

从米根霉细胞壁寻找天然壳聚糖的研究(Ⅱ)*

陈世年

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011)

摘要 用X-射线粉末衍射和红外光谱法研究米根霉细胞壁结构性多糖的组成,并通过热重反应动力学研究米根霉细胞壁结构性多糖的动力学参数.实验结果表明,米根霉细胞壁的结构性多糖是壳聚糖和 α -几丁质,两者的表观活化能分别为 $69.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $213.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

关键词 壳聚糖, α -几丁质, 米根霉, 细胞壁

分类号 TQ 929.2

文[1]用热重分析法和红外光谱法研究米根霉细胞壁结构性多糖的组成.研究的结果表明,米根霉细胞壁结构性多糖由几丁质与壳聚糖组成,细胞壁可以作为生产壳聚糖的原料.红外光谱是鉴别有机及生物物质的一种灵敏手段,但结晶性与非晶态物质分子中的官能团都会因为吸收红外光谱的频率离开基态振动产生出能量级的振动.因此常规的红外光谱法无法区别混合物、共聚物中晶态与非晶态物质,而热重法也仅能分析混合物中物相的数量.为了检验文[1]的研究结果,本文用X-射线粉末衍射与红外光谱法相结合对同一样品再次作定性研究,并从热力学角度探索从米根霉细胞壁中提取壳聚糖的可行性.

1 材料和方法

1.1 菌株

米根霉(*R. oryzae*)AS 3.3462.(下同,略)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及生化试剂级.

1.3 培养基

斜面培养基为 Czapek,摇瓶培养基为 YPG, pH 5.0.

1.4 菌株生物量

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

1.5 菌丝体细胞质、蛋白质、脂类物质的去除及细胞制备

按参考文献[2,3]进行.

1.6 细胞壁样品

105°C 烘干,磨碎过 300 目筛后,于干燥器内储存备用.

* 本文 1995-03-16 收到;国家教委国内访问学者基金及校科研基金资助项目

1.7 细胞壁红外光谱分析

采用 PE 公司 1725 X FT-IR 红外光谱仪(与 IBM 386 计算机联机),KBr 压片法。

1.8 细胞壁 X-射线粉末衍射法

采用 Rigaku 公司 D/MAX-3A 衍射仪,Cuka 辐射($\lambda=1.5418\times10^{-10}\text{m}$),石墨单色滤器,35 kV,30 mA, 2θ 为 $5\sim55^\circ$,DS/SS 为 1° ,RS 为 0.3 mm,CPS 为 1 000,步进扫描。数据按 JCPDS(粉末衍射标准化联合会)粉末衍射卡(PDF)的八强线处理,对八强线未在实验衍射图谱标出的晶面间距值(d),按文[4]进行计算求出,整个实验参考文[5]进行。

1.9 热反应动力学动态分析

采用 PE 公司 TGS-2 热天平,升温速率 $3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,温度扫描范围为室温至 530°C ,动态气氛(N_2)为 $45\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,数据处理按 Coats & Redfern 积分法数学模型^[6]。

2 结果与讨论

2.1 米根霉细胞壁结构性多糖物相的 X-射线衍射分析

X-射线粉末衍射分析表明(表 1,图 1),米根霉细胞的结构性多糖由两个物相组成,分别是

表 1 米根霉细胞壁的 X-射线粉末衍射分析

α -Chitin (JCPDS 35-1974)		本 实 验		Chitosan (JCPDS 39-1894)		本 实 验	
$d/\times10^{-10}\text{m}$	I/I_0	$d/\times10^{-10}\text{m}$	I/I_0	$d/\times10^{-10}\text{m}$	I/I_0	$d/\times10^{-10}\text{m}$	I/I_0
9.50	80.00	9.50	37.00	5.83	100.00	5.82	6.00
5.16	80.00	5.16	24.00	4.37	100.00	4.37	74.00
4.72	80.00	4.70	84.00	4.17	100.00	4.16	61.00
4.60	100.00	4.60	98.00	3.86	50.00	3.83	34.00
3.75	80.00	3.75	21.00	3.48	50.00	3.48	16.00
3.44	100.00	3.45	21.00	3.17	50.00	3.17	9.00
2.32	80.00	2.32	15.00	2.64	50.00	2.66	6.00
2.06	30.00	2.06	11.00	2.62	50.00	2.61	10.00

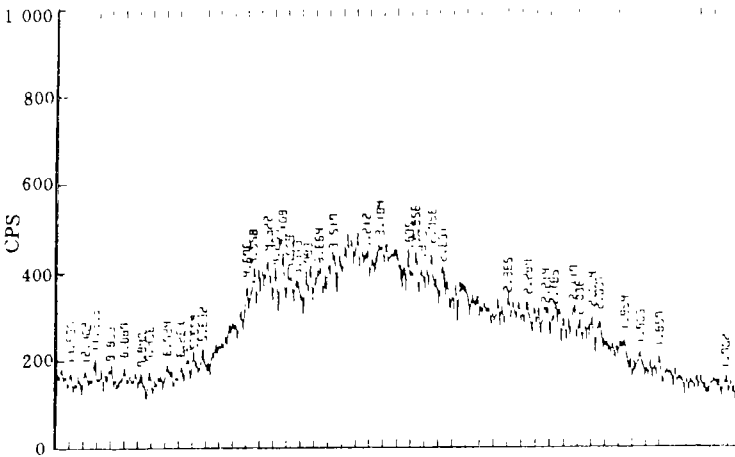


图 1 米根霉细胞壁 X-射线晶体粉末衍射图谱

几丁质和壳聚糖. 这在文[1]用热重法和红外光谱法的研究结果是一致的. 然而研究结果发现, 样品中的几丁质是 α 多晶型. 已知几丁质有 α, β, γ 三种多晶型, 晶型的不同使几丁质具有不同的理化性质^[7]. 为了证实米根霉细胞壁几丁质组分的晶型, 本研究用红外光谱作了定性研究.

2.2 米根霉细胞壁几丁质晶型的红外光谱 Fermi 共振研究.

琼斯^[8]发现, α, β, γ 三种晶型几丁质的乙酰胺基团 H 键的长度也各自不同, 在同一红外光谱频率下, H 键吸收红外光谱后产生的 Fermi 共振经计算机 Fourier 变换处理, 可以发现不同长度的 H 键在吸收红外光谱后, 出现波数上的差异, 由此可以分辨不同晶型的几丁质. 据此, 用同一样品, 采用二阶导数红外光谱技术按文[8]进行了 Fermi 共振红外光谱研究, 计算机处理的结果(图 2, 3 和表 2)证实米根霉细胞壁的几丁质组分确系 α -多晶型, 这一点在国内外对

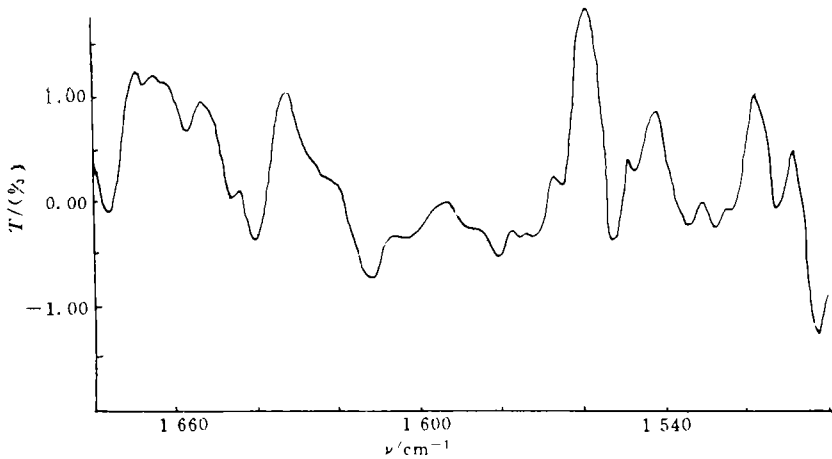


图 2 米根霉细胞壁几丁质的乙酰胺基团在 $1500 \sim 1680 \text{ cm}^{-1}$ 波段的 Fermi 共振红外光谱图

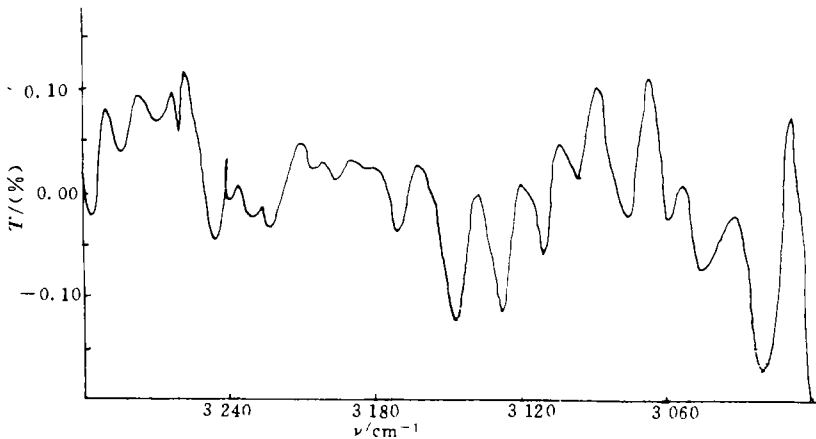


图 3 米根霉细胞壁几丁质的乙酰胺基团在 $3000 \sim 3300 \text{ cm}^{-1}$ 波段的 Fermi 共振红外光谱图

米根霉细胞壁中几丁质晶型研究中迄今未见的报道。

表 2 米根霉细胞壁的 α -几丁质酰胺基的 Fermi 共振红外光谱

酰胺光谱带	文[8]记载数据(cm^{-1})	本实验(cm^{-1})
A	3 264.00	3 262.10
B	3 106.00	3 103.40
I	1 656.00	1 652.00
	1 631.00	1 632.80
	1 621.00	1 622.40
Ⅰ	1 555.00	1 559.70

2.3 两种结构性多糖的表现活化能分析

α -几丁质分子以反平行方式相互连接,构成网络结构,分子中的乙酰胺基团中的-O \cdots H-O-及-O \cdots -N-型氢键使 α -几丁质的晶体结构形成高度有序化的微纤丝,理化性质十分稳定(图 4)^[9~10]。已知虾、蟹外壳中的几丁质属 α -多晶型^[11],因此以虾、蟹外壳作原料生产壳聚糖,其生产工艺要大量消耗酸、碱及热能。壳聚糖和几丁质的分子结构十分相似,但壳聚糖是脱去了乙酰基的(1 \rightarrow 4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡聚糖,是一种理化性质十分活泼的聚电解质。为了探索从米根霉细胞壁直接提取壳聚糖的可行性,本研究从热力学的角度用热重反应动力学法对样品的两个结构多糖作了热裂解表现活化能的研究(表 3 和图 5)。

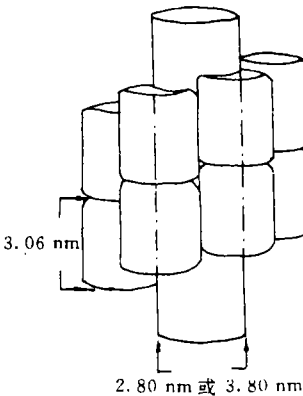


图 4 α -几丁质微纤丝

表 3 米根霉细胞壁结构性多糖热重动力学分析

动力学参数	物相(阶梯)	
	第一阶梯 (123.0~282.2℃)	第二阶梯 (282.3~384.7℃)
热分解反应组数 N	0.72	3.00
活化能 $E_a/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	69.9	213.1
频率因子 A	6.716×10^5	2.650×10^{18}
相关系数 R	0.999	0.999

热重反应动力学曲线反映的是一个被测系统分子结构的热函数,也反映被测物质的热稳定性和热寿命^[10]。根据已报道的 α -几丁质和壳聚糖的理化性质^[11],可以初步判定 $213.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $69.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 分别是米根霉细胞壁 α -几丁质和壳聚糖热裂解的表现活化能。这不仅证明了壳聚糖热稳定性和热寿命小于 α -几丁质,也和壳聚糖理化性质活泼、几丁质理化性质稳定的报道是一致的。同时也预示从米根霉细胞壁提取壳聚糖热能的消耗将远小于由虾、蟹

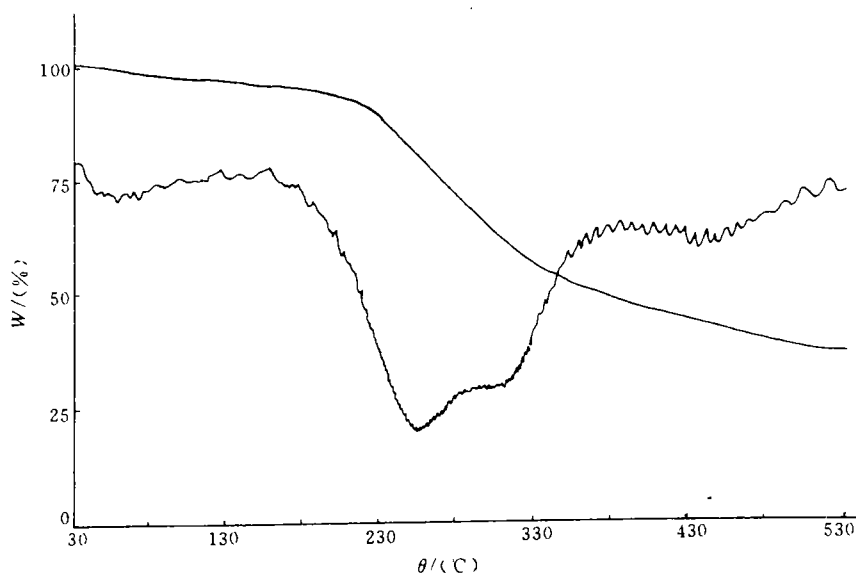


图5 米根霉细胞壁的热重动力学分析
外壳先提取几丁质,再由几丁质制备壳聚糖工艺路线所需的热能。

3 结束语

米根霉是发酵工业重要的生产菌种,本研究证实其细胞壁由壳聚糖和几丁质组成.和虾、蟹外壳中的几丁质一样,米根霉细胞壁组分之一的几丁质也是 α -多晶型.因此利用米根霉发酵生产化产品的厂家可利用发酵后的菌丝体提取壳聚糖,这不仅有利于企业开展综合利用提高经济效益,而且可以减少下游处理过程中菌丝体对环境的排放量.而从热重反应动力学研究,对米根霉细胞壁中的 α -几丁质则暂不考虑利用.有关从米根霉细胞壁提取壳聚糖的研究待报道.

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 Bartniki G S, Nikerson W J. Isolation composition, and structure of cell walle of filamentous and yeast-like forme of mucor rouxii. Biochim. Biophys. Acta,1962,(58):102~119
- 3 Taylor I E R, Cameron D S. Preparation and quantitative analysis of fungal cell walls: stratege and tactics. Annu. Rev. Microbiol.,1973,27:243~259
- 4 张月明,孔祐华,任培祐.晶体X射线衍射角与面网间距换算表.北京:科学出版社,1966.1~350
- 5 韩建成.多晶X射线结构分析.上海:华东师范大学出版社,1989.155~173
- 6 陈镜泓,李传儒.热分析及其应用.北京:科学出版社,1985.126,148~158
- 7 Muzzarelli R A A. Chitin. Oxford:Perganon Press,1977.1~120

- 8 琼斯 D W 著. 生物聚合物的波谱学导论. 江丕栋译. 北京: 科学出版社, 1983. 50~58
- 9 Blackwell J, Germinario L T, Weih M A. Chitin-protein complexes, biological activities of polymers. ACS symposium series 186. Washington: American Chemical Society, 1982. 46~87
- 10 严 俊. 甲壳素的化学和应用. 化学通报, 1984, (11): 26~31.
- 11 Marchessault R H, Liang C Y. Infraed spectra of crystalline polysaccharides (V) Chitin. J. Polymer Sci., 1960, (43): 101~116

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

Chen Shinian

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

Abstract A study is made on the structural polysaccharide from cell wall of *Rhizopus Oryzae*. Its composition is studied by X-ray powder diffraction and infrared spectrometry, and its dynamic parameters, by thermogravimetry. Such structural polysaccharide is shown experimentally to be composed of chitosan and α -chitin, with apparent activation energy of $69.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $213.1 \text{ kJ/mol}^{-1}$ respectively.

Keywords chitosan, α -chitin, cell wall, *Rhizopus Oryzae*