

几丁质的研究与进展

陈西广 刘万顺 刘晨光

(青岛海洋大学 266003)

摘要 几丁质是自然界中储量仅次于纤维素的第二大天然多糖,广泛存在于真菌、昆虫和甲壳类动物之中,自然状态复杂,刚性很强,生物亲和性好,在大多数溶剂中难溶解,可衍生出多种衍生物,并具有重要的应用价值。目前该多糖主要来源于海洋,其研究技术也与一般多糖有较大的差别。本文论述几丁质的自然状态、结构性能、生物合成、提取方法和衍生物制备技术的研究状况及其基本性能,使几丁质研究技术有一个较全面的了解。

关键词 几丁质 几丁质衍生物 生物合成 衍生化

几丁质(Chitin)是真菌细胞壁的常见成分,与真菌细胞的发生和维持以及分隔的形成有关,对真菌生长和功能方面具有特殊的重要意义。几丁质也大量存在于昆虫和甲壳类动物甲壳之中,于是几丁质又被称为甲壳质。据研究资料估计自然界中每年生成的几丁质约有一百亿吨,在所有天然聚合物中储量占第二位,仅次于纤维素。近年来几丁质的应用开发越来越广泛,大量用于工业、农业、医学、环保、生物工程等领域。其研究与开发已延伸到几丁质的人工合成、化学改造、修饰衍生等许多方面,并展现了越来越好的发展前景。关于几丁质的应用,已有一定的报导,在此不再重复。本文就几丁质的自然状态、生物合成、制备技术、衍生改造等研究技术与进展进行报导。

一、几丁质在自然界中的状态、结构和性质^[1-2]

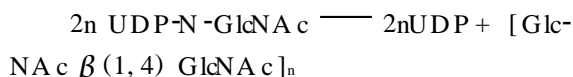
几丁质在自然界中以蛋白多糖形式存在,是和多肽、钙质、色素等相结合的,由于自然状态下的结构研究非常困难,因此,其制品都是失去了蛋白后的多糖部分。这种几丁质可视为纤维素的类似物,相当于纤维素中C-2上位置的羟基由乙酰氨基基团置换。其分子结构是由D-N-乙酰氨基葡萄糖通过重复的 $\beta(1,4)$ 糖苷键聚合而形成成为直链形的大分子。几丁质分子排列也成微纤维形式,长链可以通过一根链的

氨基与临近长链上羰基基团之间形成氢键而聚合。其构象与纤维素的构象相似。用x-射线衍射晶体分析研究发现,几丁质微纤维为晶体结构。近年来的研究发现,几丁质分子中的氨基并非全部被置换成N-乙酰氨基基团,而是分子中还存在一些游离的 $-NH_2$ 基团,几丁质正是通过这种呈碱性的氨基基团与适当的离子基团结合成络合物或共价复合物。

几丁质不溶于水,可以说几丁质在绝大部分溶剂中处于难溶状态。据目前所知,几丁质仅能溶解于少数溶剂中,如六氟异丙醇、六氟丙酮水化物、吡咯烷酮的氯化锂溶液、一些氯醇和浓酸等(Muzzarelli, 1977)。

二、几丁质的生物合成^[1-5]

生物体中的几丁质的合成部位,是细胞质膜内侧,在一种被称为几丁体(chitosome)的颗粒上,呈圆形,直径为40-70毫微米。几丁质在生物体内的合成是靠几丁质合成酶来完成的,最初在链孢霉(Neurospora)的抽提物中发现了这种酶,并发现几丁质的合成底物是UDP-N-乙酰葡萄糖胺,生物合成反应方程式如下:



随后在许多真菌细胞中发现几丁质合成酶,如鬼伞菌(Coprinus),啤酒酵母(Saccharomyces cerevisiae),白假丝酵母(Candida albi-

cans)等。几丁质在生物合成过程中不需要必须的引物,而是靠几丁质合成酶协同作用时产生的氨基糖作为反应的引物。生物合成过程中没有脂质和糖蛋白参加,但发现Mg²⁺、N-乙酰葡萄糖氨,几丁糊精能够对此反应起促进和调节作用。几丁质合成酶在细胞内通常处于酶原状态,借助蛋白质水解酶激活而转变为有活力的酶。研究制备时采用丁醇或毛地黄皂苷作溶剂,可抽提几丁质合成酶,经过凝胶过滤法提纯酶原,然后用胰蛋白酶或酵母的可溶性提取液截枝,使酶恢复活力。用负染法可在电镜下观察到几丁质维晶体的生成过程。

三、几丁质制备^[6-11]

从真菌中提取制备几丁质是一个最有发展前途的途径,它不受资源量的限制,可以规模化生产。目前这方面的研究报道不断增多,其中Claudia Crestini报道用*Lentinus edodes*固体发酵提取几丁质,收率达到每公斤培养基提取壳多糖6.18g,比其它报道收率高出近50倍,但仍处于研究开发阶段,可见用微生物发酵法生产几丁质技术还不够成熟,目前最经济的生产路线是从虾、蟹壳中提取。将虾壳或蟹壳洗净、凉干后经稀的氢氧化钠和稀的盐酸分别浸泡处理,除去脂类、蛋白质、色素、碳酸钙等杂质,再经水洗至中性,就得到纯净的几丁质,这种方法,几丁质的得率一般可达到15-20%。甲壳质在酸中不稳定,易发生降解,为减少处理过程中几丁质分子链的降解,可缩短浸泡时间改用酸碱酸碱交替重复处理。

延长酸浸泡时间可得到低分子量几丁质产品,加热条件下可生成聚合度为2-7:(GlcNAc)₂-(GlcNAc)₇的寡聚几丁质。由于寡聚几丁质易被分散、易被吸收,并具有抗菌、抗肿瘤、提高植物防御能力等功效,受到人们的关注。但是要达到一个固定的聚合度范围,则需要控制严格的条件。其制备方法有酸降解法、酶降解法和酶合成法。

酸降解法是用稀酸(2-3N)、高温(100℃)、长时间(20-40h)水解,或浓酸(10-12N)、中温(40-60℃)、短时间(2-4h)水解

然后用浓的氢氧化钠中和,活性碳脱色,用透析、电渗析或凝胶柱层析等方法脱盐,浓缩后用甲醇结晶,得到聚合度在1-7的产品,这种方法简便易掌握,缺点是产品的聚合度不好控制。

酶降解法,是利用真菌和植物病原体中分离制备出的甲壳质分解酶,溶于Mcllvaine缓冲液(0.2M NaH₂PO₄-0.1M 柠檬酸)中,30℃保温降解,按照产物聚合度控制反应时间,用10%的三氯乙酸终止反应。这种方法具有特异性,条件温和易控制,有选择性地切断特定糖苷键等优点,从而制得特定的寡聚体。这种方法发展速度快,前景很好,其主要因素取决所使用的甲壳质酶。目前甲壳质酶种类较多,通常使用的已商品化的几丁质水解酶来源见表1。但这种方法的缺点是不易制得高聚合度的寡聚糖(>6)产品。

酶合成法是一种新发展的技术,采用从放线菌(*Nocardia orientalis* IFO)的发酵液中分离纯化得到的一种具有糖转移功能的甲壳质合成酶,该酶能在醋酸缓冲液中(40℃),从高底物浓度(5-10%)条件下催化几丁质从低聚合度(4-5)向高聚合度(6-7)转化,产品的聚合度范围小,目标产品纯度高。此反应对温度、pH、底物浓度和反应时间较为敏感。

表1 几丁质水解酶来源和特性

几丁质酶来源	水解主要产物
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	(GlcNAc) ₂
<i>Serratia Marcescens</i>	(GlcNAc) ₂ -(GlcNAc) ₃
<i>Neurospora Crassa</i>	(GlcNAc) ₂
<i>Verticillium albo-atrum</i>	(GlcNAc) ₂ -(GlcNAc) ₄
<i>Phaseolus vulgaris leaves</i>	(GlcNAc) ₂ -(GlcNAc) ₃
<i>Lecopersicon esculentum</i> Glycine max	(GlcNAc) ₂ -(GlcNAc) ₆
Wheat germ	(GlcNAc) ₂ -(GlcNAc) ₄

四、几丁质衍生化

几丁质最基本的衍生物是脱乙酰化几丁质,也叫壳多糖或甲壳胺(Chitosan)。其制备方法主要靠浓碱及高温处理。反应是在非均相下

进行。高温和浓碱对提高反应有利,但在空气的存在下长时间处理,出现较大程度的糖链降解,粘度随之下降。其脱乙酰度越高,粘度越高,但脱乙酰的同时常引起分子量降解,使粘度下降。壳多糖的脱乙酰度、特征粘度及相关分子量见表 2。要得到高脱乙酰度,高分子量的壳多糖,通常是从隔绝氧气和缩短高温处理时间两方面着手,如采用氮气保护或反应中加入抗氧化剂以及短时微波处理等均有报道^[12-14]。

表 2 壳多糖脱乙酰度、粘度及平均分子量相关特性

项	脱乙酰度 (%)	粘度 (mg/g)	平均分子量 M
0	80	1000	500000
1	96	700	304000
2	99	450	163000
3	100	370	124000

在壳多糖的基础上引入离子型酸根,得到壳多糖盐衍生物。最常见的是壳多糖盐酸盐(Chitosan hydrochloride)也称聚氨基葡萄糖盐酸盐(D-Polyglucosamine Hydrochloride)。盐型壳多糖可溶解于水,使用方便,常规制备方法是将壳多糖溶解在稀的盐酸溶液中,用 2-3 倍乙醇沉淀,再用酸性乙醇脱水,真空干燥或低温烘干。但这种方法需用酸溶解处理较长时间,分子链易发生降解,所以制备的产品一般粘度不高^[15-17]。我室对这一技术进行了改进,采用极性有机溶剂作媒介,如甲醇、乙醇、乙丙醇和二甲基亚砜等进行溶胀,然后再与 HCl 进行非均相反应,控制反应时间,反应结束后迅速洗脱烘干,可制备出高粘度的壳多糖盐酸盐。由于是非均相反应,故反应的均匀度是控制成败的关键。试验中发现这种方法经过改进,也可适用于低分子壳多糖盐酸盐的制备。

壳多糖在吡啶存在下与硫酸反应形成硫酸酯,其结构与肝素(Heparine)近似,因而有类似肝素的抗凝血功能。有报道壳多糖在 DMF 溶剂中与 SO₃ 反应也得到类似物,其产品以钠盐形式存在。由于分子量高,反应的磺化度和分子

量不易控制,产物不宜恒定^[18-19]。

几丁质可以酰基化,其目的是为了减弱几丁质分子的亲水性能,增加亲油性,改善其溶解性能。通常是用几丁质和乙酰酐进行反应,制备出乙酰基几丁质。酰基化也可以在甲壳胺的基础上进行。这方面的研究工作很多,产物有 N-酰基化、O-酰基化和混合型酰基化。在不加保护的情况下酰基化反应通常得到混合物。若不使-NH₂ 酰基化,则需用醛进行保护,待-OH 酰基化后,再水解除去^[20-21]。

在几丁质分子的 6 位引入羟乙基,衍生出羟乙基几丁质这种衍生物的水溶性较好,又称可溶性甲壳质,其制备方法是几丁质在碱性条件下和环氧乙烷或氯乙醇发生非均相作用,通过控制反应时间、反应温度来控制羟乙基基团的取代度^[22]。

几丁质分子的羧甲基化一般是在 6 位上取代。这种衍生物能在高 pH 范围(pH > 7)的水溶液中溶解。制备方法是先用浓碱处理,制备出碱性几丁质,然后再与一氯醋酸进行非均相反应。这一过程放出大量的热,可能造成局部反应温度过高,并伴有脱乙酰反应发生。因此有人先用 DM SO 浸泡几丁质,使之膨胀,再进行反应,效果较好。将羧甲基几丁质进一步脱乙酰基,得到羧甲基甲壳胺(O-CM-Chitosan)。这种化合物的分子中既含有一NH₂,又含有一COOH,是一种典型的兼离子多糖,具有等电点,而且在等电点(PI)条件下呈不溶状态,具有良好的生物亲和性和螯和性。CM-Chitosan 也可以用甲壳胺进行反应,但首先应将-NH₂ 保护起来,羧甲基化后再脱除。若不进行保护则得到 N、O-羧甲基衍生物,这种衍生物较易制备,研究工作甚多,在此不多表述^[23-25]。

几丁质分子的糖基化衍生物是在几丁质分子上引入较短的糖基支链,其方法是首先将几丁质预处理,使 2 位氨基脱酰基后进行邻苯甲酰化,3 位羟基上乙酰化,6 位羟基上三甲硅烷化,转化成 TM SOTF 结构(Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate),再和酯化的糖基连接,然后控制水解条件,脱除乙酰基、邻苯二甲

酰基, 再对氨基乙酰化, 即得到几丁质的糖基化衍生物, 如引入甘露糖(D-mannose)见图 1. A 和乳糖(Lactose)见图 1. B 的反应路线。糖

基化衍生物使得几丁质能够在中性水溶液中均匀分散溶解, 能在醋酸缓冲液中被溶菌酶均相降解, 给几丁质研究提供便利条件^[26]。

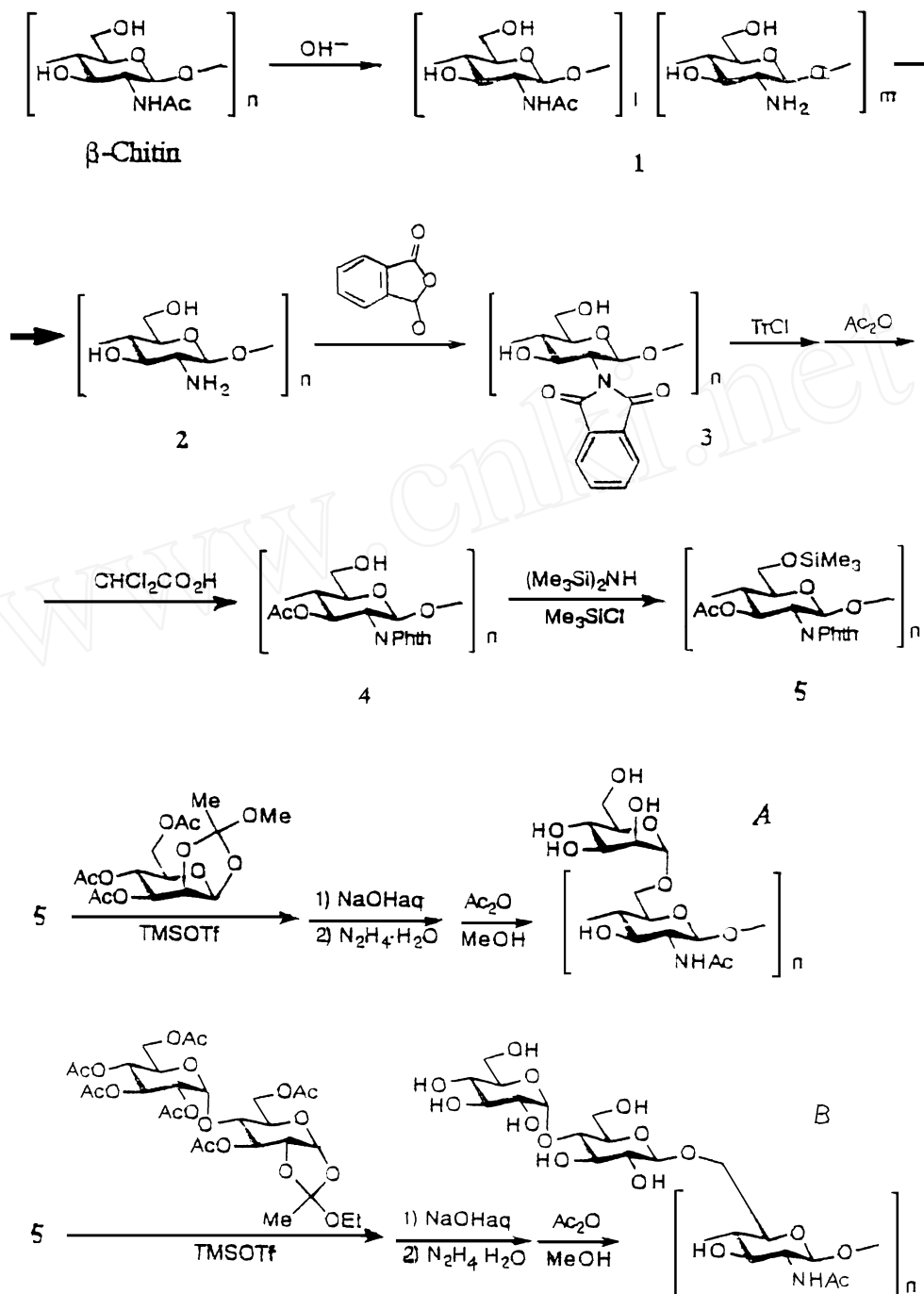


图 1 几丁质的糖基化衍生反应过程

A: 甘露糖基化 B: 乳糖基化

参考文献

- [1] 吴东儒, 糖类的生物化学, 1987. 6
- [2] R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", 1977.
- [3] T. W. Goodwin and E. I Mercer, Introduction to Plant Biochemistry, 2nd Ed., Pergamon Press, 1983
- [4] J. F. Kennedy and C. A. White, Bioactive Carbohydrates: in Chemistry, Biochemistry and Biology, Ellis Horwood and J. Wiley and Sons, 1983
- [5] Annual Review of Biochemistry Vol 51, P. 763- 793 (1982).
- [6] A. B. Foster and J. M. Webber, Advances in Carbohydrate Chem., 15, 371 (1960).
- [7] R. A. A. Muzzarelli, Atec Edizioni, Chitin Enzymology, 1996, Vol 2 P483- 490, Italy. ISBN 88-86889-00-3
- [8] R. H. Hackman, Australian J. Biol Sci., 7, 168 (1954).
- [9] 刘万顺, 陈西广, 生物工程进展, 1996 V. 16 N. 6, 37... 40
- [10] Walker, A. N., Horst, M. N. J. Crust Biol 1992 vol 12, no. 3, pp. 354- 360
- [11] Keyhani, N. O.; Roseman, S., Dep. Biol., Johns Hopkins Univ., MD 21218, USA
- [12] D. Horton et al., Methods Carbohydr. Chem. 1965, 5, 403
- [13] Proc. Int. Conf. Chitin/Chitosan 1st 1977, 88 (1998).
- [14] Z. Holan, J. Chromatogr. 1980, 190, 67.
- [15] Eur. Pat. Appl., 77, 098, 1983
- [16] C. A. Kienzie-STERZER, Makromol. Chem. 1982, 183, 1353
- [17] 见矢胜, 高分子论文集, 1982, 39, 649
- [18] L. I. Batura, Cellul. Chem. Technol. 1981, 15, 487.
- [19] 杨靖究, 中国化学论文集, 1993,
- [20] K. Kaifu, J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 1981, 19, 2361.
- [21] 安东忠直, 高分子论文集, 1980, 37, 1.
- [22] H. Yamada, Carbohydr. Res. 1981, 92, 160
- [23] R. A. A. Muzzarelli, Pure Appl. 1982, 54, 2141.
- [24] S. Tokura, Polym. J. 1983, 15, 597.
- [25] R. Jrujib, Carbohydr. Res. 1968, 7, 483
- [26] R. A. A. Muzzarelli, Atec Edizioni, Chitin Enzymology, 1996, Vol 2, P483- 490, Italy. ISBN 88-86889-00-3

THE RESEARCH and PROGRESS ON CHITIN

Chen Xiguang Liu Wanshun Liu Chenguang
(Ocean University of Qingdao)

Abstract Chitin is a natural polysaccharide, second only to fibro in natural polymer. it is widespread in fungus, insects and crust animals in a very complex state. The molecular has rigidity and adhesion, but not dissolved in almost any solvent. Chitin can be made into many kind of derivatives which have important use. Now most chitin come from ocean, the research technology has some different from the general polysaccharide. This paper review chitin on the natural state, structure character, biosynthesis, isolation and derivative technology.

Key word chitin; chitin derivative; biosynthesis; derivation