

酶在有机相中催化酚类聚合的研究

徐越平 黄国兰 俞耀庭*

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071)

(南开大学生物活性材料开放实验室 天津 300071)*

酶曾一度被认为只能在水介质中起催化作用,而有机溶剂则会使其失活。由于大量化学反应都是在有机溶剂中进行的,使得酶催化在有机合成中的应用受到极大限制。近年来不少研究表明,只要条件合适,酶催化在有机介质中也可进行^[1,2],并已在实际应用中显示出其优点,如肽的合成^[3,4]、旋光性物质的合成^[5,6]、不溶于水的化学物质的酶法分折^[7]、酯和酯交换反应^[8,9]、甾体氧化^[10]、脱氢反应^[10]、酚类聚合反应^[12]等。与一般化学催化相比,生物催化剂(酶)除了催化效率高,反应条件温和外,它具有严格的选择性。例如对反应的专一性,化学基团的选择性,位置的选择性和对映选择性,因此,酶催化特别适合那些一般化学方法难以实现的手性化合物的选择性转化^[13,14]。

我们以 HPLC 监测反应过程中酚类底物浓度的变化,研究了底物结构、反应温度、不同酶及金属离子对反应速率的影响。

1 材料与方 法

1.1 试剂

1.1.1 辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,简称 HRP,EC1.11.1.7)、乳酸过氧化物酶(Lactoperoxidase, EC1.11.1.7)和氯过氧化物酶(Chloroperoxidase, EC1.11.10)购自 Sigma 公司,其活性分别为 985, 115 和 1280u/mg,漆酶为武汉大学资源应用所杜予民教授惠赠。

1.1.2 对甲氧基苯酚购自上海白鹤化工厂,HPLC 用 C₁₈反相柱(15cm×0.5cm o. d)购自天津化学试剂二厂,流动相所用甲醇为分析纯,使用前重蒸、过滤、脱气。其它酚类、胺类试剂均为分析纯或化学纯。

1.2 方 法

1.2.1 聚合反应是在 100ml 锥形瓶中加入 20ml 由有机溶剂和 10m mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液组成的混合溶剂(水溶性溶剂其含量不超过 90%,非水溶性溶剂为其饱和溶液)。加入酚使其浓度为 20~500m mol/L。然后加入 0.1~0.5mg/ml 的辣根过氧化物酶。置于摇床上,在指定的温度下进行振荡。缓慢滴入与单体等摩尔数的 30%过氧化氢溶液。待反应完毕,进行抽滤,水洗 3 次。将沉淀物溶于二甲基酰胺中,过滤。滤液倒入水中沉淀。抽滤后烘干,即得聚合物。

2 结果与讨论

2.1 不同取代基的酚类及胺类底物对聚合速度的影响

通过对 20 余种不同结构的酚类及芳胺类底物进行有机相酶促聚合,发现底物结构对聚合反应速率有显著影响,见表 1。

首先,我们可以看出,带有给电子取代基的酚类单体易被酶催化聚合,而带拉电子取代基的酚单本则不易被催化聚合。例如,对叔丁基苯酚、对氯苯酚、对甲氧基苯酚、苯酚及对硝基苯酚在有机相乙醇中酶促聚合的速率分别为 6.59,3.22,5.30,0.869 及 0 μ mol/min·mg。给电子取代基之所以能提高反应

本工作为国家教委博士点基金资助项目。

* 联系人:天津南开大学分子生物所俞耀庭。

本文于 1995 年 9 月 19 日收到。

活性,可能是因为它可使底物分子酚羟基上的电子云密度增大,从而有利于酚羟基与辣根过氧化物酶活性中心金属离子(缺电子)的结合,然后羟基传递电子给 Fe^{4+} ,完成氧化-还原反应过程。而拉电子取代基则使酚羟基与酶活性中心的结合变得困难,所以聚合反应不易进行。

表1 底物结构对酚类有机相酶催化聚合反应速率的影响

底物	反应速率 $v/\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$	底物	反应速率 $v/\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$
对叔丁基苯酚	6.59	邻氯苯酚	3.15
对氯苯酚	3.22	间甲酚	1.38
对苯基苯酚	3.09	1-苯酚	0.134
对氯苯胺	0.0426	苯酚	0.869
对甲苯胺	4.06	2,4-二氯苯酚	5.46
邻甲苯胺	0.352	2,4-二甲酚	2.14
间苯二酚	0.701	邻甲联苯胺	3.55
邻苯二酚	0.0221	对甲氧基苯酚	5.30
双酚 A	4.70	邻甲氧基苯酚	0.374
邻甲酚	0.716	对硝基苯酚	0.00

有机溶剂乙二醇含 30% 10 mol/L NaAc-HAc 缓冲液(pH5.0);过氧化氢浓度: 4.1×10^{-5} mol/L;底物浓度: 3.61×10^{-4} mol/L,辣根过氧化物酶浓度 1.36mg/L;聚合温度: 30℃

比较取代基位置的影响时,对位取代的酚类底物比邻位取代的酚底物更易被催化聚合,这一点可通过对以下底物聚合速率的比较得到证明;对甲氧基苯酚(5.30)与邻甲氧基苯酚(0.374)。比较芳胺类底物的聚合速率也可得到证明;对甲苯胺(4.06)与邻甲苯胺(0.352)。将间位取代与邻位取代进行比较时,发现间位取代也比邻位取代更有利于聚合,这一结论似乎与取代基效应规则矛盾。但邻位取代底物的反应速率之所以小于间位与对位取代底物的反应速率,主要取决于空间位阻问题。酚羟基邻位的基团会影响羟基与酶活性中心的结合,这一问题在有机相酶催化中变得尤为突出,因为与在水介质中相比,在有机介质中酶结构的刚性增强,因此其活性中心不易张开以接纳体积庞大的底物,此时空间位阻效应占主导地位。

当酚羟基的邻位已被给电子基团占据时,羟基对位再引入给电子基团的结果是反应速率增大,如邻甲酚(0.716)与 2,4-二甲基苯酚(2.14),邻氯苯酚(3.15)与 2,4-二氯苯酚(5.46)。我们认为这是由于对位的给电子取代基进一步增大了酚羟基上的电子云密度,从而使羟基和酶活性中心的结合更为容易。

2.2 反应温度的影响

酶作为具有生物活性的催化剂,有一定的温度使用范围。温度在 14~40℃ 范围内,对甲氧基苯酚酶促反应速率随温度增大而增大,超过 40℃ 时,反应速率减少,见表 2。这显然是因为高温下酶的热失活加剧之故。

表2 温度对有机相酶促对甲氧基苯酚聚合反应速率的影响

温度/℃	反应速率(v)/ $\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$
14	3.94
17	4.26
20	4.78
25	5.61
32	6.90
35	7.51
38	8.40
40	8.93
45	8.74
48	3.75

试验条件同表 1。

2.3 不同酶的影响

为了验证除了 HRP,其它酶是否也可催化有机介质中酚类的聚合,分别以氯过氧化物酶、乳酸过氧化物酶和漆酶进行了催化聚合实验,结果发现乳酸过氧化物酶也可起催化作用,而氯过氧化物酶和漆酶则未能催化酚类底物发生聚合,见表 3。

2.4 金属离子的抑制作用

有些金属离子曾被报道对水相中辣根过氧化物酶的催化起抑制作用,为观察其对非水介质中酶促反应的抑制作用,在含有不同金属离子的有机介质中进行了酶促酚类聚合反应,结果发现 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 及 Cu^{2+} 均能不同程度地抑制 HRP 的活性,见表 4。

表 3 不同酶对甲氧基苯酚聚合速率的影响

HRP		乳酸过氧化物酶	
时间/min	酚浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	时间/min	酚浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
0	44.80	0	44.80
1.13	43.65	1.35	43.05
9.45	38.79	9.82	39.70
16.27	38.04	17.75	39.13
24.83	37.95	25.25	39.02

乳酸过氧化物酶浓度:1.05mg/L;其他条件同表1。

表 4 金属离子对有机相酶促对甲氧基苯酚聚合反应速度的影响

金属离子及浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		反应速率/ $\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$	抑制率/ %
Mn^{2+}	5.18×10^{-5}	11.2	7.4
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	3.16×10^{-4}	2.66	83.3
Cu^{2+}	6.46×10^{-4}	2.07	87.0

HRP 浓度:1.36mg/L;有机介质含水量为 50%;其他条件同表 1。

参 考 文 献

- [1]Klibanov A M. CHEMTECH, 1986, 16:354~356.
- [2]Dordick J S, Enzyme Microb Technol, 1989, 11(4):194~211.
- [3]Kimura Y. Enzyme Microb Technol, 1989, 12(4):272~275.
- [4]Auriol D, Paul F, Monson P. Ann N Y. Acad Sci, 1990, 613:201.
- [5]Yokozeki K. Eur J Appl Microb Biotechnol., 1985, 14:1.
- [6]Langrand G, Baratti J, Buono G *et al.* Tetrahedron Lett., 1986, 27:29.
- [7]Kazandjian R Z, Dordick J S, Klibanov A M. Biotechnol Bioeng, 1986, 28:417~421.
- [8]Kise H, Shirato H. Tetrahedron Lett, 1985, 26:6081~6084.
- [9]Therisod M, Klibanov A M. J Am Chem. Soc, 1987, 109:3977~3981.
- [10]Omata T, Fukui S. Eur J Appl Microb Biotechnol, 1979, 8:143~155.
- [11]Grunwald J. Klibanov A M. J Am Chem Soc, 1986, 108:6732~6734.
- [12]Dordick J S. Klibanov A M. Biotechnol Bioeng, 1987, 30:31~36.
- [13]Jones J B. Tetrahedron, 1986, 42:3351.
- [14]Whitesides G M, Wong C H. Angew Chem., Int Ed. Engl, 1985, 24:617.

Phenolic Polymerization Catalyzed by Peroxidase in Organic Media

Xu Yueping Huang Guolan Yu Yaoting

(Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

(Bioactive Materials Lab, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Phenolic polymerization was carried out by enzymatic catalysis in organic media. Phenols and aromatic amines with electron-withdrawing groups could hardly be polymerized by HRP catalysis, while phenols and aromatic amines with electron-donating groups could easily be polymerized. The reaction rate of either the para-substituted substrate or meta-substituted substrate was higher than that of ortho-substituted substrate. The reaction rate increased with the increase of reaction temperature from 14 to 40°C, but decreased when temperature exceeded 40°C. Horseradish peroxidase and lactoperoxidase could easily catalyze the polymerization, but chloroperoxidase and laccase failed to yield polymers. Metallic ions such as Mn^{2+} , Fe^{2+} , and Cu^{2+} could poison horseradish peroxidase to various extent.

Key words Organic media, enzymatic catalysis, phenolic polymerization, substrate structure