

外消旋薄荷醇对映选择性酶促酯化中 酸酐与羧酸的比较研究

许建和¹ 朱 洁² 川本卓男³ 田中渥夫³ 胡 英²

(华东理工大学生物反应器国家重点实验室¹和化学系² 上海 200237)

(京都大学工学部合成/生物化学科应用生化研究室³, 日本京都 606)

摘 要 利用脂肪酶在有机溶剂中催化对映选择性酯化反应对外消旋薄荷醇进行了有效的
光学拆分。对分别使用酸酐和相应的游离羧酸作酰基给体时的反应性能进行了比较。发现
酸酐的反应性远高于对应的游离羧酸,但在酶的催化作用下酸酐易水解成为游离羧酸;在微
水系统中使用过高浓度的酸酐会导致酶缺水而失活,同时会促进手性醇的非选择性酯化,从
而降低产物的光学纯度。然而,在连续流加丙酸酐的半批式反应系统中,所有这些缺点均可
有效地克服。与使用游离丙酸的批式反应系统相比,*dl*-薄荷醇的反应时间缩短了一半,酶的
稳定性大幅度提高,而产物 *l*-薄荷醇酯的光学纯度不相上下(>98% ee)。

关键词 薄荷醇,酶促酯化,羧酸,酸酐

有机溶剂中脂肪酶催化对映选择性酯化反应是一种获取光学纯手性醇或手性酸的非常有效的方法。通过这一反应,前人已经对许多手性醇进行了有效的光学拆分^[1~6]。但是,在以往的非水相酶促酯化反应中,通常使用游离羧酸作为醇的酰基给体。由于羧酸本身的反应性较低,而且反应副产物水的生成对酯的形成和酶在有机相中稳定性均十分不利的缘故,因此酶促酯化反应速度一般比较缓慢。所以,尝试使用反应性更强、而且反应后无水生成的酸酐作为醇的酰基给体,对于构建高效光学拆分用非水相酶反应系统,是一项十分有意义的研究课题。在我们的研究中,以化学合成的 *dl*-薄荷醇作为外消旋手性醇的模型化合物,经过立体选择性酶促酯化反应,生成光学纯 *l*-薄荷醇酯^[6]。*l*-薄荷醇酯经过化学水解即可转变为具有广泛工业用途的天然薄荷醇(*l*-薄荷醇)。目前文献上有关酸酐用于酶促酯化反应的研究报道还很少^[7~10],而且均为经验性探索;有关反应机理、工程优化方面的研究以及与游离羧酸的系统性比较,尚未见报导。本文对脂肪酶在有机溶剂中催化薄荷醇选择性酯化的工艺条件和操作方式进行了系统优化,酰化剂的酸酐与相应的游离羧酸对酶催化性能的影响进行了全面比较,并首次对脂肪酶催化醇与酸酐酯化反应机理进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪酶(Lipase OF 360),来源于圆柱形假丝酵母(*Candida cylindracea*),日本名糖产

国家自然科学基金项目(No.29506043),同时得到国家教委的部分资助。

本文于1997年1月24日收到。

业公司产品,使用前未作进一步提纯。*dl*-和 *dl*-薄荷醇为日本东京化成公司产品,*l*-薄荷醇为日本和光纯药公司产品。丙酸酐和丁酸酐分别来自东京化成与和光纯药。其它各试剂亦来自商业渠道。

1.2 方法

1.2.1 批式反应: 批式反应通常在 30℃ 恒温,长颈烧瓶(振速 120r/min)中进行。酶促酯化反应混和物的典型组成为:100mg 脂肪酶,10ml 环己烷,100mmol/L 薄荷醇(*dl*-, *d*-或者 *l*-),50mmol/L 酸酐或者 100mmol/L 游离酸。在酸酐的情况下,酯化反应前还需向系统内注入 10 μ l 脱离子水。酸酐的酶促水解反应通常在含有 50mmol/L 酸酐、10mg 脂肪酶和 10 μ l 或 20 μ l 水的 10ml 环己烷中进行。

1.2.2 半批式反应: 脂肪酶催化的薄荷醇半批式拆分在 30℃ 恒温的磁力搅拌釜式反应器(工作体积为 120ml)中进行。当向盛有 60ml 含 200mmol/L 薄荷醇的环己烷溶液与 1200mg 脂肪酶的反应器中,通过蠕动泵以 2.5ml/h 的流速连续滴加 90mmol/L 丙酸酐或者 180mmol/L 丙酸的时候,即开始反应。

1.2.3 色谱分析: 反应中剩余的薄荷醇和生成的酯用带离子火焰检测器的气相色谱仪来定量,玻璃填充柱(1.0m),担体为 Chromosorb W AW DMCS(粒度为 80/100 目),固定相为硅酮 SE-30;载气为 N₂,流速 60ml/min;进样器温度为 300℃;内标为正十七烷。用程序升温(60~240℃,20℃/min)时,观察到的保留时间如下:丙酸酐,1.5min;丁酸酐,2.7min;薄荷醇,3.3min;丙酸酯,4.8min;丁酸酯,5.6min;十七烷,6.8min。

1.2.4 光学纯度测定: 反应中生成的 *l*-薄荷醇酯,在以正己烷/乙酸乙酯(10:1)为洗脱剂,经过硅胶柱色谱分离之后,配制成 1.0%(W/V)左右的乙醇溶液,使用旋光仪(日本

光谱公司 DIP-140 型)测定其旋光度,并换算成比旋光度。用 *l*-薄荷醇衍生的纯 *l*-酯的比旋光度(实测值为:*l*-薄荷醇丙酸酯, -81.3°;*l*-薄荷醇正丁酸酯, -75.8°)作标准,即可计算所得酯的光学纯度。

2 结果与讨论

2.1 薄荷醇批式酯化中酸酐与羧酸的比较

使用经分子筛干燥过的环己烷作溶剂,批式地(即各种底物一次性投入)进行脂肪酶催化薄荷醇与丙酸酐或丙酸的酯化反应(图 1)。在初始阶段,薄荷醇与酸酐的酯化反应确实比游离酸的反应快得多,表明酸酐作为酰基给体具有较高的反应性。但是令人吃惊的是,1h 之后薄荷醇与酸酐的酯化反应变

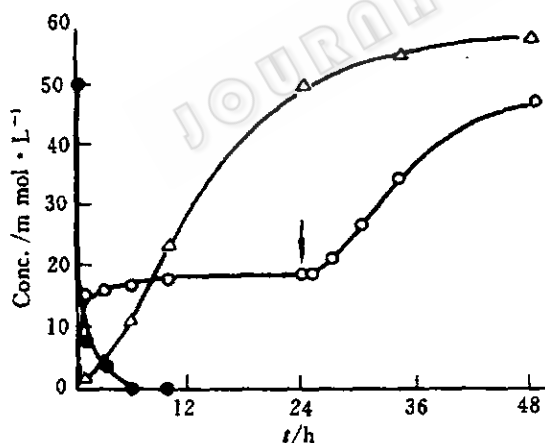


图 1 脂肪酶在脱水环己烷中催化 *dl*-薄荷醇与丙酸或丙酸酐的批式酯化

Fig. 1 Batchwise esterification of *dl*-menthol with propionic acid or propionic anhydride catalyzed by lipase in dehydrated cyclohexane

(○) The ester formed with propionic anhydride, (●) Residual propionic anhydride, (△) The ester formed with propionic acid, (↓) Water (10 μ l) was added.

得非常缓慢,转化率几乎停滞在 15% 上下的水平。还发现酸酐的减少量远远超过了它用于薄荷醇酯化所需要的量,表明一部分酸酐很可能未用于酯化即被直接水解。由于溶剂是经过脱水处理的,因此酸酐水解所需水的唯一来源只能是酶制剂。由此推测,酶促酯化反应的停滞可能是酶分子因丧失“必需水”^[11]而失活所致。当向反应系统中补加了少量水(图 2 中箭头所示)之后,酶的酯化活力即刻得到恢复。

在 50mmol/L 酸酐时,最适加水量为 0.10%。通过分别与 *d*-、*l*-和 *dl*-薄荷醇的酶促酯化反应,对几种常见的酸酐进行了考察和比较(表 1)。酶的相对活性从 *dl*-薄荷醇的转化率来衡量,而酶的对映选择性则用纯 *l*-薄荷醇的转化率与纯 *d*-薄荷醇的转化率之比来估算。由表可见,脂肪酶的催化活性和对映选择性均与酸酐的烃链长度及结构有关。对于某种酸酐而言,如果酶的活性越低,则它对薄荷醇的对映选择性也越差。不过,观察到酶的最高对应选择性在丙酸酐,而最大活性则在正丁酸酐。所以,在随后的研究中选择了丙酸酐,以期取得较好的选择性。另外,当将正丁酸酐与正丁酸进行比较时,发现在加水的情况下酸酐的优越性表现得并不明显,这可能是大部分酸酐被迅速水解成游离酸之故。

表 1 批式反应系统中酰基给体的比较

Table 1 Comparison of acyl donors in batch reaction system

| Acyl donor | Conversion/% | | | Enantiomeric ratio <i>l</i> / <i>d</i> |
|-------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|---|
| | <i>dl</i> -menthol | <i>l</i> -menthol | <i>d</i> -menthol | |
| Acid anhydride | | | | |
| Acetic anhydride | 5.1 | 8.4 | ND ^a | — |
| Propionic anhydride | 41.7 | 81.4 | 1.1 | 74 |
| <i>n</i> -Butyric anhydride | 53.5 | 88.8 | 1.4 | 63 |
| Isobutyric anhydride | 13.3 | 21.6 | 0.6 | 36 |
| <i>n</i> -pentanoic anhydride | 39.9 | 72.4 | 1.3 | 56 |
| <i>n</i> -Hexanoic anhydride | 27.0 | 39.3 | 0.8 | 49 |
| Free acid | | | | |
| <i>n</i> -Butyric acid | 47.0 | 88.5 | 1.3 | 68 |

^aND, not detected

2.2 补料批式反应器中丙酸酐与丙酸的对比

上述结果表明,向酸酐浓度相对较高的批式系统中添加适量水,虽能有效地防止酶的脱水失活,但对发挥酸酐的反应效能毫无益处。因此,为有效地利用酸酐进行薄荷醇的酶促酯化,在酸酐浓度固定不变的情况下,试图把脂肪酶的用量加倍(至 200mg),但酯化反应的初速度并未增加,而酶的失活依然发生。当把两种底物的浓度均减半时(即 *dl*-薄荷醇 50mmol/L,酸酐 25mmol/L),酶的生产能力也随之下降。在 100mmol/L *dl*-薄荷醇的酶促拆分反应中,将所需的 50mmol/L 丙酸酐分为两部分(20mmol/L 与 30mmol/L),并分别先后加料。结果,酶促酰化反应在脱水环己烷中进行得非常顺利,并没有发生象图 2 中那样的酶失活现象。这表明,要使醇能高效酶促转化,酸酐必须少量多次地加料,最好是缓慢连续地滴加到反应器中。为此,我们构建了一个补料批式(半批式)反应器,使酸酐溶液以一定流速连续地输送到盛有 *dl*-薄荷醇溶液和悬浮脂肪酶的搅拌釜中。

在半批式操作时,进行了如下考察:将 60ml 丙酸酐溶液(90mmol/L)分别以不同的流

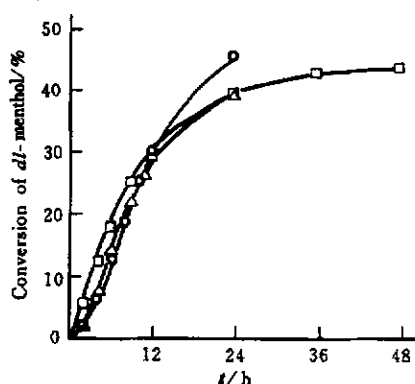


图2 *dl*-薄荷醇酶促酯化的进程曲线

Fig. 2 Progress curves of enzymatic esterification of *dl*-menthol (200mmol/L, 60ml).

- (O) Fed-batch reaction; propionic anhydride, 90mmol/L, 2.5ml/h;
 (Δ) Fed-batch reaction; free propionic acid, 180mmol/L, 2.5ml/h;
 (□) Batchwise reaction; free propionic acid, 180mmol/L, 60ml.

速(2.0~60ml/h)输送到装有1200mg脂肪酶和60ml薄荷醇溶液的反应器中。结果表明,当酸酐流速较低时,反应达到预定转化率(约45%)所需要的时间较长;而当酸酐的流速很高时则与批式反应类似,即酶分子的“必需水”被夺走,反应发生停滞。在流速为2.5ml/h时,反应24h后即可达到预定的45%转化率(图2)。而且在此期间输入反应系统的酸酐恰好等于化学计量所需的酸酐(90mmol/L, 60ml)。这样,反应之后系统中水的变化净值即可忽略不计(既无积累也无消耗),这是多批重复反应或连续反应中保持酶稳定性的一个重要先决条件。

为了比较酸酐与相应的游离酸作为酰基给体的性能,分别用丙酸(180mmol/L, 2.5ml/h)和丙酸酐(90mmol/L, 2.5ml/h)进行了半批式反应(图2)。由于一摩尔酸酐是由两摩尔羧酸脱水缩合而成的,因此将酸的浓度配制成酸酐的两倍。在半批式反应初期,反应器中酸酐的浓度非常低,以致于表现的反应速度会受到酸酐溶液流速的控制。因此,在初期的半批式反应中,丙酸酐与丙酸之间并无明显差异(图3)。但在后期(25%转化率以上),游离丙酸的酯化反应变得越来越慢。这可归咎于羧酸作酰化剂时生成的水对酯化反应的抑制作用。事实上,酸的酯化反应初速度随着系统添加水量的增加而减少(数据略)。

此外,当酸的反应以批式操作方式进行时,薄荷醇在24h后的转化率与它在酸的半批式反应中的结果相同(39%),而且其到达或接近45%转化率所花费的时间至少为48h,而在酸酐的半批式反应中达到同样的转化率仅需要24h。因此,丙酸酐的反应效率至少是丙酸的两倍。

关于酶的对映选择性,从表2可以看出,无论在丙酸的反应中还是在丙酸酐的反应中,所得酯的光学纯度都很高(>98% e.e.)。此外,对酶的稳定性也作了考察。在酸的第一次批式反应或酸酐的第一次半批式反应之后,脂肪酶被过滤回收,用环己烷洗涤数次后,在与第一次反应相同的条件下,立即用于第二次反应。由表2可见,从酸的第一次批式反应回收的脂肪酶在第二次批式反应中活力显著降低,而在酸酐的半批式反应的情况下,活力保持了88%,而对应选择性依然很高。这可能与丙酸反应生成的水在酶催化剂中的积累有关,因为通过卡尔-费歇水分滴定仪测定第一次反应后酶中的水分含量时发现,酸的批式反应(8.3%)要远远高于酸酐的半批式反应(3.0%)。

表 2 丙酸酐的补料批式酯化反应与丙酸批式反应的比较^aTable 2 Comparison between fed-batch esterification with propionic anhydride and batch reaction with free propionic acid^a

| Acyl donor | Reaction mode | 1st reaction | | 2nd reaction | | Stability/ % (2nd/1st) |
|------------|---------------|--------------|---------------------|--------------|---------------------|---------------------------|
| | | conc./ % | ee ^b / % | conc./ % | ee ^b / % | |
| Free acid | Batchwise | 39.4 | 99.3 | 13.8 | n. t. ^c | 35 |
| Anhydride | Fed-batch | 45.3 | 98.7 | 39.9 | 98.7 | 88 |

^aReaction time was 24h, other conditions were the same with Fig. 4; ^bEnantiomeric excess of the ester produced; ^cNot determined.

2.3 酸酐的酶促水解反应

通过连续滴加强反应性酸酐的方法成功地实现了薄荷醇的高效酶促拆分。以前的一些研究者在使用酸酐时采用的均是一次投料的批式反应模式^[7]。Berger 等人^[8]在含游离脂肪酶的微水批式反应系统中使用酸酐时观察到酶的对映选择性下降。我们认为这一现象(低选择性)很可能是由于酸酐的非选择性化学酰化反应所造成,它在酸酐发生水解导致系统缺水而诱发酶失活之后将变为主反应。在一未加酶的对照实验中观察到,薄荷醇在酸酐存在下会发生化学酯化,其速度相对较低而已。

为了证实酸酐在酶促酯化中所伴发的水解副反应,分别在加或不加脂肪酶的情况下,对酸酐在环己烷中的水解情况进行了考察。如图 3 所示,虽然正丁酸酐在含水环己烷中相当稳定,但在少量(仅为酯化反应用量的十分之一)的脂肪酶(lipase OF360)存在下即被迅速水解。此外,酸酐水解的速度随着加水量的增加而增大,说明向酯化反应系统加水,不利于发挥酸酐的作用。用经过热处理(在水中煮沸 1h 后冻干)的脂肪酶所做的对照实验,进一步证实了脂肪酶对酸酐水解的催化作用。酸酐很少被热处理过(失活)的脂肪酶水解,这就排除了粗酶制剂中的添加剂会产生化学催化作用的可能性。除正丁酸酐之外,丙酸酐也能被脂肪酶 OF 360 强烈水解。实验发现能催化水解丙酸酐的还有其它脂肪酶制剂,如来源于 *Candida rugosa* 的 lipase

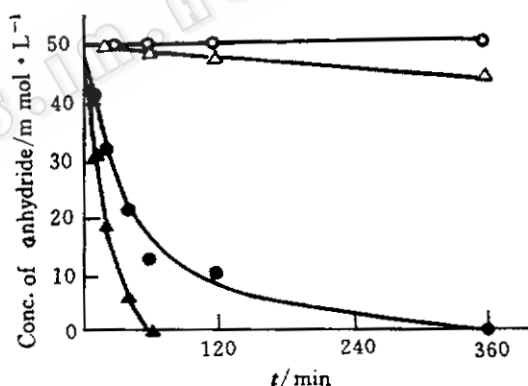


图 3 环己烷(10ml)中脂肪酶(OF 360)催化正丁酸酐(50mmol/L)水解反应

Fig.3 Hydrolysis of n-butyl anhydride (50mmol/L) catalyzed by lipase OF 360 in cyclohexane (10ml)

(○)10 μ l water, no lipase;

(△)10 μ l water, 10mg heat-deactivated lipase;

(●)10 μ l water, 10mg active lipase;

(▲)20 μ l water, 10mg active lipase

AY;来源于 *Pseudomonas* sp. 的 lipase. PS;来源于 *Humicola lanuginosa* 的 lipase CE;以及来源于 *Geotrichum candidum* 的 lipase GC(均为日本天野制药公司产品),其中包括前述 Bianchi^[7]和 Berger^[8]等人所使用过的酶制剂。由此看来,要找到一种只催化酸酐的酯化

而不引发其水解的脂肪酶似乎是不可能的。

2.4 脂肪酶催化醇与酸酐酯化反应的机理

基于上述实验结果和人们熟知的酶促酰化或去酰化反应的乒乓机理^[1], 我们提出了脂肪酶催化醇与酸酐酯化反应的机理, 如图 5 所示。在这个反应图式中, 假定由酸酐形成的中间体(酰化酶)与由相应的游离酸形成的中间体是完全相同的。作为不稳定中间体的酰化酶不仅可以与酶(如果存在的话)反应生成酯, 而且可以与水反应产生游离的酸, 但不能与酸反应逆向地生成热力学不稳定的酸酐。由于酶不能在绝对无水的环境中起作用^[11], 因此即使是在有机溶剂系统中进行的酶反应也必定会有一定量的水存在。加之对水解酶来说水是绝好的底物, 因此容易理解为何在水解酶催化的酯化反应过程中酸酐的水解不可避免的道理。事实上, 酸酐的水解反应甚至比其酯化反应还要快得多(见图 2、图 4)。

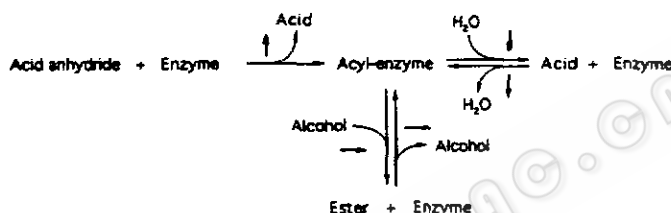


图 4 脂肪酶催化醇与酸酐酯化反应的假设机理

Fig. 4 A presumed mechanism of lipase-catalyzed esterification of an alcohol with an acid anhydride

借助上述机理人们也容易理解, 为什么在醇的酶促酯化中补料批式操作对酸酐的有效利用最为有利的道理。因为要减慢酸酐的水解, 一个基本的方面就是要尽可能降低系统中水分的含量。而在低含水的条件下, 酸酐就必须以低浓度使用方能避免过多地争夺酶的“必需水”而引起失活。因此, 连续滴加酸酐的半批式反应系统显然要比常规的将所需酸酐一次性全部投入的批式反应系统合理有利。在半批式系统中, 可以通过简单地改变酸酐的流速, 将系统的含水量调节到一个最适的范围内, 使酸酐最大限度地用于酯化反应。当酸酐以最适流速滴加时, 仅有很少量的水被用于很少量酸酐的水解, 并且用掉的水同时又被游离酸的酯化反应中产生的水所补偿。因此, 半批式系统中醇与酸酐的酶促酯化反应可以顺利而高效地进行。

综上所述, 对于水解酶催化的 *dl*-薄荷醇等外消旋醇的对映选择性酯化反应来说, 用酸酐取代普通的羧酸作酰化剂可使反应速度成倍地提高, 并使酶的稳定性大幅度改善。与传统的批式操作相比, 连续补料的半批式操作对酸酐的高效利用更为有利。

参 考 文 献

- [1]Chen C S, Sih C J. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1989, 28:695~707.
- [2]Klibanov A M. *Acc Chem Res*, 1990, 23:114~120.
- [3]Tanaka A, Sonomoto K. *Chemtech*, 1990, February. 112~117.

- [4]Xie Z F. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1991, 2:733~750.
- [5]Margolin A L. *Enzyme Microb Technol*, 1993, 15:266~280.
- [6]Koshiro S, Sonomoto K, Tanaka A, *J Biotechnol*, 1985, 2:47~57.
- [7]Bianchi D, Cesti P, Battistel E. *J Org Chem*, 1988, 53:5531~5534.
- [8]Berger B, Raliller C G, Konigsberger K *et al.* *Tetrahedron: Asymmetry*, 1990, 1:541~546.
- [9]Fukusaki E, Senda S, Nakazono Y *et al.* *J Ferment Bioeng*, 1992, 73:280~283.
- [10]Gutman A L, Brenner D, Boltanski A. *Tetrahedron Asymmetry*, 1993, 40:839~844
- [11]Zaks A, Klivanov A M. *J Biol Chem*, 1988, 263:8017~8021.

Comparison of Acid Anhydrides with Carboxylic Acids in Enantioselective Enzymatic Esterification of Racemic Menthol

Xu Jianhe^{*1} Zhu Jie² Takuo Kawamoto³ Atsuo Tanaka³ Hu Ying²

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering¹ and Department of Chemistry², East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

(Laboratory of Applied Biological Chemistry, Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry³, Faculty of Engineering, Kyoto University, Kyoto 606, Japan)³

Abstract Optical resolution of racemic menthol has been efficiently achieved by lipase-catalyzed enantioselective esterification in an organic solvent. The performance of the reaction using an acid anhydride as an acyl donor was compared with that using its corresponding free acid. The reactivities of acid anhydrides were found to be higher than their corresponding free acids, but acid anhydrides were also found easy to be hydrolyzed into free acids under the catalysis of the same enzyme. The existence of too high concentration of an acid anhydride in a micro-aqueous reaction system will cause dehydration and thus deactivation of the enzyme, and will enhance non-selective esterification of a chiral alcohol, which will reduce the optical purity of the product. All these drawbacks, however, could be effectively overcome in a semi-batch reaction system into which propionic anhydride was continuously fed. This system showed some advantages over a batch reaction system using free propionic acid: the reaction time of *dl*-menthol was shortened by half, the stability of the enzyme was much enhanced, and the optical purity of the product (*l*-menthyl ester) was kept at a similarly high level (>98% ee).

Key words Menthol, enzymatic esterification, carboxylic acid, acid anhydride