水解酶的非专一性催化在有机合成中的应用

葛 新^a 赖依峰^{a,b} 陈新志^{*,a}^(a) 浙江大学生物质化工教育部重点实验室 杭州 310027)^(b) 浙江科技学院生物与化学工程学院 杭州 310012)

摘要 介绍了水解酶非专一性催化的机理, 对水解酶的非专一性催化在单元、两步和一锅三组分的有机反应中, 特别是加成反应、Aldol 反应和 Knoevenagel 反应中的研究与应用进行了总结和概述。

关键词 水解酶; 非专一性; Michael 加成; Aldol 反应; 一锅三组分

Application of Hydrolase Catalytic Promiscuity in Organic Synthesis

Ge, Xin^a Lai, Yifeng^{a,b} Chen, Xinzhi^{*,a}^(a) Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310027)^(b) Zhejiang University of Science and Technology, School of Biological and Chemical Engineering, Hangzhou 310012)

Abstract This review introduces the mechanism of hydrolase promiscuity. Several applications of hydrolase catalytic promiscuity in unit reaction, two-step reaction and three-component reaction are summarized, especially for addition, aldol reaction, and Knoevenagel reaction.

Keywords hydrolase; promiscuity; Michael addition; aldol reaction; three-component reaction

酶一直被认为是一种高效、专一、具有很强的立体选择性的生物催化剂, 但是近年来研究发现许多酶除了具有天然催化功能外, 还能够催化其他反应, 即酶的催化多功能性, 也称为酶的催化非专一性^[1]。在生命起源时, 酶的非专一性催化使酶扮演着“多面手”的角色, 催化得到多种化合物, 使得自然界物质日益丰富^[2]。通过不断进化, 酶表现出很强的专一性, 但是由于酶的复杂结构和进化过程中的不完美控制, 很多酶仍旧残留着非专一性催化的功能, 只是催化效率较低。将酶的非专一性催化和有机合成相结合, 可以拓展有机合成的方法学和酶化学的新领域, 在近年来受到研究者的普遍关注。水解酶, 作为自然界中应用最广泛的一大类酶, 目前其非专一性催化已被应用于多种有机反应中。

水解酶的非专一性催化在有机合成中的研究主要集中于 C—C 键的反应, 如加成反应、Aldol 反应等。目前对于水解酶的非专一性催化单元反应的基础研究主要集中于不同酶和反应的大量筛选。考虑其经济价值,

有很多研究者将目光转向单酶或多酶催化的多步一锅合成, 其可以缩减多步反应中的分离纯化步骤。通常, 在多酶催化体系中, 由于不同酶的催化活性都需要特定的 pH 值和温度等影响条件, 因此每步反应都需要进行严格控制, 操作过程相对繁琐, 而且一些酶会因为缺乏特定的反应条件而失活。单酶催化一锅法则能克服多酶催化体系的这些缺点, 利用单酶具有的催化多种反应的能力, 集成多步催化反应在一个体系中完成。其过程中无需分离和提纯, 大大简化了反应步骤与操作。

本文将基于水解酶非专一性催化在有机合成中的潜在价值和优势, 主要对水解酶的非专一性催化机理和其在单元反应、两步和一锅三组分有机反应中的研究与应用进展进行总结和概述。

1 水解酶的非专一性催化机理

水解酶是催化水解反应的一类酶的总称, 用水作为被转移基团的受体, 应用非常广泛。水解酶中常见的有

* E-mail: xzchen@zju.edu.cn

Received January 4, 2013; revised February 4, 2013; published online February 18, 2013.

Project supported by the Key Innovation Group of Zhejiang Province (No. 2009R50002).

浙江省重点科技创新团队(No. 2009R50002)资助项目。

蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等, 其中对脂肪酶和蛋白酶的催化非专一性研究较多. 水解酶通常是催化酯键的形成或断裂, 但近来研究发现水解酶还具有催化 Aldol 反应、Michael 加成、Knovenegal 等反应的活性.

水解酶的非专一性催化理论研究主要集中在 α/β 水解酶超家族酶类, 这类酶含有一个“亲核类氨基酸-His-酸类氨基酸”催化三联体, 这类催化三联体可以形成高效的针对不同化合物或具有不同物理化学性质的底物的运转机制, 以适应不同的生理环境. 在水解酶反应机制中, 氧离子穴是一个非常重要的特征. 在以酯为底物时, 氧离子穴可以使羰基双键极化, 极化的羰基碳易受丝氨酸活性位点的亲核攻击使得酯键水解. 目前研究认为, 水解酶的催化非专一性的活性位点还是位于酶的原始活性位点上, 主要差异是底物的定位不同. 而氧离子洞在酶的非专一性催化中仍然发挥着激活羰基基团的作用, 是水解酶催化非水解反应的基础.

南极假丝酵母脂肪酶(CALB)是应用于研究酶的非专一性催化较多的一种酶, 它的非专一性催化活性由 Ser-His-Asp 催化三联体介导, 运用其氧离子穴, CALB 同样能够催化许多不同的 C—C 键形成反应^[3]. 其催化 Michael 加成(1)和 aldol 反应(2)的机理类似: 通过形成烯醇式中间体, 与酶上活性位点的氧负离子空洞和催化三联体作用进行反应, 活性位点组氨酸作为碱基吸引一个质子, 最后和第二底物形成 C—C 键. Berglund 等^[4]首先将天然酶用甲基-对硝基苯-正己基磷酸酯共价抑制而完全失去活性, 这证明活性中心对于催化这个反应而言是必须的; 然后比较 CALB Ser105Ala 和 CALB 的催化 Michael 加成和 aldol 反应的酶活, 发现突变后的酶活与野生酶的相比提高了很多. 后来也比较了 CALB 突变前后, 在水介质中催化 Michael 加成和水解的酶活, 发现

突变后水解能力降低了 1000 倍, 但是 Michael 加成的酶活增加了 100 倍^[5]. 由这些推测可能因为丝氨酸通过与 His-Asp 形成氢键, 从而降低了 His-Asp 夺质子的能力, 结合于量子化学模拟, 确认反应是发生在酶的活性中心, 但是这个结论仍需要更多的实验证明. 目前大部分水解酶的非专一性催化有机合成的反应机理都是依此推测的.

2 水解酶非专一性催化在有机合成中的应用

2.1 单元反应

水解酶的非专一性催化在有机合成中的研究主要集中于 C—C 键的反应, 包括加成反应(主要是 Michael 加成)、Aldol 反应和 Knovenegal 反应等(表 1)^[6~19]. 脂肪酶和蛋白酶在水解酶的非专一性催化中研究的较多.

2.1.1 加成反应

加成反应是有机合成反应中较为重要的反应, 研究发现一些水解酶在一定的条件下具有催化加成反应的活性, 其中 Michael 加成是最早同时也是最多的用于研究水解酶非专一性催化的反应.

最早 1986 年 Kitazume 等^[6]研究氟化物 4 的不对称 Michael 加成反应(Eq. 1)时发现, 在 pH=8.0 的缓冲溶液中, 以 2-三氟甲基丙烯酸(3)为原料, 猪肝酯酶(Pig liver esterase), α -胰凝乳蛋白酶(α -Chymotrypsin)和柱状假丝酵母脂肪酶(*Candida cylindracea* Lipase)可以成功催化该反应(表 2).

1984 年 Klivanov 等^[20]在有机介质中成功实现酶催化有机合成, 这彻底改变了酶促合成只在水溶液中进行传统性认识, 拓宽了酶对底物的催化应用范围, 使许多不能在水溶液中进行的酶催化反应能够在有机溶剂中进行^[21]. 有机溶剂因为种类多、理化性质选择的余地比较大和容易操作等优点而受到了广泛的重视. 2004 年林贤福课题组^[7]首先在有机介质 DMSO 和吡啶中使用枯草杆菌碱性蛋白酶(Alkaline Protease from *Bacillus subtilis*)分别催化咪唑及其衍生物 5、嘧啶及其衍生物和丙烯酸酯 6 发生 Michael 加成(Eq. 2), 取得了很好的效果. 之后 2006 年该课题^[22]系统研究了在有机介质中用不同的水解酶催化咪唑及其衍生物与丙烯酸酯的 C—N 键 Michael 加成反应. 发现有 9 种水解酶可以催化 Michael 加成, 由于这些水解酶都属于丝氨酸水解酶家族, 推测水解酶催化 Michael 加成可能发生在水解酶的催化活性中心. 该课题组^[23]继续研究发现, 具有锌活性位点的酰

表 1 水解酶的非专一性催化单元反应
Table 1 The hydrolase-promiscuous catalytic unit reaction

Reaction	Substrate 1	Substrate 2	Hydrolase	Yield	References
Michael addition		H ₂ O	<i>Candida cylindracea</i> lipase	48% (34 h), <i>ee</i> 70%	[6]
		Et ₂ NH	<i>Candida cylindracea</i> lipase	47% (92 h), <i>ee</i> 71%	
		PhNH ₂	<i>Candida cylindracea</i> lipase	76% (40 h), <i>ee</i> 39%
	Alkaline protease from <i>Bacillus subtilis</i>	76% (96 h)	[7]
		Lipozyme RM IM	92% (1 h)
		Lipozyme TL IM	85% (1.2 h)
	Novozyme 435	70% (1.2 h)	[8]
		<i>D</i> -Aminoacylase	94% (16 h)
		CALB	99% (20 h)	
Aldol reaction			PPL	96.4% (144 h), <i>ee</i> 14.7%	[11]
		Pepsin	22% (24 h), <i>ee</i> 43%	[12]
	Alkaline protease from <i>Bacillus licheniformis</i>	57% (47 h), <i>ee</i> 49%	[13]
		Acidic protease from <i>Aspergillus ussuriensis</i>	63% (144 h), <i>ee</i> 82%	[14]
			Chymopapain	69% (131 h), <i>ee</i> 78%	[15]
Knoevenagel reaction			PPL	85% (12 h)	[16]
		Papain	59% (120 h)	[17]
Henry reaction		H ₃ C-NO ₂	Immobilized lipase from <i>Thermomyces lanuginosus</i>	64% (48 h)	[18]
			<i>D</i> -aminoacylase	83% (2 h)
		Amano lipase M from <i>M. javanicus</i>	75% (2 h)	

基转移酶在 DMSO 中也可以催化含氮的芳香杂环与 α,β -不饱和羰基化合物的 Michal 加成反应, 与具有丝氨酸活性位点的水解酶相比具有更好的催化效果。之后他们又陆续报道了 *D*-氨基酰化氨基酸水解酶不仅催化嘌呤衍生物和 α,β -不饱和羰基化合物发生 Michael 反应,

产物的收率在 80% 以上^[24], 还可以在有机溶剂中催化吡咯衍生物和乙烯酯类发生 Markovnikov 加成, 收率最高至 91%^[25]。

2005 年 Gotor 等^[26]用脂肪酶 Chirazyme L-2、冻干的 CALB 和 Novozyme 435 催化了肿胺 **8** 与丙烯腈 **9** 的

表 2 水解酶催化的 Michael 加成反应
Table 2 Michael addition catalyzed by hydrolase

Enzyme	NuH	Time/h	Yield/%	ee/%
<i>Candida cylindracea</i>	H ₂ O	34	48	70
Pig liver esterase	H ₂ O	52	54	60
α -Chymotrypsin	H ₂ O	169	77	49
<i>Candida cylindracea</i>	EtOH	48	—	—
Pig liver esterase	PhOH	48	—	—
<i>Candida cylindracea</i>	Et ₃ NH	92	47	71
Pig liver esterase	Et ₃ NH	92	39	69
<i>Candida cylindracea</i>	PhNH ₂	40	76	39
Pig liver esterase	PhSH	24	64	50

Michael 加成(Eq. 3), 并且提出了催化机理: 脂肪酶活性位点的氧负离子穴极化了腈基, 从而活化丙烯腈, 催化三联体中的 His-Asp 对转移了仲胺的质子, 最终质子转移到 α -碳上得到目标化合物(Scheme 1). Souza 等^[8]通过使用不同的水解脂肪酶催化伯胺或者仲胺与丙烯腈的 Michael 加成反应, 发现所有的产物收率都可以达到 60% 以上, 催化效率也很高, 并且推测脂肪酶催化伯胺或者仲胺与丙烯腈的 Michael 加成反应的机理: 底物的活化主要是通过羧基的极化来完成的。

2005 年 Berglund 等^[3]通过量子化学模拟验证了这个机理, 他们^[4b]还报道了用 CALB Ser105Ala 在环己烷中催化 1,3-羰基化合物 11 与 α,β -不饱和羰基化合物 12 的 Michael 加成(Eq. 4). 林贤福等^[9]发现 11 种水解酶(枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶、米曲蛋白酶、猪胰脂肪酶和 D-氨基酸酰化氨基酸水解酶等)在 2-甲基-2-丁醇中也可以催化该反应, 收率最高达到 94%。

2012 年 Madalinska 等^[27]报道了水解酶催化 α,β -不饱和亚硫酰基的 Michael 加成, 以苯硫酚和乙烯基亚硫酰基苯为底物时, 反应仅在水解酶存在和乙醇溶剂中发

Scheme 1

生, 反应产物是外消旋, 收率为 20%~35%。当使用更强的 Michael 加成供体时, 发现产物有立体选择性, 该研究证明该反应的机理不能用水解酶催化烯酮和丙烯腈的 Michael 加成反应机理来解释, 推测可能不是酶原有的活性催化该反应, 而是有了新的非专一性活性中心。

2.1.2 Aldol 反应

Aldol 反应是有机化学中形成 C—C 键的重要反应, 也是较早被应用于水解酶非专一性催化研究的反应。水解酶非专一性催化 Aldol 反应已经由较早的酶活很低、没有对映选择性发展到最近的不对称合成。

2003 年 Berglund 等^[4a]首次发现 CALB 具有催化 aldol 反应的活性, 然后用 CALB Ser105Ala 来催化羟醛缩合反应(Eq. 5)发现具有更高的催化活性。反应的机理是通过形成烯醇式中间体, 与酶上活性位点的氧负离子空洞和催化三联体作用进行反应。但是 CALB 催化 aldol 反应没有对映选择性, 反应时间过长, 因此应用价值不大^[28]。

2008 年余孝其等^[11]首先发现了一些天然水解酶(猪胰脂肪酶 PPL、爪哇毛霉菌脂肪酶 MJL、灭黑毛霉菌脂肪酶 MML, CALB)能够催化对硝基苯甲醛 **15** 与丙酮 **16** 的不对称 aldol 反应(Eq. 6), *ee* 值为 43.6%(表 3)。在该反应中水起到非常重要的作用, 当整个反应体系是无水的有机溶剂时, 酶几乎没有催化活性, 体系的含水量增加到 20%时, 酶的催化活性达到最高。在 2010 年该课题组^[12]发现蛋白酶也可以在水介质中催化芳香醛与丙酮的不对称 aldol 反应, 收率最高达到 69%, *ee* 值为 44%。

表 3 水解酶催化 aldol 反应

Table 3 Aldol reaction catalyzed by lipase

Entry	Catalyst	Reaction time/h	Yield/%	<i>ee</i> /%
1	PPL	144	96.4	14.7
2	PPL	72	11.7	43.6
3	MJL	24	14.5	12.9
4	CALB	24	2.3	9.4
5	MML	24	9.8	9.6

2011~2012 年, 何延红和官智课题组^[13~15]分别报道了使用地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶(BLAP)、宇佐美曲霉酸性蛋白酶和木瓜凝乳蛋白酶(Chymopapain)在有机溶剂和水的混合介质中可以催化芳香醛 **19** 和环酮 **18** 的不对称 aldol 反应(Eq. 7), 产物的收率在 28%~92%, *ee* 值达到 22%~99%。之后该课题组在研究杂环酮和芳香醛的不对称 aldol 反应时, 发现猪胰脂肪酶 II (PPL II), 小麦胚芽脂肪酶, 黑曲霉天野脂肪酶 A, 猪胰蛋白酶在水和乙腈的混合介质中 30 °C 下均能催化该反应^[29], 收率范围为 31%~59%, *ee* 值 45%~87%。

虽然酶非专一性催化 aldol 反应已有大量报道, 但是酶非专一性催化 aldol 缩合反应的报道却很少, 林贤福等^[30]以咪唑为助催化剂, 使用 *D*-酰化氨基酸水解酶在异辛烷或者辛烷为溶剂催化芳香醛 **19** 和丙酮 **16** 的羟醛缩合反应(Eq. 8), 产物以 *E* 构型为主, 反应的收率最高接近 100%。

R = *p*-NO₂, 67.8%, *E/Z* = 38/1; R = *m*-NO₂, 88.8%, *E/Z* = 224/1;
 R = *o*-NO₂, 44.4%, *E/Z* = 1/1; R = H, 74.3%, *E/Z* = 245/1;
 R = *p*-Cl, 90%, *E*; R = *m*-Cl, 99.6%, *E/Z* = 57/1;
 R = *o*-Cl, 39%, *E/Z* = 282/1; R = *p*-OH, 8.5%, *E/Z* = 90/1;
 R = *m*-OH, 0.6%, *E*; R = *o*-OH, 20.4%, *E*;
 R = *p*-OCH₃, 89.8%, *E/Z* = 19/1 R = *p*-CH₃, 87.1%, *E/Z* = 12/1

2.1.3 Knoevenagel 反应

Knoevenagel 反应是由碱催化的缩合反应, 反应机理非常类似 aldol 缩合反应。2010 年我们课题组^[16]在尝试使用水解酶催化芳香醛 **19** 与氰基乙酸甲酯 **23** 的 Knoevenagel 反应时, 发现在醇类溶剂中猪胰脂肪酶(PPL)不仅催化 Knoevenagel 反应, 还催化酯交换反应, 反应的收率接近 100% (Eq. 9)。通过对反应的动力学研究发现 Knoevenagel 缩合反应速率明显快于酯交换的反应速率, 因此可以证明: 在有机溶剂中, 脂肪酶非专一性催化 Knoevenagel 的能力要远强于其天然属性一催化酯化的能力。在 2011 年何延红和官智等^[31]将酶的非专一性催化 Knoevenagel 反应和酯交换的串联反应应用于 2*H*-1-苯并吡喃-2-酮类化合物制备。2*H*-1-苯并吡喃-2-酮类化合物具有良好生理活性和药理活性, 是杀鼠灵的重要中间体, 也具有抗癌等作用。他们使用地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶(BLAP)催化水杨醛 **25** 和乙酰乙酸乙酯 **26** 的 Knoevenagel 和分子内酯交换反应制备 2*H*-1-苯并吡喃-2-酮类衍生物 **28**(表 4)。在 DMSO 和水(*V*:*V*=9:1)的混合溶剂中, 水杨醛 **25** 和乙酰乙酸乙酯 **26** 的物质的量比为 1:3, 反应温度 55 °C, 主产物的收率在 10%~75%之间。

R = H, *p*-NO₂, *m*-NO₂, *o*-NO₂, *p*-OH, *m*-OH,
p-OCH₃, *o*-OCH₃, *p*-Cl, *o*-Cl, *o*-CF₃, *m*-CH₃

2012 年何延红等^[17]用木瓜蛋白酶在 DMSO 和水混合介质中催化芳香醛、 α,β -不饱和芳香醛与乙酰乙酸乙酯、乙酰丙酮的 Knoevenagel 反应, 产物的收率最高可达 87%, *Z/E* 选择性最高可达 100:0。该课题组^[32]还

表 4 BLAP 催化 Knoevenagel 和分子内酯交换串联反应
Table 4 BLAP-catalyzed domino Knoevenagel/intramolecular transesterification reaction

Entry	25	R ²	Yield/%
1		Ph	75
2		OEt	68
3		CH ₃	60
4		Ph	73
5		OEt	69
6		CH ₃	58
7		Ph	45
8		OEt	56
9		CH ₃	30
10		Ph	48
11		OEt	25
12		Ph	18
13		OEt	10
14		CH ₃	48

报道了地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶(BLAP)催化杂环芳香醛与乙酰乙酸乙酯、乙酰丙酮的 Knoevenagel 反应, 发现具有较好的底物适应性和较高的收率。

2.1.4 其他单元反应

在有机合成中, Henry 反应是一个非常有效地构造 C—C 键的反应。2010 年林贤福等^[19]发现 *D*-酰化氨基酸水解酶可以在 DMSO 溶剂中催化烷烃硝基 **29** 和芳香醛 **15** 的 Henry 反应(Eq. 10), 收率范围为 15%~99%, 但是

该反应没有对映选择性。何延红等^[18]也报道了水解酶可以催化 Henry 反应, 也收率达到 64%, 没有对映选择性。

Condition A: *D*-aminoacylase, DMSO, 50 °C, yield 99%

Condition B: Immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*
10% water and 90% cyclohexane, r.t., yield 64%

aza-Diels-Alder 反应是一个构建含氮六元环的重要反应, 含氮六元环在药物和天然产物中有着重要的应用, 该反应主要是经历 Mannich-Michael 反应历程。何延红和官智等^[33]用卵清溶菌酶(HEWL)在乙腈和水的混合介质中催化芳香醛 **19**、芳香胺 **31** 和环己-2-烯酮(**32**)三组分的 aza-Diels-Alder 反应(Eq. 11), 反应的收率可达 98%, *endo/exo* 选择性达到 90 : 10。

R¹ = 4-ClC₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 93%, **33:34** = 82:18;
R¹ = 3-ClC₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 96%, **33:34** = 56:44;
R¹ = 2-ClC₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 72%, **33:34** = 81:19;
R¹ = 4-FC₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 98%, **33:34** = 90:10;
R¹ = 3-FC₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 96%, **33:34** = 86:14;
R¹ = 4-BrC₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 80%, **33:34** = 83:17;
R¹ = 3-BrC₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 88%, **33:34** = 90:10;
R¹ = C₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 78%, **33:34** = 80:20;
R¹ = 4-MeC₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 73%, **33:34** = 81:19;
R¹ = 4-MeOC₆H₄, R² = 4-MeOC₆H₄, 69%, **33:34** = 76:24;
R¹ = 4-FC₆H₄, R² = C₆H₅, 97%, **33:34** = 80:20

2.2 两步反应

2.2.1 催化脱羧-aldol 反应/Knoevenagel 反应

余孝其等^[34]报道了用 CALB 催化芳香醛 **19** 与 1,3-二羰基化合物 **35** 脱羧的 aldol 反应和脱羧的 Knoevenagel 反应(表 5)。在该反应中加入了微量的 1,4,7,10-四氮杂环十二烷作为添加剂, 在乙腈溶液中 20 °C 反应 20 h 得到脱羧的 aldol 反应产物 **36**, 收率在 81%~96%; 当反应体系为微量的水和 0.5 equiv. 的苯胺时, 在乙腈溶液中 30 °C, 反应 24 h 能得到脱羧的 Knoevenagel 加成产物 **37**, 收率为 80%左右。从中可以看出脂肪酶在不同的反应条件下可以具有不同的催化

活性, 可以通过条件的改变来控制酶的催化活性.

表 5 脂肪酶在不同条件下催化的脱羧的 aldol 反应和脱羧的 Knoevenagel 反应

Table 5 Lipase-catalyzed decarboxylative aldol reaction and decarboxylative Knoevenagel reaction

Entry	R ¹	Substrate 35	Yield/%	
			36	37
1	<i>p</i> -NO ₂		96	90
2	<i>o</i> -NO ₂		81	85
3	<i>m</i> -NO ₂		87	88
4	<i>p</i> -NO ₂		97	91
5	<i>p</i> -NO ₂		95	88
6	<i>p</i> -NO ₂		94	86
7	<i>p</i> -NO ₂		91	82
8	<i>p</i> -NO ₂		—	—
9	<i>p</i> -NO ₂		95	85
10	<i>p</i> -NO ₂		87	84

2.2.2 催化缩合-加成反应

Berglund 等^[4b]最早发现 CALB-Ser105Ala 可以催化 aldol 反应, 反应的机理是: 形成烯醇式中间体, 与酶上活性位点的氧负离子空洞和催化三联体作用进行反应. 但是该反应没有对映选择性, 反应时间过长. 之后

Berglund 等^[4b]继续报道了用 CALB-Ser105Ala 催化 1,3-羰基化合物与 α,β -不饱和羰基化合物的 Michael 加成. 由于 CALB-Ser105Ala 催化 aldol 反应的活性很低, Berglund 等^[28]设计了一个串联反应改变 aldol 反应的平衡, 来观察 aldol 反应速率是否会提高. 丙醛 **38** 通过 CALB-Ser105Ala 催化发生 aldol 反应, 然后用分子筛脱水生成 α,β -不饱和羰基化合物 **40**, 继续和硫醇发生 Michael 加成, 结果发现不是平衡影响 aldol 反应速率 (Scheme 2).

Scheme 2

Gupta 等^[35]报道了 Novozym 435 在吡啶溶剂中催化乙酸乙烯酯(**42**)原位水解成乙醛 **43**, 继而与三环二酮 **44** 发生反应最终生成产物 **47**, 4 h 后反应的收率 97% (Scheme 3). 该反应的历程实际是经历了原位水解、非专一性催化缩合反应和加成两步串联反应.

Scheme 3

2.2.3 串联 Michael 加成-酰化反应

1986 年 Kitazume 等^[6]在 pH=8.0 的缓冲溶液中, 用猪肝酯酶和柱状假丝酵母脂肪酶成功催化合成具有手性 Michael 加成的产物的时候, 发现当以 2-三氟甲基丙烯酸(**3**)和含有胺基与亲核取代基团的芳香化合物 **48** 原料, 还催化合成具有手性中心杂环化合物 **49**, 该反应主要是通过手性的 Michael 加成和酰化反应完成(表 6).

林贤福等^[36]发现枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶在无水吡啶中 50 °C 下可以催化乙烯基-3-丙烯酸基丙酸酯(**50**), *D*-葡萄糖(**51**)和咪唑衍生物 **53** 反应生成一系列咪唑含糖衍生物 **25** (Scheme 4), 该反应先经历了酰化反应生成 6-*O*-(β -丙烯酸基-丙酰基)-*D*-葡萄糖(**52**), 然后再和咪唑衍生物发生 Michael 加成得到产物 **54**, 收率在 69%~80%.

2.2.4 串联 Michael 加成-环化反应

余孝其等^[37]发现了利用单一脂肪酶的非专一性催化一锅法可以合成二氢呋喃衍生物, 用猪胰脂肪酶(PPL)在 DMSO 和水(*V*:*V*=4:1)的混合溶剂中催化硝基苯乙烯 **55** 和乙酰丙酮 **56**, 发现除了发生 Michael 加成, 还发生环化反应得到二氢呋喃的衍生物 **57**, 反应的收率为 50%~85%, 产物以 *Z* 构型为主, *Z/E* 选择性最高大于 99:1(表 7).

2.3 一锅三组分反应

吡啶啉螺环化合物是由吡啶啉和哌啶组成的螺环化合物, 由于其具有非常重要的潜在生理活性和药理活性, 常用于农药和医药领域. 章鹏飞等^[38]研究了猪胰脂

Scheme 4

肪酶(PPL)在乙醇溶剂中催化吡啶酮 **58**、腈基化合物 **59** 和 1,3-二羰基化合物 **60** 一锅法合成吡啶啉螺环衍生物 **61**(表 8), 该反应先后经历了 Knoevenagel 反应、Michael 加成和环化反应, 在水含量 10%~20%时脂肪酶的催化活性最高, 反应的收率在 83%~95%.

基于相同的反应历程, 该课题组^[39]还报道了猪胰脂肪酶(PPL)在乙醇中催化芳醛 **19**、腈基化合物 **59** 及 1,3-二羰基化合物 **60** 为底物的一锅法合成四氢苯并吡喃衍生物 **62** 的研究(Eq. 12), 反应的收率最高达到 97%. 苯并吡喃类化合物具有良好生理活性和药理活性, 如解痉、利尿、抗凝血剂、抗癌等作用.

表 6 水解酶催化的 Michael 加成反应

Table 6 Michael addition catalyzed by hydrolase

Substrate	Enzyme	Time/h	Yield/%	ee/%
2-Aminophenol	<i>Candida cylindracea</i> Lipase	21	83	41
	Pig liver esterase	16	69	36
	<i>Trichoderma viride</i> Lipase	2.5	94	56
2-Aminothiophenol	<i>Candida cylindracea</i> Lipase	20	86	47 (<i>S</i>)
	<i>Trichoderma viride</i> Lipase	6	72	36 (<i>S</i>)
<i>o</i> -Phenylenediamine	<i>Candida cylindracea</i> Lipase	24	56	38
	<i>Trichoderma viride</i> Lipase	24	52	44
4-Methyl-2-aminophenol	<i>Candida cylindracea</i> Lipase	20	71	25
	<i>Trichoderma viride</i> Lipase	20	57	37

表 7 脂肪酶催化硝基苯乙烯和乙酰丙酮的反应

Table 7 Lipase-catalyzed reaction of nitrostyrene and acetylacetone

Entry	R ¹	n=0		n=1	
		Yield/%	Z/E	Yield/%	Z/E
1	C ₆ H ₅	61.7	>99 : 1	64.3	>99 : 1.0
2	4-CH ₃ C ₆ H ₄	51.4	>99 : 1	54.6	71 : 29
3	4-CH ₃ OC ₆ H ₄	63.6	>99 : 1	73.8	>99 : 1.0
4	4-FC ₆ H ₄	48.9	>99 : 1	63.5	91 : 9.0
5	4-ClC ₆ H ₄	50.6	>99 : 1	70.8	65 : 35
6	4-BrC ₆ H ₄	50.7	>99 : 1	61.2	64 : 36
7	4-CF ₃ C ₆ H ₄	52.3	96 : 4	65.4	46 : 54
8	2-ClC ₆ H ₄	80.6	>99 : 1	85.7	28 : 72
9	3-ClC ₆ H ₄	54.5	97 : 3	65.6	>99 : 1.0

Mannich 反应是形成 C—C 键和 C—N 键的重要反应, 通过该反应合成一系列氨基酸、氨基醇及其衍生物被广泛应用于许多复杂的天然或者药物中间体的合成中。2009 年余孝其等^[40]发现一些脂肪酶可以催化芳香醛 **19**、芳香胺 **31**、丙酮 **14** 的三组分 Mannich 反应, 其中催化活性最好的为米赫毛霉脂肪酶(MML), 反应的收率最高达到 89.1%。该反应在有水的环境中能够增加酶的催化多功能活性, 在无水的条件下酶几乎不显示出 Mannich 反应催化活性。2010 年何延红和官智等^[41]也发现脂肪酶可以催化芳香醛、芳香胺、环己酮的 Mannich 反应, 发现在 30 °C 下, 在乙醇和水的混合介质中, 假丝酵母脂肪酶(CRL)的催化活性最高, 收率最高可以达到 94%。章鹏飞等^[42]尝试用胰蛋白酶(Trypsin)在丙酮溶剂中催化 Mannich 反应, 该反应具有很好的收率和底物适应性, 同时发现在无水条件下胰蛋白酶催化 Mannich 反应活性最高, 说明水不是该反应所必须的(表 9)。

不对称 Mannich 反应主要用于制备手性 β -氨基酮类和醛类。2012 年何延红和官智等^[43]首先发现了灰色链霉菌蛋白酶 XIV (SGP) 在乙腈和水的混合介质中 30 °C 下

表 8 脂肪酶催化一锅法合成四氢苯并吡喃衍生物

Table 8 One-pot synthesis of tetrahydrochromene derivatives catalyzed by lipase

Entry	R ¹	R ²	Compd. 60	Yield/%
1	H	CN	60a	92
2	H	CN	60b	93
3	H	CN	60c	94
4	H	COOEt	60a	87
5	H	COOEt	60b	85
6	H	COOEt	60c	88
7	Cl	CN	60a	93
8	Cl	CN	60b	95
9	Cl	CN	60c	95
10	Cl	COOEt	60a	85
11	Cl	COOEt	60b	83
12	Cl	COOEt	60c	86
13	OMe	CN	60a	93
14	OMe	CN	60b	95
15	OMe	CN	60c	93
16	OMe	COOEt	60b	88
17	OMe	COOEt	60c	82
18	NO ₂	CN	60a	91
19	NO ₂	CN	60b	94
20	NO ₂	COOEt	60a	95

可以催化芳香醛 **19**、芳香胺 **31** 和环酮 **64** 的不对称 Mannich 反应(Eq. 13)。收率最高可以达到 92%, ee 达到 88%。反应中用尿素、Cu²⁺和 Ag²⁺让 SGP 失活, 发现不影响反应的收率, 但是几乎没有立体选择性, 这暗示影响 Mannich 反应的立体选择性主要是 SGP 的天然的空间折叠结构。

1,4-二氢吡啶一般都是用醋酸铵或者液氨通过 Hantzsch 反应获得, 2012 年林贤福等^[44]用 CALB 催化乙酰胺 **67**、醛类 **4** 和 1,3-二羰基化合物 **66** 三组分化合物, 在 50 °C 下以甲基叔丁基醚为溶剂, 生成 1,4-二氢吡啶衍生物 **68**, 收率范围为 17%~93% (Eq. 13)。1,4-二氢吡啶衍生物是吡啶类药物的重要中间体, 如硝苯地平, 在该反应中乙酰胺首次被当做胺源制备 1,4-二氢吡啶衍生物。

表9 酶催化的 Mannich 反应
Table 9 Enzyme-catalyzed Mannich reaction

Entry	R ¹	R ²	Yield/%	
			A ^[40]	B ^[42]
1	H	H	87.3	—
2	<i>m</i> -NO ₂	H	82.4	—
3	<i>p</i> -NO ₂	H	83.5	—
4	<i>p</i> -OCH ₃	H	89.1	—
5	<i>p</i> -OH	H	43.6	—
6	<i>p</i> -CN	H	65.3	—
7	<i>p</i> -Cl	H	83.1	—
8	H	<i>o</i> -OCH ₃	—	68
9	H	<i>p</i> -Cl	—	74
10	H	<i>m</i> -Cl	—	65
11	H	<i>m</i> -NO ₂	—	47
12	<i>p</i> -NO ₂	<i>p</i> -OCH ₃	—	93
13	<i>p</i> -CH ₃	<i>p</i> -OCH ₃	—	45
14	<i>p</i> -Cl	<i>p</i> -OCH ₃	—	83

物。

3 结语

近十年, 酶非专一性催化研究的兴起, 拓展了生物催化剂在有机合成中的应用, 为进一步研究酶的结构与功能的关系提供了新的思路, 同时深入探讨了酶催化非专一性的机理, 便于开发酶的新功能。随着研究的深入, 水解酶的非专一性催化在不对称合成和串联反应中不断取得突破。利用其非专一性催化功能, 可以串联两步甚至多步反应, 得到相对复杂的化合物结构, 这一点, 是普通催化剂所难以比拟的。然而, 酶的非专一性催化离产业化还有一定距离, 主要问题是, 缺乏系统的理论指导, 并且水解酶催化可变条件太多, 催化效果不稳定。因此需要长期系统的研究, 把酶的非专一性催化模式固定化, 调控好溶剂、时间、含水量等各种因素另外, 酶的来源及制备成本对酶非专一性催化产业化也是至关重要的考虑因素。目前, 对酶的非专一性催化研究主要集中在水解酶中的脂肪酶和蛋白酶, 如 PPL, CALB 和枯草杆菌碱性蛋白酶等, 这些酶相对便宜易得, 研究它们的非专一性催化对于产业化更有应用价值。

R¹ = 4-NO₂, R² = H, 96 h, 64%, *dr*(*syn:anti*) = 88:12, *ee*(*syn*) 83%;
 R¹ = 4-CF₃, R² = H, 94 h, 73%, *dr*(*syn:anti*) = 81:19, *ee*(*syn*) 78%;
 R¹ = 4-Br, R² = H, 94 h, 65%, *dr*(*syn:anti*) = 74:26, *ee*(*syn*) 76%;
 R¹ = 4-Cl, R² = H, 120 h, 92%, *dr*(*syn:anti*) = 78:22, *ee*(*syn*) 75%;
 R¹ = 3-F, R² = H, 94 h, 72%, *dr*(*syn:anti*) = 70:30, *ee*(*syn*) 74%;
 R¹ = 4-F, R² = H, 94 h, 66%, *dr*(*syn:anti*) = 66:34, *ee*(*syn*) 64%;
 R¹ = 4-CN, R² = H, 120 h, 61%, *dr*(*syn:anti*) = 58:42, *ee*(*syn*) 68%;
 R¹ = H, R² = H, 100 h, 62%, *dr*(*syn:anti*) = 60:40, *ee*(*syn*) 61%;
 R¹ = 4-CH₃, R² = H, 120 h, 68%, *dr*(*syn:anti*) = 40:60, *ee*(*syn*) 33%;
 R¹ = 4-NO₂, R² = 3-Br, 144 h, 24%, *dr*(*syn:anti*) = 92:8, *ee*(*syn*) 88%;
 R¹ = 4-NO₂, R² = 3-CH₃, 123 h, 54%, *dr*(*syn:anti*) = 91:9, *ee*(*syn*) 83%;
 R¹ = 4-NO₂, R² = 4-Cl, 144 h, 47%, *dr*(*syn:anti*) = 89:11, *ee*(*syn*) 83%;
 R¹ = 4-NO₂, R² = 4-CH₃, 120 h, 81%, *dr*(*syn:anti*) = 90:10, *ee*(*syn*) 82%;
 R¹ = 4-NO₂, R² = 4-OCH₃, 117 h, 71%, *dr*(*syn:anti*) = 72:28, *ee*(*syn*) 72%;
 R¹ = 4-Br, R² = 4-OCH₃, 165 h, 66%, *dr*(*syn:anti*) = 52:48, *ee*(*syn*) 40%

References

- [1] (a) Copley, S. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7(2), 265.
 (b) Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9(2), 195.
 (c) Khersonsky, O.; Roodveldt, C.; Tawfik, D. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10(5), 498.
 (d) Hult, K.; Berglund, P. *Trends Biotechnol.* **2007**, 25(5), 231.
 (e) Xu, J. M.; Lin, X. F. *Chin. J. Org. Chem.* **2007**, 27(12), 1473 (in Chinese).
- [2] Nam, H.; Lewis, N. E.; Lerman, J. A.; Lee, D. H.; Chang, R. L.; Kim, D.; Palsson, B. O. *Science* **2012**, 337(6098), 1101.
- [3] Carlqvist, P.; Svedendahl, M.; Branneby, C.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. *ChemBioChem* **2005**, 6(2), 331.
- [4] (a) Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(4), 874.

- (b) Svedendahl, M.; Hult, K.; Berglund, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(51), 17988.
- [5] Svedendahl, M.; Jovanovic, B.; Fransson, L.; Berglund, P. *ChemCatChem* **2009**, *1*(2), 252.
- [6] Kitazume, T.; Ikeya, T.; Murata, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, (17), 1331.
- [7] Cai, Y.; Yao, S. P.; Wu, Q.; Lin, X. F. *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*(6), 525.
- [8] de Souza, R.; Matos, L. M. C.; Goncalves, K. M.; Costa, I. C. R.; Babics, I.; Leite, S. G. F.; Oestreich, E. G.; Antunes, O. A. C. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*(17), 2017.
- [9] Xu, J. M.; Zhang, F.; Wu, Q.; Zhang, Q. Y.; Lin, X. F. *J. Mol. Catal., B: Enzym.* **2007**, *49*(1~4), 50.
- [10] Strohmeier, G. A.; Sovic, T.; Steinkellner, G.; Hartner, F. S.; Andryushkova, A.; Purkarthofer, T.; Glieder, A.; Gruber, K.; Griengl, H. *Tetrahedron* **2009**, *65*(29~30), 5663.
- [11] Li, C.; Feng, X. W.; Wang, N.; Zhou, Y. J.; Yu, X. Q. *Green Chem.* **2008**, *10*(6), 616.
- [12] Li, C.; Zhou, Y. J.; Wang, N.; Feng, X. W.; Li, K.; Yu, X. Q. *J. Biotechnol.* **2010**, *150*(4), 539.
- [13] Li, H. H.; He, Y. H.; Guan, Z. *Catal. Commun.* **2011**, *12*(7), 580.
- [14] Xie, B. H.; Li, W.; Liu, Y.; Li, H. H.; Guan, Z.; He, Y. H. *Tetrahedron* **2012**, *68*(15), 3160.
- [15] He, Y. H.; Li, H. H.; Chen, Y. L.; Xue, Y.; Yuan, Y.; Guan, Z. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*(4), 712.
- [16] Lai, Y. F.; Zheng, H.; Chai, S. J.; Zhang, P. F.; Chen, X. Z. *Green Chem.* **2010**, *12*(11), 1917.
- [17] Hu, W.; Guan, Z.; Deng, X.; He, Y. H. *Biochimie* **2012**, *94*(3), 656.
- [18] Tang, R. C.; Guan, Z.; He, Y. H.; Zhu, W. *J. Mol. Catal., B: Enzym.* **2010**, *63*(1~2), 62.
- [19] Wang, J. L.; Li, X.; Xie, H. Y.; Liu, B. K.; Lin, X. F. *J. Biotechnol.* **2010**, *145*(3), 240.
- [20] Zaks, A.; Klivanov, A. M. *Science* **1984**, *224*(4654), 1249.
- [21] Zaks, A.; Klivanov, A. M. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*(17), 8017.
- [22] Cai, Y.; Wu, Q.; Xiao, Y. M.; Lv, D. S.; Lin, X. F. *J. Biotechnol.* **2006**, *121*(3), 330.
- [23] Xu, J. M.; Zhang, F.; Liu, B. K.; Wu, Q.; Lin, X. F. *Chem. Commun.* **2007**, (20), 2078.
- [24] Wang, J. L.; Xu, J. M.; Wu, Q.; Lv, D. S.; Lin, X. F. *Tetrahedron* **2009**, *65*(12), 2531.
- [25] (a) Wu, W. B.; Xu, J. M.; Wu, Q.; Lv, D. S.; Lin, X. F. *Synlett* **2005**, (16), 2433.
(b) Wu, W. B.; Xu, J. M.; Wu, Q.; Lv, D. S.; Lin, X. F. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*(4~5), 4872.
- [26] Torre, O.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Commun.* **2004**, (15), 1724.
- [27] Madalinska, L.; Kwiatkowska, M.; Cierpial, T.; Kielbasinski, P. *J. Mol. Catal., B: Enzym.* **2012**, *81*, 25.
- [28] Branneby, C.; Carlqvist, P.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. *J. Mol. Catal., B: Enzym.* **2004**, *31*(4~6), 123.
- [29] Guan, Z.; Fu, J. P.; He, Y. H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (37), 4959.
- [30] Chen, X. A.; Liu, B. K.; Kang, H.; Lin, X. F. *J. Mol. Catal., B: Enzym.* **2011**, *68*(1), 71.
- [31] Wang, C. H.; Guan, Z.; He, Y. H. *Green Chem.* **2011**, *13*(8), 2048.
- [32] Xie, B. H.; Guan, Z.; He, Y. H. *Biocatal. Biotransfor* **2012**, *30*(2), 238.
- [33] He, Y. H.; Hu, W.; Guan, Z. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*(1), 200.
- [34] Feng, X. W.; Li, C.; Wang, N.; Li, K.; Zhang, W. W.; Wang, Z.; Yu, X. Q. *Green Chem.* **2009**, *11*(12), 1933.
- [35] Majumder, A. B.; Ramesh, N. G.; Gupta, M. N. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*(37), 5190.
- [36] Yao, S. P.; Lu, D. S.; Wu, Q.; Cai, Y.; Xu, S. H.; Lin, X. F. *Chem. Commun.* **2004**, (17), 20067.
- [37] Wu, M. Y.; Li, K.; He, T.; Feng, X. W.; Wang, N.; Wang, X. Y.; Yu, X. Q. *Tetrahedron* **2011**, *67*(14), 2681.
- [38] Chai, S. J.; Lai, Y. F.; Xu, J. C.; Zheng, H.; Zhu, Q.; Zhang, P. F. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*(2~3), 371.
- [39] Xu, J. C.; Li, W. M.; Zheng, H.; Lai, Y. F.; Zhang, P. F. *Tetrahedron* **2011**, *67*(49), 9582.
- [40] Li, K.; He, T.; Li, C.; Feng, X. W.; Wang, N.; Yu, X. Q. *Green Chem.* **2009**, *11*(6), 777.
- [41] He, T.; Li, K.; Wu, M. Y.; Feng, X. W.; Wang, N.; Wang, H. Y.; Li, C.; Yu, X. Q. *J. Mol. Catal., B: Enzym.* **2010**, *67*(3~4), 189.
- [42] Chai, S. J.; Lai, Y. F.; Zheng, H.; Zhang, P. F. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*(11), 2231.
- [43] Xue, Y.; Li, L. P.; He, Y. H.; Guan, Z. *Sci. Reports* **2012**, 2.
- [44] Wang, J. L.; Liu, B. K.; Yin, C.; Wu, Q.; Lin, X. F. *Tetrahedron* **2011**, *6*(14), 2689.

(Qin, X.)