

2-氨基丁酸的酶拆分

奚强,丁友友,林丫丫,李俊

(武汉工程大学化工与制药学院,湖北省新型反应器与绿色化工重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘要:为了得到右旋的2-氨基丁酸,对2-氨基丁酸的拆分进行了研究. 通过从猪肾中提取的氨基酰化酶选择性地水解(R,S)-2-N-乙酰氨基丁酸,得到了(S)-2-氨基丁酸,旋光度 = -21.58° ($C=2.5 \text{ mol/L}$, HCl), 收率为71.8%. 试验结果表明最佳拆分条件为:底物浓度为0.1 mol/L;底物与酶质量比为100:1; pH 6.8~7.0; 温度为37℃;反应时间为24 h.

关键词:酶拆分;酰基转移酶;选择性水解;(S)-2-氨基丁酸

中图分类号:O629.71

文献标识码:A

0 引言

2-氨基丁酸(2-amino-butyric acid)具有氨基酸的通性,能发生酯化、酰化和氧化脱氨等反应,其分子结构中含有一个手性中心. 不同构型的2-氨基丁酸在化学性质上几乎没有区别,在物理性质上有些许差异,2-氨基丁酸是抑制人体神经信息传递的天然氨基酸,也是一种重要的化工原料和医药中间体,已广泛应用于药物合成^[1]. (S)-2-氨基丁酸经酯化和加氢还原可以制备出(S)-2-氨基丁醇, (S)-2-氨基丁醇则用于抗结核药物盐酸乙胺丁醇的合成^[2].

氨基酸的拆分方法有很多, L-氨基酸的生物合成可采用完整的微生物细胞或从微生物中提取的酶作为生物催化剂进行生物转化. 生物催化剂的区域选择性强、反应条件温和、操作简便、成本较低、公害少,且能完成一些化学合成难以进行的反应,因此该领域的研究引起了广泛的关注^[3-5]. 在氨基酸的生物拆分方法中,以氨基酰化酶为催化剂进行生物拆分是最常见的方法之一^[6-7],该酶具有立体选择性强、底物专一性的优点,能立体选择性地水解N-乙酰-L-氨基酸,适合于多数外消旋氨基酸的拆分. 还有文献报道了利用米曲霉氨基酰化酶^[8-9]和固定化青霉素酰化酶^[10]对氨基酸或类似物进行了拆分,都得到了较好的效果. 拆分的方法还有化学拆分法^[11]和高效液相色谱法^[12]等,相对这些方法而言,酶法拆分具有反应条件温和、易于工业化等诸多优点. 拆分后的乙酰化氨基酸可以进行消旋^[13-14],消旋后可再次投入拆分,从

而提高了产率. 虽然酶法制备手性氨基酸较为成熟,但用它来制备手性的2-氨基丁酸则没有见诸报导. 本实验首次采用从猪肾中提取出的水解酶^[15],制备具有重要工业价值的(S)-2-氨基丁酸,主要的工艺路线为:将混旋的氨基丁酸(1)经乙酰化得到酰化2-氨基丁酸(2),然后用酶法拆分酰化产物(2),最后采用732#强酸性阳离子交换树脂分离得到(S)-2-氨基丁酸(3),实验路线如图1所示.

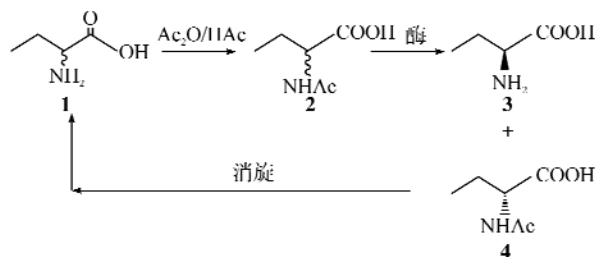


图1 (S)-2-氨基丁酸的合成路线

Fig. 1 Synthesis route for (S)-aminobutyric acid

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RY 1 熔点仪,天津市分析仪器厂生产;精密 pH 计(PHS 3C),上海雷磁仪器厂生产;TD5 II 低速多管架自动平衡离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司生产;RE 52C 旋转蒸发器,巩义市予华仪器有限责任公司生产;油浴锅,郑州长城科工贸有限公司生产;SHB III 循环水真空泵,郑州长城科工贸有限公司生产;WZZ-2A 型自动旋光仪,上海精密科学仪器有限公司生产.

冰乙酸,分析纯,天津市博迪化工有限公司生产;乙酸酐,AR,湖北大学化工厂生产;猪肾,超市

购买,新鲜;无水乙醇,分析纯,天津博迪化工有限公司生产;硫酸铵,分析纯,上海试一化学试剂有限公司生产;氯化钴,分析纯,重庆化学试剂厂生产;丙酮,分析纯,天津市博迪化工有限公司生产;氨水,分析纯,信阳市化学试剂厂生产;盐酸,分析纯,信阳市化学试剂厂;茚三酮,分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产;732[#]强酸性阳离子交换树脂,国药集团化学试剂有限公司生产。

1.2 (R,S)-2-N-乙酰氨基丁酸的合成

称取(R,S)-2-氨基丁酸41.2 g(0.4 mol)溶于200 mL的冰醋酸中,升温至65℃直至其完全溶解,待反应体系澄清后,用恒压滴液漏斗匀速滴加乙酸酐66.6 mL(约0.7 mol),继续升温至80℃,恒温反应2 h。反应完成后,将反应液减压蒸馏除去冰乙酸和过量的乙酸酐,加蒸馏水数次,每次约10 mL,抽干至出现大量的白色粉状固体。然后加入100 mL丙酮,回流溶解后冷却结晶,抽滤后用少量丙酮洗涤滤饼,将滤饼烘干后得到产品。将滤液减压蒸馏后,重复以上的操作步骤两次。所得固体烘干后混合,产物重量47.2 g,收率为81.3%。

1.3 (R,S)-2-N-乙酰氨基丁酸的拆分

1.3.1 猪肾氨基酰化酶的提取 取新鲜去髓质的猪肾两个,洗净后切片,铺盘,滴干,质量约200 g,放入-10℃的冷冻箱内冷冻,约1 h后将冷冻的猪肾解冻,加入1.5倍于猪肾重量的稀乙醇水溶液(30%),并加入少许氯化钴(研究证明 Co^{2+} 是酰化酶的激活离子^[16]),在组织捣碎机内捣成匀浆,超声波处理10 min。将匀浆用离心机离心20 min(转速3 500 r/min),取上层清液,约350 mL,再向清液中加入2倍于清液体积的95%乙醇及少量(约1 g)硫酸铵,静置沉淀,然后再离心20 min(转速3 500 r/min)得到灰色沉淀物。向沉淀物中加入100 mL丙酮脱水,抽滤,得到灰褐色粉末状颗粒约20 g,即为粗酶制品,置于-10℃条件下保存备用。

1.3.2 (R,S)-2-N-乙酰氨基丁酸的拆分 称取(R,S)-2-N-乙酰氨基丁酸4.35 g(0.03 mol)溶于300 mL的蒸馏水中,用2 mol/L NaOH调节pH=6.7,升温至35℃,加入自制的猪肾酰化酶0.435 g,恒温反应24 h。反应结束后抽滤,酶用适量的丙酮洗涤后放入冰箱中冷藏。将滤液调节pH至5.6,升温至100℃后自然冷却,抽滤除去白色絮状物。将滤液浓缩至100 mL,通过732[#]强酸性阳离子交换树脂分离纯化,收集含(S)-2-氨基丁酸的溶液^[17](茚三酮检测^[18]),浓缩至5 mL,用2 mol/L的HCl调节pH=5.56,5℃结晶,抽滤,于60℃烘干,将白色固体用50%乙醇水溶液重结晶,

所得产品重量为1.11 g,收率为71.8%,旋光=+21.58°(C=2.5 mol/L HCl)(标准值: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ =+21.6°)。

2 结果与讨论

2.1 N-乙酰化反应

2-氨基丁酸与乙酸酐的反应属于双分子亲核取代反应,pH值呈碱性有利于氨基酸类物质的乙酰化反应,在酸性条件下则易生成 $-\text{NH}_3^+$ 形式,不利于亲核试剂的进攻。反应液的OH⁻浓度过高会加速乙酸酐的水解,反应会不断地产生乙酸和放出大量的热,因此反应液的pH值不宜过高。实验中曾采取了加入氢氧化钠使反应体系为弱碱性的方法^[19],加入两倍于氨基酸摩尔质量的乙酸酐才使得反应完全,且生成了大量的盐,经处理后得到的产物收率仅为18.3%。同时还尝试了用乙酸钠的水溶液提供碱性环境,在常温下滴加乙酸酐的方法,效果也较差。以上两种方法都存在一些缺陷,且产率较低。后来利用乙酸作溶剂,丙酮结晶的方法制得了较高收率的(R,S)-2-N-乙酰氨基丁酸,熔点133~135℃(文献值129~130℃)。

2.2 影响酶拆分的因素

2.2.1 底物浓度和酶用量对酶拆分的影响 猪肾酰化酶具有一般酶的通性,即底物浓度对反应速率的影响符合米氏方程。根据文献^[7-8]的报道,酶拆分过程中所用的底物的浓度一般为0.1 mol/L,并且做过底物浓度为0.05 mol/L,0.1 mol/L和0.5 mol/L的试验,结果发现酶拆分的最佳底物浓度为0.1 mol/L。增加酶的用量会提高反应速度,但是反应速度过快又不利于(R,S)-2-氨基丁酸拆分的分布进行,影响产物的光学纯度,经研究发现增加酶的用量对收率的影响不明显。底物与酶的质量比对酶拆分的影响如图2所示,当 $m(\text{底物})/m(\text{酶})=100:1$ 时光学纯度最高。(S)-2-氨基丁酸的光学纯度^[6](Optical Purity, O. P.): $\text{O. P.} = \frac{[\alpha]_{\text{实测}}}{[\alpha]_{\text{纯(S)}}} \times 100\%$ (其中 $[\alpha]$ 为比旋光度)。

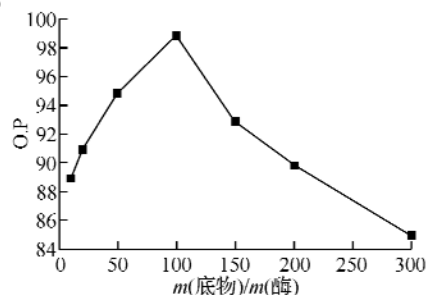


图2 底物与酶的质量比对酶拆分的影响

Fig. 2 Effect of the weight ratio of substance and enzyme on enzyme resolution 2

2.2.2 pH 值对酶拆分的影响 在相同条件下,考察反应体系的 pH 值对酶拆分结果的影响.结果如图 3 所示,当 pH 在酸性范围内,随 pH 值的增加,产物的收率增加.当反应体系在碱性范围时,随 pH 值的增加,产物的收率减少.从实验结果(图 3)可以看出 pH 值对酶促反应的影响很大,当 pH 值过高或过低时,不但影响最终产品的收率,还影响产品的纯度,所得产品的旋光度达不到要求,这可能是因为在过酸或过碱的条件下,酶活性降低,并且旋光性物质有一定程度上的消旋.因此采用猪肾酰化酶拆分(R,S)-2-氨基丁酸最适合的 pH 值为 6.8~7.0.

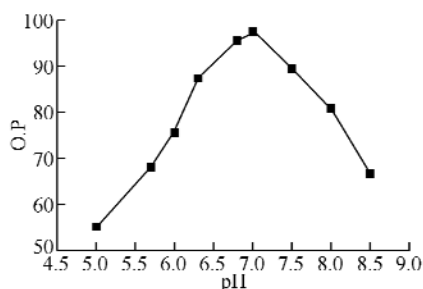


图 3 pH 值对酶拆分的影响

Fig. 3 Effect of pH value on enzyme resolution 2

2.2.3 温度对酶拆分的影响 考察不同反应温度下酶拆分的效果,结果如表 1 所示.由表 1 可知,当温度较低时,由于酶活较低,反应速度缓慢,升温可加快酶的水解速度,使(S)-2-氨基丁酸的收率增加.当温度进一步升高时会使酶蛋白变性失活,使得催化效率降低.酶促反应速度到达最大值时的速度即为该酶的最适温度,在实验条件下,较适合的反应温度为 37 ℃.另外,温度对产品质量的影响不如 pH 值对产品质量的影响显著,最终产品的旋光度较接近标准值.

表 1 温度对酶拆分的影响

Table 1 Effect of reaction time on enzyme resolution 2

乙酰氨基丁 酸用量/g	酶用量/g	t/℃	产率/%	$[\alpha]_D^{25}$
4.35	0.0435	25	56.4	19.39
4.35	0.0435	28	57.1	19.71
4.35	0.0435	30	60.3	20.20
4.35	0.0435	35	72.3	21.21
4.35	0.0435	37	73.5	21.58
4.35	0.0435	40	62.5	20.99

2.2.4 反应时间对酶拆分的影响 考察不同反应时间下酶拆分的效果,结果如表 2 所示.由表 2 可知,当反应时间增加时,产物的光学纯度和产率也升高,但超过 24 h,产物的光学纯度和产率却随之下降.时间过短,酶的拆分反应不充分,使得产率和旋光度均达不到要求,而时间过长会发生正

向和逆向的竞争反应,使得产率和旋光度都有所下降,因此最佳拆分时间为 24 h.

表 2 反应时间对酶拆分的影响

Table 2 Effect of reaction temperature on enzyme resolution 2

乙酰氨基丁 酸用量/g	酶用量/g	t/℃	产率/%	$[\alpha]_D^{25}$
4.35	0.0435	2	51.5	16.26
4.35	0.0435	5	55.3	16.61
4.35	0.0435	8	61.6	17.86
4.35	0.0435	12	64.8	18.96
4.35	0.0435	18	67.3	20.00
4.35	0.0435	20	70.5	21.45
4.35	0.0435	24	72.6	21.51
4.35	0.0435	28	75.9	20.97

3 结 语

本实验首次用猪肾氨基酰化酶成功地拆分了混旋的 2-氨基丁酸,具体研究了影响酶拆分的因素.通过对酶拆分方法的改进,在温度为 37 ℃,pH 值为 6.8~7.0,底物浓度为 0.1 mol/L,底物与酶的质量比为 100:1,反应时间为 24 小时,得到了比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +21.58^\circ$,收率为 71.8% 的(S)-2-氨基丁酸.

参考文献:

- [1] 奚强,林丫丫,王冲,等. 2-氨基丁酸的合成研究[J]. 武汉工程大学学报,2007,29(4): 15-17.
- [2] 白国义,陈立功,邢鹏,等. 乙胺丁醇的合成[J]. 精细化工,2004,21(12): 943-945.
- [3] Mamoru W, Kazuaki Y, Yoshihiko H, et al. Production of d-amino acids by N-acyl-d-amino acid amino hydrolase and its structure and function[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 23: 71-85.
- [4] Hidenobu K, Naoyoshi I, Yasuhisa A. Enhancement of the thermostability and catalytic activity of d-stereospecific amino-acid amidase from Ochrobactrum anthropi SV3 by directed evolution[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 21: 283-290.
- [5] Baek D, Song J, Lee S, et al. New thermostable d-methionine amidase from Brevibacillus borstelensis BCS-1 and its application for d-phenylalanine production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32: 131-139.
- [6] 何仕国,俞一军,许文松. DL-苯丙氨酸的酶法拆分研究[J]. 化学反应工程与工艺,2004,20(1): 64-69.
- [7] 黄冠华,夏仕文. 酶法拆分 DL-苯丙氨酸制备 D-苯丙氨酸[J]. 合成化学,2007,15(1): 69-72.

- [8] 曹军卫,高春东.产氨基酰化酶米曲霉高产菌株的选育[J].氨基酸和生物资源,1999,21(3): 20-22.
- [9] 王燕,张凤宝,宋正孝,等.米曲霉菌体光学拆分N-乙酰-DL-苯甘氨酸的动力学研究[J].化学工程,2004,32(2): 33-37.
- [10] Fadnavis N W, Sharfuddin M, Vadivel S K. Resolution of 2-amino-1-butanol with immobilised penicillin G acylase[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1999,10 (4): 495-500.
- [11] Yajima T, Aizawa Y, Nishida M, et al. Preparation of optically active 2-aminobutanoic acid via optical resolution by replacing crystallization [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2007, 71(5): 1338-1341.
- [12] 顾世利,巴杭,阿吉,等.手性药物拆分方法的研究[J].新疆师范大学学报(自然科学版),2004,23(1): 36-39.
- [13] 张清玉,谭欣,赵林,等.乙酰-D-蛋氨酸消旋工艺的研究[J].化学工业与工程,2004,21(2): 91-95.
- [14] 何■,蒋岚,张亚静,等.氨基酸的消旋研究[J].氨基酸和生物资源,2005,27(3): 55-57.
- [15] 邵友元,谭圣君,邓冰,等.酶法拆分DL-蛋氨酸工艺条件的优化控制[J].食品科技,2006,8: 157-159.
- [16] 张彤,周海梦.锌离子对氨基酰化酶构象及其稳定性的影响[J].生物物理学报,1994,10(2): 198-202.
- [17] 邹建辉,翁连进,王士斌,等.732阳离子交换树脂吸附L-组氨酸的特性[J].化学工程,2006,34(2): 1-3.
- [18] 王海龙,崔智慧,岳秀兰.氨基酸薄层层析茚三酮显色改良[J].包头医学院学报,2003,19(4): 312-313.
- [19] 史黎黎,秦凡.正交设计优化N-乙酰-L-亮氨酸的合成研究[J].江汉大学学报,2007,35(2): 44-46.

Resolution of (R,S)-2-aminobutyric acid by enzyme

XI Qiang, DING You-you, LIN Ya-ya, LI Jun

(School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology;
Hubei Key Lab of Novel Reactor and Green Chemical Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: A study was made on the resolution of 2 aminobutyric acid in order to obtain dextrogyrate 2 aminobutyric acid. In our experiment, (S)-2-aminobutyric acid was resolved from (R,S)-2-aminobutyric acid by selective hydrolyzation of (R,S)-2-N-acyl aminobutyric acid which in the presence of acylase was derived from the kidney of pigs. The optical rotation = $+21.58^{\circ}$ ($C=2.5N$ HCl) and the yield of (S) 2 aminobutyric acid is 71.8%. The experimental results showed that the best hydrolytic conditions are as follows: the concentration of the substrate is controlled to about 0.1 mol/L; m (substrate): m (enzyme)=100:1; pH value of reaction system is 6.8~7.0; reaction temperature is 37 °C and reaction time is 24 h.

Key words: enzyme resolution; aminoacylase; hydrolyzation; (S) aminobutyric acid

本文编辑:张 瑞