

综述

## 生物催化在有机合成中的应用

李祖义 朱明华

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海)

生物催化在有机合成化学中的应用在80年代越来越受到有机化学家的青睐。有机合成的研究近十几年来处于十分兴旺的时期, 对于一些有特殊功能、又有复杂结构的天然产物合成的研究往往是很多有机化学家竞相角逐的对象。近年来, 合成研究的特点是日益要求合成程序的科学设计和所应用的反应具有高度选择性<sup>[1]</sup>。1958年, Woodward在合成利血平时, 有6个手性中心, 可以有64个异构体。显然, 不通过一系列高度选择性的反应, 要完成这样的合成是绝不可能的。

近年来, 不对称合成是有机合成的前沿。所谓不对称合成是指反应产物为两个不等量的对映体或非对映体的一类反应。在传统的有机不对称合成中, 如要制备一些结构简单的手性分子时, 常使用一些手性试剂、不对称催化剂等来制成一非对映体化合物, 或利用C<sub>2</sub>对称性的基团或配体作诱导体。如著名的Sharpless不对称环氧化、均相催化氢化和羰基不对称还原等, 都是利用有机过渡金属配合物作为手性模板, 诱导反应物中手性中心的建立。但这些方法存在如下缺点: 制备不易、操作复杂、试剂昂贵、光学纯度不高。而现在对于不对称合成的要求也越来越高, 很多反应都要在95%以上对映过量才能受人注意。因此有机合成的发展方向是选择高度区域选择性、立体专一性的反应, 而生物催化正顺应了这一潮流<sup>[1-3]</sup>。

### (一) 生物催化应用于有机合成的优点

第一, 通过生物催化, 可以完成各种各样的有机反应, 如氧化、脱氢、还原、脱氨、羟基化、甲基化、环氧化、酯化、酰胺化、磷酸化、开环、异构化、切侧链、缩合、卤化等, 并且不同类型的酶, 不同生物来源的同一种类的酶催化产

生的产物各不相同。

孕甾酮作底物的羟基化反应就是典型的一例<sup>[4]</sup>。不同种类的微生物(如*Rhizopus nigricans*, *Gliocladium catenulatum*, *Mucorales*等)转化孕甾酮生成不同的产物: 14 $\alpha$ -羟基孕甾酮、6 $\beta$ -羟基-4-雄甾烯-3,17-二酮、6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -二羟基孕甾酮等。因而可筛选不同的微生物来转化获得所需的产物。

第二, 生物催化具有区域选择性、立体选择性、对映选择性, 这是生物催化优于一般化学催化重要之处。一种酶往往仅识别一个复杂分子的一小部分, 也有的可识别有相同或相似部位的不太复杂的分子。这种区域特异性使得有可能利用有限种类的酶来催化广范围的底物。例如, CH(OH)  $\rightarrow$  C=O 的氧化反应, 其底物可从甾醇直至复杂的多环醇, 而只需利用三种特异性的醇脱氢酶<sup>[5]</sup>: 酵母醇脱氢酶(YADH)、马肝醇脱氢酶(HLADH)、甾体醇脱氢酶(SADH)

酶是一个手性大分子, 消旋化合物的二个对映体可能和一个给定的酶以不同的速度进行反应, 从而可以达到动力学拆分的目的; 另一方面, 如果两个对映体均能以相似速度进行反应, 但酶对一个反应中心能产生的构型是相同的, 结果产生二个非对映体, 这样可被分开而达到拆分目的。若底物是前手性(prochiral)分子, 则发生不对称反应而生成光学活性物。不对称羰基还原反应是生物催化最普遍的反应<sup>[6,7]</sup>, 底物可以从简单的脂肪链上的羰基(一个到几个)直到杂环上酮基都能选择性还原, 产物的光学活性一般都大于95%(图1)。另外也能进行双键还原、芳香

本文于1989年12月11日收到。

核还原以及还原氨基化。

第三, 酶对底物分子结构的敏感性极强, 有时轻微的变化就能导致很不同的结果, 并且有些酶能在有机分子的非活性中心发生反应, 其产物是很难以一般化学反应来实现的。参与碳水化合物氧化的酶就存在着对底物极高的敏感性<sup>[8]</sup>。两种氧化酶(D-葡萄糖-1-氧化酶与吡喃糖-2-氧化酶)可单独或顺序作用于D-葡萄糖, 可高收率获得三种有用的D-葡萄糖衍生物: (i) D-葡萄糖

醛酮, 它可化学还原为 D-果糖; (ii) D-葡萄糖酸-1,5-内酯, 它可在水中转化为 D-葡萄糖酸; (iii) 2-D-酮-葡萄糖酸 (图 2)。这是区分 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub> 的反应, 采用化学催化是不可能完成的。

第四, 酶是一种非常高效的催化剂, 能在温和条件(中性、常温)下进行, 这样可用于对酸碱、温度敏感分子。另外, 很多生物催化剂是微生物及其产生的酶类, 可以通过发酵大量获得<sup>[11]</sup>。

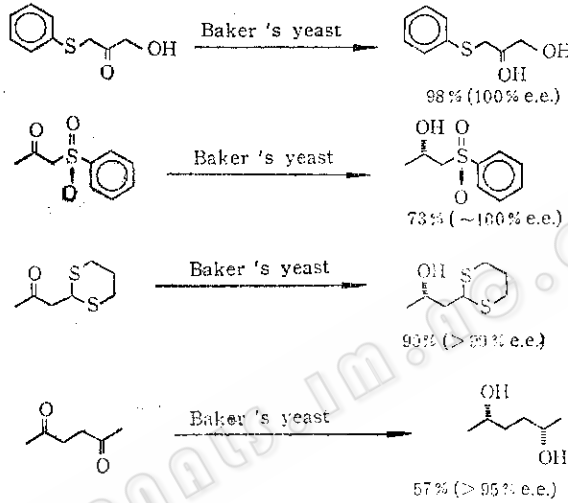


图 1 啤酒酵母催化的羰基还原 (示转化率和产物光学纯度)

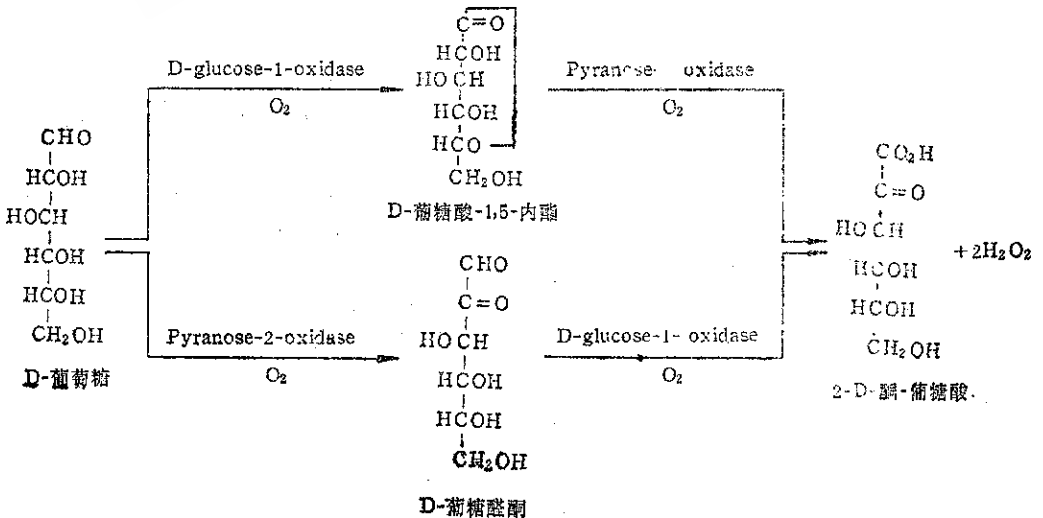


图 2 D-葡萄糖-1-氧化酶和吡喃糖-2-氧化酶催化的D-葡萄糖氧化反应

## (二) 生物催化应用于有机合成的新途径

为了使生物催化更多更好地在有机合成中发挥作用,80年代起有关生物催化的新概念、新技术不断产生。

1. 非水相的生物催化:传统的生化反应一般是在水相中进行的,而有机合成大多是在有机相中进行的。这个因素过去长期限制了酶在有机合成中的应用。按传统概念,有机溶媒可引起蛋白质变性,使酶失活。但事实上,越来越多的实验结果表明<sup>[9,10]</sup>,有机溶媒对酶反应亦有有利的一面:增加了非极性底物的浓度,很多不溶于水或在水中不稳定的产品能用有机溶剂中的酶来催化生产;在水中很难进行的酯化反应,在有机溶剂中能有效地进行;有机溶剂能保护酶免受有毒反应物和条件的伤害;提高酶的耐温性等。

严格地说,酶在绝对无水的条件下是不可能具有催化活性的,因为水分子直接或间接地通过氢键、疏水键、范德华力等维持着酶分子催化活性所必需的构象。但是不难设想,水溶液中不是所有的水分子都与酶的催化活性有关,实际上只有与酶蛋白分子紧密结合的一层单层水分子,对酶的催化活性才是至关重要的。维持酶催化活性所必需的最少量水称为“必需水”,只要这层“必需水”不丢失,而其他大部分水即使都为有机溶剂所替代,酶的催化活性也不受影响。因而可以把有机溶剂中酶催化反应理解为宏观上是非水相,而微观上是微水相反应<sup>[11,12]</sup>。

非水相中酶的含水微环境可以通过很多方式来达到,近十年来,一些新的作用方式不断产生,主要可概括为:

(1) 逆向胶囊体系中的酶催化:将酶溶解在表面活性剂与水存在的有机溶剂中形成逆向胶囊,这时表面活性剂分子的疏水性基团与大部分溶液(有机相)接触,而它们的亲水性头部形成一个极性内核,这个内核有一个小水池,里面能容纳酶,酶被限制在含水的微反应器中,因而不受有机溶剂的影响。而底物和产物还是能自由进出胶囊,达到催化作用。胶囊大小随表面活性剂、溶剂系统的种类不同而有很大差异,且是温度、离子强度、表面活性剂及溶剂的浓度的函数<sup>[13-15]</sup>。

逆向胶囊最常用于甾体化合物的转化、酯的

合成、油脂的水解和肽的合成。它能增加界面接触范围,产物容易与酶分离,并能排除底物对酶的抑制作用,因而为生物催化的应用开辟了一条新途径。

(2) 疏水性载体对生物催化剂的固定:把生物催化剂固定于一些疏水性的载体上或载体内,能使生物催化剂在有机溶剂中发挥高催化效率,并且对有机溶剂引起的变性具有很强的抗性。根据所作用底物的疏水性和溶剂的极性,选择合适的具有足够网状结构的疏水性载体对扩大生物催化的应用范围很有益处<sup>[16]</sup>。

近年来,不断产生一些新的疏水性载体材料。如光敏交联树脂ENTP<sup>[17]</sup>,该树脂的疏水性程度可通过控制其聚合前体中聚异丙二醇的聚合度来调节;氨基甲酸乙酯树脂<sup>[17]</sup>,其疏水性可通过聚合前体Pu中两部分(聚氧乙烷、聚氧异丙烷)的比例调节来改变;微孔陶瓷<sup>[18]</sup>,它具有很好的机械强度,能耐高温、耐酸碱(pH1-14),对菌体蛋白无毒,有较大的比表面积,能重复使用等特点;有机硅材料<sup>[19]</sup>(聚硅氧烷),它包埋细胞后成圆珠,该材料极有利于疏水性底物、产物和有机溶剂的进出,并且有较好的机械强度和耐温性。这些材料对一些菌体或酶已进行了固定,显示了其在有机合成反应中的应用前景。

(3) 酶蛋白的疏水性修饰:为了使酶在有机相体系中发挥高效率催化作用,可对其进行疏水性修饰,制备成在有机溶剂(如苯、氯仿)中可溶的酶<sup>[20]</sup>。用聚乙二醇(PEG)共价结合到酶分子表面的赖氨酸残基上,只要给酶提供必需水,这种PEG修饰酶就可在有机溶剂中溶解,并发挥高催化效率。目前已有很多酶蛋白被修饰,如脂酶、胰凝乳蛋白酶、过氧化氢酶、辣根过氧化物酶等。

最近有实验室用全氟烷基化合物对一些酶蛋白进行修饰<sup>[21]</sup>,被修饰的酶蛋白疏水性明显提高,有利于在有机溶剂中执行催化功能,也便于固定于含氟树脂上。

2. 金属对生物催化的影响:在化学催化中,可以通过改变金属种类而使催化的类型发生变化。在生物催化方面,有关酶活性中心的金属互换近十年来也引起了人们的注意,通过金属互换可使酶的特异性、稳定性发生变化<sup>[22]</sup>。

例如，羧肽酶A 具有酯酶和肽酶两种催化功能，其活性中心的金属互换（Zn、Co、Mn、Ca 等）能使该酶两种催化功能执行的程度发生很大改变<sup>[22]</sup>。Zn 是该酶活性中心的金属，当它被Co取代时，酯酶和肽酶两种催化功能都有所提高，当其被Mn、Ca 取代时，酯酶的功能得以很好的发挥，而肽酶的活性明显下降甚至消失。又如，酶活性中心金属互换还影响着酶对底物的特异性。来自 *Aspergillus oryzae* 的酰化氨基酸水解酶，可通过其活性中心金属互换（Zn、Co），来改变该酶对一些乙酰基氨基酸底物的特异性。因而对于不同的底物可选择不同的金属。另外，金属互换还将引起酶最适反应 pH 及其他一些酶学指标的改变<sup>[23]</sup>。

除酶活性中心金属互换对酶催化有影响外，一些金属离子能与一些酶蛋白结合使酶磁化<sup>[24]</sup>。这一磁化过程可以通过几种方法完成：通过戊二醛使酶与一些磁性物质（Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>）连结；将酶连结于具有大分子外壳的磁性物质；将酶连结于磁性物质，然后再与大分子连结。最近Inada Y 等对脂酶的磁化进行了研究<sup>[25]</sup>。二价铁离子和三价铁离子在 pH8.0—8.5条件下与 PEG 修饰了的脂酶反应，使PEG脂酶磁化。也可将PEG先与铁离子和亚铁离子反应，使PEG磁化，然后再与脂酶反应，从而得到磁化的PEG脂酶。磁化后的脂酶在有机相和水相中的稳定性大为提高，在有机溶剂中能很好地分散，放置较长时间也无沉淀产生。在有机相中催化活性也有所提高。更重要的是，磁化了的酶可通过一些磁性物质的磁力从有机反应相中提取出来，活性毫无损失，从而使这些酶能重复使用。

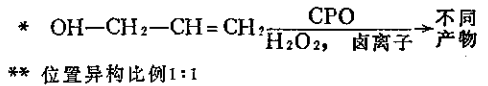
3. 底物浓度对反应产物种类的影响：一般认为，底物浓度只影响着反应的程度。但生物催化的一些反应，底物浓度的改变可影响到产物的种类，这无疑使人们有可能调节各底物的浓度及其比例来获得所需要的产物<sup>[22]</sup>。

卤化反应就是很好的一例。卤化反应是有机合成常用的反应，在生物体内广泛存在着催化这一反应的酶，它们都是含血红素的过氧化物酶。各种烯烃、炔烃与溴丙烷都是卤化反应的理想底物<sup>[26]</sup>。氯过氧化物酶(CPO)能催化烯丙醇与卤素离子进行卤化反应，所生成的产物则随卤离子

的浓度或几个卤离子浓度比例的变化而不同（见图3）<sup>[26]</sup>。当底物为单一卤离子时，产物的种类取决于该卤离子浓度的级别（mM级或M级），当底物为二个卤离子时，卤离子浓度的比例影响着产物的种类。另外当反应没有卤离子参与时，烯丙醇在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在、CPO 催化下生成丙烯醛。

	底物卤离子浓度(mmol/L)				主要产物
	KBr	KCl	KI	KF	
17	—	—	—	—	OH — Br — OH <sup>+</sup>       CH <sub>2</sub> —CH—CH <sub>2</sub>
3389	—	—	—	—	OH Br Br       CH <sub>2</sub> —CH—CH <sub>2</sub> OH — Cl — OH <sup>+</sup>       CH <sub>2</sub> —CH—CH <sub>2</sub>
—	200	—	—	—	OH Cl Cl       CH <sub>2</sub> —CH—CH <sub>2</sub>
—	2000	—	—	—	OH Br Cl <sup>+</sup>       CH <sub>2</sub> —CH—CH <sub>2</sub>
20	2000	—	—	—	OH — I — Cl <sup>+</sup>       CH <sub>2</sub> —CH—CH <sub>2</sub>
—	2000	20	—	—	OH — I — Cl <sup>+</sup>       CH <sub>2</sub> —CH—CH <sub>2</sub>

图 3 卤离子浓度及其比例对氯过氧化物酶 (CPO) 催化烯丙醇卤化\*产物种类的影响



4. 温度对生物催化产物的影响：一些微生物能催化长链烷烃与醇类反应生成一些脂类物质，这些脂类产物的饱和度与生物催化的温度密切相关：一般来说，高温反应产生的产物的不饱和程度低，而低温反应产物的不饱和程度就高<sup>[22]</sup>。表2就是 *Acinetobacter* sp. HO1-N 催化的正十二烷及乙醇反应，不同温度对脂类产物不饱和程度的影响<sup>[27]</sup>。有关这一较普遍的现象的机理现在还没有完美的答案，但这毕竟可以成为控制产物类型的手段。

(三) 生物催化在有机合成中应用的实例

1. D-氨基酸的合成：生物界中基本上都是 L-氨基酸，而由 D-氨基酸形成的肽链不易酶解，所以 D-氨基酸越来越多地被用来合成β-内酰胺抗生素和生理活性肽<sup>[28]</sup>。D-氨基酸不能象 L-氨基酸那样由发酵法合成，而用化学合成 D、L 消旋体氨基酸，再用各种化学法拆分，工

表 2 温度对由 *Acinetobacter* sp. HO1-N 转化乙醇、正十二烷生成脂类的饱和度的影响

温度(°C)	二烯物比例(总和)	单烯物比例(总和)	饱和脂类比例(总和)
乙 醇	(32:2, 34:2, 36:2)	(32:1, 34:1, 36:1)	(32:0, 34:0, 36:0)
17	72%	18%	10%
24	29%	40%	31%
30	9%	25%	66%
正十二烷	(36:2, 38:2, 40:2)	(36:1, 38:2, 40:2)	(36:0, 38:0, 40:0)
17	71%	24%	5%
24	41%	37%	22%
30	35%	40%	25%

艺复杂, 成本太高。用化学合成与酶法相结合合成 D-氨基酸, 为 D-氨基酸生产开辟了一条可行之路<sup>[29]</sup>。用 D-乙内酰胺酶解由相应的醛制得的相应 5 位取代的乙内酰胺即可。这种“化学-酶”法的组合工艺可以生产各种各样的 D-氨基酸, 具有工艺路线短, 产率高的特点。

2. 前列腺素的合成及其衍生物的制备: 前列腺素具有降低血压、扩张血管、减少胃液分泌、抑制神经兴奋等作用, 可治疗心血管、胃溃疡, 也可催产、引产, 近年又发现具有抗癌和调节免疫的作用。前列腺素用化学法合成十分困难, 而利用具有高度立体特异性的酶或微生物方法受到人们的重视<sup>[30]</sup>。利用青霉从葡萄糖可合成前列腺素的主要起始物花生四烯酸, 再经短杆孢菌将 C<sub>18</sub> 和 C<sub>19</sub> 羟化, 再经脱氢, 可合成 18-酮-PEG<sub>2</sub> 和 19-酮-PEG<sub>2</sub>。它们比 PEG<sub>2</sub> 有更强的生理活性。在 PEG<sub>1</sub> 化学合成中所需的一些具有光学活性的中间体, 均可用微生物转化的方法制备。

3. 呈香化合物的制备: 世界市场对呈香化合物的需求每年超过 20 亿美元。呈香化合物大部分都是通过化学法合成。而表现出呈香需高度专一性的立体异构。生物催化为改进目前化学合成

呈香物质的技术提供了一个令人感兴趣的方法<sup>[31]</sup>。L-薄荷醇是食品的主要香料, 化学法合成 DL-薄荷醇, 进行酯化, 再用酯酶选择性水解生产 L-薄荷醇, 总收率可达 86%, 光学纯度为 100%。另外萜烯用各种酶进行转化也能得到各种具光学活性的呈香物质。微生物烷烃氧化能制备二元酸, 再经化学法合成 C<sub>15</sub>—C<sub>17</sub> 的大环内酯。另外异丁酸经微生物氧化生成 β-羟基丁酸, 再经化学法合成到麝香酮<sup>[31]</sup>, 这些都是高级呈香原料。与化学法比较, 生物催化为各转化步骤提供了更好的专一性。

4. 稀有或同位素标记糖类的合成: 合成糖类化合物是有机合成较难进行的反应, 立体选择性高。而醛缩酶可催化羟醛缩合反应, 并具有很强的立体选择性。形成碳负离子的羰基化合物可以是 α-羰酸盐和 α-羟基羰基化合物等, 接受碳负离子的化合物均属醛类。如兔肌肉醛缩酶可催化二羟基丙酮磷酸酯与醛的缩合反应, 用于合成一些自然界稀有或不存在的糖类化合物, 也可用于合成同位素标记的糖类化合物。<sup>13</sup>C(C-5) 果糖和 <sup>13</sup>C(C-2,3) 果糖就是根据醛缩酶具有立体选择性催化作用合成的<sup>[32]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Godtfredsen, S.E. et al.: in "Biocatalysts in Organic Syntheses", International Symposium, Noordwijkerhout, The Netherlands, pp.3—18, 1985.
- [2] Geigert, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 258: 2273—2277, 1983.
- [3] Klibanov, A.M.: *Science*, 219:722—727, 1983.
- [4] Kieslich, K.: in "Microbial Enzymes and Bioconversions", 370—465, Academic Press, New York, 1980.
- [5] Jones, J.B.: in "Enzymatic and Nonenzymatic Catalysis", 54—83, Ellis Horwood, Chichester, 1980.
- [6] Mori, K. et al.: *Tetrahedron*, 41:919, 1985.
- [7] Han, C.Q. et al.: *J. Org. Chem.*, 51:1253—1260, 1986.

- [8] Geigert, J. et al.: *Carbohydrate Research*, 113:159—162, 163—165, 1983.
- [9] Halling, P.J.: *Biotech. Adv.* 5:47—84, 1987.
- [10] Hog, M.M. et al.: *Enzyme Microbial Technol.*, 8:236—240, 1986.
- [11] Zaks, A. and Russell, A.J.: *J. Biotechnol.*, 8:259—270, 1988.
- [12] Cambou, B. and Klibanov, A.M.: *J. Am. Chem. Soc.*, 106:2687—2692, 1984.
- [13] Kadam, K.L.: *Enzyme Micro. Technol.*, 8:266—173, 1986.
- [14] Castro, M.J.M. and Cabral, J.M.S.: *Biotech. Adv.*, 6:151—167, 1988.
- [15] Li Zuyi, et al.: Beijing International Conference on Biotechnol., July, 1989.
- [16] Tramper, J.: *Trends in Biotechnol.*, 3:45—50, 1985.
- [17] Fukui, S. et al.: in "Biocatalysis in Organic Media":21—41, International Symposium, Wageningen, The Netherlands, 1986.
- [18] Adams, J.M. et al.: *International Biotechnol. Lab.*, 6(3):22—27, 1988.
- [19] Oriel, P.: *Enzyme Microb. Technol.*, 10:518—522, 1988.
- [20] Kaimal, T.N.B. and Saroja, M.: *Biotechnol. Lett.*, 11(1):31—36, 1989.
- [21] Kohos, R.K. et al.: *Trends in Biotechnol.*, 7:101—106, 1989.
- [22] Neidleman, S.L.: *Biotechnol and Genetic Engineering Reviews*, 1:1—38, 1984.
- [23] Gregory, E.M. and Dapper, C.H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 220:293—300, 1983.
- [24] Setchell, C.H.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 35B:175—182, 1985.
- [25] Inada, Y.: *Trends in Biotechnol.*, 6:131—134, 1988.
- [26] Geigert, J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:366—374, 1148—1149, 1575—1581, 1983.
- [27] Ervin, J.L.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1983.
- [28] Chaiken, I.M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 7:385—399, 1982.
- [29] Meijer, E.M. et al.: *Ref.* 1:135—156, 1985.
- [30] Newton, R.F. et al.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 908, 1979.
- [31] Nagaoka, H. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 102:7962—7970, 1980.
- [32] Isowa, Y. et al.: *Tetrahedron Lett.*, 20(28):2611—2619, 1979.

### 敬 告 读 者

本刊自1991年起每期由原来的80面改为96面，定价为6.50元。欲订者可到当地邮局订阅，国内刊号为 8—32。

《生物工程学报》

编辑部