



引用格式:梁国斌,翟良创,汪斌,等. 固定化卤醇脱卤酶的制备及催化合成 ATS-5 的稳定性考察[J]. 轻工学报,2017,32(2):26-32.

中图分类号:Q814.2 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.2.005

文章编号:2096-1553(2017)02-0026-07

# 固定化卤醇脱卤酶的制备及催化合成 ATS-5 的稳定性考察

## Preparation of immobilized halohydrin dehalogenase and the stability testing of catalytic synthesis ATS-5

梁国斌,翟良创,汪斌,姚佳,周全法

LIANG Guo-bin, ZHAI Liang-chuang, WANG Bin, YAO Jia, ZHOU Quan-fa

江苏理工学院 化学与环境工程学院,江苏 常州 213001

School of Chemical and Environmental Engineering, Jiangsu University of Technology, Changzhou 213001, China

关键词:

(R)-4-氰基-3-羟基丁酸乙酯;固定化;卤醇脱卤酶;催化稳定性

Key words:

(R)-4-cyano-3-hydroxybutyric acid ethyl; immobilization; halohydrin dehalogenase; catalytic stability

摘要:研究了海藻酸钠固定化卤醇脱卤酶(HHDH)的制备条件,确定其最佳工艺条件为:海藻酸钠浓度 3.5%,HHDH 给酶量  $2.4 \times 10^4$  U/mL,戊二醛浓度 1.00%,氯化钙浓度 1.5% 和固化时间 2 h. 在此条件下,HHDH 包埋率为 52.1%,活力回收率为 75.2%. 固定化HHDH 间歇催化合成(R)-4-氰基-3-羟基丁酸乙酯(ATS-5),经 5 批次反应后,相对活力为 51.2%;固定化HHDH 连续催化合成 ATS-5,在 10 d 后底物转化率为 90.6%,ATS-5 精馏提纯收率为 98.2%,纯度达到 99.3%,光学纯度达到 99.1%. 固定化 HHDH 在 4 °C 下储存 80 d 后无明显酶活力损失.

收稿日期:2016-06-07

基金项目:江苏省产学研联合创新基金项目(BY2015028-04)

作者简介:梁国斌(1975—),男,陕西省安康市人,江苏理工学院副教授,主要研究方向为环境生物技术.

**Abstract:** The immobilization conditions of halohydrin dehalogenase (HHDH) by the sodium alginate were studied. The optimum conditions of immobilization process were as follows: sodium alginate concentration 3.5%, HHDH enzymatic amount  $2.4 \times 10^4$  U/mL, glutaraldehyde concentration 1.00%, calcium chloride solution concentration 1.5% and immobilization time 2 h. Under the optimum immobilization conditions, the encapsulation efficiency of HHDH was 52.1%, the activity recovery of HHDH was 75.2%. After five batches of intermittent catalytic synthesis of (R)-4-cyano-3-hydroxybutyric acid ethyl (ATS-5), the residual activity of immobilized HHDH was 51.2%. After the continuous catalytic synthesis of ATS-5 for 10 d, the substrate conversion efficiency was 90.6%, the distillation purification yield of ATS-5 was 98.2%, the purity and optical purity of ATS-5 were 99.3% and 99.1%, respectively. No obvious activity loss was obtained for immobilized HHDH after 80 d storage at 4 °C.

## 0 引言

阿伐他汀(Atorvastatin)是一种全新的他汀类降血脂药物<sup>[1-2]</sup>,其商品名为立普妥(Lipitor),是一种新型3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMGCoA)还原酶抑制剂。作为全合成的他汀类药物之一,阿伐他汀合成路线很多,其中较为经典的合成方法有Paal-Knorr法、不对称还原羰基法、消旋体苯乙胺拆分法、选择性醇醛缩合法等<sup>[3-5]</sup>。与其他方法相比,Paal-Knorr法工艺简单,反应条件温和,成本较低,品质可控,且产率较高,是目前阿伐他汀原料药合成的主要路线。在Paal-Knorr合成工艺路线中,(R)-4-氰基-3-羟基丁酸乙酯(ATS-5)是一种重要的中间体。因此,研究高收率、高光学纯度ATS-5的制备方法是该工艺路线的关键。

为了提高ATS-5的收率,特别是其光学纯度,酶法制备工艺得到了广泛的研究。常用的酶主要有卤醇脱卤酶、脂肪酶、腈水解酶和羰基还原酶<sup>[6-11]</sup>。其中,脂肪酶催化获得的ATS-5光学纯度较高,但是理论收率最高只有50%,限制了其工业应用<sup>[6]</sup>。腈水解酶可催化3-羟基-3-甲基戊二腈对称生成ATS-5,然而当底物浓度较高时,会对酶产生底物抑制作用,因而限制了其规模化生产<sup>[7]</sup>。羰基还原酶在辅酶NADH存在的情况下,可以催化2-甲基-4-氯-3-氧化

丁烷酸生成ATS-5,然而昂贵的辅酶NADH的添加提高了生产成本,导致其工业应用前景受到限制<sup>[8]</sup>。与这3种酶相比,卤醇脱卤酶(HHDH)具有一定优势<sup>[9-11]</sup>,在不需要任何辅酶的情况下,HHDH催化底物(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯(ATS-4)脱去卤元素,成了环氧化合物,环氧化合物受到氰基进攻,转化为ATS-5。其反应式如图1所示。该反应在水溶液中进行,由于反应后HHDH难以从反应体系中完全去除,造成后续提纯工艺困难,降低了ATS-5的收率和光学纯度。因此,为了简化分离纯化工艺,同时回收HHDH,需对HHDH进行固定化研究。

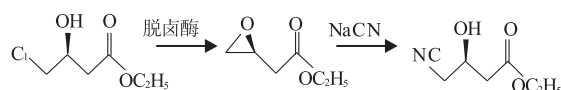


图1 脱卤酶催化合成ATS-5反应式

Fig. 1 Synthesis of ATS-5 catalyzed by dehalogenase

固定化酶具有容易分离、反应过程可以连续操作、重复利用等优点。常用的固定化方法有吸附法、包埋法、交联法和共价法<sup>[12]</sup>。其中,吸附法酶活力回收率高,但是酶容易从载体上脱落,重复利用性差。交联法和共价法利用化学方法对酶进行固定,酶活力损失大。包埋法是将酶包埋在高分子凝胶或包裹在半透性高分子膜中,操作简单,对酶活性影响较小,制作的固定

化酶球的强度较高。鉴于此,本文拟对包埋法固定 HHDH 进行研究,并对固定化 HHDH 催化合成 ATS-5 的稳定性进行评价,以期为高收率、高光学纯度 ATS-5 的工业化制备提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

主要试剂:海藻酸钠,无水氯化钙,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司产;NaCN,化学纯,河北诚信有限责任公司产;戊二醛水溶液(质量分数 25%),南京化学试剂股份有限公司产;(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯(Tris,纯度  $\geq 98.0\%$ ),江苏万年长药业有限公司产;HHDH ( $1.2 \times 10^6$  U/mL),安琪酵母股份有限公司产。

主要仪器:9790 气相色谱仪,P1030 型数显自动旋光仪,浙江温岭福立分析仪器有限公司产。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 HHDH 酶活力的测定** 30 °C 恒温条件下,在含有 5 mmol/L 底物(2-溴乙醇)的 50 mmol/L Tris/SO<sub>4</sub> 缓冲液(pH = 8.0)中,每 min 降解底物生成 1 μmol 溴离子的酶量定义为 1 个单位,即 1 U。

**1.2.2 蛋白含量的测定** 酶蛋白含量采用考马斯亮蓝染色法<sup>[13]</sup>测定。

**1.2.3 固定化 HHDH 的制备** 海藻酸钠溶液和 HHDH 酶液混合均匀,缓慢滴入戊二醛溶液,将混合液置于 30 °C 恒温水浴锅中交联,并不断搅拌;将海藻酸钠与酶的混合液逐滴注入氯化钙溶液中,立即形成凝珠小球,常温下固化后过滤得固定化 HHDH。

**1.2.4 固定化 HHDH 催化合成 ATS-5** 在 0.2 mol/L 氰化钠水溶液(pH = 8.0)中,加入一定量的底物 ATS-4,提升反应温度,加入固定化 HHDH(或者酶液),并用氰化钠水溶液控制反应体系,使其 pH 为 6.5 ~ 7.5。每隔一段时间

取样分析 ATS-4 和 ATS-5 的含量,至反应结束。

**1.2.5 ATS-5 纯度与光学纯度分析** 1) 利用气相色谱仪进行纯度分析,载气为氮气,检测器为氢火焰离子化检测器,色谱柱为毛细管色谱柱,柱温 240 °C。

2) 利用数显自动旋光仪进行光学纯度分析。

### 1.3 计算方法

#### 1.3.1 固定化 HHDH 包埋率的计算

包埋率 =

$$\frac{\text{固定化前酶液蛋白含量} - \text{固定化后氯化钙溶液蛋白含量}}{\text{固定化前酶液蛋白含量}} \times 100\%$$

#### 1.3.2 固定化 HHDH 活力回收率的计算

活力回收率 =

$$\frac{\text{固定化酶活力}}{\text{固定化前游离酶活力} - \text{固定化后溶液游离酶活力}} \times 100\%$$

#### 1.3.3 固定化 HHDH 相对活力的计算

相对活力 =

$$\frac{\text{不同批次固定化酶催化底物转化率为 90\% 所需时间}}{\text{批次反应中固定化酶第 1 次催化底物转化率为 90\% 所需时间}} \times 100\%$$

其中,底物转化率根据气相色谱底物 ATS-4 峰面积计算得到。

#### 1.3.4 ATS-5 光学纯度的计算

$$\text{光学纯度} = \frac{\text{产物比旋光率}}{\text{参考文献比旋光率}} \times 100\%$$

其中,参照文献[14],ATS-5 比旋光率为  $[a]_D^{25} = -31.3 (c = 1.0, \text{CHCl}_3)$ 。

## 2 固定化 HHDH 制备条件的确定

### 2.1 海藻酸钠浓度对固定化 HHDH 过程的影响

在 HHDH 酶液(给酶量为  $2.4 \times 10^4$  U/mL) 40 mL,戊二醛溶液(1.00%, w/v) 2 mL,氯化钙溶液(2%, w/v) 100 mL,固定化时间 1 h 条件下,分别加入 40 mL 不同浓度的海藻酸钠溶液

制成固定化HHDH,通过测定HHDH包埋率和活力回收率,考察海藻酸钠浓度对固定化HHDH过程的影响,结果如图2所示.由图2可知,HHDH包埋率随着海藻酸钠浓度的增加而增大,当海藻酸钠浓度为3.5%时,HHDH包埋率达到52.1%;但随着海藻酸钠浓度进一步提高,HHDH包埋率有所下降,当海藻酸钠浓度为4.5%时,HHDH包埋率仅有42.7%.其原因可能是过高的海藻酸钠浓度导致固定化酶结构紧密,酶蛋白被挤出小球,造成其包埋率下降.此外,从图2也可以看出,随着海藻酸钠浓度增加,固定化HHDH活力回收率下降,这也可能是较高浓度的海藻酸钠造成固定化酶结构比较紧密,内扩散阻力增加,造成酶活力回收率下降.

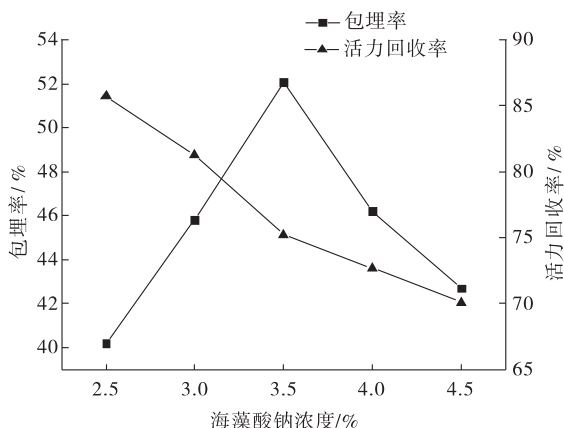


图2 海藻酸钠浓度对HHDH包埋率和固定化后HHDH活力回收率的影响

Fig. 2 Effect of sodium alginate concentration on HHDH encapsulation efficiency and activity recovery of immobilized HHDH

## 2.2 给酶量对固定化HHDH过程的影响

在海藻酸钠溶液(3.5%, w/v) 40 mL, 戊二醛溶液(1.0%, w/v) 2 mL, 分别与40 mL给酶量为 $8 \times 10^3$  U/mL,  $1.6 \times 10^4$  U/mL,  $2.4 \times 10^4$  U/mL,  $3.2 \times 10^4$  U/mL和 $4.0 \times 10^4$  U/mL的酶液混合,再将混合物滴加到氯化钙溶液(2%, w/v)中,固化时间1 h, HHDH包埋率和活力回收率如图3所示.由图3可知,HHDH包

埋率随着给酶量的增加而减少,而活力回收率则随着给酶量的增加而增大.在给酶量达到 $2.4 \times 10^4$  U/mL时,HHDH包埋率下降速度加快而活力回收率增速变缓.原因可能是:海藻酸钠的活性基团是一定的,在其结合位点未饱和之前,伴随着给酶量的增大,固定化HHDH活力也增大;当结合位点饱和后,给酶量继续增加也无法固定到载体上,活性基团会保持游离状态而被损失掉.因此,适宜的给酶量为 $2.4 \times 10^4$  U/mL,对应的活力回收率为75.2%.

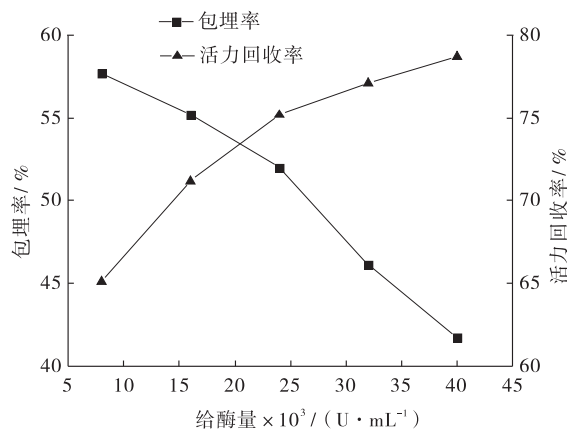


图3 给酶量对HHDH包埋率和固定化后HHDH活力回收率的影响

Fig. 3 Effect of enzyme amount on HHDH encapsulation efficiency and activity recovery of immobilized HHDH

## 2.3 戊二醛浓度对固定化HHDH过程的影响

在海藻酸钠溶液(3.5%, w/v) 40 mL, 给酶量( $2.4 \times 10^4$  U/mL) 40 mL, 氯化钙溶液(2%, w/v) 100 mL, 固定化时间1 h条件下,在海藻酸钠与酶液的混合液中加入2 mL浓度分别为0.50%, 0.75%, 1.00%, 1.25%和1.50%的戊二醛溶液,进行交联制备固定化酶,结果如图4所示.由图4可知,用较低浓度戊二醛溶液交联时,其HHDH活力回收率较高.当戊二醛浓度超过1.00%时,HHDH活力回收率明显下降.戊二醛是双向交联剂,一方面使海藻酸钠分子交联,另一方面使HHDH交联在载体

上,同时戊二醛又会导致酶蛋白变性. 当戊二醛浓度过低时,海藻酸钠与酶交联度过小,导致 HHDH 活力回收率、强度和稳定性偏低. 当戊二醛浓度过高时,海藻酸钠载体交联程度过大,以致形成过于紧密的网络结构,不仅限制了底物的扩散,也影响了反应产物的扩散,酶活性随之下降;同时,酶蛋白遇到高浓度的戊二醛会发生过度交联,使酶活性中心改变,最终导致酶失活.

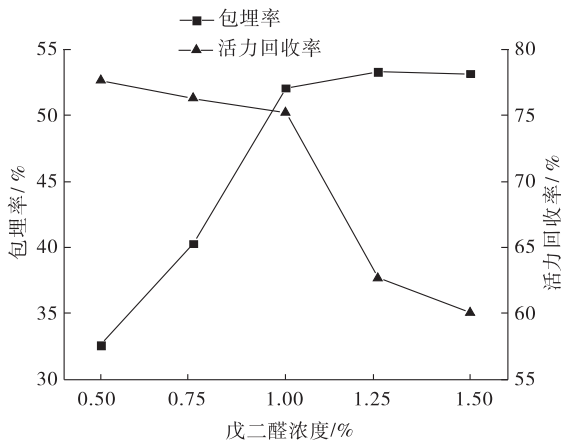


图4 戊二醛浓度对 HHDH 包埋率和固定化后 HHDH 活力回收率的影响

Fig. 4 Effect of glutaraldehyde concentration on HHDH encapsulation efficiency and activity recovery of immobilized HHDH

### 2.4 氯化钙浓度对固定化 HHDH 过程的影响

在海藻酸钠溶液(3.5%, w/v) 40 mL, 给酶量  $2.4 \times 10^4$  U/mL 的酶液 40 mL, 戊二醛溶液(1.00%, w/v) 2 mL, 固定化时间 1 h 条件下, 用 100 mL 浓度分别为 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0% 和 4.0% 的氯化钙对海藻酸钠与酶的混合液进行包埋制备凝胶小球, 结果如图 5 所示. 由图 5 可知, 当氯化钙浓度增加到 1.5% 时, HHDH 包埋率达到最大值 52.1%; 而当氯化钙浓度进一步增加到 2.0% 时, HHDH 包埋率降低到 40.1%. 原因可能是氯化钙浓度对凝胶形成的机械强度有重要影响: 当氯化钙浓度过低时, 氯

化钙与海藻酸钠反应形成的海藻酸钙凝胶网状孔径较大, 截留住酶较少; 当氯化钙浓度过高时, 凝胶网状孔径过小, 高分子联结紧密, 会影响反应时底物的扩散.

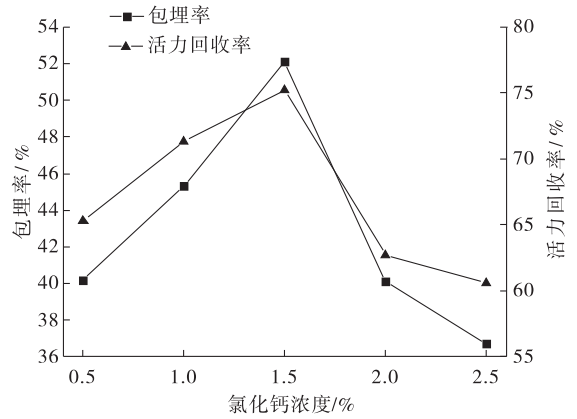


图5 氯化钙浓度对 HHDH 包埋率和固定化后 HHDH 活力回收率的影响

Fig. 5 Effect of CaCl<sub>2</sub> concentration on HHDH encapsulation efficiency and activity recovery of immobilized HHDH

### 2.5 固定化时间对固定化 HHDH 过程的影响

在以上优化条件下, 分别固定化 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h 和 4 h, 测定 HHDH 包埋率和活力回收率, 结果如图 6 所示. 由图 6 可知, 当固定化时间为 2 h 时, HHDH 包埋率最高; 随着时间的延长, HHDH 包埋率不断降低. 海藻酸钠与氯化钙形成凝胶的过程是钙离子通过海藻酸钠胶囊由外向内置换钠离子而形成海藻酸钙, 这一过程需要一定的时间: 若固定化时间过短, 包埋程度不够, 会影响固定效果; 但固定化时间过长, 也会导致凝胶结构过于紧密, 影响酶促反应时的反应速率, 固定化 HHDH 活力下降.

综上所述, 在海藻酸钠浓度 3.5%, 给酶量  $2.4 \times 10^4$  U/mL, 戊二醛浓度 1.00%, 氯化钙浓度 1.5%, 固定化时间 2 h 条件下, 固定化 HHDH 包埋率达到最大值 52.1%, 活力回收率

为 75.2%.

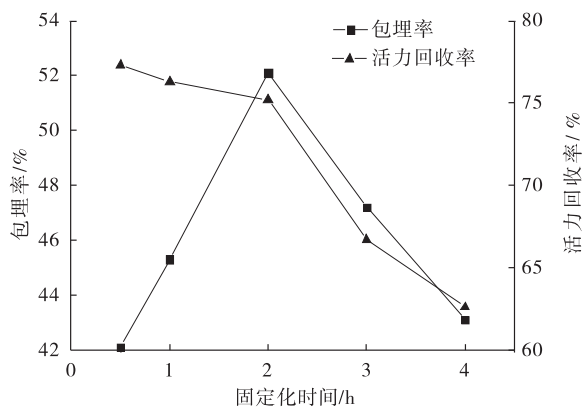


图 6 固定化时间对 HHDH 包埋率和固定化后 HHDH 活力回收率的影响

Fig. 6 Effect of immobilization time on HHDH encapsulation efficiency and activity recovery of immobilized HHDH

### 3 固定化 HHDH 催化合成 ATS-5 的稳定性与贮存稳定性

#### 3.1 间歇催化反应的稳定性

在 500 mL 0.2 mol/L 氰化钠水溶液 (pH = 8.0) 中,加入 0.2 mol 底物 ATS-4,提升反应温度至 50 °C,加入固定化 HHDH  $5 \times 10^4$  U/mL,在反应过程用氰化钠水溶液控制反应体系,使 pH = 6.8,当转化率达到 90% 后,弃去转化液,滤干固定化 HHDH,第一批次反应结束.将回收的固定化 HHDH 进行第二批次实验,当反应转化率达到 90% 时结束反应,以此类推,考察固定化 HHDH 的操作稳定性,结果见图 7.由图 7 可知,固定化 HHDH 有较好的操作稳定性.在整个反应过程中,相对酶活呈现下降趋势,但整体上相对酶活较高,5 批次反应后,固定化 HHDH 仍保留 51.2% 的相对活力,并且结构完整,未见有破碎和膨胀.

#### 3.2 连续催化反应的稳定性

将固定化 HHDH 置于填充柱内,通过蠕动泵连续添加 ATS-4 和 0.1 mol/L 的氰化钠水

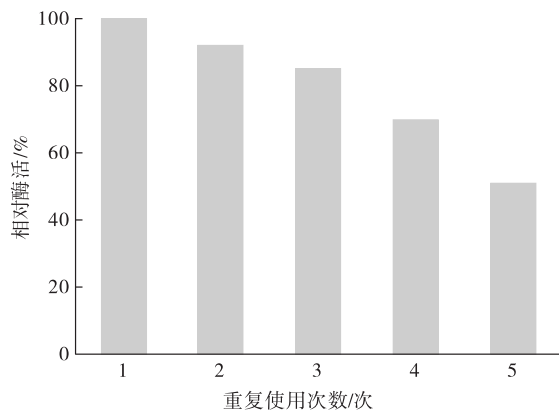


图 7 固定化 HHDH 操作稳定性

Fig. 7 Operational stability of immobilized HHDH

溶液,控制 ATS-4 流速使转化率在 90% 以上,控制氰化钠水溶液流速使填充柱内 pH 为 6.5~7.5,ATS-4 经柱内固定化 HHDH 转化成 ATS-5.填充柱内的固定化 HHDH 连续使用 10 d 后,底物 ATS-4 转化率仍高达 90.6%,产品 ATS-5 精馏提纯收率为 98.2%,纯度为 99.3%,光学纯度达到 99.1%.因此,固定化 HHDH 具有较好的连续反应的稳定性.

#### 3.3 贮存稳定性

将固定化 HHDH 置于 4 °C 冰箱保存 80 d 后取出,其外形完整,弹性良好.取出 2 g 贮存后的固定化 HHDH 加入 50 mL 蔗糖溶液中,置三角瓶中于振荡器上进行转化反应,测定结果见表 1.由表 1 可知,相对活力和机械强度经 80 d 贮存后,均基本保持不变.

表 1 固定化 HHDH 的贮存稳定性

Table 1 Storage stability of immobilized HHDH

批次	外观	相对活力/%	
		储存前	储存后
1	外观完整,无破碎	100	100
2	外观完整,无破碎	100	98
3	外观完整,无破碎	100	97

## 4 结论

本文对包埋法固定 HHDH 进行了研究,并

对固定化 HHDH 制备 ATS-5 稳定性进行了评价,得到固定化过程的最佳工艺条件:海藻酸钠浓度 3.5%,HHDH 给酶量  $2.4 \times 10^4$  U/mL,戊二醛浓度 1.00%,氯化钙浓度 1.5% 和固定化时间 2 h. 在此条件下,HHDH 包埋率为 52.1%,活力回收率为 75.2%. 将固定化 HHDH 应用于 ATS-5 催化合成,5 批次后相对活力为 51.2%;应用于连续催化合成 ATS-5,10 d 后底物转化率为 90.6%,ATS-5 精馏提纯收率为 98.2%,纯度达到 99.3%,光学纯度达到 99.1%. 固定化 HHDH 在 4 °C 下储存 80 d 后无明显酶活力损失. 这表明,工业生产中可利用固定化 HHDH 高效生产 ATS-5.

#### 参考文献:

- [1] 江红,吴永健. 阿托伐他汀治疗新进展[J]. 心血管病学进展,2004(5):335.
- [2] 丁洪,吴林森,陈永乐. 四种半合成及全合成他汀类药物的研究与开发[J]. 药学进展,1999(2):65.
- [3] KUMAR Y, KUMAR SMD, SATHYANARAYANA S. Process for the production of atorvastatin calcium in amorphous form;20090216029[P]. 2009-08-27.
- [4] 杨宽,余丽丽,姚琳,等. 调血脂药物阿伐他汀的合成路线[J]. 化工科技,2013(4):71.
- [5] MOTHANA B, BOYD R J. A density functional theory study of the mechanism of the Paal-Knorr pyrrole synthesis [J]. Journal of Molecular Structure Theo Chem,2007,811(1-3):97.
- [6] 金勇,吴坚平,徐刚,等. 有机相酶催化氨解反应拆分制备(R)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯[J]. 有机化学,2006(10):1384.
- [7] 钟萍,孙志浩. 生物催化不对称还原方法生产(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯[J]. 过程工程学报,2005(6):665.
- [8] LEE H W, KIM Y M, YOO C L, et al. An efficient method for the large-scale synthesis of atorvastatin calcium[J]. Biomolecules & Therapeutics,2008,16(1):28.
- [9] DESANTIS G, WONG K, FARWELL B, et al. Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene site saturation mutagenesis (GSSM) [J]. Journal of the American Chemical Society,2003,125(38):11476.
- [10] WANG L J, LI C X, NI Y, et al. Highly efficient synthesis of chiral alcohols with a novel NADH-dependent reductase from Streptomyces coelicolor [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(14):7023.
- [11] 何玉财,陶志成,张丹平,等. (R)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯及其衍生物的生物合成方法:104988085[P]. 2015-10-21.
- [12] 曹林秋. 载体固定化酶:原理、应用和设计[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [13] OGINO C, NEGI Y, MATSUMIYA T, et al. Purification, characterization and sequence determination of phospholipase D secreted by streptococcus cinnamomeum [J]. Journal of Biochemistry,1999,125(2):263.
- [14] WANG G J, HOLLINGSWORTH R I. Synthetic routes to l-carnitine and l-gamma-amino-beta-hydroxybutyric acid from (S)-3-hydroxybutyrolactone by functional group priority switching [J]. Tetrahedron Asymmetr, 1999, 10(10):1895.