

无溶剂体系中蛋白酶催化氨基酸糖酯合成研究^{*}

黄成红¹, 徐 迪^{1,2}, 黄仲立³, 马 林¹

(1 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2 华南农业大学资源与环境学院, 广东 广州 510642

3 中山大学测试中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 研究了在无溶剂体系中 α -糜蛋白酶催化 N-BOC-L 苯丙氨酸乙酯与 D-葡萄糖的酯交换反应, 考察了水含量、反应时间、搅拌以及底物摩尔比等因素对酯交换反应的影响。结果表明是在 6 位伯羟基 (6OH) 进行定位酰化。生成的氨基酸葡萄糖酯可通过 HPLC-UV 定量检测, 最适条件下的反应转化率达到 90% 以上。LC-MS 分离并初步定性分析, 产物相对分子质量为 445 与理论目标产物的一致。

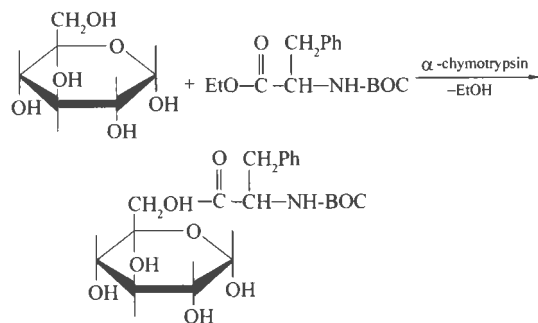
关键词: 蛋白酶; 无溶剂体系; α -糜蛋白酶; 苯丙氨酸; 葡萄糖

中图分类号: Q643.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 01-0069-04

无溶剂有机合成是有机合成的一种新方法^[1]。无溶剂条件下的酶催化反应也表现出明显的优越性。在无溶剂条件下, 即在酶催化底物量不变的情况下, 底物浓度达到最大值, 而且不必考虑底物溶解度对酶催化活性的影响。

蛋白酶可以可逆地催化酯水解反应, 可用于合成糖酯, 糖酯广泛用作医药中间体、食品添加剂和生物可降解高分子单体。由于糖多羟基的存在, 化学合成糖酯很困难, 限制了它的工业应用。有机蛋白酶催化氨基酸糖酯合成已多见报导^[2-3]。Cervovsky 等^[4]用有机相酶催化反应, 进行氨基酸糖酯合成的研究, 反应转化率达到 20% ~ 60%, 并表明产物主要是 6 位氨基酸糖酯。但由于糖是极性化合物, 需使用强极性溶剂 (如吡啶、DMF 等, 或者将糖形成糖苷或其他衍生物以增加它在有机溶剂中溶解性^[5]); 而酶是水溶性的, 不溶于有机溶剂, 这就给有机溶剂中酶催化反应带来许多困难。无溶剂条件下或超饱和体系中酶催化可以解决这些问题。

用蛋白酶进行氨基酸糖酯合成的研究。 α -糜蛋白酶 (E 3.4.21.1) 能催化水解 L 型芳香族氨基酸 (如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸) 所组成的肽键、酰胺键和酯键^[6]。第一阶段用 α -糜蛋白酶直接催化苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸与葡萄糖进行酯化反应, 第二阶段将苯丙氨酸形成活化酯后与葡萄糖进行酯交换反应, 反应式如下:



1 实 验

1.1 仪器和材料

78-1 磁力加热搅拌器仪器, GKG-11R1 型可控恒温水浴锅, SHZ-D 循环水式真空泵, ZF-Z 型三用紫外仪, HP1100 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, 岛津 LC-MS-2010。

N-BOC-L 酪氨酸、N-BOC-L 赖氨酸、N-BOC-L 苯丙氨酸均购于 Sigma-Aldrich 公司, 蛋白酶购于日本化成工业株式会社, α -糜蛋白酶、胃蛋白酶 DMAP 和 DCC 均为国产, 其它试剂均为分析纯, 购于广州化学试剂厂。

反应产物采用 HPLC 分离, DAD 检测, LC-MS 分离并定性分析。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白酶催化氨基酸与葡萄糖的酯化反应
将 3 种氨基酸 N-BOC-L 酪氨酸、N-BOC-L 赖氨酸、

* 收稿日期: 2005-04-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20032020)

作者简介: 黄成红 (1981 年生), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 马林; E-mail: cesma1@zsu.edu.cn

N-BOC-L-苯丙氨酸分别与 3 种蛋白酶 α -糜蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶适量交叉混合于 9 支小试管中, 再加入葡萄糖和一定 pH 值的 K_2HPO_4 KH_2PO_4 缓冲溶液 10 μ L, 搅拌均匀。和底物空白、酶空白一起密封置于 45 $^{\circ}$ C 水浴中反应 8 d。取出用甲醇-水混合溶剂萃取后进行 HPLC-UV 分离检测。

1.2.2 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯的合成^[7] 按文献用 DMAP 和 DCCl 在二氯甲烷中催化脱水合成, 产物用乙酸乙酯萃取并用饱和 $NaHCO_3$ 溶液洗涤有机层, 以无水 Na_2SO_4 干燥, 有机溶剂在真空干燥箱抽干, 得透明油状物。

1.2.3 α -糜蛋白酶催化 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应 分别称取 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯 (25 μ mol) 与硅藻土的混合物 21.9 mg 和葡萄糖 (0~9.9 mg) 于小试管, 再分别加入 α -糜蛋白酶 (0~10 mg) 和一定 pH 值的 K_2HPO_4 KH_2PO_4 缓冲溶液 (0~20.0 μ L) 于小试管中, 搅拌均匀。和底物空白一起密封置于 45 $^{\circ}$ C 水浴中反应 60~90 h。取出用甲醇-水混合溶剂萃取后进行 HPLC-UV 检测。

1.2.4 高效液相色谱分析 N-BOC-L-苯丙氨酸葡萄糖酯、N-BOC-L-苯丙氨酸和葡萄糖等反应混合物 25 μ mol 用体积比 1:1 的甲醇-水 (含 $\varphi=0.08\%$ CH_3COOH) 混合溶剂 0.5 mL 萃取, 然后通过 HPLC 分离, 流动相为体积比 78:22 的甲醇-水 (含 $\varphi=0.08\%$ CH_3COOH) 混合溶剂, 最后用 DAD 检测。根据 N-BOC-L-苯丙氨酸葡萄糖酯和 N-BOC-L-苯丙氨酸紫外吸收的峰面积比例计算产物 N-BOC-L-苯丙氨酸葡萄糖酯的比例, 得出反应转化率。

1.2.5 液相质谱分析 N-BOC-L-苯丙氨酸葡萄糖酯、N-BOC-L-苯丙氨酸和葡萄糖等反应混合物 25 μ mol 用体积比 1:1 的乙腈-水 (含 $\varphi=0.08\%$ CH_3COOH) 混合溶剂 0.5 mL 萃取, 然后通过液相柱分离, 流动相为体积比为 70:30 的乙腈-水 (含 $\varphi=0.05\%$ $HCOOH$) 混合溶剂, 最后通过质谱仪检测。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶催化氨基酸与葡萄糖的酯化反应

氨基酸直接与葡萄糖在蛋白酶催化下进行酯化, 反应效果不好。相比之下, α -糜蛋白酶在生理活性的 pH 值下催化效果比较好。胃蛋白酶在 pH = 1.5~2.0 的酸性环境中催化活性会比较好。3 种氨基酸的反应性没有明显差别, 基本上都没有产物氨基酸糖酯, 仅 α -糜蛋白酶催化的苯丙氨酸有极少量酯生成。

2.2 α -糜蛋白酶催化 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应

鉴于无溶剂体系中 α -糜蛋白酶催化 N-BOC-L-苯丙氨酸与葡萄糖的酯化反应效果较差, 为此, 合成了 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯, 研究了 α -糜蛋白酶催化 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应。

2.2.1 底物摩尔比对 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应的影响 一般在蛋白酶催化反应中, 底物摩尔比为 1 时反应效果最好, 并且可避免多酯及其它副产物生成。由图 1 可见, 转化率在葡萄糖与 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯的摩尔比为 0.75 左右最好。由于 N-BOC-L-苯丙氨酸乙醇酯是油状物, 比较难抽干其中的水, 所以葡萄糖与 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯的实际摩尔比接近 1。

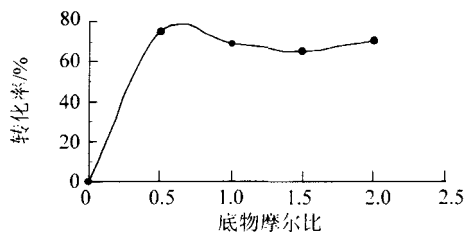


图 1 底物摩尔比对反应的影响

Fig 1 Effect of substrate mol ratio on solvent free transesterification catalyzed by α -chymotrypsin

2.2.2 加酶量对 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应的影响 酶不会改变反应平衡, 但可以加快反应速度, 所以在一定时间内转化率随酶量增加相应增大。我们往往权衡反应转化率、反应时间及工艺成本寻求一个比较合适的加酶量。由图 2 可见, 当底物量、加水量及其它条件一定时, 转化率随加酶量增加而增大, 到一个最大值时又呈下降趋势。这可能因为水量一定, 过多的酶争夺水分子, 必然有一些酶分子处于失活状态, 导致反应体系中载体、底物和带结合水的活性酶分子不能均匀分散, 使反应速度减小。这样, 一定时间内的反应转化率也就相应减小。

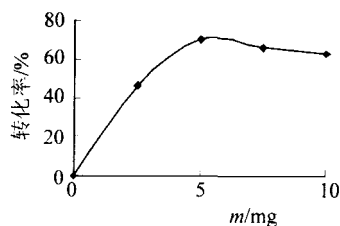


图 2 加酶量对反应的影响

Fig 2 Effect of amount of enzyme on solvent free transesterification catalyzed by α -chymotrypsin

2.2.3 加水量对 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应的影响 酶催化反应中, 酶只需少量结合水, α -糜蛋白酶只需几十分子水既可以保持其构象以维持催化活性。多余的水一方面会使 α -糜蛋白酶失活, 另一方面会导致氨基酸糖酯水解, 蛋白酶在水溶液中是催化多肽和酯水解的。由图 3 可知, 在未加水时, 依然有氨基酸糖酯生成, 但转化率很低, 只有 10% 左右。当加水量增大时, 转化率也随之增大, 但副反应产物也增多。 α -糜蛋白酶与水的质量比为 1:1 较合适。

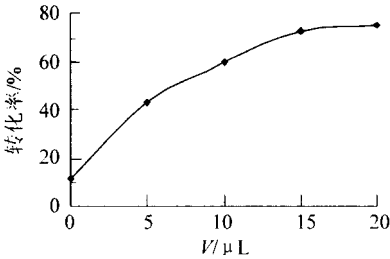


图 3 加水量对反应的影响

Fig 3 Effect of amount of water on solvent free transesterification catalyzed by α -chymotrypsin

2.2.4 pH 值对 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应的影响 缓冲溶液的 pH 值主要会对酶活性中心的离子键、疏水作用及氢键有影响, 并进一步影响其高级结构。 α -糜蛋白酶的酶解作用是由三个活性中心协同完成的, 而这三个活性中心又分别在两条链 (B 链和 C 链), 所以 pH 值对其影响不可忽略, 合适的 pH 值维持其高级结构是很重要的^[8]。由图 4 可知, α -糜蛋白酶的催化活性在 pH 值 7~8 时比较好, 而在这个范围附近, pH 值对酶的催化活性影响并不是很大, pH=7.5 时出现最大值。

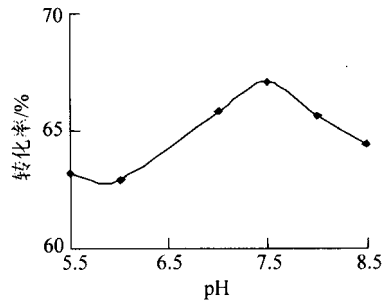


图 4 pH 对反应的影响

Fig. 4 Effect of pH on solvent free transesterification catalyzed by α -chymotrypsin

2.2.5 反应时间对 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应的影响 由于无溶剂体系的反应在反应过程中没有搅拌, 完全是靠自然扩散来完成, 所以随着反应时间延长, 反应的转化率增大。图 5 反

映了反应时间对 α -糜蛋白酶催化 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应转化率的影响, 图 5 (a) 为未反应的 HPLC-UV 检测图, 谱图上只有 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯的吸收峰。图 5 (b) 为反应 60 h 的检测图, 第一个峰为 N-BOC-L-苯丙氨酸葡萄糖酯的吸收峰, 从峰面积可以看到反应的转化率在 70% 左右。图 5 (c) 为反应 90 h 的检测图, 反应基本完全, 转化率达到 90% 以上。

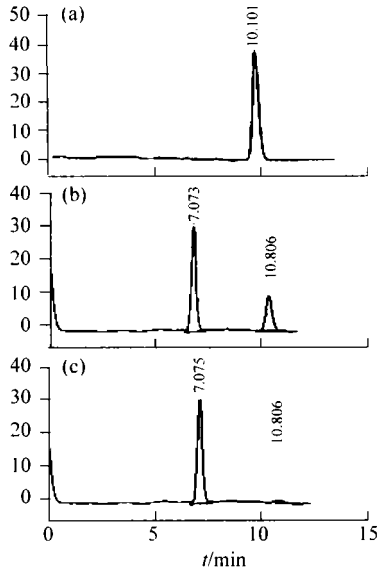


图 5 反应时间对 N-BOC-L-苯丙氨酸乙酯与葡萄糖的酯交换反应的影响

Fig 5 Effect of reaction time on solvent free transesterification catalyzed by α -chymotrypsin

2.2.6 LG-MS 谱图数据 N-BOC-L-苯丙氨酸葡萄糖酯的 LG-MS 谱图见图 6 m/z 264 (M^+ , 1), 444 (M^+ , 1)。

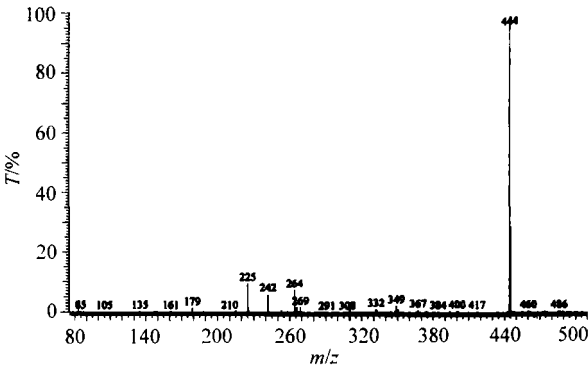


图 6 N-BOC-L-苯丙氨酸葡萄糖酯的 LG-MS 谱图

Fig 6 LG-MS chromatogram of N-BOC-L-phenylalanine glucose ester

3 结 论

N-BOC-L-苯丙氨酸与葡萄糖在 α -糜蛋白酶催

化下进行酯化反应效果不好,生成 *N*-BOC-*L*-苯丙氨酸乙酯后再与葡萄糖在 α -糜蛋白酶催化下进行酯交换反应,反应的转化率提高。这与 α -糜蛋白酶的催化机制有关,His 57 的残基咪唑基是一个高效的质子受体与给体,它能接受 Ser 195 残羟基的质子,使 Ser 195 形成一个高度极化亲核基团,利于和底物的亲电基团结合。而直接用氨基酸,氨基酸羧基上的质子则可能与 Ser 195 的残羟基竞争,影响活性中心的协同作用机制^[9]。

产物分析时由于使用甲醇-水(含 $\varphi = 0.08\%$ CH_3COOH)混合溶剂, $\text{pH} \approx 3$ 中间产物 *N*-BOC-*L*-苯丙氨酸乙酯已经水解为 *N*-BOC-*L*-苯丙氨酸和乙醇。故检测到初始反应物 *N*-BOC-*L*-苯丙氨酸和终产物 *N*-BOC-*L*-苯丙氨酸葡萄糖酯。酶催化反应受多种因素影响,我们通过一系列的条件实验,以寻找反应的最佳条件。理想的无溶剂催化反应中,两种底物的分子等量、均匀的分布,单分子层排列在每个载体分子周围。载体表面形成的产物分子层可以及时离开,其它底物分子又扩散到载体分子表面^[10]。这样在没有搅拌的情况下,酶分子可以通过自然扩散,以最大的反应速度催化反应完成。

参考文献:

- [1] TANKA K, TODA F. Solvent free organic synthesis[J]. Chem Rev. 2000. 100Q. 1025.
- [2] RIVA S, CHOPINEAU J. Protease catalyzed regioselective

esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylamide[J]. J Am Chem Soc. 1988. 11Q. 584-589.

- [3] WU Q, WANG N, XIAO Y M, et al. Regiospecific alkaline protease catalyzed divinyl acyl transesterification of primary hydroxyl groups of mono- and disaccharides in pyridine[J]. Carbohydrate Research. 2004. 33Q. 2059-2067.
- [4] PARK O J, JONG J, YANG J W. Protease catalyzed synthesis of disaccharide amino acid ester in organic media[J]. Enzyme and Microbial Technology. 1999. 25. 455-462.
- [5] THERIAULT M, KLIBANOV A M. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine[J]. J Am Chem Soc. 1986. 108. 5638.
- [6] 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙, 等. 工具酶的活力测定[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. 101.
- [7] DHAON M K, OLSEN R K, RAMASAMY K. Esterification of *N*-protected α -amino acids with alcohol/carbodiimide/4-(dimethylamino)-pyridine racemization of aspartic and glutamic acid derivatives[J]. J Org Chem. 1982. 47. 1962-1965.
- [8] 张玉彬. 生物催化与手性合成[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 16.
- [9] 邹国林. 酶学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1997. 30.
- [10] 马林, 徐迪, 古练权. 无溶剂体系固定化脂肪酶催化的酯交换反应研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2003. 42(5): 39-43.

Protease catalyzed Synthesis of Monosaccharide Amino Acid Ester in Solvent free System

HUANG Cheng-hong¹, XU Di^{1,2}, HUANG Zhong-li³, MA Lin¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

(2. College of Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(3. Instrumental Analysis & Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract The transesterification of *N*-BOC-*L*-phenylalanine ethylester with *D*-glucose catalyzed by α -chymotrypsin in solvent free system was studied. The effects of water activity or water content, reaction time, stirring on the transesterification were investigated. Results shown that *D*-glucose was selectively acylated at one primary hydroxyl (6-OH). The product could be tested qualitatively and quantitatively by HPLC-UV. The conversion was beyond 90% under the best conditions. The molecular weight of product is 445, which is corresponding to the theoretical product.

Key words protease; solvent free system; α -chymotrypsin; phenylalanine; glucose