

来源于西梅的(R)-醇腈酶促立体 选择性转氰合成(R)-酮醇腈*

刘森林^{1)**} 宗敏华²⁾

(¹⁾深圳大学生命科学学院, 深圳 518060; (²⁾华南理工大学生物工程系, 广州 510640)

摘要 在水/有机溶剂双相反应体系中, 研究了来源于西梅的(R)-醇腈酶催化酮与丙酮醇腈合成(R)-酮醇腈的立体选择性转氰反应. 系统探讨了不同酶源、酶粉颗粒大小、底物浓度、两底物配比、酶浓度和底物结构对转氰反应的影响. 结果发现西梅醇腈酶能高效催化三甲基硅酮与丙酮醇腈的立体选择性转氰. 酶粉颗粒大小以直径 0.3~0.45 mm 为优, 底物浓度以 21 mmol/L 左右为佳, 底物丙酮醇腈与三甲基硅酮摩尔浓度比以 2:1 为宜, 酶浓度以 60.9 g/L 左右为好. 西梅醇腈酶对 3,3-二甲基-2-丁酮几乎没有催化活性, 而对其硅结构类似物三甲基硅酮却具有非常高的立体选择性和催化活性, 在上述优化反应条件下反应 24 h 的底物转化率和产物光学纯度均高达 99% 以上, 表明底物中的硅原子对西梅醇腈酶的催化活性有非常显著的促进作用.

关键词 西梅, (R)-醇腈酶, (R)-酮醇腈, 立体选择性转氰

学科分类号 Q556.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00147

光学活性醇腈是一类重要的手性合成分子, 它很容易转化为 α -羟基酸(酯)、 α -羟基醛(酮)、 α -氨基酸、 β -氨基醇和邻二醇衍生物等多种具有重要商业价值的医药、农药及功能材料的中间体^[1-2], 其高效合成堪称颇具挑战性的课题. 在众多制备光学活性醇腈的方法中, 醇腈酶(oxynitrilase/hydroxynitrile lyase, E.C.4.1.2.10)在非水相中催化醛(酮)与 HCN 不对称合成光学活性醇腈的方法, 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^[3-4]. 目前, 醇腈酶催化醛的立体选择性合成已进行了一些研究^[5-6], 而醇腈酶催化酮合成光学活性酮醇腈因反应效率较低而研究甚少^[7]. 光学活性酮醇腈在许多天然化合物的合成中具有重要的应用前景^[8].

不同来源的醇腈酶不仅具有不同的催化活性和对映体选择性, 而且底物专一性也存在极大差异^[9]. 我们曾在国内首次报道了来源于杏仁的(R)-醇腈酶催化合成(R)-醇腈^[10]. Kiljunen 等^[11]的研究表明, 在其研究范围内, 西梅醇腈酶是催化醛与 HCN 不对称合成的最差酶源. 因而, 目前国际上有关来源

于西梅仁(R)-醇腈酶促反应的报道仅此 1 篇. 然而, 我们首次发现西梅醇腈酶能高效催化三甲基硅酮与丙酮醇腈的立体选择性转氰反应(在优化反应条件下, 底物转化率和产物光学纯度均高达 99% 以上). 迄今, 国内外尚未见西梅醇腈酶催化酮合成光学活性酮醇腈的其他报道. 本文研究了水/有机溶剂双相中西梅醇腈酶催化三甲基硅酮与丙酮醇腈立体选择性转氰合成(R)-酮醇腈, 并系统探讨了不同酶源、酶粉颗粒大小、底物浓度、两底物配比、酶浓度、底物结构等对反应的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

杏仁和郁李仁购自当地药店, 西梅和枇杷醇腈酶为市售国产新鲜西梅和枇杷收集核仁, 分别粉碎

* 国家自然科学基金(20376026)和广东省自然科学基金(31349)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0755-26534149, E-mail: liulsl@szu.edu.cn

收稿日期: 2010-03-24, 接受日期: 2010-07-22

后经乙酸乙酯脱脂制得粗制酶制剂^[10]。底物三甲基硅酮、内标正十烷购自 Sigma 公司; 丙酮醇腈购自 Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd; 其他化学试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 醇腈酶催化转氰反应

在 50 ml 带塞三角瓶中装入 10 ml 含有预定量的丙酮醇腈和三甲基硅酮的异丙醚, 添加 20 μ l 正十烷(内标)、1.5 ml 柠檬酸缓冲液(pH 5.0, 0.1 mol/L)于其中, 加入预定量的酶制剂(除研究酶粉颗粒大小外, 均用直径 0.3~0.45 mm 的酶粉)开始反应, 于 30 $^{\circ}$ C, 150 r/min 恒温振荡。定时从有机相取样 0.1 ml。

1.3 转化率、反应速度及产物光学纯度的测定

样品用气相色谱手性分析。采用内标法计算底物和产物的量(内标为正十烷)。根据底物酮的减少计算转化率, 以初始反应时间内底物酮在单位时

间的减少计算初始反应速度(V_0), 根据产物醇腈两种异构体的量计算光学纯度($ee\%$)。对应体过剩值 $ee\% = (A-B)/(A+B)$, 其中, A 和 B 分别表示反应后产物醇腈两对映体 R 和 S 的量。

1.4 气相色谱分析

仪器: Thermo Finnigan 型气相色谱仪, 配备 Auto Injector 3000 Thermo Finnigan 自动进样器, FID 检测器; 手性柱: β -Cyclodextrin Column(柱径 0.32 mm, 柱长 30 m。分析条件: 气化室温度 180 $^{\circ}$ C, 检测室温度 250 $^{\circ}$ C, 柱温 80 $^{\circ}$ C 维持 2 min 后, 5 $^{\circ}$ C/min 升温至 125 $^{\circ}$ C; 载气为氮气, 流速为 2.3 ml/min; 分流比 1:100; 进样量 1 μ l。在该分析条件下, 三甲基硅酮、丙酮醇腈、内标、产物 2-三甲基硅-2-羟基-丙腈 S 和 R 两对映体的保留时间分别为: 1.722 min、3.662 min、5.555 min、9.753 min 和 9.853 min(图 1)。

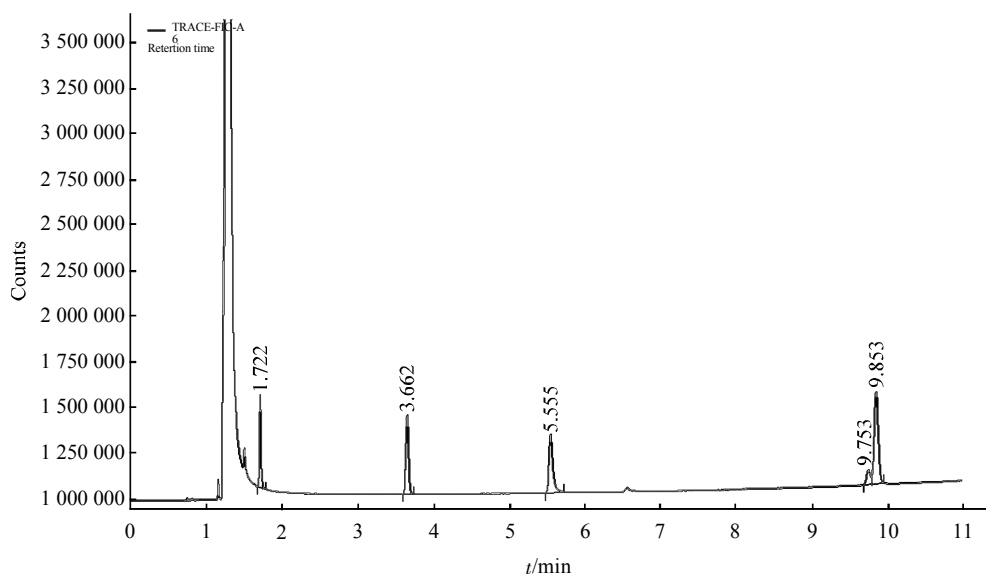


Fig. 1 GC-analysis of sample after reaction

2 结果与讨论

2.1 不同酶源对酶反应的影响

不同来源的醇腈酶在酶催化活性及立体选择性等方面均存在较大差异。我们研究了来源不同的(R)-醇腈酶催化三甲基硅酮与丙酮醇腈的立体选择性转氰, 底物平衡转化率和产物光学纯度结果如表 1 所示。由表 1 可见, 在相同实验条件下, 西梅

醇腈酶是催化该立体选择性转氰反应的最优酶源, 这与 Kiljunen 等^[11]有关西梅醇腈酶催化醛与 HCN 不对称合成的研究结果显然不同。杏仁和郁李醇腈酶在立体选择性方面较高但在酶催化活性方面较西梅醇腈酶稍逊, 而枇杷醇腈酶在酶催化活性和立体选择性方面均相对较低。鉴于西梅醇腈酶在催化本反应中的高催化活性和高立体选择性, 且国内外研究甚少, 故本文选择了来源于西梅的(R)-醇腈酶。

Table 1 Effect of (R)-oxynitrilase sources on the enzymatic reaction

Source of (R)-oxynitrilase	t/h	Conversion/%	ee%
<i>Prunus salicina</i>	24	99	99
Almond	35	99	99
<i>Prunus japonica</i>	90	99	99
Loquat	96	98	92
Substrate: 56 mmol/L acetone cyanohydrin + 28 mmol/L acetyltrimethylsilane; oxynitrilase seed: 0.5 g			

2.2 酶粉颗粒大小对酶反应的影响

酶粉颗粒大小对酶反应速度有显著影响. 颗粒越小, 比表面积越大, 酶与底物接触的几率越大, 反应速度越快. 同时, 鉴于酶反应的同时存在一竞争性、无立体选择性的生成外消旋醇腈的非酶反应, 故较高的酶反应速度有利于获得较高光学纯度的产物. 由表 2 可见, 酶粉颗粒越小, 酶反应速度越快. 但在本实验研究范围内, 直径 0.2~0.3 mm 的酶粉太细, 在反应振荡中有结团粘壁现象, 导致酶粉的比表面积随反应进行而逐渐减少, 因而产物的光学纯度有所下降. 故选择直径 0.3~0.45 mm 的酶粉为佳.

Table 2 Effect of crude enzyme diameter size on the enzymatic reaction

Crude enzyme diameter/mm	$V_0/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	t/h	Conversion/%	ee%
More than 0.9	2.46	22	99	98
0.45~0.9	3.00	22	99	99
0.3~0.45	3.60	22	99	99
0.2~0.3	3.54	22	98	98
Substrate: 56 mmol/L acetone cyanohydrin + 28 mmol/L acetyltrimethylsilane; <i>Prunus salicina</i> seed: 0.5 g				

2.3 最适底物浓度的确定

一般而言, 在一定的底物浓度范围内, 随着底物浓度的增加, 酶反应速度加快. 但高浓度的底物在加速酶反应的同时, 也加速非酶反应. 可见, 研究底物浓度对醇腈酶反应的影响具有重要意义. 本研究中, 固定丙酮醇腈浓度与三甲基硅酮摩尔浓度比 2:1 不变的情况下, 探讨了不同三甲基硅酮浓度对酶反应的影响(表 3). 由表 3 可知, 产物的光学纯度随底物浓度的增加而逐渐下降, 故选择底物浓度以 21 mmol/L 左右为宜.

Table 3 Effect of substrate concentration on the enzymatic reaction

$c(\text{Substrate})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$V_0/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	t/h	Conversion/%	ee%
7	0.60	22	66	>99
14	1.78	22	99	>99
21	2.61	22	99	>99
28	3.59	22	99	99
42	4.84	22	90	98

Substrate: Acetone cyanohydrin + acetyltrimethylsilane; *Prunus salicina* seed: 0.5 g

2.4 底物比对酶反应的影响

西梅醇腈酶催化三甲基硅酮与丙酮醇腈转氨反应合成(R)-2-三甲基硅-2-羟基丙腈是双底物反应. 丙酮醇腈作为氨基供体, 其浓度对酶反应有一定影响. 本研究固定三甲基硅酮浓度为 21 mmol/L 不变, 其他反应条件相同的情况下, 研究不同的底物摩尔比对转氨反应的影响(表 4). 由表 4 可见, 产物的光学纯度随丙酮醇腈与三甲基硅酮摩尔浓度比的增大而减小. 这是由于随丙酮醇腈与三甲基硅酮摩尔浓度比的增大, 丙酮醇腈浓度越高, 在加速酶反应的同时, 极大地加速了竞争性非酶反应, 故产物的光学纯度降低. 综合考虑反应初速度、转化率和产物的光学纯度, 丙酮醇腈与三甲基硅酮摩尔浓度比以 2:1 为优.

Table 4 Effect of the ratio of acetone cyanohydrin to acetyltrimethylsilane on the reaction

Molar ratio of acetone cyanohydrin to acetyltrimethylsilane	$V_0/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	t/h	Conversion/%	ee%
1:1	2.03	30	75	>99
2:1	2.60	24	99	>99
3:1	2.94	24	99	99
4:1	3.22	24	99	97
5:1	3.28	24	99	96

Substrate: Acetone cyanohydrin + 21 mmol/L acetyltrimethylsilane; *Prunus salicina* seed: 0.5 g

2.5 最适酶浓度的确定

酶浓度对醇腈酶促反应有显著影响(表 5). 由表 5 可见, 随着酶浓度的增加, 酶反应速度和产物光学纯度均有显著提高. 这是由于酶浓度越大, 酶与底物接触的几率越大, 酶反应速度越快, 而竞争性非酶反应速度基本不变, 故适当增加酶量可加速

酶反应以获得较高光学纯度的产物。但当酶浓度超过 60.9 g/L 后, 酶浓度对酶反应速度和产物光学纯度影响甚微。这是由于酶浓度接近饱和, 对反应速度影响较小之故。因此, 综合考虑酶反应效率和经济效益, 选择酶浓度 60.9 g/L 左右为优。

Table 5 Effect of the enzyme concentration on the enzymatic reaction

$\rho(\text{Enzyme})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$V_0/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	t/h	Conversion/%	$ee\%$
26.1	1.04	24	95	99
43.5	2.35	24	99	99
60.9	2.62	24	>99	>99
87.0	2.63	24	>99	>99
104.3	2.63	24	99	99

Substrate: 42 mmol/L acetone cyanohydrin + 21 mmol/L acetyltrimethylsilane.

多, 使 $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ —基团以及 $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ —基团上的三个甲基与羰基碳原子之间具有较大的空间距离, 有利于中间复合物的形成及 HCN 对中间复合物的攻击, 因而, 醇腈酶催化三甲基硅酮反应具有较其碳结构类似物 3, 3-二甲基-2-丁酮更大的酶催化活性。

Table 6 Effect of substrate structure on the enzymatic reaction

Substrate	t/h	Conversion/%	$ee\%$
Acetyltrimethylsilane	8	70	>99
	24	>99	>99
3, 3-dimethyl-2-butanone	8	NR	NR
	48	NR	NR

NR = No reaction was detected. Substrate: 42 mmol/L acetone cyanohydrin + 21mmol/L ketone; *Prunus salicina* seed: 0.5 g.

2.6 底物结构的影响

为了明了底物中硅原子对来源于西梅的(R)-醇腈酶催化三甲基硅酮转氰反应的影响, 对比研究了其碳结构类似物 3, 3-二甲基-2-丁酮与丙酮醇腈反应合成相应的(R)-醇腈(表 6)。结果表明, 西梅醇腈酶对 3, 3-二甲基-2-丁酮几乎没有催化活性, 而对其硅结构类似物三甲基硅酮却具有非常高的催化活性和立体选择性, 在优化反应条件下反应 24 h 的底物转化率和产物光学纯度均高达 99%以上, 表明底物中的硅原子对西梅醇腈酶的催化活性有非常显著的促进作用, 这与我们以前有关马肝醇脱氢酶催化有机硅反应的结果类似^[12]。醇腈酶催化三甲基硅酮及其碳结构类似物转氰在酶催化活性方面的显著差异可以通过底物结构、酶反应机制和硅原子特性等得以解释。酶动力学研究表明, 醇腈酶催化醛(酮)与 HCN 反应遵循有序的 Uni-Bi 机制, 即先由底物中的羰基基团连接到酶的活性中心形成中间复合物, 然后由 HCN 攻击中间复合物, 最后释放出醇腈^[13]。来源于三叶胶树醇腈酶的晶体结构证明, 醇腈酶的活性中心被深深包埋于酶蛋白中并通过一个狭窄的通道连接到酶蛋白表面, 故中间复合物的形成在一定程度上受到与羰基碳原子相连基团空间体积的影响^[14]。Kiljunen 等^[15]研究发现杏仁醇腈酶催化羰基化合物的酶催化活性随与羰基碳原子相连基团空间体积的增大而降低。同样, 由于 $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ —基团的空间体积较大, 空间位阻较强, 3, 3-二甲基-2-丁酮与酶形成中间复合物相对较难, 因而酶催化活性较低。硅原子的原子半径较碳原子大得

参 考 文 献

- [1] Gruber J K, Kragl U, Eggert T, *et al.* Uneven Twins: Comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold. *J Biotechnology*, 2009, **141**(3): 166–173
- [2] Nanda S, Kato Y, Asano Y. A new (R)-hydroxynitrile lyase from *Prunus mume*: asymmetric synthesis of cyanohydrins. *Tetrahedron*, 2005, **61**(46): 10908–10916
- [3] Koch K, Berg R J F, Nieuwland P, *et al.* Enzymatic synthesis of optically pure cyanohydrins in microchannels using a crude cell lysate. *Chemical Engineering J*, 2008, **135**(1): 89–92
- [4] Avi M, Fechter M H, gruber K, *et al.* Hydroxynitrile lyase catalyzed synthesis of heterocyclic (R)- and (S)-cyanohydrins. *Tetrahedron*, 2004, **60**(46): 10411–10418
- [5] Nanda S, Kato Y, Asano Y. *PmHNL* catalyzed synthesis of (R)-cyanohydrins derived from aliphatic aldehydes. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**(5): 735–741
- [6] Willeman W F, Straathof A J J, Heijnen J J. Reaction temperature optimization procedure for the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase using a process model approach. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **30**(2): 200–208
- [7] Roberge C, Fleitz F, Pollar D, *et al.* Synthesis of optically activity cyanohydrins from aromatic ketones: evidence of a substrate range and inverted stereoselectivity for the hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**(2): 208–214
- [8] Harada T, Hayashiya T, Wada I, *et al.* Enantio-selective functionalization of prochiral diols *via* chiral spiroketals: preparation of optically pure 2-substituted 1,3-propanediol derivatives and asymmetric synthesis of chroma ring and side chain of α -tocopherol. *J Am Chem Soc*, 1987, **109**(2): 527–532
- [9] Solis A, Luna H, Manjarrez N, *et al.* Study on the (R)-oxynitrilase activity of *Pouteria sapota*. *Tetrahedron*, 2004, **60**(46): 10427–10431

- [10] 刘森林, 宗敏华, 涂 然, 等. 微水相中杏仁醇酶催化不对称合成 R- 氰醇的研究. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28**(4): 542-545
Liu S L, Zong M H, Tu R, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2001, **28**(4): 542-545
- [11] Kiljunen E, Kanerva L T. Novel (R)-oxynitrilase sources for the synthesis of (R)-cyanohydrins in diisopropyl ether. Tetrahedron: Asymmetry, 1997, **8**(8): 1225-1234
- [12] Zong M H, Fukui T, Kawamoto T, *et al.* Bioconversion of organosilicon compounds by horse liver alcohol dehydrogenase: The role of silicon atom in enzymatic reactions. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, **36**(1): 40-43
- [13] Bauer M, Griengl H, Steiner W. Kinetic studies on the enzyme (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* using initial rate methods and progress curve analysis. Biotechnol. Bioengineering, 1999, **62**(1): 20-29
- [14] Wagner U G. Mechanism of cyanogenesis: the crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. Structure, 1996, **4**:811-822
- [15] Kiljunen E, Kanerva L T. (R)- and (S)-Cyanohydrins using oxynitrilases in whole cells. Tetrahedron: Asymmetry, 1996, **7**(6): 1105-1116

(R)-Oxynitrilase From *Prunus salicina* Catalysed Synthesis of (R)-Ketone-cyanohydrin by Enantioselective Transcyanation*

LIU Sen-Lin^{1)**}, ZONG Min-Hua²⁾

¹⁾ College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

²⁾ Department of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract The synthesis of optically active (R)-ketone-cyanohydrin catalyzed by (R)-oxynitrilase from *Prunus salicina* seed meal *via* enantioselective transcyanation of acetyltrimethylsilane with acetone cyanohydrin in the water/organic solvent biphasic system was studied by GC analysis on a chiral β -Cyclodextrin Column. The effects of different (R)-oxynitrilase sources, diameter size of crude enzyme, substrate concentration, the ratio of two substrates, enzyme concentration and substrate structure on the enzymatic enantioselective transcyanation were investigated systematically. The results showed that (R)-oxynitrilase from *Prunus salicina* could efficiently catalyze enantioselective transcyanation of acetyltrimethylsilane with acetone cyanohydrin. The optimal diameter size of crude enzyme, concentration of acetyltrimethylsilane, ratio of acetone cyanohydrin to acetyltrimethylsilane and crude enzyme concentration were 0.3~0.45 mm, 21 mmol/L, 2 : 1 and 60.9 g/L, respectively. (R)-oxynitrilase from *Prunus salicina* could not accept 3, 3-dimethyl-2-butanone as substrate, while both high substrate conversion and high product *ee*% were obtained with its silicon counterpart acetyltrimethylsilane as the substrate. Under the optimal conditions, both acetyltrimethylsilane conversion and enantiomeric excess of the product were above 99%. These results demonstrated that the silicon atom in substrate served as a more effective atom than the carbon atom to enhance the activity of this enzyme.

Key words *Prunus salicina*, (R)-oxynitrilase, (R)-ketone-cyanohydrin, enantioselective transcyanation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00147

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (20376026) and National Science Foundation of Guangdong Province(31349).

**Corresponding author.

Tel: 86-755-26534149, E-mail: liulsl@szu.edu.cn

Received: March 24, 2010 Accepted: July 22, 2010