

微生物酶的立体选择性反应

邢维梅 法幼华

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

有机化合物立体专一性反应是有机合成中的一个重要组成部分。但是由于化学合成的局限, 要得到纯度高的手性异构体是较困难的。对映体的纯度在医药、农药的生产及理论研究上都十分重要, 因而化合物的立体选择性形成的研究已受到广泛重视^[1,2]。

巴斯德于1820年首次报道了对映体有药效学差别。他发现精氨酸的两个对映体(D-和L-)的味道不同, 其中一个甜, 一个无味。目前已知有许多对映体有这样的差别。其中活性较大的优对映体的药效学活性与活性小的劣对映体之比可大到100或1000倍, 例如 β -阻滞剂(普奈洛尔、噻吗洛尔)以及2-芳基丙酸类非甾体抗炎药(NSAIDs)(布洛芬、氟比洛比)等^[2]。由于合成药中的许多原料及中间体都要求有高纯度的手性结构, 因此用生物酶来解决这类有机物的形成问题是一个十分引人注目的方向。早于1903年Mckenzie和Harden就曾报道, 用青霉和曲霉拆开 β -羟基丁酸的外消旋体。现已有许多关于用微生物酶进行空间专一性反应的报道, 包括羟化、还原、环氧化、酯交换、酯化、水解产生光学活性物等方面, 有些已投入工业化生产^[3,10]。

(一) 立体选择性羟化脂肪酸

Goodhue和Schaeffer用*Pseudomonas putida*从异丁酸制得克量的L- β -羟基异丁酸^[4]; Miyoshi和Harada则用*Fusarium merismoides*从丙酸产生 β -羟基丙酸^[5]。1981年, Hasegawa等用*Candida rugosa* IFO 0750由异丁酸产生D(-)- β -羟基异丁酸, 接着又研究了一系列 β -脂肪酸的羟化。如用*Candida rugosa* IFO 0750和IFO 1542由戊酸分别产生D(-)-和D(+)- β -羟基戊酸; 用*Candida*

rugosa IFO 0750和*Trichosporon fermentans* CBS 2529从DL(\pm)- α -甲基丁酸产生(-)和(+)- α -羟基甲基丁酸; 用*Endomyces reessii*从异己酸产生 β -羟基异己酸等。有的产率高达96%^[6,7,9]。

生物产生D- β -羟基脂肪酸的发现对 β -氧化途径也是一个补充。1931年Friedmann报道酵母可还原乙酰乙酸产生右旋 β -羟基丁酸。Lehninger的工作证明, D-和L-形式的脂肪酸是各自经过不同的酶系统自然产生的^[8]。Hasegawa也发现*Candida rugosa* IFO 0750及其变种可将具有对称碳的脂肪酸变为其相应的D- β -羟基脂肪酸。D- β -羟基丁酸和D- β -羟基戊酸分别是D- β -羟基己酸和庚酸的副产物。这说明*Candida rugosa* IFO 0750有单一的 β -脂肪酸氧化能力, 中间产物是 α 、 β -不饱和酯酰CoA和D- β -羟基酯酰CoA^[10]。

(二) 消旋物的拆分(酯化、水解、水化)

1. 立体选择性水解、水化分离消旋物: Omata等报道用聚氨基甲酸酯包埋的(*Rhodotorula minuta* var. *texensis*)细胞在水饱和的正庚烷体系中能立体选择性地水解DL-盖基丁二酸酯, 水解产物是单纯的L-薄荷醇^[11], 反应式见图1。

日本这方面的专利很多。1981年福井三郎用固定化的红酵母细胞在有机溶剂中使DL-薄荷醇酯产生L-薄荷醇, 产率为63%^[12]。之后又有人报道, 用*Arthrobacter* sp.和*Bacillus*或它们的酯酶水解顺-2,2-二甲基-3-(2-氯-3,3,3-三氟丙基)环丙烷酯产生(+)-顺式羧酸, 光学纯度为100%^[13]; 在含L-肉碱的培养基中生长的假单胞菌可诱导产生水化酶, 将外消旋L-肉碱酰胺水化产生L-肉碱, 光学纯

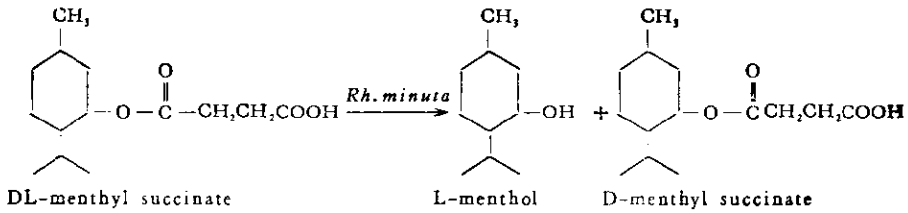


图1 DL-萜基丁二酸酯的立体选择水解反应式

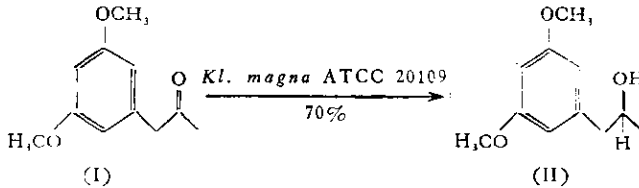


图2 (3',5'-二甲氧基-苯基-2(S)-酮基丙烷立体专一地还原反应式

度 99%^[18]。在氨基酸的生产中,用来自微生物细胞的氨基酰化酶可光学拆分 DL-氨基酸;在工业上已用固定化的 L-氨基酰化酶连续合成 L-苯丙氨酸和 L-色氨酸等氨基酸^[19]。1984 年,德国专利也报道,可将 N-(甲氧基羰基)-DL-缬氨酸用微生物细胞立体专一地水解成 L-缬氨酸,转化率达 92.86%^[20]。

2. 立体选择性酯化: Koshiro 等用聚氨基酸乙酯包埋假丝酵母的酯酶,在有机相中酯化 DL-薄荷醇,产生了单纯的 L-薄荷酯。他们还发现,用适当的酰基配体,不同的萜醇都能被立体选择性地酯化^[21]。1981 年日本专利报道,将产酯酶的红酵母培养在含 DL-羧酸的介质中可产生具有光学活性的羧酸和羧酸酯^[21]。

3. 其它拆分消旋物的方法: 1982 年 Sawada 筛选出不同种的 *Brevibacterium fraudenreichii* 和 *albidum*) 能对 DL-2-羟基-4-甲基戊酸立体专一地脱氢,发酵 4—5 天,产率可达 80%^[22]。1988 年又有专利报道,在含外消旋体乳酸的培养基中培养枯草杆菌,5 克外消旋的乳酸经 4 天发酵可产生 2.16 克/升单纯的 D-乳酸^[24]。*Pseudomonas putida* ATCC 17642 只利用 L-酒石酸而不利用 D-酒石酸;在含 80 克 DL-酒石酸的培养基中发酵 30 小时后,经离心和 CaCl_2 处理可得 65.3 克 D-(—)-酒石酸钙盐 ($\cdot 4\text{H}_2\text{O}$),再用酸处理即可获得 30.8 克 D-(—)-酒石酸粗品,产率达 39%^[37]。

(三) 立体选择性还原反应

1949 年 Neuberger 报道了微生物还原 α, β -不饱和酮,但却伴有双键的水解。1978 年 Kieselich 等成功地用 *Kloeckera magna* 将 (3',5'-二甲氧基)-苯基-2(S)-酮基丙烷立体选择性地还原为 α -羟基化合物,底物浓度高达 5—10 克/升时,产率可达 70%^[23]。图 2 是反应方程式。

在甾类的微生物转化中,早在 1966 年 Gibian 等已大规模实现了利用啤酒酵母的立体选择性还原作用,将一种 14,17-双酮中间体转化成 14-酮-17- β -羟基的构型,由于这一手性的引入得已控制以后合成过程中的立体构型。

Peter 等的实验结果证明,微生物立体选择性还原 α -甲酰酯时,对对映体的选择性是根据菌种的不同和甲酰酯的取代基所决定的。图 3 是对不同 R 基团的化合物转化的反应式,表 1 列举了其中的几个反应的结果^[26]。

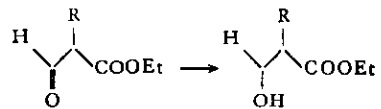


图3 甲酰酯的还原反应式

Sih 等也发现,用酵母还原 β -酮基酯时,增大末端羟基的分子可使 S 构型变为 R 构型。例如控制酯端基团的体积可将 γ -氯乙酰乙酸酯由 S \rightarrow R, 得到 R- γ -氯- β -羟基丁酸^[27]。

表1 还原甲酰胺所得产物的光学纯度和构型

R基团	转化菌种	光学纯度 (e.e.%)	构型
CH ₃	<i>Candida humicola</i>	98.2	R
C ₂ H ₅	<i>Aspergillus petrakii</i>	91.1	R
CH(CH ₃) ₂	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	96.5	R
C ₆ H ₅	<i>Streptomyces griseus</i>	95.6	R
CH ₂ C ₆ H ₅	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	99	R

(四) 立体选择性酯交换反应

甘油三酯一般是用化学法通过氢化或酯交换得到。但这两种方法反应位点都不专一，而且有时会将顺式不饱和脂肪酸变为反式。Yokozeki 等报道从根霉 (*Rhizopus delemar*) 提取的酯酶，吸附于硅藻土上，再包埋于光交联树脂预聚物中，反应在正己烷中进行，可将甘油三酯在 1,3 位立体专一地进行了酯交换^[28]。

(五) 其它立体选择性反应

Hahets-Cruetzen 等发现，在含乙烯、丙烯或丁烯的培养物中培养的微生物细胞，产生 R 构型的 1,2-环氧丙烷和 1,2-环氧丁烷；而培养在含 3-氯丙烯的培养物中的细胞则产生 S 构型的 1-氯-2,3-环氧丙烷^[1,12]。Cameron 等 1986 年报道，他们在用 *Lostridium thermosaccharolyticum* 发酵糖生产乙醇、乳酸、丙酸、丁酸的研究中，发现终产物中含一定量的 R(-)-1,2-环氧丙二醇，转化率为 0.27 克/克葡萄糖，浓度为 7.9 克/升，光学纯度 99%^[30]。

日、美在用发酵法生产单一对映体化合物方面有不少报道。例如在含亮氨酸的培养基中培养的抗 α -氨基丁酸的沙雷氏菌属 (*Serratia*) 细胞在特定的培养基中，可发酵产生 β -甲基-L-正亮氨酸，产物浓度 2.8 克/升^[31]。乙酰乙酸酯经发酵 3 小时可产生 81% 的 3-(R)-羟基丁酸酯^[32]。苯基甘氨酸或 P-羟基苯基甘氨酸的 N-氨基甲酰胺衍生物的消旋物可被 *Agrobacterium* spp. 作用，产生 D-氨基酸^[32]。

近年来国内也有不少有关微生物酶产生光学活性物的研究报道。其中，利用啤酒酵母立体选择性还原，解决口服避孕药光学活性 18-甲基炔诺酮合成过程中所需手性结构的引入工艺已投产多年^[39]。黄益群等采用酶学方法，由苯甲酰甲酸产生苯乙醇酸，转化产物是单纯的 D-型光学活性物^[35]。马林等用固定化天冬氨酸酶生产 L-氨基酸^[38]。厉齐耀等报道，用枯草杆菌的乙内酰胺酶可将 DL-5-(羟基苯)乙内酰胺转化为 D-N-氨基甲酰对羟基苯甘氨酸，再经酸解反应成相应的 D(-)-对羟基苯甘氨酸^[36]。

综上所述，用微生物酶对化合物进行立体选择性转化生成所需要的构型，在医药、农药的工业生产中有广泛的应用前景。

参 考 文 献

1. Bryce M: *Nature*, 322(28): 776—777, 1986.
2. 王振铎译: 国外医药——合成药、生化药、制剂分册, 12(2): 80—84, 1991
3. 长谷川 淳三: 石油 & 微生物, 44(5): 482—493, 1986.
4. Goodhue G T and J R Schaeffer: *Biotechnol. Bioeng.*, 13: 203—214, 1971.
5. Miyoshi T and T Harada: *J. Ferment Technol.*, 52: 388, 1974.
6. Hasegawa J et al.: *J. Ferment Technol.*, 59: 203—208, 262, 1981.
7. Hasegawa J et al.: *J. Ferment Technol.*, 59(4): 257—262 1981.
8. Lehninger L A and G D Greville: *Biochimica et Biophysica Acta*, 12: 88, 1953.
9. Hasegawa J et al and G D Greville: al.: *J. Ferment Technol.*, 60(6): 501—508, 1982.
10. Hasegawa J et al.: *J. Ferment Technol.*, 61(1): 37—42, 1983.
11. Amster J and K Tanaka: *The Journal of Biological Chemistry*, 255(1): 119—120, 1980.
12. Peter S J C: *Enzyme Microb. Technol.*, 9: 194—213, 1987.
13. 古橋敬三: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 62(4): 772—774, 1988.
14. Omata T et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 199, 1981.
15. Jpn. kokai Tokkyo koho: JP81, 137, 891, 289CT, 1981.
16. C. A., 111: 230704x.
17. C. A., 110: 152836e.
18. C. A., 112: 117345p.
19. 日本发酵工程学会编, 张展元等译: 微生物工程的基础和应用, 轻工业出版社, 北京, 253—273, 1988.
20. C. A., 108: 185294p.
21. Koshiro S et al.: *Journal of Biotechnology*, 2: 47, 1985.

(下转第 264 页)

(上接第 308 页)

22. Jpn. Kokai Tokky Koho: JP82, 152894 21SEP, 1982.
23. Gowde P et al.: *J. Ferment Technol.*, 60: 579, 1982.
24. C. A., 110: 133727d.
25. Kraiove H: Proc. of FEVS Sywpos. of Microbiol. Products, 320—323, 1981.
26. Peter K M and H G W Leuenberger: *Appl. Microbiol.*, 22: 208, 1985.
27. C. A., 101: 166642q.
28. Yokozeki K et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol., Biotechnol.*, 14: 1—5, 1982.
29. 李祖义等: 生物工程学报, 6(4): 259—262, 1990。
30. Cameron C D and C. L. Cooney: *Bio-Technology*, 4 (JULY): 615, 1986.
31. C. A., 88: 150627r.
32. C. A., 111: 230711x.
33. Lanzilotta R P et al.: *Appl. Microbiol.*, 29(3): 427, 1975.
34. Lin Y Y and L L Smith: *Biochimica et Biophysica Acta*, 210: 319, 1970.
35. 黄益群等: 工业生化杂志, 第 1 期, p.29—30, 1991。
36. 厉齐耀等: 工业生化杂志, 第 3、4 期, p.92, 1991。
37. C. A., 110: 152834c.
38. 马林等: 工业生化杂志, 第 3、4 期, p.96, 1991。
39. 法幼华等: 微生物学报, 18(3): 232—238, 1978。