

含糖聚合物的酶促合成

才 滢, 吴 起, 薛兴涛, 冯陈国, 吕德水, 林贤福^{*}
(浙江大学化学系, 杭州 310027)

摘要:介绍含糖聚合物的酶促催化合成研究进展, 主要包括主链含糖聚糖酯、支链含糖聚合物、中心为糖的星形聚合物、硅烷主链含糖聚合物等。主链含糖聚合物直接由酶促催化酯化或酯交换作用制得; 支链含糖聚合物由酶促合成糖酯单体及单体的化学聚合两步制得。

关键词:酶促合成; 聚糖酯; 含糖聚合物; 合成

含糖聚合物是一种生物可降解的功能高分子材料, 根据其结构主要分为两大类, 一类主链含糖, 具有良好的水溶性, 可用作吸水剂、卫生用品、缓释药物等; 另一类支链含糖, 不仅良好的水溶性可直接用于生物化学和生物医学, 如蛋白质的分离、细胞培养及缓释药物^[1]等, 而且其支链上的糖可以被生物体内的糖类受体识别, 是研究细胞间分子识别行为深入认识生命现象的模型分子, 因此含糖聚合物合成研究引起各国学者的重视。

由于糖分子存在众多微环境相似的羟基, 聚糖酯的化学合成方法存在条件苛刻、选择性差和产物复杂等问题。而酶是具有高度的立体选择性、化学选择性及高效、快速、专一、无毒等催化特性的生物催化剂, 在非水介质中能够催化反应^[2]并具有高度选择性, 因而酶促方法合成含糖聚合物研究受到了青睐。本文对近年来含糖聚合物的酶促合成研究进展进行综述。

1 主链含糖聚合物的酶促合成

1.1 聚糖酯的一步合成

1991 年, Dordick 等^[3]以无水吡啶为溶剂, 考察了枯草杆菌碱性蛋白酶(Proleather)等 15 种酶(见表 1)催化蔗糖和丁酸-2, 2, 2-三氟乙酯进行的酯交换反应, 其中十一种酶具有催化活性, 且酯化位置均在蔗糖的 6、1' 位。然后以枯草杆菌碱性蛋白酶(Proleather)催化蔗糖与己二酸二-2, 2, 2-三氟乙酯的酯交换反应, 生成主链含糖的聚蔗糖酯, 如图 1 所示, 分子量 13, 000, 具有高度的水溶性, 也能够溶于极性有机溶剂。酶降解实验表明, 在 Proleather 作用下, 9d 后该聚合物的分子量降至 900。

表 1 吡啶中应用的酶及 5 天后蔗糖的转化率(括号内为商品名)

反应所用催化剂	转化率	反应所用催化剂	转化率
无酶	0	枯草杆菌蛋白酶(rapodase S-90)	24%
杆菌蛋白酶(bioenzyme 240)	100%	脂肪酶(lipozyme)	8%
碱性蛋白酶(Proleather)	96%	假丝酵母脂肪酶	7%
枯草杆菌蛋白酶(蛋白酶 N)	83%	猪胰脂肪酶	13%
酰氨酶	70%	脂肪酶(bioenzyme S)	0
枯草杆菌蛋白酶(B-500)	65%	酵母酯酶	0
枯草杆菌蛋白酶(蛋白酶 HT)	34%	脂肪酶 P	0
脂肪酶 G	32%	脂肪酶 AP	0

作者简介:才滢(1978—), 女, 博士生, 主要从事酶促合成生物可降解性材料的研究。

^{*} 通讯联系人
(C) 1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

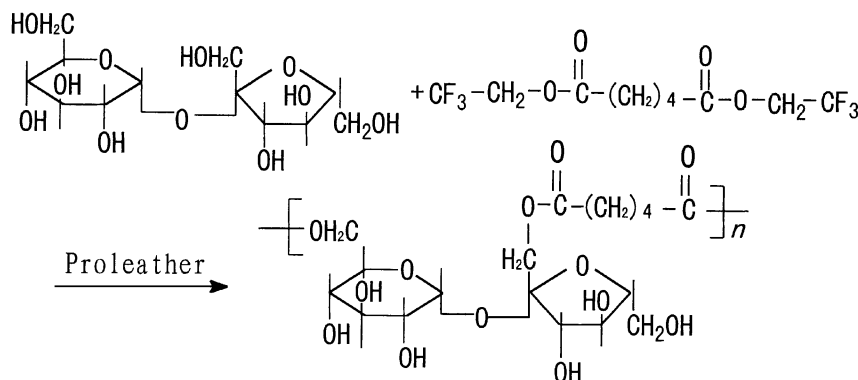


图 1 聚蔗糖己二酸酯的酶促合成

Kaneko 等^[4]将纤维二糖和 2,2,2-三氟乙醇己二酸酯溶于 DMF (N,N-二甲基甲酰胺)中,用固定多孔聚丙烯板上的脂肪酶作为催化剂,在 45℃ 条件下反应 10~15d 后,得到了由线性聚糖酯组成的薄膜。这类聚合物包含两个以上的重复单元,其中一个以上的重复单元中含有糖基。酶降解实验表明,该聚合物在酯酶作用下分解,释放出纤维二糖和己二酸。进一步研究表明,这类聚合物是高度无定型的固体,可以生成与催化剂载体类似的形状。这类聚糖酯的合成还可以用低聚糖作为羟基供体,与脂肪族二酸发生酯化反应。

1.2 聚糖酯的两步合成

Park 等^[5]设计了主链含糖聚酯的全酶促两步合成方法。首先,在丙酮中以 Novozym-435 催化蔗糖与己二酸二乙酯的酯交换反应,得到 6,6'-酯化的蔗糖二酯(SDVA),产率为 71.3%。然后再在丙酮中以 Novozym-435 催化 SDVA 与二醇(包括 1,4-丁二醇、1,6-己二醇、1,8-辛二醇、1,10-癸二醇和对苯二甲醇)的缩聚反应,其中,SDVA 与 1,8-辛二醇缩聚的产物分子量最高, $M_w = 22,200$ 。降解实验显示,该聚合物能够被 Novozym-435 快速降解。

Patil 等^[6]以吡啶为溶剂,用枯草杆菌碱性蛋白酶(Proleather)催化蔗糖与己二酸二-2,2,2-三氟乙酯的酯交换反应,仅用 5d 时间合成 6,1'-位酯化的蔗糖二酯,再用化学方法使之与己二胺缩聚,生成的主链含糖聚合物分子量为 8,100 (M_w)。由于该反应既保证了酶的催化特性,又缩短了反应时间,综合了化学方法和酶促方法的优势,因此,越来越为研究者青睐。

Park 等^[7]以吡啶为溶剂,用 *Bacillus licheniformis* 蛋白酶催化蔗糖与对苯二甲酸的酯交换反应,6d 后,开始生成蔗糖二酯,20d 后,蔗糖二酯的产率为 13.8%,其中 6,1'-二酯和 6',6'-二酯的比例为 2:1。蔗糖二酯分别与乙二醇和乙二胺缩聚,得到主链含糖的聚酯和聚酰胺,其数均分子量分别为 3,200 和 4,300。

1.3 聚糖醇酯的酶促合成

Hiroshi 等^[8]第一次报道了糖醇作为单体进行酶促聚合的反应。他们以山梨糖醇和癸二酸二乙酯为单体,以乙腈为溶剂,用 *Candida Antarctica* 脂肪酶(CAL)催化合成了聚癸二酸山梨酯,如图 2 所示。¹³C NMR 分析结果表明,山梨糖醇的酯化位置在 1,6 位,说明酶促反应具有明显的选择性。他们还研究了反应温度对聚合物产率及分子量的影响,当反应温度为 80℃ 时,聚合物分子量最高,超过了 10,000,但产率较低;温度为 20℃ 时,产率最高,但分子量较低。

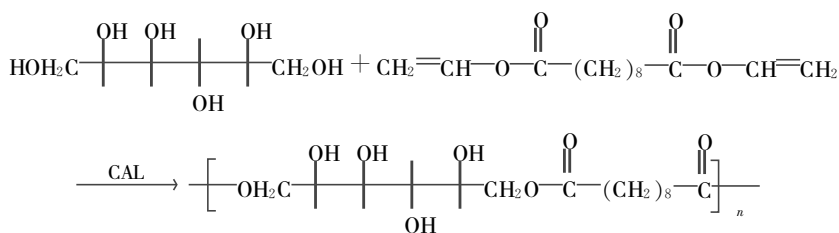


图2 癸二酸山梨糖醇酯的酶促合成

2 支链含糖聚合物的酶促合成

支链含糖聚合物都具有非常规则的梳状结构,由可聚合的单糖衍生物(一般含一个双键,如丙烯酸糖酯)通过化学方法聚合得到。其中,可聚合单糖衍生物是在有机溶剂中酶促合成的,主要分为两类,一类是不饱和羟基糖苷,另一类为糖酯,当糖酯的酰基供体是二乙烯酯时,其聚合物可完全生物降解^[9]。

2.1 不饱和羟基糖苷的酶促合成

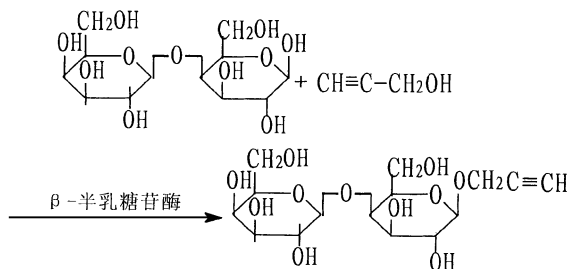
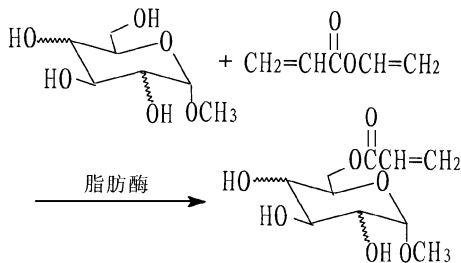
Martin 等^[10]在 pH 值分别为 4.5 和 4.85 的醋酸钠缓冲溶液中,以 β -半乳糖苷酶催化乳糖与炔丙醇和烯丙醇的反应,分别得到炔丙基- β -D-吡喃半乳糖苷和烯丙基- β -D-半乳糖苷,产率分别为 42% 和 13%,如图 3 所示。前者以乙醇为溶剂,在 AlBr_3 存在时聚合,聚合物分子量为 1,300 (M_w);后者在 DMF 中由 AIBN 引发聚合,分子量可达 36,000 (M_w)。降解实验证明,两者均可被 β -半乳糖苷酶降解。此外,他们还以 β -葡萄糖苷酶催化合成了炔丙基- β -D-吡喃葡萄糖苷,产率 10%。

2.2 支链含二糖聚合物的酶促合成

Dordick 等^[6]以吡啶为溶剂,以枯草杆菌碱性蛋白酶(Proleather)催化蔗糖与丙烯酸乙烯酯的酯交换反应,生成了丙烯酸蔗糖酯,再用化学方法使之聚合,聚合物的分子量达到 57,000,溶于 DMF 和 NMP(N-甲基吡咯烷酮)。

2.3 支链含非还原性单糖酯的酶促合成

Martin 等^[11]以吡啶为溶剂,以 *Psuesomonas cepacia* 脂肪酶催化 α -甲基半乳糖苷与丙烯酸乙烯酯的酯交换反应,生成 6 位酯化的半乳糖酯,如图 4 所示。该糖酯在 AIBN 引发下在 DMF 中聚合,得到的聚合物重均分子量 135,000,数均分子量 58,000,溶于水和极性溶剂。把甲基改为苯基后,同样条件下酯化再聚合,得到重均分子量 52,700,数均分子量 28,900 的难溶于水的聚合物。

图3 炔丙基- β -D-吡喃半乳糖苷的酶促合成图4 丙烯酸- α -甲基半乳糖酯的酶促合成

Ikeda 等^[12]以 *t*-丁醇为溶剂,以 *Psuesomonas* sp. lipoprotein 脂肪酶催化合成了丙烯酸葡萄糖酯。为增加葡萄糖在 *t*-丁醇中的溶解度,他们先使葡萄糖与苯硼酸络合,再用酶催化络合物与丙烯酸乙酯的反应,水解后即得到丙烯酸葡萄糖酯。该糖酯用化学方法聚合,得到了分子量为 14,000 的聚合物。

Bisht 等^[13]以 THF 为溶剂,以 Novozym-435 催化槐糖脂与丙烯酸乙酯的酯交换反应,生成可聚合的槐糖脂丙烯酸酯,在 DMF 中,65℃ 下该糖酯可以由 AIBN 引发均聚,聚合产物由于 1,6'-内酯长链的存在而不溶于水,但溶于 DMF 和 DMSO;与丙烯酰胺共聚,当糖酯的摩尔百分数为 2.1 时,聚合物的分子量最大,为 42,000;摩尔百分数小于 3 时,共聚物溶于水。该糖酯还可以与丙烯酸共聚。

2.4 支链含还原性单糖酯的酶促合成

支链含还原性糖的聚合物与生物分子的反应活性比支链含非还原性糖的聚合物高,更适合在生物体外模拟生物反应以研究生物体内的生物化学现象。

Kitagawa 等^[14~16]以 DMF 为溶剂,以 *Streptomyces* sp. 碱性蛋白酶催化葡萄糖和己二酸二乙酯的酯交换反应,生成了 6 位酯化的葡萄糖酯,如图 5 所示,其聚合物完全生物可降解^[14]。他们还研究了温度对该酯化反应的影响^[15],发现在 50℃ 时酶的催化活性最高,当温度高于 60℃ 时,酶完全失活。*Streptomyces* sp. 碱性蛋白酶还可以在 DMF 中催化半乳糖、甘露糖与己二酸二乙酯的酯交换反应^[16],酯化位置均在伯羟基;当加入 20% (v/v) 的 DMSO 作为辅助溶剂后,半乳糖的酯化位置改在 2 位,产率为 49%,葡萄糖和甘露糖的酯化位置不变,但产率有所下降。他们还比较了 *Bacillus* 碱性蛋白酶和 *Streptomyces* sp. 碱性蛋白酶在不同溶剂中的催化性能^[17],发现 *Bacillus* 碱性蛋白酶在吡啶中的催化活性较大,而 *Streptomyces* sp. 碱性蛋白酶在 DMF 中的催化活性更好。*Streptomyces* sp. 碱性蛋白酶在 DMF 中催化葡萄糖和己二酸二乙酯的酯交换反应,葡萄糖酯的产率为 66%,该糖酯可以在水中聚合。

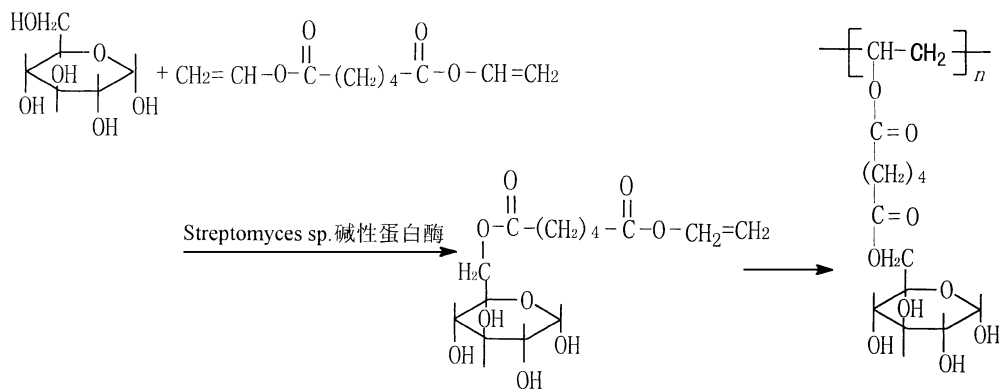


图 5 乙烷基己二酸葡萄糖酯的酶促合成

Shibatani 等^[18]检验了 34 种酶对葡萄糖与丁酸-2,2,2-三氟乙酯的反应活性,其中 *Streptomyces* sp. 碱性蛋白酶的活性最大。以 DMF 为溶剂,用 *Streptomyces* sp. 碱性蛋白酶催化葡萄糖和己二酸二乙酯的酯交换反应,葡萄糖酯的产率为 56%。

Tokiwa 等^[19]以 DMF 为溶剂,以 *Streptomyces* sp. 碱性蛋白酶催化阿拉伯糖与己二酸二乙酯的酯交换反应,7d 后,5 位酯化的阿拉伯糖酯产率为 50%。核磁共振分析结果显示,呋喃阿拉伯糖苷的伯羟基发生酯化,而吡喃阿拉伯糖苷未发生酯化反应。

Kitagawa 等^[20]以吡啶为溶剂,用 *Alcaligenes* sp. 脂肪酶催化葡萄糖和癸二酸二乙酯的酯交换

反应,6位酯化的葡萄糖酯产率为99%。该糖酯在DMF中,以AIBN为引发剂聚合,聚合物数均分子量为11,000。

2.5 支链含核苷聚合物的酶促合成

核糖不仅是DNA、RNA等生物大分子的主要成分,也是一些生命现象不可缺少的小分子如ATP、NAD、UDP的组成部分,在生物化学反应中占重要地位。支链含核苷的聚合物可用于合成生物大分子如抗感RNA(anti-sense RNA)或用作其聚合的辅助因素。

Tokiwa等^[21]以DMF/DMSO(4:1,v/v)为溶剂,以Streptomyces sp.碱性蛋白酶催化腺苷与己二酸二乙酯的酯交换反应,得到了3'位酯化的可聚合核苷酯。

Kitagawa等^[22]以DMF为溶剂,以Streptomyces sp.碱性蛋白酶催化胸腺嘧啶核苷与己二酸二乙酯的酯交换反应,得到了5位酯化的可聚合己二酸乙酯核苷酯,单体在DMSO中聚合,聚合物分子量达到24,000(M_n)。

Wang等^[23]以乙腈为溶剂,以CAL催化胸腺嘧啶核苷与对羟基苯甲酸-2,2,2-三氟乙酯的酯交换反应,生成的对羟基苯甲酸胸腺嘧啶核苷酯在加入60%乙腈的pH=7.0的磷酸钠盐缓冲液中,在 H_2O_2 存在条件下,由豆蔻过氧化酶(SHP)催化聚合,聚合物 $M_n=21,700$, $d=1.2$ 。

3 其它含糖聚合物的酶促合成

除上述酶促合成的含糖聚合物外,还有含糖水凝胶、端基为糖的聚酯、中心为糖的星形聚合物、硅烷主链含糖聚合物等生物可降解的含糖聚合物。

3.1 含糖水凝胶

Chen等^[24]以脂肪酶P在吡啶中催化 α -甲基半乳糖苷和丙烯酸乙酯的酯交换反应,生成6位酯化的半乳糖酯,该糖酯以N,N'-亚甲基二丙烯酰胺(BIS)为交联剂,55℃时在水中生成含糖水凝胶,可用于吸水剂或生物相容性材料。

3.2 端基为糖的聚酯

Córdova等^[25]以CALB(Novozym-435)为催化剂,将摩尔比为30:1的 ϵ -己内酯和甲基吡喃葡萄糖或半乳糖苷加入丙烯腈中,得到端基为糖的线形聚酯,聚酯链的重均分子量为3,750。这是一种高分子表面活性剂,可是用作洗涤剂、包装袋等。

3.3 中心为糖的星形聚合物

Deng等^[26]以猪胰脂肪酶(PPL)为催化剂,温度为70℃,在EGP存在时,合成乙基吡喃葡萄糖-6-聚己内酯,其数均分子量为1,120。然后,在THF中,25℃、以脂肪酶PS 30为催化剂,使之与醋酸乙烯酯反应,8h后,该糖酯的聚酯链被封端。在100℃、辛酸锌存在下,使这种聚酯与丙交酯反应,则糖的其余位置均连入聚丙交酯链,成为一种星形聚合物,星形的中心位置为糖分子。

3.4 主链为聚二甲基硅烷的含糖聚合物

Braunmühl等^[27]以马铃薯磷酸化酶催化聚二甲基硅烷与淀粉的接枝聚合,得到一种全新的两性聚合物,其支链为糖,主链为聚二甲基硅烷。这类聚合物无论在本体或溶液中均有不同寻常的性质,如良好的机械强度、生物相容性等。

4 总结

综上所述,无论主链含糖聚酯、支链含糖聚合物、中心为糖的星形聚合物或硅烷主链含糖聚

合物,酶促合成是一种高度选择性的合成功能聚糖酯方法,为糖酯类聚合物的合成提供了一个新的选择。目前酶促合成用于工业生产具有一定的困难,但随着生物技术和酶大规模筛选的实现,酶促合成方法必将为生物医药和生命科学提供各种分子结构的聚糖酯材料。

参考文献:

- [1] Miyata T, Nakamae K. Trends Polym Sci, 1997, 5, 198.
- [2] Zaks A, Klivanov A M. Science, 1984, 224, 1249.
- [3] Dordick J S, Rethwisch D G, Patil D R. Biotechnol & Bioeng, 1991, 37, 639.
- [4] Kaneko N, Mihara C, Kishi H, et al. Jpn Kokai Tokkyo Koho Jp, 10 218, 903, 1998.
- [5] Park Oh-Jim, Kim Dae-Yun, Dordick J S. Biotechnol & Bioeng, 2000, 70, 208.
- [6] Patil D R, Dordick J S, Rethwisch D G. Macromolecules, 1991, 24, 3462.
- [7] Park H G, Chang H N, Dordick J S. Biotechnol & Bioeng, 2001, 72, 541.
- [8] Hiroshi U, Ellen K, Satoshi W, et al. Chem Lett, 2000, 800.
- [9] Tokiwa Y, Fan H, Hiraguri Y, et al. Macromolecules, 2000, 33, 1636.
- [10] Martin B D, Ampofo S A, Dordick J S, et al. Macromolecules 1992 25, 7081.
- [11] Martin B D, Linhardt R J, Dordick J S. Biomaterials, 1998, 19, 69.
- [12] Ikeda I, Klivanov A M. Biotechnol & Bioeng, 1993, 42, 788.
- [13] Bisht K S, Gao W, Gross R A. Macromolecules, 2000, 33, 6208.
- [14] Kitagawa M, Tokiwa Y. Kobunshi Ronbunshu, 2000, 57, 629.
- [15] Kitagawa M, Tokiwa T, Fan H, et al. Biotechnol Lett, 2000, 22, 879.
- [16] Kitagawa M, Fan H, Raku T, et al. Biotechnol Lett, 1999, 21, 355.
- [17] Kitagawa M, Tokiwa Y. Carbohydr Chem, 1998, 17, 893.
- [18] Shibatani S, Kitagawa M, Tokiwa Y. Biotechnol Lett, 1997, 19, 511.
- [19] Tokiwa Y, Kitagawa M, Fan H, et al. Biotechnol Tech, 1999, 13(3), 173.
- [20] Kitagawa M, Tokiwa Y. Biotechnol Lett, 1998, 20, 627.
- [21] Tokiwa Y, Kitagawa M, Fan H, et al. Biotechnol Tech, 1999, 13(8), 563.
- [22] Kitagawa M, Fan H, Tokiwa Y, et al. Biotech Lett, 2000, 22, 883.
- [23] Wang P, Dordick J S. Macromolecules, 1998, 31, 941.
- [24] Chen X, Dordick J S, Rethwisch D G. Macromolecules, 1995, 28, 6014.
- [25] Córdova A, Iversen T. Macromolecules, 1998, 31, 1040.
- [26] Deng F, Bisht K S, Gross R A, et al. Macromolecules, 1999, 32, 5159.
- [27] Braunmühl V V, Jonas G, Staoller R. Macromolecules, 1995, 28, 17.

Enzymatic Synthesis of Sugar-Containing Polymers

CAI Ying, WU Qi, XUE Xing-tao, FENG Chen-guo, LV De-shui, LIN Xian-fu^{*}

(Chemistry Department, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: This article provides a review of enzymatic synthesis of sugar-containing polymers concluding sugar-containing linear polyesters, linear polymers with pendent saccharides which are called glycopolymers and others. Most of the sugar-containing linear polyesters can be synthesized with enzyme as the catalyst, while the glycopolymers must be synthesized by two steps: enzymatic synthesis of sugar-containing monomers and chemically polymerization of the monomers.

Key words: Enzymatic synthesis; Sugar ester; Sugar-containing polymers; Synthesis