

酶催化的多糖酯化反应研究进展

黄振华, 刘晨光*

(中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 酯化改性可以赋予多糖诸多新的优异性能, 拓宽工业应用前景。作为生物催化剂的酶可以在有机溶剂中对多糖进行对映选择性、区域选择性的酯化, 具有条件温和、步骤简单、无须基团保护、产物可生物降解等优点, 符合绿色化学的理念。本文从酶催化多糖酯合成的影响因素、多糖酯的酶催化制备方法方面综述了酶催化多糖酯化反应的研究进展。

关键词: 多糖酯; 酶酰化; 酶催化; 酯化反应

Research Progress in Enzymatic Synthesis of Polysaccharides Esters

HUANG Zhen-hua, LIU Chen-guang*

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Polysaccharides can obtain many excellent properties after selective esterification thereby broadening their application in industry. As a biocatalyst, enzyme catalyzes polysaccharide esterification enantio-selectively and regio-selectively with superiority in line with the concept of green chemistry, like mild reaction conditions, simple reaction process, no need for protective groups in reaction and biodegradable products. Here, we review recent progresses made in the study of enzymatic synthesis of polysaccharide esters.

Key words: polysaccharides esters; enzymatic acylation; enzymatic catalysis; enzymatic esterification

中图分类号: TB34 ; TB324; Q539 文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0283-06

多糖是一类具有丰富结构多样性的天然生物高分子。在生物体内, 有些多糖以贮能高分子形式存在, 如糖原、淀粉等; 有的则通过超分子作用, 形成结构组分, 如纤维素、果胶等; 此外, 多糖还在生物识别与转化过程中起重要作用, 如细胞表面的糖被成分。天然多糖已具有许多优良性能, 而改性可以进一步改善多糖的理化性质从而获得功能新材料。其中醚化和酯化改性成为最具多样性的多糖改性方法^[1]。目前, 在工业上得到广泛应用的多糖酯是纤维素酯, 其次为淀粉酯、右旋糖酐酯、甲壳素酯以及凝胶多糖酯^[1]。如纤维素三乙酯可应用于纺织纤维、感光胶片、绝缘涂层等, 纤维素二乙酯可应用于过滤丝、热塑材料、粘胶纤维箔、热塑材料等^[2]。近来发展起来的多糖酯应用领域有新型涂层、药物缓释载体、生物可降解聚合物、复合材料、感光胶片以及功能膜等。

要制备具有商业应用前景的高纯度、生物可相容的多糖材料, 须保证多糖骨架上无任何副反应发生, 这

就对反应的化学选择性、立体选择性、区域选择性提出了很高的要求。多糖含有大量易于发生酯化反应的伯羟基、仲羟基等, 因此选择合适的反应体系和催化剂显得尤为重要。

酶是生物界的天然催化剂, 在食品加工、纺织、洗涤工业等有着广泛应用。传统观念认为酶只能在水环境中发挥作用, Therisod 等^[3]的创造性工作证明固体酶在无水有机溶剂中也表现出很高的催化活性。其后, 一系列有机相中酶催化的化学反应相继报道。这些发现为使用酶催化某些反应, 如为酯化反应和转酯化反应创造了条件, 而这些反应在水相中, 由于热力学和动力学的原因, 很难发生。酶催化有机合成的优点在于: 1) 酶可以促进采用传统化学手段难以发生、不可能发生的反应的进行, 甚至提供某种捷径。2) 酶在某些反应中表现出对映选择性和区域选择性, 优先地与特定异构体或在特定位点反应, 便于产物结构的控制。3) 酶催化的反应通常是在温和条件下进行, 特定的温度、pH值和压

收稿日期: 2010-12-21

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z349); 山东省自然科学基金项目(ZR2009CM071)

作者简介: 黄振华(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物材料。E-mail: zhenhua.hwang@gmail.com

* 通信作者: 刘晨光(1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为纳米技术在生物、医药与食品中的应用。E-mail: liucg@ouc.edu.cn

强,提高了能量利用效率。4)酶是天然的催化剂,对人体和环境不会产生危害。5)酶催化反应的产物一般都是可生物降解的,从环境角度这是最有利的方面。6)酶可以重复利用^[4]。

酶催化的转酯化反应可用于单羟基的醇类、多羟基的糖类的酰化。在催化糖类酯化时的区域选择性意义重大,免除了传统合成过程中繁琐的保护-脱保护步骤。基于此,酶催化多糖酯化反应在近几十年来得到了较快的发展,本文介绍了这方面的研究成果。

1 酶催化多糖酯合成的影响因素

1.1 不同来源多糖的结构

进行酯化改性时,一般选择结构简单、均一的多糖,如葡聚糖等。结构多样、成分复杂的多糖由于构效关系复杂,则很少采用。如海藻多糖随海藻种类、生长期、提取部位不同,结构也存在明显差异。常被用于酶催化酯化的多糖见表1。

表1 常被用于酶催化酯化的多糖

Table 1 Polysaccharides frequently used in enzyme-catalyzed esterification

多糖类型	来源	结构
纤维素	植物	β -(1 \rightarrow 4)-D-葡萄糖
淀粉	直链淀粉	植物 α -(1 \rightarrow 4)-D-葡萄糖
	支链淀粉	植物 α -(1 \rightarrow 4)-D-葡萄糖
		α -(1 \rightarrow 6)-D-葡萄糖
右旋糖酐	细菌	α -(1 \rightarrow 6)-D-葡萄糖主链
瓜尔胶	植物	β -(1 \rightarrow 4)-D-甘露糖主链, D-半乳糖支链
魔芋葡甘聚糖	植物	D-葡萄糖、D-甘露糖通过 β -(1 \rightarrow 4)键成主链
菊粉	植物	β -(1 \rightarrow 2)-呋喃果糖
环糊精	植物	α 、 β 、 γ -环糊精分别是6、7、8个D(+)-吡喃型葡萄糖组成的环状低聚物

1.2 用于多糖酯合成的酶

用于多糖酯合成的酶一般有脂肪酶、蛋白酶等,需要对有机溶剂尤其是易于溶解多糖的强极性非质子溶剂如二甲基亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)等有较好的耐受能力。催化多糖酯合成常用的酶总结如表2。

1.3 溶剂的选择

不同的有机溶剂,从非极性到极性,均可作为酶催化酯化反应的体系。一般而言,疏水性越强、极性越小的反应介质,酶的催化活性越强。原因在于,亲

水性越强越易夺走酶表面必需的结合水,造成酶的稳定性和活力下降,甚至造成酶的失活。另外,极性溶剂本身带有的和从酶表面剥夺的水分容易造成酯化产物的水解,不利于转酯化反应的进行。另一方面,反应底物在有机溶剂中的溶解性也是选择溶剂时需要重点考虑的内容。糖是多羟基物质,导致其只溶解于DMSO、N,N-二甲基乙酰胺(DMAc)、吡啶等强极性有机溶剂中,但这类强极性溶剂易使酶变性失活。当选用非极性溶剂(如甲苯、异辛烷等)为反应介质时,酶虽然能保持较高的催化活性,但由于酶和糖均不溶于此类溶剂,导致反应速度极为缓慢。因此,在极性溶剂中可以采取固定化、化学修饰等方法来提高酶的稳定性^[5],或探索在极性溶剂中稳定的酶。非极性溶剂中,可以通过添加助溶剂、糖修饰及固定化等方法来提高糖的溶解度。

因均相反应条件温和、选择性好、反应效率高,所以向多糖引入复杂和敏感酯基时,均相体系必不可少,与非均相体系不同,在均相体系中可制备易溶的部分取代衍生物,甚至制得具有新取代方式的衍生物。除了能溶解大部分多糖的甲酰胺、DMF、DMSO和水外,目前又开发了一些新的溶剂如室温下呈液态的离子液体^[6],尤其是针对具有特殊超分子结构纤维素的溶剂。

许多脂肪酶和蛋白酶已被发现可用于催化酯化反应和转酯反应。不同的酶由于反应体系不同,催化活性差异很大。例如,在几十种工业脂肪酶之中,极少数能在吡啶、DMF、DMSO中表现出活性。但有些蛋白酶,如胰凝乳蛋白酶、枯草蛋白酶则具有很好的耐受性,在催化可溶性底物如糖类的酯化反应时表现出较高活性^[7]。

1.4 酶催化的多糖酯化反应机理

酶催化多糖转酯化反应一般采用活性的酰基供体,如乙烯酯、己内酯、己二酸二乙烯酯、烷基烯基甲酮类似物、酸酐等,而羧酸采用较少。常见的酰基供体见图1。

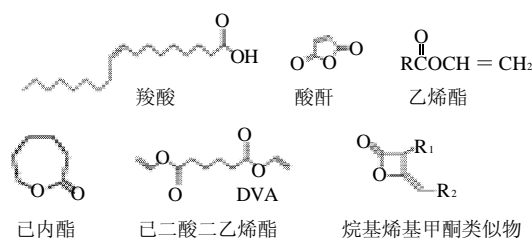


图1 常见的酰基供体

Fig.1 Common acyl donors

表2 催化多糖酯合成常用的酶

Table 2 Enzymes frequently used in enzymatic synthesis of polysaccharide esters

酶种类	酶的来源
脂肪酶(lipase)	南极假丝酵母(<i>Candida antarctica</i>)、黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)、金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)、疏绵状嗜热丝孢菌(<i>Thermomyces lanuginosa</i>)、皱落假丝酵母(<i>Candida rugosa</i>)、洋葱假单胞菌(<i>Pseudomonas cepacia</i>)
蛋白酶(protease)	枯草杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)、嗜热菌(<i>Thermophilus</i>)
其他	提取自猪肝的固定化酯酶、提取自腐皮镰刀菌(<i>Fusarium solani</i>)的角质酶(cutinase)

转酯化反应是最常用的酯化策略。其机理(图2)如下:首先酯键供体或酰化因子与酶的活性位点结合形成酶酯复合物,后者随着醇产物的释放变为酰基酶中间体。酰基酶中间体随后与亲核试剂如含有羟基基团的化合物结合,产生第二个二元产物,最终分离形成自由的酶和酯化终产物^[4]。

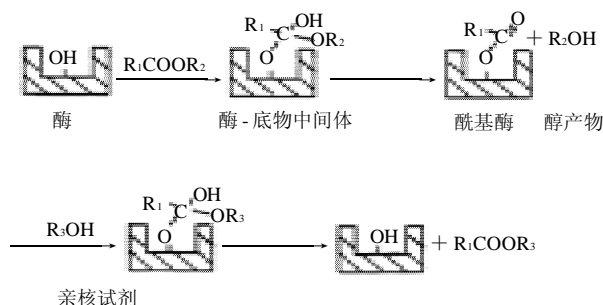


图2 酶催化转酯化反应的机理

Fig.2 Mechanism of enzyme-catalyzed transesterification

采用活性酰基供体可以从热力学和动力学上促进反应的进行。活性酯如三卤代烷基酯常用于增加酰化试剂的亲电性,同时含卤基团脱离后立体构象发生变化,由于空间位阻效应,反向反应很难发生,从而提高了产率。乙烯酯也是优良的酰化试剂,不仅能加速转酯化反应的进行,而且能使反应平衡连续地向右进行,原因在于烯醇副产物易于互变异构转变为酮或乙醛,使反向反应很难发生。但乙烯酯浓度较高时,会抑制酶的活力^[8]。

2 多糖酯的酶催化制备方法

2.1 纤维素酯化

采用传统的有机合成方法,对多糖糖链上羟基基团进行位置特异性的化学修饰几乎是不可能的。相反,采用酶法合成可解决此类问题。多种酶如猪胰脂肪酶(PPL)对多种单糖进行高度区域特异性的酯化报道较多。更进一步的实验表明,对多糖而言,合理选择酶、底物和溶剂也可以实现高度区域特异性的酯化^[4,9-11]。

Xie等^[12]发现Protease type VIII(自枯草杆菌,Subtilisin Carlsberg)可在吡啶中催化丙酸乙烯酯、丙烯酸乙烯酯酯化纤维素小颗粒,酯化发生在葡萄糖残基的C6位上。而且,酯化产物可以被水相中的该酶水解,因此是可生物降解的。纤维素丙烯酸酯可被丙烯腈引发发生接枝共聚反应,接枝率为16%。聚丙烯腈纤维素的热行为不同于聚丙烯腈和纤维素的简单混合。

Yang等^[13]发现,从11种微生物酶中筛选出来的Lipase A12(自黑曲霉,*Aspergillus niger*)可以在缓冲液中催化羧甲基纤维素(CMC)与乙酸乙烯酯的转酯化反应,因此被用作脂肪酶在水相中催化酯化的模式反应。CMC

质量分数的增加(1%~15%)可从热力学上提高产率。乙酸乙烯酯作为活化的酰基供体,能在动力学上促进转酯化进行,同时避免产物水解,但在质量浓度较大时会部分地抑制酶的活性(>5mL/g CMC)。增加酶用量能够显著促进酯化进行,但在大于1000IU/g CMC时效力下降,原因可能是底物扩散限制。实验发现,酶催化转酯化反应是受动力学控制,而非酶反应则受热力学限制。用酶时酰化产率比不用酶时提高了5.6倍。产率的增加,部分地(19%)取决于脂肪酶的纤维素酶活性,但更多(81%)是因为其转酯化活性。因此,证实了Lipase A12是一种能在水相中催化酯合成的水解酶。

随后,Yang等^[14]将Lipase A12应用到固体纤维素的酯化反应中。发现在水相中,纤维素的酯化率为0.16%,采用超声辐照对纤维素进行预处理、表面活性剂溶液反应体系分别使酯化率提高44%、27%。相反,当采用DMSO-多聚甲醛混合有机溶剂作为反应体系时,酯化率提高了近50倍,达到7.87%。原因在于:1)DMSO-多聚甲醛混合有机溶剂促进酯化反应正向发生,同时减少了易使酯化产物水解的水分含量。2)纤维素能溶于DMSO-多聚甲醛混合有机溶剂,反应在均相体系中发生。3)产物纤维素乙酸酯在DMSO-多聚甲醛混合有机溶剂中溶解性较好,产物生成后易于离开反应位点,从而促进酯化反应的发生。4)Lipase A12在强极性溶剂DMSO中也能保持很高的活性。

随后,Yang等^[15]探讨了影响产率的因素。当采用超声预处理纤维素时可使产率提高14%,原因在于提高了酰化试剂到达纤维素表面的机会。热力学水分活度(water activity, a_w)对反应影响很大,在 a_w 为0.52时,达到最高酯化率约11%,比对照组提高了约51%。

Novozym435是来源于南极假丝酵母(*Candida antarctica*),吸附固定于大孔丙烯酸树脂的固定化脂肪酶,在酶催化酯化时应用广泛。Sereti等^[16]报道了用Novozym 435在叔丁醇中催化羟丙基纤维素(HPC)与脂肪酸的酰化反应。最适条件下,HPC的酯化率为11%。其后,又采用同种酶在乙腈中催化纤维素乙酸酯(CA)与油酸、月桂酸的酰化反应。取代度为2.4的CA可溶于较高浓度的乙腈。50℃反应96h后,脂肪酸的转化率为35%。与未修饰前相比,增加了2%的酯键。纤维素乙酸酯与月桂酸的酰化反应发生在两方面,即1)与基质分子的自由羟基直接酯化;2)取代乙酰基^[17]。

Gross等^[14]把4g羟乙基纤维素(HEC)溶于20mL DMAc,添加0.5g假单胞菌脂肪酶(Lipase PS,源自*Pseudomonas* sp.)或Novozym 435和1g硬脂酸乙烯酯,搅拌10min后50℃反应48h得到羟乙基纤维素硬脂酸酯。而在*t*-丁基-甲醚、*t*-丁醇、氯仿中,转酯化产物产率极低。

Gremos等^[18]用氯化1-丁基-3-甲基咪唑(BMIMCl)离子液体预处理微晶纤维素,然后在无溶剂体系选用多

种酶、多种酰化试剂(丙酸乙烯酯、月桂酸乙烯酯、硬脂酸乙烯酯)进行转酯化反应。结果发现来自猪肝的固定化水解酶、来自腐皮镰孢霉菌(*Fusarium solani*)的角质酶(cutinase)能够催化酯化反应的进行,纤维素丙酸酯、纤维素月桂酸酯、纤维素硬脂酸酯的取代度分别为1.9%、1.3%、1.0%。相反,常用的酶如Novozym 435则不能催化酯化反应的进行。BMIMCl离子液体的预处理使纤维素内部致密结构被打开,为酶、酰基供体介入提供了更多机会。

2.2 淀粉酯化

淀粉的亲水性、较差的力学性能及立体稳定性限制了其应用。对淀粉进行酯化改性可改善其性能。

Rajan等^[19]用回收的椰子油和玉米淀粉、木薯淀粉在脂肪酶(自*T. lanuginosa*)的催化下合成了淀粉酯。对于玉米淀粉和木薯淀粉,淀粉、椰子油(质量比为2:1)与1mL 140 IU的酶磷酸缓冲液采用微波加热酯化法得到的产物取代度(DS)为1.55、1.1。用Triton X-100将反应体系调成半固态在剪切力下60℃反应20min,木薯淀粉酯化产物取代度为0.43。用DMSO将反应体系调成溶液状态60℃反应36h,木薯淀粉酯化产物取代度为0.08。热重分析(TGA)和差示热量扫描(DSC)结果表明,酯化后淀粉的分解初始温度(492℃)高于淀粉(330℃),在高于600℃是也是比较稳定的。修饰后的淀粉对 α -淀粉酶抗性提高,黏度降低。这均从侧面证明二者是共价结合的。

直链淀粉可溶于水和极性有机溶剂中,但在此环境中由于脂肪酶的低活性导致酯化率很低。因此,Chakraborty等^[20]采用由AOT阴离子表面活性剂形成的反相胶束包裹淀粉形成纳米粒子,再与硬脂酸乙烯酯、 ϵ -己内酯、马来酸酐在40℃的甲苯中用Novozym 435催化酯化48h,得到的酯化率分别为0.8、0.6、0.4。酯化反应发生在葡萄糖残基的C6位上。尽管酶被固定在大孔树脂上,其仍能与淀粉纳米粒子充分接触。采用未固定化的酶(SP-525)时,使酶与淀粉一起与AOT形成反相胶束,在40℃下与硬脂酸乙烯酯反应24h得到的产物取代度为0.5。

Bruno等^[21]将枯草蛋白酶通过相转移制成枯草蛋白酶-AOT复合物,可以很好地溶于异辛烷。加入癸酸乙烯酯后,可以催化酯化沉淀到ZnSe玻片的不溶性直链淀粉和冷冻研碎的不溶性直链淀粉颗粒物。溶解状态的酶是酰化反应发生的先决条件。

Horchani等^[22]把一种脂肪酶(自*Staphylococcus aureus*)用CaCO₃固定化后,在无溶剂体系、微波加热条件下催化淀粉溶液与油酸的酯化反应。响应面分析法得到的最适条件为386IU的固定化脂肪酶,淀粉与油酸物质的量比0.18,44℃条件下反应4h。此时,油酸的转化率为76%,淀粉的取代度为2.86%。淀粉疏水化修饰后对 α -淀粉水解酶的敏感性降低。疏水修饰的淀粉

油酸酯在表面包被材料、食品调味材料、骨固定和替换生物医学材料等方面有着广泛的应用前景。

Qiao等^[23]研究了Lipase PS在50℃的DMAc中催化直链淀粉与烷基或链烯基乙烯酮二聚物(AKD)的转酯化反应。酶可以在较低的温度下得到取代度较高的淀粉酯。取代度可通过改变反应条件,如酶用量、反应温度、反应物浓度和反应溶剂的方法进行调控。与化学法合成相比,酶法合成具有AKD用量少、反应温度较低、不添加酸或碱、反应中无淀粉降解、产率较高的优点。AKD-淀粉的性能取决于取代度,可用作增稠剂和乳化剂。

2.3 右旋糖酐(dextran)酯化

Kaewprapan等^[24]发现来自*Candida rugosa*、pH-印迹的假丝酵母脂肪酶(lipase AY,源自*Candida rugosa*)在DMSO中可催化Dextran T-40与癸酸乙烯酯的转酯化反应,5d反应25h后癸酸乙烯酯最高转化率可达到52%。与水相比,Lipase AY只表现出15%的活力。酯化发生在吡喃葡萄糖苷的C2、C3位。选择酰基供体时,当采用活性强、分子较小的如丙烯酸乙烯酯时,C3位优先被取代;当采用中等大小、活性稍弱的如癸酸乙烯酯时,C2有所增加,接近于C3所占比例。在相同条件下,pH-印迹的Lipase AY转化率为21.64%时,未经印迹的Lipase AY转化率仅为2.95%,pH-印迹的枯草芽孢杆菌蛋白酶(proleather FG-F,源自*Bacillus subtilis*)为8.54%,不加酶的对照组为1.93%,加热失活的Lipase AY组为7.91%。未经印迹的Lipase AY转化率如此之低,原因可能是Lipase AY抑制了Dextran T-40中吡喃葡萄糖苷单元羟基与癸酸乙烯酯发生化学性的酯化反应。

Ferreira等^[25]采用单步生物催化转酯化反应制备了基于右旋糖酐、大孔、规则的水凝胶。方法是,在无水DMSO中,酶催化Dextran与己二酸二乙烯酯(divinyladipate, DVA)在50℃、250r/min条件下反应72h。在筛选所用的酶时,采用了pH记忆的方法。pH8条件下对proleather、Protease S、和Subtilisin Carlsberg(一种芽孢杆菌)进行记忆;pH7.5下对Proteases A、N、P和Lipases A、AY、M、PS和猪胰脂肪酶(porcine Pancreas)进行记忆。经液氮速冻、冷冻干燥后的300mg酶粉与1g Dextran(*M_w*为70kD)、0.2mol/L DVA 50℃、250r/min反应72h。在上述广泛应用于单糖酯化反应的11种酶中,来自*B. subtilis*的碱性蛋白酶Proleather FG-F、来自假丝酵母(*C. rugosa*)和洋葱假单胞菌(*P. cepacia*)的2种脂肪酶产生了大于58%的转化率。转酯化反应的进行伴随着右旋糖酐水凝胶的自发形成,而在不加酶、不加DVA的对照组则无水凝胶生成。为了证实转酯化反应确实由酶所催化,采用具有最高活性的Proleather FG-F做了验证。结果发现,不加Proleather FG-F、加失活的Proleather FG-F、含有丝氨酸蛋白酶抑

制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)的对照组转化率较低且没有水凝胶生成。酶法单步生成的右旋糖酐水凝胶与化学法相比具有优异的力学性能,生理 pH 值下易降解,移植到鼠皮下时不形成实体纤维囊(substantial fibrous capsule),在细胞支架、可移植生物分子载体方面具有很大应用前景。

Ferreira 等^[26]分别用 Proleather FG-F 和 Lipase AY, 在无水 DMSO 中催化了 Dextran(dexT70)与乙烯基丙烯酸酯(VA)的转酯化反应。凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)显示, Dextran 在反应后相对分子质量增大证明了丙烯酸官能团的接入,同时,酶没有催化 Dextran 发生降解。核磁共振(NMR)显示在转酯化发生在葡萄糖残基的 C2 和 C3 位上, C3 位更具有优先性(Proleather FG-F, C2、C3 物质的量比为 43:57; Lipase AY, C2、C3 物质的量比为 28:72)。Proleather FG-F 催化转酯化效率更高。而且, Dextran 的吡喃型葡萄糖残基是单取代的。相同条件下,采用 4-二甲基氨基吡啶(4-DMAP)催化剂时, VA 掺入率为 38.6%, 低于酶(71%)的催化效率。而且,产物在透析 10d 后,透析液中依然存在少量 4-DMAP,说明化学催化剂是极难去除的。dexT70-VA 在水溶液中可通过自由基聚合反应制备性能优异的水凝胶,用于药物的运送。

2.4 菊粉(inulin)

Ferreira 等^[27]用 Proleather FG-F 蛋白酶在 DMF 中催化了丙烯酸乙烯酯(VA)与菊粉的转酯化反应。50℃反应 96h 后,不同浓度丙烯酸乙烯酯的转化率超过 57%。丙烯酸基团的取代度可通过控制 VA 和菊粉的比例来实现。转酯化主要发生在呋喃果糖苷残基的 C6 位上,其余 2 种比例较低的异构体在 C3、C4 位上。因此,该酶总体上是位置选择的。另外,每个呋喃果糖苷残基是单取代的。Inul-VA 的水溶液可发生自由基聚合形成水凝胶用于药物携带基质。

2.5 环糊精(cyclodextrin, CD)

Pedersen 等^[28]采用一步反应法用酶催化环糊精(CDs)、脂肪酸乙烯酯合成了环糊精脂肪酸酯。在选用的嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)、碱性蛋白酶 AL-89、南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* lipase B)中,嗜热菌蛋白酶效果最好。枯草杆菌蛋白酶、AL-89 催化时,由于存在于亲水质子惰性的溶剂中的无机缓冲盐也可以催化合成,因此 2 种酶的催化效果不大。南极假丝酵母脂肪酶 B 不能在选用的几种溶剂中催化合成。采用癸酸乙烯酯作酰基供体时,酯化发生在第 7 个葡萄糖残基的 C2 位上形成 7(2-*O*-癸酰)- β -环糊精,取代度为 7%。而采用丁酸乙烯酯时,取代度约为 9%,酯化主要发生在 C2 位,部分地发生在 C3、C6 位上,原因可能是短的脂肪酸链能够克服空间位阻的作用。嗜热菌蛋白酶可以在 DMSO、DMF 中催化 α -CD、 β -CD、 γ -CD、麦芽糖- β -CD 与

月桂酰乙烯酯的转酯化,而在吡啶、*t*-丁醇中则没有产物生成。采用月桂酰乙烯酯作酰基供体时,取代度与环糊精的类型有关。采用 α -CD、 β -CD、 γ -CD、麦芽糖- β -CD 时的取代度分别为 1%~4%、1%~7%、1%~5%、2%~5%。

2.6 阳离子瓜尔胶(cationic guar)

Gross 等^[4]分别用 DMAc、*t*-丁基-甲醚作溶剂合成了瓜尔胶硬脂酸酯。DMAc 作溶剂时,把 0.3g 阳离子瓜尔胶溶于 100mL DMAc 中,添加 0.8g 硬脂酸乙烯酯和 0.4g Lipase AK(来自 *Pseudomonas* sp.)。彻底混匀滴入几滴甲磺酸后 50℃反应 24h,得到 5.1g 产物。*t*-丁基-甲醚作溶剂时,10g 阳离子瓜尔胶悬浮于 100mL *t*-丁基-甲醚中,添加 2g 硬脂酸乙烯酯和 0.5g Lipase PS, 50℃反应 72h 得到产物。采用 *t*-丁基-甲醚时,由于阳离子瓜尔胶是悬浮而非溶解,反应时间很长且得到的取代度相对较低。但由于酶在此环境下是稳定的,所以在很长的时间内,取代度稳步增加。相同条件下,采用 Novozym 435 时活性低于以上 2 种,采用枯草杆菌蛋白酶、固定化碱性蛋白酶(alcalase)时则没有活性。采用瓜尔胶时,酯化率远低于阳离子瓜尔胶,原因可能是采用阳离子瓜尔胶时,酯化发生在糖链中阳离子基团的 2 位羟基上。酯化后,阳离子瓜尔胶硬脂酸酯黏度增加,从侧面证明了共价键的形成。

2.7 魔芋葡甘聚糖(konjac glucomannan, KGM)

魔芋葡甘聚糖是由 *D*-葡萄糖、*D*-甘露糖通过 β -(1 \rightarrow 4)键连接而成,其中甘露糖的 C3 位有短的侧链。

Chen 等^[29]在无溶剂体系中,用 Novozym 435 催化醋酸乙烯酯与之反应,酯化发生在 C6 位上。最适的水活度、反应温度、转速、酶剂量分别为 0.84、50℃、200r/min 和 400U/mL。随着魔芋葡甘聚糖相对分子质量的增大,取代度减小。

随后,Chen 探讨了热力学水分活度(a_w)、有机溶剂、反应温度、摇动速率、酶用量、KGM 相对分子质量等对 Novozym 435 催化乙酸乙烯酯与魔芋葡甘聚糖的转酯化反应产率的影响。45℃、200r/min、 $a_w=0.75$ 、48h、24U/mL 时,DMSO、DMF、吡啶、*t*-丁醇、甲苯、异辛烷取代度分别为:0.2、0.36、0.48、0.64、0.54、0.51。取代度随 KGM 相对分子质量增加而减小。酯化特异性地发生在 C6 位上^[30]。

Chen 等^[31]对酶促魔芋葡甘聚糖酰化反应的研究表明,在离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐($C_2MIm \cdot BF_4$)、1-*n*-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐($C_4MIm \cdot BF_4$)、1-辛基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐($C_8MIm \cdot BF_4$)及 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐($C_4Mim \cdot PF_6$)中,Novozym 435 催化 KGM 酰化反应的速度、产物、取代度(DS)及酶的稳定性与有机介质叔丁醇相比均显著提高。如以乙酸乙烯酯为酰基供体时,在上述 4 种离子液体及叔丁醇中酶促酰

化反应速度分别是 3.2×10^{-2} 、 3.7×10^{-2} 、 3.0×10^{-2} 、 2.8×10^{-2} 和 2.6×10^{-2} DS/h。离子液体中酶促酰化反应速度提高的原因在于 1) 离子液体中底物溶解度较高; 2) 离子液体对酶的失活作用较小^[31]。

3 结 论

多糖酯有着较大的潜在应用价值。但由于多糖是多羟基物质, 对特定定位点的羟基进行特异性的修饰是有机合成的难题。采用酶催化的方法, 可以实现区域选择性、立体选择性的酯化, 也已经在纤维素、淀粉、右旋糖酐、环糊精、菊粉等多糖中得到了应用。由于酶、活性酰基供体、新型溶剂较为昂贵, 反应条件因需要精确调控对仪器要求较高等原因, 酶催化多糖酯化反应还仅仅是停留在实验室阶段。但随着研究的深入和生物提取分离纯化技术的进步, 酶将在多糖酯化乃至生物化工方面得到更广泛的应用。

参考文献:

- HEINZE T, LIEBERT T, KOSCHELLA A. Esterification of polysaccharides[M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2006: 1-3; 181-193.
- SCHILLING M, BOUCHARD M, KHANJIAN H, et al. Application of chemical and thermal analysis methods for studying cellulose ester plastics[J]. *Acc Chem Res*, 2010, 43 (6): 888-896.
- THERISOD M, KLIBANOV A M. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1986, 108(18): 5638-5640.
- GROSS R A, CHENG H N. Biocatalysis in polymer science[M]. Washington: Amer Chemical Soc, 2003: 217-230; 243-252.
- HEGEDUS I, NAGY E. Improvement of chymotrypsin enzyme stability as single enzyme nanoparticles[J]. *Chemical Engineering Science*, 2009, 64(5): 1053-1060.
- MONIRUZZAMAN M, NAKASHIMA K, KAMIYA N, et al. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48(3): 295-314.
- CASTILLO B, DELGADO Y, BARLETTA G, et al. Enantioselective transesterification catalysis by nanosized serine protease subtilisin Carlsberg particles in tetrahydrofuran[J]. *Tetrahedron*, 2010, 66(12): 2175-2180.
- CHÈNEVERT R, PELCHAT N, MORIN P. Lipase-mediated enantioselective acylation of alcohols with functionalized vinyl esters: acyl donor tolerance and applications[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, 20 (10): 1191-1196.
- KOBAYASHI S, MAKINO A. Enzymatic polymer pyntesis: an opportunity for green polymer chemistry[J]. *Chemical Reviews*, 2009, 109 (11): 5288-5353.
- PEDERSEN N R, KRISTENSEN J B, BAUW G, et al. Thermolysin catalyses the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16(3): 615-622.
- FERREIRA L, GIL M H, DORDICK J S. Enzymatic synthesis of dextran-containing hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(19): 3957-3967.
- XIE J, HSIEH Y L. Enzyme-catalyzed transesterification of vinyl esters on cellulose solids[J]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2001, 39(11): 1931-1939.
- YANG Kui, WANG Y J. Lipase-catalyzed transesterification in aqueous medium under thermodynamic and kinetic control using carboxymethyl cellulose acetylation as the model reaction[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35(2/3): 223-231.
- YANG Kui, WANG Y J. Lipase-catalyzed cellulose acetylation in aqueous and organic media[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(6): 1664-1671.
- YANG Kui, WANG Y J, KUO M I. Effects of substrate pretreatment and water activity on lipase-catalyzed cellulose acetylation in organic media[J]. *Biotechnology Progress*, 2004, 20(4): 1053-1061.
- SERETI V, STAMATIS H, PAPPAS C, et al. Enzymatic acylation of hydroxypropyl cellulose in organic media and determination of ester formation by diffuse reflectance infrared fourier transform (DRIFT) spectroscopy[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 72(4): 495-500.
- SERETI V, STAMATIS H, KOUKIOS E, et al. Enzymatic acylation of cellulose acetate in organic media[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 66(2/3): 219-223.
- GREMOS S, ZARAFETA D, KEKOS D, et al. Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1378-1382.
- RAJAN A, PRASAD V S, EMILIA ABRAHAM T. Enzymatic esterification of starch using recovered coconut oil[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, 39(4/5): 265-272.
- CHAKRABORTY S, SAHOO B, TERAOKA I, et al. Enzyme-catalyzed regioselective modification of starch nanoparticles[J]. *Macromolecules*, 2004, 38(1): 61-68.
- BRUNO F F, AKKARA J A, AYYAGARI M, et al. Enzymic modification of insoluble amylose in organic solvents[J]. *Macromolecules*, 1995, 28(26): 8881-8883.
- HORCHANI H, CHAĀBOUNI M, GARGOURI Y, et al. Solvent-free lipase-catalyzed synthesis of long-chain starch esters using microwave heating: optimization by response surface methodology[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79 (2): 466-474.
- QIAO L, GU Q M, CHENG H N. Enzyme-catalyzed synthesis of hydrophobically modified starch[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 66 (1): 135-140.
- KAEWPRAPAN K, TUCHINDA P, MARIE E, et al. PH-imprinted lipase catalyzed synthesis of dextran fatty acid ester[J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2007, 47(3/4): 135-142.
- FERREIRA L, GIL M H, CABRITA A M S, et al. Biocatalytic synthesis of highly ordered degradable dextran-based hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (23): 4707-4716.
- FERREIRA L, GIL M H, DORDICK J S. Enzymatic synthesis of dextran-containing hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(19): 3957-3967.
- FERREIRA L, CARVALHO R, GIL M H, et al. Enzymatic synthesis of inulin-containing hydrogels[J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(2): 333-341.
- PEDERSEN N R, KRISTENSEN J B, BAUW G, et al. Thermolysin catalyses the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16(3): 615-622.
- CHEN Zhigang, ZONG Minhua, LI Guangji. Lipase-catalyzed modification of konjac glucomannan[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 102(2): 1335-1340.
- CHEN Zhigang, ZONG Minhua, LI Gangji. Lipase-catalyzed acylation of konjac glucomannan in organic media[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7): 1514-1520.
- CHEN Zhigang, ZONG Minhua, LI Gangji. Lipase-catalyzed acylation of konjac glucomannan in ionic liquids[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2006, 81(7): 1225-1231.