

# 家蝇幼虫壳聚糖的保鲜及抑菌作用的研究

王 艳<sup>1</sup>, 李培森<sup>2</sup>, 刘晓芳<sup>1</sup>, 徐金瑞<sup>3,\*</sup>

(1. 广东药学院医药化工学院, 广东中山 528458;

2. 广东药学院基础学院, 广东广州 510006;

3. 广东药学院食品学院, 广东中山 528458)

**摘要:**研究了家蝇幼虫可溶性壳聚糖的抗菌作用和对杨桃的保鲜效果。从家蝇幼虫提取壳聚糖并降解得到可溶性壳聚糖, 设空白对照组、阳性对照组、0.5%壳聚糖组、1%壳聚糖组和2%壳聚糖组, 分别测定其重量, 观察其成熟程度, 测定其维生素C含量和总糖含量。用四种供试菌, 采用滤纸片法比较各组的抑菌活性。结果表明, 家蝇幼虫壳聚糖的提取率约为29.70%, 木瓜蛋白酶降解可得到可溶性壳聚糖。1%壳聚糖溶液处理明显降低了杨桃果实的腐烂程度与失重率, 延缓了果实总糖含量以及V<sub>C</sub>的降低, 提高了杨桃果实贮藏期间品质。其中2%壳聚糖的抑菌效果最好, 对大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌抑菌圈分别是(7.821±0.583)、(7.399±0.402)、(6.439±0.405) mm。研究表明家蝇幼虫可溶性壳聚糖不仅有抗菌作用, 对杨桃也有一定的保鲜效果。

**关键词:**家蝇幼虫, 可溶性壳聚糖, 保鲜, 抑菌

## Study on preservation and antimicrobial effects by chitosan of Housefly larvae

WANG Yan<sup>1</sup>, LI Pei-sen<sup>2</sup>, LIU Xiao-fang<sup>1</sup>, XU Jin-rui<sup>3,\*</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China;

2. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

3. School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

**Abstract:** The effect of chitosan on the preservation and antibacterial effect of carambola was studied. In this experiment, chitosan of housefly larvae was degraded to get soluble chitosan. The study was divided into five groups: blank group, positive control group, 0.5%, 1%, 2% chitosan group. Every day their weight was measured, their maturity was observed and their content of vitamin C and total sugar after 9 days was measured. Antibacterial activities of extraction were tested by the filter paper method of four G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> strains. It illustrated that the extraction rate of soluble chitosan from housefly larvae was about 29.70% and chitosan could be degraded by papain. This soluble chitosan had certain antibacterial and preservation effect. The concentration of 1% chitosan solution treatment significantly reduces the carambola decay degree and rate of weight loss, delay fruit storage period of soluble solids, total sugar content and vitamin C reduce, improves the quality of carambola during storage. The activity of 2% chitosan group was the strongest, and suppressed zones of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* were (7.821±0.583), (7.399±0.402), (6.439±0.405) mm. The research showed that the soluble chitosan from larva of housefly had good effect on preservation of Carambola and had antibacterial effects

**Key words:** Housefly larvae; chitosan; keep-fresh; antibacterial

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0109-03

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.014

杨桃是热带、亚热带地区的特产水果, 富含维生素C, 具有祛风热、生津止渴、止血、拔毒生肌等药效。

但由于杨桃呼吸作用旺盛, 果实皮薄、质脆、具棱, 因此在贮藏过程中营养成分下降快, 极易失水皱缩、变

收稿日期: 2015-04-17

作者简介: 王艳(1981-), 女, 硕士, 实验师, 主要从事生物活性物质方面的研究, E-mail: sahara81@163.com。

\* 通讯作者: 徐金瑞(1976-), 女, 博士, 副教授, 主要从事生物活性物质与功能食品方面的研究, E-mail: xujr343@126.com。

基金项目: 广东药学院食品科学学院学科建设基金; 广东省医学科研基金(A2014350)。

味、褐变和损伤腐烂。目前常采用的方法存在毒性残留、抗药性成本高及环境污染问题。所以,开发安全无毒的“绿色”杨桃保鲜剂具有广阔的市场前景。

壳聚糖是甲壳素在浓碱溶液中脱乙酰基的产物,是自然界的唯一碱性多糖,可溶于稀酸中,因其结构中大量游离氨基的存在,使其具有各种优良性能而被应用于农业、医药、化妆品、环保等行业<sup>[1-3]</sup>。壳聚糖的保鲜机理一是其具有良好的成膜性,二是其抑菌活性<sup>[4]</sup>。目前国内对壳聚糖的开发主要集中于虾蟹,但不同种类的虾蟹壳聚糖的含量不同,提取工艺不同,造成了其成本较高,限制了壳聚糖的广泛使用。家蝇是可再生资源,幼虫壳中的甲壳素含量高达95%,约是虾蟹壳的6倍,是潜在的壳聚糖来源<sup>[5]</sup>。为此,本文研究了从家蝇幼虫中提取的壳聚糖对水果的保鲜作用及抑菌作用,为大规模从蝇蛆中提取利用壳聚糖提供理论依据。研究可溶性壳聚糖对杨桃的保鲜及抑菌作用,以期为该壳聚糖应用于水果保鲜提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

家蝇幼虫(*Musca domestica*) 由广东省疾病预防控制中心提供,经繁殖数代所得;甜杨桃(B10) 2014年10月26日采自广东省潮州市田间,无农药,无保鲜剂,选取成熟度、大小相对一致、无机械损伤的果实,当天运达本校实验室进行处理;供试菌种大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、伤寒杆菌,抗生素青霉素、链霉素 均由广东药学院医药化工学院实验中心提供;木瓜蛋白酶 上海蓝季科技发展有限公司;盐酸、氢氧化钠、冰乙酸、无水乙醇、氯化钙等 均为国产分析纯。

721型可见光分光光度计 上海精密仪器有限公司;ZHJH-C1209C超净工作台 上海智诚分析仪器制造有限公司;乌氏粘度计 上海华科实验器材有限公司;ZD-85A恒温振荡器 江苏金坛市宏华仪器厂;HPX-9162MBE恒温培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

### 1.2 实验方法

1.2.1 可溶性壳聚糖制备 取家蝇幼虫20.0 g研磨后,加入200 mL 2mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液离心,搅拌1 h除去灰分,过滤得家蝇幼虫壳。将家蝇幼虫壳依次浸入2.5 mol·L<sup>-1</sup> NaOH溶液和1.5 mol·L<sup>-1</sup> NaOH溶液,沸水浴各4 h除蛋白即得甲壳素粗品。然后60% NaOH溶液沸水浴3 h进行脱乙酰基,并用普通滤纸抽滤,洗涤固相残渣后,溶于10%醋酸溶液搅拌溶解1 h,过滤,取续滤液调其pH=7,出现絮状沉淀即壳聚糖,离心分离,在80 ℃下干燥,即得固体壳聚糖<sup>[6]</sup>。将得到的固体壳聚糖加入到pH4.0的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,配制成1%的壳聚糖溶液。配制好的壳聚糖溶液置于烧杯中,恒温水浴中预热。溶液升至温度为40 ℃后,按照25:1加入木瓜蛋白酶。反应初始时壳聚糖粘度较高,可用玻璃棒搅拌,使溶液粘度迅速下降。之后将溶液置气浴恒温振荡器中继续反应约60 min。反应结束后,取壳聚糖降解液加热煮沸10 min,使溶

液中的酶失活,用孔径为75 μm中速滤纸抽滤,脱去酶。旋转蒸发至一半体积,然后加3倍无水乙醇进行醇沉,静置过夜,抽滤,80 ℃进行干燥,即得到可溶性壳聚糖<sup>[7]</sup>。

1.2.2 壳聚糖参数测定及对杨桃的保鲜 提取率根据提取前后的质量进行计算。壳聚糖分子量的测定采用乌氏粘度计粘度法方法参考贺岚等<sup>[8]</sup>,按式(1)计算特征粘度 $[\eta]$ :脱乙酰度DD的测定采用滴定法式(2)计算<sup>[9]</sup>。

$$[\eta]=\ln\left[\frac{T/T_0}{G}\right]=K\times M^\alpha \quad \text{式(1)}$$

式中:G 样品溶液的浓度,g/mL;K=0.104×10<sup>-3</sup>;α=1.12

$$\text{DD值}(\%)=\frac{(C_{\text{酸}}V_{\text{酸}}-C_{\text{碱}}V_{\text{碱}})\times 0.016\times 100}{\text{样品重}G\times 0.094} \quad \text{式(2)}$$

称取6.0 g家蝇幼虫壳聚糖加入300 mL蒸馏水使之完全溶解即2%壳聚糖,再分别稀释成1%、0.5%备用。杨桃随机分为五组<sup>[10-12]</sup>:空白对照组、1%氯化钙阳性对照组、2%、1%及0.5%蝇蛆壳聚糖,每组20个。空白对照组不做如何处理,其他组用对应的溶液浸泡2~3 min后捞出,待其自然风干后,装入0.01 mm PE保鲜袋中,单果包装于室温15~25 ℃,相对湿度65%~75%下存放。每天记录其失水率和腐烂率,失水率:用式(3)称重法,9 d后研磨取汁直接滴定法测定其维生素C含量和总糖含量<sup>[13]</sup>。

$$\text{失水率}(\%)=\frac{(\text{贮前果重}-\text{贮后果重})}{\text{贮前果重}}\times 100 \quad \text{式(3)}$$

1.2.3 壳聚糖的抑菌作用 配制2%、1%、0.5%壳聚糖溶液,高压灭菌后调至pH=6,同时生理盐水作为阴性对照,抗生素作为阳性对照。将直径4 mm纸片,121 ℃高压灭菌30 min,再经80 ℃烘干,置于干燥器中备用,分别将四种菌悬液0.2 mL均匀涂于L-B肉汤培养基上,均匀涂布制成含菌平板。将纸片置于各溶液中,浸泡40 min,取出待其干燥后贴入含菌平板中,每个平皿放四片,重复9次,置于37 ℃恒温培养箱中培养约24 h。用游标卡尺采用十字交叉法量取抑菌圈直径(mm)通过测定抑菌圈直径大小评价不同组别对不同受试菌抑制作用<sup>[14]</sup>。

1.2.4 统计学方法 实验数据以平均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间差异采用t-检验,以p<0.05作为显著性差异的标准,以p<0.01为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 蝇蛆壳聚糖的参数

本次实验所用的干燥家蝇幼虫壳为36.56 g,提取得到的壳聚糖干燥后为10.86 g,提取率约为29.70%,木瓜蛋白酶降解前后的壳聚糖几乎没有损失。实验滴定所用去的NaOH的体积为15.4 mL,代入式(2)算出脱乙酰度DD值约为62.64%。本次实验所测的T<sub>0</sub>为93 s,T为242 s,G为0.005 g/mL,算出 $[\eta]$ 约为6.2547,分子量M约为18497.63163。

### 2.2 壳聚糖对杨桃保鲜效果

杨桃在储藏过程中容易损失水分,呼吸作用旺盛,维生素C被氧化而含量下降,淀粉转化而使总糖

表1 家蝇幼虫壳聚糖保鲜结果 ( $\bar{x}\pm s, n=20$ )Table 1 The preservation results of Housefly larvae of chitinous ( $\bar{x}\pm s, n=20$ )

组别	失水率 (%)	腐烂程度(个)	维生素C含量 (mg/100 g)	总糖含量 (g/100 g)
空白对照组	1.227±0.646	7软6黄3黑斑	4.224±0.791	4.161±0.370
阳性对照组	1.064±0.570**	4软2黄0黑斑	5.901±0.271**	3.856±0.185
0.5%壳聚糖组	1.075±0.590**	1软1黄0黑斑	5.600±0.460**	3.729±0.332**
1%壳聚糖组	1.033±0.549** <sup>ΔΔ</sup>	1软0黄0黑斑	6.556±0.518** <sup>ΔΔ</sup>	3.284±0.261** <sup>ΔΔ</sup>
2%壳聚糖组	1.077±0.557**	1软0黄0黑斑	6.168±0.284**	3.592±0.122**

注:与空白组对比\*\* $p<0.01$ ;与阳性对照组对比 $\Delta\Delta p<0.01$ 。

表2 家蝇幼虫壳聚糖抑菌结果(以抑菌圈直径表示, mm,  $\bar{x}\pm s, n=9$ )Table 2 The antibacterial results of Housefly larvae of chitinous (Diameters of inhibition zone, mm,  $\bar{x}\pm s, n=9$ )

菌种	抑菌圈直径(mm)				
	2%壳聚糖	1%壳聚糖	0.5%壳聚糖	空白	抗生素
大肠杆菌	7.821±0.583**	6.474±0.430**	5.561±0.487**	0	13.017±0.521
枯草杆菌	7.399±0.402**	6.299±0.365**	5.291±0.403**	0	17.651±0.457
伤寒杆菌	0	0	0	0	11.469±0.604
金黄色葡萄球菌	6.439±0.405**	5.703±0.296**	4.822±0.319**	0	28.559±0.734

注:0表示没有抑菌圈现,与抗生素组对比\*\* $p<0.01$ 。

含量增多。由表1可知2%、1%及0.5%蝇蛆壳聚糖组的失水率和腐烂程度均比空白对照组低,维生素C含量和总糖含量与空白对照组比均有极显著性差异( $p<0.01$ ),说明1%氯化钙和壳聚糖对杨桃均有一定的保鲜效果。其中,1%壳聚糖组的失水率最低、腐烂程度最小、维生素C含量最高、总糖含量最低,与阳性对照组相比具有极显著性差异( $p<0.01$ ),说明其对杨桃的保鲜作用最强。

### 2.3 壳聚糖的抑菌结果

由表2可知,壳聚糖对大肠杆菌、枯草杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌作用,对伤寒杆菌则没有抑菌效果。随着浓度的增加,其抑菌作用也增强。抑菌作用效果依次是:大肠杆菌>枯草杆菌>黄色葡萄球菌,但抑菌效果弱于抗生素。

## 3 结论

家蝇资源丰富,从中提取壳聚糖工艺较为简单统一,既可以变废为宝,充分利用可再生资源,又可以降低保鲜成本,方便运输。Muzzarelli等认为木瓜蛋白酶在微酸条件下可有效降解壳聚糖,降解速度也很高。这种降解方法要求壳聚糖的脱乙酰化度以60%左右为宜。本实验得到的壳聚糖脱乙酰度为62.64%,适合用木瓜蛋白酶降解,而且条件温和,无使用化学试剂,应用在食品行业较为安全。

家蝇幼虫壳聚糖溶液对大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定的抑制效果,可以在一定程度上减少附着的细菌对杨桃的损害。1%壳聚糖用来保鲜杨桃,能够有效控制微生物数量,在其表面成膜,阻止其呼吸作用和水分蒸发,减少腐烂,保持较高维生素C含量,有效延缓成熟。

### 参考文献

[1] 王恩文,鲍莹.壳聚糖在农业中的应用研究[J].现代农业科

技,2012(12):24-25.

[2] 程志,杜娜.壳聚糖在医药领域应用研究进展[J].人民军医,2013,56(2):223-224.

[3] Prospero Di Piero, Angela Sorrentino. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life[J]. Food Science and Technology, 2011, (44):2324-2327.

[4] 瑞瑞.壳聚糖在食品保鲜中的应用[J].农业工程,2012,2(3):37-42.

[5] 苏水莲,李娟,胡亚琼,等.人工饲养家蝇蛆和蛹提取几丁质的研究[J].赣南医学院学报:2002,22(3):227-229.

[6] 曹小红,陈一,张燕,等.蝇蛆中甲壳素与壳聚糖提取工艺的研究[J].食品工业科技,2003,28(5):82-86.

[7] 李和生,孙玉喜,吴汉民,等.木瓜蛋白酶水解壳聚糖的工艺研究[J].天然产物研究与开发,2006(18):478-482.

[8] 贺岚,白海红,艾有年.粘度法测定壳聚糖分子量的一些体会[J].中国卫生检验杂志,2010,11(5):631-632.

[9] 徐文峰,廖晓玲.碱量法测定壳聚糖脱乙酰度的研究[J].分析实验室,2008,27(5):218-221.

[10] 赵凤,李玲,杨小龙.水溶性壳聚糖在葡萄保鲜中的应用[J].中国农学通报,2011,27(10):294-296.

[11] 姜秋焕,叶盛权,叶春海,等.壳聚糖涂膜对鲜切菠萝蜜的保鲜作用[J].现代食品科技,2012,28(1):14-17.

[12] Maria del R Moreira, Sara I Roura. Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli[J]. Food Science and Technology, 2011(44):2335-2341.

[13] 蒙盛华,胡小松,赵华,等.水果蔬菜贮藏保鲜实用技术手册[M].北京:科学普及出版社,1991:7-8.

[14] Hu Y J, Qiao J L, Zhang X, et al. Antimicrobial activity of magnolia officinalis extracts *in vitro* and its effects on the preservation of chilled mutton[J]. Journal of Food Biochemistry, 2011,35(2):425-441.