

微水相脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯立体选择性氨解反应*

李慧青 宗敏华 何欢 梁文峰

(华南理工大学生物工程系 广州 510640)

摘要: 从4种不同来源的脂肪酶, 2种不同来源的蛋白酶中筛选出了具有较高活性和对映体选择性的能催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应的脂肪酶 Novozym 435。进一步探讨了氨源、酶浓度、底物浓度等因素对该酶反应的影响。结果表明, 在优化条件下, 氨解反应6h, 转化率为51.6%, 残留底物中(-)-乙酸甲基苯甲酯对映体过剩值可达99%以上。

关键词: 微水相, 脂肪酶, 乙酸甲基苯甲酯, 立体选择性氨解

中图分类号: Q939.124 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0040-05

LIPASE-CATALYZED ENANTIOSELECTIVE AMMONOLYSIS OF (\pm) α -METHYLBENZYL ACETATE IN MICROAQUEOUS PHASE

LI Hui-Qing ZONG Min-Hua HE Huan LIANG Wen-Feng

(Biotechnology department, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract: Novozym 435 was selected from four lipases and two proteinase because of its high catalytic activity and enantioselectivity. For the ammonolysis of (\pm) α -methylbenzyl acetate, The effect of ammonia sources, the concentration of enzyme and substrates on the reaction were further explored. under the optimum conditions of this study, after 6h reaction, with the enantiomeric excess of the remaining (-) α -methylbenzyl acetate was found to be higher than 99%.

Key words: Microaqueous phase, Lipase, (\pm) α -Methylbenzyl acetate, Stereoselective ammonolysis

脂肪酶 (EC3.1.1.3) 是能与底物形成酰酶中间体, 催化酯的水解、酯化和转酯反应的酶类。80年代后期以来, 界面酶学和非水相酶学的研究与应用取得突破性进展, 极大地促进了脂肪酶多功能催化作用的开发。脂肪酶具有宽广的底物专一性, 在有机相中具有较高的稳定性和立体选择性, 能催化多种类型的反应, 包括以许多非天然的酰基受体, 如乙醇、酰胺、胺和过氧化物为底物的反应^[1]。近来发现氨也可以作为酰基受体, 如辛酸乙酯能在脂肪酶的催化作用下发生氨解反应, 生成相应的酰胺^[2]。酰胺具有良好的乳化作用、生物相容性及抗微生物的能力, 因此广泛应用于化妆品、生活用品、食品和药物上, 还可作为工业去垢剂、家用清洁剂等; 与传统在高温高压下用脂肪酸或其甲酯酰胺化生产酰胺相比, 酶促反应具有条件温和、专一性强、催化效率高的优点。其生产过程更节能、产品质量明显提高。尤其适用合成化学方法难以合成的不饱和脂肪酸的酰胺。由于许多酰胺在有机溶剂中溶解度低, 在氨解反应过程中易于从反应体系析出, 这不但能实现产物的在线分离, 而且有利于平衡向形成产物的方向移动。酯的氨解反应 (羧酸可以在脂肪酶作用下形成酯, 然后在同一酶作用下进行酯氨解反应), 不仅是合成手性酰胺的一个非常有用的方法, 也是手性羧酸、手性酯

* 广东省自然科学基金资助项目 (No. 980543)

收稿日期: 2000-07-17, 修回日期: 2000-12-10

及手性醇动力学拆分的有效途径^[4-10]。因而,具有广泛的应用前景。由于酯氨解反应是一个新反应,有关的研究甚少,国内迄今未见有关报道。本文对乙酸甲基苯甲酯的立体选择性氨解反应进行了初步的研究,筛选出了具有较高催化活性和对映体选择性的脂肪酶 Novozym 435,并进一步探讨了氨源、酶浓度、底物浓度、两底物配比等因素对该反应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪酶 Novozym 435, 3811 units/mg, 来源于 *Candida antarctica*, 固定化于大孔阴离子交换树脂, 丹麦 Novo 公司赠送; 脂肪酶 NO-L-3001, 210 units/mg, 来源于小麦胚芽, 购自 Sigma 公司; 脂肪酶 Lipozyme, 770 units/mg, 来源于 *Mucor miehei*, 由 Novo Nordisk 公司赠送; PAPAINE, 553 units/mg, 来源于 *Papaya Latex*, 购自 Sigma 公司; 木瓜蛋白酶, 600 units/mg, 购自广州远天酶制剂厂; 脂肪酶 CCL, 2470 units/mg, 来源于 *Candida rugosa*, 购自 Sigma 公司; 乙酸甲基苯甲酯标准品(外消旋), 纯度 > 99%; 十四烷(内标), 纯度 > 99%, 均购自 Aldrich 公司。其他化学试剂均为市售分析纯。

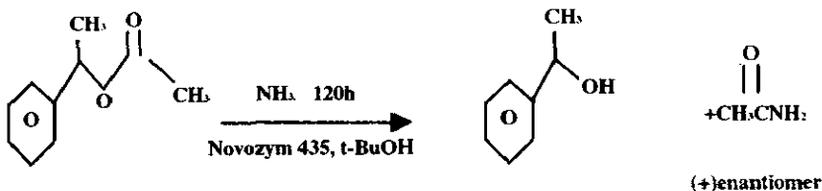
1.2 方法

1.2.1 有机溶剂脱水: 将 4A 分子筛于 180℃ 干燥箱内活化 2h, 置干燥器冷却后, 加入有机溶剂中, 室温振荡 48h, 滤去分子筛, 得脱水有机溶剂。

1.2.2 反应初始水活度的控制: 将冻干的酶与底物、脱水有机溶剂分别置于密闭容器中, 与 MgCl₂ 饱和水溶液气相平衡 72h, 使酶及反应介质的初始水活度 a_w 为 0.33。

1.2.3 脂肪酶催化酯氨解反应: 在 50mL 带塞三角瓶中装入预定量的反应底物和脱水有机溶剂, 加酶开始反应, 在 25℃, 150 r/min 振荡, 取样 0.1 mL 供气相色谱分析用。根据残留底物乙酸甲基苯甲酯两对映体的浓度及其变化计算反应的对映体选择性和转化率。其它条件相同的不加酶对照实验表明, 在本研究的条件下, 未见有非酶反应发生。

1.2.4 气相色谱分析: 仪器: HP 4890D 气相色谱仪, 配备 3398 化学工作站, 氢火焰检测器; HP Chiral 柱 (20% Permethylated β -cyclodextrin (0.32mm \times 30m); 进样口温度 280℃; 检测器温度 300℃; 柱温 115℃ 保持 2min, 再以每分钟 5℃ 升温速率升至 135℃, 保持 2min; 载气为高纯氮, 气速 2.3mL/min; 分流比 100:1; 进样量为 0.4 μ L。在该分析条件下, 乙酸甲基苯甲酯两对映体分离因子 $\alpha = 4.7$ 。用内标法定量。氨解反应方程式:



转化率 $C\% = [1 - (A + B) / (A_0 + B_0)] \times 100$, 对映体过剩值 $ee\% = [(B - A) / (B + A)] \times 100$
 $V = \{ (A_0 + B_0) - (A + B) \} / t$; 其中 $ee\%$ 为底物对映体过剩值; V 表示反应速度 (mmol/L · h) A_0 、 B_0 分别为酶促反应前乙酸甲基苯甲酯两对映体的浓度 (mmol/L); A 、

B表示为反应后残存乙酸甲基苯甲酯两对映体的浓度 (mmol/L); t表示反应时间。

2 结果与讨论

2.1 酶的筛选

不同来源的酶,其结构及活性中心的差异使其具有不同的特异性。我们利用实验室现有的4种脂肪酶和2种蛋白酶进行了氨解反应实验,结果如表1所示。

表1 不同酶催化乙酸甲基苯甲酯选择性氨解反应比较

酶	12h		24h		36h	
	C (%)	ee (%)	C (%)	ee (%)	C (%)	ee (%)
No-L-3001	6.6	3.3	10.4	1.37	11.01	1.18
Lipozyme	1.9	1.36	7.04	6.96	7.96	1.54
Novozym435	29.07	85.4	45.56	90.04	52.9	>99
L-1754	20.8	0.47	26.6	3.48	26.4	4.76
木瓜蛋白酶	2.7	1.28	8.06	1.3	8.9	1.4
PAPAIN	0	0	0	0	0	0

反应条件: 10.0mL MIBK 溶液, 31.4mmol/L 氨基甲酸铵, 31.4mmol/L 乙酸甲基苯甲酯, 20 μ L 内标 (十四烷), 反应温度 25 $^{\circ}$ C, 振荡频率 150r/min

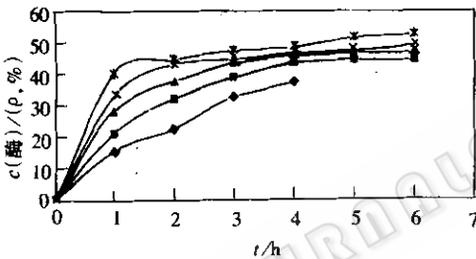


图1 不同酶浓度下酶催化氨解反应过程曲线

反应条件: 31.4mmol/L 乙酸甲基苯甲酯 + 31.4mmol/L 氨基甲酸铵, 10mL 正己烷 ($\alpha_s = 0.33$), 20 μ L 内标 (十四烷) 反应温度 25 $^{\circ}$ C, 振荡频率 150r/min

◆ 1mg/mL, ■ 2mg/mL, ▲ 3mg/mL, ✕ 5mg/mL

影响 (图1、表2)。因此, 认为 5mg/mL 的酶浓度较佳。

表1说明,除了Novozym 435有较高的催化活性和立体选择性,其他酶均表现较低的催化活性和立体选择性。故选用Novozym 435作进一步的研究。

2.2 酶浓度对反应的影响

在研究不同浓度的Novozym435催化乙酸甲基苯甲酯与氨基甲酸铵的氨解反应中,发现,酶浓度较低时,随着酶浓度的提高,酶促氨解反应速度加快,但当酶浓度超过5mg/mL后,继续增大酶浓度,氨解反应速率增加甚微。酶浓度对反应立体选择性基本上没有影响 (图1、表2)。

表2 酶浓度对氨解反应立体选择性的影响

酶浓度 (mg/mL)	C (%), t/h	ee (%)	C (%), t/h	ee (%)
1	20.15, 2.0	23.02	37.14, 4.0	58.18
2	20.22, 1.0	23.64	37.17, 3.0	58.64
3	20.24, 0.8	23.78	37.78, 2.0	58.01
4	20.15, 0.7	23.14	37.95, 1.2	58.47
5	20.17, 0.5	23.16	37.24, 1.0	58.01
6	20.25, 0.4	23.22	37.37, 0.8	59.01
7	20.16, 0.3	23.17	37.65, 0.7	58.57

反应条件: 同图1

2.3 氨源的选择

首先尝试通氨气作为氨源,结果发现不但重现性不好 (表3)。且反应速度慢、立

体选择性差。据文献报道^[3], 通氨气的浓度过大可对酶产生毒害作用, 可以使用铵盐作为氨源, 于是尝试利用氨基甲酸铵、碳酸氢铵、三乙胺 + 氯化铵、氯化铵以及氯化铵 + 氢氧化钠作为氨源, 结果如表 4 所示。

表 3 以氨气为氨源乙酸甲基苯甲酯氨解反应的结果

	T (h)	C (%)	ee (%)
1	16	4.8	6.46
2	16	24.07	27.02
3	16	14.82	17.54

反应条件: 31.1mmol/L 乙酸甲基苯甲酯, 20 μ L 内标 (十四烷), 10mL MIBK (甲基异丁基甲酮), 50mg Novozym 435, 氨气流速 3mL/min, 通气 20min, 反应温度 25 $^{\circ}$ C, 振荡频率为 150r/min

表 4 不同氨源对酶催化氨解反应的影响

氨源	t/h	C/%	ee/%	t/h	C/%	ee/%	t/h	C/%	ee/%
氨基甲酸铵	2	34.26	41.15	10	50.35	91.25	36	54.12	>99
碳酸氢铵	2	28.16	32.17	28	44.45	76.1	45	44.72	79.3
三乙胺 + 氯化铵	2	31.17	38.56	28	51.8	91.14	40	55.16	>99
氯化铵	2	3.42	3.21	20	5.7	7.6	43	20.6	14.01
氯化铵 + 氢氧化钠	2	29.17	36.57	48	51.4	88.9	56	51.6	89.1

反应条件: 20 μ L 内标 (十四烷), 10mL MIBK (甲基异丁基甲酮), 50mg Novozym 435, 加入不同的铵盐, 理论产生氨气 31.4mmol/L, 反应温度 25 $^{\circ}$ C, 振荡频率为 150r/min

由铵盐作为氨源比直接通氨气效果好, 不仅容易控制, 而且由于氨气逐渐释放, 减少了其对酶的毒害作用。因此反应速度和立体选择性都比直接通氨气高 (以氯化铵为氨源除外)。从表中可看出, 氨基甲酸铵作为氨源的效果最好, 反应 2h, 转化率达 34.26%。反应 36h, 转化率为 54.12%, 底物 ee% 大于 99%。而以三乙胺 + 氯化铵为氨源时, 反应慢、立体选择性稍低, 反应 2h, 转化率为 31.17%; 而需 40h, 底物 ee% 方达到 99% 以上。以碳酸氢铵为氨源效果较差, 因为它含有一分子的水, 水与氨气竞争为酰基受体。反应 2h, 转化率为 28.16%; 反应 28h 基本达到平衡, 转化率为 44.45%, 残留底物 ee% 仅为 76.1%。氯化铵 + 氢氧化钠为氨源结果与碳酸氢铵相仿, 而氯化铵为氨源时效果最差, 反应 2h 转化率仅为 3.42%; 反应 43h, 转化率仅为 20.6%, 底物 ee% 为 14.2% 因此我们认为以氨基甲酸铵为氨源较宜。

2.4 氨基甲酸铵浓度对氨解反应的影响

为了选择一个最适合的氨基甲酸铵浓度, 分别比较了氨基甲酸铵浓度为: 15.75mmol/L、31.4mmol/L、47.1mmol/L、62.8mmol/L 和 78.5mmol/L 的反应, 结果如图 2、表 5 所示。

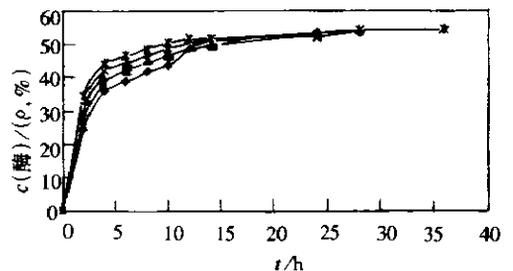


图 2 氨基甲酸铵浓度对酶催化氨解反应的影响

反应条件: 31.4mmol/L 乙酸甲基苯甲酯, 10mMIBK, 20 μ L 内标 (十四烷), Novozym 435 为 5mg/mL, 反应温度 25 $^{\circ}$ C, 振荡频率 150r/min

—●— 16.5mmol/L, —■— 31.5mmol/L, —▲— 49.5mmol/L, —×— 66mmol/L, —*— 82.5mmol/L

表5 氨基甲酸铵浓度对酶催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应的影响

氨基甲酸铵浓度	<i>t</i>	C	<i>t</i>	C	ee	<i>t</i>	C	ee
mmol/L	(h)	(%)	(h)	(%)	(%)	(h)	(%)	(%)
15.7	2	24.36	14	51.23	94.59	28	53.68	>99
31.4	2	27.03	14	49.38	95.98	24	52.68	>99
47.1	2	29.68	14	49.36	97.15	24	52.02	>99
62.8	2	33.02	12	50.01	94.25	28	54.02	>99
78.5	2	34.26	10	50.35	91.25	36	54.12	>99

反应条件：同图2

在所研究的氨基甲酸铵浓度范围内，随着其浓度的增大，氨解反应速度加快。反应2h，反应的转化率依次为24.36、27.03、29.68、33.02、34.26%。但酶反应的对映体选择性在氨基甲酸铵浓度15.7mmol/L~47.1mmol/L范围内，随着其浓度的增加而增大。而当其浓度超过47.1mmol/L时，立体选择性略有下降。可能是因为随着氨基甲酸铵浓度的改变，酶的微环境略有变化，从而影响了酶分子的构象，进而影响酶分子与两对映体的“契合”。当氨基甲酸铵较低时，酶的立体选择性也有降低，这可能是因为反应体系中与氨解反应相竞争的立体选择性较差的副反应—酯水解反应的比例加大。因此从反应速度和酶的立体选择性及经济性考虑，我们认为氨浓度以31.4mmol/L为宜。

酶浓度、底物浓度等因素对Novozym 435催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应均有显著影响。以10mL正己烷($a_w = 0.33$)为反应介质，酶浓度为5mg/mL，Novozym 435催化31.4mmol/L乙酸甲基苯甲酯和31.4mmol/L氨解甲酸铵进行氨解反应，反应6h，转化率为52.16%，残留底物(-)-乙酸甲基苯甲酯对映体过剩值可达99%以上。

参考文献

- [1] Raffaele M, Giovanni N, Angela P. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, 6 (7): 1773~1778.
- [2] Chen C S, Yoshinori F, Garg G. *J Am Chem Soc*, 1982, 104 (3): 7294~7299.
- [3] Mike J J, Lijens C M, Adrie J J, *et al.* *Tetrahedron*, 1999, 55 (2): 12411~12418.
- [4] Zoete M C, Rantwijk F, Sheldon R A. *Catalysis Today*, 1994, 22 (1): 563~590.
- [5] Zoete M C, Dalen A C. *J. Mol. Catal. B*, 1996, 2: 141~145.
- [6] Zoete M C, Dalen A C, Sheldon R A. *J. Mol. Catal. B*, 1996, 2: 19~25.
- [7] Wegman M A, Hacking M A P, Sheldon R A. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, 10: 1739~1750.
- [8] Eduardo G U, Francisca R, Vicente G. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, 10: 721~726.
- [9] Zoete M C, Danlen A C, Sheldon R A. *Biocatalysis*, 1994, 10: 307~316.
- [10] Starmans W A J, Doppen R G, Zwanzburg B. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, 9: 429~435.