

微环境对脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯立体 选择性氨解的影响*

李慧青 宗敏华 梁文峰 何 欢

(华南理工大学生物工程系 广州 510640)

摘 要: 系统研究了反应介质、水活度、温度、pH 等因素对脂肪酶 Novozym 435 催化乙酸甲基苯甲酯立体选择性氨解反应的影响。以正己烷为反应介质, 酶表现出较高的催化活性和对映体选择性; 适宜的反应温度为 25℃~35℃; 最适反应体系初始水活度为 0.33; 较适宜的 pH 范围为 6~7。

关键词: 微环境, 脂肪酶, 乙酸甲基苯甲酯, 立体选择性氨解

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0035-06

EFFECT OF MICROENVIRONMENT ON LIPASE-CATALYZED ENANTIOSELECTIVE AMMONOLYSIS OF (±)- α -METHYLBENZYL ACETATE

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

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

Abstract: The effects of reaction media, water activity, temperature and pH on Novozym 435-catalyzed enantioselective ammonolysis of (±)- α -methylbenzyl acetate have been systematically explored. Novozym 435 showed high catalytic activity and enantioselectivity in hexane; the optimum temperature and the initial water activity were 25℃ and 0.33 respectively; The suitable reaction pH was in the range of 6.0~7.0.

Key words: Microenvironment, Lipase, α -Methylbenzyl Acetate, Ammonolysis

80 年代后期, 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。有些酶不仅在有机溶剂中能发挥催化作用, 而且还表现出许多新特性^[1]。非水相中的酶催化已成为生物催化用于有机合成的重要途径。

脂肪酶 (EC3. 1. 1) 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, 已在外消旋物质的拆分中得到广泛应用^[2]。近年来的一些研究表明, 某些脂肪酶还可催化一些非天然酰基受体的转化, 如过氧化氢、烷基胺、联胺和氨等。这些非天然酰基受体的转化反应在多肽的合成、手性羧酸及手性醇的拆分中显示出较大的应用前景。其中, 以氨为酰基受体的酶催化氨解反应, 不仅为功能性酰胺的合成提供了行之有效的途径, 其还可用于手性酯、酸、醇类化合物的动力学拆分, 这是继酶催化对映体选择性水解、酯化及转酯反应之后的另一制备光学纯化合物的新反应^[3-5]。迄今, 国际上对脂肪酶催化的这一新反应研究报道甚少, 国内尚未见有报道。作者发现脂肪酶 Novozym 435 能催化乙酸甲基苯甲酯的立体选择性氨解反应, 本文进一步探讨

* 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: 2000-11-17

微环境因素对这一反应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪酶 Novozym 435, 来源于 *Candida antarctica*, 吸附法固定化于大孔阴离子交换树脂, 丹麦 Novo 公司赠送。乙酸甲基苯甲酯标准品, 纯度 > 99% ; 十四烷 (内标): 纯度 > 99% , 氨基甲酸铵, 纯度 > 99% ; 均购自 Aldrich 公司。其它化学试剂均为市售分析纯。

仪器: HP 4890 D 气相色谱仪, 配备 3398 化学工作站。氢火焰检测器, 色谱柱: HP 柱 Chiral (20% Permethylated β -cyclodextrin) 0.32mm \times 30m;

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: 将冻干的脂肪酶 Novozym 435 与底物、脱水有机溶剂分别置于密闭容器中, 与不同盐的饱和水溶液气相平衡 72h, 使酶及反应介质的水活度与盐溶液的水活度相同。22℃ 时, 饱和盐 LiCl、MgCl₂、Mg(NO₃)₂、NaCl、KCl 水溶液平衡所得的初始水活度 a_w 分别为: 0.12、0.33、0.55、0.75、0.86^[6]。

1.2.3 pH 的控制: 将脂肪酶溶于 pH 分别为 4.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 的磷酸盐缓冲液中, 然后冻干得不同 pH 的脂肪酶。

1.2.4 脂肪酶催化氨解反应: 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、内标 (十四烷), 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。根据残留乙酸甲基苯甲酯两对映体的浓度来计算反应的转化率和对映体选择性。其它条件相同但不加酶的对照实验表明, 在此条件下, 未检测出非酶反应。

1.2.5 气相色谱分析: 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 3min; 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度为 4.7 (图 1)。

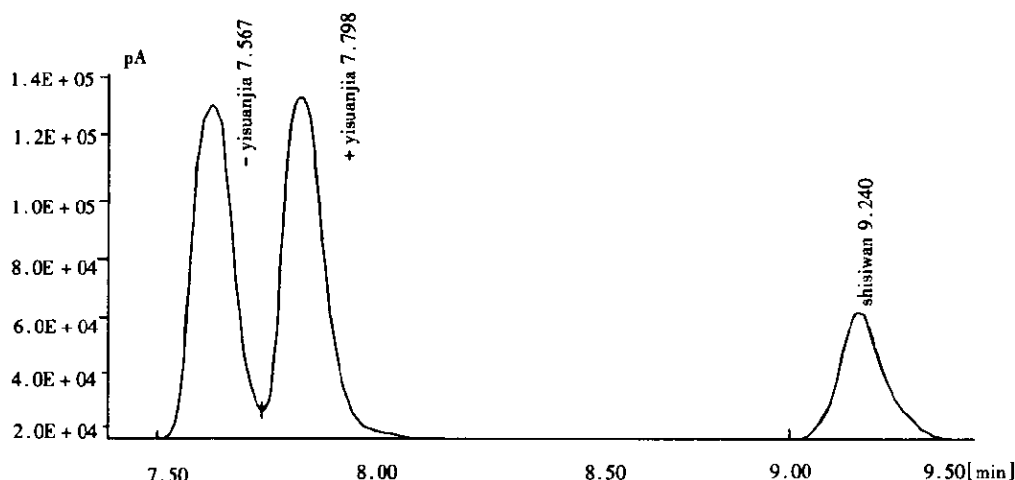


图 1 乙酸甲基苯甲酯两对映体分离色谱图

转化率 $C\% = [1 - (A + B) / (A_0 + B_0)] \cdot 100$, 对映体过剩值 $ee\% = [(B - A) / (B + A)] \cdot 100$,

$$\text{反应初速度 } V = \frac{(A_0 + B_0) - (A + B)}{t} \quad V_- = \frac{A_0 - A}{t}$$

$$V_+ = \frac{B_0 - B}{t} \quad E = \frac{(V_+)_0}{(V_-)_0}$$

其中 $ee\%$ 为底物对映体过剩值; V 表示反应初速度 ($\text{mmol/L} \cdot \text{h}$); A_0 、 B_0 分别为酶催化反应前乙酸甲基苯甲酯两对映体的浓度 (mmol/L); A 、 B 表示反应一定时间后残留乙酸甲基苯甲酯两对映体的浓度 (mmol/L)^[7]。

2 结果

2.1 反应介质对脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应的影响

有机溶剂的性质对酶的催化活性及对映体选择性有显著的影响^[8]。我们研究了 8 种溶剂系统 (水活度 $a_w = 0.75$) 对 Novozym 435 催化乙酸甲基苯甲酯与氨基甲酸铵氨解反应的影响, 结果发现, 酶的活性与溶剂的疏水性 LogP 有着良好的关联性, 符合溶剂疏水性模型。从图 2 和表 1 可看出, Novozym 435 在强极性、强亲水性的溶剂四氢呋喃、二氯甲烷中反应活性很低, 反应 24h, 转化率分别为 1.58% 和 6.64%, 这与 Adoercreutz^[9] 的实验结果一致, 他发现 $\text{LogP} < 2$ 的溶剂很易使酶失活。原因可能是因为这些强极性溶剂侵入酶

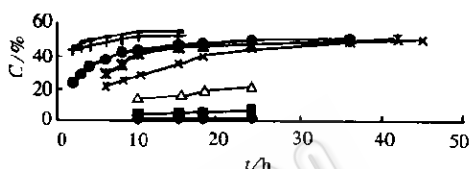


图 2 不同有机溶液中酶催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应过程曲线

反应条件: 31.4mmol/L 乙酸甲基苯甲酯 + 31.4mmol/L 氨基甲酸铵, 10mL 有机溶剂 (水活度 $a_w = 0.75$), 20μL 内标 (十四烷), Novozym 435, 50mg, 25℃, 150r/min, LogP 表示一种溶剂在辛醇/水两相之间的分配系数的常用对数值

—◆—四氢呋喃, —■—二氯甲烷, —▲—1,2-二氯乙烷, —×—叔丁醇, —*—甲苯, —●—MIBK, —■—正乙烷, —□—庚烷

分子内部的活性中心, 破坏了酶的构象; 或者是这些强亲水性溶剂夺取了维持酶分子活性构象的“必需水”, 从而造成酶的失活。在 LogP 为 2~4 的范围内, 随着溶剂 LogP 值的增大, 与酶分子结合的水增多, 酶活提高, 故酶催化氨解反应速度加快。酶反应的对映体选择性随溶剂疏水性的增大而下降。在研究的八种溶剂中, 庚烷为反应介质时, 氨解反应速度最快, 15h 转化率可达 56.09%。Novozym 435 在叔丁醇中的立体选择性最好, 但酶反应速率过慢 (45h, 转化率 50.03%, ee 值 99%)。综合考虑反应速度和立体选择性, 认为以正己烷做为反应介质较好。

表 1 有机溶剂对脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应的影响

有机溶剂	LogP	t/h	$C/\%$	$ee/\%$	t/h	$C/\%$	$ee/\%$
四氢呋喃	0.49	10	1.12	0.58	24	1.58	4.436
二氯甲烷	0.6	10	3.87	4.167	24	6.64	6.28
1, 2 二氯乙烷	0.71	10	12.78	12.64	24	24.04	26.45
叔丁醇	1.8	42	49.31	97.98	45	50.03	> 99
甲苯	2.0	36	49.3	96.58	42	50.12	> 99
甲基异丁基甲酮	2.2	24	50.41	96.87	36	51.62	> 99
正己烷	3.5	8	49.55	95.48	15	52.64	> 99
庚烷	4.0	4	50.65	87.12	15	56.09	> 99

注: 反应条件同图 2

2.2 反应初始水活度对脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应的影响

酶蛋白的水化作用是稳定酶催化活性构象的必要条件。我们用热力学水活度 a_w 来描述有机溶剂中酶的活性与水含量的关系。水活度是在指定的温度压力下, 反应体系中水的蒸汽压和纯水的蒸汽压之比。 a_w 表示了催化剂周围含水层中水的浓度大小, 而不是整个体系的含水量大小。初始水活度对脂肪酶 Novozym 435 催化乙酸甲基苯甲酯与氨基甲酸铵氨解反应的影响见表 2。在所研究的水活度范围内, 酶的反应速度随水活度的增大呈增大趋势。但酶的立体选择性随水活度的增加而降低。从 V_- 、 V_+ 的变化趋势和幅度可以看出, 随着初始水活度的增加, 优势对映体即 (+)-乙酸甲基苯甲酯的氨解反应速度变化较小, 但劣势对映体 (-)-乙酸甲基苯甲酯的氨解反应大幅度加速, 从而导致反应的立体选择性降低。 $a_w = 0.12$, 转化率为 52.05%, 底物 ee% 大于 99%; 而 $a_w = 0.85$, 底物 ee% 大于 99% 时, 转化率为 59.38%。这是由于随着水活度的增加, “束缚” 在酶分子表层的水分增多, 催化选择性降低。另外, 过量的水可能使副反应——酯水解反应的比例增大。我们通过不加铵盐的空白实验已经证实了这一点。在水活度为 0.75 时, 反应 6h, 转化率达 29.45%, 而在水活度为 0.33 下, 反应 6h, 转化率仅为 7.47%, 综合考虑反应速度和立体选择性, 认为最适初始水活度以 0.33 为宜。

表 2 初始水活度对脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应的影响

a_w	t (h)	V_0	$V_- \times 10^2$ (mmol/L·h)	V_+	ee (%)	E	t (h)	C (%)	ee (%)	t (h)	C (%)	ee (%)
0.12	1	0.951	2.919	1.48	40.01	50.7	8	49.99	94.18	18	52.05	>99
0.33	1	0.979	3.017	1.45	42.36	48.0	4	50.75	94.16	6	52.26	>99
0.55	1	0.993	5.731	1.42	45.16	24.7	6	49.55	92.01	15	52.64	>99
0.75	1	1.016	8.231	1.41	45.25	17.1	6	48.63	87.32	18	56.91	>99
0.85	1	1.027	13.827	1.39	41.18	10.05	4	49.84	82.31	18	59.38	>99

反应条件: 31.4 mmol/L 乙酸甲基苯甲酯 + 31.4 mmol/L 氨基甲酸铵, 10mL 正己烷 (水活度 a_w 分别为 0.12、0.33、0.55、0.75、0.85), 20 μ L 内标 (十四烷), Novozym 435, 50mg, 25 $^{\circ}$ C, 150r/min。

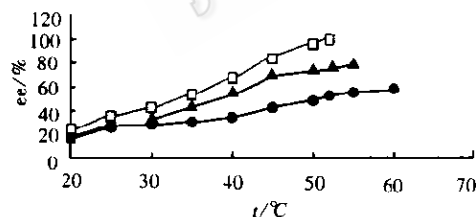


图 3 反应温度对乙酸甲基苯甲酯氨解反应立体选择性的影响

反应条件: 31.4 mmol/L 乙酸甲基苯甲酯 + 31.4 mmol/L 氨基甲酸铵, 10mL 正己烷 (水活度 $a_w = 0.33$), 20 μ L 内标 (十四烷), Novozym 435, 50mg, 其中温度分别控制在 0、15、25、35、45、60 $^{\circ}$ C
—□—0 $^{\circ}$ C, 15 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 35 $^{\circ}$ C, —▲—45 $^{\circ}$ C, —●—60 $^{\circ}$ C

2.3 反应温度对脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应的影响

为了确定脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯乙酯氨解反应的最佳温度, 分别比较了在 0 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C 和 60 $^{\circ}$ C 下的反应, 发现随着温度的升高, 反应速度加快 (表 3)。随着温度的提高, 残留底物的光学纯度降低, 当反应温度高于 35 $^{\circ}$ C 后, 这种变化尤为显著 (图 3)。这是因为随着温度的升高, 优势对映体即 (+)-乙酸甲基苯甲酯的氨解反应速度变化较小, 但劣势对映体 (-)-乙酸甲基苯甲酯的氨解反应大幅度加快。同时在较高的温度下, 氨气在有机溶剂中溶解度降低, 从而使副反应——酯水解反应的比例加大, 导致光学纯度降低。我们通过不加氨基甲酸铵的对照实验证实了这一点。在 60 $^{\circ}$ C 下, 反应进行 6h, 转化率达到 38.8%; 而在 25 $^{\circ}$ C 下, 反应 6h, 转化率才为 7.13%。

0℃、15℃、25℃和 35℃下反应, 转化率为 52%左右时, 残留底物的光学纯度都达到 >99%, 但是欲达到该转化率, 在 0℃和 15℃下反应所需的时间分别长达 36h 和 15h, 而 25℃下仅需要 6h, 35℃下仅需 5h。因此 25℃到 35℃之间都是比较适宜的反应温度。

表 3 反应温度对酶促乙酸甲基苯甲酯氨解反应的影响

t (°C)	t (h)	V_{-}	V_{+} (mmol/L·h)	V_0	E
0	1	1.37×10^{-2}	0.84	0.431	61.31
15	1	2.19	1.33	0.7852	60.7
25	1	2.76	1.41	1.064	50.94
35	1	3.179	1.45	1.5617	45.61
45	1	36.49	1.70	2.068	4.65
60	1	62.42	1.78	2.4045	2.85

2.4 pH 对脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应的影响

有机介质中的酶具有“刚性”结构, 使酶能够“记住”它最后存在过的水溶液的 pH 值^[10], 被称作“pH 记忆”(pH memory)效应。由于冻干前含酶缓冲液的 pH 值决定了冻干后酶分子的电离状态, 从而影响到冻干酶的构象, 因此对酶在有机相中的催化活性和对映体选择性都有不同程度的影响。

在本研究中, 我们比较了冻干后 pH 值为 4.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 的脂肪酶催化乙酸甲基苯甲酯乙酸甲基苯甲酯氨解反应。从表 4 可以看出, 在所研究的 pH 范围内, pH 对酶反应的立体选择性影响甚微, 但对酶的催化活性有一定的影响。在 pH 为 4.0 和 9.0 的条件下, 所需反应时间分别长达 18 及 24h, 转化率达 52%左右, 底物 ee% 值达到 >99%。而 pH 为 7.0 左右, 仅需 10h 即可达到同样的结果。因此可见在微偏酸性条件下 (pH6.0~7.0), 酶活和酶的立体选择性较好。

表 4 不同 pH 值对乙酸甲基苯甲酯氨解反应的影响

pH	t (h)	C (%)	ee (%)	t (h)	C (%)	ee (%)
4.0	8	50.15	91.69	18	52.98	>99
6.0	8	50.18	92.69	12	52.69	>99
6.5	8	49.48	92.13	10	52.04	>99
7.0	6	49.1	92.65	10	53.35	>99
7.5	6	50.3	92.45	12	53.38	>99
8.0	6	50.8	91.68	18	53.23	>99
9.0	12	49.9	90.65	24	52.29	>99

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 (水活度 $a_w = 0.33$), 20 μ L 内标 (十四烷), Novozym435 50mg, 25℃, 150r/min

反应介质、水活度、温度、pH 等因素对脂肪酶 Novozym 435 催化乙酸甲基苯甲酯氨解反应均有一定的影响: 以正己烷为反应介质表现出较高的催化活性和对映体选择性; 适宜的反应温度为 25℃~35℃; 最适反应初始水活度为 0.33; 较适宜的 pH 范围为 6.0~7.0。

参考文献

- [1] 杜伟, 宗敏华, 凌均建, 等. 工业微生物, 2000, 30 (2): 58~60.
- [2] Morrone R, Nivolosi G, Patti A. Tetrahedron: Asymmetry, 1995, 6 (7): 1773~1778.
- [3] De Zoete M C, Kock-Van Dalen A C, Rantwijk Van F, et al. Catalysis B: Enzymatic, 1996, 2 (2~3): 141~145.

- [4] Litjens M J J, Sha M, Straathof A J J, *et al*. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **65** (3): 347 ~ 356.
- [5] Mike J J, Litjens, Adrie J J, *et al*. *Tetrahedron*, 1999, **55** (4): 12411 ~ 12418.
- [6] Amélie D, Trani M, Robert L. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, **22** (2): 212 ~ 216.
- [7] Chen C S, Yoshinori F, Garg G. *J Am Chem Soc*, 1982, **104** (2): 7294 ~ 7299.
- [8] Shubhada S, Sundaram P V. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, **17** (1): 330 ~ 335.
- [9] Lanne C, Boeren S, Vos K, *et al*. *Biotechnol Bioeng*, 1986, **30** (3): 81 ~ 87.
- [10] Francesco S, Roberts P. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, **19** (3): 487 ~ 492.