

微生物环氧化合物水解酶在有机合成中的应用*

彭华松 宗敏华 娄文勇 王菊芳

(华南理工大学生物工程系 广州 510640)

摘要:环氧化合物水解酶是一种在自然界广泛存在的水解酶,它能高对映体选择性、高区域选择性地将环氧化合物水解为相应的邻位二醇。近年来,国际上利用微生物环氧化合物水解酶催化的不对称水解反应获得了高光学纯度环氧化合物和邻二醇,可用于多种精细化学品和生物活性物质的合成,为该酶在合成工业上的应用开辟了一条新途径。这里综述了该酶的来源、催化机理、催化特性和应用研究情况。

关键词:环氧化合物水解酶,拆分,邻位二醇,对映体选择性

中图分类号: TQ556.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0092-05

微生物环氧化合物水解酶(Epoxyde hydrolase, EHs, EC3.3.2.3)是一种 α/β -折叠型水解酶,能将细胞内活泼的环氧化合物水解成水溶性的邻位二醇,便于进一步的降解或排泄,减少了对体内活性物质的伤害,在细胞脱毒中起到了极其重要的作用。同时,由该水解反应得到的光学活性的环氧化合物和邻位二醇是精细有机合成上极为重要的

* 国家自然科学基金资助项目 (No.20076019)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.20076019)

收稿日期: 2002-03-05, 修回日期: 2002-06-12

手性合成子,可以进一步转化成许多具有生物活性的化合物,如白三烯、昆虫信息素、甾类物质、爱滋病毒蛋白酶抑制剂等,因而在医药、农药、化妆品等行业具有非常广阔的应用前景。

在各种环氧化合物水解酶之中,哺乳动物环氧化合物水解酶的研究最充分,但是由于其制备困难,因而限制了它在合成上的应用研究。近几年来的研究发现,许多微生物包括细菌、酵母、丝状真菌等都能产生环氧化合物水解酶,而且有些酶已经被分离纯化和测序,并被进一步克隆和过量表达,使该水解酶的大规模制备和应用开发成为可能。微生物环氧化合物水解酶来源广泛,底物谱宽广,其催化功能的发挥既不需要金属离子辅基也不需要辅酶的参加,而且催化的不对称水解反应具有优良的对映体选择性和区域选择性,即使在非水介质中仍保持了较高的催化活性,成为极具应用潜力的生物催化剂。

1 微生物环氧化合物水解酶的种类及分布

早在1967年, Schroefer等在利用一种从假单孢菌中得到的酶催化油酸水解生成10R-羟基油酸时发现,这种酶同样可以催化顺式或反式-9, 10-环氧油酸的水解反应,且反应具有一定的选择性,可惜这一发现在当时未引起广泛的重视。最近的研究表明,在包括细菌、酵母和丝状真菌在内的多种微生物体内都有环氧化合物水解酶的存在。

1.1 细菌环氧化合物水解酶 细菌环氧化合物水解酶在自然界中广泛存在,可分为两大类:组成型和诱导型(降解特殊的环氧化合物)。组成型酶的底物谱较宽广,可水解各种2-取代、2,2-二取代或2,3-二取代的环氧化合物。Faber等^[1]筛选到5株选择性很高的组成型环氧化合物水解酶菌株,其中 *Rhodococcus ruber* DSM 43338在水解底物2-甲基-1,2-环氧庚烷时的选择性非常高,E值高达200。诱导型酶的底物谱相对较窄,仅限于那些与生长基质中诱导物结构比较相似的环氧化合物。Archer等^[2]以1,2-环氧环己烷为诱导物筛选到一株分泌环氧化合物水解酶的细菌。当生长在含有1,2-环氧环己烷及其衍生物的培养基上时,细菌 *Corynebacterium* C12就会被诱导产生水解该环氧化合物的水解酶。利用该酶催化的不对称水解反应可制备光学活性的(1S, 2S)-1-甲基-环己烷-1, 2-二醇。

1.2 酵母环氧化合物水解酶 由于酵母细胞易于培养、易于从培养液中分离出来,适宜于大规模生产,因而酵母环氧化合物水解酶比其它来源的环氧化合物水解酶具有更优良的应用潜力。Weijers等^[3]以1,2-环氧辛烷为底物从酵母的25个不同属中筛选具有环氧化合物水解酶活性的菌株,发现很多种属的酵母细胞都具有该水解酶活性,但只有几个担子菌属菌株的环氧化合物水解酶选择性较高,如丝孢酵母属、红冬孢属和红酵母属。两株酵母菌 *Rhodotorula araucariae* CBS 6031和 *Rhodospiridium toruloides* CBS 349对底物1, 2-环氧辛烷显示出了很高的活性和对映体选择性(E值>100),这种水解能力在其它种类的微生物环氧化合物水解酶中尚未发现。

1.3 丝状真菌环氧化合物水解酶 研究发现,许多丝状真菌环氧化合物水解酶为组成型酶,其底物谱较广,选择性很高,尤其是对含芳基、取代脂环基的环氧化合物其选择性非常高,是一种极具应用潜力的生物催化剂。其中, *Aspergillus* 和 *Beauveria* 是两种最重要的高活性环氧化合物水解酶的产生菌。Archelas等^[4]利用一种环氧化合物水解酶菌株(*Aspergillus niger*)拆分外消旋的2-吡啶环氧乙烷,获得了光学活性极高的手性合

成子(S)-2-吡啶环氧乙烷(ee值>99%)。

2 微生物环氧化合物水解酶的催化机理

环氧化合物水解酶是一种 α/β -折叠型水解酶,遵循两步催化机理:(1)酶的天冬氨酸残基亲核进攻环氧乙烷中的一个碳原子,形成一个共价结合的酯中间体;(2)在酶的作用下,一个水分子被激活,将酯中间体水解成产物。Rink等^[5]的研究发现,细菌*A. radiobacter*环氧化合物水解酶的Asp107(亲核进攻作用)、Asp246(辅助组氨酸残基发挥作用)和His275(活化水分子)3个氨基酸残基组成了该酶三位一体的催化功能。

3 微生物环氧化合物水解酶的催化特性

环氧化合物水解酶同脂肪酶和酯酶一样,是一类既不需要金属离子辅基也不需要辅酶的水解酶,能方便地用于许多重要手性中间体的制备。

3.1 活性和底物专一性 微生物环氧化合物水解酶不仅活性较高,而且能在有机溶剂中催化环氧化合物的选择性水解。Furstoss等^[6]报道了在水/水溶性有机溶剂组成的单相体系中,利用冷冻干燥的*A. niger* LCP 521抽提酶粉选择性水解对-溴- α -甲基-苯基环氧乙烷(浓度为80g/L),得到的S-构型环氧化合物的对映体过剩值为99%(收率39%),R-二醇的对映体过剩值为96%(收率49%),E值高达260。

微生物环氧化合物水解酶的底物谱很广,包括各种外消旋的、潜手性的脂肪族或芳香族环氧化合物。但是,不同的酶其底物专一性差别很大。Faber等^[7]报道了*Nocardia* EH1环氧化合物水解酶催化2-甲基-1,2-环氧庚烷的选择性水解,该反应具有绝对选择性,可以获得很高光学纯度的R-二醇和S-环氧化合物。但是与哺乳动物环氧化合物水解酶不同的是,*Nocardia* EH1不能以内消旋的环氧化合物为底物。

3.2 对映体选择性(Enantioselectivity) 一般情况下,环氧化合物水解酶优先水解R-构型的环氧化合物,但也有少数环氧化合物水解酶优先水解S-构型的环氧化合物。Furstoss^[8]等筛选到了两株高选择性的环氧化合物水解酶菌株,在拆分对-氯-苯基环氧乙烷的水解反应中,*A. niger*抽提酶粉优先水解R-构型底物,得到的S-构型环氧化合物的对映体过剩值为99%(收率47%),R-二醇的对映体过剩值为92%(收率48%),E值高达100;而*S. tuberosum*抽提酶粉优先水解S-构型底物,得到的R-构型环氧化合物的对映体过剩值为99%(收率47%),R-二醇的对映体过剩值为96%(收率47%),E值高达100。

3.3 区域选择性(Regioselectivity) 在环氧化合物水解酶催化的水解反应中,受到亲核攻击的可能是环氧乙烷三元环上的任意一个碳原子,随底物取代基和环氧化合物水解酶种类的不同而异,因而反应的区域选择性差别很大。

对于单取代的底物,由于分子非常纤细,柔性较大,因而酶促反应的手性识别困难,区域选择性不高。对于1,2-二取代的环氧化合物,其区域选择性非常高,受到亲核进攻的一定是较少取代基的碳原子。而对于2,3-二取代的环氧化合物,其区域选择性差别也很大,酶的亲核进攻可能出现在环氧乙烷不同碳原子上。对于含苯基的环氧化合物,由于苯环的电负性较高,环氧乙烷上连接苯环的手性碳原子易形成稳定的碳正离子。尽管存在较大的立体障碍,但是受到酶的亲核进攻并形成酯中间体的仍然是

该碳正离子, 因而反应的立体选择性很高^[9]。

3.4 构型逆转 (Configuration inversion) 与对映会聚 (Enantioconvergent) 在环氧化合物水解酶与环氧乙烷结合的过程中, 因酶亲核进攻不同的碳原子, 底物的构型可能被

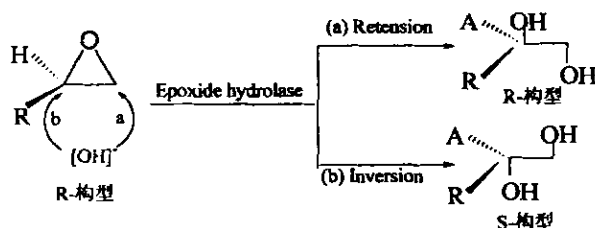


图 1 环氧化合物水解酶水解反应的立体化学

保留, 也可能发生逆转 (图 1)。在一些环氧化合物的选择性水解反应中, 由于环氧化合物水解酶对两个对映异构体中环氧乙烷两个碳原子亲核结合的不同, 同时由于构型逆转现象存在, 会形成一种所谓的对映会聚现象 (消旋的混合物变成单一的对映体)。

利用两种选择性互补的环氧化合物水解酶共同催化环氧化合物的水解, 可以实现对映会聚。Furstoss 等^[10]研究了苯基环氧乙烷的选择性水解, *A. niger* 环氧化合物水解酶优先与 R-对映体的 1 位碳原子结合, 产物为 S-构型环氧化合物 (96% ee) 和 R-二醇 (51% ee); *B. Sulfurescens* 的选择性相反, 环氧化合物水解酶优先与 S-对映体的 2 位碳原子结合, 并且在水解的过程中手性碳原子发生了构型的转变, 产物为 R-构型环氧化合物 (98% ee) 和 R-二醇 (83% ee)。当利

用两种微生物共同催化苯基环氧乙烷的水解时, 最后得到 89% 对映体过剩值的 R-二醇, 转化率高达 92% (图 2)。通过化学-酶法, 也可以实现对映会聚。

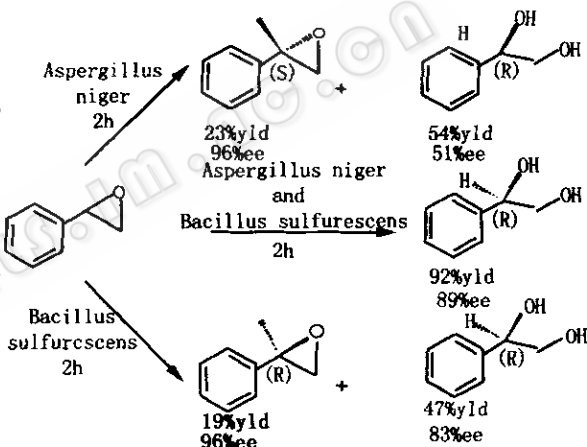


图 2 R-1-苯-1, 2-乙二醇的对映会聚合成

4 微生物环氧化合物水解酶在合成上的应用

随着被发现的微生物环氧化合物水解酶种类的增多, 其应用方面的研究也不断深入。许多实验研究已经扩大到生物反应器中, 光学活性环氧化合物的制备规模已经达到几十克的水平。在这些拆分反应中, 不仅使用了生物反应器, 而且采用了高底物浓度、两相体系, 甚至用自来水代替缓冲液等多种新的方法, 展现了良好的应用前景。

Weijers 等^[11]报道了在水-有机溶剂两相体系中, 利用酵母细胞 *Rhodotorula glutinis* 环氧化合物水解酶进行了大规模的拆分反应, 获得了高浓度 (0.9 mol/L)、高光学纯度 (98% ee) 的 (S)-1, 2-环己烷 (6.5 g, 30% 收率)。在级联的中空纤维膜生物反应器中进行连续转化时, 比产率为 $3.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 运行 12 d, 获得了 38 g 高光学纯度 (98% ee)

的(S)-1,2-环氧己烷。

在药物合成方面,利用环氧化合物水解酶制备光学活性的环氧化合物,解决了许多重要的生物活性物质合成途径上的限制性环节。Faber等^[12]利用冷冻干燥的*Rhodococcus equi* IFO 3730细胞对底物进行不对称水解开环,得到了一种合成松树甲虫信息素的重要中间体——(S)-Frontalin。Furstoss的研究小组利用黑曲霉选择性水解环氧苈烯底物,获得了光学纯的6,7-双羟基香叶醇(dihydroxylgeraniol)和(4S,8S)-防风根醇(bisabolol),后者是护肤品、洗涤剂和多种软膏的重要成分。在拆分(±)- α -甲基-异丁基苯基环氧乙烷的反应中,他们还采用了化学-酶法。首先通过黑曲霉催化的不对称水解获得了S-构型环氧化合物,然后将生成的R-二醇采用化学的方法环化为消旋的环氧化合物继续进行拆分。(S)- α -甲基-异丁基苯基环氧乙烷在开环后可以转化成重要的生物活性药物——S-布洛酚(Ibuprofen)^[13]。同时,他们利用该环氧化合物水解酶拆分330mmol/L的对-硝基苯基环氧乙烷(54g/L),经过6h的水解反应得到了光学纯度高达99%的S-构型环氧化合物,然后在酸性条件下对产物进行水解及重结晶获得了光学纯度为98%的R-二醇,最后加氨合成了 β -阻断剂类手性药物尼芬尔醇(Nifénalol)^[14]。这种化学酶法在拆分外消旋环氧底物获得光学活性环氧中间体以制备药物(R)-3,5-二羟-3-甲基戊酸内酯的合成中得到了应用^[15]。此外,Furstoss等^[8]还报道了利用两种选择性互补的微生物*A. niger*和*S. tuberosum*环氧化合物水解酶,共同催化对-氯苯基环氧乙烷的不对称水解反应,得到了神经保护药物Eliprodil[®]的关键性手性合成子——光学活性的R-二醇,其对映体过剩值高达96%,转化率达93%。利用真菌*S. tuberosum*环氧化合物水解酶水解茚环类环氧化合物,他们还获得了抗爱滋病药物齐夫尔定(Indinavir[®])的重要前体物质:光学纯度为98%的(1R,2S)——环氧化合物(收率20%)和光学纯度为69%的(1R,2R)——二醇(收率48%)。

5 结论与展望

由于外消旋环氧化合物的制备非常简单,与不对称化学合成法及其它生物转化法相比,通过微生物环氧化合物水解酶的拆分反应来制备各种光学活性的环氧化合物和邻位二醇中间体是一种高效、高选择性的生物转化法,符合“绿色化学”和“原子经济”的原则,必将在有机合成及药物制备领域发挥日益重要的重用。

但是,在酶法拆分的扩大试验中也存在两个比较突出的问题:(1)底物的溶解性较差;(2)高浓度的底物对反应有抑制作用。选择非水相反应体系进行酶促生物转化将是一个比较好的解决方案。

参考文献

- [1] Orru R V A, Mayer S F, Kroutil W, et al. Tetrahedron, 1998, 54: 859 ~ 874.
- [2] Archer I V J, Leak D J, Widdowson D A. Tetrahedron letter, 1996, 37: 8819 ~ 8822.
- [3] Botes A L, Weijers C A G M, van D. Biotechnol Letter, 1998, 20: 421 ~ 426
- [4] Genzel Y, Archelas A, Broxterman Q B, et al. Tetrahedron Asymmetry, 2000, 11: 3041 ~ 3044.
- [5] Rink R, Spelberg J H K, Pieters R J, et al. J Am Chem Soc, 1999, 121: 7417 ~ 7418
- [6] Cleij M, Archelas A, Furstoss R. Tetrahedron Asymmetry, 1998, 8: 1839 ~ 1842.
- [7] Osprian I, Kroutil W, Mischitz M, et al. Tetrahedron Asymmetry, 1997, 18: 65 ~ 71.

- [8] Manoj K M, Archelas A, Bratti J, *et al.* Tetrahedron, 2001, 57: 695 ~ 701.
- [9] Romano V A O, Kurt F. Curr Opin Chem Biol, 1999, 31: 71 ~ 86.
- [10] Pedragosa-Moreau S, Archelas A, Furstoss R. Tetrahedron, 1996, 52: 4593 ~ 4606.
- [11] Choi W J, Choi C Y, de Bont J A M, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54: 641 ~ 646.
- [12] Kroutil W, Osprian I, Mischitz M, *et al.* Synthesis, 1997, 2: 156 ~ 158.
- [13] Cleij M, Archelas A, Furstoss R. J Org Chem, 1999, 64: 5029 ~ 5035.
- [14] Pedragosa-Moreau S, Morisseau C, Baratti J, *et al.* Tetrahedron, 1997, 53: 9707 ~ 9714.
- [15] Orru R V A, Osprian I, Kroutil W, *et al.* Synthesis, 1998, 63: 1259 ~ 1263.