

酶法拆分腈类制备光学活性 2-芳基丙酸

徐诗伟 徐 清

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

在有机合成中, 腈基易作为“水稳定负碳离子”引入有机化合物, 而腈类化合物则是一种多用途的中间体, 能转化为胺、酰胺、羧酸和羰基化合物等。用微生物酶水解腈为酰胺和羧酸时, 由于反应条件温和(如 pH 和温度)以及纯的产物使之成为一种很有吸引力的方法, 迄今在工业生产上已有许多成功的例子^[1]。这些年, 颇有意义的是研究用微生物酶立体选择性水解腈类制备光学活性 2-芳基丙酸(2-APA), 光学活性 2-APA 可作为药物活性基质特别是作为非甾体抗炎药(NSAID)应用。由药理临床的新研究表明 2-APA 类 NSAID 的一对对映体中仅 S(+)-构型显示高的药理作用, R(-)-构型活性低或无作用。鉴于一般化学反应所产生的手性中心总是得到等量的一对对映体混合物, 称之为外消旋体。欲得到光学纯

S(+)-2-APA, 拆分外消旋体是主要方法之一。一般说来, 采用化学法拆分需用手性衍生试剂, 价格较贵, 且过程冗长, 较难得到满意的结果。近年来, 手性色谱法分离对映体已迅速发展成为药物立体选择性的药理学和毒理学研究的一种主要分析手段广为应用。此外, 手性色谱还适用于制备小量样品, 具有简便快速, 分离效果好和光学纯度高等优点。而用微生物酶法拆分则可提供一个经济的选择, 尤其将固定化、多相反应、膜反应器和基因克隆等新技术引入酶促反应使生物法拆分更具特色^[2-5]。最近, 开展用微生物酶立体选择性水解拆分(±)-2-芳基丙腈(2-AP-CN)制备 S(+)-2-APA 的研究已引起人们的关注。本文就其两种不同的拆分途径作一简要介绍(图 1)。

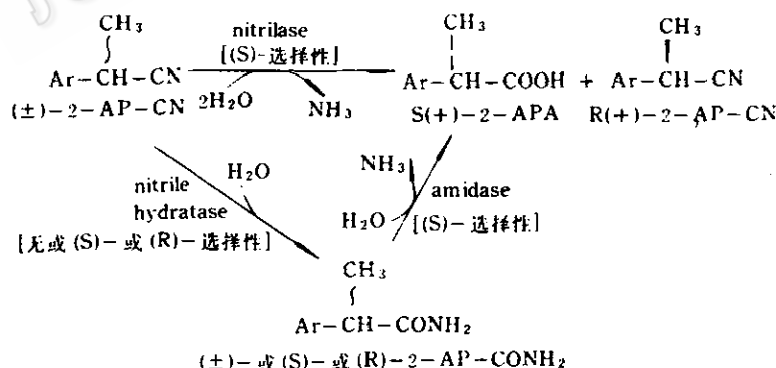


图 1 酶法水解拆分(±)-2-AP-CN 制备 S(+)-2-APA 的两种途径

1 腈水解酶(nitrilase)直接立体选择性水解拆分(±)-2-AP-CN 为 S(+)-2-APA

首先, 发现玫瑰色红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*) J1 产生的腈水解酶既可作用于脂族腈, 也可作用于芳香族腈水解为相应羧酸^[6]。

此后, 又分离出玫瑰色红球菌 K22 脂族腈酶^[7]和粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*) JM3 芳基乙腈酶^[8]。这些微生物腈水解酶的发现扩大了

1994-01-15 收稿

腈转化为羧酸的范围。Yamamoto 等^[9,10]筛选的一些微生物,可立体选择性水解腈或酰胺制备 S (+)-2-APA,其中产生 S (+)-2-苯丙酸或 S (+)-布洛芬 (ibuprofen) 的微生物 (表 1)。表 1 中一株由土样富集培养分离出的不动杆菌 (*Acinetobacter* sp) AK226 能高度立体选择性水解 (±)-2-(4-异丁基苯) 丙腈 (Ibu-CN) 为 S (+)-布洛芬。用该菌休眠细胞水解 (±)-Ibu-CN,可产生对映体过量 (ee) 95% 的 S (+)-布洛芬, $[\alpha]_D^{20} + 54.0^\circ$, 收率 23%, 没有伴随产生 2-(4-异丁基苯) 丙酰胺 (Ibu-CONH₂), 也不水解 Ibu-CONH₂ 为 S (+)-布洛芬。可见,该不动杆菌仅产腈水解酶,

对 S (-)-Ibu-CN 具有高度选择性。高木等^[11]采用多孔纤维素微粒高密度固定化不动杆菌 AK226 细胞进行制备 S (+)-布洛芬的尝试。固定化微生物生长可达每克微粒 1.32g 干细胞,其水解 (±)-Ibu-CN 得到 35% 的 S (+)-布洛芬。Yamamoto 等^[12,13]在筛选不动杆菌同时,还曾得到分枝杆菌 (*Mycobacterium* sp) AC777 和棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp) KO-2-4 均能高度立体选择性水解 (±)-2-(6-甲氧基-2-萘) 丙腈得到 S (+)-萘普生 (naproxen), ee 为 99%, $[\alpha]_D^{20} + 68.4^\circ$, 收率分别为 37.8% 和 36.7%。

表 1 微生物立体选择性水解腈或酰胺
制备 S (+)-2-苯丙酸或 S (+)-布洛芬

微生物	S (+)-2-苯丙酸		S (+)-布洛芬	
	(±)-2-苯丙腈	(±)-2-苯丙酰胺	(±)-Ibu-CN	(±)-Ibu-CONH ₂
<i>Corynebacterium</i> sp C5	4.17 (99)	4.00 (94)	4.26 (30)	4.99 (55)
<i>C. nitrilophilus</i> ATCC21419	0.15 (100)	4.62 (99)	0.03 (16)	3.09 (60)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO3925	0.01 (99)	1.00 (100)	0.02 (57)	1.45 (91)
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC8750	0.02 (32)	4.44 (75)	0.06 (35)	2.70 (80)
<i>Rhodococcus</i> sp AK32	0.75 (94)	0.73 (98)	0.83 (98)	0.82 (96)
<i>Acinetobacter</i> sp AK226	13.9 (54)	ND	17.5 (97)	ND
<i>Bacillus subtilis</i> CN-5	9.70 (98)	1.45 (100)	0.76 (82)	1.36 (99)
<i>Mycobacterium</i> sp AC777	2.72 (100)	2.74 (99)	0.83 (30)	ND

“a” 产酸规定为每毫克干细胞 n mol/h; 括号内数字表示酸的光学纯度 (%) = $[S / (S + R)] \cdot 100$

“ND” 为未被检出

2 腈水合酶 (nitrile hydratase) 和酰胺酶 (amidase) 相结合立体选择性水解拆分 (±)-2-AP-CN 为 S (+)-APA

用两种酶结合水解腈为相应羧酸反应中,酰胺为中间产物。第一种酶水合腈为酰胺,第二种酶水解酰胺为羧酸。Gilligan 等^[14]从土壤中分离到的马红球菌 (*R. equi*) TG328 能有效水解拆分 (±)-2-苯丙腈为 S (+)-2-苯丙酸。这一转化由上述两种酶催化,即首先由无立体选择性的腈水合酶使 (±)-2-苯丙腈转化为 (±)-2-苯丙酰胺,然后由另一种具有高度立体选择性的酰胺酶水解 S (+)-酰胺为 S (+)-2-苯丙酸。用马红球菌 TG328 休眠细胞在 10℃

下反应 30h 可产生 100g/L S (+)-2-苯丙酸, ee 99.4%; 同时分离出 ee 99.0% R (-)-2-苯丙酰胺。此外,作者还发现一些菌株显示出腈水合酶活力,它们对 (±)-2-苯丙腈的一种对映体有立体专一性,可用于制备 S (+)-或 R (-)-2-苯丙酰胺。Cerbelaud 和 Mayaux 等^[15,16]也曾发现具有酰胺酶活力的短杆菌 (*Brevibacterium* sp) R312 能立体选择性水解一些 (±)-2-芳基丙酰胺 (如 2-苯丙酰胺) 和 2-芳氧基丙酰胺 [如 2-(4-羟基苯氧) 丙酰胺], 分别得到相应 S (+)-或 R (-)-羧酸, ee 93—95%。短杆菌 R312 的完整细胞和可溶性的细胞提取液中含酰胺酶活力分别为每毫克细菌蛋

白 0.25 和 0.40u; 将 R312 粗酶提取液经硫酸铵分级沉淀、苯-琼脂糖色谱和凝胶过滤等步骤纯化; 纯化后比活力提高 31 倍, 纯度约 80%, 回收率 6.3%, 纯蛋白的立体选择性 $ee > 95\%$; 测定纯化后酰胺酶的蛋白质序列, 进行菌落杂交, 基因克隆到大肠杆菌中表达酶活, 由核苷酸序列分析得到证实酰胺酶基因与腈水合酶基因耦合的结构证据。Turner 等^[17,18]用固定化完整细胞催化剂 SP361 (由红球菌 CH5 细胞固定在离子交换树脂上得到) 转化各种 2-烷基芳基乙腈或酰胺制备光学活性酰胺和/或羧酸时, 用 (±)-2-苯丙腈、(±)-2-苯丁腈、(±)-2-(4-甲基苯) 丙腈和 (±)-Ibu-CN 及其相应结构的酰胺作为转化基质, 发现 SP361 水解前三种腈得到 (R)-酰胺和 (S)-羧酸; 而水解 (±)-Ibu-CN 得到只是 (R)-羧酸, 没有酰胺产生。另一方面, 用 SP361 水解 (±)-2-苯丁酰胺、(±)-2-(4-甲基苯) 丙酰胺和 (±)-Ibu-CONH₂ 时均得到 (S)-羧酸。可见, SP361 酶系含有较好的立体选择性催化上述两类不同

反应的腈水合酶和酰胺酶, 而无腈水解酶活力。底物腈结构的不同可影响产物羧酸的绝对构型, 作者推测了该酶系对上述不同腈的两种作用模式。此外, 还发现 SP361 酶系还具有立体选择性水解潜手性二腈化合物的能力。

3 两种水解拆分途径的结合

Takeya 等^[19]筛选以 2-氰基乙醇或苄腈作为唯一氮源生长的微生物, 选到一株丁烷红球菌 (*R. butanica*) ATCC21197, 发现降解腈的三种酶 (腈水解酶、腈水合酶和酰胺酶) 是由在培养基中添加 ϵ -己内酰胺诱导产生的, 能成功地动态拆分 (±)-2-AP-CN, 如 (±)-Ibu-CN, (±)-2-(4-氯苯) 丙腈和 (±)-2-(4-甲氧基苯) 丙腈为 (R)-酰胺和 (S)-羧酸。除了得到满意收率 (S)-羧酸外, 还均得到好收率和高 ee 的 (R)-酰胺 (表 2)。可见, 该酶系按图 1 两种途径进行水解拆分, 其中以腈水合酶与酰胺酶相结合方式为主, 且腈水合酶活力最高。

表 2 微生物立体选择性水解 2-芳基丙腈

底 物 (±)-2-AP-CN	反应时间 (h)	收率 (%) / ee (%)		
		(S)-2-AP-CN	(R)-2-AP-CONH ₂	(S)-2-APA
(±)-Ibu-CN	3	56/27	30/95	6/75
	6	21/73	48/99	13/87
	24	-	27/95	60/15
(±)-2-(4-氯苯) 丙腈	6	-	46/76	13/99
	24	-	34/99	30/43
(±)-2-(4-甲氧基苯) 丙腈	6	-	45/99	47/99
	24	-	37/99	59/53

由于 (R)-酰胺在酸性条件下 [6N 硫酸/醋酸 (1:2), 回流 12h] 水解为 (R)-羧酸, 本质上不发生消旋化。因此利用丁烷红球菌可同时制备 2-APA 的一对对映体。此外, 还发现该菌能水解各种光学活性腈醇得到完全保留构型的 α -羟基酸^[20]。Gilligan 等^[14]对上述两种由腈类制备 S(+)-2-APA 的不同途径曾有所评价。用腈水解酶直接水解时, 由于反应所剩下 R(+)-2-AP-CN, 通常对细胞物理损伤较大, 能抑制腈水解酶活力。其次, 腈还是一种

催泪毒剂, 对人类健康会构成危害。在用腈水合酶和酰胺酶相结合水解体系中, 未反应的基质 2-AP-CONH₂ 对细胞损害较小, 且不易挥发, 因此下游纯化过程较安全。在双酶配合过程中, 也发现腈水合酶常受酰胺酶反应产物 S(+)-羧酸和铵离子的抑制。抑制作用是因腈水合酶活性中心趋于疏水性, 当存在上述产物时, 能与酶以盐桥型相互作用, 形成稳定的络合物成为竞争性抑制剂。纵观上述, 在利用微生物酶制备 S(+)-2-APA 中, 立体选择性水解腈

类开辟了可供选择的又一新途径。90 年代以来,已成为许多研究者所关注,将成为手性化合物(腓、酰胺和羧酸)的研究和制备的一个新热点。

参 考 文 献

- [1] Nagasawa T, Yamada H. Trends Biotechnol, 1989, 7: 153—158.
- [2] Santaniello E, Ferraboschi P, Grisenti P, *et al.* Chem Rev, 1992, 92: 1071—1140.
- [3] 徐诗伟, 徐清. 微生物学通报, 1993, 20 (4): 232—237.
- [4] 徐诗伟, 徐清. 中国医药工业杂志, 1995, 26 (1): 38—42.
- [5] 徐诗伟, 徐清. 微生物学通报, 1995, 22 (2): 待发表.
- [6] Nagasawa T, Nakamura T, Yamada H. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 34: 322—324.
- [7] Kobayashi M, Yanaka N, Nagasawa T. Tetrahedron, 1990, 46: 5587—5590.
- [8] Mauger J, Nagasawa T, Yamada H. Arch Microbiol, 1990, 155: 1—6.
- [9] Yamamoto K, Otsubo K, Oishi K. Eur Pat, 1989, 0348901.
- [10] Yamamoto K, Ueno Y, Otsubo K, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 3125—3129.
- [11] 高木睦, 城風淳一. JP, 1992, 4—365483.
- [12] 山本敏三, 大坪一政, 上野雄二. JP, 1991, 3—224496.
- [13] 大坪一政, 山本敏三. JP, 1993, 5—76390.
- [14] Gilligan T, Yamada H, Nagasawa T. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39: 720—725.
- [15] Cerbelaud E, Petre D. Eur Pat, 1988, 0330529.
- [16] Mayaux J F, Cerbelaud E, Soubrier F, *et al.* J Bacteriol, 1990, 172: 6764—6773.
- [17] Cohen M A, Parratt J S, Turner N J. Tetrahedron: Asymmetry, 1992, 3: 1543—1546.
- [18] Beard T, Cohen M A, Parratt J S, *et al.* Tetrahedron: Asymmetry, 1993, 4: 1085—1104.
- [19] Kakeya H, Sakai N, Sugai T, *et al.* Tetrahedron Lett, 1991, 32: 1343—1346.
- [20] Kakeya H, Sakai N, Sugai T, *et al.* Agric Biol Chem, 1991, 55: 1877—1886.