

## 脂肪酶 Novozyme 435 选择性催化 2,2-二甲基环丙烷甲酸乙酯合成 *S*-(+)-2,2-二甲基环丙烷甲酸

王 普, 祝加男, 何军邀

浙江工业大学药学院, 浙江杭州 310032

**摘要:** 采用脂肪酶催化外消旋 2,2-二甲基环丙烷甲酸乙酯 (DMCPE) 不对称水解合成西司他丁关键手性中间体 *S*-(+)-2,2-二甲基环丙烷甲酸 (*S*-(+)-DMCPA)。比较了 5 种不同来源的脂肪酶, 从中优选出立体选择性较高和催化活性较高的脂肪酶 Novozyme 435, 系统考察了影响该酶催化不对称水解反应的关键因素, 获得了优化的生物催化工艺条件。结果表明, 当脂肪酶 Novozyme 435 用量为 16 g/L, 底物 DMCPE 浓度为 65 mmol/L 时, 以 pH 值为 7.2 的磷酸缓冲液 (1 mol/L) 为反应介质, 30 °C 反应 64 h, 产物的收率和光学纯度分别为 45.6% 和 99.2%。脂肪酶 Novozyme 435 催化 DMCPE 不对称水解制备 *S*-(+)-DMCPA 工艺的产物光学纯度高, 路线可行, 并且酶可重复使用, 具有良好的工业化应用前景。

**关键词:** 脂肪酶; 2,2-二甲基环丙烷甲酸乙酯; 不对称水解; *S*-(+)-2,2-二甲基环丙烷甲酸; 手性中间体

中图分类号: O643/Q55 文献标识码: A

## Enantioselective Synthesis of *S*-(+)-2,2-Dimethylcyclopropanecarboxylic Acid from Ethyl-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate Catalyzed by Lipase Novozyme 435

WANG Pu\*, ZHU Jianan, HE Junyao

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, Zhejiang, China

**Abstract:** *S*-(+)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid (*S*-(+)-DMCPA) was synthesized by asymmetric hydrolysis of racemic ethyl-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate (DMCPE) over different lipases. Among the five enzymes investigated, Novozyme 435 showed higher enantioselectivity and activity. The influence of reaction parameters, such as ionic strength, the ratio of lipase/DMCPE, buffer pH, reaction temperature, and reaction time, on the biosynthesis of *S*-(+)-DMCPA was investigated. The optimum DMCPE concentration, enzyme dosage, buffer pH, reaction temperature, and reaction time were 65 mmol/L, 16 g/L, 7.2, 30 °C, and 64 h, respectively. Under the optimal conditions, the higher yield of 45.6% and enantiomeric excess of 99.2% for *S*-(+)-DMCPA were obtained. The biocatalytic activity of Novozyme 435 was relatively stable, retaining 70.3% of the initial activity after reuse three times. The results demonstrated that lipase Novozyme 435 is a suitable biocatalyst for the synthesis of *S*-(+)-DMCPA and has great potential for industrial applications.

**Key words:** lipase; ethyl-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate; asymmetric hydrolysis; *S*-(+)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid; chiral intermediate

*S*-(+)-2,2-二甲基环丙烷甲酸 (*S*-(+)-DMCPA) 是制备西司他丁的重要手性中间体<sup>[1]</sup>。西司他丁为肾脱氢二肽酶抑制剂, 它与亚胺培南制成的复合剂泰能是第一个应用于临床的新型碳青霉烯类抗生素, 不仅具有极强的广谱抗菌活性, 还具有β-内酰胺酶

抑制作用, 是目前抗重症感染的首选药物和全球畅销药之一。*S*-(+)-DMCPA 的制备方法主要有化学法和生物法两种。石晓华等<sup>[2]</sup>采用化学拆分方法, 以 L-肉碱草酸盐为拆分试剂, 经酰化、成盐、部分结晶、水解得到 *S*-(+)-DMCPA, 收率为 16.7%, 产物 ee 值

收稿日期: 2009-10-30.

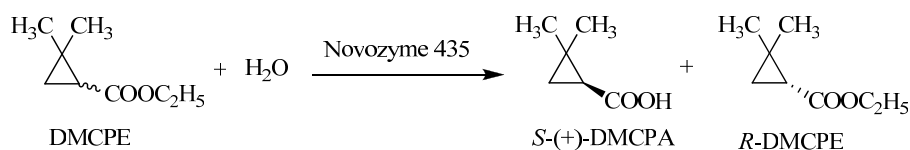
联系人: 王 普. Tel/Fax: (0571)88320389; E-mail: wangpu@zjut.edu.cn

基金来源: 浙江省重大科技攻关项目 (2005C13024); 浙江省高校优秀青年教师资助计划 (G0801116042610).

为 98.9%. Wang 等<sup>[3]</sup>采用异丁烯为原料, 手性铜试剂为催化剂直接不对称合成 *S*-(+)-DMCPA, 收率为 72%, 产物 ee 值为 92%. 尽管该路线的收率较高, 但产物的光学纯度偏低, 且所用的手性催化剂昂贵, 反应条件较苛刻, 其中多步反应需在  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温下进行. 采用生物催化手性合成技术制备手性药物中间体因具有高选择性、高催化效率和环境友好等优点而日益受到重视<sup>[4]</sup>. 文献[5,6]利用红球菌产生的腈水解酶不对称水解 2,2-二甲基环丙烷甲腈合成 *S*-(+)-DMCPA, 收率分别为 26% 和 45%, 但产物光学纯度较低, ee 值分别为 90% 和 81.8%. 此外, 该路线所用底物在合成过程中需用到剧毒的氰化物, 这在一定程度上影响到该路线的环境效益. 本文利用脂肪酶催化具有的高立体选择性、高催化活性及反应条件温和等优点, 采用外消旋 2,2-二甲基环丙烷甲酸乙酯 (DMCPE) 为底物, 通过优选合适的脂肪酶

催化剂, 考察影响酶催化反应的因素, 优化反应条件, 旨在建立脂肪酶 Novozyme 435 催化 DMCPE 不对称水解制备 *S*-(+)-DMCPA 的新途径. 迄今, 国内外尚未见相关的研究报道.

脂肪酶具有较宽泛的底物专一性, 是目前用于手性化合物制备的优良生物催化剂之一. 脂肪酶 Novozyme 435 为吸附固定于大孔丙烯酸树脂的南极假丝酵母脂肪酶 B, 具有较宽的 pH 适用范围和较高的热稳定性, 被广泛用于酯类、酸类、醇类和生物柴油等的制备<sup>[7–10]</sup>; 并且在不对称催化反应中具有较高的立体选择性<sup>[11]</sup>. 本文将脂肪酶 Novozyme 435 用于催化 DMCPE 的不对称水解 (反应原理如图式 1 所示), 获得了较高收率和高光学活性 (两者均高于文献[5,6]报道值) 的 *S*-(+)-DMCPA, 建立了一种制备西司他丁重要手性中间体 *S*-(+)-DMCPA 的新方法.



图式 1 脂肪酶 Novozyme 435 催化 2,2-二甲基环丙烷甲酸乙酯不对称水解

Scheme 1. Asymmetric hydrolysis of ethyl-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (DMCPE) catalyzed by lipase Novozyme 435.

## 1 实验部分

### 1.1 脂肪酶来源

Novozyme 435 来源于南极假丝酵母 (*Candida Antarctica*), 吸附固定于大孔丙烯酸树脂, 酶活力 10 U/mg, 购自诺维信公司; Lipozyme IM 来源于米黑毛霉 (*Mucor miehei*), 固定于大孔阴离子交换树脂, 酶活力 5.8 U/mg, 购自诺维信公司; Lipase F-AP 15 粉末来源于米根霉 (*Rhizopus oryzae*), 酶活力  $\geq 30$  U/mg, 购自 Sigma 公司; L-1754 粉末来源于皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*), 酶活力 25 U/mg, 购自 Sigma 公司; Lipase PS-D (硅藻土固定化酶) 来源于洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas cepacia*), 酶活力 10.5 U/mg, 购自 Amano 公司.

### 1.2 脂肪酶催化 DMCPE 不对称水解反应

称取一定量的脂肪酶置于磷酸缓冲液 (1 mol/L) 中, 加入一定量的底物 DMCPE (含量为 94.4%, 由浙江海翔药业股份有限公司合成并提供).

因不同来源脂肪酶的最适反应条件不同, 反应体系密闭后, 采用供试脂肪酶各自最适反应条件, 置恒温培养振荡器 (上海智诚分析仪器制造有限公司, ZHWY-2012 型) 中, 200 r/min 下进行酶催化 DMCPE 不对称水解反应. 由于底物在水中的溶解度较低, 因此在反应体系中加入 Tween-80 (20 mg/ml) 作为助溶剂, 增加酶和底物的有效接触.

酶催化反应结束后, 反应液用等体积乙酸乙酯萃取两次, 萃取液经定容后采用气相色谱法测定产物的收率和 ee 值<sup>[6]</sup>. 气相色谱仪为岛津 GC-2014 型, Chirasil-Dex CB 毛细管柱 (25 m  $\times$  0.25 mm, Varian, 美国), FID 检测器, 载气为 N<sub>2</sub>; 进样口和检测器温度均为 250  $^{\circ}\text{C}$ ; 柱温起始温度为 80  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 3 min, 升温速率为 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 终止温度为 180  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 5 min; 载气流速 2 ml/min; 分流比 15. 在此条件下, *S*型和 *R*型底物、内标物 (十二烷)、*S*型和 *R*型产物的保留时间分别为 3.69, 3.91, 8.29, 9.38 和 9.73 min.

反应液中产物和底物的光学纯度由 *ee* 值表征, 计算式为:  $ee_p = (C_{SP} - C_{RP}) / (C_{SP} + C_{RP}) \times 100\%$  和  $ee_s = (C_{SS} - C_{RS}) / (C_{SS} + C_{RS}) \times 100\%$ . 其中  $C_{SP}$ ,  $C_{RP}$ ,  $C_{SS}$  和  $C_{RS}$  分别为反应结束后 *S* 型产物、*R* 型产物、*S* 型底物和 *R* 型底物的摩尔浓度. 酶的立体选择性以 *E* 值表示, 计算式<sup>[12]</sup>为  $E = \ln[1 - X(1 + ee_p)] / \ln[1 - X(1 - ee_p)]$ . 其中  $X$  为转化率 ( $X = ee_s / (ee_s + ee_p)$ ). 产物收率计算式为  $Y = C_{SP} / C_0 \times 100\%$ . 其中  $C_0$  为底物初始摩尔浓度. 实验数据为 3 次重复的平均值.

## 2 结果与讨论

### 2.1 高选择性和高催化活性脂肪酶的优选

采用生物催化实现 DMCPE 外消旋体的不对称水解制备所需光学活性的西司他丁手性中间体, 其关键在于获得具有高立体选择性的生物催化剂. 脂肪酶种类较多, 但并非都适合于催化合成手性

*S*-(+)-DMCPA. 我们选择了 Novozyme 435, Lipase F-AP 15, Lipase PS-D, L-1754 和 Lipozyme IM 等 5 种脂肪酶进行酶催化 DMCPE 不对称水解的对比研究. 由表 1 可知, Lipase F-AP 15, L-1754 和 Lipase PS-D 具有 *R* 型立体选择性, 而 Novozyme 435 和 Lipozyme IM 则具有 *S* 型立体选择性, 其中 Novozyme 435 的立体选择性 ( $E > 100$ ) 和催化活性均较高. 因此, 将其作为 DMCPE 不对称水解合成 *S*-(+)-DMCPA 的优选生物催化剂. 尽管 Novozyme 435 在其最适反应温度 (60 °C) 下的催化活性较高, 转化率为 50.0%, 但立体选择性低于 30 °C 之值. 采用 30 °C 反应时 *E* 值为 277.7, 产物 *ee* 值为 99.0%, 故选择 30 °C 用于后续研究. 此外, 对 Novozyme 435 而言, 反应体系中加入 Tween-80 后产物 *ee* 值有所下降, 还需优选其它表面活性剂作为助溶剂, 以增加酶与底物的接触面积, 促进反应的进行.

表 1 不同脂肪酶催化 DMCPE 水解反应的比较

Table 1 Comparison of the hydrolysis of DMCPE catalyzed by different lipases

Lipase	Temperature (°C)	<i>ee<sub>p</sub></i> (%)	<i>ee<sub>s</sub></i> (%)	Conversion (%)	<i>E</i>	Stereoselectivity
Lipase F-AP 15 (5.0 g/L, pH 7.2)	40	85.0	98.3	53.6	57.7	<i>R</i>
L-1754 (6.0 g/L, pH 7.2)	40	79.0	95.0	54.7	31.2	<i>R</i>
Lipase PS-D (14.3 g/L, pH 7.0)	50	85.0	97.8	53.5	54.8	<i>R</i>
Lipase IM (25.9 g/L, pH 7.0)	30	65.9	1.9	2.8	5.0	<i>S</i>
	40	46.7	4.5	8.8	2.9	<i>S</i>
Novozyme 435 (15.0 g/L, pH 7.0)	30	95.8	23.7	19.8	58.8	<i>S</i>
	60	93.2	88.3	48.7	83.6	<i>S</i>
Novozyme 435 (15.0 g/L, pH 7.0)*	30	99.0	34.0	25.6	277.7	<i>S</i>
	60	95.6	95.4	50.0	169.3	<i>S</i>

Reaction conditions: 2 ml of phosphate buffer (1.0 mol/L), DMCPE 0.13 mmol, Tween-80 20 mg/ml, 200 r/min, 20 h.

\*Without the addition of Tween-80 in the reaction system.

### 2.2 反应条件对 Novozyme 435 催化不对称水解反应的影响

#### 2.2.1 缓冲液离子强度的影响

缓冲液离子强度会改变酶分子所处的微环境, 影响其活性构象, 从而影响酶的立体选择性和催化活性. 另外, 一定浓度的盐和酶分子形成复合物, 有利于维持酶的刚性结构, 保持酶的活性. 为此, 考察了缓冲液离子强度对酶催化活性和立体选择性的影响. 图 1(a) 表明, 产物收率随缓冲液离子强度的增大先逐渐升高而后降低, 当离子强度为 1.0 mol/L 时收率最高 (32.9%), 此时 *ee* 值为 99.1%. 这表明离子强度较大的无机盐对酶催化活性产生抑制作用. 因此, 选择 1.0 mol/L 的磷酸缓冲液作为酶催化不对称

水解反应的介质.

#### 2.2.2 酶与 DMCPE 浓度之比的影响

由于底物 DMCPE 在水中的溶解度较低, 底物主要吸附于酶固定化载体上进行反应, 底物浓度与酶浓度对产物的收率和光学纯度的影响相互偶联. 为此, 考察了酶与底物浓度之比对不对称水解反应的影响, 结果如图 1(b) 所示. 随着酶与底物浓度比值的增大, 产物收率不断升高, *ee* 值基本不变 (99.0%~99.2%). 单位酶浓度的收率随酶与底物浓度之比呈现先升高后下降的变化趋势 (见图 2). 综合考虑产物收率、*ee* 值和酶的利用效率, 选择酶与底物摩尔浓度之比为 0.25, 即酶浓度 16 g/L、底物浓度 65 mmol/L 为佳.

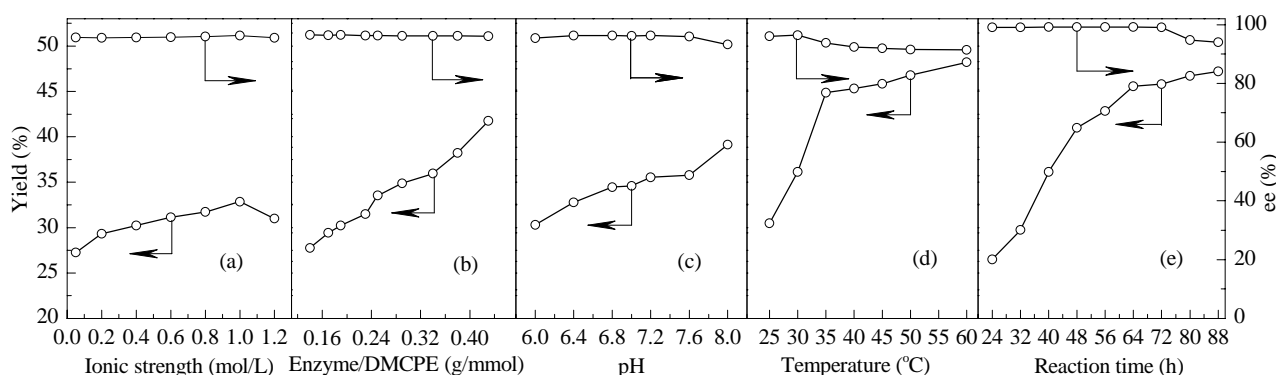


图1 反应条件对产物 ee 值和收率的影响

**Fig. 1.** Effects of reaction conditions on ee and yield of *S*-(+)-DMCPA. Reaction conditions: (a) 10 ml of pH 7.0 phosphate buffer, 150 mg of Novozyme 435, DMCPE 0.65 mmol, 30 °C, 200 r/min, 40 h; (b) 10 ml of 1.0 mol/L phosphate buffer, pH 7.0, 30 °C, 200 r/min, 40 h; (c) 10 ml of 1.0 mol/L phosphate buffer, Novozyme 435 160 mg, DMCPE 0.65 mmol, 30 °C, 200 r/min, 40 h; (d) 10 ml of 1.0 mol/L phosphate buffer, pH 7.2, Novozyme 435 160 mg, DMCPE 0.65 mmol, 200 r/min, 40 h; (e) 10 ml of 1.0 mol/L phosphate buffer, pH 7.2, Novozyme 435 160 mg, DMCPE 0.65 mmol, 30 °C, 200 r/min.

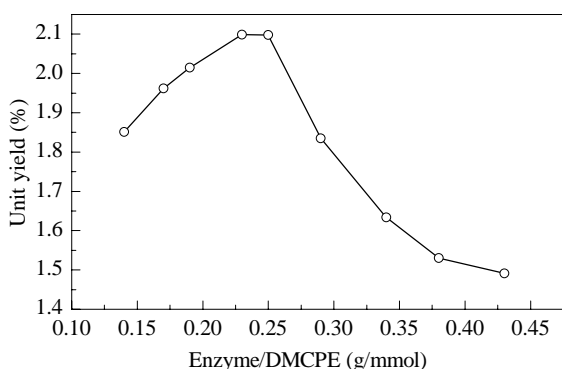


图2 酶与 DMCPE 浓度比对单位酶产物收率的影响

**Fig. 2.** Effect of ratio of lipase to DMCPE concentration on the unit yield of enzyme. Reaction conditions: 10 ml of 1.0 mol/L phosphate buffer, pH 7.0, 30 °C, 200 r/min, 40 h.

### 2.2.3 缓冲液 pH 值的影响

缓冲液 pH 值影响酶的解离状态, 进而影响酶的催化活性和立体选择性. Novozyme 435 是一种刚性很强的蛋白, 在 pH 值 3.5~9.5 内均较稳定<sup>[13]</sup>. 考察了 Novozyme 435 在 pH 值 6.0~8.0 内对 DMCPE 不对称水解反应的影响 (见图 1(c)). 结果表明, 产物收率随 pH 值增大而升高. 当 pH = 8.0 时, 收率最高 (达 39.1%); 但相应的 ee 值有所降低 (96.0%). 显然, 弱碱性环境有利于加快反应, 但同时酶的立体选择性降低. 缓冲液 pH = 7.2 为宜, 此时产物收率为 35.6%, ee 值为 99.1%.

### 2.2.4 反应温度的影响

反应温度对产物收率和 ee 值的影响见图 1(d).

由图可知, 当反应温度低于 35 °C 时, 产物收率随温度的升高而迅速升高, 35 °C 时产物收率达 44.9%; 继续升高温度, 产物收率略有提高. 实验结果表明, Novozyme 435 在 35~60 °C 内对 DMCPE 的不对称水解均表现出较高的催化活性.

温度对 Novozyme 435 催化 DMCPE 不对称水解反应的立体选择性有一定影响, 表现为产物 ee 值随温度升高而有所下降, 当反应温度为 30 °C 时, 酶的立体选择性最高, ee 值为 99.2%. 这与文献[14]报道的 Novozyme 435 催化外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解制备对映体纯 D-对羟基苯甘氨酸, 以及文献[15]报道的固定化脂肪酶 CALB 催化外消旋 1-甲氧基-2-丙基酯生成手性仲醇的结果一致. Sakai<sup>[16]</sup>认为, 降低温度可提高酶的立体选择性, 并给出符合 Eyring 公式的  $E$  值与温度的线性关系式:  $\ln E = \Delta\Delta S^\ddagger/R - \Delta\Delta H^\ddagger/(RT)$ . Dabkowska 等<sup>[17]</sup>认为, 温度对酶催化反应立体选择性的影响与底物两种对映体的能量势垒有关, 两种对映体能量势垒差别越大, 则温度的影响越大. 尽管在 35~60 °C 内的产物收率高于 30 °C 之值, 但产物 ee 值有所降低. 综合考虑产物的收率和 ee 值, 酶催化反应温度以 30 °C 为好.

### 2.2.5 反应时间的影响

图 1(e) 为 Novozyme 435 催化 DMCPE 不对称水解反应的时间曲线. 酶催化水解反应在 24~72 h 内, 产物 ee 值维持在 99.1% 左右, 反应 80 h 时 ee 值下降至 94.8%. 产物收率随反应时间的延长而提

高, 72 h 时产物收率为 45.8%, 略高于 64 h 时的 45.6%。从经济角度考虑, 最佳反应时间为 64 h, 此时产物收率和 ee 值均比较理想。

### 2.3 脂肪酶 Novozyme 435 的重复使用

在上述优化的反应条件下考察了脂肪酶 Novozyme 435 的重复使用。考虑到固定化酶载体上会吸附有底物和产物, 待水解反应结束后, 将乙酸乙酯加入到未经分离酶的反应液中一并进行萃取, 之后, 分离乙酸乙酯层用于分析检测或产物提取, 同时过滤萃取相回收酶。固定化酶经过滤后, 用缓冲液洗涤数次, 然后重新用于催化 DMCPE 的不对称水解反应。图 3 结果表明, 脂肪酶 Novozyme 435 重复使用性能较好, 使用 3 次后的产物收率仍可达初始值的 70.3%, ee 值为 97.8%。重复使用 4 次后, 产物收率为初始值的 56.5%, ee 值为 96.9%。重复使用过程中酶的活性逐渐下降, 主要是由于 Novozyme 435 为南极假丝酵母脂肪酶 B 经吸附制得的固定化酶<sup>[18]</sup>, 在反应振荡过程中可能出现酶分子脱落, 从而造成酶回收量的减少, 影响了酶的重复使用效果。后续研究考虑采用交联剂对 Novozyme 435 进行交联固定以进一步提高酶的稳定性。

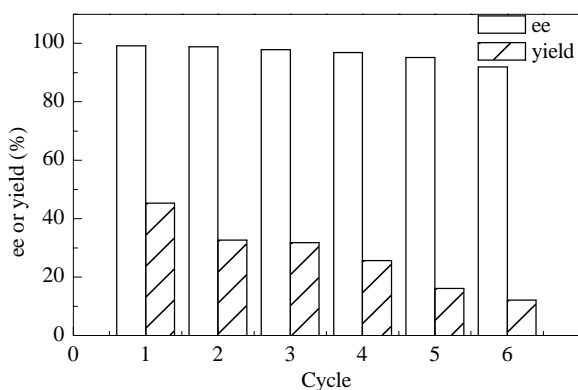


图 3 Novozyme 435 催化 DMCPE 不对称水解的重复使用  
Fig. 3. Repeated hydrolysis of DMCPE catalyzed by Novozyme 435. Reaction conditions: 10 ml of 1.0 mol/L phosphate buffer, pH 7.2, Novozyme 435 160 mg, DMCPE 0.65 mmol, 30 °C, 200 r/min, 64 h.

## 3 结论

采用脂肪酶 Novozyme 435 催化 DMCPE 不对称水解反应是一种环境友好的制备高光学活性西司他丁关键手性中间体 *S*-(+)-DMCPA 的新方法。通过酶催化反应条件的优化, 产物的收率和 ee 值均优于

文献[5,6]采用红球菌产生的脲水解酶催化 2,2-二甲基环丙烷甲脲制备 *S*-(+)-DMCPA 的结果。脂肪酶 Novozyme 435 对 DMCPE 具有较高的立体选择性、催化活性和稳定性, 是一种性能优良的生物催化剂, 并且可重复使用, 具有很好的工业化应用前景。由于 Novozyme 435 价格偏高, 如何提高酶的重复使用次数以降低催化剂成本还需进一步研究。将底物中未反应的对映体进行消旋化处理也可进一步提高底物的利用率。此外, 通过菌种筛选和定向进化获得具有更高酶活力的优良微生物菌种, 有望进一步提高该生物催化制备路线的经济性。

## 参 考 文 献

- 1 Drusano G L. *J Antimicrob Chemoth*, 1986, **18**(Suppl E): 79
- 2 石晓华, 周舞阒, 陈新志. 高校化学工程学报 (Shi X H, Zhou W T, Chen X Zh. *J Chem Eng Chin Univ*), 2005, **19**: 384
- 3 Wang Q W, Yang F K, Du H, Hossain M M, Bennett D, Grubisha D S. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, **9**: 3971
- 4 许建和, 谢彦, 赵丽丽, 刘旭勤. 生物加工过程 (Xu J H, Xie Y, Zhao L L, Liu X Q. *Chin J Bioprocess Eng*), 2007, **5**: 1
- 5 Wang M X, Feng G Q. *J Mol Catal B*, 2002, **18**: 267
- 6 Yeom S J, Kim H J, Oh D K. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **41**: 842
- 7 赵天涛, 张丽杰, 高静, 黄志红, 全学军. 催化学报 (Zhao T T, Zhang L J, Gao J, Huang Zh H, Quan X J. *Chin J Catal*), 2008, **29**: 141
- 8 Chattopadhyay S, Sivalingam G, Madras G. *Polym Degrad Stabil*, 2003, **80**: 477
- 9 Habulin M, Knez Z. *J Mol Catal B*, 2009, **58**: 24
- 10 Rahman Talukder M M, Wu J C, Lau S K, Cui L C, Shimin G, Lim A. *Energ Fuel*, 2009, **23**: 1
- 11 Rotticci D. [PhD Dissertation]. Stockholm: Royal Inst Technol, 2000
- 12 Chen C S, Wu S H, Girdaukas G, Sih C J. *J Am Chem Soc*, 1987, **109**: 2812
- 13 Kirk O, Christensen M W. *Org Process Res Dev*, 2002, **6**: 446
- 14 张媛媛, 宗敏华, 娄文勇, 林颖敏, 吴虹. 催化学报 (Zhang Y Y, Zong M H, Lou W Y, Lin Y M, Wu H. *Chin J Catal*), 2005, **26**: 106
- 15 Berendsen W R, Gendrot G, Resnick S, Reuss M. *J Biotechnol*, 2006, **121**: 213
- 16 Sakai T. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**: 2749
- 17 Dabkowska K, Szweczyk K W. *Biochem Eng J*, 2009, **46**: 147
- 18 Pedersen S, Hansen T T. US 5 342 768. 1991