

离子液中蔗渣纤维素的硫酸酯化及抑菌效果研究

邱常玲, 王兆梅, 郭祀远

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要:从蔗渣中分离出蔗渣纤维素(BC),以离子液[BMIM]Cl为反应介质对BC进行均相硫酸酯化得到蔗渣纤维素硫酸酯(BCS),采用 ^{13}C NMR光谱对产物BCS进行结构表征,通过体外抑菌试验考察BCS的抗菌活性。结果表明,BCS结构中硫酸酯取代基分布随反应时间的变化而不同,硫酸酯化取代首先发生在C6位,然后在C2位、C3位;BCS对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有一定的抑制作用,抑菌圈直径随BCS浓度的升高而增大。

关键词: 蔗渣; 纤维素; 硫酸酯化; 抑菌

中图分类号: TS249.4 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0535-04

Study on the Sulfation of Bagasse Cellulose in Ionic Liquid and Antibacterial Activity of Sulfated Cellulose

QIU Chang-ling, WANG Zhao-mei, GUO Si-yuan

(College of Light Industry & Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Bagasse cellulose sulfate (BCS) was achieved via homogeneous sulfation of Bagasse Cellulose (BC) in ionic liquid [BMIM]Cl and structurally elucidated by ^{13}C NMR. It was found that the substituent distributions of sulfate differed with the reaction time, firstly occurring in C6 place, and then in C2 and C3 places. In vitro investigation of the antibacterial activities of BCS showed that BCS could inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Its antibacterial activity would be improved by increasing the BC concentration.

Key words: bagasse; cellulose; sulfation; antibacterial

纤维素是自然界中最为丰富的可再生资源,越来越多的国家选择把农林废弃物等可再生资源的转化利用列入社会经济可持续发展的重要战略中。蔗渣是制糖工业的副产品,是甘蔗机械压榨后所剩的主要部分,在我国属于一种重要的纤维质农业固体废弃物。通常蔗渣作为锅炉燃料和造纸原料,但其附加值不高。近年来,将蔗渣各组分分开利用以提升其附加值成为一种研究趋势。蔗渣中含有丰富的纤维素,故蔗渣作为一种纤维素原料具有很大的优越性,同时也提高了其作为农副产物的利用价值。

纤维素是脱水葡萄糖单元(AGU)通过 β -1,4糖苷键连接的高分子多糖。通过化学修饰的方法可以大大提高纤维素的附加值。纤维素硫酸酯(Cellulose Sulfate, 简称CS)是纤维素结构中的羟基部分或者完全被硫酸酯基团取代所得到的硫酸酯多糖^[1]。研究表明,CS具有广泛的生物学活性如抗凝血、抗病毒和抗肿瘤等,分子量和硫酸酯基取代度的大小是决定其生物活性最重要的结构因素^[2-3]。通过分子修饰提高硫酸

酯基取代度,这是提高CS生物活性的有效途径。然而,到目前为止的纤维素硫酸酯化反应大多都是在多相体系中的,造成反应不同步、取代度低和取代不均匀等,从而影响了CS的生物活性。因此,本研究引入能溶解纤维素的离子液(Ionic Liquid, IL),构建纤维素硫酸酯化的均相反应体系,通过均相反应效率高、取代均匀和有效保护主链不发生降解等特点获得能满足生物活性结构特点的蔗渣纤维素硫酸酯。IL是在室温下呈液态的完全由离子构成的熔盐体系,IL具有强极性、不挥发、对无机和有机化合物有良好的溶解性和对绝大部分试剂稳定等优良特性,被认为是代替易挥发化学溶剂的绿色溶剂^[4]。最近,Swatloski等^[5]发现氯化1-丁基-3-甲基咪唑鎓盐([BMIM]Cl)离子液体可溶解纤维素;任强等^[6]表明咪唑基离子液体对纤维素具有较好的溶解性能。

本文以天然甘蔗渣纤维素为原料,以离子液[BMIM]Cl为反应介质,构建纤维素硫酸酯化的均相反应体系从而获得能满足生物活性结构特点的蔗渣纤维素硫酸酯,考察蔗渣纤维素硫酸酯对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用。

收稿日期: 2008-01-21

作者简介: 邱常玲,女,硕士研究生

1 实验材料与方法

1.1 主要实验材料与仪器

甘蔗渣, 广东江门甘化厂提供; 1-丁基-3-甲基咪唑氯化物 ([BMIM]Cl), 杭州科默化学有限公司; 甲苯、N,N-二甲基酰胺 (DMF)、醋酸钠、乙醇、氢氧化钾、氢氧化钠等均为分析纯, 广州化学试剂厂。大肠杆菌 (*Escherichiacoli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由华南理工大学轻工与食品学院微生物实验室提供。

RE-85A 真空旋转蒸发仪; Vector-33 型红外光谱分析仪; XP-213 型偏光显微镜; DRX-400 型核磁共振分析仪; DZF-6021 型真空干燥箱; S312-250P 强力搅拌器。

1.2 实验方法

1.2.1 蔗渣纤维素的分离

(1) 蔗渣预处理: 用两级筛选的方法将取自甘蔗制糖厂的蔗渣中的泥块和蔗皮等杂质去除, 得到干净的蔗渣原料。将蔗渣充分晒干、粉碎, 将粉碎后的蔗渣过筛 0.4~0.8 mm。

(2) 脱蜡: 将粉碎后的蔗渣用甲苯-乙醇 (2:1, V/V) 进行索氏抽提 6 h, 然后置于 60 °C 鼓风干燥箱中鼓风干燥 16 h。

(3) 去除水溶性半纤维素: 将适量的水加入到已脱蜡的蔗渣中, 55 °C 下浸泡 2 h, 过滤分离出滤渣。

(4) 脱木质素: 滤渣用 1.3% 的亚氯酸钠处理, 10% 的醋酸调节 pH 为 3.5~4.0, 75 °C 浸泡 2 h 后过滤分离。

(5) 提取纤维素: 将滤渣分别用 10% KOH 和 10% NaOH, 20 °C 下浸泡 10 h, 过滤, 用蒸馏水和 95% 的乙醇洗涤, 60 °C 下鼓风干燥 16 h, 即得蔗渣纤维素 (Bagasse cellulose, BC)。

1.2.2 蔗渣纤维素的溶解

将加有 [BMIM]Cl 离子液体的三颈圆底烧瓶置于 100 °C 油浴锅中加热, 机械搅拌下逐渐加入干燥的 BC。通过偏光显微镜观察 BC 在离子液体中的溶解情况^[7]。

1.2.3 蔗渣纤维素的硫酸酯化

纤维素硫酸酯化过程包括三个步骤^[8]: 酯化剂的制备、硫酸酯化反应和产物后处理。

(1) 酯化剂的制备: 将带有冷凝管和机械搅拌装置的四颈烧瓶置于盐水冰浴中, 加入无水 DMF, 在氮气保护下边搅拌边缓慢滴加氯磺酸, 即得到 ClSO₃H-DMF 酯化剂。

(2) 硫酸酯化反应: 向纤维素-离子液体溶液加入适量酯化剂, 室温下搅拌反应。反应完成后, 将产物倒入的醋酸钠-乙醇溶液, 搅拌过滤, 用无水乙醇洗涤沉淀多次, 即得纤维素硫酸酯粗品。

(3) 产物后处理: 将制得的粗品用蒸馏水溶解, NaOH 调节 pH 后进行透析, 将透析液减压蒸发浓缩, 后真空下干燥即获得透明薄膜状产物, 即蔗渣纤维素硫酸酯 (Bagasse cellulose sulfate, BCS)。

1.2.4 蔗渣纤维素硫酸酯的抑菌实验

将制得的 BCS 样品溶解并配制成 1 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL 3 个浓度梯度的药液, 无菌蒸馏水作对照。用滤纸制成 5 mm 直径的圆形滤纸片, 灭菌后浸渍在各浓度溶液中备用。将活化后的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌供试斜面培养基, 用无菌生理盐水制成菌悬液, 然后将菌悬液均匀涂抹于无菌的牛肉膏蛋白胨平面培养基上, 把上述浸渍过的滤纸片放入培养基表面, 每皿 4 片 (3 个浓度各 1 片, 另 1 片为对照), 每一处理重复 3 次, 37 °C 恒温培养 24 h。用十字交叉法测量抑菌圈直径, 比较抑菌效果。

2 结果与讨论

2.1 蔗渣纤维素的分离与表征

蔗渣经过脱蜡、脱木质素和去除半纤维素等处理, 得到纯度较高的 BC, 经过产物质量分析, 蔗渣纤维素的产率为 32.1%。

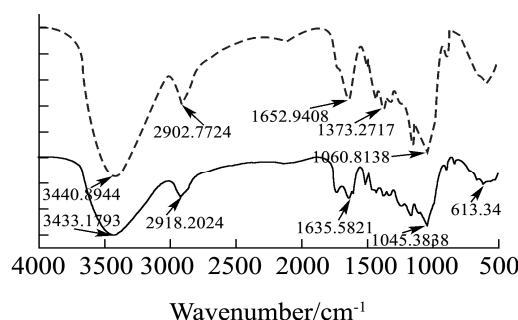


图1 蔗渣和蔗渣纤维素的红外光谱图

Fig.1 IR spectrum of bagasse and BC

图1比较了蔗渣与BC的IR谱图。从图中可以看出, 在BC的IR谱图中, 不存在901~1050 cm⁻¹处的吸收峰, 表明BC中不存在半纤维素^[9,10]; 1635 cm⁻¹是木质素的特征吸收峰^[10,11], 蔗渣经处理后在该处无明显吸收峰, 表明BC中木质素被去除; 在3300~3498 cm⁻¹处有吸收峰, 表明蔗渣和处理后的蔗渣中均有纤维素的存在。

2.2 离子液中蔗渣纤维素的溶解

离子液体[C₄mim]Cl是由1-丁基-3-甲基咪唑阳离子和氯阴离子组成的离子型化合物^[12], 其结构如图2(a)

所示。纤维素是葡聚糖单元通过 β -1,4糖苷键连接起来的聚合物如图2(b), 蔗渣纤维素的聚合度在700~900之间, 属于天然高分子聚合物。

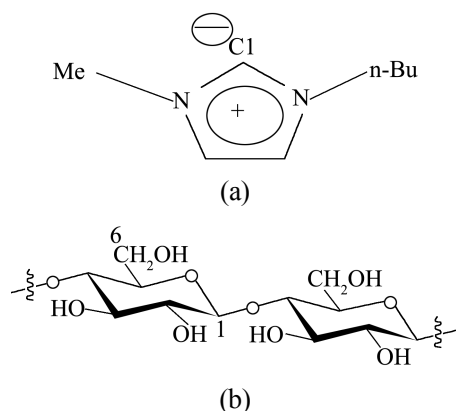


图2 [C₄mim]Cl(a)和BC(b)结构图

Fig.2 Molecular structures of [C₄mim]Cl(a) and BC(b)

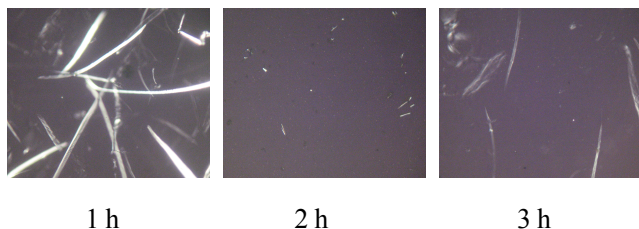
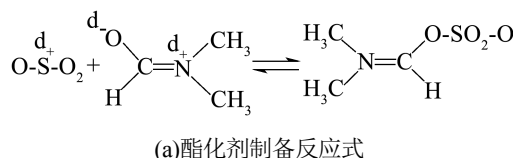


图3 不同溶解时间下纤维素离子液体体系偏光显微镜图

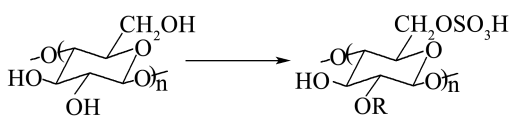
Fig.3 Polarizing microscope diagrams of BC dissolved in ionic liquid for different time

图3是不同溶解时间下纤维素离子液体体系的偏光显微镜图。由于纤维素具有高度的结晶结构, 在偏光显微镜下可呈光亮的亮点, 因此可通过偏光显微镜观察BC在离子液中的溶解过程。如图3所示, 当溶解时间为1 h时可观察到离子液中有大量的纤维素, 在此阶段, 纤维素被离子液体浸湿, 首先发生润胀, 由纤维素丝组成的集束结构逐渐变得松散, 进而逐渐解离; 随着时间的延长, 当溶解2 h时, 纤维素开始溶解; 溶解时间为3 h时, 纤维素丝逐渐变细变短, 逐渐至溶解。

2.3 蔗渣纤维素的硫酸酯化与产物结构表征



(a)酯化剂制备反应式



R=SO₃H 或 H, n=3~30

(b) BC的硫酸酯化

图4 蔗渣纤维素硫酸酯的制备

Fig.4 (a) Preparation of esterifying agent

(b) sulfation of BC

酯化剂 ClSO₃H-DMF 是由 ClSO₃H 与 DMF 结合而成, 其中 ClSO₃H 在反应过程中起作用的为 SO₃, 即 SO₃ 中缺电子的硫原子结合到极性溶剂 DMF 中带负电荷的氧原子上^[13], 其制备过程反应式如图4(a)所示。

纤维素是含有多个羟基的多元醇, 当它与酯化剂 ClSO₃H-DMF 作用后便生成纤维素硫酸酯。在制备 BCS 的反应过程中, 根据不同的硫酸酯化条件, BC 中 AGU 上羟基被取代的数目不同。其中 C6 位上的伯羟基优先发生硫酸酯化反应, 其次是 C2 位上的仲羟基、C3 位的叔羟基^[14], 其反应过程如图4(b)。通过控制酯化反应的时间, 可以得到不同取代度的 BCS。酯化反应时间为0.5 h、2 h和4 h时得到的BCS分别用BCS1、BCS2和BCS3来表示。通过¹³C NMR光谱对不同硫酸酯化时间得到的BCS进行结构表征。

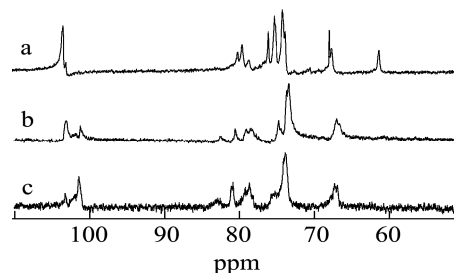


图5 不同酯化时间纤维素硫酸酯的¹³C NMR

(a为BCS1; b为BCS2; c为BCS3)

Fig.5 ¹³C NMR spectra of BCS with different sulfation time (a: BCS1; b: BCS2; c: BCS3)

图5为不同硫酸酯化时间得到的BCS的¹³C NMR谱图。 $\delta=102$ 、73.8、74.1、79.5、77.4和60.6 ppm的吸收峰分别表示纤维素骨架C1~C6位的吸收^[15]。从图中可发现, BCS1的¹³C NMR谱图如a, $\delta=60.6$ ppm处有一个吸收峰存在, 这个峰是C6位的吸收峰, 同时在 $\delta=66$ ppm左右的吸收峰表示被取代的C6, 即C6S。这两个峰的存在表明C6位发生了酯化取代反应, 但反应刚开始, 只有部分C6位被取代。BCS2的谱图如b, $\delta=60.6$ ppm的吸收峰已经消失, 而在 $\delta=66$ ppm处的峰形则有所增强, 这说明C6位的取代已经完全。c与b的谱图进行比较, 发现 $\delta=74.1$ ppm处的峰消失, 这说明C2处的羟基已被完全取代。在 $\delta=82.5$ ppm处出现了新的吸收峰, 这是 $\delta=73.8$ ppm处C3位的化学位移造成的, 说明C3位的羟基被部分取代。

2.4 蔗渣纤维素硫酸酯的抑菌效果

由表 1 可以看出,不同酯化时间的 BCS 在各浓度下对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有一定的抑制作用,抑菌圈直径随 BCS 浓度的升高而增大。由表可知,10 mg/mL、20 mg/mL 浓度的 BCS 其抑菌效果明显好于 1 mg/mL 浓度的 BCS; 不同酯化时间的 BCS 在相同浓度下对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果无明显区别; BCS 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果有略微不同,这可能与细菌的代谢途径有关。

表 1 蔗渣纤维素硫酸酯抑菌效果比较

Table 1 Antimicrobial Activity of different BC											
供试		BCS1			BCS2			BCS3			
菌株	空白	1	10	20	1	10	20	1	10	20	
A	-	6.5	12.2	14.1	6.5	12.0	14.6	6.8	12.9	15.0	
B	-	6.2	12.1	13.7	6.3	12.2	14.0	6.5	12.1	14.5	

注: (1) A 为大肠杆菌, B 为金黄色葡萄球菌; (2) 表内数值为抑菌圈直径/mm; -表示无抑菌圈。

3 结论

(1) 蔗渣经预处理、脱蜡、去除水溶性物质、脱木质素后得到纤维素, 产率为 32.1%。通过红外光谱分析表明, 蔗渣和处理后的蔗渣中均存在纤维素。

(2) 将不同酯化反应时间得到的蔗渣纤维素硫酸酯进行 ¹³C NMR 分析, 结果表明, 硫酸酯取代基分布随反应时间的变化而不同, 硫酸酯化取代首先发生在 C6 位, 然后在 C2 位、C3 位。

(3) 体外抑菌试验结果表明, 蔗渣纤维素硫酸酯对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有一定的抑制作用, 抑菌圈直径随 BCS 浓度的升高而增大。

参考文献

[1] Hayashi K, Hayashi T, Kojima I. A nature sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina Platensis* in vitro and exvivo evaluation of antiherpes simplex virus and antihuman immunodeficiency virus activities [J]. *Aids Res Hum Retroviruses*, 1996, 12 (15) : 1463

[2] Wang, Z.M., Li, L. Zheng, B.S. Normakhamatov, N., & Guo, S.Y. Preparation and anticoagulation activity of sodium cellulose sulfate [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, 41(4): 376-382

[3] Ren, J.L., Sun, R.C., Liu, C.F., Lin, L., & He, B.H. Synthesis and characterization of novel cationic SCB hemicelluloses with a low degree of substitution [J]. *Carbohydrate Polymer*, 2007,67(3): 347-357

[4] Liu, C. F., Sun, R. C., Zhang, A.P., & Ren, J.L. Preparation of

sugarcane bagasse cellulosic phthalate using an ionic liquid as reaction medium[J]. *Carbohydrate Polymer*, 2007,68(1): 17-25

[5] Swatloskir P, Spearsk K, Holbreyj D. Dissolution of cellulose with ionic liquids [J]. *J Am. Chem. Soc.*, 2002, (124):4974-4975

[6] 任强,武进,张军,等.1-烯丙基-3-甲基咪唑室温离子液体的合成及其对纤维素溶解性能的初步研究[J].*高分子学报*, 2003(3):448-451

[7] Wasserscheid P, Keim W. Ionic liquids – new solutionsfor transition metal catalysis [J]. *Angew Chem. Int. Ed*, 2000, (39): 3772- 3789

[8] 王兆梅,李琳,胡松青,等.抗凝血硫酸化微晶纤维素的制备[J].*现代化工*,2003,23(2):30-33

[9] Vieira, R. G. P., Rodrigues, F. G., Assunc, R. M. N., Meireles, C. S., Vieira, J. G., & Oliveira, G.S. Synthesis and characterization of methylcellulose from sugarcane bagasse cellulose [J]. *Carbohydrate Polymer*, 2007, 67(2): 182-189

[10] Carlos, M., Marcelo, M., Oscar, A. & Leif, J. J. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 1767-1773

[11] Rodrigues, F. G., Silva, R. C., & Meireles, C. S. Water Flux trough blends from waste materials: cellulose acetate (from sugar cane bagasse) with polystyrene (from plastic cups) [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2005, 96(2): 516-522

[12] Zhang, H. Wu, J. Zhang, J., & He, J.S. 1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride Room Temperature Ionic Liquid:A New and Powerful Nonderivatizing Solvent for Cellulose [J]. *Macromolecules*, 2005, 38, 8272-8277

[13] Zhang, J., Yao S.-J., & Guan, Y.-X. Preparation of macroporous sodium cellulose sulphate/poly (dimethyldiallylammonium chloride) capsules and their characteristics [J]. *Journal of Membrane Science*, 2005, 255(1): 89-98

[14] Khan, M. A., Ashraf, S. M., & Malhotra, V. P. Development and characterization of a wood adhesive using bagasse lignin [J]. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2004, 24(6): 485-493

[15] Jose, A.S., Diane, M.C. & Alla, A.Two Novel Vaginal Microbicides (Polystyrene Sulfonate and Cellulose Sulfate) Inhibit *Gardnerella vaginalis* and Anaerobes Commonly Associated with Bacterial Vaginosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46 (8): 2692-2695.