

# 有机相中脂肪酶催化作用的应用

宋欣 曲音波

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**关键词** 有机相, 脂肪酶, 工业应用

**分类号** Q556 **文献标识码** C **文章编号** 0253-2654(1990)-04-0296-04

近年来, 由于许多微生物酶在有机相中的催化反应具有高度的立体选择性和区域选择性这一新特性的发现, 使生物转化技术获得突破性进展, 成为国际上非常热门的一个研究领域, 尤以有机相中脂肪酶的研究最为活跃, 在有机溶剂中, 利用脂肪酶的催化作用已成功地进行了许多生物转化。

酶拆分的独特作用是由于它们由 L-氨基酸组成, 其活性中心构成了一个不对称环境, 有利于识别消旋体, 但适于拆分的酶应有广泛的底物选择性, 其中水解酶是较理想的酶类。脂肪酶(甘油酯水解酶, EC3.1.1.3)是专门在异相系统即在油-水的界面上起催化作用的酶, 它对均匀分散的或水溶性底物不起作用。基于脂肪酶的这种作用特点, 它成了人们最早研究的在有机相中能催化多种化学反应的酶类之一。脂肪酶在有机相

中可以完成酯化、交换酶化及转酯等反应, 具有区域选择性、立体选择性、较高的稳定性; 抑制了水参与的副反应; 酶本身不溶于有机溶剂, 易于回收和利用; 反应完毕后产物的分离纯化也比较容易, 尤其是它的立体选择催化特性, 可以完成用化学法难以进行的消旋化合物的拆分、不对称合成等, 使这一古老的酶种有着崭新而广阔的发展前景。本文主要对近年来脂肪酶在有机相中催化反应的应用作一简要介绍。

## 1 在医药工业中的应用

对手性药物而言, 通常并非两种异构体都具有相同的活性。例如, “心得安”的(S)-(-)异构体的疗效是(R)-(+)-异构体的100倍。又如反应停(Thalidomide)是

1998-04-06收稿, 1998-06-22修回

一种外消旋的手性药物,其(R)-异构体具有镇静作用,而(S)-异构体则具致畸作用,惨痛的教训使人们认识到对手性药物的立体异构体必须分别进行考察,慎重对待,也促进与手性技术有关的研究的蓬勃发展.制备光学纯药物的潜在优点在于扩大用药安全范围、提高治疗指数、改进制剂质量、减少并发症以及寻找新的适应症.其中研究最多的一类手性药物是2-芳基丙酸类药物.

**1.1 2-芳基丙酸类药物的拆分** 2-芳基丙酸类药物(2-APA)属非甾体抗炎药(NSAID),主要有布洛芬和萘普生两种,是解热镇痛、消炎抗风湿的基本药物和主要产品.其 $\alpha$ 位含有一个手性碳原子,存在一对光学对映体S(+)-和R(-)-构型,前者具有高的生理活性,后者活性低或无活性.如在抑制前列腺素合成方面,S-型对映体比R-型对映体活性大160倍.

近年来,国内外已有不少关于利用脂肪酶拆分消旋布洛芬的报道. Annikka 等<sup>[1]</sup>及 Gun 等<sup>[2]</sup>利用 *Candida cylindracea* 脂肪酶(CCL)在有机溶剂系统中成功地对消旋布洛芬进行了对映体选择酯化反应,合成了S(+)-布洛芬.在国内,徐诗伟等人有许多关于拆分外消旋布洛芬的报道,并已经开始中试.

**1.2 合成其他的手性药物中间体** 有3大类重要手性药物的中间体可以用脂肪酶催化的反应得到,这3类药物包括(1)抗癌药;(2)凝血恶烷 $A_2$  颞颞物,用于治疗心血管疾病;(3)治疗高血压的药物.紫杉醇(taxol)是一种多环的二萜烯,一种抗有丝分裂剂,是唯一的一种具有促进微管装配和抑制微管蛋白分解的复合物,已经用紫杉醇生成了许多种类的抗癌药.最近,紫杉醇的侧链前体已经通过脂肪酶催化的甲基-反- $\beta$ -葡萄糖酸的酯化反应制备成功,并且利用脂肪酶催化的对映体选择酯化反应还成功地合成了凝血恶烷 $A_2$  颞颞物和抗高血压药物 captopril 和 zofenopril 的关键性中间体<sup>[3]</sup>.

## 2 在农用化学品工业中的应用

天然存在的杀虫剂全部为手性,而人工合成的大多数是以消旋体的形式出售.随着酶学研究的的发展和与手性技术有关的研究的蓬勃发展,使人们认识到制备单一对映体的手性农药也成为一种必然.酶法拆分在这一领域中的价值也在已报道的研究成果中得到了体现.

**2.1 环氧类昆虫信息素的形成** 在经典的有机合成

中,对二酯进行区域选择性水解,使之成为单酯,尤其是要制备有光学活性的单酯,非常困难.但在脂肪酶等水解酶的作用下,上述转化则很容易实现. Brevet 等<sup>[4]</sup>利用脂肪酶具有区域选择性这一特性,合成了环氧类昆虫信息素的重要中间体.利用2-丁烯-1,4-二醇为原料,先制得环氧二酯,然后在含30%异丙醚的磷酸缓冲液中,在猪胰脂酶(PPL)的催化下,环氧二酯进行区域选择性水解生成光学活性单酯,对映体过量(ee%)达到91%.

**2.2 三唑类杀真菌剂的拆分** 对于能够抑制麦角固醇合成的三唑类杀真菌剂来说,其立体异构性的研究也是近年来引起广泛兴趣的一个课题. Daniele 等<sup>[5]</sup>曾研究了水解反应和酯交换反应在拆分三唑类杀菌剂的前体时得到的不同结果.本文对在水溶液中的反应不予讨论,仅仅对在有机溶剂中发生的反应感兴趣.在有机溶剂乙酸乙酯中,(±)-三唑醇在猪胰脂肪酶的催化下,进行了酯交换反应,经分离后得到的是S-型三唑醇,产物的ee%在95%以上.

**2.3 合成杀虫剂拟除虫菊酯及其重要中间体-氧醇** 液-液两相系统中的脂肪酶水解作用以及有机相中的脂肪酶转酯反应已经成功地立体选择性地合成了拟除虫菊酯<sup>[6-9]</sup>.而S-型的氧醇才是合成拟除虫菊酯的重要中间体. Inagaki 等<sup>[10]</sup>将酶催化的酯交换反应与外消旋化反应有机地结合在一起,提出“酶催化的二级不对称化”,使绝对对映体的产率不高的问题得到解决.在无水分异丙醚中进行的反应所生成的单一产物S-型氧醇乙酸酯的ee%可达80%~90%,产率可达70%~96%.

**2.4 合成保幼激素类似物** 昆虫的保幼激素作为一种叫做昆虫生长调节因子的高效选择性杀虫剂,日益引起人们的重视.使用保幼激素可以控制各种各样的害虫,不仅对公众健康有益,对农业和贮藏产品也极有益处. Kanji 等<sup>[11]</sup>利用微生物脂肪酶及猪胰脂肪酶,以4-苯氧基苯氧基内基乙酸为原料,制备了保幼激素类似物.

## 3 在油脂工业中的应用

**3.1 油脂改良** 随着有机相中酶学研究的不断发展,脂肪酶在油脂加工中的应用已从油脂水解扩展到酯合成和酯交换.利用酯交换反应,可以把廉价的油脂改良成具有特殊功能性质的高品位油脂;与利用钠和甲醇钠为催化剂所催化的油脂的酯交换反应相比,脂肪酶

具有催化活性高,反应条件温和,选择性强,产物易于分离、易于回收等优点。棕榈油是当今世界产量第二的植物油,其产量稳定,价格便宜,但品位较低,主要用作油炸食品用油。其中熔点物POMF的主要成分是1,3-二棕榈酰-2-油酰甘油酯(POP),尹顺义等<sup>[12]</sup>利用来源于米赫毛霉(*Mucor miehei*)并固定于大孔径阴离子交换树脂上的脂肪酶,选择性地催化棕榈油熔点物POMF的1-位和3-位酰基与硬脂酸进行酯交换反应,可把POMF改良成与可可脂相似的油脂,提高了POMF的品位,成为工业生产中可可脂的代用品。

Matsushima等<sup>[13]</sup>用单甲氧基聚乙二醇修饰的脂肪酶催化牛油、猪油和羊油等分别同橄榄油间的酯交换反应,使它们的熔点降低。用脂肪酶催化人造奶油与不饱和脂肪酸之间的酯交换反应,能够使人造奶油熔点降低,改良了人造奶油的质量。

**3.2 生产含多不饱和脂肪酸的油脂** 脂肪酶也被广泛用于富含花生四烯酸、廿碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)等多价不饱和脂肪酸的油脂的改良。例如鱼油,其主要成分是由大量n-3系高度不饱和脂肪酸(n-3 PUFA)组成的甘油三酯。n-3 PUFA具有预防循环系统疾病和提高智力等生理功能。因此,对鱼油进行加工改良,制备保健性食品和医药的研究方兴未艾。国外已有报道用脂肪酶在微水介质中进行酯交换和酯化反应,得到富含EPA、DHA等n-3系多价不饱和脂肪酸的甘油三酯<sup>[14,15]</sup>。

#### 4 在酿造工业中的应用

脂肪酶在有机相中能够保持高稳定性和高活性的性质被报道后,有关脂肪酶的工业应用研究大大增加了,其中一个极具吸引力的领域是在工业中利用脂肪酶来增加浓香型曲酒的风味。我国是一个白酒消耗量极大的国家,而在白酒的生产中,浓香型酒产量名列前茅,生产厂家遍布全国。浓香型酒所含香酯以己酸乙酯、乳酸乙酯、乙酸乙酯和丁酸乙酯为主,主体香成分是己酸乙酯,它的含量高低及与其他三种香酯的比例直接影响着曲酒的风味和质量,是生产优质率高低的主要因素,因此如何提高白酒中己酸乙酯的含量成为酿酒工业中一大重要课题<sup>[16]</sup>。近年来,利用脂肪酶的酯化特性来合成香酯的研究已有不少报道。卢世珩等<sup>[17]</sup>将一株根霉(*Rhizopus*)应用在大曲浓香型白酒的发酵过程中,其产生的脂肪酶具有合成己酸乙酯的较强的

酯化活性,使浓香型白酒的质量有了改进,己酸乙酯含量有了明显提高,酒的口感有了较大改善。吴衍庸等报道<sup>[18~19]</sup>,浓香型曲酒中各种芳香酯类的形成与微生物脂肪酶的作用有关,他们发现红曲霉、根霉中许多菌株具有较强的乙酸乙酯合成能力。另外,国内有许多报道,在食醋和酱油的酿造中可以利用脂肪酶催化产生的酯类来增进香味。

#### 5 其他

脂肪酶在有机相中的催化反应,除了以上列举的几大方面的应用,它们还能够拆分外消旋醇、外消旋酸等来制备药物、农药、液晶以及化妆品等的重要原料,例如手性2-辛醇是制造液晶的重要手性中间体,同时也是合成光学活性药物和农药的重要原料,生产手性2-辛醇是国家“九五”攻关的重要课题,即将投入大批量生产。另外,在有机溶剂中,脂肪酶能够制备光学活性内酯并具有合成脂肪胺及多肽的功能,能够合成多肽是由于脂肪酶没有酰胺酶的活性,使得肽的水解被抑制,而对寡肽合成十分有利。

#### 6 小结

脂肪酶在非水体系中反应的研究,在国外已经取得了突破性的进展。脂肪酶在有机合成中的应用已深入到工业生产的众多领域,在国内,脂肪酶在非水介质中的酶促反应,也成为近年来的研究热点,并取得了一些可喜的成果,但是有机溶剂中的酶促反应机理仍然仅仅局限于非水体系中微环境(如必需水、pH值、载体)对酶的活性及选择性的影响关于有机相中酶与底物是如何作用的,酶的构象是如何变化的,都未曾有人进行过系统的研究,必将是今后研究的一个主要方向。因而,对脂肪酶在非水介质中的反应进行更加深入的研究,不仅具有重大的理论意义,而且对于推广和开发脂肪酶的新用途,也具有极大的实际意义。

随着酶学研究的进展,脂肪酶的催化特性必将得到进一步阐明,其在各行各业中的作用也必将得到最大发挥。

#### 参 考 文 献

- [1] Annikka M. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 38: 61~66.
- [2] Gun H, Maria B, Peter J S. Biotechnol Bioeng, 1993, 42: 618~624.
- [3] Ramesh N P, Amit B, Laszlo J S. J Am oil Chem

- Soc, 1996,73(11):1363~1375.
- [4] Brevet J L, Mori K. Synthesis, 1992,10:1007.
- [5] Daniele B, Pietro C, Paolo G *et al.* Pure Appl Chem, 1992,64(8):1073~1078.
- [6] Mitsuda S, Umemura T, Hirohara H. Appl Microbiol Biotechnol, 1988,29:310~315
- [7] Mitsuda S, Nabeshima S, Hirohara H. Appl Microbiol Biotechnol, 1989,31:334~337.
- [8] Umemura T, Hirohara H. In:Whitaker J R, Sonnet P E, Eds Biocatalysis in Agricultural Biotechnology. ACS Symp. Ser. 389 Am Chem Soc, Washington, DC, 1989,371~384.
- [9] Mitsuda S, Yamamoto H, Umemura T *et al.* Agric Biol Chem, 1990,54:2907~2912.
- [10] Inagaki M, Hiratake J. J Am Chem Soc, 1991,113(24): 9360
- [11] Kanji N, Yasutaka O, Nontada M *et al.* Enzyme Microb Technol,1997,20:333~339.
- [12] 尹顺义,宗敏华,刘耘等.食品与发酵工业,1995,2:17~21
- [13] Matsushima A, Kodera Y, Takahashi K *et al.* Biotech Lett, 1986, 8:73.
- [14] Gerald P M, Robert G A, Stephen R M. J Am Oil Chem Soc, 1996,73:1403~1407.
- [15] Stephen R M, Gerald P M. J Am Oil Chem Soc, 1996,73:1409~1414.
- [16] 胡晓,张洪渊,陈周平等.酿酒科技,1997,5:15~17.
- [17] 卢世珩,陈昭容,徐春玲等.酿酒,1997,5:7~8.
- [18] 吴衍庸,郭世则,卢世珩等.食品与发酵工业,1990,5:1~3.
- [19] 刘光焯,卢世珩,黄德英等.生物工程学报,1995,11(3): 288~290.