

微生物酶立体控制合成光学异构体

徐诗伟

徐 清

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

自然界生命现象在于其手征性,不同构型的手性分子具有不同的光学活性和生理活性。如 S-(+)-萘普生(Naproxen)抗炎活性为 R-(-)对映体的 28 倍;抗心律失常药 S-(-)-普萘洛尔(Propranolol)比 R-(+)-对映体活性高 100 倍;避孕药 D-(-)-18-甲基炔诺酮(Norgestrel)有抑制排卵的活性,而 L-(+)对映体无抗排卵活性。随着生命科学特别是生物

化学和药物化学的发展,对于光学纯的手性物质的需求也日益增大,因而对映体的拆分受到了人们的普遍关注。有机合成法拆分是一项相当困难和繁杂的过程,不仅需要手性试剂,而且在多数情况下得不到满意的收率,难以工业化应用。色谱法尤其是高效液相色谱(HPLC)从 70 年代后期开始逐渐成为拆分对映体的重要手段之一,但仍需要采用手性固定相。添加

手性流动相或用手性试剂进行衍生化,使对映体的混合物转换成非对映异构体,然后利用物理化学上的差异加以分离,而且常只局限于分析和进行小规模制备。近十年来,由于生物反应技术和酶工程的发展,利用微生物酶拆分以及将其固定化、多相反应器等新技术引入酶促反应系统取得了较大进展,成为生物合成的一个十分活跃的领域。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。但适合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,不仅其工业造价低,不需昂贵的辅助因子,对有机溶剂忍耐力较强,而且对手性化学中常见的醇、羧酸、酯、酰胺和胺等均有较好的立体选择性。因此,工业上广泛使用脂肪酶和酯酶拆分消旋醇和羧酸。光学活性的醇和羧酸在化学上有多种用途,也易转换成其它类型的化合物,已成为合成具有天然构型物质的最佳手性合成原。酶催化的主要途径为立体选择性水解、酯化和转酯作用。除了水解酶外,氧化还原酶也常被用于合成和拆分对映体。一般来说,若反应底物与产物为水不溶或疏水性的,则酶反应需要在适宜的有机溶剂体系中进行才能保持生物催化剂的高催化活性。为此,许多研究者将有机溶剂引入反应体系以改善含水体系中疏水性物质的弱溶解性,使反应平衡移向合成的方向。此外,还常采用酶固定化技术来提高生物催化剂的稳定性,防止有机溶剂对酶的毒害作用。最近还发展了应用固定化酶的多相萃取膜反应器等新技术,使拆分对映体更有效易行。

(一) 萜类化合物的拆分

Fului 等^[12]首先研究成功用光交联树脂预聚物和水混溶的尿烷预聚物固定化酶及微生物细胞的简便方法。这两种固定化方法适用于各种水不溶或强疏水性的消旋化合物如萜类化合物的立体选择转换反应。工业上拆分由化学合成的DL-薄荷醇是很有经济价值的。薄荷醇是食品和化妆品中主要呈香原料,需求量大,而作为呈香化合物需要有高度专一性的立体构

型。Omata 等^[2]用聚尿烷包埋小红酵母(*Rhodotorula minuta*)细胞在水饱和的正庚烷体系中立体选择水解DL-丁二酸薄荷醇酯,得到100%光学纯的L-薄荷醇,总收率可达86%。

Koshiro 等^[3]研究了用聚尿烷固定化脂肪酶在有机溶剂体系中立体选择酯化DL-薄荷醇。结果表明来源于圆柱状假丝酵母(*Candida cylindracea*)的脂肪酶,在选择5-苯基戊酸作为酰基给体以及用水饱和和环己烷或异辛烷体系中进行立体选择酯化得到L-薄荷醇酯,具有较高的转化率和光学纯度(ee值超过96%)。若溶剂的极性增大,截留酶的活性将减弱或丧失。这一立体选择性酯化还可用不同微生物酶作用于其它萜醇。选择适宜的酰基给体得到各种具有光学活性的呈香化合物。

(二) 1, 2-二醇的拆分

具有活泼基团的光学活性1, 2-二醇可作为手性起始物质用于药物,除草剂、信息素和液晶的合成。为此,许多研究者试图寻求简便的制造方法。在用酶法合成方面,有用面包酵母等微生物立体选择还原1-羟基-2-酮化合物^[4]和用圆柱状假丝酵母脂肪酶在有机介质里催化消旋1, 2-丁二醇和三丁酸甘油酯的转酯作用制取R-1, 2-丁二醇^[5]。

最近,Hasegawa 等^[6]又发现了一个不寻常的微生物反应。一般在酶法或化学法拆分消旋体过程中,一个纯的光学异构体最高收率为50%,而他们利用类脱发假丝酵母(*Candida Parapsilosis*)与30g/L消旋1, 2-戊二醇反应24h得到27.9g/L(S)-1,2-戊二醇,收率93%(ee 100%),远超过理论收率。这一立体控制合成过程已被证实为微生物专一性转化消旋体中(R)-1,2-戊二醇为(S)-对映体。即首先由(R)-1,2-戊二醇经NAD⁺-偶联的专一(R)-醇脱氢酶氧化为1-羟基-2-戊酮,然后由NADPH-偶联的专一(S)-2-酮-1-醇还原酶还原1-羟基-2-戊酮为(S)-1,2-戊二醇。用上述微生物立体转换方法还制备了8种光学纯(S)-1,2-二醇化合物及(R)-3-甲硫基-1,2-丙

方法。60 年代后期采用米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 酰化酶固定化在 DEAE-交联葡聚糖上, 用柱反应器进行 DL-氨基酸拆分。它包括先将 DL-氨基酸转化为 N-酰化 DL-氨基酸, 然后用酰化酶立体选择水解得到 L-氨基酸和 N-酰化-D-氨基酸, 经常规分离, 分出的 N-酰化-D-氨基酸再经化学消旋后重复使用。整个生产工艺过程已实现连续自动控制^[22,25]。

近来, Yokozeki 等^[24-26]以化学合成中间体 DL-5-吡啶甲基乙内酰胺为原料用黄杆菌 (*Flavobacterium* sp.) 变异株为酶源, 在添加肌苷条件下催化 50g/L 消旋底物得到 43g/L L-色氨酸, 收率 97%。该菌还可合成 L-苯丙氨酸 L-酪氨酸以及 L-多巴等芳香族 L-氨基酸。其转化机理已得到阐明, 即有两种水解酶参与转化, 它们分别为非光学专一性的乙内酰胺水解酶和 L-型专一性的 N-氨甲酰氨基酸水解酶。前一个酶还可使 N-氨甲酰-D-氨基酸逆向转化为 D-5-取代乙内酰胺的同时发生消旋化, 因此最终可将底物几乎全部转化为 L-氨基酸。此法为 L-氨基酸生产开辟了一条新途径, 也是发酵法生产 L-氨基酸的一个很好补充, 可用于生产一些发酵法产率低或生产困难的氨基酸。

由于非天然构型 D-氨基酸形成的肽不被肽酶水解, 因此已被普遍用于生产合成 β -内酰胺类抗生素以及生理活性肽^[27]。但 D-氨基酸不能以发酵法直接获得, 现工业上主要用化学法和酶法相结合生产各种 D-氨基酸^[28]。通常以醛为原料经 Bucherer 反应合成 DL-5-取代乙内酰胺, 然后在恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的二氢嘧啶酶催化下立体选择水解 DL-5-取代乙内酰胺为 N-氨甲酰-D-氨基酸。若酶反应保持在 pH8—9 下进行, 可同时发生 5-取代乙内酰胺的消旋化, 因此可使底物定量地转化为 N-氨甲酰-D-氨基酸, 而省去消旋工序。后者再经化学法脱氨甲酰生成 D-氨基酸。此法为生产 D-氨基酸提供了一条可行之路。

Yokozeki 等^[29,30]以假单胞菌为酶源由 30g/L DL-5-对羟苯基乙内酰胺得到 25g/L D-对羟苯基甘氨酸, 收率 92%。D-对羟苯基甘氨酸

与 D-苯甘氨酸一样可用于合成青霉素和头孢菌素类抗生素的重要侧链。更换不同的 5-取代乙内酰胺可得到各种相应的 D-氨基酸。并对酶催化机理进行了阐述^[31]。

(七) 有机金属化合物的不对称合成

酶或微生物作为手性催化剂用于不对称合成早已被人们所认识, 其作用底物通常都是由非金属元素组成的习用化合物^[32]。而在现代有机化学中有着重要用途的有机金属化合物, 用酶或微生物参与有机合成近几年才被开发^[33-35]。Yamazaki 等^[36]首先报道了将微生物不对称还原作用应用于有机金属化学领域中, 他们用热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、酿酒酵母、罗氏酵母 (*Saccharomyces rosei*) 和食油假单胞菌 (*Pseudomonas oleovorans*) 等微生物立体选择性还原乙酰二茂铁 (1) 可得到 ee>96% 的 S-(+)-1-羟乙基二茂铁 (2)。用酵母菌 (*Saccharomyces* sp.) 还原 (乙酰苯基)-三羰基铬 (3) 得到 S-(+)-三羰基 [(1, 2, 3, 4, 5, 6- η)- α -甲基苯甲醇] 铬 (4) (收率 94%, ee 73%); 而用罗氏酵母和红平诺卡氏菌 (*Nocardia erythropolis*) 分别可得到收率 35%, ee>97% 和收率 54%, ee 83% 的 S-(+)-(4) 图 1。用这些微生物合成的手性有机金属化合物比用化学法衍生和拆分程序简单得多。上述手性二茂铁和三羰基铬络合物常被作为手性助剂广泛用于不对称合成^[37,38]。

众所周知, 在有机合成中, 马肝醇脱氢酶 (HLADH) 是应用最广的酶之一。大量的不对称合成均由该酶立体选择催化氧化还原各种内消旋二醇或二酮类化合物实现的^[39,40]。近年来研究表明, 在合成手性有机金属化合物方面, HLADH 同样也是很有用的一种酶。Yamazaki 等^[41]在研究酶催化转换水稳定金属省过程中, 发现了一件趣事, 用 HLADH 既可不对称氧化 1, 2-二 (羟甲基) 二茂铁 (5) 得到 (1R, 2S)-(+) -1-甲酰-2-羟甲基二茂铁 (6) (收率 81%, ee86%), 又能还原 1, 2-二甲酰二茂铁 (7) 得到 (1S, 2R)-(-) - (6) 对映体 (收率 80%)。中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

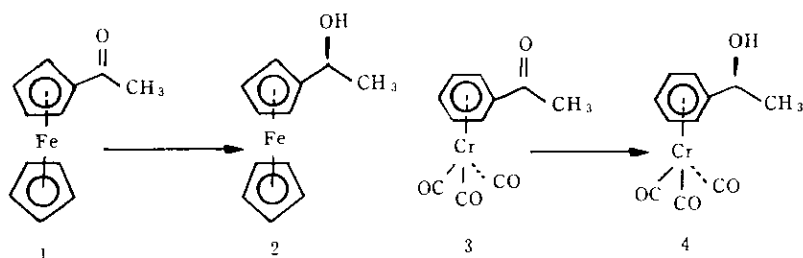


图1 左:微生物主体选择还原乙酰二茂铁

右:微生物立体选择还原(乙酰苯基)-三羰基络

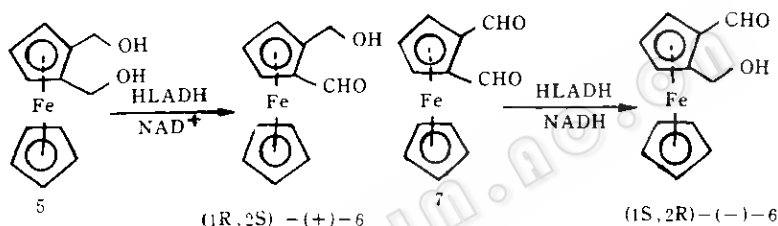


图2 左:酶立体选择氧化1,2-二(羟甲基)二茂铁

右:酶立体选择还原1,2-二甲酰二茂铁

这一结果表明在这两种内消旋二醇和二醛中,前-R基是被酶优先转化的。同时还表明一种含内消旋概念的化合物的一对对映体可由一种可逆酶反应合成。这一信息的获得对进一步阐明 HLADH 的活性部位立体结构是很有价值的,他们用计算机图解方式检验了 HLADH 的还原作用的机制^[42,43]。此外,用 HLADH 还可以立体选择氧化拆分消旋 1-羟乙基二茂铁得到光学纯的 R(-)-1-羟乙基二茂铁和乙酰二茂铁^[42],以及立体选择还原拆分消旋三羰基(η^5 -1-甲酰-2-甲基环戊二烯)锰得到 ee \geq 97% 的 (1R,2S)-(-)-三羰基-(η^5 -1-羟甲基-2-甲基环戊二烯)锰(收率 35%)和回收 (1S,2R)-(+)-底物,收率 31%, ee \geq 97%^[43]。

综上所述,利用微生物酶拆分和不对称合成获得单一构型的光学异构体,因其立体选择性强,程序简单、光学纯度和产率高,近年来已成为天然产物合成化学研究的一个重要领

域,具有广阔的应用前景。

参考文献

1. Fukui S et al. : *Biochimie*, **62**: 381, 1980.
2. Omata T et al. : *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**: 199, 1981.
3. Koshiro S et al. : *J. Biotechnol.*, **2**: 47, 1985.
4. Lee, L G et al. : *J. Org. Chem.*, **51**: 25, 1986.
5. Cambou B et al. : *J. Am. Chem. Soc.*, **106**: 2687, 1984.
6. Hasegawa, J et al. *Agric. Biol. Chem.*, **54**: 1819, 1990.
7. Nakamura K et al. *J. Org. Chem.*, **53**: 2589, 1988.
8. Nakamura K et al. : *Tetrahedron Lett.*, **30**: 2245, 1989.
9. Nakamura K et al. : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**: 91, 1990.
10. Nakamura K et al. : *Tetrahedron Lett.*, **29**: 4769, 1988.
11. Nakamura K et al. : *Agric. Biol. Chem.*, **54**: 1569, 1990.
12. Bellet P et al. : US P. 3, 432, 393, 1969.
13. 法幼华, 徐诗伟等: *微生物学报*, **18**: 232, 1978.
14. Rufer C et al. : *Liebigs Ann. Chem.*, **702**: 141, 1967.

16. Cesti P et al. ; *Eur.* , **195**: 717, 1986.
17. Gist-Brocades N V; 特公附 63—45234.
18. 古荣鸣; 中国医药工业杂志, **22**: 49, 1991.
19. Stephen I. M; US P. 4, 800, 162, 1989.
20. Phillips G T et al. ; *Eur.* , **205**: 215, 1986.
21. Bertola M A et al. ; *Eur.* , **274**: 146, 1988.
22. Chibata I et al. aMethods in Enzymology, Ed. Mosbach, K. , Academic press, New york, 44, 746, 1976.
23. Pitcher W H Jr; Immobilized Enzymes for Food Processing, 185, 1980.
24. Yokozeki K et al. ; *Agric. Biol. Chem.* , **51**: 363, 1987.
25. Yokozeki K et al. ; *Agric. Biol. Chem.* , **51**: 729, 1987.
26. Yokozeki K et al. ; *Agric. Biol. Chem.* , **51**: 737, 1987.
27. Chailcen I M; *Appl. Biochem. Biotechnol.* , **7**: 385, 1982.
28. Meijer E M et al. ; "Biocatalysis in Organic Syntheses", International Symposium, Noordwijkerhout, The Netherlands, 135, 1985.
29. Yokozeki K et al. ; *Agric. Biol. Chem.* , **51**: 355, 1987.
30. Yokozeki K et al. ; *Agric. Biol. Chem.* , **51**: 715, 1987.
31. Yokozeki K et al. ; *Agric. Biol. Chem.* , **51**: 721, 1987.
32. Jones J B; *Tetrahedron* , **42**: 3351, 1986.
33. Sylatk C et al. ; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , **27**: 152, 1987.
34. Alcock N W et al. ; *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* , 746, 1988.
35. Top S et al. ; *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* , 1284, 1988.
36. Yamazaki Y et al. ; *Agric. Biol. Chem.* , **52**: 3239, 1988.
37. Hayashi T; *Pure Appl. Chem.* , **60**: 7, 1988.
38. Soliadie-Cavallo A et al. ; *Tetrahedron Lett.* , **27**: 1331, 1986.
39. Bridges A J et al. ; *J. Am. Chem. Soc.* , **106**: 1461, 1984.
40. Dodds D R et al. ; *J. Am. Chem. Soc.* , **110**: 577, 1988.
41. Yamazaki Y et al. ; *Tetrahedron Lett.* , **29**: 5769, 1988.
42. Yamazaki Y et al. ; *Eur. J. Biochem.* , **184**: 671, 1989.
43. Yamazaki Y et al. ; *Agric. Biol. Chem.* , **54**: 1781, 1990.

(1992-07-03 收稿)