

微水相中杏仁醇腈酶催化不对称合成 (R) - 氰醇的研究*

刘森林 宗敏华** 涂 然 周 番

(华南理工大学生物工程系, 广州 510640)

摘要 利用气相色谱手性分析, 研究了微水相中来源于杏仁的 (R) - 醇腈酶催化醛与 HCN 不对称合成 (R) - 氰醇. 结果表明, 反应时间、添加乙酸、反应介质、反应体系水活度、反应温度和底物的结构对醇腈酶反应均有显著影响. 杏仁醇腈酶对芳香族、脂肪族和杂环族醛均有良好的催化作用. 其中, 苯甲醛为杏仁醇腈酶的最适作用底物, 在低温 (0~5℃) 下, 转化率和产物对映体过剩值均在 99% 以上.

关键词 微水相, 杏仁醇腈酶, 不对称合成, (R) - 氰醇

学科分类号 Q556.1

不对称生物合成与转化是 90 年代以来国内外生物工程学和有机合成化学最为活跃的研究领域之一. 光学活性氰醇是一类重要的手性合成中间体, 它很容易转化为 α -羟基酸 (酯)、 α -羟基醛 (酮)、 α -氨基酸、 β -胺基醇和邻二醇衍生物等多种具有重大应用价值的手性中间体^[1]. 这些中间体不仅为现代不对称合成研究提供了富有学术价值的光学活性构体, 而且本身还是能够产生巨大商业价值的重要医药和农药中间体^[2]. 因此, 在不对称合成领域中, 光学活性醇腈的合成堪称颇具挑战性的课题. 各种化学和生物方法相继见诸报道^[3,4], 归纳起来主要包括: 手性底物诱导的氰基对手性醛 (酮) 的不对称加成反应; 手性催化剂诱导氰基对潜手性醛 (酮) 的不对称加成生成光学活性氰醇; 外消旋体氰醇的拆分等. 其中, 醇腈酶 (oxynitrilase/hydroxynitrile lyase, E. C. 4.1.2.10) 催化醛与 HCN 不对称合成光学活性氰醇的方法, 因其在反应条件、产物得率、光学纯度和底物适用范围等方面均较其他方法胜出一筹, 故成为该领域的研究热点^[5]. 醇腈酶催化不对称合成手性氰醇的研究在酶反应条件的优化、新反应体系的建立、酶反应的立体专一性、区域选择性、底物适用性等方面均值得研究和探讨. 迄今, 尚未见系统研究微水相中各种反应条件对醇腈酶催化不对称合成手性氰醇的报道. 本文研究了微水有机相中来源于杏仁的 (R) - 醇腈酶催化醛与 HCN 不对称合成 (R) - 氰醇, 并系统探讨了微水有机相中添加乙酸、有机溶剂、水活度、反应温度和底物结构对不对称合成

的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

杏仁醇腈酶为市售苦杏仁粉碎后经乙酸乙酯脱脂制得的粗制酶制剂^[6]; HCN 由 KCN 与乙酸反应制得; 内标正十四烷购自 Sigma 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 0.4 nm 分子筛于 180℃ 干燥箱内活化 2 h, 置干燥器中冷却后, 加入有机溶剂 (除在研究有机溶剂的影响时用到其他有机溶剂外, 均用异丙醚为有机溶剂) 中, 室温振荡 48 h, 滤去分子筛, 得脱水有机溶剂.

1.2.2 水活度的控制: 酶反应前, 将酶冻干后, 与底物、反应介质分别置于密闭容器中, 对不同盐的饱和水溶液气相平衡 72 h, 使酶及反应介质的水活度与饱和盐水溶液的水活度相同. LiCl ($a_w = 0.12$), MgCl₂ ($a_w = 0.32$), Mg (NO₃)₂ · 6H₂O ($a_w = 0.55$), NaCl ($a_w = 0.75$), KCl ($a_w = 0.86$), H₂O ($a_w = 1$).

1.2.3 醇腈酶催化不对称合成反应: 在 50 ml 带塞三角瓶中装入 10 ml 含有 750 mmol/L HCN、300 mmol/L 醛的脱水有机溶剂, 添加 90 μ l 正十四烷 (内标)、预定量的乙酸于其中, 加入 1.5 g 酶

* 广东省自然科学基金资助项目 (980543).

** 通讯联系人.

Tel: 020-87111452, E-mail: senlinliu@163.net

收稿日期: 2000-07-19, 接受日期: 2000-08-23

制剂开始反应, 于预定温度, 120 r/min 水浴振荡. 定时取样 0.1 ml.

1.2.4 转化率、反应速度及产物光学纯度的测定: 向 0.1 ml 样品中加入 60 mmol/L 吡啶和 60 mmol/L 乙酸酐, 于 30 °C 条件下酯化 3 h (产物氰醇 99% 以上转化成相应的酯). 衍生样品供气相色谱分析. 采用内标法计算底物和产物的量 (内标为正十四烷). 根据底物醛的减少计算转化率, 以初始反应时间内, 醛在单位时间内的减少量计算初始反应速度, 根据衍生产物酯两种异构体的量, 计算光学纯度 (用对映体过剩值 $ee\%$ 表示). 对映体过剩值 $ee\% = (A-B)/(A+B)$ (其中: A 、 B 分别表示反应后氰醇衍生物酯两对映体 R、S 的量).

1.2.5 气相色谱分析. 仪器: HP4890D 气相色谱仪, 配备 3398A 工作站, 氢火焰离子检测器; 手性柱: β -Cyclodextrin 柱, 柱径 0.32 mm, 柱长 30 m (美国惠普公司). 分析条件: 气化室温度: 260 °C, 检测室温度: 300 °C, 柱温: 120 °C 维持 2 min 后, 5 °C/min 升温至 180 °C; 载气: 氮气, 流速为 2.3 ml/min; 分流比: 1:100; 进样量: 1 μ l.

2 结果与讨论

2.1 反应过程曲线

在 10 ml 含有 150 μ l 乙酸、水活度为 0.86 的异丙醚中, 常温 (25 °C) 下, 来源于苦杏仁的 (R)-醇腈酶催化苯甲醛与 HCN 不对称合成 (R)-氰醇的反应过程曲线如图 1 所示. 反应前 2 h,

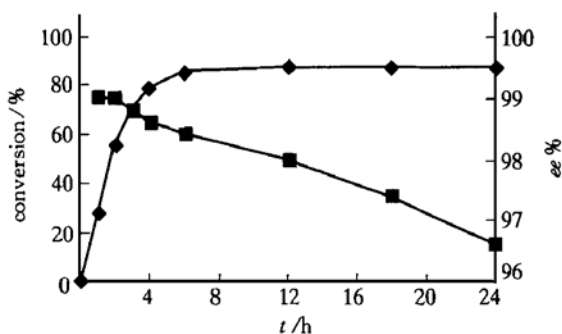


Fig. 1 Reaction time course of the asymmetric synthesis of chiral cyanohydrin catalysed by (R)-oxynitrilase from benzaldehyde and hydrogen cyanide
◆ —◆: conversion; ■ —■: $ee\%$

转化率随反应时间直线上升, 对映体过剩值 ($ee\%$) 高达 99% 以上; 此后, 酶反应速度逐渐下降, 至反应 12 h, 反应达到平衡, 转化率和产物 $ee\%$ 分别达 88% 和 98%. 随反应的进一步增加,

转化率基本不变, 而产物的光学纯度逐步下降. 这是由于生成的光学活性氰醇进一步外消旋化之故^[7]. 可见, 选择适当的反应时间对获得高转化率的同时得到较高的光学纯度至关重要.

2.2 添加乙酸对酶反应的影响

在 10 ml 异丙醚为反应介质的醇腈酶反应体系中, 分别添加不同量的乙酸, 反应进行 6 h 和 12 h 的转化率和产物对映体过剩值 $ee\%$ 分别列于表 1.

Table 1 Effect of acetic acid on enzymatic reaction

V (Acetic acid) / μ l	pH	t = 6 h		t = 12 h	
		Conversion/ %	ee %	Conversion/ %	ee %
0	6.4	62	87	82	86
50	4.9	69	95	87	93
100	4.7	84	97	87	95
150	4.5	86	98	88	98
200	4.3	84	98	87	97
300	4.0	80	98	86	97
400	3.7	78	98	86	97
500	3.5	74	98	86	97

reaction medium: 10 ml diisopropyl ether; substrate: benzaldehyde; t = 25 °C.

结果表明, 在不添加乙酸的情况下, 产物的光学纯度较低 ($ee\%$ 为 87%); 当向反应体系中添加适量的乙酸时, 由于乙酸抑制了 HCN 解离成有利于非酶反应的 CN^{-1} 离子, 从而大大降低了生成外消旋产物的非酶反应, 因此, 产物的光学纯度显著提高. 同时, 添加乙酸也可影响酶反应的速度. 当添加乙酸量较小时, 随着乙酸量的增加, 醇腈酶反应速度不断增加; 当添加乙酸量较多时, 酶反应速度反而有所下降. 这是由于能生成氢键的乙酸可代替酶分子表面的部分水充当酶分子的润滑剂, 使酶活性中心的极性和柔性增大, 并通过非共价作用力来维持其催化活性构象, 从而提高酶的活性^[8]. 然而, 过量的乙酸又可降低酶周围微环境的 pH 值, 改变酶活性部位上有关基团的解离状态, 改变酶分子的活性构象, 故酶的活性反而有所下降. 而且, 由表 1 可见, 乙酸量在 150 μ l 以上时对转化率和产物 $ee\%$ 影响不大, 这是由于乙酸对反应平衡点影响甚微, 而添加 150 μ l 乙酸足以抑制非酶反应之故. 另外, 由于乙酸酸性较弱, 添加适量的乙酸对酶的稳定性影响甚小. 综合考虑反应速度和产物的光学纯度等因素, 乙酸的添加量以 150 μ l 左右为宜.

2.3 有机溶剂对酶反应的影响

有机溶剂作为反应介质, 对酶的催化反应起着

重要作用. 它不仅影响反应平衡点和酶反应的对映体选择性, 而且酶在不同有机溶剂中的活性也有显著差异 (表 2). Lanne 等^[9]通过研究发现, 脂肪酶活性与有机溶剂的疏水性 (用一种溶剂在辛醇/水两相之间分配系数的常用对数值, 即 $\lg P$ 表示) 有密切的关系, 当选用疏水性较强的有机溶剂时, 酶具有较高的活性. 本研究选用不同疏水性的 5 种有机溶剂作为醇腈酶反应介质. 结果发现, 微水有机相中醇腈酶活性并不符合上述 $\lg P$ 规律. 在本研究范围内, 醇腈酶在疏水性最弱的乙酸乙酯中活性较低, 但在疏水性较弱的异丙醚中, 酶反应速度、转化率和立体选择性较疏水性较强的甲苯、环己烷和正己烷均胜出一筹. 可见, 有机溶剂特性对非水相酶反应的影响因酶类的不同而异.

Table 2 Effect of organic solvents on enzymatic reaction

	Ether acetate	Diisopropyl ether	Toluene	Cyclohexane	Hexane
$\lg P$	0.68	1.9	2.5	3.0	3.5
$v / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	6	84	55	30	31
t / h	12	12	24	24	24
Conversion/ %	9	88	54	26	27
ee %	96	98	96	91	90

reaction medium: 10 ml organic solvent, 150 μl acetic acid; substrate: benzaldehyde; $t = 25^\circ\text{C}$.

2.4 水活度对酶反应的影响

酶蛋白的水化作用是维持酶催化活性构象的必要条件. 完全没有水, 酶的催化作用不可能发生. 在微水有机相酶反应体系中, 尽管水含量很低, 但总有一部分与酶分子紧密结合的水化层, 将酶分子与大量可使酶失活的有机介质隔离开来, 以维持酶的活性. 而且, 酶蛋白的结合水可削弱各极性残基间的相互作用, 使其彼此分开, 增大酶活性位点的柔性, 降低酶与底物间形成过渡态的能阈, 故酶的水化作用可提高酶的活性. 然而, 过量的水则可能在酶分子周围形成水簇, 影响传质, 导致酶反应速度降低. 为了揭示反应体系水活度对醇腈酶催化不对称合成氰醇的影响, 作者比较了在不同水活度的反应体系中的酶反应 (图 2). 由图 2 可见, 当体系水活度小于 0.55 时, 酶反应速度和酶反应的立体选择性均较低. 这是因为水活度较低时, 反应体系中的水不足以形成酶发挥催化功能所需的水化层, 酶分子未被活化, 酶反应速度较低, 而无立体选择性的非酶反应速度一定, 故产物光学纯度也较低. 当水活度大于 0.55, 酶分子被逐渐活化, 酶

反应速度和产物的光学纯度均随体系水活度的增加而迅速增加. 但当水活度超过 0.86 后, 酶反应速度反而有所下降. 故该反应体系的水活度以 0.86 左右为宜.

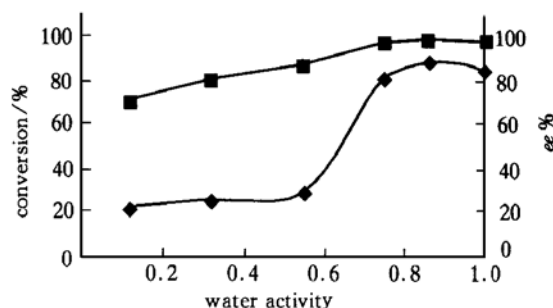


Fig. 2 Effect of water activity enzymatic reaction

reaction medium: 10 ml diisopropyl ether, 150 μl acetic acid; substrate: benzaldehyde; $t = 25^\circ\text{C}$. $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: conversion; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: ee %.

2.5 反应温度对酶反应的影响

温度可影响醇腈酶反应速度, 但更重要的是影响最终转化率和产物的光学纯度 (表 3). 温度适

Table 3 Effect of temperature on enzymatic reaction

$t / ^\circ\text{C}$	$v / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	t / h	Conversion/ %	ee %
0	15	48	> 99	> 99
5	21	48	> 99	> 99
10	28	48	98	99
15	32	48	97	99
25	67	24	88	98
35	80	12	79	96
50	100	6	65	92

reaction medium: 10 ml diisopropyl ether, 150 μl acetic acid; substrate: benzaldehyde; water activity: 0.86.

当降低, 酶反应速度有所下降, 而转化率和产物光学纯度均有显著提高. 当温度从 50°C 下降到 15°C , 转化率从 65% 增加到 97%, 产物 ee% 从 92% 提高到 99%, 而转化率和产物 ee% 在 $0 \sim 5^\circ\text{C}$ 时均高达 99% 以上. 这是由于醇腈酶促不对称合成反应是一放热反应, 温度降低有利于反应平衡向氰醇合成的方向移动, 故平衡转化率不断提高. 同时, 醇腈酶反应的活化能较无立体选择性非酶反应的活化能低得多. 提高温度, 活化能较高的非酶反应速度增加的幅度比活化能较低的酶反应大得多. 换言之, 温度升高有利于活化能较高的非酶反应, 而温度降低则有利于活化能较低的酶反应. 即在较低温度下, 醇腈酶反应速度远远大于无立体选择性非酶反应的速度, 故可获得较高的光学纯度. 可见, 为获得高

转化率和高光学纯度, 应选择低温 0~ 5 °C 为佳.

2.6 底物醛的结构对酶反应的影响

来源于杏仁的醇腈酶对底物有较强的特异性. 在以不同的醛为底物时, 醇腈酶反应的转化率和产物的光学纯度存在较大的差异. 为了研究醇腈酶对醛结构的特异性, 作者比较了微水有机相中其催化 7 种不同的醛与 HCN 不对称合成 (R) - 氰醇 (表 4). 结果表明, 芳香族、脂肪族和杂环族醛均

着脂肪醛碳链的增长, HCN 亲核进攻醛与醇腈酶复合物中间体的空间障碍增大^[10], 导致酶反应速度降低.

参 考 文 献

Table 4 Effect of substrate structure on enzymatic reaction

Substrate	t/h	Conversion/ %	ee%
benzaldehyde	48	> 99	> 99
p-hydroxy benzaldehyde	68	64	96
p-anisaldehyde	91	82	97
phenylpropionaldehyde	70	88	96
n-butyl aldehyde	48	95	98
n-hexanal	75	72	96
n-octyl aldehyde	120	33	68
fural	48	94	98

reaction medium: 10 ml diisopropyl ether, 150 μ l acetic acid; water activity: 0.86; $t = 0^\circ\text{C}$.

是杏仁醇腈酶的良好底物. 而苯甲醛是杏仁醇腈酶的最适作用底物, 其在反应速度、转化率和立体选择性等方面较其他醛均胜出一筹. 这是由于杏仁醇腈酶的天然作用底物为苯甲醛之故. 同时, 我们发现, 对脂肪族醛而言, 底物醛的碳链长短对醇腈酶反应有显著影响. 正丁醛为底物时的转化率和光学纯度均高于正辛醛为底物时的相应值. 这是因为随

- 1 Kruse C G. Chirality Cyanohydrins—their Manufacture and Utility as Chiral Building Blocks. New York: Chirality in Industry, Wiley, 1992, 279~ 299
- 2 Bauer M, Griengl H, Steiner W. Parameters influencing stability and activity of a hydroxynitrile lyase from *Hevea Brasiliensis* in two phase systems. Enzyme and Microbial Technology, 1999, **24** (8): 514~ 522
- 3 Effenberger F. Synthesis and reactions of optically active cyanohydrins. Angew Chem Int Ed Engl, 1994, **33** (15): 1555 ~ 1565
- 4 Griengl H, Hichel A, Johnson D V. Enzymatic cleavage and formation of cyanohydrins: a reaction of biological and synthetic relevance. Chem Commun, 1997, **20** (20): 1933~ 1940
- 5 Griengl H, Klempier N, Pochlauer P, *et al.* Enzyme catalysed formation of (S) -cyanohydrins derived from aldehydes and ketones in a biphasic solvent system. Tetrahedron, 1998, **54** (48): 14477~ 14486
- 6 Han S Q, Lin G Q, Li Z Y. Synthesis of (R) -cyanohydrins by Crude (R) -oxynitrilase catalyzed reactions in micro aqueous medium. Tetrahedron: Asymmetry, 1998, **9** (11): 1835 ~ 1838
- 7 Lin G Q, Han S Q, Li Z Y. Enzymatic synthesis of (R) -cyanohydrins by three (R) -oxynitrilase sources in micro aqueous organo medium. Tetrahedron, 1999, **55** (12): 3531~ 3540
- 8 Zaks A, Klivanov A M. The effect of water on enzyme action in organic media. J Biol Chem, 1988, **263** (17): 8017~ 8021
- 9 Lanne C, Boeren S, Vos K, *et al.* Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol Bioeng, 1987, **30** (1): 81~ 87
- 10 Jors M S. Studies on the kinetics of cyanohydrin synthesis and cleavage by the flavoenzyme oxynitrilase. Biochim Biophys Acta, 1980, **613** (1): 203~ 209

Study on the Asymmetric Synthesis of (R) -Cyanohydrins Catalysed by (R) -Oxynitrilase from Almond in Micro-aqueous Phase*

LIU Sen-Lin, ZONG Min-Hua**, TU Ran, ZHOU Fan
(Department of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract Asymmetric synthesis of (R) -cyanohydrins from aldehydes and hydrogen cyanide using (R) -oxynitrilase from almond in micro-aqueous phase was studied by GC chiral analysis. Reaction time, content of acetic acid, reaction medium, water activity, reaction temperature and substrate structure all had remarkable effects on the reaction. (R) -oxynitrilase from almond accommodates a wide variety of aromatic, heterocyclic and aliphatic aldehydes. Benzaldehyde was found to be the best substrate for the (R) -oxynitrilase from almond. At low temperature 0~ 5 °C, both conversion rate and enantiomeric excess of the product were above 99%.

Key words micro-aqueous phase, (R) -oxynitrilase, asymmetric synthesis, (R) -cyanohydrins

* This work was supported by a grant from Natural Science Foundation of Guangdong (980543).

** Corresponding author. Tel: 86-20-87111452, E-mail: senlinliu@163.net

Received: July 19, 2000 Accepted: August 23, 2000