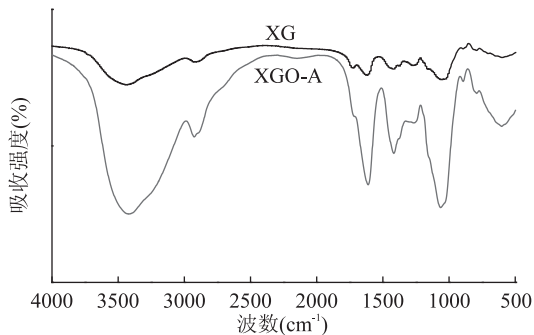


图1 原料黄原胶及其寡糖的红外光谱图  
Fig.1 IR spectra of the xanthan polysaccharide and oligosaccharide

果还是 XGO-B > XGO-C > XGO-A。

### 2.3 最低抑菌浓度 (MIC) 测定

MIC 是指抑菌剂完全抑制细菌生长所需要的最低浓度,其值越低,表明抑菌剂的抑菌效果越好。从图 2 中得知,在 1.25g/L 时, XGO-B 可以完全抑制野油菜黄单胞菌的生长,而 XGO-A 和 XGO-C 完全抑制野油菜黄单胞菌生长需要 2.50g/L,即 XGO-B 有最好的抑菌效果。这与抑菌圈实验结果相一致。

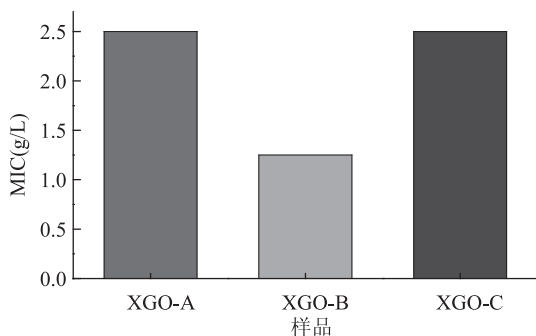


图2 黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌的 MIC  
Fig.2 The MIC of xanthan oligosaccharides on *X.campestris*

### 2.4 黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌生长的影响

野油菜黄单胞菌的生长曲线反映了其在一定环境条件下于液体培养时所表现出的群体生长规律。图 3 为黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌生长的影响。野油菜黄单胞菌从 3~15h 为生长的对数期,之后进入稳定期;黄原胶寡糖能够抑制野油菜黄单胞菌的生长,却并未改变其生长趋势;在 21h 时, XGO-A、XGO-B 和 XGO-C 三种寡糖可以使野油菜黄单胞菌的 OD 值从

0.98 分别下降至 0.84、0.76 和 0.81,即分子量为 7500 的 XGO-B 抑制作用最强,分子量为 3600 的 XGO-A 抑制作用最差,且三种寡糖的抑制作用差异显著 ( $p < 0.05$ ),这与抑菌圈与 MIC 实验结果一致。

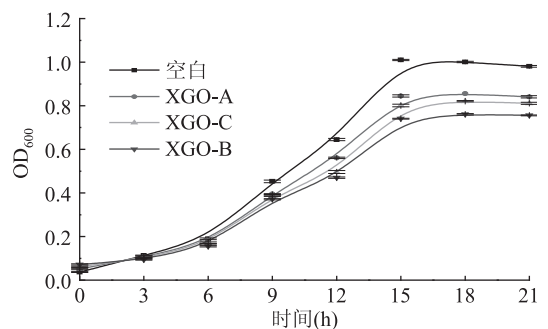


图3 2.5mg/mL 黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌生长的影响  
Fig.3 Antibacterial activity of xanthan oligosaccharides against *X.campestris*

### 2.5 黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌细胞膜通透性的影响

抑菌剂对细菌的抑菌机理包括对细菌细胞膜通透性或细胞壁的影响等。细胞膜是细菌的一层保护屏障,当细菌遇到不利生长环境或与抑菌剂作用时,其细胞膜会遭到破坏,丧失半透性,内部电解质大量渗入至培养液中,导致培养液的电导率上升。因此菌液电导率的变化反映了细菌细胞膜通透性的变化情况<sup>[16]</sup>。图 4 反映了野油菜黄单胞菌经黄原胶寡糖处理后其菌液电导率的变化情况。当野油菜黄单胞菌与黄原胶寡糖作用的前 100min 内,培养液的电导率上升较快,之后趋于平稳。空白组电导率值在测定时间内也有平缓的上升,这可能是细菌进一步生长,菌体浓度提高,从而导致溶液整体电导率上升。三种含寡糖的溶液电导率明显高于空白组,其中 XGO-C 组电导率上升最高,而 XGO-A 组电导率上升最低。表明 XGO-C 寡糖对野油菜黄单胞菌的细胞膜通透性破坏最大, XGO-B 次之, XGO-A 最小。即随着分子量的上升,寡糖对野油菜黄单胞菌细胞膜破坏增强,这与抑菌圈、MIC 和生长曲线结果不一致,说明对细胞膜通透性的破坏只是黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌的抑菌机理之一。

### 3 结论

黄原胶寡糖对许多微生物,如金黄色葡萄球菌、

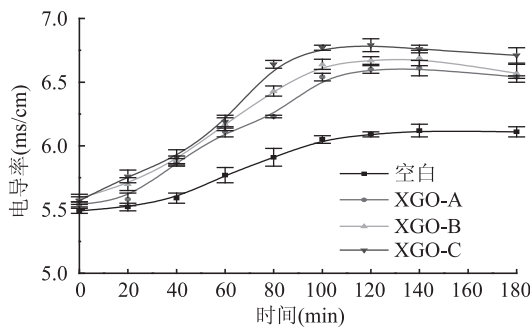


图4 黄原胶寡糖处理后  
野油菜黄单胞菌菌液电导率的变化

Fig.4 Effects of xanthan oligosaccharides on  
changes of electric conductivity of *X.campestris*

大肠杆菌等都没有抑制作用<sup>[17]</sup>,但是对野油菜黄单胞菌具有一定的抑菌性。研究表明当黄原胶寡糖的粘度与还原糖比值为100~230时,对野油菜黄单胞菌有良好的抑制效果<sup>[17]</sup>。本文于碱性条件下氧化降解得到三种黄原胶寡糖,当还原糖与丙酮酸含量相近时,分子量为7500的寡糖具有更好的抑菌性能,表明抑菌性能可能与分子量有关;而电导率实验表明随着黄原胶寡糖分子量的上升,其对野油菜黄单胞菌细胞膜破坏性增强,即黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌细胞膜通透性的破坏,仅是其抑菌机理之一,相应机理还有待进一步探讨研究。

### 参考文献

- [1] 黄成栋,白雪芳,杜显光.黄原胶(Xanthan Gum)的特性、生产及应用[J].微生物学通报,2005,32(2):91-98.
- [2] 郭瑞,丁思勇.黄原胶的结构、性能与应用[J].日用化学工业,2006,36(1):42-45.
- [3] 韩冠英,凌沛学,王凤山.黄原胶的特性及其在医学领域的应用[J].生物医学工程研究,2010,29(4):277-281.
- [4] 钱方.黄原胶生物降解及其寡糖生理活性的研究[D].大连:大连理工大学,2008.

- [5] Qian F, An LJ, He XY, et al. Antibacterial activity of xanthan-oligosaccharide cleaved from xanthan against phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 1582-1588.
- [6] Xiong XY, Li M, Xie J, et al. Antioxidant activity of xanthan oligosaccharides prepared by different degradation methods [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92: 1166-1171.
- [7] 江丽丽,张庆,徐世艾.黄原胶降解的研究进展[J].微生物学通报,2008,35(8):1292-1296.
- [8] 孙涛,熊小英,魏颖隽,等.黄原胶降解及其抗氧化性能研究[J].天然产物研究与开发,2012,24:102-104,113.
- [9] 楼良旺,高年发.紫外分光光度法测定丙酮酸[J].分析实验室,2005,24(4):11-13.
- [10] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426-428.
- [11] Fernandes JC, Tavarina FK. Antimicrobial effect of chitosans and chitoooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems [J]. *Food Microbiology*, 2009, 25: 922-928.
- [12] Jeon YJ. Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 44: 71-76.
- [13] Hong KN, Na YP, Shin HL, et al. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 74: 65-72.
- [14] 侯伟峰,谢晶,蓝蔚青,等.植酸对大肠杆菌抑菌机理的研究[J].江苏农业学报,2012,28(2):443-447.
- [15] 朱淮武.有机分子结构波谱解析[M].北京:化工出版社,2008:50-51.
- [16] Madigan M T, Martinko J M. 微生物生物学[M].11版.李明春,杨文博,译.北京:科学出版社,2009,95-113.
- [17] 何晓燕.黄原胶寡糖生物活性的研究[D].大连:大连轻工业学院,2005.

(上接第90页)

- [13] 李刚凤,陈洁,吕莹果,等.大米原料性质对米粉老化品质的影响[J].河南工业大学学报:自然科学版,2013,34(2):39-42.
- [14] 袁美兰,鲁战会,程永强,等.自然发酵对米粉RVA黏度性质及米粉拉伸性质的影响[J].中国粮油学报,2008,23(1):6-9.
- [15] 张国治.糯米粉的品质分析及速冻汤圆品质改良[J].冷饮与速冻食品工业,2006,12(2):39-42.
- [16] Primo-Martín C, van Deventer H. Deep-fat fried battered snacks prepared using super heated steam (SHS): crispness and low oil content [J]. *Food Research International*, 2011, 44: 442-448.
- [17] 李春红,潘家荣,张波.物性测试仪对休闲食品酥脆性的测量[J].现代科学仪器,2008(6):59-62.
- [18] 许永亮,程科,邱承光,等.不同品种大米淀粉的流变学特性研究[J].中国粮油学报,2006,21(4):16-20.
- [19] Mohamed S, Hamid NA, Hamid MA. Food components

- affecting the oil absorption and crispness of fried batter [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 78: 39-45.
- [20] Ahamed NT, Singhal RS, Kulkarni PR, et al. Deep-fat fried snacks from blends of soy flour and corn, amaranth and chenopodium starches [J]. *Food Chemistry*, 1997, 58: 313-317.
- [21] Sanz T, Salvador A, Fiszman SM. Resistant starch (RS) in battered fried products: functionality and high-fibre benefit [J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22: 543-549.
- [22] Altunakar B, Sahin S, Sumnu G. Functionality of batters containing different starch types for deep-fat frying of chicken nuggets [J]. *European Food Research and Technology*, 2004, 218: 318-322.
- [23] Gennadios A, Hanna MA, Kurth LB. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a Review [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1997, 30(4): 337-350.
- [24] Fiszman S, Salvador A. Recent developments in coating batters [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2003, 14: 399-407.