

从米根霉细胞壁寻找天然壳聚糖研究(I)*

陈世年

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011)

摘要 用热重法和红外光谱法研究米根霉细胞壁结构性多糖的组成. 实验表明米根霉细胞壁由几丁质和壳聚糖这两种多糖通过 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键连接构成. 米根霉细胞壁可以取代虾、蟹壳作为提取壳聚糖的原料.

关键词 壳聚糖, 几丁质, 细胞壁, 米根霉, 热重法, 红外光谱法

分类号 TQ 929.2

壳聚糖 $[(1\rightarrow4)\text{-}2\text{-氨基-}\beta\text{-D-葡聚糖}]$ 是一种生物聚合物和大分子阳离子型聚电解质. 近年来发现壳聚糖在医学、食品加工、化妆品、纺织品处理以及环境保护等领域具有广泛与独特的用途, 因而引起许多科学家和开发商的强烈兴趣^(1,2). 目前使用的壳聚糖主要来自虾、蟹等海洋甲壳纲生物的外壳中提取的几丁质[甲壳素, $(1\rightarrow4)\text{-}2\text{-}2\text{-酰胺-}2\text{-脱氧-}\beta\text{-D-葡聚糖}]$ 经高温浓碱处理后制备而成. 这种产品的原料来源受到虾、蟹生长周期、生长季节、气候条件及捕捞量等因素的制约; 生产工艺也存在大量耗酸、碱、能源, 成本高及造成环境污染、腐蚀设备等问题. 因此开辟生产壳聚糖原料的新资源, 尤其是寻找天然的壳聚糖成了当前所关注的焦点. Bartniki 等⁽³⁾曾报道组成鲁毛霉(*Mucor Rouxii*)细胞壁结构性多糖是几丁质和壳聚糖. 根据这一线索, 本研究按真菌系统发育的亲缘关系, 以在分类和鲁毛霉同属于接合菌纲(*Zygomycetes*)毛霉目毛霉科的发酵工业重要菌株米根霉为供试菌种, 用热重法研究其细胞壁结构性多糖的物相数量以及用红外光谱作定性分析来确定是否存在壳聚糖.

1 材料与方 法

1.1 菌种

米根霉(*Rhizopus Oryzae*) AS 3. 3462. 系中国科学院微生物研究所保藏菌种.

1.2 试剂

所用试剂均为市售分析纯和生化试剂级.

1.3 培养基

斜面培养基为 Czapek; 摇瓶培养基为 YPG, pH 5.0.

1.4 米根霉细胞生物量的获得

* 本文 1994-12-31 收到

采用摇瓶培养, $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 72 h , 32°C .

1.5 菌体细胞质、蛋白质、脂类物质的去除及细胞壁的制备

按文献[3],[4]进行.

1.6 样品处理

用热重法与红外光谱法分析米根霉细胞壁样品磨碎后 300 目过筛,于干燥器储存备用.

1.7 热重分析(TG, Thermogravimetry)

采用 DuPont 公司 1 090B 系统 951 热天平. 石英支持器、温度扫描从室温至 500°C , 升温速率 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 动态气氛(N_2) $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. 样品在热天平炉中 105°C 恒重 5 min 后, 从室温开始升温记录热重积分曲线和微商热重法(DTG, Derivative Thermogravimetry)曲线.

1.8 外光谱分析

采用 PE 公司 1 725 X FT-IR 红外光谱仪(与 IBM 386 计算机联机), KBr 压片法.

2 结果和讨论

2.1 米根霉细胞壁结构性多糖物相数量的热重分析

热重法是在程序控温下, 测量物质质量与温度关系的方法. 它根据在某一特定温度区域被测样品失重的最大速率, 可判别出聚合物、共聚物、混合物中物相的数量^[5]. 在本研究中样品热裂解的积分曲线分为两个阶段(图 1), 第一阶段出于在 $43.5 \sim 240.7^\circ\text{C}$ 区域, 第二阶段出现在 $240 \sim 280.4^\circ\text{C}$ 区域. 表明样品存在着两种不同分解特性的热活性物质. 微商热重法分析(图 2)

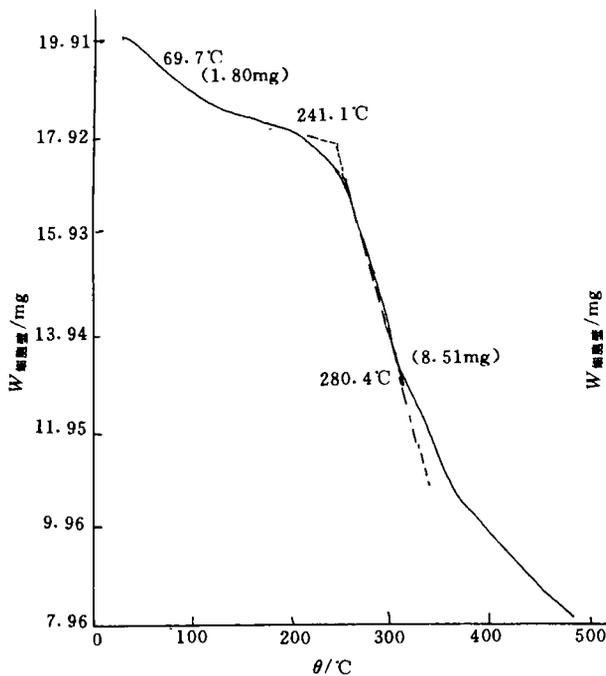


图 1 米根霉细胞壁的热重法分析

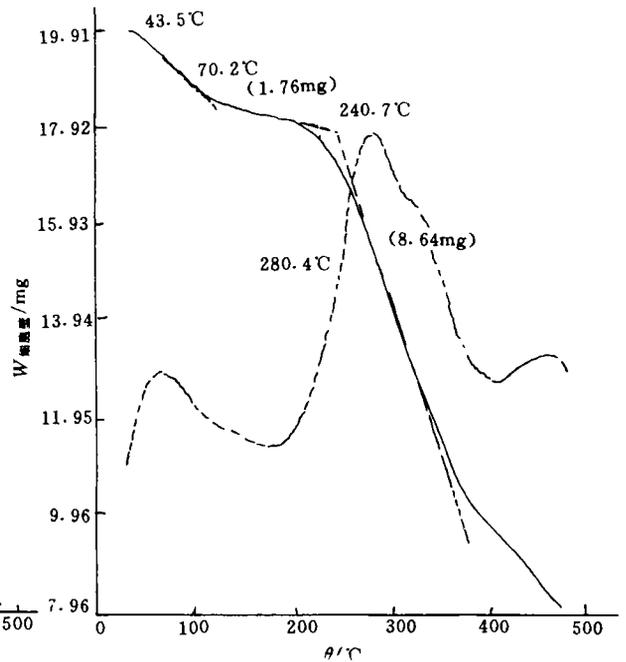


图 2 米根霉细胞壁的微商热重法分析

出现的两个峰(图 2 虚线部分)进一步说明米根霉细胞壁是一个由两个物相组成的体系. 为了证实这两个物相是多糖物质, 我们用红外光谱对同一样品作了定性研究.

2.2 米根霉细胞壁结构性多糖的红外光谱分析

红外光谱分析(图 3 和附表)首先发现几丁质存在于米根霉细胞壁中. 几丁质和壳聚糖的分子结构十分相似, 两者的区别仅在 β -D-吡喃葡萄糖环的第二碳原子连接着不同的基团(图 4); 前者为 R-NHCOCH₃, 后者是 R-NH₂. 因此几丁质与壳聚糖的红外吸收光谱必然十分

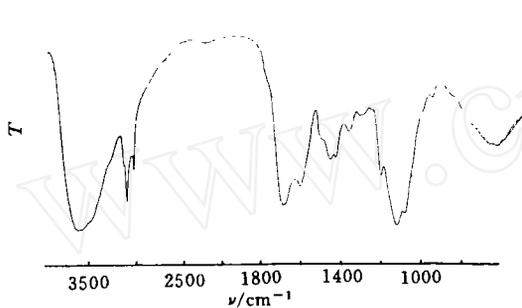


图 3 米根霉细胞壁的红外光谱

附表 米根霉细胞壁结构性多糖
组分的红外光谱分析

波数 ν/cm^{-1}	解 释
901.0	β -D-吡喃葡萄糖环
	$\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键
1 152.0	醚键(氧桥)
1 313.0	酰胺 I (C-N)
1 380.0	CH ₃
1 559.0	酰胺 I (NH)
1 652.0	酰胺 I (C=O)
2 851.0	CH ₂
3 448.1 } 3 475.1 }	OH

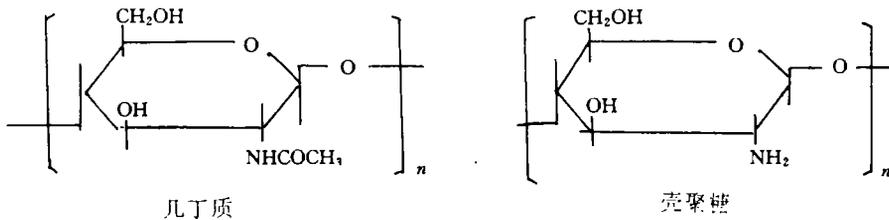


图 4 几丁质和壳聚糖的分子结构

相似, 差别也仅在第二碳原子连接的官能团对红外光谱的吸收. Michell 等⁽⁶⁾在研究雷丸 (*Plyporus Cookeet Mass.*) 细胞壁的多糖组分时, 发现表征壳聚糖的 R-NH₂ 在 1 590 cm⁻¹ 左右有一个特征吸收峰, 从而有别于几丁质的红外光谱. 由于生物聚合物、共聚物的红外光谱通常由数个吸收峰叠加组成一个分不开的宽峰⁽⁷⁾, 因此常规的红外光谱分析无法逐一鉴别出样品的每官能团. 如果米根霉存在着壳聚糖组分, 那么其 R-NH₂ 的红外吸收峰必然被重叠在几丁质乙酰胺基的酰胺 I (C=O) 和酰胺 I (NH) 之间. 从本研究的红外吸收谱图(图 3)的直观分析, 从 1 500~1 680 cm⁻¹ 区域的红外吸收由两个基部宽大的峰组成. 从数学观点, 红外光谱的吸收曲线属 Gauss ($D_1 = a_1 \exp - \{ -bv^2 \}$) 和 Lorentz ($D_2 = \frac{a_2}{1 + av^2}$) 函数型⁽⁷⁾, 这两种函数的图形与二阶导数图形极为相似. 据此本研究在计算机上取出 1 500~1 680 cm⁻¹ 这一波段的吸

收曲线进行放大分析,发现此段曲线存在多个拐点(图5),在此基础上经 Fourier 函数线型变换用二阶导数红外光谱进行分峰测定⁽⁷⁾, (图6)结果在 1594.67 cm^{-1} 处发现壳聚糖的 R-NH_2

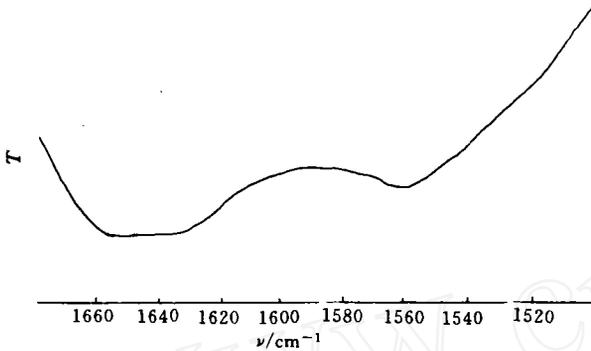


图5 1500~1680 cm^{-1} 波段红外
光谱吸收曲线放大分析

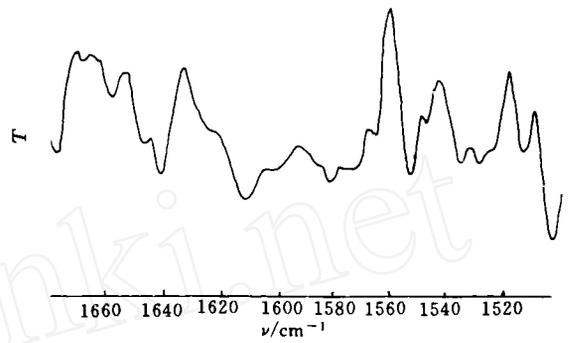


图6 米根霉细胞壁在1500~1680 cm^{-1}
的二阶导数红外光谱

的吸收波数. Davis, 等⁽⁸⁾发现鲁毛霉细胞壁的几丁质和壳聚糖的生物合成,其前体物质都是来自 UDP-GLCNAC(尿苷:磷酸-N-乙酰基-D-葡萄糖胺). 该前体物质先由几丁质合成酶催化合成新生态的(Nascent)的几丁质,然后新生态的几丁质由几丁质脱乙酰基酶催化脱去乙酰基生成壳聚糖,几丁质和壳聚糖的生物合成按先后作用(Tandem Action)机制实现. 几丁质脱乙酰基酶活性很低,一旦新生态几丁质结晶化形成微丝(Microfibrils)时,几丁质脱乙酰基酶就不起作用. 从在波数 901 cm^{-1} 发现的吸收峰(见附表),可以表明米根霉细胞壁中几丁质和壳聚糖两者通过 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键共价连接,一起作为细胞壁的支持物,即结构性多糖. 因此推断米根霉壳聚糖的生物合成与鲁毛霉同属一模式,此结论与 Bartnik^(9,10)用细胞壁化学组分成作为真菌分类的报道中对接合菌纲论述的观点吻合.

米根霉是发酵工业中用来生产 L-乳酸、丁烯二酸以及酿酒糖化的重要菌种. 用其发酵后的废菌体作为虾、蟹壳提取壳聚糖,不仅可以省略先提取几丁质再脱除乙酰基大量耗碱、酸、能源的两个操作单元,而且有助于用米根霉生产发酵产品的企业开展综合利用提高经济效益,并减少下游处理中菌体的排放量,变废为宝. 有关从米根霉细胞壁提取壳聚糖的研究待报道.

本文为国家教委国内访问学者基金及校科研基金资助项目.

参 考 文 献

- 1 Muzzarelli R A A. Chitin and its derivatives; New trends of applied research. Carbohydr. Polym., 1983, (3):53~75
- 2 Anon. Chitin its derivativs opportunities indiverse niches, \$ 336 million U. S. market froeseen. Bioprocess Technol., 1987, (9):4~5
- 3 Bartniki G S, Nikerson W J. Isolation composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of mucor rouxii. Biochim. Biophys. Acta., 1962, (58):102~119

- 4 Taylor I E R, Cameron D S. Preparation and quantitative analyses of fungal cell wall; Strategy and tactics. *Annu. Rev. Microbiol.* , 1973, (27):243~259
- 5 陈镜泓, 李纯儒. 热分析及其应用. 北京: 科学出版社, 1985. 154~159
- 6 Michell A J, Scurfield G. Composition of extracted fungal cell wall as indicated by infrared spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* , 1967, (120):628~637
- 7 琼斯 D W. 生物聚合物波谱学导论. 江丕栋译. 北京: 科学出版社, 1983. 21~96
- 8 Davis L L, Bartniki G S. Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochem.* , 1984, (23):1 065~1 073
- 10 Bartniki G S. Cell wall chemistry morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* , 1968, (22):87~108

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

Chen Shinian

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

Abstract The composition of structural polysaccharide in the cell wall of *Rhizopus oryzae* was studied by thermogravimetry and infrared spectrometry. As shown by experiment, the cell wall of *Rhizopus oryzae* is composed by Glycosidic linkage(1→4) of chitin and chitosan. The cell wall of *Rhizopus oryzae* is capable of replacing the shells of shrimp and crab as raw material for extracting chitosan.

Keywords chitosan, chitin, cell wall, *Rhizopus oryzae*, thermogravimetry, infrared spectrometry