

科研与开发

反应分离耦合酶法制备 *D*-苹果酸

何冰芳 吴俊清 欧阳平凯

(南京工业大学制药与生命科学学院,江苏省生物工业技术重点实验室,江苏南京 210009)

摘要:用 *Pimelobacter simplex* DM18 菌的马来酸水合酶高效转化马来酸制备 *D*-苹果酸。为避免高浓度产物及底物对水合酶的抑制作用,利用马来酸和 *D*-苹果酸的钙盐溶解度低的特点,以马来酸钙为底物,经水合酶催化加水转化成 *D*-苹果酸钙,实现边反应边分离产物的反应分离耦合,同时利用钙盐和钠盐的混合反应体系提高了转化反应速率,反应 36 h,可制备 386 g/L 的 *D*-苹果酸钙盐,相当于 300 g/L *D*-苹果酸,转化率接近 99%,光学纯度达 97.03%。

关键词:反应分离耦合;马来酸水合酶;马来酸钙;*D*-苹果酸

中图分类号:TQ225.41;TQ921.7

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2004)12-0027-03

Maleate-catalyzed production of *D*-malate by coupling reaction and separation

HE Bing-fang, WU Jun-qing, OUYANG Ping-kai

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: Maleate hydratase from *Pimelobacter simplex* DM18 was used to effectively produce *D*-malate from maleate. To avoid the inhibition of the hydratase from product and substrate of high concentrations, calcium-ligand complex was used in this reaction system, because of the low solubility of Ca-maleate and Ca-malate. Ca-maleate as a substrate was converted into Ca-malate by maleate hydratase through coupling reaction and separation, and high biocatalyst velocity was maintained during the process by regulating the ratio of the complex maleate to free maleate. After 36 h of reaction, 385 g/L of Ca-*D*-malate was produced. This is equivalent to 300 g/L of *D*-malic acid, with a 99% mol yield, and 97.03% in optical purity.

Key words: coupling reaction and separation; maleate hydratase; Ca-maleate complex; *D*-malate

D-苹果酸主要应用于手性药物合成、手性拆分试剂和手性助剂等领域^[1-5],其高效制备技术的研究正越来越受到关注。采用酶法直接转化马来酸生成 *D*-苹果酸是最为有效的方法^[6-8],国内仅有一篇由本研究室报道的 *Pimelobacter simplex* DM18 菌发酵及转化条件优化的相关论文^[9],但此法存在高底物浓度或产物浓度下马来酸水合酶受到抑制的缺点^[8-9]。Mariët J. van der Werf 等报道利用 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* NCIMB9867 的马来酸水合酶采用钙盐法制备 *D*-苹果酸,产物质量浓度可达到 200 g/L,产率 99.4%^[10],该法的 *P. pseudoalcaligenes* NCIMB9867 菌极难培养,而且菌中马来酸水合酶不稳定^[11-12]。本文中报道采用反应分离耦合技术酶法转化马来酸钙制备 *D*-苹果酸钙,主要由于马来酸钙与 *D*-苹果酸钙溶解度较低,在酶促反应过程中底物和产物在反应液中能保持较低浓度,提高反应速率,简化产物分离过程,降低生产成本。

笔者利用 *Pimelobacter simplex* DM18 菌所含马来酸水合酶催化马来酸钙转化反应 36 h,转化率约 99%,转化产物浓度等方面已达到目前国际最高水平。

1 材料和方法

1.1 菌株和实验试剂

Pimelobacter simplex DM18, He B-F. 自行筛选所得并用 Biolog 仪器进行了鉴定,同时进行了 16s rDNA 鉴定的一株 *D*-苹果酸高产菌^[8]。柠康酸, AR, 日本东京化成株式会社; *D*-苹果酸, BR, Fluka Corporation。

平板培养基:柠康酸 4.0 g/L,葡萄糖 2.0 g/L,磷酸二氢钾 10.0 g/L,硝酸铵 2.0 g/L,无水硫酸镁 0.25 g/L,硫酸亚铁 0.015 g/L,酵母膏 0.2 g/L,琼脂 15~20 g/L;pH 值 7.2。

种子培养基:柠康酸 2 g/L,葡萄糖 3 g/L,酵母膏 2.8 g/L,玉米浆 5 g/L,其他组分(不含琼脂)同平

收稿日期:2004-08-31

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2002014)

作者简介:何冰芳(1962-),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为应用微生物,025-83587336,bingfanghe@njut.edu.cn;欧阳平凯(1945-),男,硕士,教授,博士生导师,中国工程院院士,研究方向为生物化工。

板培养基;pH 值 7.2。

发酵培养基:柠檬酸 2.5 g/L,其他组分同种子培养基;pH 值 7.2。

1.2 培养条件

平板培养:30℃,约 24 h;种子液培养:30℃,约 22 h,200 r/min;发酵条件:30℃,28~32 h,200 r/min。

1.3 酶活力测定

发酵液经 10 000 r/min 离心 20 min,菌泥悬浮在 0.1 mol/L 乙酸铵缓冲液(pH 值 7.2)中,菌体用量调整到反应液终 OD₆₆₀为 10,用 0.4%(体积分数)十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)破壁,加入底物,在 32℃ 下振荡反应,反应结束时煮沸终止反应,离心,检测上清液中马来酸消耗的吸光值变化,换算成酶活(单位 g·L⁻¹·h⁻¹)。

1.4 定量分析

马来酸含量分析采用紫外分光光度法^[13];马来酸及苹果酸定量测定可同时采用高效液相色谱(HPLC)法^[8],色谱柱为 Aminex HPX-87H,美国产 Bio-Rad Laboratories, Hercules。示差检测器为日本产 Shodex RI-101 型。

1.5 D-苹果酸结构与构型分析

D-苹果酸钙用 5 mol/L 硫酸酸解,离心除去硫酸钙,然后调酸至离心液 pH 值达 1.0,加入硫酸铵至饱和,用乙酸乙酯抽提 2 次后浓缩得产品,产品经核磁共振分析确定产物结构。

D-苹果酸的光学纯度分析使用 HPLC,色谱条件为:紫外检测器 280 nm;配位体交换柱 SUMICHRAL OA-5000(日本 Sumika Chemical Analysis Service),柱温 32℃;移动相为 1 mmol/L 醋酸铜,0.1 mol/L 醋酸铵,pH 值 4.5,流速 1 mL/min。

2 结果与讨论

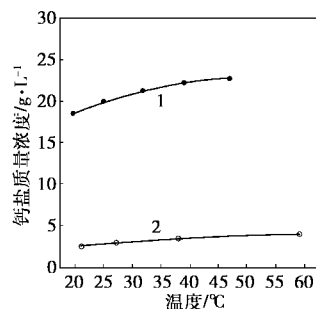
2.1 反应分离耦合制备 D-苹果酸的原理

底物马来酸与产物苹果酸为二元羧酸,易于与钙离子形成不溶性盐配位复合物,可大大降低反应液中底物与产物的浓度,马来酸钙底物不断地部分溶解,随后在酶催化下快速地转化为 D-苹果酸,超过产物溶解度范围的 D-苹果酸钙结晶析出,解除了底物与产物的抑制,提高了反应速度,同时达到边反应边分离产物的目的。

2.2 马来酸钙与 D-苹果酸钙的溶解度

马来酸钙与 D-苹果酸钙的溶解度测量参照文献[14],钙盐与温度的关系测量结果见图 1,马来酸

钙在转化温度(36℃)下的溶解度约 22 g/L,而 D-苹果酸钙在该温度下溶解度低于 5 g/L,可有效避免高浓度产物或底物对转化酶的抑制,这种溶解度差更有利于反应快速进行。



1—马来酸钙;2—D-苹果酸钙

图 1 马来酸钙和 D-苹果酸钙的溶解度

2.3 底物浓度对酶活的影响

初始底物浓度对酶活的影响见图 2,马来酸质量浓度在 80 g/L 以下时,酶活随底物浓度的升高有所上升,但超过 80 g/L 时,产生了底物抑制现象,且浓度越高,抑制现象越严重,因此转化反应中的马来酸质量浓度控制在 80 g/L 左右才能维持较高的反应速度。

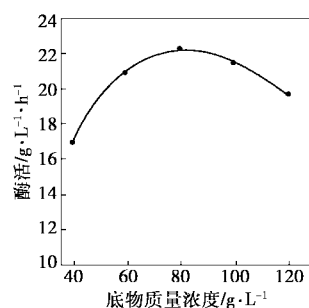


图 2 底物浓度对酶活的影响

2.4 反应分离耦合过程中可溶性马来酸根离子浓度对酶活的影响

由于马来酸钙的溶解度较低,过低的底物浓度不易维持快速反应。为了设计高效快速的反应分离耦合体系,探讨了可溶性马来酸根离子浓度对酶活的影响(图 3)。

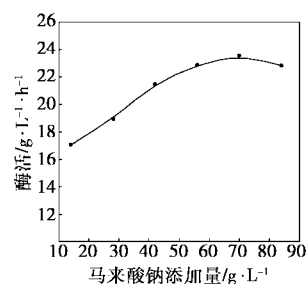


图 3 马来酸钠添加量对酶活影响

在已加入 170 g/L 的马来酸钙体系中添加马来酸钠,酶活随添加量的增加而增加,马来酸钠添加量在 70 g/L 时,酶活为最佳(此时可溶性马来酸根离子质量浓度约为 80 g/L)。马来酸钠添加量大于 70 g/L 时,酶活反而有所下降。

2.5 D-苹果酸的制备

2.5.1 间歇添加马来酸钠制备 D-苹果酸

采用间歇添加马来酸钠,将反应液中马来酸质量浓度控制在 80 g/L 以下,反应 32 h, D-苹果酸质量浓度达到 153.92 g/L, D-苹果酸摩尔产率达到 96.66%。具体反应过程中底物及产物质量浓度变化见图 4,在转化初期反应产物快速形成,当产物质量浓度大于 100 ~ 110 g/L 时,反应生成速度明显下降,这可能是由于反应液中底物浓度下降与产物积累的双重因素所致。

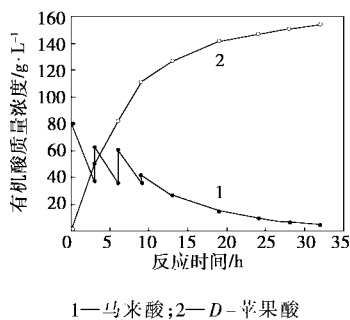


图 4 间歇添加马来酸钠制备 D-苹果酸

2.5.2 反应分离耦合制备 D-苹果酸

反应体系中一次性加入 270 g/L 马来酸钙和 70 g/L 马来酸钠,酶促反应 36 h,生成 385 g/L 的 D-苹果酸钙,折合 D-苹果酸 300 g/L,其转化率接近 99%,反应过程中底物及产物质量浓度变化见图 5。转化反应开始后产物快速形成,直至产物质量浓度大于 250 g/L 时,产物生成速度才有所下降,主要由于底物浓度过低所致。

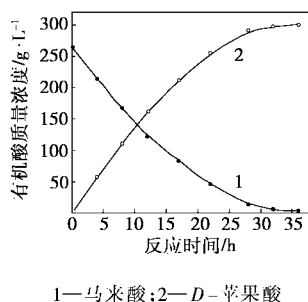


图 5 反应分离耦合制备 D-苹果酸

由图 5 可见采用反应分离耦合技术由于解除了高浓度底物抑制作用,可一次投入大量的钙盐,并由

于解除了产物的抑制,转化能在较长时间内维持快速反应,表明转化酶能在较长时间维持高活力。利用反应分离耦合方法不仅可获得高浓度的产物,更能进一步地提高底物的转化率。

2.5.3 间歇添加与反应分离耦合的比较

由钠盐法及钙盐法 D-苹果酸制备曲线(图 6)可见,转化反应初期,两种马来酸盐均快速转变为 D-苹果酸盐,当产物的质量浓度约达 100 g/L 以上时,钠盐转化速度明显下降,而钙盐基本保持较快的转化速度,表明钙盐法有效消除了高浓度底物和产物的抑制作用,大大提高了转化率。

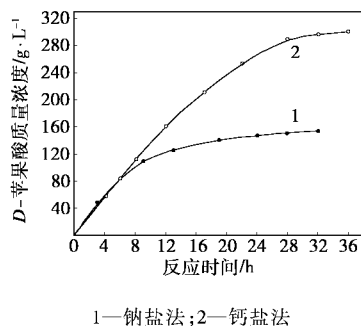


图 6 钠盐法与钙盐法 D-苹果酸制备曲线

2.6 产物结构与构型分析

产物核磁共振的氢谱和碳谱分析结果如下:
 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ 2.88 (2H, CH_2), δ 4.58 (1H, CH)。 $^{13}\text{C-NMR}$: δ 176.06 (C=O, 羧酸), δ 174.07 (C=O), δ 66.39 (CH), δ 38.01 (CH_2)。

钙盐法与钠盐法制备的产物核磁共振图谱完全一致,同时产物的氢谱与碳谱的化学位移值与 D-苹果酸标准品对照完全一致,证实钠盐法与钙盐法制备的产物均为苹果酸。

手性分离柱层析进行产物光学纯度分析的结果显示,钠盐法制备的 D-苹果酸光学纯度为 96.93%;钙盐法制备的 D-苹果酸光学纯度为 97.03%。

3 结语

利用反应分离耦合技术和钙盐与钠盐的混合反应体系,既避免了高浓度底物与产物的抑制作用,又在整个转化反应中维持了最佳期的转化速度,使转化产物 D-苹果酸的终质量浓度(300 g/L)明显高于目前国际上报道的最高水平(200 g/L)。反应分离耦合技术制备 D-苹果酸可以缩短酶促反应时间,增加对酶的应用效率,在转化反应结束后加适量氯

(下转第 31 页)

无水乙醇洗涤、真空干燥、焙烧,得到 HY 沸石负载无水 AlCl_3 的负载型催化剂 AlCl_x/HY , 研磨筛成 40 ~ 60 目的颗粒,置于干燥密封的锥形瓶中备用。

1.3 催化剂表征

催化剂的比表面积和孔径的测定在 Quanta Chrome 的 AUTOSORB-1 型物理仪上进行,吸附质为 N_2 , 吸附温度为液氮温度,载气为氦气;比表面积用 BET 法计算得到。催化剂表面酸性的测定实验在大连理工大学化工学院研发的氨程序升温脱附(NH_3 -TPD)仪上进行, NH_3 吸附温度为 120°C ,载气为高纯氦气,流率为 $60\text{ mL}/\text{min}$,升温速率为 $15^\circ\text{C}/\text{min}$ 。

1.4 反应方法

反应采用等温固定床反应器,直径为 30 mm 外衬铜套管的不锈钢管中装入 1.0 g 催化剂,使其位于反应管恒温区内,将催化剂在 500°C 下的高纯氦气氛中活化 30 min ,再降至反应温度。将预先按一定比例混合均匀的液相反应物(β -MN、均四甲苯和环己烷摩尔比 $1:1:4$ 的混合液)用微量泵以 6 h^{-1} 的质量空速注入汽化室中,汽化后进入反应器催化剂床层,在 400°C 下进行反应。

产物分析用 GC-7890F 气相色谱分析仪,FID 检测器,SE-54 石英毛细管柱, $60\text{ m} \times 0.32\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$;同时用 Agilent GC-MS 6890/5973N 对反应产物进行鉴定。

2 结果与讨论

2.1 催化剂的酸性能

负载无水 AlCl_3 前后 HY 沸石催化剂的表面酸性见图 1。由图 1 可见,负载无水 AlCl_3 后的 AlCl_x/HY 沸石弱酸量减少,强酸量有一定幅度的增加,

有利于提高催化剂的反应活性。

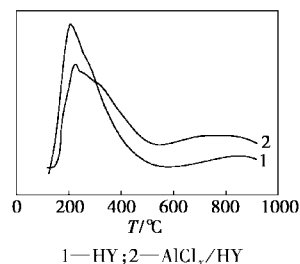


图 1 负载前后 HY 沸石的 NH_3 -TPD 谱图

2.2 催化剂的结构性能

负载前后 HY 分子筛的比表面积及孔径分布分别见图 2、图 3。

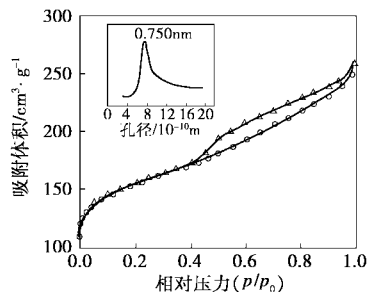


图 2 HY 沸石的 77 K 下 N_2 吸附-脱附等温线 (内图为对应的孔径分布)

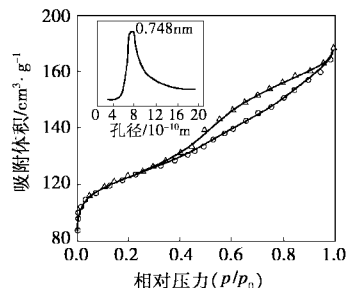


图 3 AlCl_x/HY 沸石的 77 K 下 N_2 吸附-脱附等温线(内图为对应的孔径分布)

(上接第 29 页)

化钙便可彻底分离产物 D -苹果酸钙,减少了产品分离过程,具有产业化前景。

参考文献

- [1] Barth M, Bellamy F D, Renaut P, et al. [J]. Tetrahedron, 1990, 46: 6731 - 6740.
- [2] Baily S, Harnden M R, Jarvest R L, et al. [J]. J Med Chem, 1991, 34: 56 - 65.
- [3] Almeida J F, Anaya J, Martin N, et al. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1992, 3: 1431 - 1440.
- [4] Herradon B. [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1991, 2: 191 - 194.
- [5] Shimizu K, Morita A, Fujisawa T. [J]. Chem Lett, 1998, 5: 467 - 469.
- [6] Asano Y, Ueda M, Yamasa H. [J]. Environ Microbiol, 1993, 59: 1110 - 1113.
- [7] van der Werf M J, van den Tweel W J J, Hartmans S. [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 2854 - 2860.
- [8] He B-F, Nakajima-Kambe T, Ozawa T, et al. [J]. Process Biochem, 2000, 36: 407 - 414.
- [9] 吴俊清, 何冰芳, 欧阳平凯. [J]. 生物加工过程, 2004, 2(4): 15 - 20.
- [10] van der Werf M J, Hartmans S, van den Tweel W J J. [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1995, 17: 430 - 436.
- [11] van der Werf M J, Huybers P, van den Tweel W J J, et al. [J]. World J Microbiol Biotech, 1997, 13: 279 - 282.
- [12] Michielsen M J F, Frielink C, Meijer E A, et al. [J]. Biocatal Biotransform, 1999, 17: 125 - 137.
- [13] van der Werf M J, van den Tweel W J J, Hartmans S. [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 2823 - 2829.
- [14] 叶青, 裴兆蓉, 韶晖. [J]. 江苏石油化工学院学报, 2002, 14(1): 20 - 23. ■