

Synthesis of Edible Antistaling Agent CTS-*cys* for Fruits and Vegetables

Cankai Li^{1*}, Mengxi Lin^{2*}, Wei Feng¹, Yi Liu^{1#}

¹School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan Guangdong

²School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan Guangdong

Email: #liuyi915@126.com, #Liuyi@gdpu.edu.cn

Received: May 8th, 2017; accepted: May 23rd, 2017; published: May 26th, 2017

Abstract

The *L-cys* modified CTS (CTS-*cys*) with the content of thiol up to 333 $\mu\text{mol/g}$ was prepared by chemical modification, which made use of good film formation, bacteriostasis of chitosan (CTS) and good antibacterial, antioxidant of *L-cysteine* (*L-cys*). The inhibitory effects of CTS, *L-cys* and CTS-*cys* on *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* were studied by the method of inhibition zone. The experimental results as follows: *L-cys* had good antibacterial activity to the three strains in the tested range; CTS-*cys* had good antibacterial effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and the maximum inhibition rate was 89%, 92.9%, while the maximum inhibition rate of CTS-*cys* against *Bacillus cereus* was only 60.5%. The maximum inhibition rate of CTS to three strains was lower than 50%, and the inhibitory effect was poor. Chitosan cysteine derivatives have largely coordinated the bacteriostasis of cysteine and greatly enhanced the bacteriostatic ability of chitosan.

Keywords

Modified Chitosan, Cysteine, Antistaling Agent, Fresh-Cut Fruits, Antibacterial Property

可食用果蔬保鲜剂CTS-*cys*的合成

李灿楷^{1*}, 林梦夕^{2*}, 丰伟¹, 刘意^{1#}

¹广东药科大学医药化工学院, 广东 中山

²广东药科大学食品科学学院, 广东 中山

Email: #liuyi915@126.com, #Liuyi@gdpu.edu.cn

收稿日期: 2017年5月8日; 录用日期: 2017年5月23日; 发布日期: 2017年5月26日

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 李灿楷, 林梦夕, 丰伟, 刘意. 可食用果蔬保鲜剂 CTS-*cys* 的合成[J]. 化学工程与技术, 2017, 7(3): 99-107.
<https://doi.org/10.12677/hjct.2017.73016>

摘要

利用壳聚糖(CTS)良好的成膜, 抑菌性和L-半胱氨酸(L-cys)良好的抑菌, 抗氧化性, 通过化学改性法制备了巯基含量高达333 $\mu\text{mol/g}$ 的L-cys改性CTS (CTS-cys)。采用抑菌圈法研究了CTS、L-cys和CTS-cys对大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果。实验结果表明: 在被测试范围内, L-cys对三种菌株均有很好抑菌性; CTS-cys对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有较好抑菌效果, 最大抑菌率为89%, 92.9%, 对蜡样芽孢杆菌的最大抑菌率只有60.5%; CTS对三种菌株的最大抑菌率均在50%水平以下, 抑菌效果差。壳聚糖半胱氨酸衍生物很大程度上协同了半胱氨酸的抑菌性, 大大提高了壳聚糖的抑菌能力。

关键词

改性壳聚糖, 半胱氨酸, 保鲜剂, 鲜切水果, 抑菌性能

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

壳聚糖(chitosan, CTS)是生物界中唯一大量存在的天然碱性多糖, 无毒无味、可生物降解、生物相容性好、成本较低, 具有优良的分散性、保湿性、成膜性、抗菌性等诸多优点, 在医药、纺织和食品等领域有着广泛的应用。用壳聚糖进行涂膜保鲜[1] [2], 其膜层具有通透性、阻水性, 可以对各种气体分子增加穿透阻力, 形成了一种微气调环境, 是果蔬组织内的二氧化碳含量增加, 氧气含量降低, 抑制了果蔬的呼吸代谢和水分散失, 减缓果蔬组织和结构衰老, 从而有效地延长果蔬的采后寿命。单一膜对水果有一定的保鲜作用, 但壳聚糖膜自身有一些缺点如成膜保湿性, 机械去强度等性能差, 抑菌范围窄等, 通过添加一定的功能改良剂, 能够改善这些缺点, 开发可食用保鲜剂[3] [4] [5] [6]。例如: 李满林[7]采用一锅法将氨基硫脲接入壳聚糖结构得其衍生物, 对细菌有一定的抑菌活性, 但低于原料壳聚糖, 抑菌性不足; 又如, 羧基化壳聚糖[8]具有良好的物理化学及生物学性质, 但壳聚糖羧基化反应过程存在壳聚糖降解、取代基种类较少、产物取代度偏低等现象。

L-半胱氨酸(L-cystine)是一种具有生理功能且在自然界广泛存在的重要物质。在动植物体内能够起到防御有害物质和增加活力的作用, 也是组成蛋白质的20多种氨基酸中唯一具有活性巯基(-SH)的氨基酸, 广泛应用于食品、药物和化妆品中[9]; L-半胱氨酸上的还原性-SH使其能够抑制水果的酶促褐变现象[10] [11], 此外, 还具有一定的抑菌作用, 其类SOD活性也最高, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌都有很强抑菌作用。但由于L-cys为氨基酸类小分子物质, 其水溶液涂在水果表面不能形成保护膜, 无法直接做保鲜剂使用; 改性L-cys对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有抑制作用[9], 因此, 本文通过化学修饰法, 制备可用于水果保鲜的改性壳聚糖(CTS-cys), 并考查其相关性能[12] [13] [14]。

2. 实验部分

2.1. 材料

2.1.1. 主要仪器与试剂

傅里叶变换红外光谱仪(Perkin-Elmer240Q, 美国PE公司)、紫外可见分光光度计(U-3900, 日本日立

公司)、冷冻干燥机(LCT-10C, 北京四环科学仪器厂有限公司)、超净工作台(SW-CJ-2F, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)、恒温培养箱(SPX250B-2, 上海福玛实验设备有限公司)、手提式压力蒸汽灭菌器(XFS-280B, 浙江新丰医疗器械有限公司)。

CTS, *L-cys*, 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDAC), 氯化钠, 氢氧化钠, 碘, 碘化钾, 硫代硫酸钠: 均为分析纯试剂(AR), 购自于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。可溶性淀粉, 营养琼脂: 均为食品级, 成都市科龙化工试剂厂生产。

2.1.2. 测试菌株

革兰氏阴性大肠杆菌, 革兰氏阳性金黄色葡萄球菌, 蜡样芽孢杆菌: 均由广东药科大学食品学院微生物实验室提供。

2.2. CTS-*cys* 的合成

将 CTS 溶于 0.1% HCl 溶液配成 1.0% (W/V) 壳聚糖溶液, EDAC 经室温平衡后, 按摩尔比 1:1.2 (CTS:EDAC) 直接粉末加入, 室温下活化 45 分钟[15]; 再以质量比为 2:1 (CTS:*L-cys*) 将称量好的 *L-cys* 溶解后缓慢加入, 并充分搅拌; 室温下反应 3 小时后, 得到粗产物, 将粗产物倒入大量乙醇中, 抽滤, 得到沉淀产物并装入已验漏的透析袋中。用 1 mM HCl (pH = 4) 溶液透析 1 次, 后用含 1% NaCl 的 1 mM HCl 溶液透析 1 次, 再用含 0.5% NaCl 的 1 mM HCl 溶液透析 1 次, 透析间隔 24 h, 透析环境最好为低温且避光。透析好的样品分瓶装好并进行冷冻干燥, 得到新鲜 CTS-*cys* 于 4°C 保存备用。

2.3. 测试与表征

2.3.1. 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析

分别配制质量分数均为 1.000% 的 *L-cys*、CTS 和 CTS-*cys* 水溶液, 各取适量涂膜于玻璃片上, 待冷风吹干后在玻璃片上成膜, 用镊子小心撕下透明的薄膜, 以空气为参比进行背景扫描, 用 FTIR 对待测样品进行红外光谱测定。

2.3.2. 紫外-可见光光谱分析

分别取适量 *L-cys*、CTS 和 CTS-*cys* 制备成质量分数为 0.001% 的水溶液, 以超纯水为参比建立基线, 在 200~800 nm 波长下进行扫描, 观察衍生物的最大吸收峰位置, 获取结构中相关基团的信息。

2.3.3. 巯基含量的测定

采用直接碘量法[16], 利用-SH 和 I_2 的氧化还原反应, 可用于测定巯基含量。称取适量 CTS-*cys*, 以 3:1000 的比例溶解于超纯水。用 1M HCl 调节 pH = 2~3 范围内, 后加入 2~5 滴 1% 淀粉溶液。用 1 mM 碘溶液滴定至溶液变为亮蓝色且 30 s 内不褪色。按公式(1-1)计算巯基含量。

$$n(-SH) = \frac{2 \times C(I_2) \times V(I_2) \times 10^{-3}}{m(\text{CTS}-cys)} \times 10^6 \quad (1-1)$$

式中: $n(-SH)$ 为聚合物中巯基的含量($\mu\text{mol/g}$); $C(I_2)$ 为碘溶液浓度(mol/L); $V(I_2)$ 碘液的体积(mL); $m(\text{CTS}-cys)$ 为壳聚糖半胱氨酸衍生物的质量(g)。

2.4. CTS-*cys* 的防褐变实验

配制质量分数为 1.000% 的 CTS-*cys*、CTS 水溶液。双蒸水作为空白对照液, 分别处理鲜切的苹果块(新产), 定期观察其对于鲜切苹果块的防褐变效果。

2.5. CTS-cys 的抑菌实验

采用抑菌圈法评价 CTS-cys 的抑菌效果。将 CTS-cys 溶于无菌水配制成浓度为 0.2%, 0.5%, 1%, 1.5% 溶液备用, 将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌菌种划线接种到平板, 37℃ 恒温培养 24 h。将样品液和固体培养基消毒数小时, 同时将钳下的抑菌环进行消毒, 进行完以上操作后, 在操作台内将抑菌环浸泡在样品液中, 待一段时间后, 将抑菌环移至装有细菌的培养基上, 每个浓度一个抑菌环, 加上一个空白抑菌环做对照, 再置于 37℃ 恒温箱中培养 24 h 后记录抑菌环半径, L-cys 和 CTS 样品采用上述方法同时进行实验。抑菌率按式(1-2)计算。

$$RI = \frac{D-d}{D} \times 100\% \quad (1-2)$$

式中: RI 为抑菌率; D 为对照菌落直径; d 为处理菌落的直径。

2.6. CTS-cys 对鲜切水果中 Vc 含量的影响

用不同浓度的改性壳聚糖保鲜剂(CTS-cys)对冬枣、苹果进行保鲜实验。采用碘量法[17]测定其果肉维生素 C 含量的变化。

3. 结果与分析

3.1. CTS-cys 的结构

3.1.1. 红外光谱分析

如图 1 所示, 壳聚糖谱图高波数段 3680~2950 cm^{-1} 为羟基的缔合峰, 同时与氨基的伸缩振动峰交盖, 这是由于分子中存在着羟基之间以及羟基与氨基之间的氢键缔合所致; 在壳聚糖改性后, 这部分的缔合峰明显变窄。在 1024 cm^{-1} 处的醇羟基 C-O 伸缩振动吸收峰强度变强, 说明-OH 上发生了反应, 再结合 1726 cm^{-1} 处出现了 C=O 特征吸收峰, 且强度明显增强, 可能是反应过程中生成了一定酯类。在 1631 cm^{-1} 处有较强的酰胺 I 吸收峰, 在 1517 cm^{-1} 处有酰胺 II 峰的峰位, 表明衍生物中可能形成了酰胺键(-NHCO-)。而在 2490 cm^{-1} 处有一小峰, 是-SH 的特征吸收峰, 综上推测, 壳聚糖上的氨基和 L-半胱氨酸上的羧基发生反应, 并以酰胺键的形式结合, 同时使 L-cys 上的巯基接到 CTS 上。

3.1.2. 紫外光谱分析

从图 2 可以看出: 壳聚糖、L-半胱氨酸的吸收光谱相似, 在 200~400 nm 波长范围内有明显吸收峰, 说明壳聚糖与 L-半胱氨酸有类似的发色基团。壳聚糖在 210 nm 有最大吸收峰, 是壳聚糖的最大吸收波长, 在 309 nm 也有一个吸收峰。L-半胱氨酸的在 210 nm 有-COOH 基团的最大吸收峰, 同时还有助色团-NH₂。CTS-cys 有两个吸收峰, 说明只有两个发色基团。酯基的最大吸收波长的最大值为 210 nm, 而 CTS-cys 的最大吸收波长在 209 nm, 该处可能为酰胺基的最大吸收。表明壳聚糖与 L-半胱氨酸之间发生了化学反应, 并可以推测是壳聚糖上的氨基与 L-半胱氨酸的羧基形成了酰胺键, 与红外光谱推测的结果相一致。

3.2. CTS-cys 的巯基含量

在反应物、反应时间、反应条件和后处理相同的前提下, 以标定后浓度为 0.001 mol/L 的碘溶液滴定称量后质量相近的 5 组样品(a~e)。结果显示(见图 3), 各组测定结果相近, 巯基含量都在 325 $\mu\text{mol/g}$ 水平上下浮动。含量范围为 316.27 ± 6.70 到 $332.10 \pm 3.06 \mu\text{mol/g}$ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)。

3.3. CTS-cys 对鲜切苹果块的防褐变实验

不同溶液对鲜切苹果块的防褐变效果如图 4, 用 CTS-cys 溶液处理的鲜切苹果块, 4~5 天时未出现明

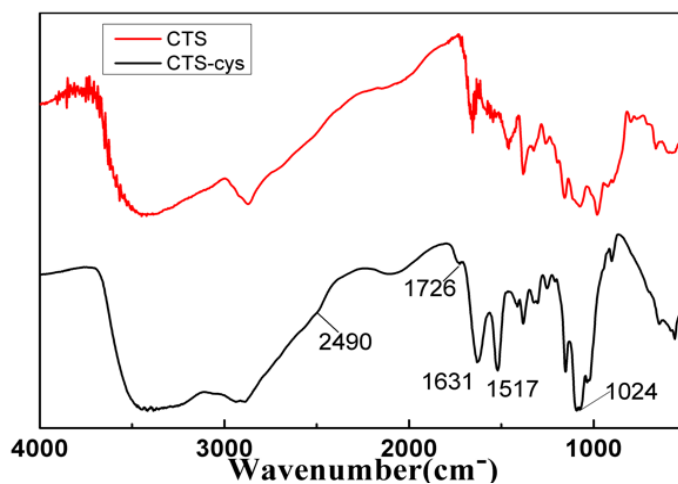


Figure 1. IR spectra of CTS and CTS-cys

图 1. CTS 和 CTS-cys 红外光谱

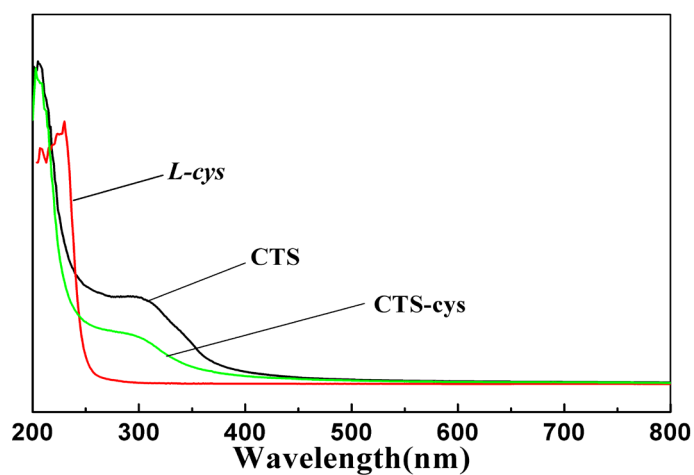


Figure 2. UV spectra of CTS, *L*-cys and CTS-cys

图 2. CTS, *L*-cys 及 CTS-cys 紫外光谱

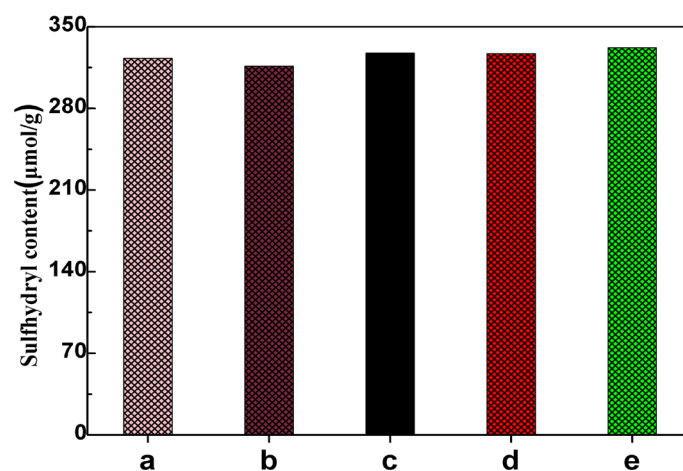


Figure 3. The thiol content of lyophilized samples of chitosan cysteine derivatives

图 3. 壳聚糖半胱氨酸衍生物冻干样品的巯基含量

显的褐变，而用 CTS 溶液或双蒸水处理的苹果块褐变明显。

3.4. CTS-cys, L-cys, CTS 的抑菌效果

3.4.1. 对大肠杆菌的抑菌效果

由图 5 可以看出，*L-cys* 和 CTS-cys 对大肠杆菌都有很好的抑菌效果，在测试浓度范围内，均能达到很高抑菌效果；CTS 对大肠杆菌的抑菌能力最弱。由抑菌率曲线图 4 可知，*L-cys* 和 CTS-cys 的抑菌率曲线趋势相同，都随浓度增大而上升，最高抑菌率可达到 100% 和 89%。*L-cys* 对大肠杆菌的抑菌效果最好， $w(L-cys)$ 为 0.5% 可达最佳抑菌效果，但在浓度为 0.2% 时抑菌率较低。CTS-cys 在 $w(CTS-cys)$ 为 1.5% 时可达最佳抑菌效果，在 0.2% 低浓度时，抑菌率比 *L-cys* 和 CTS 要高。而 CTS 的最高抑菌率只有 49.36%，远低于 *L-cys* 和 CTS-cys，抑菌率随浓度增大而增大，但增加幅度较小。相对于前期的工作中，通过化学



Figure 4. Effects of different solution on anti-browning of fresh-cut apple pieces

图 4. 不同溶液对鲜切苹果块的防褐变效果

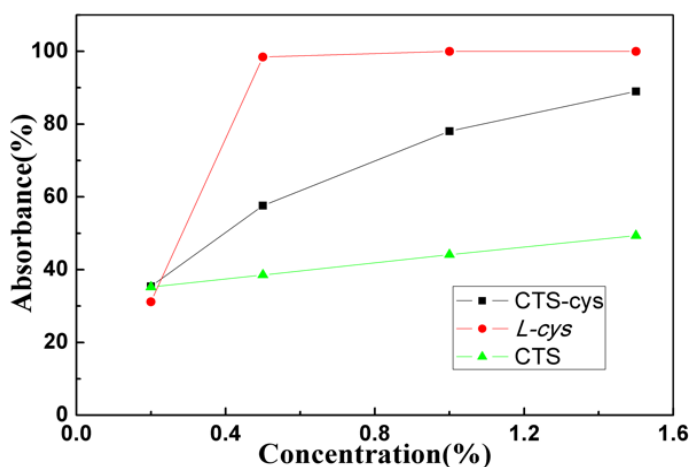


Figure 5. The inhibition rate curve of CTS, *L-cys* and CTS-cys against *Escherichia coli*

图 5. CTS、*L-cys* 和 CTS-cys 对大肠杆菌的抑菌率曲线图

改性法制得的可食用果蔬保鲜剂 SA-cys [18], 对大肠杆菌的抑菌效果要弱些。

3.4.2. 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果

如图 6, *L-cys* 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果很好, 在测试浓度范围内均为完全抑菌, $w(L-cys)$ 为 0.2% 即可达最佳抑菌效果; 而 CTS-cys 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果相对较弱, 最高抑菌率在 $w(CTS-cys)$ 为 1.5% 达 92.86, 在 $w(CTS-cys)$ 为 1.0% 可达较高的抑菌效果, 与 SA-cys 相比, CTS-cys 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果要好些; CTS 的抑菌率呈缓慢上升趋势, 但最高抑菌率只达 51.23%, 仅为 *L-cys* 抑菌效果的一半。

3.4.3. 对蜡样芽孢杆菌的抑菌效果

由图 7 可以看出: *L-cys*, CTS-cys, CTS 对蜡样芽孢杆菌均有一定的抑制效果, 其抑菌率随浓度增大而升高, 但变化不明显, 且效果较之对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果均降低, 相对而言, *L-cys*

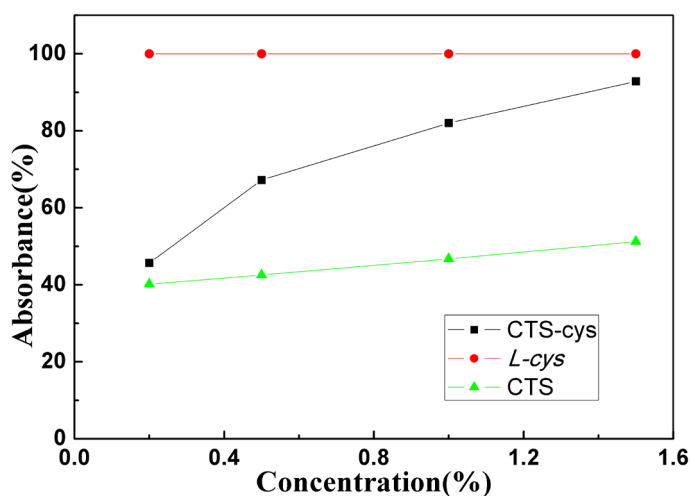


Figure 6. The inhibition rate curve of CTS, *L-cys* and CTS-cys against *Staphylococcus aureus*

图 6. CTS、*L-cys* 和 CTS-cys 对金黄色葡萄球菌的抑菌率曲线图

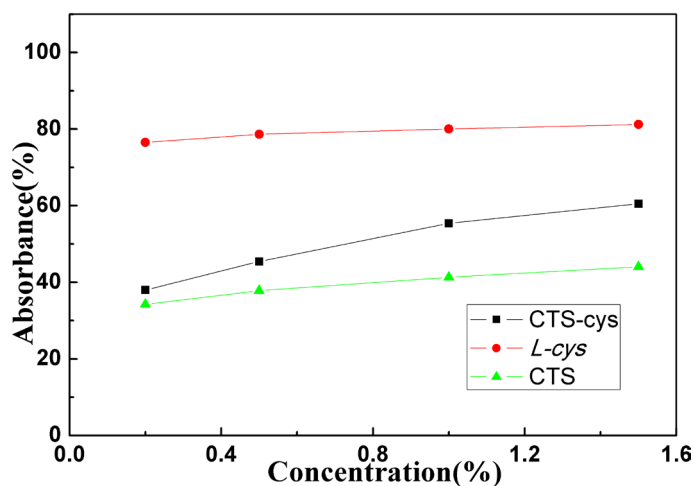


Figure 7. The inhibition rate curve of CTS, *L-cys* and CTS-cys against *Bacillus cereus*

图 7. CTS、*L-cys* 和 CTS-cys 对蜡样芽孢杆菌的抑菌率曲线图

的抑菌效果较好,最高可达81.22%;CTS-cys较L-cys要弱些,最高可达60.50%,而CTS的抑菌率为44.05%,仅为L-cys的一半。且CTS-cys的抑菌效果远不如SA-cys的好。

3.5. CTS-cys对鲜切水果中Vc含量的影响

用浓度为1.0~1.5%wt CTS-cys保鲜剂对冬枣进行涂膜保鲜处理,贮藏四天后测得其Vc含量为324.51 mg/100g, Vc含量下降了13.89%,空白组Vc含量下降34.77%。

用与上述同浓度的CTS-cys保鲜剂对苹果进行涂膜保鲜处理,贮藏四天后测得其Vc含量为2.25 mg/100g, Vc含量下降了43.75%,空白组Vc含量下降53.75%。

4. 结论

1) 通过化学改性法制备的CTS-cys分子结构中含有CTS和L-cys的特征基团,引入了-SH,其含量最高可达335.16 $\mu\text{mol/g}$ 。

2) CTS-cys具有良好的抑菌性,对3种菌株的抑菌效果从大到小为金黄色葡萄球菌,大肠杆菌,蜡样芽孢杆菌。对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最高抑菌率分别为92.86%和89.00%;而对蜡样芽孢杆菌的抑菌率仅为60.50%。综合分析各试样的抑菌效果,质量分数为1.0%~1.5%的CTS-cys水溶液最适宜作为鲜切苹果块的保鲜剂。

3) 巯基化壳聚糖引入亲水基团-SH后,形成的涂膜较致密,透氧能力降低,使果蔬处于稀氧环境中;另一方面-SH具有还原性,从而使果蔬中的酚类被氧化成醌的机率降低。在微酸性条件下,-SH还可增强壳聚糖的杀菌能力,从而减少果蔬的腐烂变质现象。

4) 水果中含有的维生素C,具有一定的还原性,易被空气中的氧气氧化,通过在水果表面涂布保鲜剂,形成致密的保护膜,相对于无保护膜的水果,涂膜后减少氧气的通过量,水果处于稀氧状态,Vc更多的被保留下来,使Vc含量的减少率下降;此外,与氧气接触面积的大小对Vc含量的变化有一定的影响。

基金项目

国家级大学生创新创业训练计划项目(项目名称:绿色环保型果蔬保鲜剂的研制;项目编号:201610573008)。

参考文献 (References)

- [1] 胡晓亮,周国燕.壳聚糖及其衍生物在果蔬贮藏保鲜中的应用[J].食品与发酵工业,2011,37(3):146-150.
- [2] 张洪,王明力,毛玉涛.壳聚糖复合涂膜在果蔬保鲜中的应用研究进展[J].贵州农业科学,2011,39(10):149-152.
- [3] 潘永贵,段琪,陈维信.壳聚糖涂膜处理对鲜切杨桃的保鲜效果[J].热带作物学报,2008,29(2):145-149.
- [4] 岳晓华,沈月新.可食性壳聚糖膜性能的研究[J].食品科学,2002,23(8):62-67.
- [5] 张举印,饶景萍,董晓庆,等.壳聚糖复合涂膜对红富士苹果保鲜研究[J].西北农业学报,2009,(5):354-358.
- [6] 李明春,许涛,辛梅华.壳聚糖及其衍生物的抗菌活性研究进展[J].化工进展,2011,30(1):203-209.
- [7] 李满林.氨基硫脲及氨基化壳聚糖衍生物的合成与应用研究[D]:[博士学位论文].杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [8] 袁文,尹学琼,贺永宁,等.壳聚糖羧基化的研究进展[J].化学试剂,2007,29(5):277-280.
- [9] 陈敏元.L-半胱氨酸及其应用的进展[J].化工进展,1992,12(2):26-30.
- [10] 孔维宝,陆健,赵海锋,等.L-半胱氨酸抑制多酚氧化酶的机制研究[J].食品科学,2007,28(11):66-70.
- [11] 李粉玲,蔡汉权,陈艳,等.火龙果果肉的酶促褐变及其抑制措施[J].湖北农业科学,2007,46(6):999-1002.
- [12] 陈月开.半胱氨酸的抑菌作用与类SOD活力[J].山西大学学报(自然科学版),2004,27(1):65-67.

- [13] 赵爱珍, 徐兴然, 韩文瑜. 二硫键对 Enterocin A 抗李斯特菌 LIN3 活性的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 182-185.
- [14] 孙浩, 王红, 孙祥煜. 壳多糖及其衍生物的复合抑菌作用[J]. 大连工业大学学报, 2008, 27(4): 301-303.
- [15] Jindal, A.B., Wasnik, M.N. and Nair, H.A. (2010) Synthesis of Thiolated Alginate and Evaluation of Mucoadhesiveness, Cytotoxicity and Release Retardant Properties. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **72**, 766-774. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.84590>
- [16] Bernkop-Schnürch, A., Kast, C.E. and Richter, M.F. (2001) Improvement in the Mucoadhesive Properties of Alginate by the Covalent Attachment of Cysteine. *Journal of Controlled Release*, **71**, 277-285. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00227-9)
- [17] 武文, 詹秀环, 宣亚文. 碘量法测定蔬菜中维生素 C 的含量[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(21): 9845-9846.
- [18] 刘意, 张翎琳, 郑传进, 等. 绿色环保型可食用果蔬保鲜剂 SA-cys 的合成[J]. 合成树脂及塑料, 2016, 33(4): 15-19.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjctet@hanspub.org