

低分子量壳聚糖及其衍生物的制备与溶菌酶对其降解的实验研究

王 征, 刘万顺, 韩宝芹, 魏长征

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 将大分子质量壳聚糖用壳聚糖酶法降解成分子质量为 3 ku 左右的低分子质量壳聚糖, 再将其分别化学修饰成低分子质量的羧甲基壳聚糖和羧甲基甲壳素, 并进行结构表征。在最适条件下, 用溶菌酶分别对 3 种多糖进行降解实验, 并进行酶解前后多糖的还原糖浓度测定和 HPLC 分析, 确定溶菌酶对不同结构多糖的水解能力。结果表明, 溶菌酶对羧甲基甲壳素水解作用最快, 羧甲基壳聚糖次之, 壳聚糖最慢。该研究为甲壳素衍生物在生物医用材料中的应用和降解速率调控提供了依据。

关键词: 壳聚糖; 羧甲基壳聚糖; 羧甲基甲壳素; 溶菌酶; 降解

中图分类号: Q539 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)10-0036-05

甲壳素(Chitin)是自然界存储量仅次于纤维素的第二大天然多糖化合物, 广泛存在于甲壳动物外壳、某些植物及真菌类细胞壁中, 其化学结构为 β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-N-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡聚糖。甲壳素不溶于水、一般的酸碱和有机溶剂, 在浓碱加热条件下可脱乙酰基成为壳聚糖(Chitosan)。壳聚糖糖单元 C₂ 位带有伯胺基, 在酸性溶液中溶解形成聚阳离子的功能性多糖。由于壳聚糖可溶于水, 大大拓宽了应用范围, 研究和开发应用已涉及工业、农业、医药、功能性食品、生物材料、环保和日用化工等众多领域^[1], 越来越显示出甲壳素衍生物的重要发展前景。近 10 年来, 人们日益认识到甲壳素和壳聚糖作为功能性多糖, 具有优良的生物相容性、生物可降解性、无免疫原性, 在机体上具有抑菌、止血、镇痛和促进伤口愈合等功能, 降解产物 N-乙酰氨基葡萄糖和氨基葡萄糖是构建机体组织的重要性成分。甲壳素/壳聚糖及其衍生物作为生物医用材料的应用已受到生物医用工程研究人员的极大关注, 并得到广泛的研究应用和开发, 如作为药物的缓释控释降解材料, 应用于术后防组织间粘连的胶体和膜材料的制备^[2], 手术组织空腔填充可降解材料骨关节滑液体的制造^[3], 组织工程支架材料及可降解人工骨的合成^[4], 眼科疾病治疗修复支架^[5], 神经组织修复导管^[6]等在中国已有较深入的研究。作为载体支架材料在体内的降解速度与新生组织形成时间的匹配是治愈损伤组织恢复其生物学功能的关键。壳聚糖在动物体内可被溶菌酶缓慢降解已有报道^[7], 但壳聚糖及其衍

生物产品作为生物材料, 溶菌酶对其水解速度快慢的比较尚未见报道, 本实验用酶法将高分子质量的壳聚糖用壳聚糖酶(Chitosanase)水解制备出数均分子质量为 3 ku 左右的低分子质量的壳聚糖。通过化学修饰制备出相应的羧甲基壳聚糖(CM-Chitosan)和羧甲基甲壳素(CM-Chitin), 以此为底物, 分别进行溶菌酶水解作用的实验研究, 为壳聚糖及其羧甲基化衍生物作为生物医用材料生物降解速度调控方面提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖: 本实验室制备, 粘均分子质量为 39 ku, 脱乙酰度为 90.15%; **壳聚糖酶:** 本实验室发酵纯化制品, 酶活力为 18 U/mg; Sephadex G 25 凝胶(Pharmacia)。

试剂: 溶菌酶(北京鼎国生物技术发展中心, 酶活力为 10 000 U/mg), 冰醋酸、无水乙醇、KOH、氯乙酸、甲醇、三氯醋酸、异丙醇均为国产商品试剂, 分析纯。

收稿日期: 2005-06-01; 修回日期: 2005-09-10

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2001AA625050)

作者简介: 王征(1979), 男, 山东青岛人, 硕士, E-mail: wangzhengqdio@yahoo.com; 刘万顺, 通讯作者, E-mail: wangshunliu@ouc.edu.cn

仪器: 1525 型液相色谱仪(美国 Waters 公司); 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); 电位计; 冷冻干燥机(Labconco); 红外光谱仪 RFX 65(Analect); 紫外检测仪(上海康华生化仪器制造厂)。

1.2 方法

1.2.1 低分子质量壳聚糖的制备及纯化

取粘均分子质量为 39 ku 的壳聚糖 10 g 溶于 200 mL 2% 的醋酸溶液, 调 pH 6.0, 加入 0.5 g 壳聚糖酶, 于 40℃ 下搅拌酶解, 取样, 用稀 KOH 溶液调 pH 10~11 不产生沉淀时, 反应终止, 时间为 3 h。反应水解液冷却至室温, 搅拌下加入 50% 三氯醋酸 5.0 mL, 于 4℃ 下静置过夜。10 000 r/min 离心 30 min, 除去沉淀的酶蛋白及不溶物, 得上清液。搅拌下将离心多糖溶液慢慢倒入 10 倍体积的 95% 乙醇中, 收集沉淀。无水乙醇洗涤脱水, 真空干燥, 得低分子质量壳聚糖。

低分子质量壳聚糖组分的葡聚糖凝胶分离: 将低分子质量壳聚糖配成 10% 水溶液, 上 Sephadex G-25 柱(3 cm × 60 cm) 进行分离, 每次上样量 5 mL, 控制流速 0.3 mL/min, 紫外检测仪(214 nm) 检测洗脱峰, 每管收集 6 mL, 合并最大峰值对应的收集液, 冷冻干燥, 得纯化的低分子质量壳聚糖。

1.2.2 羧甲基壳聚糖的制备

用凝胶过滤制备的低分子质量壳聚糖 6.5 g, 加 50% KOH 水溶液 26 mL, 搅拌均匀, 放置 -20℃ 过夜, 加入异丙醇溶液 90 mL, 室温搅拌下慢慢滴加 50% 氯乙酸异丙醇溶液 37 mL, 控制 3 h 内加完继续搅拌共计 8 h, 反应结束抽滤固液分离, 固形物加入甲醇溶液洗涤 3 次, 再用 6 mol/L HCl 溶液调 pH 8~9 充分甲醇洗涤, 反应产物真空干燥, 得低分子质量羧甲基壳聚糖。

1.2.3 羧甲基壳聚糖的制备

取羧甲基壳聚糖 4.8 g, 置 250 mL 三口瓶中, 加入 50 mL 甲醇和 2 mL 冰醋酸, 搅拌下缓慢加入醋酸酐 6 mL, 继续搅拌 12 h, 40℃ 减压浓缩, 浓缩物用无水乙醇沉淀, 抽滤, 固形物乙醇洗涤, 真空干燥, 得低分子质量羧甲基壳聚糖。

1.2.4 多糖中氨基、羧基含量分析

采用电位滴定法测定伯氨基、羧基含量^[8]。

1.2.5 多糖的红外光谱分析

将 3 种多糖分别与适量 KBr 混合研磨, 压片。

在 4 000~400 cm^{-1} 波数范围内进行扫描, 得中红外区红外吸收光谱。

1.2.6 溶菌酶对 3 种多糖的酶水解实验

准确称取 3 种多糖各 200 mg, 分别装入 3 个 50 mL 三角瓶中, 各加入 10 mL 0.1 mol/L 的 HAc-KAc (pH=5.8) 缓冲液, 加入溶菌酶 40 mg, 于 37℃ 恒温酶解 6 h。将酶解液各加入 50% 三氯乙酸 0.5 mL, 摇匀, 于 4℃ 静置过夜, 10 000 r/min 离心 30 min, 除去沉淀蛋白, 得上清液。测定 3 种多糖酶水解前后的还原糖浓度, 剩余酶水解上清液冷冻干燥, 用无水乙醇洗涤多次, 真空干燥, 得到 3 种多糖水解产物中干燥样品, 进行多糖组分分析。

1.2.7 溶菌酶降解产物还原糖浓度测定

采用 3,5-二硝基水杨酸法^[9]。

1.2.8 酶水解多糖组分分析

采用 Waters 1525 型液相色谱仪(色谱柱: TSK-GELG4000PWXL 7.8 × 300; 流动相: 0.1 mol/L HAc-KAC, pH=4.0; 柱温: 40℃; 进样量: 20 μL ; 流速: 0.5 mL/min) 取适量的干燥物溶解于流动相中, 0.22 μm 滤膜过滤后进样。得到待测样品的典型色谱图和保留时间, 对色谱图进行分析。

2 结果与分析

2.1 低分子质量壳聚糖 Sephadex G-25 凝胶柱分离结果

低分子质量壳聚糖组分通过葡聚糖凝胶分离, 得到 4 个组分(图 1), 峰 1, 2 应为穿透峰, 峰 4 应为聚合度较小的寡糖, 合并最大峰值 3 对应的收集液, 冷冻干燥, 得分子质量相对均一的低分子质量壳聚糖。

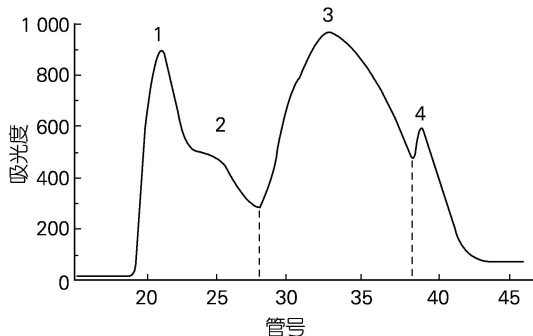


图 1 低分子质量壳聚糖 Sephadex G-25 凝胶柱分离结果
Fig. 1 Separating result of chitosan with low molecular weight by Sephadex G-25

2.2 3种多糖的红外光谱结构表征

图2中Ⅱ、Ⅲ与Ⅰ相比较在 $1\,062\text{ cm}^{-1}$ 一级羟基峰减弱($\text{C}-\text{OH}$),说明在此位置发生了羧甲基化反应, $\text{C}=\text{O}$ 的非对称和对称伸缩振动羧基($-\text{COO}-$) 在 $1\,650\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,420\text{ cm}^{-1}$ 分别是羧酸中的 $\text{C}=\text{O}$ 双键和 $\text{C}-\text{O}$ 单键的伸缩振动峰,以上结果表明所制备产品Ⅱ、胺谱带,即酰胺基中 $\text{N}-\text{H}$ 的面内弯曲和 $\text{G}-\text{N}$ 伸缩振Ⅲ存在羧甲基;Ⅲ与Ⅰ、Ⅱ相比较在 $1\,580\text{ cm}^{-1}$ 出现酰胺特征峰。壳聚糖红外光谱中 $1\,590\text{ cm}^{-1}$ 是酰胺的吸收峰,是由 $\delta(\text{NH})$ 和 $\nu(\text{G}-\text{N})$ 偶合产生的峰。

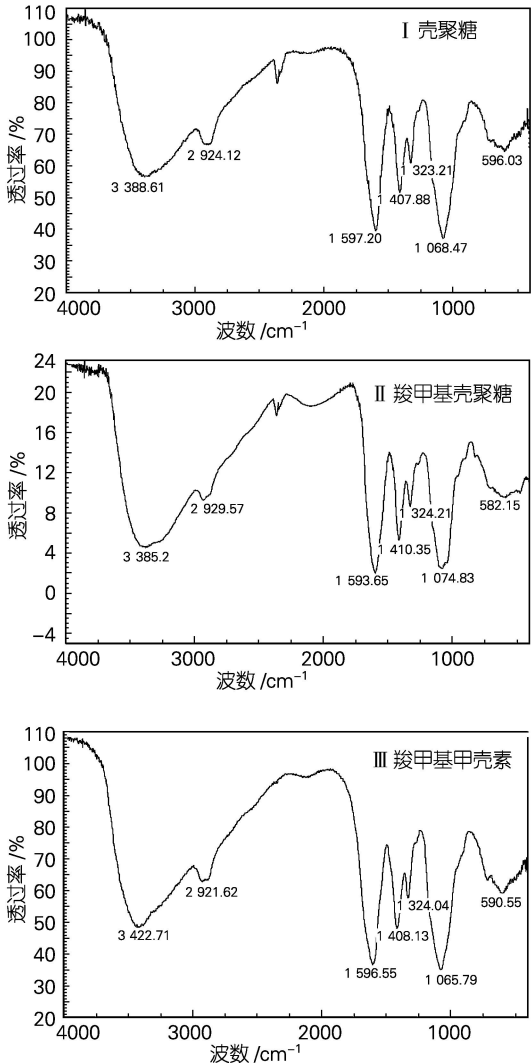


图2 3种多糖的红外光谱

Fig. 2 IR results of three samples

2.3 3种多糖的指标测定

3种多糖的各项指标测定见表1。

表1 3种多糖各项指标测定

Tab 1 Properties of three samples of chitosan

多糖	相对分子质量	氨基质量分数(%)	羧基质量分数(%)	还原糖吸光度
壳聚糖	3 100	84.50	—	0.467
羧甲基壳聚糖	—	83.00	71.20	0.369
羧甲基甲壳素	—	27.30	65.45	0.305

2.4 3种多糖酶解前后还原糖浓度的变化

3种糖还原糖浓度酶解后都有增加。表明它们都有不同程度的降解。在6h时壳聚糖和羧甲基壳聚糖还原糖浓度的增加量相差不多,而羧甲基甲壳素还原糖浓度的增加量较大。表明壳寡糖随着羧甲基的引入对降解并无太多影响,而随着羧基和 $\text{N}-$ 乙酰基的引入,壳聚糖更易于溶菌酶降解。见图3。

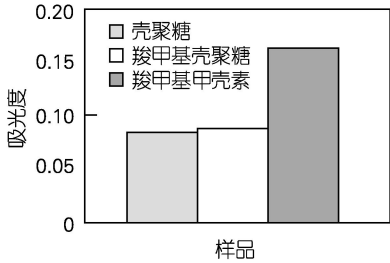


图3 3种糖酶解后还原糖浓度增加量的比较

Fig. 3 Result of three samples of chitosan by hydrolysis

2.5 HPLC 产物分析

由图4的图谱分析,在酶水解6h第二个峰面积都比初始时(0h)大,而羧甲基甲壳素的最大,表明3种糖都有降解,而羧甲基甲壳素降解速度最快,羧甲基甲壳聚糖次之,溶菌酶对壳聚糖降解最慢。

3 讨论

壳聚糖含有游离氨基是一种碱性糖,羧甲基壳聚糖同时含有游离氨基和羧基,是一种两性糖。而羧甲基甲壳素只含有游离羧基,氨基被 $\text{N}-$ 乙酰基保护,则是一种酸性糖。通过实验得出3种糖在溶菌酶作用下都降解,表明3种多糖在体内都会降解。溶菌酶对羧甲基甲壳素水解作用最快,羧甲基壳聚糖次之,壳聚糖最慢。实验结果为壳聚糖及其羧甲基化衍生物作为生物医用材料生物降解速度调控方面提供理论依据。

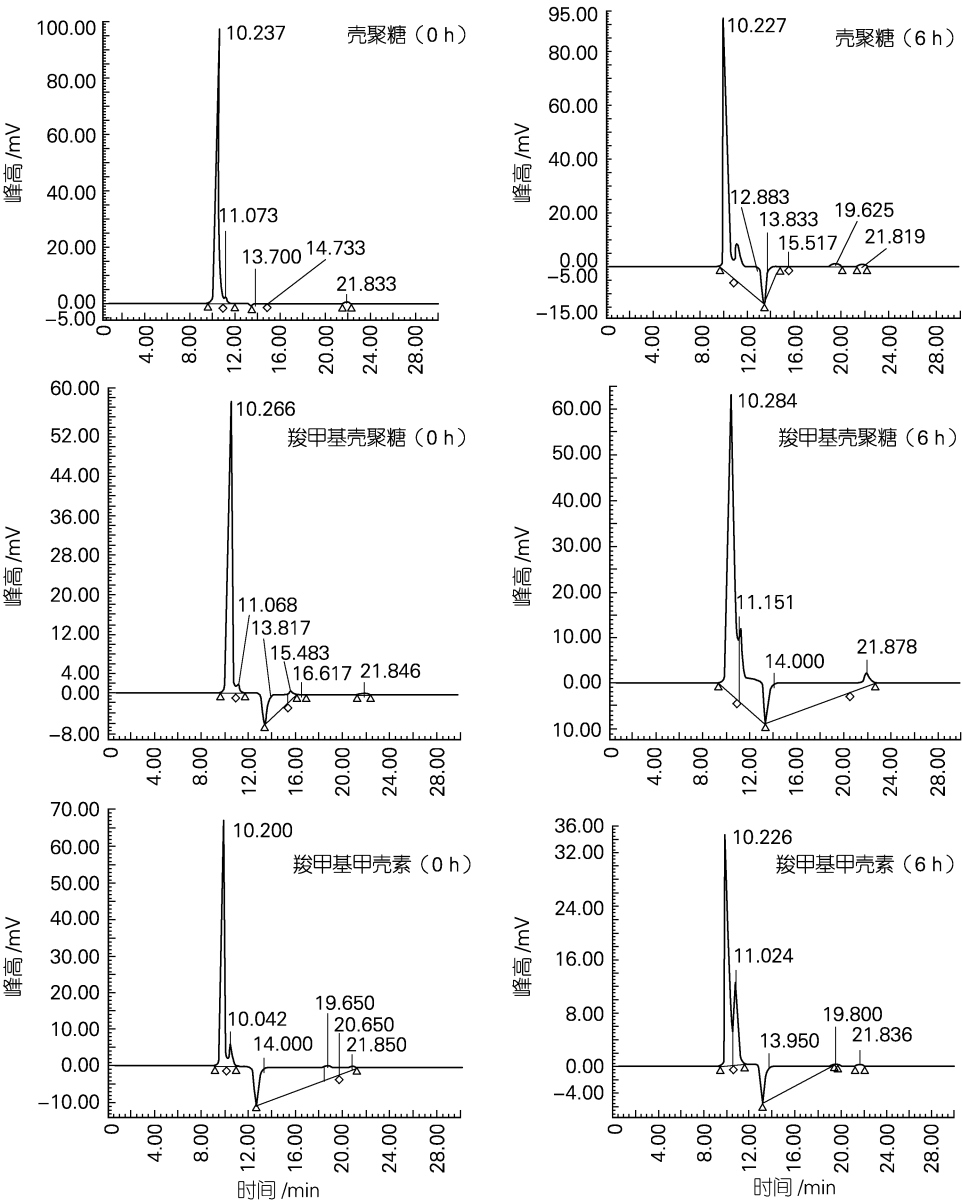


图 4 3种多糖的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC analysis of three samples of chitoan

人体内存在溶菌酶,其生物学功能是催化细菌细胞壁多糖的水解。这种多糖是 N-乙酰氨基葡萄糖 (KG)-N-乙酰氨基葡萄糖乳酸(KM)的共聚物。葡萄糖(KG)-N-乙酰氨基葡萄糖乳酸(KM)的共聚物。由于甲壳素与肽聚糖结构相似,因此溶菌酶也可水解甲壳素。据推测溶菌酶在酶解底物时存在特异性,降解速度随着脱乙酰化度的提高而降低^[10]。溶菌酶在降解壳聚糖时,由于糖单元上 N-乙酰基的缺失,造成

酶与底物亲和性的降低,故溶菌酶水解速度变慢。在壳聚糖糖单元 6 位上引入羧甲基,在一定程度上增加了多糖的亲水性,有利于溶菌酶的水解作用,但对提高其水解速度不显著。

参考文献:

[1] Kurita K. Chemistry and application of Chitin and Chitosan[J]. **Polymer Degradation and Stability**, 1998,

- 59: 117-120.
- [2] 张抒, 侯春林. 壳多糖预防椎板切除术后硬膜周围粘连的实验研究[J]. 中华实验外科杂志, 1999, **16**(5): 464-465.
- [3] Lu J X, Prudhommeaux F, Meunier A. Effect of chitosan on rat knee cartilages[J]. *Biomaterials*, 1999, **20**(20): 1 937-1 944.
- [4] Dalin C, Andersson L, Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by osteopromotive membrane techniques: An controlled clinical study [J]. *Clin Oral Implants Res*, 1991, 2: 159.
- [5] Nettles D I, Elder S H, Gilbert J A. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering[J]. *Tissue Eng*, 2002, **8**(6): 1 009-1 016.
- [6] 于炎冰, 左焕琼, 任祖渊. 壳聚糖导管桥接周围神经缺损的实验研究[J]. 中华神经外科杂志[J]. 2000, **16**(6): 375-378.
- [7] Hiraku O, Yoshiharu M. Biodegradation and distribution of water soluble chitosan in mice[J]. *Biomaterials*, 1999, 175-182.
- [8] 刘长霞, 陈国华, 孙明昆, 等. N, O-羧甲基壳聚糖羧化度计算式的修正[J]. 北京化工大学学报, 2003, **31**(2): 14-17.
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.
- [10] Nordtveit R J, Varum K M, Smidrod O. Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme [J]. *Carbohydr Polym*, 1994, 23: 253.

Study on preparation of low molecular weight chitosan/ its derivatives and hydrolysis by lysozyme

WANG Zheng, LIU Warrshun, HAN Bao-qin, WEI Chang-zheng
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Jun. 1, 2005

Key words: chitosan; carboxymethylchitoan; carboxymethylchitin; lysozyme; hydrolysis

Abstract: Low molecular weight chitosan($M_n = 3$ ku) is prepared from high molecular weight by chitosanase, carboxymethylchitoan and carboxymethylchitin being synthesized by low molecular weight chitosan. The three amyloses were characterized by infrared spectrum and hydrolysed by lysozyme on the optimal condition. Their hydrolytic abilities in lysozyme are ascertained by lysozyme on the optimal conditions, by determining concentration of reducing sugar and High Performance Liquid Chromatography. The data revealed the hydrolysis rate of carboxymethylchitin was fastest and that of chitosan was slowest.

(本文编辑: 张培新)