

从米根霉细胞壁寻找天然壳聚糖的研究(Ⅲ)*

陈世年

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011)

摘要 研究用米根霉发酵法生产壳聚糖. 经 72 h 摇瓶培养, 壳聚糖产量为 10.1 % (占生物量干重), 重均分子量为 5.37×10^5 , 粘度为 $240 \text{ mPa} \cdot \text{s}$, 脱乙酰基程度 92%.

关键词 壳聚糖, 米根霉, 发酵法

分类号 TQ 929.2

文[1~2]报道用红外光谱、热重分析及粉末 X-射线衍射研究证实米根霉细胞壁含有天然的壳聚糖. 米根霉是用于生产 L-乳酸等生化产品的菌种, 生物量培养条件简单, 本文报道通过发酵法生产壳聚糖的研究.

1 材料和方法

- (1) 菌种. 米根霉(*R. oryzae*)AS 3.3462. 系中国科学院微生物研究所保藏菌种.
- (2) 试剂. 所用试剂均为市售分析纯及生化试剂级. 壳聚糖标准样品(从虾壳中提取)购自美国 Sigma 公司.
- (3) 培养基. 斜面培养基为 Czapek, 发酵培养基为 YPG (pH 5.0).
- (4) 菌体生物量的获得. 于 32°C , $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下摇瓶培养 72 h.
- (5) 菌体细胞质、蛋白质、脂类物质的去除及细胞壁的制备. 按文[3~4]进行.
- (6) 壳聚糖的提取. 按文[5]进行.
- (7) 壳聚糖的红外光谱定性分析. 采用 PE 公司 FT-IR 1725X 红外光谱仪, KBr 压片法.
- (8) 壳聚糖脱乙酰基程度测定. 采用 Shimadzu 公司 UV-260 紫外可见吸收光谱仪按文[6]进行.
- (9) 壳聚糖的折光指数增量值(dn/dc)、第二维利系数(A_2)和重均分子量(\overline{M}_w)测定. 采用 Chromatix 公司 KMX-6 小角激光光散仪和 KMX-16 激光示差折射仪系统按文[7]测定.
- (10) 壳聚糖粘度(η)的测定. 用 NDJ-79 旋转式粘度计(上海同济大学机电厂)按文[5]测定.

2 结果和讨论

(1) 培养时间对壳聚糖产量及菌体生物量的影响. 米根霉培养时间为 72 h, 在 1 L 的培养基中, 壳聚糖产量 $m_{\text{壳}}$ (g) 及米根霉菌体生物量 $m_{\text{主}}$ (g) 达到最高峰, 此后呈逐步下降趋势(表

* 本文 1996-02-06 收到; 国家教委国内访问学者基金与福建省自然科学基金的资助项目

1). David等人^[8]发现大毛霉(*M. mucedo*)细胞内cAMP水平和细胞壁中壳聚糖所占比例成

表1 培养时间对壳聚糖产量及菌体生物量的影响^①

t/h	$m_{壳}/g$	$m_{菌}/g$	$m_{生}/g$	$W_{壳聚糖/细胞壁}/(\%)$	$W_{壳聚糖/生物量}/(\%)$
48	1.55	5.50	16.47	28.2	9.41
72	1.95	5.65	19.31	34.5	10.10
96	1.80	5.52	18.50	32.6	9.73
120	1.75	5.50	18.19	31.8	9.62
144	1.64	5.43	17.21	30.2	9.53

① 壳聚糖量、细胞壁产量 $m_{壳}(g)$ 及菌体生物量均按干燥至恒重时计算表示

反比. 当 cAMP 浓度升高时, 细胞壁中壳聚糖含量则下降. cAMP 是微生物对生长环境中葡萄糖浓度变化产生反映的一种细胞内信号分子. 当葡萄糖随着微生物培养时间的推移逐步被消耗时, 细胞内 cAMP 浓度逐步增高. 由此推论米根霉培养时间超过 72 h, 壳聚糖与菌体生物量的下降趋势是发酵培养基中葡萄糖浓度逐步降低所致. 因此用发酵法生产壳聚糖应在培养期间内根据糖耗补入一定量的可发酵性碳源.

(2) 生物素对壳聚糖产量及菌体生物量的影响. 丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶在微生物细胞内通过对 CO_2 的固定催化底物丙酮酸和磷酸烯醇式丙酮酸生成草酰乙酸, 弥补 TCA 循环中 C_4 化合物因生物体用于种生物合成用途的大量消耗, 起着糖代谢的回补作用.

生物素作为这两种酶的辅酶, 其功能在于介导底物丙酮酸、磷酸烯醇式丙酮酸的羧化作用, 把被 ATP 活化的羧基转移至羧基的受体物分子上. 本研究发现, 在 1 L 的发酵培养基中加入不同水平的生物素 $m_{生}$, 对壳聚糖产量及米根霉菌体生物量的提高都具有促进作用(表 2).

表2 生物素对壳聚糖产量及菌体生物量的影响

$m_{生}/mg$	$m_{壳}/g$	$m_{生}/g$
0.0	1.95	19.31
1.0	2.05	19.80
2.0	2.20	20.20
3.0	2.30	20.50

因此用富含生物素的废糖蜜来代替发酵培养基中的葡萄糖可能是一项降低生产成本的有待研究的措施.

(3) 亚胺环己酮对壳聚糖产量的影响. 据 Katz 等人^[9]的报道, 亚胺环己酮可以显著提高葡胺糖在构巢曲霉(*A. nidulans*)细胞壁中的含量. 然而在本研究的 1 L 的发酵培养基中加入不同水平的亚胺环己酮 $m_{亚}$ 对壳聚糖的产量并无提高作用(表 3).

表3 亚胺环己酮对壳聚糖产量的影响

$m_{亚}/\mu g$	$m_{壳}/g$
0.0	1.95
20.0	1.96
40.0	1.94
60.0	1.93
80.0	1.95

(4) 壳聚糖红外光谱定性研究. 从米根霉细胞壁提取的壳聚糖与用虾壳提取的标准样品壳聚糖作定性对比研究, 结果发现(图 1, 2)来源于米根霉细胞壁的壳聚糖的红外光谱符合其分子结构特征. 在 $1500 \sim$

600 cm^{-1} 的红外光谱指纹区中, 两种不同来源的壳聚糖均显示出具有相同的分子骨架. 然而在该区中, 发现发酵法生产的壳聚糖其表征伯胺基($R-NH_2$)的吸收谱带(1567.0 cm^{-1})相对强度明显大于由虾壳提取的壳聚糖, 并且表征乙酰胺基的红外吸收谱带(仅见表征酰胺 I 的吸收峰)也远少于虾壳来源的壳聚糖. 壳聚糖是天然线性多糖 α -几丁质经脱去乙酰基反应后得到的产物. 已知 α -几丁质的单体单元为 $(1 \rightarrow 4)\text{-2-乙酰胺-2-脱氧-}\beta\text{-D-吡喃葡萄糖}$, 脱去乙酰

基成为(1→4)-2-胺基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖. 脱乙酰基程度(Degree of Deacetylation, 简称为D. D值)的不同, 不仅造成产物结构及理化性质的差异, 同时, 也是衡量产品品质的标准

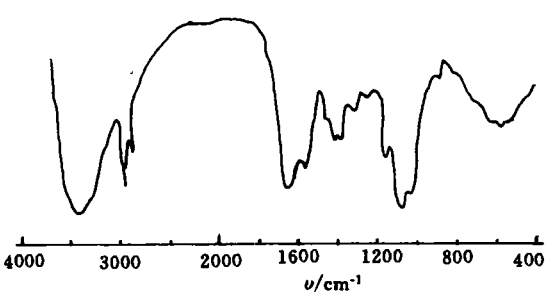


图 1 从米根霉细胞壁提取的壳聚糖的红外光谱

之一. 从红外光谱基团频率区所表征乙酰胺官能团谱带数量及伯胺基相对吸收强度的差别, 提示着从米根霉细胞壁提取的壳聚糖的 D. D 值高于美国 Sigma 公司的样品. 为了证实这一推测, 本研究作了两种不同来源的壳聚糖 D. D 值的测定(表 4).

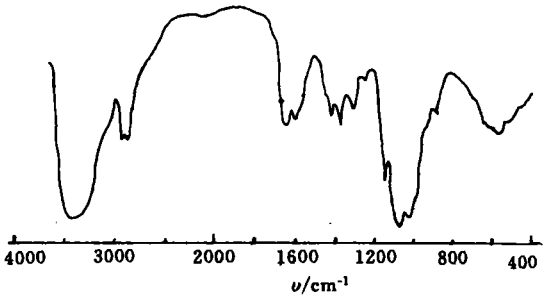


图 2 从虾壳提取的壳聚糖的红外光谱

表 4 壳聚糖的 D. D 值及粘度分析

样 品	D. D/(%)	η/mPa · s
壳聚糖(米根霉)	92	240
壳聚糖(虾 壳)	73	750

(5) 壳聚糖 D. D 值及粘度的测定. 两种不同来源的壳聚糖 D. D 值测定结果证实了红外光谱研究的推测, 实验表明发酵法生产的壳聚糖 D. D 值远高于来自虾壳的壳聚糖, 然而两者粘度值的测定却与 D. D 值成反比. 从理论方面而言, D. D 值高的壳聚糖胺基(-NH₂)含量高, 在粘度测定的酸介质(醋酸)中胺基被质子化成铵离子(-NH₃⁺)后, 其有效电荷密度的增加会使壳聚糖这种聚电解质溶液粘度增大^[10]. 因此从米根霉细胞壁提取出的壳聚糖 D. D 值与粘度成反比的现象必须从高分子的胶体化学角度作进一步研究, 有关这一问题的探讨待报道.

(6) 壳聚糖的重均分子量(\overline{M}_w)、折光指数增量(dn/dc)、第二维利系数(A₂)测定. 折光指数增量值及第二维利系数是研究高分子共聚物组成及化学结构、胶体化学性质的重要参数. 为进一步研究壳聚糖的物化性质, 本研究在测定壳聚糖重均分子量的同时, 也测定了其 dn/dc 及 A₂ 值(表 5), 有关从真菌细胞壁提取壳聚糖这一问题的研究国内外迄今未见报道.

表 5 壳聚糖的重均分子量、折光指数增量、第二维利系数的研究

样 品	\overline{M}_w	(dn/dc)/cm ³ · g ⁻¹	A ₂ /mL · mol · g ⁻²
壳聚糖(米根霉)	5.370 × 10 ⁵	0.145	1.8 × 10 ⁻³
壳聚糖(虾 壳)	8.505 × 10 ⁴	0.170	-5.4 × 10 ⁻³

3 结束语

微生物资源是地球上最大的生物基因库, 其大部分种类可以用工业发酵技术实现大规模培养. 因此运用微生物工艺学的基础理论, 通过发酵参数的控制, 可以达到壳聚糖集约化生

产. 与用虾、蟹等海洋甲壳纲动物外骨骼为原料的传统方法相比, 显然发酵法有着不可比拟的优势. 米根霉是生产 *L*-乳酸等生化产品的菌种. 有关厂家可在获取主产品的同时, 从废菌体中提取壳聚糖, 这不仅可以减少发酵下游处理过程中菌体对环境的排放量, 同时也可提高资源利用率和企业经济效益.

参 考 文 献

- 1 陈世年. 从米根霉细胞壁寻找天然壳聚糖的研究(I). 华侨大学学报(自然科学版), 1995, 16(3): 323~327
- 2 陈世年. 从米根霉细胞壁寻找天然壳聚糖的研究(II). 华侨大学学报(自然科学版), 1996, 17(1): 318~323
- 3 Bartnicki G S, Nikerson W J. Isolation composition and structure of cell wall of filamentous and yeast-like form of *mucor rouxii*. *Biochim. Biophys.*, 1962, (58): 102~119
- 4 Taylor I E R, Cameron D S. Preparation and quantitative analysis of fungal cell walls: strategy and tactics. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1973, 27: 243~259
- 5 Kishore D R, Dallas G H. An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi. *Process Biochem.*, 1993, 28: 115~118
- 6 Muzzarelli R A A, Rocchetti R. Determination of degree of deacetylation of chitosan by first derivative UV-spectrophotometry. *Carbo. Polymers.*, 1985: 461~472
- 7 Muzzarelli R A A, Catherine L, Monica E. The molecular weight of chitosans studied by laser light scattering. *Carbohydr. Res.*, 1987, 164: 433~442
- 8 David B D, Peter T B. Changes in the rate of chitin-plus-chitosan synthesis accompany morphogenesis of *mucor racemosus*. *J. Bacteriol.*, 1981, 146: 945~951
- 9 Katz D D, Rosenberger R F. Hyphal wall synthesis in *aspergillus nidulans* effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. *J. Bacteriol.*, 1971, 108: 184~190
- 10 王伟, 薄淑琴, 秦汶. 不同脱乙酰度壳聚糖 Mark-Houwink 方程的制定. 中国科学(B辑), 1990(11): 1126~1131

Searching after Natural Chitosan from Cell Wall of *Rhizopus Oryzae* (III)

Chen Shinian

(Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

Abstract Chitosan was produced in laboratory-scale from *Rhizopus oryzae* by fermentation. After shaking culture for 72 h, chitosan showed a yield of 10.1 % (in dry weight of biomass), an average molecular weight of $5.37 \times 10^5 \bar{M}_w$, a viscosity of 240 mPa · s, and a degree of deacetylation of 92 %.

Keywords chitosan, *Rhizopus oryzae*, fermentation