

# 微水有机溶剂中酶促外消旋化合物 拆分过程的动力学分析

高修功 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院,无锡 214036)

曹淑桂

(吉林大学酶工程国家重点实验室,长春 130023)

**摘要** 建立了微水有机溶剂体系中酶促外消旋化合物拆分反应的动力学方程,其中关联了控制酶对映选择性的有关动力学和热力学参数。通过实验验证了该方程的准确性,从而以此为根据可对外消旋化合物的拆分过程进行准确预测和有效控制。

**关键词** 微水相;酶促拆分;动力学;外消旋化合物

**中图分类号** TQ920.1

## 0 前 言

近十年来,利用水解酶(如蛋白酶、酰胺酶、脂肪酶等)为催化剂在非(微)水有机溶剂体系中进行合成反应引起了广泛的关注。由于酶具有立体(对映)选择性,因此通过这些合成反应就可以实现对外消旋醇或外消旋羧酸的手性拆分;特别是利用微生物脂肪酶通过对映选择性酯合成反应拆分外消旋醇类化合物已成为该领域的研究热点<sup>[1]</sup>。

Chen等曾对水相和水-有机溶剂两相体系中酶促外消旋化合物拆分的动力学过程做了分析<sup>[2,3]</sup>。我们将这一动力学分析推广至非(微)水有机溶剂体系中,建立了有关的动力学方程,其中关联了控制酶对映选择性的有关动力学和热力学参数。通过实验验证了方程的准确性,从而可以根据该方程对拆分过程进行准确预测和有效控制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 主要试剂** 脂肪酶 PSL(*Pseudomonas sp.* Lipase),由 *Pseudomonas sp.* H18 经液体发酵及部分纯化后获得,酶水解活力为 770 u/g<sup>[4]</sup>;脂肪酶 CSL(*Candida sp.* Lipase),由中国科学院微生物研究所提供,酶水解活力为 525 u/g;手性试剂 1-(1-萘基)乙基异氰酸酯(NEI), R-(-)-NEI及 S-(+)-NEI, Aldrich(Milwaukee, WI);(R) 2-辛醇及 (S) 2-辛醇,

Sigma Chemical Co.; (R, S) 2-辛醇及其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器 台式恒温水浴振荡器, SH288-1型, 江苏太仓鹿河生化仪器厂; 高压液相色谱仪, 510型, Waters (Millipore) 公司, 配有 Wisp710B型自动进样器, 510型高压泵, 440型紫外检测器 (Waters Associates) 及 3390A型积分记录仪 (HP)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 酯合成反应 将含一定浓度辛酸与 2-辛醇的环己烷溶液 5 ml 置于容量瓶内, 加入所需量的酶粉和水份, 并放置数粒玻璃珠, 密闭,  $37^{\circ}\text{C}$ , 150 r/min 恒温振荡反应, 一定时间后过滤除酶终止反应。

1.2.2 底物转化率测定 将过滤除酶的反应样品  $100\mu\text{l}$  加入 5 ml 苯-甲醇混合溶剂 (4/1, v/v) 中, 用 0.025 mol/L 的氢氧化钠甲醇溶液滴定样品中未反应的有机酸, 以 0.3% (w/v) 百里酚蓝的甲醇溶液为指示剂 (3滴), 滴定终点时其颜色由黄色变为蓝绿色<sup>[5]</sup>。根据有机酸的减少量, 计算底物转化率。

1.2.3 底物与产物对映过量值 (ee, enantiomeric excess) 测定<sup>[6]</sup> 仲醇与手性试剂 1-(1-萘基)乙基异氰酸酯 (NEI) 反应, 形成相应的氨基甲酸酯非对映体衍生物, 可以于非手性固定相上在正相 HPLC 色谱条件下得以分离。当使用 (R)-NEI 时, 仲醇 S 型异构体衍生物的洗脱速度较其 R 型异构体快; 反之, 当使用 (S)-NEI 时, R 型异构体衍生物洗脱速度较快, 从而可以将两种异构体的衍生物分开 (见图 1)。通过两种非对映衍生物的洗脱峰面积可以计算出醇的对映过量值

1) 衍生化反应: 将  $20\mu\text{l}$  浓度为 50 g/L 的 (S)-NEI 甲苯溶液和  $5\mu\text{l}$  经过滤除酶的反应混合物混溶于  $100\mu\text{l}$  甲苯中, 在密闭条件下于  $90\sim 100^{\circ}\text{C}$  水浴中保温反应 4 h。反应完毕冷至室温, 加入  $200\mu\text{l}$  乙醇, 继续在密闭条件下于  $90\sim 100^{\circ}\text{C}$  水浴中保温反应 4 h。取  $5\sim 10\mu\text{l}$  进样作 HPLC 分析。

2) HPLC 检测条件: 色谱柱,  $\mu\text{Borasil Silica}$  柱 (内径 0.39 cm, 长度 30 cm); 流动相, 含 0.3% (v/v) 乙醇的环己烷溶液; 流速, 1.0 ml/min; 检测波长, 254 nm。

以  $S_{\text{t}}$  代表 2-辛醇两种异构体衍生物的峰面积比值, 则未反应的底物 2-辛醇的对映过量值  $ees$  可以通过下式求出:

$$ees = (S_{\text{t}} - 1) / (S_{\text{t}} + 1)$$

而产物 2-辛醇辛酸酯的对映过量值  $ee_{\text{p}}$  则可由下式求出:

$$ee_{\text{p}} = ees / c - ees$$

其中  $c$  为底物 2-辛醇的转化率

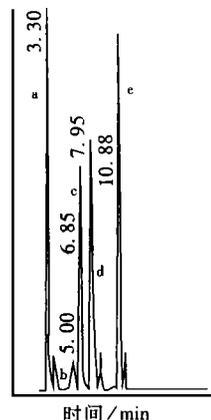


图 1 正相 HPLC 分离  
2-辛醇对映异构体

- a- 甲苯                      b- (S)-NEI  
c- (R)-(-)-2-辛基 N-[(S)-(+)-1-(1-萘基)乙基]氨基甲酸酯  
d- (S)-(+)-2-辛基 2-辛基 N-[(S)-(+)-1-(1-萘基)乙基]氨基甲酸酯  
e- 乙基 N-[(S)-(+)-1-(1-萘基)乙基]氨基甲酸酯

## 2 拆分过程的预测与控制

从文献 [2], [3] 拆分过程的动力学分析可知, 酶催化拆分外消旋化合物的反应是一动力学过程, 当反应过程为不可逆时, 拆分的效果主要由酶的催化选择性常数  $E$  控制. 在不同的  $E$  值下, 底物的对映过量值  $ees$  与底物转化率  $c$  之间的关系符合式 (1); 而产物的对映过量值  $ee_p$  与转化率  $c$  之间的关系符合式 (2).

$$\frac{\ln[(1-c)(1-ees)]}{\ln[(1-c)(1+ees)]} = E \quad (1)$$

$$\frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]} = E \quad (2)$$

在式 (1) 式 (2) 中, 三个变量 ( $E$   $c$   $ees$  或  $ee_p$ ) 之间的关系可以绘成如图 2 所示的曲线. 可以看出对于底物 (图 2a), 其对映过量值  $ees$  随着反应的进行逐渐增大; 转化率超过一定数值时, 剩余底物  $ee$  值可以达到 100%;  $E$  值越小,  $ees$  达到 100% 时要求的转化率越高. 当底物的  $ee$  值达到一定的要求时, 应尽早结束反应, 否则随着转化率的增大, 尽管  $ees$  不会再降低, 但剩余的底物量将逐渐减少.

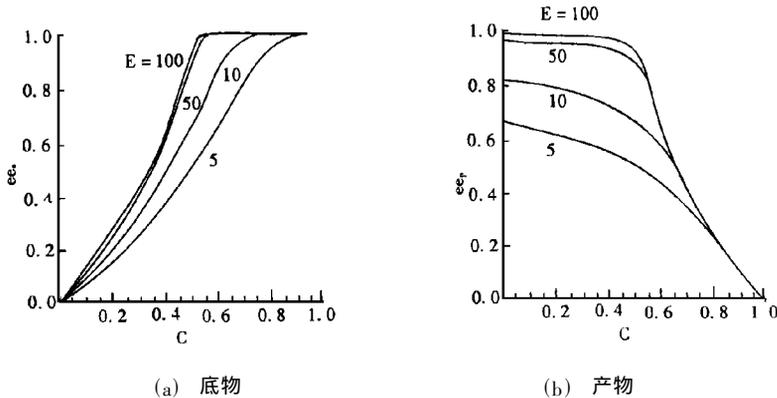


图 2 不可逆反应中不同  $E$  值下  $ee$  与  $c$  之间的关系曲线

而对于产物 (图 2b), 其对映过量值 ( $ee_p$ ) 在反应刚开始时最大 (但此时只有微量产物形成). 随着反应的进行,  $ee_p$  值逐渐降低;  $E$  值愈小, 降低愈快. 当转化率  $c$  超过 0.5 时, 所有  $E$  值下的  $ee_p$  均发生急剧下降. 因此, 如果所希望的旋光异构体以产物形式存在, 无论何种情况均不应使转化率超过 50%.

当拆分反应可逆时, 情况变得较为复杂. 此时酶对两种对映异构体的拆分效果就不仅取决于酶的选择性常数  $E$  (动力学常数), 而且还受反应平衡常数  $K$  (热力学常数) 较大的影响.  $c$  与  $ees$  或  $ee_p$  之间的关系分别由式 (3) 和式 (4) 表示<sup>[2,3]</sup>.

$$\frac{\ln[1 - (1+k)(c+ees\{1-c\})]}{\ln[1 - (1+k)(c-ees\{1-c\})]} = E \quad (3)$$

$$\frac{\ln[1 - (1+k)c(1+ee_p)]}{\ln[1 - (1+k)c(1-ee_p)]} = E \quad (4)$$

取  $E = 10$ , 将不同  $K$  值下 ( $0 \sim 1$ )  $c$  与  $ees$  及  $ee_p$  的关系分别绘于图 3 中. 可以看出平衡常数  $K$  微小的变化对底物或产物的光学纯度均将产生很明显的影 响. 根据这一现象可以预测, 除了可以通过提高酶的  $E$  值来提高底物或产物的旋光纯度外<sup>[4]</sup>, 改进反应条件降低平衡

常数  $K$  可以达到同样的目的,而且效果更为明显。例如可以通过改变酰基供体的种类,使其与 2-辛醇形成的酯不易发生水解反应,从而使  $K$  降低,有可能大幅度提高底物或产物的光学纯度。

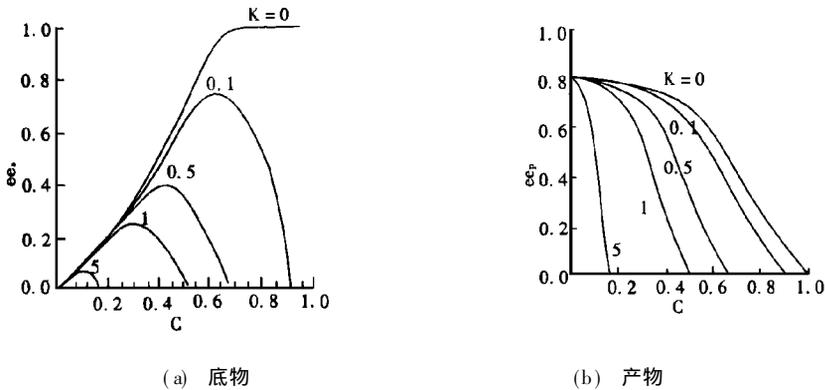


图 3 可逆反应中  $E = 10$  时不同  $K$  值下  $ee$  与  $c$  之间的关系曲线

从图 3 还可以看出,当反应为可逆时转化率  $c$  对底物旋光纯度  $ee_s$  的影响形式不同于可逆反应,在一定的  $c$  值时  $ee_s$  取得最大值,进一步增加  $c$  会使  $ee_s$  又发生下降。因此通过图中的各曲线可以很容易地确定何时终止反应可以在合适的转化率下获得最高的底物或产物旋光纯度。

### 3 实验结果

利用脂肪酶在无水环己烷中催化的外消旋 2-辛醇拆分反应(与辛酸的不对称酯合成反应)对动力学方程式(3),式(4)的准确性进行了验证。

在反应条件下,保持辛酸过量,测定(R)2-辛醇达到平衡时未反应的量与已反应掉的量的比值,得到反应平衡常数  $K = 0.06^{[4]}$ 。

反应中使用的两种酶 PSL 和 CSL 在反应条件下的选择性常数分别为 8.17 和 8.66<sup>[4]</sup>。在反应过程中的不同时间测定底物转化率  $c$  和剩余底物旋光纯度  $ee_s$ ,并由此计算产物的旋光纯度  $ee_p$ 。图 4 中示出了各实验值和动力学方程的预测值。可以看出两者拟合很好。这说明

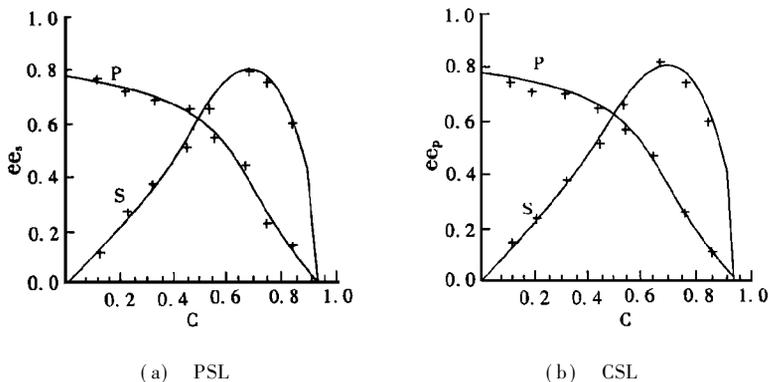


图 4 脂肪酶催化拆分外消旋 2-辛醇过程的动力学预测与模拟

× —— 实测值      - —— 模型预测值

通过上述动力学方程定量描述反应过程是可靠的;也就是说,通过由这些动力学方程所得的关系曲线可以准确地预测反应的进程和终止反应的最佳时刻(所达到的转化率)对于 PSL 转化率为 68.0% 时底物的光学纯度最高,  $ee_s = 80.06\%$ ;而对于 CSL,  $c = 68.1\%$  时,  $ee_s$  的最高值为 80.57%, 两者拆分效果相当

## 4 讨 论

酶促外消旋化合物的拆分是一个动力学过程。当反应为不可逆时,拆分效果主要由酶的对映选择性常数  $E$  (两个对映底物的专一性常数之比,即  $E = (k_{cat}/K_m)_{快} / (k_{cat}/K_m)_{慢}$ ) 决定;而当反应为可逆时,拆分效果不仅取决于  $E$ ,而且在很大程度上受反应平衡常数  $K$  (逆、正反应的专一性常数之比,即  $K = (k_{cat}/K_m)_{逆} / (k_{cat}/K_m)_{正}$ ) 的影响。值得注意的是,  $E$  是一个动力学参数,为酶的对映选择性的定量指数,是由酶本身的性质所决定的,因而不同种类的酶具有不同的  $E$  值;而  $K$  为热力学函数,与酶的性质无关。但两者均与底物浓度、酶浓度及底物转化率无关,又均受到底物种类及体系水含量、pH 温度等体系环境因素的影响。

比较图 2a 和图 3a 可以明显看出,判别反应是否可逆的一个最明显的准则是:在可逆反应中,当底物转化率  $c$  超过 50% 时,剩余底物的旋光纯度 ( $ee_s$ ) 开始下降;而在不可逆反应中,  $ee_s$  随着转化率  $c$  的增加而不断增大。

在可逆反应中,  $K$  不仅影响外消旋底物的拆分效果,而且还决定了产物的最高得率 (转化率  $c = 1/(1+K)$ )。在利用脂肪酶催化不对称酯合成反应拆分外消旋醇时,可以采用下面的措施抑制逆反应 (降低  $K$  值):

1) 减小体系水含量。当有机溶剂体系中无添加水时,水解逆反应本应忽略。但由于酶蛋白中有残留水 (酶催化作用的“必需水份”),而且酯化反应本身又产生一定量的水,这些足以使水解逆反应在一定程度上发生。可以设法及时除去反应中产生的多余水份,使体系水活度保持恒定<sup>[8]</sup>;另外也可以用转酯反应代替酯化反应 (即用脂肪酸酯代替脂肪酸作酰基供体),这样可以避免水作为反应产物生成。

2) 增加底物 (酸或醇) 的浓度,使反应趋于完全。前提是酶在该条件 (高浓度酸或醇) 下不失活。

3) 选择具有特定结构的酰基供体 (酸),使形成的酯不易被催化水解。即增大正、逆反应的专一性的常数差,使反应的平衡常数  $K$  (即  $(k_{cat}/K_m)_{逆} / (k_{cat}/K_m)_{正}$ ) 减小,从而使反应向有利于酯合成的方向偏移 (如具有支链或环状结构的酸所形成的酯较难发生水解)。

总之,笔者建立了微水有机溶剂体系中酶促外消旋化合物拆分反应的动力学方程,并通过实验作了验证。利用该方程可以对拆分过程进行准确预测和有效控制。在可逆反应中,除了酶的对映选择性常数  $E$  外,平衡常数  $K$  也对拆分效果有明显的影响。通过某些措施可以有效地降低  $K$  值 (即抑制逆反应),从而明显改进拆分效果。

## 致 谢

本研究实验工作是在吉林大学酶工程国家重点实验室完成的, 谨致谢意。

## 参 考 文 献

- 1 Dordick J S. In: Blanch H W & Clark D S ed. Applied Biocatalysis ( Vol 1), New York: Marcel Dekker Inc, 1991, 1 ~ 51
- 2 Chen C S, et al. J Am Chem Soc, 1982, 104 7294~ 7299
- 3 Chen C S, et al. J Am Chem Soc, 1987, 109 2812~ 2817
- 4 高修功. 微生物脂肪酶生产及非水相催化性质与应用的研究. [学位论文 ], 无锡: 无锡轻工大学, 1995
- 5 孙谨. 非水滴定 (下册). 北京: 科学出版社, 1985
- 6 Hrata H, et al. J Jpn Oil Chem Soc, 1991, 40 995
- 7 Burwell R L Jr, Pearson R G. J Phys Chem, 1966, 70 300
- 8 Halling P J. Enzyme Microb Technol, 1994, 16 178

## Kinetic Analysis of Enzyme-Catalyzed Racemate Resolutions in Microaqueous Organic Solvents

Gao Xiugong Zhang Kechang

(Department of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Cao Shugui

( National Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023)

**Abstract** Quantitative equations and useful graphs, which consider the kinetic and thermodynamic parameters that govern the enantioselectivity of enzyme-catalyzed resolution of enantiomers in microaqueous organic media, have been developed. The theoretical equations have been verified experimentally. Consequently, the enzymatic resolution process can be precisely predicted and effectively controlled according to the graphs derived from these equations.

**Key words** microaqueous medium; enzyme-catalyzed resolution; kinetics; racemate

(责任编辑: 陈 娇)