

有机介质中脂肪酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯的对映体选择性氨解反应

杜伟* 宗敏华 郭勇 何俊 张媛媛 谢昭霖 娄文勇

(华南理工大学生物工程系, 广州 510640)

关键词 脂肪酶, 氨解反应, 苯甘氨酸甲酯

中图分类号 Q939.124 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0242-04

由水解酶催化的酯的对映体选择性水解和醇解反应, 已在外消旋物质的拆分中得到广泛应用^[1]。近年来的一些研究表明, 某些水解酶还可催化一些非天然酰基受体的转化, 如过氧化氢、烷基胺、联胺和氨等。这些非天然酰基受体的转化反应在多肽的合成及手性化合物的拆分中显示出巨大的应用前景。其中, 以氨为酰基受体的酶促氨解反应, 是继酶促对映体选择性水解、酯化及转酯反应之后的另一制备光学纯化化合物的新反应^[2]。目前国际上对这一新反应的研究尚属起步, 国内未见有对该反应研究的报道。

(D, L)-苯甘氨酸是半合成 β -内酰胺类抗生素的重要中间体, 由它拆分得到的 D-苯甘氨酸是氨基青霉素、头孢氨苄和头孢拉定等药物的重要侧链。本文探讨了利用脂肪酶催化对映体选择性氨解反应拆分外消旋苯甘氨酸甲酯的可能性(图 1), 首次系统研究了各因素对脂肪酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响。

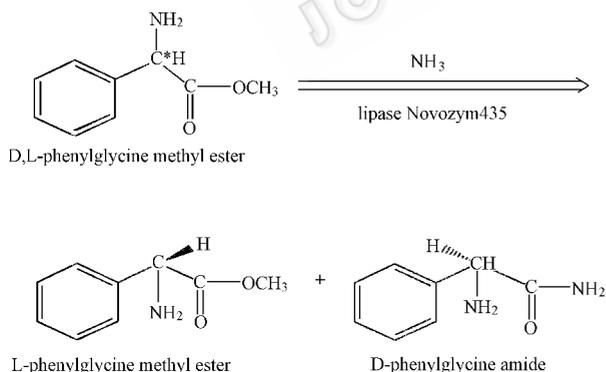


图 1 脂肪酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯的对映体选择性氨解反应
Fig. 1 Lipase-catalyzed enantioselective ammonolysis of racemic phenylglycine methyl ester in organic solvent

1 材料和方法

1.1 材料

脂肪酶 Novozym435(950u/mg solid) 来源于 *Candida antar-*

ctica, 固定化于大孔阴离子交换树脂), Novo 公司赠送; 苯甘氨酸甲酯、氨基甲酸铵及 1, β -二甲氧基苯, 购自 Sigma 公司。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 有机溶剂脱水: 将 40nm 分子筛于 180 $^{\circ}$ C 干燥箱内活化 2 h, 置干燥器中冷却后, 加入有机溶剂中, 室温振荡 48 h, 滤去分子筛, 得脱水有机溶剂。

1.2.2 反应初速度 v_0 的测量: 按时取样, 作液相色谱分析。反应初速度定义为每毫克酶每小时底物减少的摩尔浓度。

1.2.3 脂肪酶催化氨解反应: 在 50mL 带塞三角瓶中分别装入 20.2mg 外消旋苯甘氨酸甲酯、一定量的氨基甲酸铵、5 μ L 1, β -二甲氧基苯(内标)及 10mL 脱水叔丁醇, 然后加酶 100mg 开始反应, 在 30 $^{\circ}$ C, 150r/min 振荡, 定时取样 20 μ L 供液相色谱分析用。根据苯甘氨酸甲酯两对映体的减少来计算反应的转化率($c\%$)及对映体选择性(E)。

$$\text{转化率 } c\% = [1 - (A + B) / (A_0 + B_0)] \times 100$$

$$\text{对映体选择性比率 } E = V_{\text{initial } R} / V_{\text{initial } S}$$

其中: A_0, B_0 分别为酶促反应前两对映体的浓度(mmol/L); A, B 表示为反应后残余两对映体的浓度(mmol/L)。

对照实验: 在其它条件相同的情况下, 不加酶作对照实验, 反应 24h, 底物转化率为 0%。

1.2.4 反应初始水活度的控制: 将冻干的脂肪酶 Novozym435 与底物、脱水有机溶剂分别置于密闭器中, 与不同盐的饱和水溶液气相平衡 72h, 使酶及反应介质的水活度与盐溶液的水活度相同^[3]。

1.2.5 液相色谱分析: 液相色谱仪: 泵, Waters 600; 检测器, Waters 996 PAD; 检测波长 254nm; 手性柱, ODC(Daicel Chemical Industries, LTD) 流动相为正己烷: 异丙醇: 二甲胺 = 90: 10: 0.1 (V/V/V) 流速 0.8mL/min; 两对映体的保留时间分别为: 13.5min 和 15.2min; 分离因子 $\alpha = 1.5$ 。

2 结果与讨论

2.1 反应介质对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨

收稿日期 2001-08-20, 修回日期 2001-12-03。

基金项目 广东省自然科学基金资助项目(No. 980543)。

* 通讯作者。Tel: 86-20-87111452; E-mail: crystal-du@263.net

解反应的影响

作为反应介质,有机溶剂的性质对酶的催化活性及对映体选择性均有着显著影响^[4]。在本研究中,由于苯甘氨酸甲酯在大多数有机溶剂中溶解性很差,为研究不同有机溶剂对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯盐酸盐两对映体氨解反应的影响,先用 5mL 叔丁醇完全溶解底物后,再分别加入 5mL 其它不同的有机溶剂(分别为 1,2-二氯乙烷、叔丁醇、苯、4-methyl-2-pentanone (MIBK)、环己烷和正庚烷),试图以此研究不同有机溶剂对氨解反应的相对影响。研究发现,加入的有机溶剂不同,酶催化两对映体氨解反应的速度及对映体选择性也不同。以 1,2-二氯乙烷为反应介质,酶催化氨解反应表现出较高的对映体选择性,但氨解反应速度较低;完全以叔丁醇为反应介质,不仅氨解反应速度较快,且酶的对映体选择性也较高(表 1)。

表 1 有机溶剂对脂肪酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响

Table 1 Effect of organic solvents on the lipase-catalyzed enantioselective ammonolysis of racemic phenylglycine methyl ester

The added organic solvent	v (mmol·L ⁻¹ ·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)	E
1,2-dichloride ethane	0.022	23
Tert-butanol	0.048	20
Benzene	0.042	18
MIBK	0.044	17
Cyclohexane	0.049	15
Heptane	0.054	13

Reaction conditions :10mmol·L⁻¹ phenylglycine methyl ester, 5μL 1,3-dioxibenzene, 10mg/mL lipase Novozym435, shaken at 150r/min; 30°C

在本反应体系中,溶剂对脂肪酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯的对映体选择性氨解反应的影响是多方面的。一方面,溶剂可通过直接影响酶分子的构象来影响其催化性能;另一方面,还可通过影响底物和产物在酶分子表面水层的分布来影响整个酶反应;不同溶剂还可以通过影响底物的溶剂化能等来影响两对映体的氨解反应;再者,酰基受体在不同溶剂里的溶解度也有差异,从而也会导致氨解反应速度的改变。

2.2 反应初始水活度对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响

酶蛋白的水化作用是稳定酶催化活性构象的必要条件。对本研究体系,水的存在将导致竞争性水解反应的进行,故在本研究中控制适量的水就显得特别重要。在研究的水活度范围内,当水活度低于 0.75 时,随着水活度的增加,脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯氨解反应速率增大,当水活度超过 0.75 后,氨解反应速度随水活度的增加而下降,这是因为随着水活度的增加,酶分子逐步被活化,但水活度过高,该酶分子表面形成水簇,影响了传质从而导致氨解反应速度的降低;在研究的水活度范围内,酶促氨解反应对映体选择性随水活度的增加而降低(图 2)。兼顾酶反应活性和对映体选择性,

0.75 为最佳水活度。

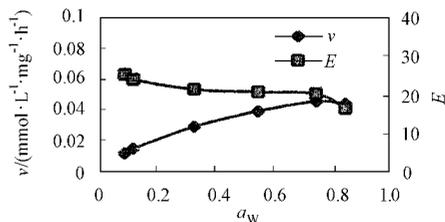


图 2 初始水活度对脂肪酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯对映体氨解反应的影响

Fig.2 Effect of initial water activity on the lipase-catalyzed enantioselective ammonolysis of racemic phenylglycine methyl ester
Reaction conditions :10mmol·L⁻¹ phenylglycine methyl ester, 10mL tert-butanol, 5μL 1,3-dioxibenzene, 10mg/mL lipase Novozym435, shaken at 150r/min; 30°C

在本研究的范围内,水解反应非常微弱,反应 30 h,转化率低于 5%。

2.3 温度对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响

在本反应体系中,温度对酶的催化活性及对映体选择性均有显著影响。当温度低于 35°C 时,酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯的氨解反应速度随着温度的升高而增大,但当温度超过 40°C 后,氨解反应速度随温度的升高骤然下降,由于所用的酶具有很好的热稳定性(经检测反应后酶残留活性所证),故推测这是由于过高的温度使溶解在溶剂里的氨的浓度降低所致;在研究的温度范围内,对映体选择性随着温度的升高而降低(图 3)。

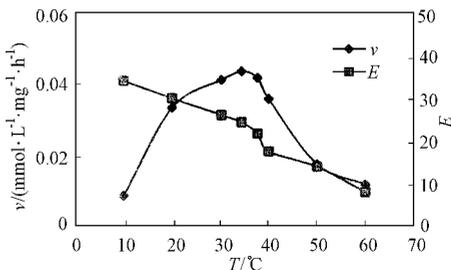


图 3 温度对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响

Fig.3 Effect of temperature on the lipase-catalyzed ammonolysis of racemic phenylglycine methyl ester
Reaction conditions :10mmol·L⁻¹ phenylglycine methyl ester, 10mL dehydrated tert-butanol, 5μL 1,3-dioxibenzene, 10mg/mL lipase Novozym435, shaken at 150r/min

2.4 添加剂对脂肪酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响

在本研究体系中,探讨了不同添加量的冠醚对脂肪酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响(冠醚添加量分别为 0mg/mL, 0.05mg/mL, 0.3mg/mL, 0.5mg/mL, 0.7mg/mL, 1mg/mL 和 1.5mg/mL)。结果发现,在所研究的范围内,酶促氨解反应速度随着冠醚添加量的增加而增大,但酶

反应对映体选择性却随着冠醚添加量的增加而降低。故在本反应体系中,不宜添加冠醚。

在有机介质中添加一定量的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 对酶反应活性和对映体选择性均有显著的影响^[5]。不同添加量的 *N,N*-二甲基甲酰胺对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响如表 2 所示。当 *N,N*-二甲基甲酰胺添加量小于 8 μ L 时,酶促氨解反应速度及对映体选择性均随着 *N,N*-二甲基甲酰胺的增加而增大;当 *N,N*-二甲基甲酰胺的添加量超过 8 μ L 时,氨解反应速度增加,但对映体选择性却略有降低。添加剂 *N,N*-二甲基甲酰胺对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响是多方面的:一方面添加剂可能直接影响酶分子的构象从而会影响其催化功能;另一方面,它还可能通过改变底物和产物在酶分子表面水层的分布来影响整个酶反应;再者,添加剂还可通过影响底物溶剂化能等方式影响对映体选择性。

表 2 *N,N*-二甲基甲酰胺对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响

Table 2 Effect of *N,N*-dimethyl formamide on lipase-catalyzed enantioselective ammonolysis of phenylglycine methyl ester

Amount of <i>N,N</i> -dimethyl formamide/ μ L	v (mmol \cdot L ⁻¹ \cdot mg ⁻¹ \cdot h ⁻¹)	<i>E</i>
0	0.048	20
4	0.052	22
6	0.055	24
8	0.061	27
10	0.067	25
12	0.069	24
14	0.070	22

Reaction conditions: 10mmol \cdot L⁻¹ phenylglycine methyl ester, 10mL dehydrated tert-butanol, 5 μ L 1,3-dioxobenzene, 10mg/mL lipase Novozym435, shaken at 150r/min; 30 $^{\circ}$ C

不少文献报道,添加一些表面活性剂可影响酶反应活性和对映体选择性。作者研究了表面活性剂 Tween80, Tween20, Span80 和 Span85 对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响,结果发现,除 Span80 能提高该反应的对映体选择性外, Tween80, Tween20 和 Span85 虽可提高酶促氨解反应速度,但使反应的对映体选择性均略有降低。作者进一步考察了不同添加量的 Span80 对脂肪酶催化外消旋苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响,发现当 Span80 的添加量小于 0.272mg/mL 时,氨解反应对映体选择性随着 Span80 添加量的增加而提高;当 Span80 的添加量超过 0.272mg/mL 时,对映体选择性均略有降低(表 3)。在所研究的范围内,Span80 对酶促氨解反应速度影响不大。

2.5 脂肪酶 Novozym435 催化外消旋苯甘氨酸甲酯的氨解反应与对应的水解和醇解反应比较

对比研究了酶促氨解、水解和醇解反应,发现脂肪酶 Novozym435 催化外消旋苯甘氨酸甲酯水解反应和醇解反应(分别以乙醇、1-丙醇和 1-丁醇为酰基受体)不仅反应速度很

慢,且均未表现出对映体选择性(表 4)。可见,酶促氨解反应比其它相应的水解、醇解反应表现出更高的酶反应活性和对映体选择性。

表 3 Span80 对脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应的影响

Table 3 Effect of Span80 on lipase-catalyzed enantioselective ammonolysis of phenylglycine methyl ester

Amount of Span80(mg/mL)	v (mmol \cdot L ⁻¹ \cdot mg ⁻¹ \cdot h ⁻¹)	<i>E</i>
0	0.048	20
0.068	0.047	22
0.136	0.047	25
0.272	0.046	29
0.48	0.045	27
1.36	0.046	25

Reaction conditions: 10mmol \cdot L⁻¹ phenylglycine methyl ester, 10mL dehydrated tert-butanol, 5 μ L 1,3-dioxobenzene, 10mg/mL lipase Novozym435, shaken at 150r/min; 30 $^{\circ}$ C

表 4 脂肪酶催化苯甘氨酸甲酯氨解、水解和醇解反应比较

Table 4 Comparison of lipase-catalyzed ammonolysis, alcoholysis and hydrolysis of phenylglycine methyl ester

v_0 (mmol \cdot L ⁻¹ \cdot mg ⁻¹ \cdot h ⁻¹)	Ammonolysis hydrolysis		Alcoholysis		
			Ethanol	1-propanol	1-butanol
	0.048	0.0025	0.013	0.009	0.004
<i>E</i>	20	0	0	0	0

Reaction conditions: The same as Table 3 except for different acyl acceptor

3 结 论

有机溶剂,反应初始水活度、温度及添加剂对脂肪酶 Novozym435 催化外消旋苯甘氨酸甲酯对映体选择性氨解反应有着显著影响:最适的反应介质为叔丁醇,兼顾酶反应活性和对映体选择性,最适的反应初始水活度和温度分别为 0.75 和 35 $^{\circ}$ C。添加一些添加剂对酶反应活性和对映体均有着一定影响,酶促苯甘氨酸甲酯的氨解反应比对应的水解和醇解反应表现出更高的活性和对映体选择性。

REFERENCES(参考文献)

- [1] De Zoete M C, Kock-Van Dalen A C, Rantwijk Van F, Sheldon R A. Lipase-catalyzed ammonolysis of lipids. A facile synthesis of fatty acid amides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1996, 2 (2~3):141~145
- [2] Litjens M J J, Sha M, Straathof A J J *et al.* Competitive Lipase-catalyzed ester hydrolysis and ammonolysis in organic solvents: equilibrium model of a solid-liquid-vapor system. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 65(3):347~356

esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology* ,1998 **22** :212 ~ 216

[4] Affleck R ,Haynes C A , Clark D S. Solvent dielectric effects on pro-

tein dynamics. *Pro Natl Acad Sci USA* ,1992 **89** :5167 ~ 5170

[5] Duan G , Chen J Y. Lipase catalyzed enantioselective esterification of 2-methylalkanoic acids. *Biotechnol Lett* ,1994 **165** :1065 ~ 1067

Lipase-catalyzed Enantioselective Ammonolysis of Racemic Phenylglycine Methyl Ester in Organic Solvent

DU Wei* ZONG Min-Hua GUO Yong HE Jun ZHANG Yuan-Yuan XIE Zhao-Lin LOU Wen-Yong

(*Biotechnology Department , South China University of Technology , Guangzhou 510640 , China*)

Abstract A novel reaction-enzymatic ammonolysis discovered in the mid of 1990s has been demonstrated to be a very promising alternative in the preparation of optically pure compounds. The effects of organic solvent , initial water activity , temperature and additives on lipase Novozym435-catalyzed enantioselective ammonolysis of racemic phenylglycine methyl ester were investigated systematically in this paper. Enzymatic reaction of ammonolysis showed higher activity and enantioselectivity than the corresponding reaction of hydrolysis and alcoholysis.

Key words lipase , ammonolysis , phenylglycine methyl ester

Received 08-20-2001

* Corresponding author. Tel 86-20-87111452 ;E-mail :crystal-du@263.net