

丙酮酸改性壳聚糖的制备及应用

陈 忻, 胡秀梅, 洪祥乐

(佛山科学技术学院理学院, 广东 佛山 528000)

摘 要: 利用壳聚糖 C₂ 位上活泼氨基与丙酮酸进行席夫碱反应, 制取丙酮酸改性壳聚糖(简称为 PCTS)。实验结果表明其最佳的合成条件为: 1.8g 溶胀的壳聚糖与 1.48g 丙酮酸在 pH=4~5 反应 4h 后, 加入 1.7g NaBH₄ 反应 1.5h, 合成的 1.6g PCTS, 取代度可达 88.14%。结果显示 0.1g 的 PCTS 吸附 0.1g/L 的 Cu(II) 和 Zn(II), 其吸附率分别可达 100% 和 99.29%; PCTS 对 NO₂⁻ 也有一定的清除作用, 11mg/ml 的取代度为 85.79% PCTS 对 NO₂⁻ 的清除率可达 50.57%。

关键词: 壳聚糖; 丙酮酸; 丙酮酸改性壳聚糖; 吸附

Preparation and Application of Chitosan Modified by Pyruvic Acid

CHEN Xin, HU Xiu-mei, HONG Xiang-le

(Science Academy, Foshan College of Science and Technology, Foshan 528000, China)

Abstract: The modified Chitosan polymer (PCTS) containing schiff-base group was synthesized by the chemical modification of an amino group of chitosan with pyruvic acid. The experimental results showed that the optimum conditions were: 1.8g chitosan reacted with 1.48g pyruvic acid under the aqueous solution at pH4~5 for 4h and then was reduced by 1.7g NaBH₄ for 1.5h to produce 1.6g PCTS. The product(PCTS) could be dissolved in distilled water, 1% sodium hydroxide solution and 0.3mol/L hydrochloric acid. The analysis showed that the substituted rate of schiff-base group was 88.14%. In comparison with chitosan, the PCTS had a higher absorption rate of Cu(II) and Zn(II). The PCTS could also remove the NO₂⁻ with its removing rate as high as 50.57%.

Key words: chitosan; pyruvic acid; chitosan modified by pyruvic acid; absorption of Cu(II) and Zn(II)

中图分类号: TS245.4

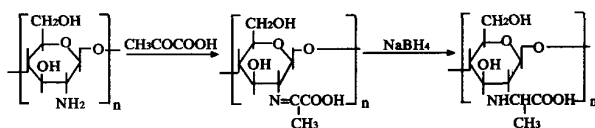
文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2004)08-0110-04

甲壳素(chitin)又名几丁质、甲壳质, 化学名称是 (1,4)-2- 乙酰胺基 -2- 脱氧 - β -D 葡萄糖, 甲壳素是自然界含量仅次于纤维素的第二大天然有机高分子化合物, 壳聚糖(chitosan)则是甲壳素脱乙酰化的产物, 是一种阳离子型直链氨基多糖, 在环保方面, 甲壳素与壳聚糖能特别有效地除去水中的有害物质, 如 Hg、Pb、Zn、Cu、Cr、Pu、U 等金属离子^[1]。另外, 甲壳素与壳聚糖在造纸、制药、生物技术、食品工业、农业等方面也有较好的应用^[2]。

甲壳素和壳聚糖都不溶于水, 这在一定程度上限制了其在各方面的应用。因此对甲壳素及其衍生物进行化学改性, 以改善其溶解性和加工工艺性能已成为壳聚糖化学研究的重点。本研究就是利用壳聚糖 C₂ 位上活泼氨基与丙酮酸进行大分子反应, 合成了具有高取代羧基、能溶于水的功能性聚合物—丙酮酸改性壳聚糖(简称为

PCTS), 反应方程式如下所示:



PCTS 的合成反应方程式

本研究对高取代度 PCTS 的合成方法进行了探讨实验, 与壳聚糖(CTS)相比较试验了其 Cu(II) 和 Zn(II) 两种金属离子的吸附作用, 并首次报道了 PCTS 对 NO₂⁻ 的清除能力。

1 材料与方法

1.1 主要原料和试剂

收稿日期: 2003-09-05

作者简介: 陈忻(1968-), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为生物化学。

甲壳素 自制; 硼氢化钠、丙酮酸、无水乙醚为分析纯; 其余试剂均为化学纯。

1.2 主要仪器

78-1 型磁力加热搅拌器; WS70-1 型红外线快速干燥器; DDS-11A 型电导率仪; VARIAN AA-640 原子吸收分光光度计等。

1.3 壳聚糖的制备

把一定体积的 50% 的氢氧化钠溶液(W/W)加入甲壳素中, 加热到 150℃ 后保温 20min, 过滤, 除去滤液, 滤渣用蒸馏水洗涤至中性, 可制得脱乙酰度为 94.68%~99.8% 的壳聚糖。壳聚糖脱乙酰度的测定方法参考文献[3]。

1.4 丙酮酸改性壳聚糖的制备

1.8g 的壳聚糖用 50ml 的蒸馏水溶胀, 加入 1.48g 丙酮酸搅拌反应 1h, 过滤除去不溶物, 缓慢滴入稀氢氧化钠调 pH 值至 4~5, 继续搅拌反应 4h。加入硼氢化钠溶液(一定质量的硼氢化钠 +5ml 蒸馏水), 再加入一定量的蒸馏水, 搅拌反应 1.5h, 用玻璃纤维过滤, 滤液滴入适量的无水乙醇中, 一边滴入一边搅拌, 直至沉淀完全析出为止。用普通过滤装置过滤, 滤渣用约 30ml 无水乙醚洗涤 3 次, 红外线快速干燥器干燥 15min 后, 即得易溶于水的白色粉末。

1.5 PCTS 取代度的测定

1.5.1 测定原理^[4]

PCTS 中羧基化取代度(DS)定义为每个葡糖胺基上羧基的平均基团, 计算公式如下:

$$DS = \frac{0.161A}{1 - 0.072A - 0.022B} \times 100\%$$

$$\text{式中, } A = \frac{C_{NaOH}(V_2 - V_1)}{W}; B = \frac{C_{HCl} V_{HCl} - C_{NaOH} V_1}{W},$$

其中 V_1 , V_2 分别是电导滴定曲线中第 1 个折点和第 2 个折点所消耗的氢氧化钠标准溶液的体积(ml); V_{HCl} 为滴定前加入的盐酸标准溶液的体积($V_{HCl}=5.00\text{ml}$); W 为样品的净重(g); A 为每克样品中总的取代羧基的量(mmol); B 为每克样品中羧基钠的量(mmol); 葡糖胺基: 0.161g/mmol; $-CCH_3COOH$: 0.072g/mmol; $-CCH_3COONa$: 0.094g/mmol。

1.5.2 取代度的测定方法

参考文献[4], 准确称取 0.5g PCTS, 溶于 150ml 不含二氧化碳的去离子水的三颈瓶中, 加入盐酸调 pH 值至 6~7, 再加入 5.00ml 0.3243mol/L 盐酸, 通氮气 5min, 然后用 0.2832mol/L 氢氧化钠溶液滴定, 每次加入 0.40ml, 待电导率仪指针稳定后再读数。以标准氢氧化钠溶液的滴定体积(ml)为横坐标, 电导率为纵坐标作图

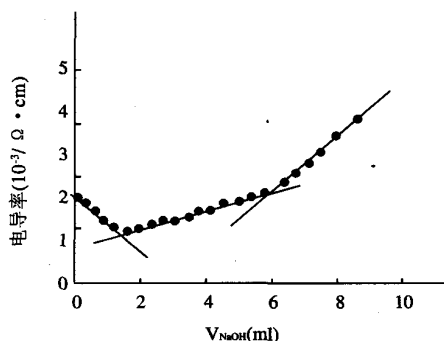


图1 PCTS 取代度滴定曲线

(如图 1 所示)。

1.6 PCTS 与 CTS 对 Cu(II)、Zn(II) 的吸附性能实验, 具体方法见文献[4]。

1.7 PCTS 对 NO₂ 的清除率测定实验

参考文献[5]的方法, 根据 NO₂ 在酸性条件下, 与对氨基苯磺酸发生重氮化反应, 生成的物质在显色剂盐酸萘基乙二胺的作用下可显色, 从而可测定其吸光度。

各取浓度分别为 0、3、5、7、9、11mg/ml 的取代度为 85.79% 的 PCTS 溶液 5ml 于 50ml 容量瓶中, 加入 25ml pH=3 柠檬酸钠-盐酸缓冲溶液, 加入 5ml 0.1g/ml 的亚硝酸钠溶液, 然后把混合物置于 37℃ 水浴箱中 1h; 抽 1ml 上述混合物于培养皿中, 加入 0.5ml 0.5% 碳酸钠溶液, 1.5ml 0.4% 对氨基苯磺酸, 再加入盐酸萘基乙二胺显色剂, 静置 15min 后测各溶液的吸光度 A_x , 其中把浓度为 0mg/ml 所测得的吸光度定为 A_0 , 即空白值。按以下公式计算 PCTS 对 NO₂ 的清除率。

$$\text{NO}_2 \text{ 的清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 反应条件对 PCTS 取代度的影响

Schiff 碱反应会受到多种因素的影响, 经过实验, 主要考察了如下两种因素: 丙酮酸与壳聚糖的反应时间; 还原剂硼氢化钠的加入量。实验结果如表 1、表 2。

从实验结果可看出: 在 pH=4~5, 丙酮酸与壳聚糖的反应时间为 4h 时, 生成的 PCTS 的溶解性最好; 硼氢化钠的加入量以 1.7g 为佳, 过少, 生成的 PCTS 产量低、取代度低, 过多则浪费还原剂且产量不高、干燥时间延长。反应优化方案为: 丙酮酸与壳聚糖在 pH 为 4~5, 加入硼氢化钠的量为 1.7g。

2.2 PCTS 与壳聚糖(CTS)的溶解性比较

0.1g PCTS 与 CTS 分别加入 25ml 以下溶剂中, 其溶解性比较如表 3 所示。从表中可看出: PCTS 的溶解性

表1 壳聚糖与丙酮酸的反应时间对 PCTS 合成的影响

丙酮酸的 加入量(g)	壳聚糖与丙酮酸的 反应时间(h)	硼氢化钠的 加入量(g)	加入硼氢化钠后的 反应时间(h)	溶解性比较		
				蒸馏水	0.3mol/L 盐酸	1% 氢氧化钠溶液
1.48	2	0.7	1	部分溶	全溶	部分溶
1.48	4	0.7	1	溶解性最好	全溶	溶解性最好
1.48	6	0.7	1	部分溶	全溶	部分溶

注：反应所用的壳聚糖为 1.8g，脱乙酰度为 94.68%，且经 50ml 蒸馏水溶胀。

表2 硼氢化钠加入量对 PCTS 合成的影响

丙酮酸的 加入量(g)	壳聚糖与丙酮酸的 反应时间(h)	硼氢化钠 加入量(g)	加入硼氢化钠后的 反应时间(h)	PCTS 产量 (g)	PCTS 取代度 (%)	干燥时间 (min)
1.48	4	0.35	1.5	0.075	—	5
1.48	4	0.7	1.5	0.200	—	5
1.48	4	1.5	1.5	0.658	—	25
1.48	4	1.7	1.5	1.600	88.14	15
1.48	4	2.0	1.5	1.343	约 100	52

注：反应所用的壳聚糖为 1.8g，脱乙酰度为 94.68%，且经 50ml 蒸馏水溶胀。

明显优于 CTS，这可能是由于壳聚糖的 -NH₂ 中的 H 被 -CHCH₃-COOH 所取代，取代基的体积大，削弱了壳聚糖分子间氢键，同时由于亲水性 -COOH 的存在，使得 PCTS 的水溶性明显改善。

表3 PCTS 与 CTS 的溶解性比较

样品	溶 剂		
	蒸馏水	盐酸	氢氧化钠溶液
PCTS	全溶	全溶	全溶
CTS	不溶	全溶	不溶

注：盐酸的浓度为 0.3mol/L，氢氧化钠溶液的浓度为 1%(W/W)。

2.3 PCTS 的应用实验结果

2.3.1 PCTS 在环保方面的应用

丙酮酸改性的壳聚糖由于具有良好的水溶性，能与金属离子形成稳定的五元环螯合物沉降下来，故其对金属离子的吸附能力比壳聚糖强，在环保方面的应用更广泛。

2.3.1.1 PCTS 与 CTS 对 Cu(II) 的吸附性能比较

表4 PCTS 对 NO₂⁻ 的清除实验结果

PCTS 浓度 (mg/ml)	吸光度 A	对 0.1g/L NO ₂ ⁻ 的清除率(%)
0	0.174	—
3	0.149	14.37
5	0.145	16.69
7	0.102	41.36
9	0.099	43.10
11	0.086	50.57

测得 PCTS 对 Cu(II) 的吸附率为 100%，而壳聚糖为 72.64%。由此可见 PCTS 对 Cu(II) 的吸附率高于 CTS。

2.3.1.2 PCTS 与 CTS 对 Zn(II) 的吸附性能比较

测得 PCTS 对 Zn(II) 的吸附率为 99.29%，壳聚糖为 30%，PCTS 对 Zn(II) 的吸附作用明显优于 CTS。

2.3.1.3 PCTS 对 NO₂⁻ 的清除率

PCTS 对 NO₂⁻ 的清除作用结果如表 4 所示。由此可看出随着 PCTS 溶液浓度的增加，PCTS 对 NO₂⁻ 的清除作用越好。11mg/ml 的 PCTS 对 0.1g/L NO₂⁻ 的清除率可达 50.57%。

3 结 论

3.1 丙酮酸改性壳聚糖的最佳合成条件

丙酮酸改性壳聚糖的最佳合成条件是：1.8g 溶胀的壳聚糖与 1.48g 丙酮酸在 pH=4~5 反应 4h，加入 1.7g NaBH₄ 反应 1.5h，合成的 PCTS 共 1.6g，取代度可达 88.14%。

3.2 丙酮酸改性壳聚糖的性质

丙酮酸改性壳聚糖易溶于蒸馏水、0.3mol/L 盐酸以及 1% 氢氧化钠溶液，溶解性能大大优于壳聚糖。

3.3 丙酮酸改性壳聚糖的应用

PCTS 对 Cu(II) 及 Zn(II) 具有很好的吸附作用，对 NO₂⁻ 也有一定的清除效果。0.1g 的 PCTS 吸附 0.1g/L 的 Cu(II) 和 Zn(II)，其吸附率分别可达 100% 和 99.29%。PCTS 对 NO₂⁻ 也有一定的清除作用。11mg/ml 的 PCTS 对 NO₂⁻ 的清除率可达 50.57%。

3.4 尚存在的问题

丙酮酸改性壳聚糖的制备方法并不复杂，但问题是

粉被虫草液体培养条件的优化

肖建辉¹, 刘祖林¹, 刘金伟¹, 肖瑜¹, 方宁¹, 祁莹¹, 梁宗琦²

(1.遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 贵州 遵义 563003;

2.贵州大学真菌资源研究室, 贵州 贵阳 550025)

摘要:通过摇瓶液体培养正交试验获得了粉被虫草的液体培养条件, 即蔗糖 2.5%, 马铃薯淀粉 2%, 黄豆 0.5%, 牛肉膏 0.5%, 酵母膏 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, KCl 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, pH5~7, 装液量(100ml/250ml 摇瓶), 加 15 颗玻璃珠作分散剂, 5% 接种量, 旋转式摇床 150r/min, 28℃ 培养 7d, 达到最大菌丝干重 31.86g/L, 于 9d 获得最大胞内产物 3.13g/L。同时, 对摇瓶液体培养和生物反应器液体深层分批培养的动力学做了较系统的研究, 无论生物反应器还是摇瓶, 其培养过程中相对应的 pH、残糖、氨基氮、菌丝干重、胞内产物等参数变化趋势基本一致, 但生物反应器培养时间大大缩短, 48h 即可达到最大菌丝干重 29.97g/L, 54h 达到 4.95g/L 的最高胞内产物产率。生物反应器设定培养温度 28℃、装液量 65%、接种量 10%、0.2% 的消泡剂、搅拌转速 350r/min、通气量(12 ± 3)L/min、罐压 1.1MPa、初始 pH6.5, 培养基配方用食用蔗糖 3%、蔗糖糖蜜 2%、花生 0.5% 分别替代蔗糖、马铃薯淀粉、牛肉膏以降低成本。实验表明, 粉被虫草的液体培养条件基本能达到工业发酵水平的要求。

关键词:粉被虫草; 液体培养; 胞内产物; 正交试验

Studies on Optimization Conditions of Liquid Culture of *Cordyceps pruinosa*

XIAO Jian-hui¹, LIU Zu-lin¹, LIU Jin-wei¹, XIAO Yu¹, FANG Ning¹, QI Ying¹, LIANG Zong-qi²

(1.Key Lab. of Cell Engineering of Guizhou Province, The Affiliated Hospital of Zunyi Medicinal College, Zunyi 563003, China; 2.Lab. of Fungus Resources, Guizhou University, Guiyang 50025, China)

Abstract: Liquid culture conditions of *Cordyceps pruinosa* Petch were investigated through orthogonal test in shake flask culture. The contents and constituents of the optimal liquid culture medium were sucrose 2.5%, potato starch 2%, soybean

收稿日期: 2003-11-25

作者简介: 肖建辉(1972-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为微生物资源及其生物活性产物。

制备的成本高, 如果可以改用成本较低的还原剂(例如次亚磷酸钠、亚硫酸钠等)代替硼氢化钠, 则成本可大大减低。目前 PCTS 的应用研究主要集中在环保方面对过渡金属离子的吸附^[4], 在其他方面的应用尚未见报道。丙酮酸是机体和食物中所含的一种天然物质, 是三羧酸循环的中间产物, 糖、脂肪和蛋白质等能量代谢的中枢。正常体内丙酮酸的含量有限, 外界补充丙酮酸, 通过刺激加速循环, 可起到消耗更多脂肪的作用^[5], 因此丙酮酸是近期热门的减肥药物, 但丙酮酸有一定的毒性, 若在神经组织中堆积, 易发生多发性神经炎。而 PCTS 毒性大大降低, 本研究结果也显示 PCTS 对 NO_2^- 也有一定的清除作用, 若能加强研究其在保健食品方面的应用, 那么 PCTS 的应用前景将会更广阔。

参考文献:

- [1] 陈世清. 甲壳素与壳聚糖在工业水处理中的应用[J]. 工业水处理, 1996, 16(2): 1-2.
- [2] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 13-108.
- [3] 孙加龙, 班卫平, 张运展. 壳聚糖制备工艺探讨[J]. 大连轻工业学院学报, 2000, 19(1): 1-3.
- [4] 马全红, 高永红, 邹宗柏. 丙酮酸改性壳聚糖对金属离子的吸附性能研究[J]. 现代化工, 2000, 20(10): 44-46.
- [5] 张虹, 许钢, 袁建耀. 刘奇奴提取液对亚硝化反应的抑制作用[J]. 郑州粮食学院学报, 2000, 21(1): 50-53.
- [6] 邵泽川, 贾伟, 田耕. 丙酮酸钙的应用与生产[J]. 食品科学, 2000, 21(3): 9-10.