行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

多孔幾丁聚醣基質製備及以溶菌酶對其改質之探討

<u>計畫類別:</u>個別型計畫 <u>計畫編號:</u>NSC91-2214-E-002-035-<u>執行期間:</u>91年08月01日至92年07月31日 執行單位:國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人: 謝學真

計畫參與人員: 苑乃義

報告類型:精簡報告

處理方式: 本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 11 月 29 日

多孔幾丁聚醣基質製備及以溶菌酶對其改質之探討

Fabrication of porous chitosan matrix and adjustment of matrix property by lysozyme

苑乃義、王大銘、謝學真*

國立台灣大學化工系

國科會計畫編號: NSC 91-2214-E-002-035

摘要:

幾丁聚醣為一良好的生醫材料,但是幾丁聚醣在生物體內降解較為緩慢。本研究將幾丁聚 醣製成多孔狀基質,以增加其降解反應的表面積,同時採用溶菌酶(lysozyme)增加幾丁聚醣降解 程度及速率,並探討溶菌酶以不同的添加方式降解基質,測定基質隨時間之重量改變、含水率 的變化與機械強度的變化。另以 SEM 觀察基質的結構。結果顯示,隨降解時間增加,基質的重 量減少、機械強度變低、結構逐漸鬆散,但含水率無顯著的變化。由此可知溶菌酶具有降解幾 丁聚醣的效果,使其性質改變。在不同的溶菌酶添加方式中,幾丁聚醣的降解速率亦不同。因 此,可藉由溶菌酶添加量及添加方式的改變來控制幾丁聚醣的降解速率,以因應不同應用上的 需求。

關鍵字:幾丁聚醣(chitosan)、溶菌酶(lysozyme)、降解(degradation)

前言

幾丁聚醣(chitosan),可由幾丁質(chitin)去乙醯化而得[1]。由於幾丁聚醣具有良好的生物特 性如生物相容性(biocompability)[2]、抗菌性(anti-bacterial action)[3]、可結晶性(crystallization)[4] 與生物可分解性(biodegradation)[5]。因此,廣為應用於生醫工程領域如藥物控制釋放(drug delivery)[6]、傷口敷料(wound healing)[7]等。

過去的研究中,幾丁聚醣在酸中會進行水解反應[8],然而其降解速率緩慢,因此必須使用 酵素增加其降解速率。而生物體內的溶菌酶 (lysozyme) 是其中一種可分解幾丁聚醣的酵素。通 常使用的是雞蛋白溶菌酶 (Hen-egg white lysozyme),分子量約在 14-15 kD 左右,其組成為單體 蛋白質(monomeric protein)。溶菌酶的分子內有四個雙硫鍵(disulfide bond),等電點(pI 值)約為 10.5[9]。溶菌酶的催化反應主要在水解微生物細胞壁多醣類中的 β -(1→4)-glycosidic bond。酵素 活性位置與基質鍵結殘基是乙醯化葡萄胺(N-acetylglucosamine),而被切斷的位置發生在含有乙 醯基之 β -(1→4)-glycosidic linkage[10]。

另外,根據文獻的報導,以 0.2mg/ml 的溶菌酶在 pH 5.6 之微酸性溶液下,經過 50 分鐘反應之後,約有 35%的幾丁聚醣被溶菌酶分解[11]。亦有學者將幾丁聚醣/丙烯酸的共聚物以溶菌酶分解之,數天後可達 30%~60%重量損失率[12]。

研究方法

幾丁聚醣基材的製備

先以 0.2 M 醋酸水溶液溶解幾丁聚醣(去乙醯度為 85%以上),其重量百分濃度為 4%(w/w)。 將溶解之幾丁聚醣溶液以超音波振盪洗淨機(BRANSON 3210)及離心機(2000 rpm, 60 min, KUBOTA 2100)去除氣泡。將去除氣泡之幾丁聚醣溶液 60 ml 倒入 15×15×0.9(cm³)的不銹鋼容器 中,置於低溫下待其結凍後,由容器中取出結凍之水-幾丁聚醣固體浸入低溫之鹼性溶液中使幾 丁聚醣沉澱及凝膠,之後將所得之幾丁聚醣基質浸入 4℃PBS 溶液中保存。

溶菌酶-瓊脂糖微粒混幾丁聚醣基材的製備

首先將低凝膠溫度(low gel point)的瓊脂糖(agarose)配置成40 mg/ml溶液5 ml。加入Tween-20 1g。將溶液恆溫於35℃,緩緩加入溶菌酶0.1g均勻攪拌。於定溫下攪拌30分鐘。將此溶液倒 入預熱至35℃的油(35 ml)中。停止恆溫加熱,冰浴維持攪拌,待瓊脂糖凝膠後離心、過濾將微 粒取出。將此微粒混入配置好的幾丁聚醣溶液中,如同上述之步驟製成多孔性基質。

直接混入溶菌酶-幾丁聚醣基材之製備

以 0.2 M 醋酸水溶液溶解幾丁聚醣,其重量百分濃度為 4 %(w/w),混入 0.1 g 溶菌酶,總重量為 60 g,之後離心去除氣泡,以前述之步驟,製成多孔性基質。

幾丁聚醣的降解

將4cm×1cm×2mm的基質浸泡於70%酒精溶液中30分鐘,再浸泡於含抗生素溶液中2小時,達成滅菌效果。泡入添加溶菌酶的0.05MPBS(0.05wt%、Tween80,pH7.4)水溶液中,若 混有溶菌酶的基材則是直接泡入0.05MPBS,將上述之基材置於37℃培養箱中,於固定時間點 (1h至數天或更久)取樣烘乾秤重。

掃描電子顯微鏡(SEM)觀察

幾丁聚醣基質先裁成 0.5cm×0.5cm×2mm 大小,浸泡於純水清洗三次,之後於 4℃下逐次以 50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%的酒精脫水,每次 15 分鐘。之後再進行臨界點乾燥、 鍍金,以掃描式電子顯微鏡觀察基材的孔洞分布、表面及截面性質。

孔隙度测量

先測量基材的各項數值如下所示,再利用下列公式計算孔隙度:

$$porosity(\%) = \frac{V_M - V_P}{V_M} \times 100\% = \frac{D \times A - \left(\frac{W_M}{\rho_P}\right)}{D \times A} \times 100\%$$
(1)

其中: V_M 為基材的總體積; V_P 為幾丁聚醣實際所佔的體積;D為基材厚度;A為基質面積; W_M 為基材的質量; ρ_p 為緻密幾丁聚醣的密度。純幾丁聚醣的密度為 1.342g/cm³ [21]。 機械強度測試

成例出史及例刊

將溶菌酶降解後的基材,利用拉伸機 (tensile strength instrument) 於完全膨潤狀態下測定基材的機械強度,所採用的拉伸速度 10 mm/min。

基質含水率测定

將不同降解條件下的幾丁聚醣基材取出,輕拭基材表面後,以電子天秤稱量溼重,再將基材烘乾稱得乾重,再利用下列公式計算膨潤度。

含水率(%)=(濕重--乾重)/濕重 (2)

結果與討論

由 Fig. 1 顯示在不同系統中幾丁聚醣基質的降解情況,在有溶菌酶相較於不含溶菌酶的系統,溶菌酶確有降解幾丁聚醣基質的效果,且降解率可達 20%左右,之後似乎無法再提高降解率。其原因可能是溶菌酶是對含乙醯基的 β -(1→4)-glycosidic bond 去作用,而本研究所使用的幾丁聚醣的乙醯化程度不高有關。由 Fig. 2 與 Fig. 3 的結果可得,幾丁聚醣含水率和孔隙度隨降解時間增加而略為增加。另外,綜合比較 Fig. 1~3 可發現混入瓊脂糖微粒(PL)的基材降解較慢,含水率較低,孔隙度亦下降,這些可能是因微粒的存在,進而改變基材的特性所致。在 Fig. 4 機械性質的測試中,在加有溶菌酶的降解系統(AL、ML、PL),相較於不含溶菌酶的系統(control), 其機械強度有著明顯的不同,外加溶菌酶的系統(AL)中,最大拉伸力下的應力值隨降解的時間增加而下降的程度最多,而混入瓊脂糖微粒(PL)的基材則是在一開始的強度就較差,而直接混入溶菌酶的基材(ML)則是有相同的情形。但未加溶菌酶的系統則是幾乎沒有變化,並且擁有最高的應力值。

關於基質的結構變化,由 Fig. 5 電子掃描顯微鏡的觀察,經過溶菌酶降解後的幾丁聚醣基

材,表面((a) ~(d))與底面((e)~(h))的結構被破壞,多出一些孔洞,而由截面的圖((i)~(l)),可 以發現孔洞的壁上多出許多小洞,結構變的比較鬆散,推測應是被降解的緣故。由重量損失結 果可得,在不同的溶菌酶加入方式,會有不同的降解效果,直接混入的作用於初期最快,而微 粒包覆法則是由於多了瓊脂糖的質傳阻力,因此初期作用較小。但長時間都可達 20%的降解率, 因此,可藉由溶菌酶添加方式的改變來調整幾丁聚醣基材的降解速率,以因應各種應用上的需 求。

參考文獻

- 1. Goosen M. Applications of chitin and chitosan, Technomic Publishing., Lancaster (1997).
- 2. Yannas IV, B J, "Design of an artificial skin. Basic design principle," *J. Biomed. Mater. Res.*, 14, 65 (1980).
- 3. Hu S G, Jou C H, Yang M C, "Surface grafting of polyester fiber with chitosan and the antibacterial activity of pathogenic bacteria," *J. Appl. Polym. Sci.*, 86, 2977 (2002).
- 4. Robert Joel Samuels, "Solid state characterization of the structure of chitosan films," *J. Polym. Sci.*, 19, 1081 (1981).
- 5. Varum K M, Ottoy M H, Smidsrod O, "Acid hydrolysis of chitosans," *Carbohyd. Polym*, 41, 89 (2001).
- 6. Bernkop Schnurch A, Kast C E, "Chemically modified chitosans as enzyme inhibitors," *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 52, 127 (2001).
- 7. Yamamoto H, Senoo Y, "Polyion complex fiber and capsule formed by self assembly of chitosan and gellan at solution interfaces," *Macromol. Chem. Physic.*, 201, 84 (2000).
- Chen R H, Chang J R, Shyur J S, "Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes on molecular weight and polydispersity of treated chitosan," *Carbohyd. Res*, 299, 287 (1997).
- 9. Osserman E F, Canfield R E, and Beychok S, Lysozyme, Academic Press, USA (1974).
- 10. Pangburn S H, Trescony P V, Heller J, "Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels," *Biomaterials*, 3, 105 (1982).
- 11. Quong D, Yeo J N, Neufeld R J, "Stability of chitosan and poly-L-lysine membranes coating DNA-alginate beads when exposed to hydrolytic enzymes," *J. Microencapsul.*, 16, 73 (1999).
- 12. Izume M, Nagae S, Kawagishi H, Mitsutomi M, Ohtakata A, "Action pattern of bacillus Sp No-7-M Chitosanase on Partially N-Acetylated chitosan," *Biosci. Biotech. Bioch.*, 56, 448 (1992).





Fig. 1 Time course of degradation of chitosan matrices by lysozyme. (mean \pm SD, n 4). AL: lysozyme added in PBS; ML: lysozyme dispersed in matrices; PL: lysozyme embedded in agarose particles; control: no lysozyme used.

Fig. 2 Time course of water content of chitosan matrices. (mean±SD, n 4). AL: lysozyme added in PBS; ML: lysozyme dispersed in matrices; PL: lysozyme embedded in agarose particles; control: no lysozyme used.



Fig. 3 Time course of porosity of chitosan matrices. (mean±SD, n 4). AL: lysozyme added in PBS; ML: lysozyme dispersed in matrices; PL: lysozyme embedded in agarose particles; control: no lysozyme used.



Fig. 4 Mechanical strength of chitosan matrices. (mean \pm SD, n 4). AL: lysozyme added in PBS; ML: lysozyme dispersed in matrices; PL: lysozyme embedded in agarose particles; control: no lysozyme used.



Fig. 5 The SEM micrographs of chitosan matrices. (Bar = $100 \mu m$)