

酶催化手性拆分旋光异构体

蒋南 胡学铮 夏咏梅 方云

(江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 将酶催化拆分反应的国内外新进展归纳为水解反应、氧化-还原反应、转移-裂合反应以及非水介质中的合成反应等类型, 并列举了其中一些具有重要理论意义或应用价值的实例。探讨了介质工程、预处理酶及添加剂等因素对映体选择性和产率的影响。指出酶催化手性拆分在不对称合成领域的发展方向将是新的适用反应类型的开发、酶的固定化及重复利用技术, 以及大规模制备手性产品的专用反应器的设计等。

关键词: 酶催化; 手性拆分; 对映体; 旋光异构体

中图分类号: TQ032; O641.6; Q55

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2003)12-0024-04

Chiral resolution of optical isomers by enzyme catalytic reaction

JIANG Nan, HU Xue-Zheng, XIA Yong-Mei, FANG Yun

(School of Chemical & Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The latest progress in enzymatic resolution was introduced and its methods of enzymatic resolution were classified into hydrolyzation, oxidation and reduction, group transfer and lyase-catalysed reactions, and synthesis in non-aqueous media. Some examples valuable in either foundation or application were also cited. The factors such as solvent engineering, disposing of enzyme, additives and so on that can possibly enhance the selectivity and yield of enantiomers were discussed. The R&D of enzymatic resolution would be significant for the development of the new types of reaction, immobilization and reuse of enzyme and designing of specific reaction instruments for mass preparation of chiral products.

Key words: enzyme catalysis; chiral resolution; enantiomer, optical isomer

由于对映体间的生物活性可能存在量到质的区别甚至完全相反, 因而手性产品在医药、农药、兽药、食品添加剂、香精香料以及手性聚合物材料等行业中的需求日益增大^[1]。生物催化手性拆分是以酶或微生物选择性催化外消旋底物中某个对映体优先反应, 再利用其与未反应对映体的物理化学性能差异达到拆分目的。生物催化拆分反应操作简便, 选择性强, 因而生物催化手性拆分有利于较大规模地制备手性产品, 近年来已利用其成功地制备了许多手性药物^[2], 但目前文献中关于生物催化手性拆分的总结归纳较为少见^[3]。

1 酶催化拆分的常见反应类型

1.1 不对称水解反应

水解酶的结构简单、来源丰富、无须辅酶且许多已商品化, 故成为目前酶催化手性拆分中用得最多的生物催化剂。X 射线衍射结果表明^[4], 脂肪酶的

空穴结构可以辨别不同对映体, 其催化的拆分反应主要为水解、酯化和转酯, 如 Moreno 等^[2]利用固定化脂肪酶 *Candida cylindracea* lipase (CCL) 催化萘普生乙酯不对称水解得到 95% 的 (S)-萘普生。某些水解酶甚至可以催化环氧化物、腈、酰胺的水解。

1.1.1 环氧化物水解

环氧化物水解酶能催化环氧化物进行不对称水解, 与一般酶催化不对称合成反应相比, 该类酶以水代替缓冲液作溶剂简化了下游处理过程, 因而被誉为“绿色化学”方法。大量研究结果表明^[5], 微生物来源的酶, 其对映体选择性与底物的取代结构有关, 如酵母细胞中红酵母属 (*Rhodotorula*) 可催化拆分脂肪族单取代环氧乙烷, 真菌细胞中曲霉属 (*Aspergillus*) 则选择催化芳香环或杂环单取代环氧乙烷, 细菌特别是放线菌 (*Actinomycete*) 适用于制备 2,2-和 2,3-二取代环氧乙烷。例如手性吡啶型环氧乙烷(1)是制备一些手性阻断剂的关键中间体, 反

收稿日期: 2003-07-09; 修回日期: 2003-10-14

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BJ99036) 资助项目

作者简介: 蒋南 (1979-) 女, 硕士生; 方云 (1957-) 男, 硕士, 教授, 博导, 主要从事酶催化和胶体与界面科学的研究, 通讯联系人, 0510-5865424, fangyunzhou@hotmail.com。

应用中使用的环氧化物水解酶来源于丝状菌(*filamentous fungi*)的黑曲霉(*Aspergillus niger*),得到2种手性环氧化物,对映体过量 $\geq 98\%$ (见图1)^[6]。

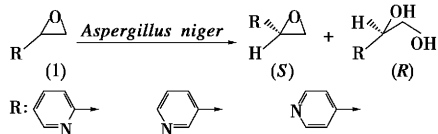


图1 酶催化环氧化物水解反应拆分吡啶型环氧乙烷

1.1.2 脞水解

脞水解酶无须辅酶,催化氰基直接水解成羧基,而脞水合酶具有紧密结合的金属离子(Co或Fe)作为辅酶,首先催化氰基生成相应的酰胺,再经过酰胺酶或蛋白酶催化水解为羧基。(R)- α -氟苯乙酸(2)^[7]可以由动力学拆分 α -氟苯乙脞得到。源于*A. Thaliens*的脞水解酶没有按照一般的途径直接将氰基转化为羧酸,而是像脞水合酶一样经过酰胺再到羧酸。(R)-异构体的氰基水解为羧酸,而(S)-异构体不发生反应,因而可达到拆分目的(见图2),对(S)-异构体进行二次拆分可提高原料转化率^[8]。

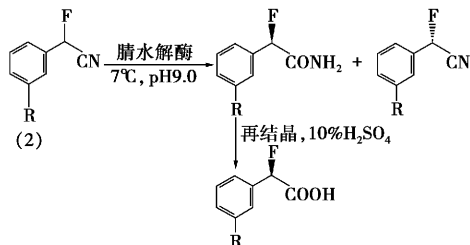


图2 酶催化脞水解反应拆分氟苯乙脞

1.1.3 酰胺水解

氨基酰化酶能选择性催化酰基氨基酸的酰胺键水解,制备D-氨基酸^[9]。目前利用海因酶生产D-对羟基苯甘氨酸已达相当生产规模。

1.2 氧化-还原反应

1.2.1 氧化反应

酶催化氧化反应手性拆分比传统化学氧化法具有更高的对映体选择性,通常在外消旋环酮的某个对映体的碳环里插入氧分子形成内酯,而另一个对映体不发生氧化反应。图3为选择性氧化仲醇(3)而得到甲基酮和手性仲醇的实例^[10],手性醇是合成一些仿生产品以及药物的中间体。

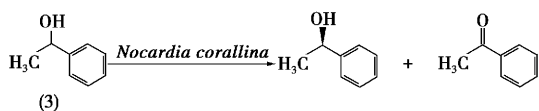


图3 酶催化氧化反应拆分仲醇

1.2.2 还原反应

脱氢酶可以催化醛或酮不对称还原。海生草苔虫*bugula neritia* (Linnaeus)和苔藓类植物*Amathia convoluta*中的提取物具有抗肿瘤疗效,可以治疗淋巴白血病和卵巢癌,经研究其有效成分是一个大环内酯。仿生合成这一大环内酯的关键步骤在于拆分外消旋体(4)(见图4),采用源于*Lactobacillus kefir*的乳杆菌属醇脱氢酶,并用聚乙二醇(PEG)作为载体,可以提高产物的纯度和产率^[11]。

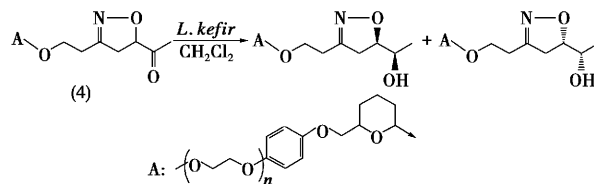


图4 酶催化还原反应拆分酮

手性氢过氧化物及其衍生物是近年来不对称合成具有氧化能力的化合物的重要中间体^[12]。Adam等^[13]用从土壤中分离得到的2种微生物细胞催化不对称还原氢过氧化物(5),克服了酶催化反应需要使用大量的纯化酶,且需要辅酶的缺点(见图5)。

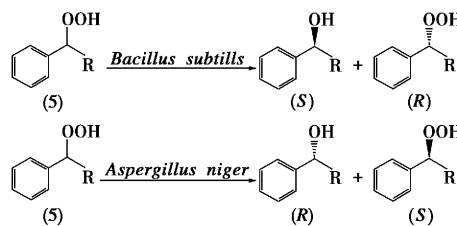
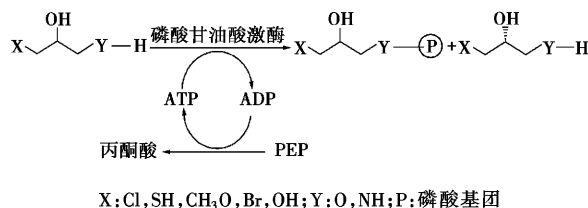


图5 酶催化拆分氢过氧化物

1.3 转移-裂合反应

转移酶和裂合酶能催化C—C、C—N、C—O以及C=C、C=O等化学键的生成和裂解反应。磷酸甘油酸激酶的用途是催化天然底物甘油磷酸化,它也可以催化仲醇羟基磷酸化,用于外消旋仲醇的拆分^[14](见图6)。Persson等比较了溶剂、水活度对裂合酶和脂肪酶催化拆分反应的影响,结果表明体系含水量增加,裂合酶催化拆分反应的对映体选择性增加,而脂肪酶催化反应则相反。溶剂极性对裂合酶催化反应影响不大,众所周知,溶剂极性对脂肪酶催化反应则有很大的影响^[15]。



X: Cl, SH, CH₃O, Br, OH; Y: O, NH; P: 磷酸基团

图6 酶催化转移反应

1.4 非水介质合成反应

1.4.1 酯合成反应

利用生物催化的酰基转移反应替代直接酯化反应拆分手性醇类旋光异构体,可避免副产物水的影响,常用酰基供体主要有羧酸乙烯酯、异丙烯酯、脲酯或酸酐等。脲酯有较高的反应速率^[16]且反应副产物不再参与后继反应,酸酐可使反应不可逆。研究表明,用脂肪酶催化时,一般说来是(*R*)-仲醇或(*S*)-伯醇优先反应^[6]。以手性 β -羟基腈为中间体,将氰基转化为氨基或羰基,可以合成手性 1,3-氨基醇或 1,3-二醇。图 7 所示反应以乙酸乙烯酯为酰基供体,不稳定的烯醇副产物很快自发转变为稳定的乙醛而有利于反应进行。

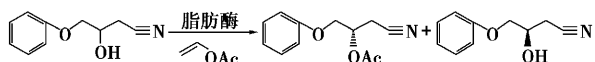


图 7 酶催化酯合成反应拆分 β -羟基腈

咪喃型木酚醇(6)有保肝抗菌以及促进伤口愈合的功能,(2*S*,3*R*)-(6)的疗效远大于(2*R*,3*S*)-(6)。传统合成方法须用大量手性助剂^[17],而酶催化酯化有时能同时表达很好的区域和立体选择性而方便廉价,如(6)含有 2 个醇羟基,脂肪酶区域选择性催化其中一个羟基酯化并同时在另一个羟基上表达出立体选择性(见图 8)^[18]。

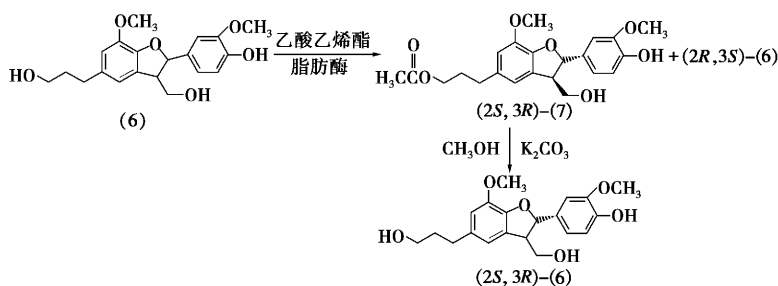


图 8 酶的区域选择性催化酯化同时表达立体选择性

1.4.2 酰胺化

水解酶在非水介质中能催化酯的氨解合成酰胺或将含氨基的外消旋体酰胺化。文献报道脂肪酶中 *Candida antarctica* lipase(CAL)是对酰胺化最有效的酶催化剂。杨波等^[19]提出在 CAL 作用下,含有手性碳原子的胺类化合物酰胺化的异构选择性规则,即按手性碳原子上取代基的大小来识别和决定反应的立体构型,而且与氨基相连的碳原子的立体结构对酰胺化反应有很大的影响。

2 提高对映体选择性的方法

2.1 介质工程

通过溶剂调控酶的选择性即为酶催化反应的

“介质工程”。为了保证酶与底物能够诱导契合表现出催化活性,酶表面要有微量“必需水”维持其柔性,而有机溶剂可能会剥夺这部分水分子。反胶束体系能较好地模拟酶的天然环境,酶为薄水层和表面活性剂层环绕,大多数酶在其中能够保持催化活性和稳定性,甚至表现出明显的激活作用。例如在气溶胶硫代琥珀酸 2[2-乙己酸]酯钠盐(AOT)/异辛烷/水反胶束体系中,用 CCL 拆分布洛芬的对映体选择性高于水/异辛烷两相体系^[20]。也可采用主溶剂/助溶剂混合溶剂对来提高对映体选择性^[21],如酮基布洛芬的酶促酯化中,疏水性较强的有机溶剂很难溶解底物,而疏水性较弱的有机溶剂虽能溶解底物但是酶在其中的活性却很低,采用混合溶剂对可以两者兼顾,提高酶活和对映体选择性。

2.2 预处理酶

商品酶或粗酶中的杂酶或添加剂会降低酶的对映体选择性,因此纯化酶可以提高其选择性。酶的化学修饰也是提高反应专一性和产率行之有效的方法^[22]。表面活性剂包衣酶借助表面活性剂的两亲性质避免了酶的失活且易分散在有机介质中,使反应在均相中进行,反应的效率得到了大幅度的提高。Okahata 等^[23]用双十八烷基-N-D-葡萄糖酸-L-谷氨酸酯对 CCL 进行包衣,并催化外消旋 1-苯乙醇与月桂酸的酯化反应进行拆分,溶剂为异辛烷,实验结果表明包衣酶催化拆分反应的对映选择性是天然酶的近 3 倍。但是包衣酶制备收率低,不易与产物分离,这将是今后亟待解决的问题。

酶的固定化也可大大提高立体选择性、酶的稳定性和活性。Kim 等^[24]用 CCL 酯化拆分布洛芬,实验结果表明将脂肪酶用凝胶固定化可以大大提高酶的催化效率和手性选择性,转化率由 25% 提高到 46%,接近理论转化率。Palomo 等^[25]对不同载体固定化酶催化拆分不同底物进行了研究,结果表明,通过表面吸附法得到的固定化酶对于拆分结构简单的底物比较有效,而离子吸附法得到的固定化酶对于复杂底物显示出更高的选择性。另外,对于同一底物,可以通过酶固定化过程中采用不同载体改变酶的选择方向。如拆分(*RS*)-2-苯基-2-丁酰基乙酸反应中,对 *Candida rugosa* lipase(CRL)采用吸附法固定于憎水载体上优先选择 *S*-对映体反应,采用共价法固定于戊二醛载体上优先选择 *R*-对映体反应。

2.3 添加剂的影响

加入添加剂是提高酶选择性的一种方法,而且较为简单易行。一些大环添加剂可以提高对映体选择性和反应产率。例如冠醚和过乙酰化 β -环糊精的加入,可以增加酶构象的柔韧性,从而使得酶的催化活性有明显的提高^[26]。在固定化酶水解拆分酮基布洛芬氯乙酯反应中加入吐温-80,既能提高酶的催化效率,又能提高对映体选择性,纯化酶的对映体选择率可达100%^[27-28]。此外,加入金属离子或抑制剂等也是提高反应立体专一性和产率的行之有效的方法。

2.4 其他影响

除了以上方法之外,微波辐射也可以影响拆分效果。Lin等^[29]报道,在微波辐射下,猪胰脂肪酶 *Porcine pancreatic lipase* (PPL) 催化下的酯化反应可加快反应速度4~6倍,对映体选择性提高3~9倍。另外,近年来,研究人员致力于新型反应器的设计,将酶催化手性拆分反应工业化、商品化,例如双向酶膜反应器拆分消炎药物萘普生,采用管状硅橡胶作为膜,其优点是反应和分离同步进行,实现操作的连续化和集约化。

3 展望

由于酶的价格、酶失活、酶反应参数限制、底物和产物的抑制作用等因素,目前只是在涉及手性中心的生成步骤时方才采用酶催化手性制备技术,其余一半以上的合成步骤则仍然采用传统的化学合成法。酶催化手性拆分领域尚待解决的问题包括:酶在有机介质中的反应机理和选择性、酶的固定化及重复利用技术等深入研究,用于消旋体药物及其中间体的拆分的适用反应类型的开发,以及大规模制备手性产品的专用反应器的设计等。由于手性目标产品的光学纯度和得率受微环境和操作条件的影响较大,因此利用计算机技术精确控制反应条件将是今后的发展方向之一。

参考文献

- [1] 丁永学,张铭俊,虞星炬.[J]. 化学反应工程与工艺,2000,16(1):67-70.
- [2] Moreno J M, Sinisterra J V. [J]. J Mol Catal A: Chem, 1995, 98(3): 171-184.
- [3] 魏志亮,李祖义,林国强.[J]. 有机化学,2001,21(6):403-412.
- [4] Miroslaw C, Pawel G, Romas J K. [J]. J Am Chem Soc, 1994, 116(8): 3180-3186.
- [5] Hellstrom H, Steinreiber A, Mayer S F. [J]. Biotechnol Lett, 2001, 23(3):169-173.
- [6] Yronne G, Alain A, Broxterman Q B. [J]. J Org Chem, 2001, 66(2): 538-543.
- [7] Khirmian A P, Oliver J E, Waters R M. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1996, 7(1):37-40.
- [8] Effenberger F, Obwald S. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, 12(2): 279-285.
- [9] Solodenko V A, Kasheva T N, KuKhar V P. [J]. Tetrahedron, 1991, 47(24):3989-3998.
- [10] Herminia I, Perez, Héctor L. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, 12(12):1709-1712.
- [11] López-Pelegriñ J A, Wentworth P, Sieber F. [J]. J Org Chem, 2000, 65(25):8527-8531.
- [12] Adam W, Korb M N. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1997, 8(7):1131-1142.
- [13] Adam W, Lukacs Z, Saha-Möller C R, et al. [J]. J Am Chem Soc, 2000, 122(20):4887-4892.
- [14] Crans D C, Whitesides G M. [J]. J Am Chem Soc, 1985, 107(24): 7008-7018.
- [15] Persson M, Costes D, Wehtje E, et al. [J]. Enzyme Microb Technol, 2002, 30(7):916-923.
- [16] Salunkhe M M, Nair R A. [J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 28(4): 333-338.
- [17] Anmed K, Ramesh G B. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, 12(3): 405-410.
- [18] Van Dyck S M O, Lemiere G L F, Jonckers T H M, et al. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, 12(5):785-789.
- [19] 杨波, 泉多惠子, 张书圣. [J]. 高等学校化学学报, 2001, 22(8): 1332-1337.
- [20] Hedstrom G, Backlund M, Slotte J P. [J]. Biotech Bioeng, 1993, 42(5):618-624.
- [21] 许建和, 刘军民, 许学书, 等. [J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 267-269.
- [22] Xin J Y, Li S B, Xu Y. [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2001, 76(6): 579-585.
- [23] Okahata Y, Hatano A, Ijiro K. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1995, 6(6):1311-1322.
- [24] Kim M G, Lee S B. [J]. J Fermentation Bioeng, 1996, 81(3):269-271.
- [25] Palomo J M, Fernandez-Lorente G, Mateo C. [J]. Enzyme Microb Technol, 2002, 31(6):775-783.
- [26] Ashraf G, Volker S. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2001, 12(19): 2761-2766.
- [27] 刘幽燕, 许建和, 胡英. [J]. 催化学报, 1999, 20(6):667-670.
- [28] Liu Y Y, Xu J H, Hu Y. [J]. J Mol Catal B: Enzym, 2000, 10(6): 523-529.
- [29] Lin G L, Lin W Y. [J]. Tetrahedron Lett, 1998, 39(24):4333-4336.

■