

## Living-Polymerisation und enzymatische Polysaccharidsynthese

B. Pfannemüller

Institut für Makromolekulare Chemie der Universität Freiburg i.Br.

The kinetics of anionic polymerization are shown to be largely analogous to those of enzymic polycondensation (amylose synthesis). The two systems are compared as regards their capacity to synthesize linear and branched polymers of well-defined size and shape.

Makromoleküle sind charakterisiert und in ihren Eigenschaften weitgehend bestimmt durch ihr Molekulargewicht und ihre Molekulargewichtsverteilung, durch die Sequenz ihrer Bausteine (statische, alternierende oder Block-Copolymere) sowie durch die sterische Anordnung der Monomeren (ataktische, syndiotaktische oder isotaktische Struktur). Die meisten technischen Polymersynthesen liefern unregelmäßig aufgebaute Produkte, die in Bezug auf die Kettenlänge, die Sequenz der Bausteine und die Verknüpfung der Monomeren eine weitgehend statistische Verteilung aufweisen. Mechanismen, die einen dieser Parameter zu steuern erlauben, haben daher besonderes Interesse gefunden. Dazu gehört die Verwendung von metallorganischen Koordinationskomplexen (Ziegler-Natta-Katalysatoren) mit der Möglichkeit zur sterischen Kontrolle des Wachstumsschritts und die anionische Polymerisation mit lebenden Polymeren mit der Möglichkeit der Regulation der Kettenlänge bei einheitlicher Verteilung.

Diesen bekannten Polymerisationsverfahren soll hier eine enzymatische Polykondensationsreaktion gegenübergestellt werden: die *in-vitro*-Synthese von  $\alpha$ -1,4-Glucan (Amylose) mit Phosphorylase. Sie vereint die Vorteile eines nach Art der Ziegler-Natta-Katalysatoren stereoselektiv arbeitenden Katalysators mit den Vorteilen der anionischen Polymerisation, da auch hier das Kettenwachstum über lebende Polymere abläuft.

### Die Reaktionsschemata

Hier wird zunächst gezeigt, daß zwischen der Kinetik der anionischen Polymerisation und der enzymatischen Polykondensation weitgehende Analogie besteht. Daraus werden dann die Möglichkeiten beider Systeme im Hinblick auf den gezielten Aufbau von Makromolekülen abgeleitet und vergleichend diskutiert. In Fig. 1 sind die anionische Polymerisation mit Butyllithium in Tetrahydrofuran und die phosphorolytische Polykondensation von Glucose in  $H_2O$  schematisch dargestellt.

Die Startreaktion bei der anionischen Polymerisation in polaren Lösungsmitteln besteht in der Aktivierung eines kleinen Teils der Monomeren durch den Initiator unter Bildung von anionischen Zentren. Das Kettenwachstum erfolgt durch Addition von nicht aktivierten

Monomeren an die aktivierten Kettenenden. Startreaktion und Kettenwachstum verlaufen ungefähr gleich schnell. Die Zahl der Initiatormoleküle bestimmt die Zahl der aktiven Enden und damit die Anzahl der Makromoleküle, auf die sich das zugegebene Monomere gleichmäßig verteilt.

Bei der enzymatischen Synthese liegt umgekehrt das Monomere, die Glucose, in aktivierter Form als Glucose-1-phosphat vor. Als Akzeptor für den Glucosylrest fungiert ein sog. Starter, der nicht aktiviert ist. Er enthält das Muster für die zu synthetisierende Kette, und seine Länge muß mindestens vier Glucoseeinheiten betragen, damit die Phosphorylase wirksam werden kann. In dem Dreikomponentenkomplex Enzym – Glucose-1-phosphat – Starter erfolgt der Wachstumsschritt. Die Katalyse liegt bei der anionischen Polymerisation vor dem Wachstumsschritt, bei der enzymatischen Synthese im Wachstumsschritt selbst. Die Zahl der wachsenden Ketten wird – wie bei der anionischen Polymerisation – durch die Zahl der Startermoleküle festgelegt.

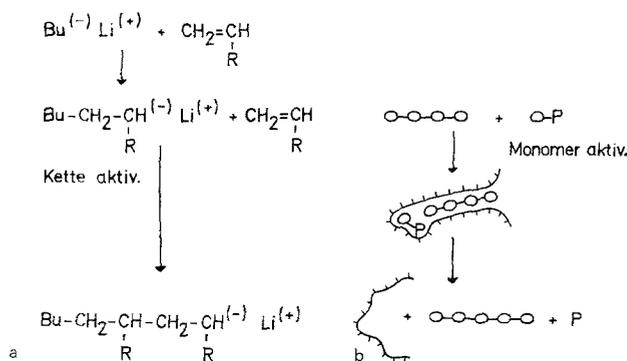


Fig. 1. Schema (a) der anionischen Polymerisation in Tetrahydrofuran und (b) der phosphorolytischen Polykondensation in wäßriger Lösung.  $\circ-\circ-\circ-\circ$  Maltotetraose,  $-P$  Glucose-1-phosphat (aktives Monomer),  $P$  Phosphorsäure

Gleichzeitiger Start aller Makromoleküle  
und fehlender Kettenabbruch  
liefern gleich lange Polymerketten

Das Ergebnis einer enzymatischen *in-vitro*-Synthese  
von Amylose mit Maltotetraose als Starter zeigen  
Tabelle 1 und Fig. 2.

Tabelle 1. Stufenweise Amylosesynthese mit Maltotetraose als Starter

Umsatz [%]	$\bar{P}_{ber.}$	$\bar{P}_{w,gef.}$	$P_w$	$P_n$	$P_w/P_n$
28,5	955	1040	1023	1022	<1,001
52,5	1760	1810	1821	1817	1,002
71,5	2400	2380	2500	2482	1,007

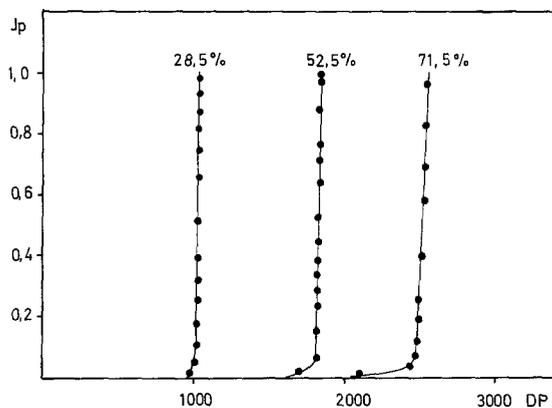


Fig. 2. Phosphorolytische Synthese mit Maltotetraose als Starter. Integrals mass distribution ( $J_p$ ) der Amylose tricarbanilate bei 28,5, 52,5 und 71,5% Umsatz

Der Polymerisationsgrad der Amylosen nimmt mit steigendem Umsatz kontinuierlich zu. Der aus der Starterkonzentration berechnete Polymerisationsgrad ( $P_{ber.}$ ) und der experimentell bestimmte Wert ( $P_{w,gef.}$ ) stimmen jeweils gut überein. Bei der fraktionierten Fällung der Tricarbanilylderivate der Amylosen erhält man eine außerordentlich enge Molekulargewichtsverteilung:  $P_w$  und  $P_n$  sind praktisch identisch. Die hohe Einheitlichkeit beruht wie bei der anionischen Polymerisation darauf, daß alle Ketten gleichzeitig wachsen, die Kettenzahl unverändert bleibt und ein Kettenabbruch bei der enzymatischen Synthese prinzipiell nicht möglich ist. Es wurden Polymerisationsgrade bis zu 30000 erhalten.

#### Verzögerte Startreaktion – ungleich lange Makromoleküle

Die anionische Polymerisation in unpolaren Lösungsmitteln verläuft analog zur enzymatischen Synthese mit Maltotriose als Starter. In beiden Fällen liegt eine langsame Startreaktion vor. Einerseits wird sie bestimmt durch das Assoziationsgleichgewicht zwischen hexamerem und monomerem Butyllithium, andererseits dadurch, daß der erste Schritt von Maltotriose

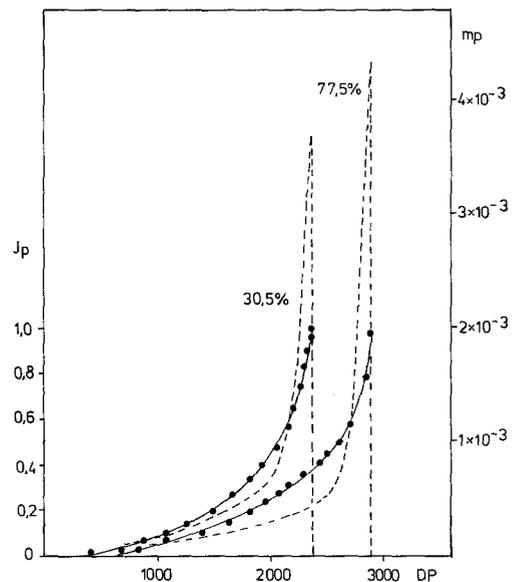


Fig. 3. Phosphorolytische Synthese mit Maltotriose als Starter.  $\rightarrow$  Integrals ( $J_p$ ),  $---$  differentielle ( $m_p$ ) Massenverteilung der Amylose tricarbanilate bei 30,5 und 77,5% Umsatz.

zu Maltotetraose etwa 400mal langsamer ist als die weiteren Wachstumsschritte, bedingt durch das ungünstigere Bindungsverhalten am Enzym. Die Bedingungen für ein gleichzeitiges Wachstum aller Ketten sind also nicht erfüllt. Die Konsequenzen in Bezug auf die Molekulargewichtsverteilung sind dieselben wie bei der anionischen Polymerisation. Wie Fig. 3 zeigt, erhält man eine typische Dreiecksverteilung [1].

Tabelle 2. Stufenweise Amylosesynthese mit Maltotriose als Starter

Umsatz [%]	$\bar{P}_{ber.}$	$\bar{P}_{w,gef.}$	$P_w$	$P_n$	$P_w/P_n$
30,5	412	1930	2065	1618	1,25
51,5	695	2200	2100	1838	1,14
77,5	1050	2420	2360	2005	1,18

Die Amylosen bestehen aus einer einheitlichen hochmolekularen Komponente und einem uneinheitlichen Schwanz kürzerer Ketten. Die bei der langsamen Startreaktion gebildeten ersten Maltotetraose-Moleküle wachsen noch ziemlich gleichzeitig, während ein Teil der Maltotriose-Moleküle erst nach und nach zum Zuge kommt. Damit erklärt sich, daß im Gegensatz zur Synthese mit reiner Maltotetraose oder höheren Maltooligomeren der Polymerisationsgrad mit steigendem Umsatz nicht linear verläuft. Das hat zur Folge, daß die entstehenden Polymerketten verschieden lang werden und daß die Mittelwerte schon bei kleinem Umsatz verhältnismäßig hoch sind und im weiteren Verlauf nur wenig ansteigen (Tabelle 2).

Die Voraussetzungen für die Erhaltung einer engen Molekulargewichtsverteilung sind also bei der anionischen Polymerisation und bei der enzymatischen Polykondensation dieselben: 1. keine geschwindig-

keitsbestimmende Startreaktion, 2. gleichzeitiges Wachstum aller Ketten, 3. keine Abbruchreaktion. Unter diesen Bedingungen läßt sich der Polymerisationsgrad durch die Initiator- bzw. Starterkonzentration und den Umsatz nach Belieben regeln und vorausberechnen.

Die enzymatische Polykondensation unterscheidet sich von der anionischen Polymerisation dadurch, daß die Synthese in wässrigem Medium durchgeführt wird und weitgehend wasserlösliche Produkte liefert. Die Polymeren können daher in Wasser, ebenso gut aber in organischen Lösungsmitteln untersucht werden, wenn nach Umsetzung der funktionellen Gruppen der Amylose die Derivate eingesetzt werden. Außerdem ist die Amylose wie alle Biopolymeren stereoreguliert (Helixstruktur).

#### *Synthese definiert gebauter Polymere*

Der Mechanismus von lebenden Polymeren bietet verschiedene Variationsmöglichkeiten. Die anionische Polymerisation wird außer zur Herstellung von Homopolymeren auch vielfach zur Synthese von Blockcopolymeren mit definierter Sequenzlänge benützt. Das geht in dieser Art bei der enzymatischen Synthese nicht, weil noch kein ähnlich gut arbeitendes Enzym zur Verfügung steht, das eine andere Sorte von Monomeren weiterbaut.

#### Blockcopolymere

Blockcopolymere lassen sich jedoch noch auf einem anderen Weg herstellen. Es ist bekannt, daß bei Verwendung von Naphthalinnatrium bei der anionischen Polymerisation radikal-anionische Monomere entstehen, die durch radikalische Rekombination zu bifunktionellen, an beiden Enden aktivierten wachsenden Ketten führen, die ebenfalls zur Synthese von Blockpolymeren vom Typ A-B-A herangezogen werden. Prinzipiell sind solche Synthesen auch mit der enzymatischen Polykondensation möglich. So wurden an die Hydroxylgruppen an beiden Enden von Polyäthylenoxid Startermoleküle angekoppelt. Durch nachfolgende phosphorolytische Synthese ließen sich nun Amyloseblöcke nach beiden Seiten anwachsen.

#### Verzweigte Polymere

Will man verzweigte Strukturen herstellen, dann müssen die Moleküle mehr als zwei lebende Zentren besitzen. Bei der anionischen Polymerisation wurde dieser Syntheseweg bisher kaum eingeschlagen. Verzweigte Strukturen, wie Kamm- und Sternpolymere, werden üblicherweise durch Abbruch von lebenden linearen Ketten mit polyfunktionellen Abbrechern hergestellt. Erst kürzlich ist es gelungen, lebende Polymere mit vielen aktiven Enden zu erhalten [2].

#### *Anwendung auf Polysaccharide*

Makro-Moleküle mit zahlreichen wachsenden Ketten sind bei der enzymatischen Methode dadurch relativ leicht zugänglich, daß man die Startermoleküle mit einem entsprechenden Träger verknüpft. Es wurden mehrere Reaktionen bearbeitet, um oligomere Starter in größerer Zahl an einem Träger zu fixieren und phosphorolytisch zu verlängern [3]: 1. eine Verknüpfung durch Glykosidbindung in 1,6-Position an Polysaccharide, 2. eine Esterbindung (Kondensation mit Dicyclohexylcarbodiimid oder Kohlensäurediesterbindung) und 3. die Reaktion von Säurehydrazidgruppen am Träger mit den reduzierenden Endgruppen des Starters unter Hydrazonbindung. Die Hydrazonbindung liefert bis jetzt die höchsten Verzweigungsgrade. Sie hat außerdem den Vorteil, daß keine Schutzgruppen eingeführt werden müssen und der Starter daher schonend umgesetzt werden kann. Als Rückgrat bei den verschiedenen Kupplungen werden Amylose, Cellulose, Pektin und Alginsäure, aber auch lineares und vernetztes Polyacrylsäurehydrazid (aus Bio-Gel) verwendet. Ebenso wird versucht, mit niedermolekularen cyclischen Trägern wie Cyclodextrin und multifunktionellen Benzolcarbonsäuren Sternmoleküle mit definierter Zweigzahl zu erhalten.

Statt den oligomeren Starter erst chemisch einzuführen, kann man auch direkt verzweigte Polysaccharide wie Glykogen und Amylopektin verwenden, die viele fertige lebende Enden besitzen. Man erhält so Sternmoleküle mit einem hochmolekularen Kern und kann durch Variation der Starterkonzentration die Länge der aufgepfropften Amyloseketten einstellen. Die Zweigzahlen liegen bisher bei Glykogensternen um 20, bei den Amylopektinprodukten im Bereich von 10000.

Die durch enzymatische Polykondensation zugänglichen linearen und je nach Art des Trägers verschiedenartig verzweigten Makromoleküle mit einheitlichen und in ihrer Länge regulierbaren Ketten sind wie die entsprechenden anionisch polymerisierten Produkte gut geeignet, um grundlegende Fragen über den Zusammenhang zwischen Struktur und Eigenschaften zu untersuchen. Man hat nun die Möglichkeit, zwei Substanzklassen (Vinylpolymere und stereoregulierte Zuckerpolymeren) unmittelbar zu vergleichen, um festzustellen, ob die Eigenschaften durch Größe und Gestalt der Moleküle allein bestimmt werden und wie sich die unterschiedliche mikro-chemische Struktur der Ketten auswirkt.

1. Figini, R.V.: Z. physik. Chem. N. F. 38, 341 (1963)
2. Eschwey, H., Hallensleben, M.L., Burchard, W.: Makromol. Chem. 173, 235 (1973)
3. Pfannemüller, B.: Stärke 25, 396 (1973)

Eingegangen am 25. Juli 1974