

脂肪酶 AK 对富勒烯封端聚己内酯的降解

彭琦云, 康峰, 李娟, 杨新林*

北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081

* 联系人, E-mail: xlyang@bit.edu.cn

2009-11-12 收稿, 2010-04-27 接受

国家自然科学基金(20672012)和北京市自然科学基金(2082020)资助项目

摘要 采用滴定法并以聚己内酯 PCL 为对照, 探讨了富勒烯封端聚己内酯 C₆₀-PCL 的脂肪酶 AK 降解行为. 实验发现, PCL 和 C₆₀-PCL 的酶解反应均符合米氏方程, 其动力学参数 K_m 分别为 0.75 和 0.16 mg·mL⁻¹, 最大降解速度 V_{max} 分别为 0.90 和 0.43 mL·h⁻¹. 在同等条件下 C₆₀-PCL 降解速率较 PCL 减小, 表明富勒烯的引入使聚己内酯难于被脂肪酶降解.

关键词

富勒烯封端聚己内酯
聚己内酯
脂肪酶 AK
滴定法

富勒烯及其衍生物在化学、材料学、生物学及生命科学等许多领域具有诱人的应用前景^[1]. 研究发现, 富勒烯具有多种特殊的生物学效应, 如清除自由基、切割 DNA、抑制酶活性、杀伤肿瘤细胞、保护神经等^[2-7]. 在众多富勒烯衍生物中, 包括富勒烯聚酯在内的富勒烯聚合物十分引人关注^[8]. 最近, Kai 等人^[9,10]将聚己内酯(polycaprolactone, PCL)修饰到富勒烯球上, 并研究了富勒烯对聚己内酯的物理化学性能的影响.

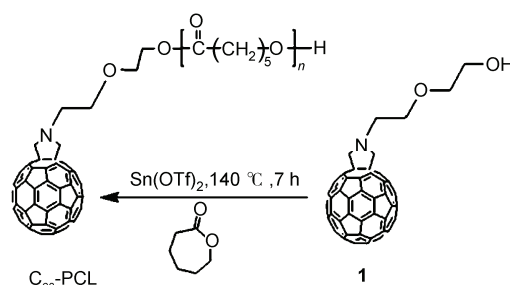
PCL 属于一种线性聚酯高分子材料, 具有良好的生物相容性和生物降解性, 且没有生物毒性, 已经应用于手术缝合线(surgical sutures)和其他可吸收固定装置(absorbable fixation devices). 同时由于其对小分子药物的通透性好, 被视为体内植入药物缓释胶囊的理想材料, 应用于药物控释系统^[11].

生物降解性是 PCL 作为生物医用材料使用的一个关键特性. Darwis 等人^[12]曾研究了脂肪酶 AK 对交联 PCL 的降解反应, 发现由于形成网状结构, 其降解速率比交联前减慢. Pastorino 等人^[13]分别采用 3 种真菌脂肪酶 *C. rugosa*, *M. miehei* 和 *R. delemar* 对 PCL 降解进行了研究, 结果表明, *M. miehei* 的效率最高. Sivalingam 等^[14]研究了脂肪酶对聚乳酸(poly(lactic

acid, PLA)、PCL 和二者混合物的降解行为, 结果发现 PLA 的加入并不影响 PCL 的酶催化降解, 2 种聚合物的降解是相互独立的. 而富勒烯修饰后对 PCL 的生物降解性有何影响还未见有文献报道. 最近我们合成了一种新的富勒烯封端聚己内酯(fullerene end-capped polycaprolactone, C₆₀-PCL)(图 1)^[15], 初步探讨了脂肪酶 AK 存在下 C₆₀-PCL 的降解反应.

1 实验**1.1 试剂与仪器**

C₆₀(纯度 99.9%)购自河南省濮阳永新试剂公司; 2-溴乙酸苄酯、2-(2-氨乙氧基)乙醇、多聚甲醛是 Acros Organics 产品; 10% Pd/C 购自 Alfa Aesar 公司;

图 1 C₆₀-PCL 的合成路线

纯度为 99% 的 ϵ -己内酯和 98% 的三氟甲磺酸锡 [Sn(OTf)₂] 均购自北京百灵威化学技术有限公司; 甲苯、二氯甲烷、乙酸乙酯、氢氧化钠和无水乙醇等均购自北京化工厂分析纯试剂. BS 124S 型电子天平 (德国 Sartorius); 脂肪酶 AK (活性 ≥ 20000 U/g) 购自 Sigma 公司.

1.2 实验方法

(1) C₆₀-PCL 和 PCL 的合成. C₆₀-PCL 由 N-取代的 3, 4-富勒烯吡咯烷 **1** 引发己内酯单体开环聚合而成, 其合成方法已另文报道^[15]. 基本步骤是先按文献[16]合成化合物 **1**, 然后将 **1** (40 mg, 0.047 mmol)、 ϵ -己内酯 (100 μ L, 0.938 mmol) 和三氟甲磺酸锡 (20 mg, 0.047 mmol) 混合, 140 $^{\circ}$ C 油浴加热, 氩气保护搅拌反应 7 h. 产物用丙酮溶解, 并用无水乙醇沉淀, 干燥后得到棕黑色固体 C₆₀-PCL. PCL 也用类似方法得到, 只是反应体系中不添加 **1**. 化学表征数据如下: C₆₀-PCL: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.40 (m, 2H), 1.64 (m, 4H), 2.31 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.64 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 4.06 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 24.5, 25.5, 28.3, 34.1, 64.1, 70.6, 71.8, 128.9, 130.9, 132.4, 173.5; FT-IR (KBr) $\nu_{\max}$: 526.8 (C₆₀), 732.1, 1106.0, 1169.9, 1462.4, 1631.5 (C=C), 1730.8 (C=O), 2857.0, 2925.5, 3436.9 (OH) cm⁻¹; MALDI-TOF MS (基质: CCA): 数均分子量 $M_n = 4819$, 重均分子量 $M_w = 5282$, 分子量分布 $PDI = M_w/M_n = 1.09$.

PCL: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.40 (m, 2H), 1.64 (m, 4H), 2.31 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.65 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 4.06 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 24.5, 25.5, 28.3, 34.1, 64.1, 173.5; FT-IR (KBr) $\nu_{\max}$: 731.7, 1107.9, 1188.8, 1472.0, 1725.4, 2866.3, 2946.5, 3437.0 (OH) cm⁻¹; MALDI-TOF MS (基质: CCA): 数均分子量 $M_n = 4765$, 重均分子量 $M_w = 5162$, 分子量分布 $PDI = M_w/M_n = 1.08$.

(2) 脂肪酶 AK 对 PCL 和 C₆₀-PCL 的降解作用. 参考张龙彬等^[17]的方法, 将真空干燥样品研磨成粉末状, 分别称取 2, 3, 4, 5 mg 样品完全浸泡于 5 mL 1 mg/mL 的脂肪酶溶液中, 置于 52 $^{\circ}$ C 恒温摇床中孵育. 反应不同时间 (2, 4, 6, 8, 10 h) 后, 加 2 滴酚酞指示剂, 用 0.01 mol/L NaOH 溶液滴定降解产物羟基己酸, 待溶液由无色变成粉红色且能保持 15 s 不变色时停止滴定, 记录 NaOH 的平均消耗量, 用 NaOH 的消耗量来表示酸的生成量. 计算反应速率并根据米氏方程作图.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}.$$

2 结果与讨论

C₆₀-PCL 和 PCL 均通过氢谱、碳谱、质谱、红外、热重和差热扫描分析进行了鉴定^[15]. 特别地, 在 C₆₀-PCL 的 ¹³C NMR 谱 (图 2) 中, δ 173.5 处为 C=O 的碳共振信号, δ 24.5, 25.5, 28.3, 34.1, 64.1 分别对应于各种亚甲基的碳信号, δ 70.6, 71.8 与 128.9, 130.9, 132.4 处为富勒烯 sp³ 杂化和 sp² 杂化碳原子信号^[18].

脂肪酶 AK 来源于荧光假单胞菌, 常用于研究聚酯高分子材料的生物降解性能^[12, 17]. 分别以 PCL 和 C₆₀-PCL 粉末作为脂肪酶 AK 的降解底物, 不同浓度底物的降解产物生成量随时间的变化如图 3 和 4 所示. 在相同底物浓度下, 随着时间的延长, 二者碱液的消耗量均逐渐增加, 同时呈变缓趋势. 这是由于长时间孵育, 酶的活性降低, 催化效率下降, PCL 和 C₆₀-PCL 的降解速率变慢. 随着底物浓度的提高, 相同时间下 NaOH 的滴定量增多, 这是因为底物浓度增大, 底物分子与酶分子的接触结合几率增加, 所以羟基己酸的生成量也随之增加. 从图中也很明显看出, 同等条件下, C₆₀-PCL 的 NaOH 消耗量较 PCL 少.

图 5 和 6 是二者降解速率随时间的变化图. 可以看出 PCL 和 C₆₀-PCL 的酶降解速率随时间均呈显著下降趋势, 降解速率呈现浓度依赖性, 底物浓度越大, 降解越快. 同等条件下, C₆₀-PCL 比 PCL 的降解速率要慢.

分别将这两种底物的降解速率倒数对底物浓度倒数作图, 发现这两种底物的速率倒数对底物浓度

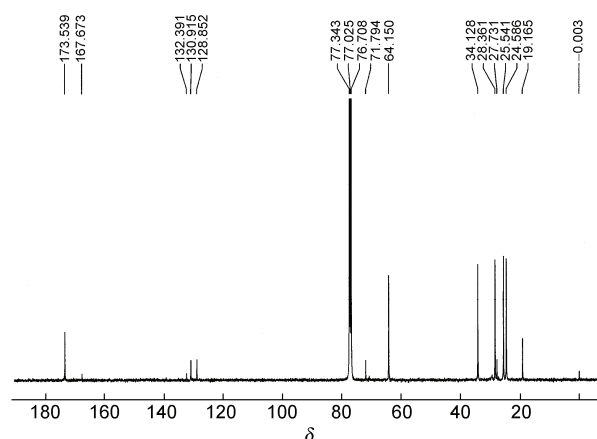


图 2 C₆₀-PCL 的 ¹³C NMR 谱

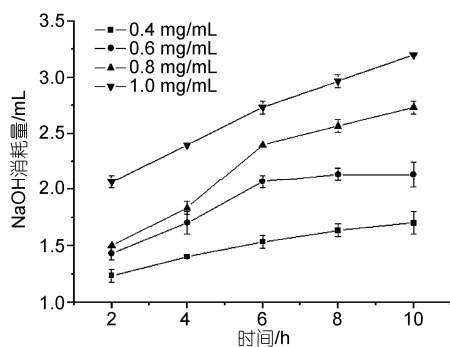


图3 不同浓度的PCL降解后消耗碱液的量随时间的变化图

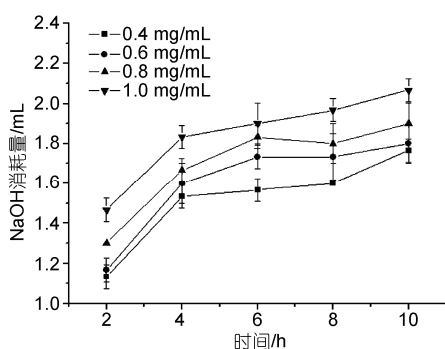
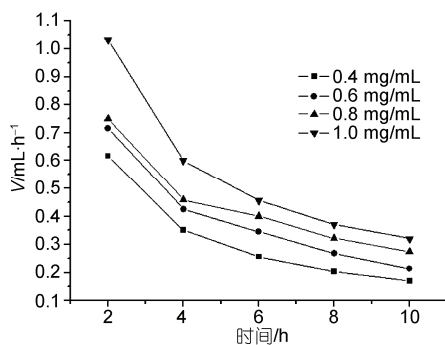
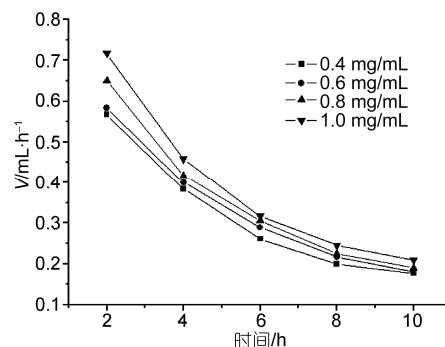
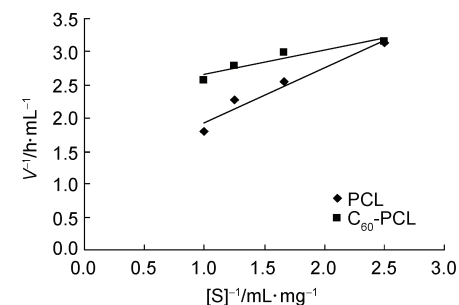
图4 不同浓度的C₆₀-PCL降解后消耗碱液的量随时间的变化图

图5 不同浓度的PCL降解速率随时间的变化图

倒数基本呈线性关系, 较符合米氏方程(图7)。由米氏方程计算得到: 底物PCL和C₆₀-PCL的最大降解速率 $V_{\max}$ 分别为 0.90 和 0.43 mL·h⁻¹, 对应 K_m 分别为 0.75 和 0.16 mg·mL⁻¹。计算结果和图7均显示, 聚己内酯经富勒烯修饰后, 其脂肪酶降解反应的最大降解速率和米氏常数都变小。

富勒烯脂衍生物的合成已有近 20 年的历史^[18], 迄今为止已经报道了多种类型的富勒烯脂衍生物,

图6 不同浓度的C₆₀-PCL降解速率随时间的变化图图7 脂肪酶降解PCL及C₆₀-PCL中底物浓度倒数与降解速率倒数的关系图

包括各种富勒烯聚脂^[9,10,19-21]。但是据我们所知, 关于脂肪酶和富勒烯脂衍生物的酶解反应的研究本文属于首次报道。

与底物PCL相比, 底物C₆₀-PCL在同等条件下消耗的NaOH少, 降解速率较慢。推测原因有两方面: 从底物角度考虑, 富勒烯封端聚己内酯由于富勒烯基团的引入可能增强了其结构上的稳定性, 使其难于被脂肪酶降解; 从酶的角度考虑, 水解产物富勒烯衍生物的引入可能抑制了脂肪酶的活性, 从而使底物降解速率降低。酶的抑制作用随时间增加而增强, 推测是随着降解反应进行, 生成的富勒烯产物越来越小, 而较小分子产物更容易和酶结合导致对酶的抑制作用更强。Schergna等人^[22]在研究脂肪酶B催化富勒烯衍生物的转脂反应时也发现了类似现象, 为这种推测提供了另外的实验依据。

一般说来, 酶的降解反应与酶、底物及反应条件(如温度、pH、抑制剂与激活剂等)密切相关。聚酯酶的降解过程则更加复杂, 其影响因素还包括酶分子在聚合物表面的吸附、酶向聚合物本体的扩散、降解产物的种类、降解产物从聚合物表面及内部扩散的速

率^[23]。富勒烯基团的引入进一步增加了反应的复杂性,而本文只是报道 C₆₀-PCL 在脂肪酶存在下降解行为的一些初步结果,选定的实验温度 52℃, pH 7.4 来自相关文献报道的脂肪酶 AK 对 PCL 降解的反应条件^[17]。显然,对这一酶解体系的作用机制,即包括温度和 pH 在内的各种因素的影响,还有待于深入研究。此外,实验结果表明与 PCL 相比, C₆₀-PCL 在生物体内更加稳定,暗示其在生物医用材料领域具有潜在的应用前景。

3 结论

本文采用 NaOH 滴定法比较了脂肪酶 AK 对 C₆₀-PCL 和 PCL 的降解行为,得到如下结论:

(1) PCL 和 C₆₀-PCL 的降解动力学相似,符合米氏方程,二者动力学参数 K_m 分别为 0.75 和 0.16 mg·mL⁻¹,最大降解速度 V_{max} 分别为 0.90 和 0.43 mL·h⁻¹。

(2) 富勒烯的引入能够减缓 PCL 被脂肪酶降解, C₆₀-PCL 有望成为一种新的生物医用材料。

参考文献

- Anton W J, Stephen R W, David I. Biological applications of fullerenes. *Bioorg Med Chem*, 1996, 4: 767—779
- Tokuyama H, Yamago S, Nakamura E, et al. Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 7918—7919
- Yang X L, Fan C H, Zhu H S. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C-60]fullerene derivatives and its mechanism. *Toxicol In Vitro*, 2002, 16: 41—46
- Sijbesma R, Srdanov G, Wudl F, et al. Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 6510—6512
- Friedman S H, Ganapathi P S, Rubin Y, et al. Optimizing the binding of fullerene inhibitors of the HIV-1 protease through predicted increases in hydrophobic desolvation. *J Med Chem*, 1998, 41: 2424—2429
- Nakamura E, Tokuyama H, Yamago S, et al. Biological activity of water-soluble fullerenes. Structural dependence of DNA cleavage, cytotoxicity, and enzyme inhibitory activities including HIV-protease inhibition. *Bull Chem Soc Jpn*, 1996, 69: 2143—2151
- Dugan L L, Turetsky D M, Du C, et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9434—9439
- Francesco G, Nazario M. Fullerene polymers: Synthesis and properties. *Chem Rev*, 2006, 106: 5136—5190
- Kai W H, Hua L, Dong T L, et al. Fullerene end-capped biodegradable poly (epsilon-caprolactone). *Macromol Chem Phys*, 2008, 209: 104—111
- Kai W H, Hua L, Dong T L, et al. Synthesis and characterization of fullerene grafted poly(epsilon-caprolactone). *J Appl Polym Sci*, 2008, 107: 4029—4035
- Sung G A, Chang G C. Synthesis and characterization of amphiphilic poly(caprolactone) star block copolymers. *Macromol Rapid Commun*, 2004, 25: 618—622
- Darwis D, Mitomo H, Enjoji T, et al. Enzymatic degradation of radiation crosslinked poly(epsilon-caprolactone). *Polym Degrad Stab*, 1998, 62: 259—265
- Pastorino L, Pioli F, Zilli M, et al. Lipase-catalyzed degradation of poly(epsilon-caprolactone). *Enzyme Microb Tech*, 2004, 35: 321—326
- Sivalingam G, Vijayalakshmi S P, Madras G. Enzymatic and thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide), and their blends. *Ind Eng Chem Res*, 2004, 43: 7702—7709
- 彭琦云, 康峰, 李娟, 等. 富勒烯衍生物引发的富勒烯末端封端聚己内酯的合成. *高等学校化学学报*, 2010, 31: 177—180
- Sofou P, Elemen Y, Panou P E, et al. Synthesis of a proline-rich [60]fullerene peptide with potential biological activity. *Tetrahedron*, 2004, 60: 2823—2828
- 张龙彬, 朱光明, 许硕贵, 等. 辐射交联聚己内酯的酶降解动力学研究. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2006, 24: 275—278
- Prato M, Li Q C, Wudl F, et al. Addition of azides to C60: Synthesis of azafulleroids. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 1148—1150
- Jie M S, Cheung S W. Fullerene lipids: Synthesis of C60 fullerene derivatives bearing a long-chain saturated or unsaturated triester system. *Lipids*, 1999, 34: 1223—1230
- Jie M S, Cheung S W, Ho J C. Fullerene lipids: Synthesis of novel nitrogen-bridged [60]fullerene fatty ester derivatives. *Lipids*, 2001, 36: 421—426
- Stoilova O, Jerome C, Detrembleur C, et al. New nanostructured materials based on fullerene and biodegradable polyesters. *Chem Mater*, 2006, 18: 4917—4923
- Schergna S, Da Ros T, Linda P, et al. Enzymatic modification of fullerene derivatives. *Tetrahedron Lett*, 1998, 39: 7791—7794
- 郑裕东, 王迎军, 吴刚, 等. 聚羟基烷酸酯酶降解动力学研究. *高分子学报*, 2002, (6): 760—763

Degradation of a fullerene end-capped polycaprolactone by lipase AK

PENG QiYun, KANG Feng, LI Juan & YANG XinLin

School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081

Using titrimetric method, enzymatic behavior of lipase AK against fullerene end-capped polycaprolactone (C₆₀-PCL) was studied for the first time, compared with polycaprolactone (PCL). The results showed that degradation of both C₆₀-PCL and PCL by lipase followed Michaelis-Menten equation, with the degradation parameters of PCL and C₆₀-PCL were 0.75 and 0.16 mg · mL⁻¹ for *K_m*, and 0.90 and 0.43 mL · h⁻¹ for *V_{max}*, respectively. C₆₀-PCL had a slower degradation rate than PCL under the same conditions. These data indicated that the introduction of fullerene enabled PCL hard to be degraded by lipase.

fullerene end-capped polycaprolactone, polycaprolactone, lipase AK, titrimetry

doi: 10.1360/972009-2419

· 动 态 ·

第一届全国生物物理化学会议暨生物物理化学发展战略研讨会在京召开

在最近修订的《国家自然科学基金申请指南》中,国家自然科学基金申请代码物理化学下增设了生物物理化学,为生物物理化学学科在中国的发展奠定了基础.从自然科学基金申请的情况可以看出,由于生物物理化学的申请代码刚刚设立,国内的科学家们对于这个学科的范畴、任务还没有统一和清晰的认识,基金申请的项目数也较少,需要进行战略研讨,回答相关问题.为了促进我国生物物理化学的发展和为从事相关研究的科学家提供一个学术交流的平台,受中国化学会和国家自然科学基金委员会化学学部的委托,作为庆祝北京大学化学学科创立 100 周年活动的一部分,北京大学化学与分子工程学院于 2010 年 7 月 5~7 日承办了第一届全国生物物理化学会议暨生物物理化学发展战略研讨会,会议主席为赵新生教授.哈佛大学谢晓亮

教授等 14 位海外华裔科学家与国内 100 多位代表相聚一堂,交流学术成果,研讨发展战略.国家自然科学基金委员会化学部杨俊林处长出席会议并讲话.会议共进行了 2 个大会报告、33 个邀请报告、27 个口头报告和墙报的交流,介绍了国际上生物物理化学学科的研究热点,展示了当前我国该学科研究的基本面貌.与会代表经过讨论认为:生物物理化学的基本任务是充分运用物理化学的原理、方法和思想,深入探究生物过程中化学运动的本质,这是其区别于其他相邻学科的鲜明特点;近期的一些科研热点包括发展和运用各种先进的物理化学手段和工具,研究生物过程和生物分子的动态结构,探究相关化学反应的机理和动力学.会议商定 2012 年秋季在武汉召开第二届全国生物物理化学会议.

会议筹备组