

[研究简报]

聚 己内酯的微米硅球固定化猪胰脂肪酶促合成

王迎霞, 贺 枫, 李 峰, 冯 俊, 卓仁禧

(教育部生物医用材料重点实验室, 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072)

关键词 猪胰脂肪酶; 固定化; 微米硅球; 酶促开环聚合; 聚 己内酯

中图分类号 O631

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)05-0982-03

酶促开环聚合方法是近年来迅速发展起来的一种新的聚合物合成方法^[1,2]。传统的化学聚合方法往往要求无水、无氧以及高纯的金属催化剂等苛刻的反应条件,对于生物医用高分子材料而言,残留的金属催化剂也必须在反应后彻底清除,否则可能造成的毒副作用会直接影响生物医用材料的生物相容性和使用安全性。而酶促开环聚合方法作为环境友好方法的一种,能有效地克服以上传统化学方法的不足,保证所制备聚合物材料的生物相容性和使用安全性。聚 己内酯是一类生物可降解和生物相容性高分子,被广泛用作生物医用材料和包装材料^[3]。聚 己内酯通常是通过七元环的内酯(己内酯; ϵ -CL)的开环聚合反应制备的^[4],近年来也有一些用酶促开环聚合方法来制备聚 己内酯的报道^[5,6]。

脂肪酶作为水解酶的一种,是目前用于制备生物医用高分子的最广泛的一种酶,其中猪胰脂肪酶便宜易得,并且对丙交酯^[7]、环状碳酸酯^[8]以及一些环状内酯^[6]都具有很高的催化活性。根据文献^[6]报道,无论在本体聚合还是在有机溶剂中进行溶液聚合,猪胰脂肪酶对 己内酯都表现出相当低的催化活性。在以往的研究中,我们发现硅球是一类性能优良的刚性无机载体,猪胰脂肪酶固定多孔硅球以及微米硅球上以后,酶分子结构得到较好的稳定,耐热性增强,更适用于催化反应,表现出对环状磷酸酯^[9]和环状碳酸酯^[10]更高的催化活性;并且硅球固定化猪胰脂肪酶具有很好的可循环使用性。

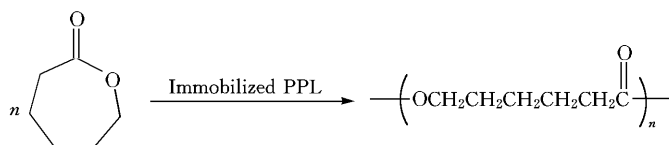
本文采用微米硅球固定化猪胰脂肪酶为催化剂合成聚 己内酯,以期获得具有较高分子量、良好生物相容性和使用安全性的生物可降解医用高分子材料。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 猪胰脂肪酶(PPL, 198.90 Unit/mg蛋白), Sigma公司;微米硅球(1 μ m, Narrow distribution), Dupont公司;酶的固定化参照文献^[8]方法进行,每克微米硅球固定化猪胰脂肪酶的活力相当于53.2 mg自由酶的活力。己内酯(ϵ -CL), Aldrich公司。其它试剂均为分析纯试剂。

聚合物的分子量及其分布由气相分配色谱(GPC, Waters Millennium³² HPLC 2690分离系统, Shodex K803凝胶柱)测定,以聚苯乙烯为标样,三氯甲烷为流动相(1.0 mL/min)。聚合物的核磁共振分析用 Varian Mercury-VX 300 Apparatus谱仪测定。

1.2 实验过程 以微米硅球固定化猪胰脂肪酶为催化剂,由本体聚合得到聚 己内酯(Scheme 1)。

Scheme 1 Ring-opening polymerization of ϵ -CL catalyzed by immobilized PPL on micron glass beads

收稿日期: 2005-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20104005)资助。

联系人简介: 贺 枫(1970年出生),女,博士,副教授,主要从事生物医用高分子研究。E-mail: hef@chem.whu.edu.cn

主要制备步骤如下: 在氩气保护下, 将一定量的 ϵ -CL 和固定化酶依次放入清洁干燥的反应管中, 抽真空后充入氩气, 如此反复多次后封管; 在磁力搅拌下, 恒温反应一定时间后取出. 将产物溶解在二氯甲烷中, 通过离心除去不溶的酶, 浓缩清液, 在甲醇中沉淀得到聚 己内酯. 如此重复沉淀 2 次后, 将聚合物在真空下干燥至恒重.

将离心得到的固定化酶通过二氯甲烷和蒸馏水的充分洗涤后, 在室温下真空干燥至恒重. 在 180 重复聚合反应 240 h, 使用的固定化酶的质量分数为 5.18%.

2 结果与讨论

目前, 聚 己内酯的酶促合成已经采用了多种不同来源的脂肪酶, 如: *Candida Cylindracea Lipase* (Lipase CC), *Pseudomonas Fluorescens Lipase* (Lipase PF), *Pseudomonas Cepacia Lipase* (Lipase PC) 和 *Porcine pancreas lipase* (PPL) 等. 脂肪酶对 己内酯开环聚合的催化活性与脂肪酶的来源密切相关. 由于低廉的价格和较高的催化活力, 猪胰脂肪酶被广泛地用于生物可降解高分子材料的合成. 然而, 猪胰脂肪酶对 己内酯却表现出很低的催化活力, 得到的聚 己内酯分子量很低 ($M_n < 3\ 000$)^[6].

我们曾报道聚磷酸酯的酶促开环聚合反应, 但以猪胰脂肪酶为催化剂时得到的聚磷酸酯的分子量较低^[11]; 以多孔硅球固定化猪胰脂肪酶为催化剂合成的聚磷酸酯的分子量较高^[9]. 因此本文通过固定化来有效地提高猪胰脂肪酶对 己内酯开环聚合反应的催化活性. 以微米硅球固定化猪胰脂肪酶为催化剂, 通过本体聚合, 合成了聚 己内酯. 研究了酶的使用浓度、聚合反应时间和温度等因素对聚合反应的影响. 结果列于表 1.

Table 1 Ring-opening polymerization of ϵ -CL catalyzed by immobilized PPL on micron glass beads

Entry	Enzyme mass fraction (%)	Temperature/	Time/h	M_n	M_w/M_n
1	5.40	140	192	15 200	1.61
2	2.60	140	240	14 900	1.70
3	1.08	160	192	15 000	1.70
4	3.98	160	192	13 900	1.55
5	2.49	160	240	18 900	1.80
6	11.78	180	144	8 600	1.47
7	1.05	180	192	15 600	1.31
8	5.19	180	192	17 100	1.65
9	2.27	180	240	19 500	1.85
10	5.31	180	240	20 500	1.75
11*	5.18	180	240	21 300	1.98

* Recovered immobilized PPL from entry 10 was used for the polymerization in entry 11.

在实验条件范围内, 较高的反应温度和较长的反应时间有助于获得较高分子量的聚 己内酯. 在 140, 160 和 180 反应温度下, 低于 144 h 的反应时间基本上得不到聚合产物; 同时采用低于 140 的反应温度时, 反应 240 h 后也未得到聚 己内酯. 另外, 酶用量对聚合反应也有一定的影响, 过高的酶浓度使得体系中引发点增多, 导致聚 己内酯分子量下降. 在不同的反应条件下, 聚合反应的产率没有明显的变化, 均在 90% 左右.

为了评估微米硅球固定化猪胰脂肪酶在反应中的重复使用性能, 我们在循环实验中采用了较苛刻的反应条件 (180 , 240 h), 结果发现, 重复 1 次使用的微米硅球固定化猪胰脂肪酶具有与原固定化酶相当的催化活性, 前后两次得到的聚 己内酯的分子量相当. 得到的聚 己内酯的结构经 ¹H NMR 表征, 发现与其标准谱图一致. 微米硅球固定化猪胰脂肪酶的这种重复使用性能有利于其大规模应用.

参 考 文 献

- [1] Matsumura S. *Macromol Biosci* [J], 2002, 2(3): 105—126
- [2] Gross R. A., Kumar A., Kalia B. *Chem. Rev* [J], 2001, 101(7): 2097—2124
- [3] Amass W., Amass A., Tighe B. *Polym. Int* [J], 1998, 47(2): 89—144

- [4] TAN Guo-Hua(谈国华), LING Jun(凌君), SHEN Zhi-Quan(沈之荃). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2003, **24**(11): 2095—2098
- [5] Kumar A., Gross R. A. Biomacromolecules[J], 2000, **1**(1): 133—138
- [6] Namekawa S., Suda S., Uyama H. *et al.* Int. J. Biol. Macromol. [J], 1999, **25**(1—3): 145—151
- [7] Matsumura S., Mabuchi K., Toshima K. Macromol. Rapid Commun. [J], 1997, **18**(6): 477—482
- [8] Al-Azemi T. F., Bisht K. S. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. [J], 2002, **40**(9): 1267—1274
- [9] He Feng, Zhuo Ren-Xi, Liu Li-Jian *et al.* React. & Func. Polym. [J], 2001, **47**(2): 153—158
- [10] Feng Jun, He Feng, Zhuo Ren-Xi. Macromolecules[J], 2002, **35**(19): 7175—7177
- [11] Wen Jie, Zhuo Ren-Xi. Macromol. Rapid Commun. [J], 1998, **19**(12): 641—642

Synthesis of Poly(ϵ -caprolactone) Catalyzed by Immobilized Porcine Pancreas Lipase on Narrow Distributed Micron Glass Beads

WANG Ying-Xia, HE Feng*, LI Feng, FENG Jun, ZHUO Ren-Xi

(Key Laboratory of Biomedical Polymers, Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract Porcine pancreas lipase (PPL) immobilized on narrow distributed micron glass beads was employed successfully for ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone (CL). Different polymerization conditions such as enzyme concentration, reaction temperature and reaction time were studied. The results showed that M_n of the resulting PCL was significantly increased compared with that catalyzed by PPL. Higher temperature and longer reaction time both contributed to gaining PCL with a higher molecular weight, while the yield had almost no change. In addition, for evaluating the recyclability of immobilized PPL on narrow distributed micron glass beads for the ring-opening polymerization of CL, we adopted the most severe reaction conditions (180 °C, 240 h) in the recycling experiments. It was found that the recovered immobilized PPL could be used again with a compatible high catalytic activity. The highest M_n of 21 300 of PCL could be obtained at a mass fraction of 5.18% of the reused immobilized PPL at 180 °C for 240 h, which is the highest M_n of PCL catalyzed by PPL. The excellent recyclability of immobilized PPL on narrow distributed micron glass beads is very helpful to its further industry applications.

Keywords Porcine pancreas lipase; Immobilization; Micron glass beads; Enzymatic ring-opening polymerization; Poly(ϵ -caprolactone)

(Ed : Y, Z)