

生物酶法制备光学纯 β -苯丙氨酸的研究

李登超^{1,2}, 魏东芝²

(1. 淮阴师范学院生物系, 江苏 淮安 223300; 2 华东理工大学生物反应器国家重点实验室, 鲁华生物技术研究, 上海 200237)

摘要: 利用工业来源的固定化青霉素酰化酶在不同 pH 条件下具有的对映体选择性酰化和水解反应特性制备光学纯 (*S*)- β -苯丙氨酸 (BPA) 和 (*R*)-BPA。在酰化过程中 (pH 10) 只有 (*R*)-BPA 被酰化为苯乙酰-(*R*)-BPA, 而 (*S*)-BPA 不被酰化留在水相, 然后利用苯乙酰-(*R*)-BPA 和 (*S*)-BPA 的溶解性差异将二者分离可直接得到 (*S*)-BPA, 分离的苯乙酰-(*R*)-BPA 再经 PGA 水解 (pH 7.5) 可得到 (*R*)-BPA, 从而制备了 BPA 的 2 种对映体。得到的 *N*-苯乙酰-(*R*)-BPA 的对映体过量值 (e. e. %) 为 99%; (*S*)-BPA 和 (*R*)-BPA 的 e. e. % 分别为 98% 和 99%。

关键词: 青霉素酰化酶; 酰化; β -苯丙氨酸; 对映体过量值

中图分类号: TQ464.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2009)06-0044-03

Enzymatic preparation of optically pure (*S*)- β -phenylalanine and (*R*)- β -phenylalanine

LI Deng-chao^{1,2}, WEI Dong-zhi²

(1. Department of Biology, Huaiyin Teacher's College, Huai'an 223300, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: A new technique for preparation of optically pure (*S*)- β -phenylalanine (*S*-BPA) and (*R*)-BPA is proposed based on the enantioselective acylation and hydrolytic properties of penicillin G acylase at different pH conditions. (*R*)-BPA is acylated into *N*-phenylacetyl-(*R*)-BPA, while (*S*)-BPA can not be acylated at pH = 10, and thereof the two compounds can be separated by their different water solubility directly. The separated *N*-phenylacetyl-(*R*)-BPA can be further hydrolyzed into (*R*)-BPA by the same enzyme at pH = 7.5. The enantiomeric excess (e. e. %) of *N*-phenylacetyl-(*R*)-BPA is 99%, and of (*S*)-BPA and (*R*)-BPA, 98% and 99%, respectively.

Key words: penicillin G acylase; acylation; β -phenylalanine; enantiomeric excess

含 β -氨基酸尤其是光学纯 β -氨基酸结构的化合物往往是新药开发的母体结构^[1]。 β -苯丙氨酸 (BPA) 具有重要的生物和医学用途, 如酶抑制剂^[2]和 β -抗生素^[3], 抗癌药物紫杉醇的侧链是羟基化的 BPA 衍生物, 侧链对紫杉醇类发挥抗癌作用是不可缺少的^[4]。用生物法来代替化学法制备光学纯的 BPA 及其衍生物的研究备受青睐。青霉素酰化酶 (PGA, E. C. 3. 5. 1. 11) 是在青霉素 G 钾盐裂解成 6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 和侧链羧酸过程中起关键作用的酶, 该酶在工业上应用其水解酶特性水解青霉素 G 制备 6-APA, 而且 PGA 还具有酰化酶的活性^[5-9]。PGA 能专一性的水解苯乙酰-BPA 制备光学活性的 BPA, 但整个反应涉及到两步化学反应^[10]。笔者提出用 PGA 专一性地酰化一种对映体, 而另一对映体形式不被酰化, 通过进一步分离纯化得到 2 种不同光学活性的 BPA, 则整条路线只用一种酶进行催化, 避免了化学反应, 而且操作简单。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

Zorbax XDB-C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), Agilent; Chirobiotic T 手性柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), ASTEC; Chirobiotic R 手性柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), ASTEC; 0.45 μ m 水相和有机过滤膜, 上海源聚生物科技有限公司; 001 \times 7(732) 阳离子交换树脂, 上海华震科技有限公司。 β -苯丙氨酸标准品, Sigma 公司; β -苯丙氨酸, *N*-苯乙酰-BPA, 为实验室自行合成; 其他试剂均为市售分析纯。Agilent 1100 series 高效液相色谱仪; XT4A 控温型显微熔点仪; WZZ-1S 数字式自动旋光仪。

1.2 实验步骤

合成路线见图 1。BPA 的合成采用标准的 Rodionow 反应^[10], *N*-苯乙酰-BPA 的合成参照 Cardillo 方法^[11], BPA 和 *N*-苯乙酰-BPA 的收率分别为

收稿日期: 2009-04-02

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-04-0411)

作者简介: 李登超 (1976-), 男, 博士, 讲师, 主要从事生物化工领域的研究, 0517-83535992, deli@hytc.edu.cn。

74%和70%,熔点分别为216~218℃和136~138℃。

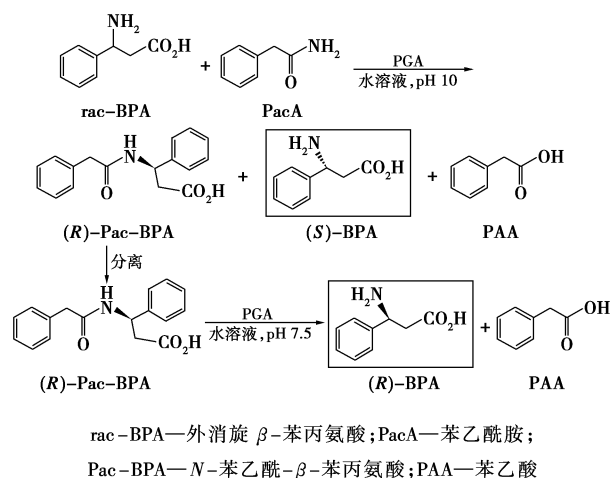


图1 青霉素酰化酶酰化制备光学纯 β -苯丙氨酸

PGA酰化BPA的反应在搅拌式反应器中进行,控制温度和pH,磁力搅拌。含BPA和苯乙酰胺的溶液总体积30 mL,加入固定化酶后反应开始计时。在不同的反应时间取100 μ L加入900 μ L流动相稀释样品和终止酶反应。样品经过适当稀释和0.45 μ m滤膜过滤后进行高效液相色谱(HPLC)分析。在高底物浓度反应体系时,取2份样品,一份样品通过过滤分离固体,另一份样品用于测定整个反应混合物。

当反应达最大转化率时,终止反应,过滤除去固定化酶,滴加2.0 mol/L盐酸调节反应液的pH至2.0左右,加入乙酸乙酯(20 mL \times 3)加热萃取*N*-苯乙酰-(*R*)-BPA、副产物苯乙酸和少量剩余的酰基供体,而另一产物(*S*)-BPA和少量的苯乙酰胺则留在水相中。合并乙酸乙酯萃取液,无水 Na_2SO_4 干燥,旋蒸除去溶剂,用环己烷洗旋蒸的残余物以除去苯乙酸和苯乙酰胺,用乙酸乙酯/正己烷结晶得*N*-苯乙酰-(*R*)-BPA。

水相溶液浓缩过001 \times 7(732)阳离子交换树脂进一步纯化,用0.1 mol/L氨水洗脱,收集穿出峰,合并穿出液,旋转蒸发浓缩,用乙醇结晶,即得到产物(*S*)-BPA。

将得到的*N*-苯乙酰-(*R*)-BPA在25℃,pH 7.5条件下用PGA酰化酶催化至完全水解,过滤除去酶,反应液滴加2.0 mol/L盐酸调节反应液的pH至

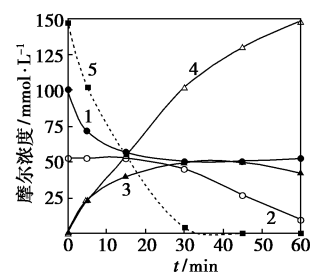
2.0左右,加入乙酸乙酯(15 mL \times 3)萃取苯乙酸,采用与上述同样的方法处理水相,即得产物(*R*)-BPA。测量产物的熔点、比旋光度,计算光学纯度。

反应过程中反应液各组成的含量通过装有XDB-C18柱的Agilent 1100系列HPLC分析;*N*-苯乙酰-BPA的对映体含量通过装有Chirobiotic T手性柱的Shimadzu LC-10Avp HPLC分析;BPA的对映体含量分析通过装有Chirobiotic R手性柱的Shimadzu LC-10Avp HPLC分析。

2 结果与讨论

2.1 酶法酰化制备光学纯 β -苯丙氨酸的过程

笔者前期工作对酰化制备光学纯BPA的工艺条件进行了优化并确定了最佳条件为pH 10、25℃、100 mmol/L BPA、200 mmol/L苯乙酰胺、8 IU/mL酶浓度^[12]。在此优化条件下,PGA酰化BPA的过程曲线如图2所示。苯乙酰胺的溶解度比较低,在反应起始以溶解的和溶解的两种形式存在(超饱和悬浊液),随着反应的进行,苯乙酰胺逐渐地被消耗,一部分形成产物*N*-苯乙酰-BPA;一部分被PGA水解产生副产物苯乙酸。结果发现,反应30 min后,苯乙酰胺以完全溶解的形式存在。



1—BPA;2—PacA;3—*N*-Pac-BPA;4—PAA;5—固体PacA

图2 酶法酰化 β -苯丙氨酸的过程曲线

PGA酰化(*R*)-BPA形成的*N*-苯乙酰-(*R*)-BPA与BPA的减少基本符合,说明在pH 10的反应体系中,产物基本以可溶形式存在。当反应进行45 min时,转化率达最大(近50%),随后产物*N*-苯乙酰-(*R*)-BPA逐渐被水解。PAA浓度随着反应的进程一直增加。由此可以推断,在反应前期由于有酰基供体苯乙酰胺的存在,PGA主要表现为酰化合成*N*-苯乙酰-(*R*)-BPA和水解苯乙酰胺,而后期酰基

(上接第43页)

- [7] Ogura M, Shinomiya S, Tateno J K, *et al.* Formation of uniform mesopores in ZSM-5 zeolite through treatment in alkaline solution[J]. Chem Lett, 2000, 8: 882 - 883.
- [8] Ogura M, Shinomiya S, Tateno J. Alkalitreatment technique: New method

for modification of structural and acid-catalytic properties of ZSM-5 zeolites[J]. Appl Catal A: Gen, 2001, 219: 33 - 43.

- [9] Groen J C, Jansen J C, Moulijn J A, *et al.* Optimal aluminum-assisted mesoporosity development in MFI zeolites by desilication[J]. J Phys B, 2004, 108: 13062 - 13065. ■

供体基本消耗完毕,此时 PGA 主要表现以水解 *N*-苯乙酰-(*R*)-BPA 为主。文献报道 PGA 水解 *N*-苯乙酰-BPA 制备(*R*)-BPA 反应过程需 5 h^[10];脂肪酶水解 BPA 乙酯制备光学纯需 15 h^[13];氨基酰化酶酰化制备光学纯 BPA 需 48 h^[14]。可见采用 PGA 酰化反应具有高的反应速率。

2.2 产物的检测与分离

2.2.1 HPLC 分离检测 4 种物质

采用安捷伦 Zorbax XDB-C18 柱,洗脱条件:流动相为含 35% (体积分数)乙腈的 7 mmol/L pH 3.0 磷酸缓冲液(含 SDS 0.68 g/L),流速为 1.0 mL/min,柱温 30℃,检测波长为 210 nm。苯乙酰胺、苯乙酸、*N*-苯乙酰-BPA、BPA 可在 12 min 内完全分离,出峰时间分别为 3.2、5.2、7.6、10.7 min,分离度均大于 1.5。

2.2.2 光学纯 β -苯丙氨酸的分离纯化

苯乙酰胺、苯乙酰-(*R*)-BPA、苯乙酸和 BPA 4 种物质,其中前 3 种物质易溶于有机溶剂,而 BPA 不溶于有机溶剂。反应结束后反应液用乙酸乙酯进行萃取,将苯乙酰胺、苯乙酰-(*R*)-BPA、苯乙酸完全萃取到有机相中,而未反应的(*S*)-苯丙氨酸则留在水相。然后用阳离子交换树脂对水相溶液脱盐,旋蒸、结晶、干燥等步骤,得到光学纯的(*S*)-BPA。有机相经过浓缩、去杂、结晶得到苯乙酰-(*R*)-BPA;将苯乙酰-(*R*)-BPA 再通过酶法水解,采用相同的实验步骤得到(*R*)-BPA。所得产品的熔点和比旋光度与文献报道基本一致,而收率与同类文献[10]相比有很大提高(见表 1)。

表 1 物质的熔点和比旋光度

物质	熔点/℃	比旋光度 $[\alpha]_d^{20}$	收率/%
(<i>S</i>)-BPA	221 ~ 223	-6.3(1,水)	71
<i>N</i> -苯乙酰-(<i>R</i>)-BPA	128 ~ 130	+64.5(1,乙醇)	81
(<i>R</i>)-BPA	222 ~ 224	+6.5(1,水)	60

2.2.3 产物光学纯度

采用 Chirobiotic T 柱通过 HPLC 分离检测消旋的 *N*-苯乙酰-BPA,其中(*S*)-型对映体比(*R*)-型对映体先被洗脱。然后将反应液分离以后有机相结晶得到的 *N*-苯乙酰-(*R*)-BPA 在同样的条件检测。结果显示,反应液分离得到的苯乙酰化的产物只对应其中一种对映体,与消旋体中 *N*-苯乙酰-(*R*)-BPA 出峰时间一致,e.e.% 值为 99%。同样的方法鉴定 BPA 的纯度,结果表明(*S*)-BPA 和(*R*)-BPA

的 e.e.% 分别为 98% 和 99%。

3 结语

利用 PGA 在不同 pH 条件下具有的对映体选择性酰化反应及水解反应的特性,建立了酶法酰化制备光学纯 β -苯丙氨酸的工艺路线。经手性柱检测(*S*)-BPA 和(*R*)-BPA 的 e.e.% 分别为 98% 和 99%。该法具有制备工艺简单、反应条件温和、反应速度快、立体选择性强等特点,具有工业化前景。

参考文献

- [1] Spiteller P. β -Amino acids in natural products[M]//Enantioselective synthesis of β -amino acids. Juaristi E, Soloshonok V A (Eds). 2nd edition. New York: John Wiley, 2005.
- [2] Achilles K, Schirmeister T, Otto H H. β -Lactam derivatives as enzyme inhibitors: 1-Peptidyl derivatives of 4-phenylazetid-2-one as inhibitors of elastase and papain[J]. Arch Pharm Pharm Med Chem, 2000, 333: 243 - 253.
- [3] Nagano Y, Ikedo K, Fujishima A, et al. Pyloricidins, novel anti-*Helicobacter pylori* antibiotics produced by *Bacillus sp.* [J]. J Antibiot, 2001, 54: 934 - 947.
- [4] Kingston D G I. Taxol, a molecular for all seasons[J]. Chem Commun, 2001, 20: 867 - 880.
- [5] Shewale J G, Deshpands B S, Sudhakaran V K, et al. Penicillin acylase: Applications and potentials[J]. Process Biochem, 1992, 27: 131 - 143.
- [6] Cole M. Deacylation of apcylamino compounds other than penicillins by cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli* [J]. Biochem J, 1969, 115: 741 - 746.
- [7] Zmijewski M J, Briggs B S, Thompson A R, et al. Enantioselective acylation of a beta-lactam intermediate in the synthesis of loracarbef using penicillin G amidase[J]. Tetrahedron Lett, 1991, 32: 1621 - 1622.
- [8] Guranda D T, Khimiuk A I, van Langen L M, et al. An 'easy-on, easy-off' protecting group for the enzymatic resolution of (\pm)-1-phenylamine in an aqueous medium[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15: 2901 - 2906.
- [9] Carboni C, Kierkels H G T, Gardossi L, et al. Preparation of *d*-amino acids by enzymatic kinetic resolution using a mutant of penicillin-G acylase from *E. coli* [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2006, 17: 245 - 251.
- [10] Soloshonok V A, Fokina N A, Rybakova A V, et al. Biocatalytic approach to enantiomerically pure β -amino acids[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1995, 6: 1601 - 1610.
- [11] Cardillo G, Gentilucci L. A stereoselective synthesis of (2*R*,3*S*)-*N*-benzoylphenylisoserine methyl ester[J]. J Org Chem, 1998, 63: 2351 - 2353.
- [12] Li D C, Cheng S W, Wei D Z, et al. Production of enantiomerically pure (*S*)- β -phenylalanine and (*R*)- β -phenylalanine by penicillin G acylase from *Escherichia coli* in aqueous medium[J]. Biotechnol Lett, 2007, 29: 1825 - 1830.
- [13] Faulconbridge S J, Holt K E, Sevillano L G, et al. Preparation of enantiomerically enriched aromatic β -amino acids via enzymatic resolution [J]. Tetrahedron Lett, 2000, 41: 2679 - 2681.
- [14] Groeger H, Trauthwein H, Buchholz S, et al. The first aminoacylase-catalyzed enantioselective synthesis of aromatic β -amino acids [J]. Org Biomol Chem, 2004, 2: 1977 - 1978. ■