

黑曲霉几丁质和壳聚糖的研究

曹 健 殷蔚申*

(郑州粮食学院粮油贮藏系, 郑州 450052)

摘要 通过正交试验确定黑曲霉的最佳培养条件。由培养的黑曲霉菌体制备几丁质, 最经济的方法是电解法; 制备壳聚糖则采用间歇提取法, 所得干燥壳聚糖产品的壳聚糖含量为 92.29%, 游离氨基为 90.11%, 1%壳聚糖的 1%醋酸溶液运动粘度为 $5.33 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$, 粘均分子量为 8.024×10^4 , 灰分为 9.24%, 产品得率为 9.72%。探讨了从柠檬酸厂废弃酸渣中分离黑曲霉菌丝体的方法, 得率为 30% 左右。

关键词 黑曲霉, 几丁质, 壳聚糖

几丁质是广泛存在于自然界的一类多糖物质, 壳聚糖则是几丁质脱去乙酰基的产物。几丁质、壳聚糖及其衍生物在食品、轻工、医药、农业、环保等领域有广泛的用途。本世纪 70 年代以前, 对几丁质和壳聚糖的基础研究已取得了很大进展, 此后的研究开始集中于工业化生产和应用。

目前工业生产几丁质和壳聚糖, 原料主要是甲壳动物的外壳。但仍存在一些缺陷^[1]。与此同时, 对以微生物为来源获取几丁质和壳聚

糖的方法也已经展开了研究。从各种微生物的几丁质和壳聚糖含量来看, 黑曲霉的几丁质含量较高^[2], 并且是工业生产中常用真菌。例如柠檬酸生产中产生的大量黑曲霉废菌体, 是提取几丁质和壳聚糖的廉价原料。本文报道用经济、简便的方法从黑曲霉菌丝体中提取几丁质和壳聚糖, 并进行定性、定量分析; 同时还研究了从柠檬酸厂的废弃酸渣中分离回收黑曲霉菌

* 93 届本院本科生苏营轩等参加了部分工作
1994-02-08 收稿

丝体的方法。

1 材料与方法

1.1 菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 由郑州粮食学院微生物教研室提供; 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 由中国科学院微生物所提供。

1.2 培养液

葡萄糖-玉米浆培养液; 蔗糖-玉米浆培养液。

1.3 试剂

标准几丁质, 美国 Sigma 公司产品。

氨基葡萄糖: 浙江玉环县化工厂产品。

其余化学试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.4 方法

1.4.1 黑曲霉培养条件: 将斜面菌种制成孢子悬液 ($7-9 \times 10^8$ 个孢子/ml)。在 500ml 三角瓶中装入 100ml 培养液, 接入 1ml 孢子悬液, 于 30℃ 进行摇床培养。每隔 8h 测定一次菌体干重和培养液残糖 (3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法)。

1.4.2 Mg^{2+} 对黑曲霉生长的刺激作用: 每 100 ml 察氏培养液中分别补加不同体积的 0.25 mol/L 硫酸镁溶液和蒸馏水, 用所得的不同 Mg^{2+} 浓度的培养液培养黑曲霉。培养结束后测定菌丝干重。

1.4.3 几丁质和壳聚糖的提取

(1) 电解法制备几丁质: 用黑曲霉干菌体粉末 (80 目筛)、捣碎的黑曲霉湿菌体以及尖孢镰刀菌湿菌体三种原料进行电解, 电泳仪控制电压 6—15V, 电流强度 100—200mA。反应液中加入 1—2% 的 NaOH 溶液, 反应时间 4—22h。将电解后的固体物质洗涤并干燥。

(2) 间歇法制备壳聚糖: 捣碎的黑曲霉湿菌体经 4—6% NaOH, 100℃ 处理 6h, 离心洗涤至上清液无色, 用 45% NaOH, 135℃ 处理 2h, 离心洗涤至上清液无色, 再经 45% NaOH, 125℃ 处理 2h (在灭菌锅内进行, 压力保持在 2×10^5 Pa), 离心洗涤至沉淀物为中性后, 用 10% HAc, 95—100℃ 处理 3h, 共抽提两次,

离心后得到的醋酸抽提液用 NaOH 调 pH 值到 10, 沉淀出壳聚糖, 洗涤干燥。

1.4.4 几丁质和壳聚糖产品的定性分析: 红外光谱法, 采用西德 Perkin Elmer 938G 红外分光光度计。

1.4.5 壳聚糖产品的定量分析

(1) 含量的测定^[3,4]: 壳聚糖样品水解后稀释到一定浓度。以氨基葡萄糖盐酸盐为标准, 通过颜色反应, 在 530nm 处进行比色测定, 并计算壳聚糖含量。

(2) 游离氨基的测定: 采用改进后的碱量法, 以甲基橙-苯胺蓝混合指示剂指示终点。见文献[5,6]。

(3) 粘度的测定^[7]: 用乌氏粘度计测定 1% 壳聚糖样品的 1% 醋酸溶液的运动粘度。温度为 20℃。

$$\nu = ct$$

其中, ν : 运动粘度, c : 粘度计常数, t : 时间。

(4) 分子量的测定^[8,9]: 采用粘度法。先求出 25℃ 下 1% 壳聚糖样品的 1% 醋酸溶液的特性粘度 $[\eta]$, 再根据 Mark-Houwink 经验公式: $[\eta] = kM^\alpha$ 计算壳聚糖样品的分子量 M 。对于壳聚糖, $\alpha = 0.71$, $k = 8.93 \times 10^{-4}$ 。

(5) 灰分和水分的测定。见文献[10]。

1.4.6 柠檬酸厂废弃酸渣中黑曲霉菌丝体的分离

(1) NaOH-HAc 法: 用 NaOH 溶液, 85℃ 处理酸渣 6h, 离心洗涤至中性, 再用稀 HAc 80℃ 处理 1h, 沉淀物离心洗涤至中性。

(2) HCl-NaOH 法: 用 5% HCl, 80℃ 处理酸渣 4—6h, 离心洗涤至中性, 用 5% NaOH 80℃ 处理 4—6h, 离心洗涤至上清液无色, 再用 5% NaOH, 100℃ 处理 4h, 沉淀物离心洗涤至中性。

2 结果与讨论

2.1 黑曲霉最佳培养条件的选择

2.1.1 培养时间的确定: 黑曲霉在葡萄糖 (5%)—玉米浆 (3%) 及蔗糖 (4%)—玉米浆 (4%)

培养液中的生长曲线可看出(图略),当培养时间到达96h后,残糖浓度已很低,此时黑曲霉的生物量趋于稳定,因此确定最佳培养时间为96h。

2.1.2 培养液最佳 C/N 的选择: 采用 $L_9(3^4)$ 正交表,通过正交试验,确定黑曲霉的最佳 C/N 为每 100ml 培养液含 3g 葡萄糖(或 4g 蔗糖)和 3ml 玉米浆。培养 96h 后,每 100ml 葡萄糖(3%)-玉米浆(3%)培养液可得 1.51g 干菌丝,而每 100ml 蔗糖(4%)-玉米浆(3%)培养液可得 1.81g 干菌丝,两种培养液最后的残糖浓度分别是 0.66mg/ml 和 5.8mg/ml。

2.2 Mg^{2+} 对黑曲霉生长的刺激作用

Mg^{2+} 在几丁质的合成过程中起重要作用^[14],试验了不同浓度(11、12、13、14、15mmol/L)的 Mg^{2+} 对黑曲霉菌丝体生物量的影响。当 Mg^{2+} 浓度在 12mmol/L 左右时黑曲霉的生物量最大(3.6g/100ml),几丁质的合成量也相应增多。

2.3 几丁质和壳聚糖的提取

2.3.1 电解法: 将黑曲霉干菌体粉末(80目筛)或经洗涤、捣碎处理的黑曲霉和尖孢镰刀菌湿菌体分别在稀碱液中电解。所得三种产品的红外光谱图与标准几丁质(a)红外光谱见图1。通过比较可以确定三种产品均为几丁质,三种产物在 $1600-1650\text{cm}^{-1}$ 之间都有一个乙酰氨基吸收峰(b,c,d)。所得的几丁质产品进一步脱乙酰基则得到壳聚糖。在 $1550-1600\text{cm}^{-1}$ 之间有一个氨基吸收峰。

2.3.2 间歇提取法: 用浓碱在高温下直接使黑曲霉菌丝体中的几丁质脱乙酰基,可获得壳聚糖。脱乙酰反应中,反应液中的乙酸根离子浓度逐渐增加,使反应进行1h后速度开始减慢^[15]。因此本试验首次对黑曲霉菌湿菌体采用了间歇法,以获得高脱乙酰度的壳聚糖产品,在 $1550-1600\text{cm}^{-1}$ 间有一个氨基吸收峰。经测定,其游离氨基含量为 96.01%,壳聚糖含量为 92.29%,运动粘度为 $5.33 \times 10^{-4}\text{m}^2/\text{s}$,粘均分子量为 8.024×10^4 ,水分为 8.38%,灰分为 9.24%,壳聚糖得率为 9.72%。

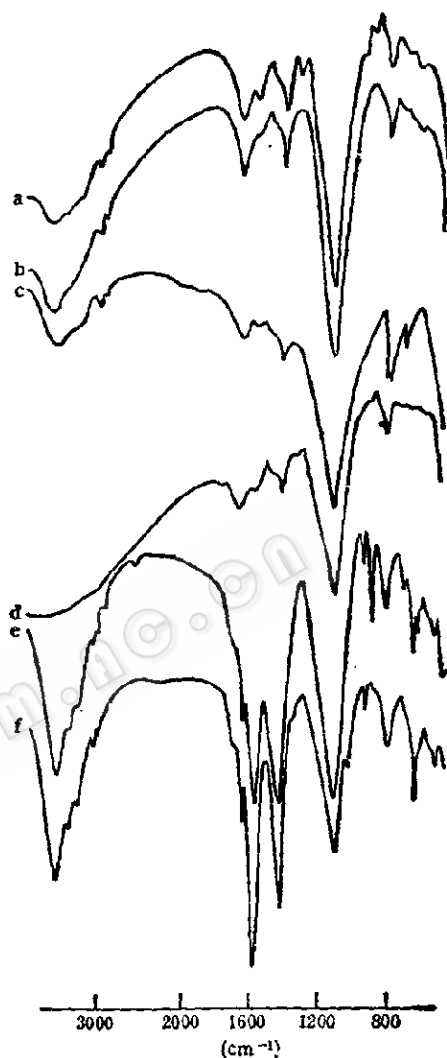


图1 几丁质和壳聚糖的红外光谱图

2.4 柠檬酸厂废弃酸液中黑曲霉菌丝体的分离

用 NaOH-HAc 法分离出的黑曲霉菌丝在显微镜下观察,核明显,菌丝透明且周围杂质很少。但碱液浓度低时,分离出的菌体颜色深。因此本试验在稀碱处理前先用稀 HCl 处理酸渣,最后再碱煮除去色素。用 HCl-NaOH 法最终得到了灰白色菌丝,得率为 30% 左右。

参 考 文 献

- [1] Riccardo A A Muzzarelli, Fabio Tanfani, Gianfranco Scarpini. Biotech and Bioeng, 1980, 22: 885—896.
- [2] Dietrich K. Food Technology, 1991, 1: 114—122.
- [3] 梁赖正明. 东海区水产研究所研究报告, 1975, 83: 1.
- [4] Boas N F. J Biol Chem, 1953, 204: 553.
- [5] 汪志君. 化学世界, 1986, 1: 22—23.
- [6] 陈振宁, 郭慎滴. 化学通报, 1990, 10: 42—43.
- [7] 郑崇喜. 粮油分析法, 西宁: 青海人民出版社, 1980.
- [8] 姚汝华, 江贤君, 谭丰顺. 广州食品工业科技, 1992, 2: 9—12.
- [9] 江贤君. 广州, 华南理工大学硕士学位论文, 1991. 论文编号 9150416.
- [10] 郑连英, 陈 超, 刘荣娥. 精细化工, 1993, 10(1): 16—18.
- [11] 周与良, 邢来君. 真菌学, 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [12] Guennadi I Krepets, Alexandre Y Mikhailine. U. S. Patent 5053 113, 1991.
- [13] 张所信, 江龙法, 李树安, 等. 精细化工, 1990, 7(3): 7—10.

STUDY ON CHITIN AND CHITOSAN OF *ASPERGILLUS NIGER*

Cao Jian Yin Weishen

(Zhengzhou Grain College, Zhengzhou 450052)

Abstract This paper first determined the best condition of culturing *Aspergillus niger*. The economic way for obtaining chitin from the mycelium was electrolysis; the method of preparing chitosan was to treat the mycelium two times with high concentrated NaOH solution at 135°C. Purity of such chitosan product was 92.29%, free NH_2 was 96.01%, viscosity was $5.33 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$, viscosity-average molecular weight was 8.024×10^4 , ash was 9.24%.

This paper also investigated to separate mycelium of *Aspergillus niger* from the waste material of citric acid production plant. Yield of mycelium reached 30% or so.

Key words *Aspergillus niger*, chitin, chitosan