

使用响应面法优化酶动力学拆分 (*R/S*)- δ -十四内酯

彭 艳, 李春霓, 龙竟魏, 李俊澄, 陆 群*

(西南交通大学生命与工程学院, 四川 成都 610031)

摘要: 采用柱前衍生 HPLC 分析方法, 以 δ -十四内酯为底物, 对一系列脂肪酶进行了筛选, 得到可特异性拆分底物为 (*R/S*)-5-羟基十四烷酸的黑曲霉脂肪酶 (ANL) 和洋葱假单胞菌脂肪酶 (PCL). 考察了 pH、温度、助溶剂、酶酯比和反应时间对产物光学纯度 (ee_p)、收率 (Y) 的影响. 通过响应面分析方法 (CCD) 确定了最佳反应条件, 优化后得到 (*S*)-5-羟基十四烷酸 ($ee_{p1} \geq 99.9\%$, 收率为 42.0%) 和 (*R*)-5-羟基十四烷酸 ($ee_{p2} \geq 99.9\%$, 收率达 49.0%). 该研究符合绿色化学要求, 具有良好的应用潜力.

关键词: 脂肪酶; 特异性拆分; 响应面法; 羟基脂肪酸

中图分类号: O643.32

文献标志码: A

DOI: 10.16084/j.issn1001-3555.2024.05.003

在多种脂肪酸中, 羟基脂肪酸 (HFAs) 构成了一个独特的类别. 其中 5-羟基十四烷酸是一种重要的化工中间体, 光学纯 5-羟基十四烷酸是不对称合成反应中重要的配体合成子, 在制药、精细化工、食品等领域应用广泛^[1]. 研究发现, 5 位羟基硬脂酸异构体对各种肿瘤细胞系具有生长抑制作用^[2-3]. 其手性原料六元环状酯, 即 δ -十四内酯, 亦是重要的生物活性分子和食品添加剂中香味的主要来源^[4-5].

光学纯的化合物可以通过化学拆分或化学不对称合成来制备^[6]. 然而, 化学不对称合成在实践中的应用可能会受到必要手性试剂、高成本催化剂和低光学纯度产物的阻碍; 此外, 含有重金属的化学催化剂会严重影响产品的质量^[7-8]. 基于绿色化学的概念, 生物催化剂越来越多地被现代合成化学家使用^[9]. 酶动力学拆分具有立体选择性高、反应条件温和、环境友好等优点, 可以弥补化学拆分的不足, 是一种前景广阔的适合大规模生产的绿色合成方法^[10-12].

脂肪酶在有机溶剂中具有高催化活性和热稳定性, 因此被广泛应用于合成手性化合物^[13]. 我们通过筛选出合适的脂肪酶选择性水解 δ -十四内酯得到具有良好立体选择的 5-羟基十四烷酸. 先通过单因素实验分析, 选择响应面 (RSM) 分析的自变量为助溶剂比例、温度、酶酯比和反应时间; 再通过中心复合设计 (CCD)^[14] 响应面分析法确定了最佳反应参

数, 获得了具有高收率、高光学活性的光学纯 5-羟基十四烷酸和光学纯 δ -十四内酯.

1 实验部分

1.1 主要试剂

δ -十四内酯 (CAS No. 2 721-22-4)、2,4'-二溴苯乙酮 (CAS No. 99-73-0) 购自上海毕得医药科技有限公司; 商业脂肪酶 Lipase AS (*Aspergillus niger* lipase, ANL)、Lipase PS (*Pseudomonas cepacia* lipase, PCL)、Lipase RM (*Rhizomucor miehei* lipase)、Novozym 435 (*Candida antarctica* lipase)、Lipase M (*Malbranchea cinnamomea* lipase)、Lipase TL LM (*Talaromyces thermophilus* immobilized lipase)、Lipase OPE (*Talaromyces thermophilus* lipase) 购自北京诺维信有限公司; 商业脂肪酶 Lipase G (*Geotrichum candidum* lipase)、Lipase CY YG (*C. cylindracea* lipase)、Lipase CRL (*Candida rugosa* lipase) 购自默克有限公司; 商业脂肪酶 Lipase PL LM (*Rhizomucor miehei* lipase)、Lipase PPL (*Porcine pancreatic* lipase) 购自上海伯奥生物科技有限公司; 色谱纯级正丁醇 (CAS No. 71-36-3)、异丙醇、正己烷、环己烷购自成都科隆试剂有限公司等; 其余试剂均为分析纯.

1.2 脂肪酶的筛选

取 12 只 5 mL EP 管, 加入 20 mg 外消旋 δ -十四

收稿日期: 2024-06-07; 修回日期: 2024-08-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (2019G010129) (The National Nature Science Foundation of China(2019G010129)).

作者简介: 彭 艳 (2000-), 女, 硕士研究生, 主要从事药物合成研究. E-mail: py17@my.swjtu.edu.cn (Peng Yan(2000-), female, master degree candidate, mainly engaged in research of drug synthesis. E-mail: py17@my.swjtu.edu.cn).

* 通信联系人, E-mail: luqun1125@home.swjtu.edu.cn.

内酯作为底物, 加入 1 mL 磷酸缓冲液作为溶剂, 分别依次加入 5 mg 12 种脂肪酶作为催化剂. 在 30 °C 下, 120 r·min⁻¹ 摇床中反应 8 h. 产物后处理及衍生化处理后进入 HPLC 检测分析.

1.3 脂肪酶催化内酯水解反应

脂肪酶催化水解反应流程图如图 1 所示^[15]. 取 30 mg 外消旋 δ -十四内酯, 加入 1 mL 磷酸缓冲液作

为溶剂, 再加入适量脂肪酶和适量助溶剂于 5 mL 反应烧瓶中, 5 °C 下反应 20 h. 反应结束后, 向其中加入 1 mL 乙酸乙酯、适量 2,4'-二溴苯乙酮和 3 滴三乙胺, 40 °C 下过夜反应, 反应结束后加入 1 mL 水和 3 滴 5% 的盐酸洗涤两次, 取上清液 25 μ L, 使用高效液相色谱 (HPLC) 进行分析.

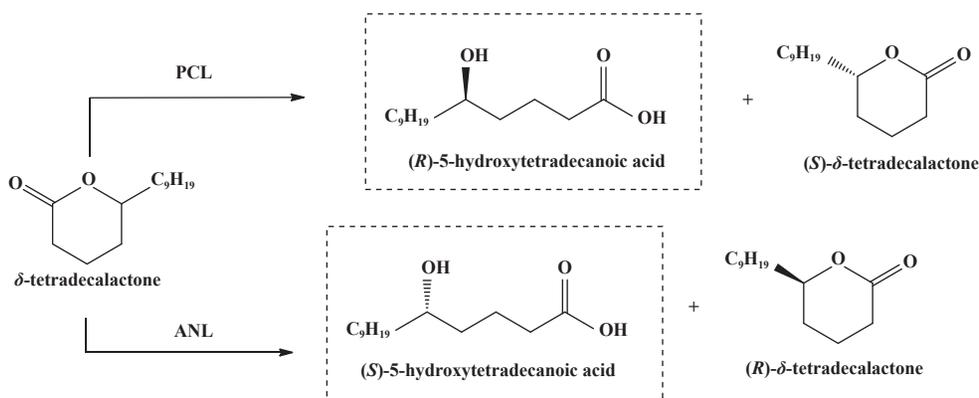


图 1 酶动力学拆分方案

Fig.1 Enzyme kinetic resolution scheme

动力学拆分效率通过酶催化水解反应产物的光学纯度 (ee_p)、产物收率 (Y) 和对映体选择率 (E) 进行评估, 使用以下公式计算^[16-18]:

$$ee_{p1} = \frac{S_3 - S_4}{S_3 + S_4}, ee_{p2} = \frac{S_4 - S_3}{S_3 + S_4} \quad (1)$$

$$Y = \frac{S_3 + S_4}{S_1 + S_2} \quad (2)$$

$$E = \frac{\ln[1 - Y(1 + ee_p)]}{\ln[1 - Y(1 - ee_p)]} \quad (3)$$

用式 (1), (2), (3) 计算产物的光学纯度 (ee_p)、产物收率 (Y) 和对映体选择率 (E), 其中 S_1 和 S_2 代表消旋体衍生物的 (S) 和 (R) 对映体峰面积, S_3 和 S_4 代表反应后产物的 (S) 和 (R) 对映体峰面积.

1.4 分析方法

我们采用高效液相色谱 (HPLC) 对 5-羟基十四烷酸进行定性、定量分析. 由于 δ -十四内酯经酶拆分后得到的手性 5-羟基十四烷酸无紫外吸收与荧光发射, 故将 5-羟基十四烷酸经柱前衍生后再经 HPLC 对其检测. 衍生剂选用 2,4'-二溴苯乙酮, 衍生方法如图 2, 利用该方法可以即时监测和有效评估酶法拆分的对映体手性纯度^[19]. 色谱柱为 CHIRALCEL OD-H(4.6 mm \times 250 mm \times 5 μ m); 流动相配比为异丙醇/正己烷 (7 : 93, 体积比); 流速为 1.3 mL·min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 柱温为 36 °C; 进样量为 20 μ L.

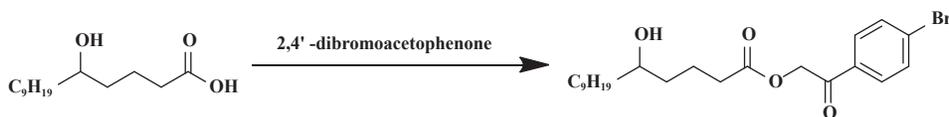


图 2 5-羟基十四烷酸的衍生化方法

Fig.2 Derivatization method of 5-hydroxytetradecanoic acid

1.5 优化方法

脂肪酶、pH、温度、助溶剂、酶用量、底物摩尔比和反应时间是影响拆分性能的重要因素, 我们通过单因素实验研究了这些因素的影响. 在单因素实

验结果的基础上, 采用响应面法对工艺开展了进一步的综合优化. 以 Y 和 ee_p 为指标, 采用中心组合设计考查一些重要定量因素的影响. 采用二次多项式模型对中心组合设计中得到的数据进行拟合. 在

Design Expert 软件(版本 13.0)上进行优化。

最佳 pH: 实验共分为 2 组。第 1 组: 取 4 只 5 mL EP 管, 加入 20 mg δ -十四内酯, 各取 1 mL pH 为 6.0、7.0、8.0 和 9.0 的磷酸缓冲液作为溶剂, 加入 5 mg ANL 作为催化剂。在 30 °C 下, 120 r·min⁻¹ 摇床中反应 8 h。第 2 组: 替换为 5 mg PCL 作为催化剂, 重复上述步骤。

最佳温度: 实验共分为 2 组。第 1 组: 取 7 只 5 mL EP 管, 加入 20 mg δ -十四内酯及 1 mL 磷酸缓冲液, 各加入 5 mg ANL 作为催化剂。温度设置为 6、12、18、24、30、36 和 42 °C。120 r·min⁻¹ 摇床中反应 8 h。第 2 组: 替换为 5 mg PCL 作为催化剂, 重复上述步骤。

最佳助溶剂: 实验共分为 2 组。第 1 组: 取 12 只 5 mL EP 管, 加入 δ -十四内酯及 1 mL 磷酸缓冲液, 分别加入有机溶剂 20%(体积分数): 正庚烷、正己烷、环己烷、甲苯、异丙醚、甲基叔丁基醚、四氢呋喃、1,4-二氧六环、二甲基亚砜、乙酸乙酯、*N,N*-二甲基甲酰胺; 对照组, 加入 5 mg ANL 作为催化剂。温度设置为 36 °C, 120 r·min⁻¹ 摇床中反应 8 h。第 2 组: 替换为 5 mg PCL 作为催化剂, 温度设置为 12 °C, 重复上述步骤。

最佳酶酯比: 实验共分为 2 组。第 1 组: 取 4 只 5 mL EP 管, 加入 20 mg δ -十四内酯及 1 mL 磷酸缓冲液, 加入 20% 1,4-二氧六环(体积分数), 依次向反应体系中加入 2.5 mg(1:8)、3.3 mg(1:6)、5 mg(1:4)、10 mg(1:2) 和 20 mg(1:1) 的 ANL 并摇匀。温度设置为 36 °C, 120 r·min⁻¹ 摇床中反应 8 h。第 2 组: 替换为 PCL 作为催化剂, 替换为 20% 正己烷(体积分数) 作为助溶剂, 温度设置为 12 °C, 重复上述步骤。

最佳反应时间: 实验共分为 2 组。第 1 组: 取 6 只 5 mL EP 管, 加入 20 mg δ -十四内酯、1 mL 磷酸缓冲液及 20% 1,4-二氧六环(体积分数), 依次向反应体系中加入 10 mg(1:2) 的 ANL 并摇匀。温度设置为 36 °C, 120 r·min⁻¹ 摇床中反应, 反应时间依次为 3、6、9、12、18 和 24 h。第 2 组: 替换为 3.3 mg(1:6) 的 PCL 作为催化剂, 替换为 20% 正己烷(体积分数) 作为助溶剂, 温度设置为 12 °C, 重复上述步骤。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶的筛选

为了选择最合适的脂肪酶, 测试了实验室酶库

中不同的 12 种市售脂肪酶 (ANL、PCL、Lipase G、Lipase RM RM、Lipase PPL、Lipase TL LM、Lipase M、Lipase CY YG、Lipase CRL、Novozym 435、Lipase PL LM 与 Lipase OPE)。脂肪酶的活性和立体选择性如图 3 所示。研究发现, 不同脂肪酶在产物收率 (Y) 和反应产物的光学纯度 (ee_p) 方面存在显著差异。其中, ANL 具有最佳的对映选择性, ee_{p1} 达到 80.2%, $E=11.7$; PCL 具有最高的催化活性, Y 值为 38.1%, $E=11.0$ 。因此, 将 ANL 及 PCL 选为进一步研究的脂肪酶。

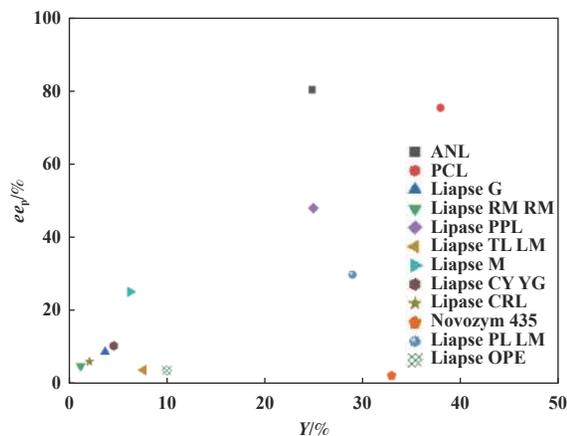


图 3 不同脂肪酶的拆分效率

Fig.3 Resolution efficiency of different lipases

2.2 反应参数的优化

2.2.1 pH 和温度对酶促动力学拆分的影响

酶是含有氨基酸表面正负电离的聚电解质, pH 可以改变细胞表面的电荷密度和酶的分子结构, 从而影响酶的解离状态, 进而影响酶的催化活性和立体选择性^[20]。如图 4(a) 所示, 对于 1 号酶 ANL, pH 为 7 时, ee_{p1} 达到 85.4%, Y_1 达到 25.0%。对于 2 号酶 PCL, pH 为 8 时, ee_{p2} 达到 78.9%, Y_2 达到 37.5%。在过酸或过碱性环境下均不利于酶的生存, 活性降低。因此, 选择 pH=7 应用于 ANL 催化水解的反应体系, 选择 pH=8 应用于 PCL 催化水解的反应体系, 并用于后续实验。

温度可以影响酶的活性、选择性、稳定性以及反应平衡^[21]。控制在酶拆分过程中的温度范围为 6~42 °C, 结果如图 4(b) 所示。对于 1 号酶 ANL, 当温度从 6 升高到 36 °C 时, ee_{p1} 呈增加趋势, 并在 36 °C 时达到最大值 86.2%, 同时 Y_1 达到 31.2%。然而, 随着温度的进一步升高, ee_{p1} 显著下降, 这是由于过高温可能会影响酶蛋白的构象, 从而降低酶的对映选择性。对于 2 号酶 PCL, 低温有利于产生高 ee_{p2}

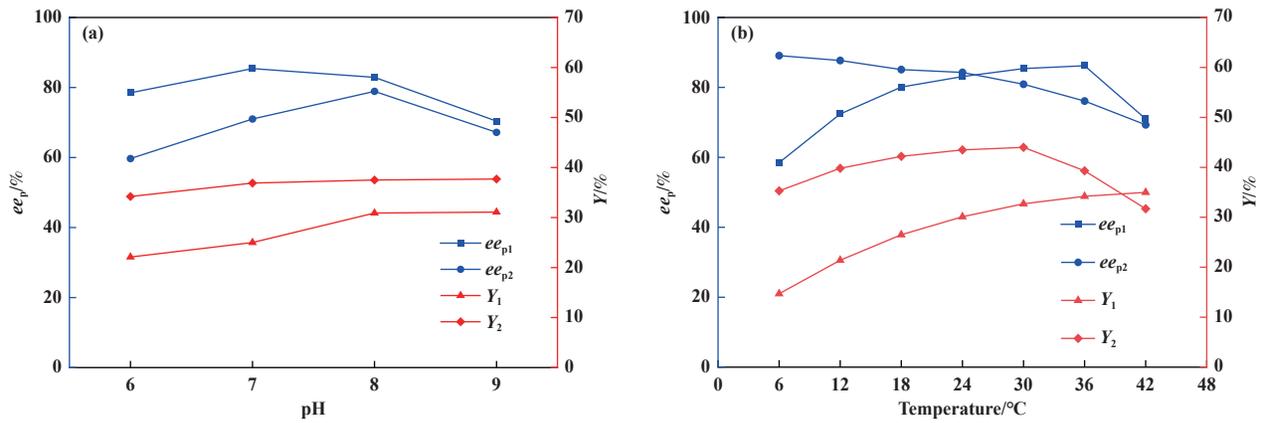


图 4 pH (a) 和温度 (b) 对 ANL 和 PCL 酶促动力学拆分的影响
Fig.4 Effects of pH (a) and temperature (b) on the kinetic resolution of ANL and PCL

产物, 随着温度的升高, ee_{p2} 呈下降趋势, 这可能是由于内酯底物自身水解导致, 但低温会导致转化率较低. 因此, 选择 36 °C 作为 ANL 的反应体系温度, 选择 12 °C 作为 PCL 的反应体系温度, 并用于后续实验.

2.2.2 助溶剂对酶促动力学拆分的影响

酶的两相催化在酶工程中占有重要地位, 有机溶剂对酶的催化活性和稳定性有很大影响. 有研究表明, 在酶催化反应过程中加入适当比例的助溶剂, 可以有效提升酶的稳定性, 同时也可相应地增加其专一性^[22-23]. 为使两相酶催化反应顺利进行, 助溶剂需要满足两个条件: 1) 具有较高的疏水性 (lgP); 2) 具有较好的底物溶解性^[24]. Griengl 等^[25] 解释到, 酶在疏水性弱 (lgP 值小) 的溶剂中容易失活, 而疏水性越强 (lgP 值越高) 的溶剂越有利于酶反应. 针对两种不同的脂肪酶, 我们研究了 11 种助溶剂对酶催化内酯水解反应的影响. 如图 5 所示, 对于 1 号酶

ANL, 尽管以二甲基亚砷作助溶剂时 ee_{p1} 达到最大值 88.5%, 但 Y_1 仅为 20.2%, 酶催化水解的效率过低. 另外, 对照组 Y_1 达到 35.1%, 但 ee_{p1} 并不理想, 仅为 80.4%. 而当助溶剂为 1,4-二氧六环时, ee_{p1} 达到 86.4%, 同时 Y_1 达到 33.2%. 因此综合考虑, 选择 1,4-二氧六环作为 ANL 的反应体系的助溶剂. 对于 2 号酶 PCL, 对照组 Y_2 达到 48.2%, 但 ee_{p2} 仅 68.2%. 选择以高 lgP 有机溶剂正己烷作为助溶剂, ee_{p2} 达到 94.7% 远高于其他组, 同时 Y_2 达到 42.2%. 因此选择正己烷作为 PCL 的反应体系的助溶剂 (编号对应的助溶剂: 1 号为正庚烷、2 号为正己烷、3 号为环己烷、4 号为甲苯、5 号为异丙醚、6 号为甲基叔丁基醚、7 号为四氢呋喃、8 号为 1,4-二氧六环、9 号为二甲基亚砷、10 号为二氯甲烷、11 号为 *N,N*-二甲基甲酰胺、12 号为对照组).

2.2.3 酶酯比对酶促动力学拆分的影响

底物量和酶量都是影响酶反应的重要因素之

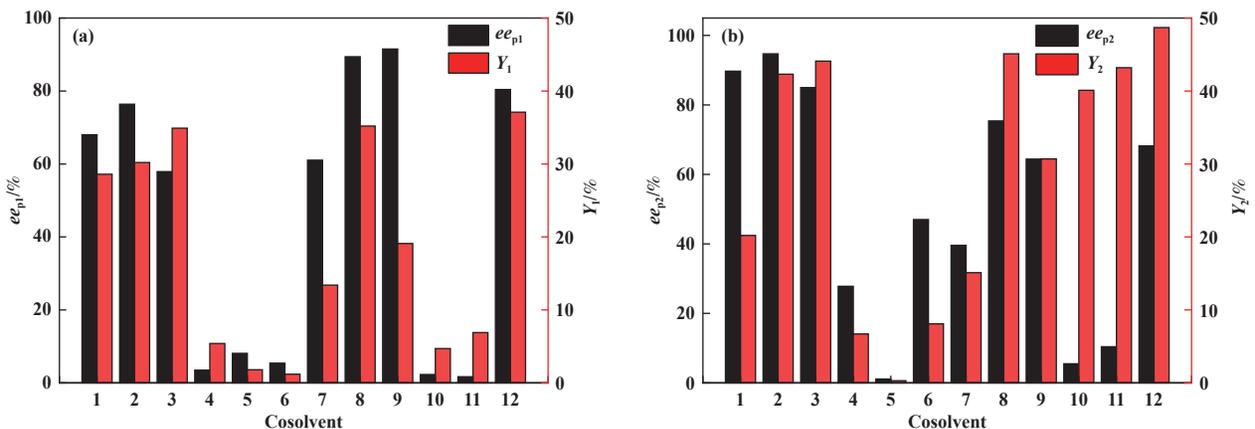


图 5 助溶剂对 (a) ANL 和 (b) PCL 酶促动力学拆分的影响
Fig.5 Effects of cosolvent on the kinetic resolution of (a) ANL and (b) PCL enzymes

一, 底物浓度过高, 可能造成底物抑制, 而酶量过高也会使酶的对映选择性降低, 同时对反应进程造成影响^[26]. 因此, 适当的酶酯比不仅可以获得最佳的反应效果, 而且可以提高经济效益^[27]. 如图 6 所示, 对于 1 号酶 ANL, 随着酶酯比的增加, ee_{p1} 和 Y_1 都呈递

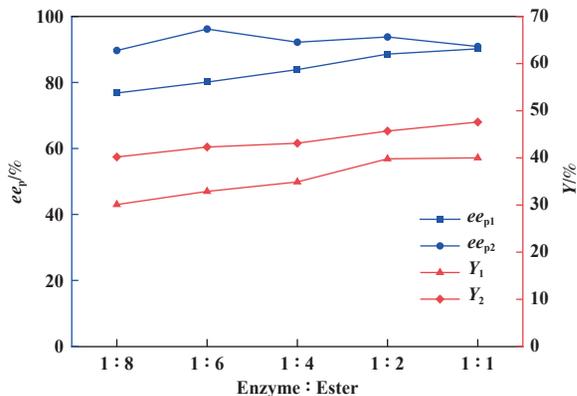
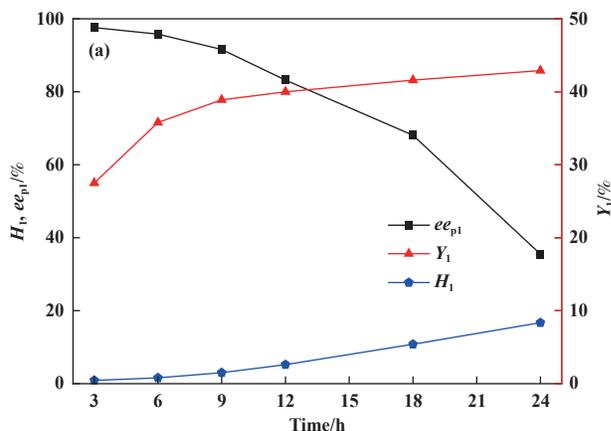


图 6 酶酯比对 ANL 和 PCL 酶促动力学拆分的影响

Fig.6 Effect of enzyme-ester ratio on the kinetic resolution of ANL and PCL



增趋势, 在酶酯比大于 1 : 2 时, 增长速率趋于平稳, 这可能归因于一定量的酶的活性位点有限. 考虑到酶酯比越高, 经济效益越低, 因此选择酶酯比为 1 : 2, 此时 ee_{p1} 达到 88.6%, Y_1 达到 39.8%. 对于 2 号酶 PCL, 在酶酯比为 1 : 6 时, ee_{p2} 达到最大值 96.2%, Y_2 达到 42.3%. 因此, 将 ANL 反应体系的酶酯比设定为 1 : 2, 将 PCL 反应体系的酶酯比设定为 1 : 6.

2.2.4 反应时间对酶促动力学拆分的影响

考查了时间对脂肪酶催化水解反应的影响, 反应结果如图 7 所示. 对于 1 号酶 ANL, 在反应开始时, 随着反应时间的延长, 收率迅速提高, 同时保持了优异的对映选择性. 然而, 在超过 6 h 后, Y_1 增加缓慢, 水解率 (H_1) 逐渐上升, ee_{p1} 显著下降. 因此, 选择在 6 h 时终止反应, 此时 ee_{p1} 为 95.4%, Y_1 达到 32.8%, H_1 为 1.6%. 对于 2 号酶 PCL, 低温反应条件时, 对映选择性优异, 并且水解率较低, 但收率增长较为缓慢. 因此, 选择在 12 h 后终止反应, 此时 ee_{p2} 为 96.1%, Y_2 达到 43.7%, H_2 为 0.9%. 综合实验结果,

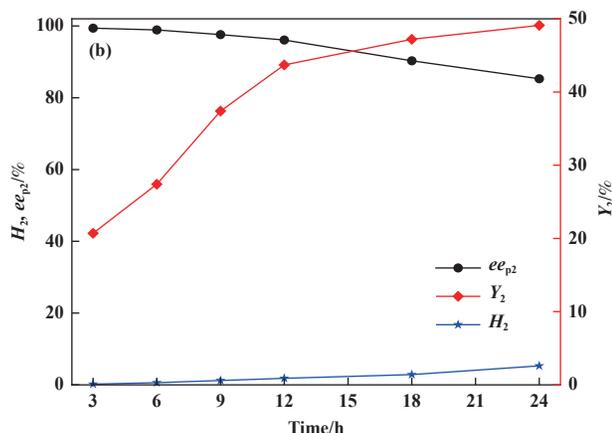


图 7 反应时间对 (a) ANL 和 (b) PCL 酶促动力学拆分的影响

Fig.7 Effects of reaction time on the kinetic resolution of (a) ANL and (b) PCL enzymes

ANL 反应体系选择在 6 h 时终止反应, PCL 反应体系选择在 12 h 时终止反应.

2.3 响应面模型应用

2.3.1 ANL 催化水解内酯的响应面优化设计

单因素实验表明, 重要因素对分辨率的影响较大, 然而, 由于没有考虑多因素的相互作用, 通过上述实验无法确定优化的条件. 我们使用 Design Expert 软件上的中心组合设计方法对条件进行了进一步优化. 以 ANL 作为催化剂, 在 PB(0.2 mol·L⁻¹, pH 7.0) 溶液中, 以体积分数 20% 的 1,4-二氧六环为助溶剂的条件下, 选择另外 3 个显著单因素作为优

化变量, 分别是温度 (A)、酶/酯比 (B)、反应时间 (C), 并以转化率 Y 和光学纯度 ee_p 作为响应值, 如表 1. 根据 Design Expert 软件设计 17 组 CCD 实验, 实验方案及结果见表 2.

表 1 RSM 中自变量的编码和实际值

Table 1 Coding and actual values of independent variables in RSM

A	B	C	Variable
$T/^\circ\text{C}$	Enzyme : Ester	t/h	
30	0.250	3	-1
42	1.000	9	1

表 2 实验条件和反应的实际值

Table 2 Experimental conditions and the actual value of the reaction

Experiment No.	A T/°C	B Enzyme : Ester	C t/h	Real value of the response	
				$ee_{p1}/\%$	$Y_1/\%$
1	42	1.000	6	64.9	35.2
2	36	0.250	9	80.0	32.5
3	36	0.625	6	97.9	38.5
4	42	0.625	9	58.7	42.6
5	36	1.000	3	99.5	22.0
6	36	0.625	6	97.9	38.1
7	36	0.625	6	94.3	32.0
8	30	0.625	3	95.3	18.4
9	36	0.625	6	97.8	38.6
10	42	0.250	6	58.5	35.7
11	42	0.625	3	76.6	27.4
12	36	0.625	6	97.5	33.0
13	30	0.250	6	73.3	20.7
14	36	1.000	9	93.7	42.5
15	30	1.000	6	88.2	33.4
16	30	0.625	9	84.5	35.9
17	36	0.250	3	90.6	24.0

对表 1 和表 2 中的数据进行多元回归拟合, 拟合得到了 ee_{p1} 和 Y_1 的二次回归方程: 选择二次多项式模型来拟合这些数据. $ee_{p1}(Y_1)$ 和 $Y_1(Y_2)$ 的数学模型如下公式所示:

$$ee_{p1} = 97.08 - 10.325A + 5.4875B - 5.6375C - 2.125AB - 1.775AC + 1.2BC - 19.015A^2 - 6.84B^2 + 0.71C^2 \quad (4)$$

$$Y_1 = 36.04 + 4.0625A + 2.525B + 7.7125C - 3.3AB - 0.575AC + 3BC - 1.9825A^2 - 2.8075B^2 + 2.9825C^2 \quad (5)$$

F 值越大和 P 值越小越能代表相关系数的显著性. 表 3 和表 4 展示了模型拟合检验及方差分析的结果. ee_{p1} 和 Y_1 的 F 值分别为 72.46 和 14.00, $P < 0.0001$, 达到较高水平, 表明该模型具有统计学意义. ee_{p1} 的失拟项为 $0.1390 > 0.05$, Y_1 的失拟项为 $0.9387 > 0.05$, 这意味着两个模型都具有高度的拟合关系. 模型 ee_{p1} 和 Y_1 的相关系数 (R_2) 分别为 0.9894 和 0.9474, 表明实际值和预测值具有高相关性. 从表 3 得知, 在 ee_{p1} 模型模型中, A 、 B 、 C 、 A^2 、 B^2 是重要的模型项, 其中 A 、 C 、 AB 、 AC 、 A^2 、 B^2 对于 ee_{p1} 的值呈现消极作用, 而 B 、 BC 、 C^2 对于 ee_{p1} 的值呈现积极作用, 表明 ee_{p1} 受温度、酶酯比和反应时间的显著影响. 从表 4 得知, 在 ee_{p1} 模型模型中, A 、 B 、 C 、 AB 、 C^2 是重要的模型项, 其中 A 、 B 、 C 、 BC 、 C^2 对于 Y_1

表 3 ee_{p1} 模型方差分析

Table 3 ee_{p1} model analysis of variance

Response	Sum of squares	Degree of freedom(d_f)	Mean square	F-value	P-value Prob>F
Model	3 168.63	9	352.07	72.46	< 0.000 1
A	852.84	1	852.84	175.53	< 0.000 1
B	240.90	1	240.90	49.58	0.000 2
C	254.25	1	254.25	52.33	0.000 2
AB	18.06	1	18.06	3.72	0.095 2
AC	12.60	1	12.60	2.59	0.151 3
BC	5.76	1	5.76	1.19	0.312 3
A^2	1 522.40	1	1 522.40	313.34	< 0.000 1
B^2	196.99	1	196.99	40.54	0.000 4
C^2	2.12	1	2.12	0.44	0.529 8
Residual	34.01	7	4.86	-	-
Lack of fit	24.24	3	8.08	3.31	0.139 0
Pure error	9.77	4	2.44	-	-
Cor total	3 202.64	16	-	-	-

表 4 Y_1 模型方差分析Table 4 Analysis of variance of Y_1 model

Response	Sum of squares	Degree of freedom(d_f)	Mean square	F-value	P-value prob>F
Model	836.83	9	92.98	14.00	0.001 1
<i>A</i>	132.03	1	132.03	19.88	0.002 9
<i>B</i>	51.01	1	51.01	7.68	0.027 6
<i>C</i>	475.86	1	475.86	71.67	< 0.000 1
<i>AB</i>	43.56	1	43.56	6.56	0.037 5
<i>AC</i>	1.32	1	1.32	0.20	0.668 9
<i>BC</i>	36.00	1	36.00	5.42	0.052 7
A^2	16.55	1	16.55	2.49	0.158 4
B^2	33.19	1	33.19	5.00	0.060 5
C^2	37.45	1	37.45	5.64	0.049 2
Residual	46.48	7	6.64	—	—
Lack of fit	4.07	3	1.36	0.13	0.938 7
Pure error	42.41	4	10.60	—	—
Cor total	883.30	16	—	—	—

的 C^2 值呈现消极作用, 而 AB 、 AC 、 A^2 、 B^2 对于 Y_1 的值呈现积极作用, 表明 Y_1 受温度、酶酯比和反应时间显著影响. 根据模型方程绘制响应面图 (图 8), 可以直观地反映变量之间交互作用对光学纯度 ee_p 的影响, 可方便用于研究各变量之间的交互作用. 根据 ANL 催化水解 δ -十四内酯得到 (S)-5-羟基十四烷酸的实验结果和回归方程各项的方差分析, 以响应值 ee_{p1} 为主要因素, Y_1 为次要因素, 由响应面分析法模拟出酶法拆分的最佳工艺条件: 反应温度 34.6 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间 5.7 h, ANL 与 δ -十四内酯质量比

0.67 时的 ee_{p1} 达到 99.65%, 收率为 42.3%.

2.3.2 PCL 催化水解内酯的响应面优化设计

参照 ANL 催化水解内酯的响应面优化设计, 根据 PCL 催化水解 δ -十四内酯得到 (R)-5-羟基十四烷酸的实验结果和回归方程各项的方差分析, 以响应值 ee_{p2} 为主要因素, Y_2 为次要因素, 由响应面分析法模拟出酶法拆分的最佳工艺条件: 反应温度为 6 $^{\circ}\text{C}$; 反应时间为 10.4 h; PCL 与内酯的质量比为 0.14, 此时的 ee_{p2} 达到 99.61%, 收率达 49.5%.

2.4 验证实验

为验证 RSM 模拟的最佳数据, 以 CCD 预测的参数值为条件, 分别进行了实验验证. 以 ANL 作为催化剂, 在 PB($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7.0) 溶液中, 以 20% 1,4 二氧六环为助溶剂, 35 $^{\circ}\text{C}$ 下, 酶酯比=0.67, 反应 6 h 得到 (S)-5-羟基十四烷酸 ($ee_{p1} \geq 99.9\%$, $Y_1=42.0\%$). 以 PCL 作为催化剂, 在 PB($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=8.0) 溶液中, 以 20% 正己烷为助溶剂, 6 $^{\circ}\text{C}$ 下酶酯比为 0.14, 反应 12 h 得到 (R)-5-羟基十四烷酸 ($ee_{p2} \geq 99.9\%$, $Y_2=49.0\%$). 两组实验结果与模型的预期值 (42.3%、49.5%) 均非常吻合 (误差在 3% 以内). 放大实验的结果与模型预测值的误差也在 3% 以内, 表明该模型适用于工业生产和优化. 图 9 为经脂肪酶 ANL 和 PCL 拆分后的 5-羟基十四烷酸的高效液相色谱图.

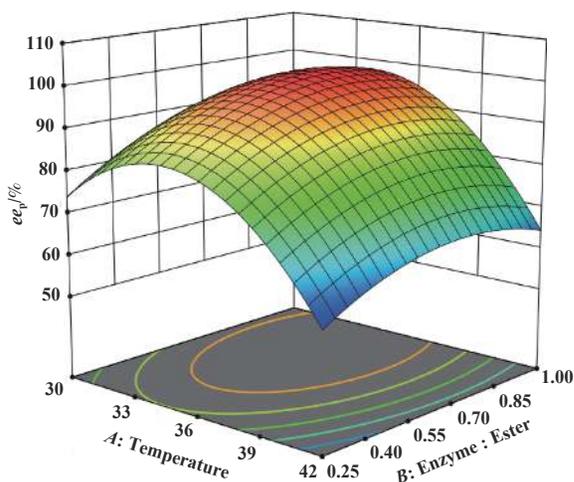


图 8 A 和 B 两因素交互作用对 ee_{p1} 影响的响应面图
Fig.8 Response surface diagram of the interaction between A and B on ee_{p1}

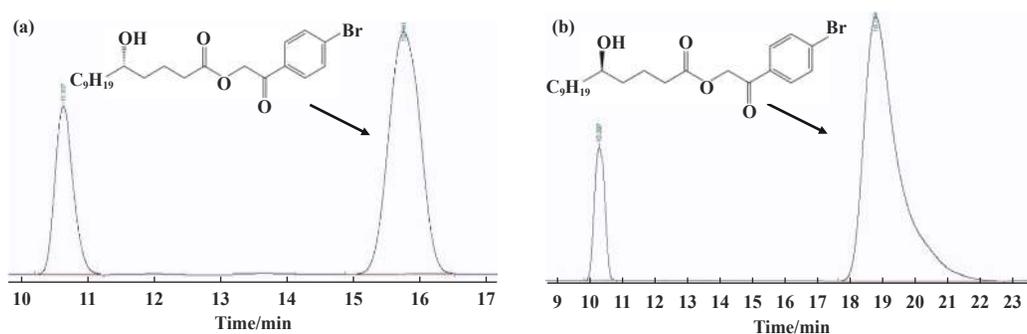


图9 经 ANL 和 PCL 拆分后的 (a) (*S*)-5-羟基十四烷酸和
(b) (*R*)-5-羟基十四烷酸的高效液相色谱图

Fig.9 High performance liquid chromatograms of (a) (*R*)-5-hydroxytetradecanoic acid and (b) (*S*)-5-hydroxytetradecanoic acid separated by ANL and PCL

3 结论

我们建立了一种高效的脂肪酶催化 δ -十四内酯水解成光学纯 5-羟基十四烷酸的反应体系。对一系列脂肪酶进行了筛选得到脂肪酶 ANL 和 PCL。研究了有机溶剂、pH、酶酯比、时间和温度对反应产物收率 (Y) 和光学纯度 (ee_p) 的影响。采用响应面法评估了一些重要因素的影响并优化工艺。优化后得到 (*S*)-5-羟基十四烷酸 ($ee_{p1} \geq 99.9\%$, $Y=42.0\%$) 和 (*R*)-5-羟基十四烷酸 ($ee_{p2} \geq 99.9\%$, $Y=49.0\%$)。该研究为直接获得光学纯 5-羟基十四烷酸和光学纯 δ -十四内酯提供了一个实用方案, 具有操作简单、能耗低、催化剂易用、高选择性和分离效率高等优点。这种酶催化的合成效率高, 立体选择性优异, 符合环保效益, 为工业制备各种用途的手性羟基酸和光学纯 δ -内酯提供了一种很有前途的方法。

参考文献:

- [1] Weng Pei-fang(翁佩芳), Wu Zu-fang(吴祖芳). Advances of hydroxyl fatty acids production by bioconversion of fatty acids with microbe(脂肪酸微生物转化生产羟基脂肪酸的研究进展)[J]. *J Chin Cereals Oils Association*(中国粮油学报), 2008, **23**(1): 203–206.
- [2] Calonghi N, Boga C, Nitti P, et al. Effects of regioisomerism on the antiproliferative activity of hydroxystearic acids on human cancer cell lines[J]. *Molecules*, 2022, **27**(8): 2396.
- [3] Kokotou M G, Kokotos A C, Gkikas D, et al. Saturated hydroxy fatty acids exhibit a cell growth inhibitory activity and suppress the cytokine-induced β -cell apoptosis[J]. *J Med Chem*, 2020, **63**(21): 12666–12681.
- [4] Braner M, Zielonka S, Auras S, et al. Systematic investigation of the kinetic resolution of 3-hydroxy fatty acid esters using *Candida antarctica* lipase B (CALB) and the influence of competing oligomerization on the enantiomeric ratios[J]. *Synth Commun*, 2012, **42**(7): 1019–1025.
- [5] Shimotori Y, Sekine K, Miyakoshi T. Asymmetric synthesis of δ -lactones with lipase catalyst[J]. *Flavour Frag J*, 2007, **22**(6): 531–539.
- [6] Bharathi D, Rajalakshmi G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification[J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2019, **22**: 101368.
- [7] Xu Y, Wang M, Feng B, et al. Dynamic kinetic resolution of aromatic *sec*-alcohols by using a heterogeneous palladium racemization catalyst and lipase[J]. *Catal Sci Technol*, 2017, **7**(4): 5838–5842.
- [8] Sekhon B. Enantioseparation of chiral drugs: An overview[J]. *Int J Pharmtech Res*, 2010, **2**(2): 1584–1594.
- [9] Han H, Zhou Y, Li S, et al. Immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on porous polyurea and its application in kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, **8**(39): 25714–25724.
- [10] Breuer M, Dittrich K, Habicher T, et al. Industrial methods for the production of optically active intermediates[J]. *Angew Chem Int Edit*, 2004, **43**(7): 788–824.
- [11] Santos K C, Cassimiro D M J, Avelar M H M, et al. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils[J]. *Ind Crop Prod*, 2013, **49**: 462–470.
- [12] Goncalves Filho D, Silva A G, Guidini C Z. Lipases: Sources, immobilization methods, and industrial applications[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, **103**(18): 7399–7423.
- [13] Pascoal A, Estevinho L M, Martins I M, et al. Review:

- Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2018, **104**: 119–126.
- [14] Alam M S, Damanhour Z A, Ahmad A, *et al.* Development of response surface methodology for optimization of extraction parameters and quantitative estimation of embelin from embelia ribes burm by high performance liquid chromatography[J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, **11**(42): S166–172.
- [15] Parve J, Reile I, Aid T, *et al.* Lipase-catalyzed stereo-resolution of long-chain 1,2-alkanediols: A screening of preferable reaction conditions[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2015, **116**: 60–69.
- [16] Uyanik M, Hayashi H, Iwata H, *et al.* Chiral ammonium hypoiodite salt-catalyzed enantioselective oxidative cycloetherification to 2-acyl tetrahydrofurans[J]. *Chem Lett*, 2016, **45**(3): 353–355.
- [17] Bornscheuer U T, Romas J K. Hydrolases in organic synthesis: Regio- and stereoselective biotransformations[M]. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- [18] Dos Santos L A, Alnoch R C, Soares G A, *et al.* Immobilization of *pseudomonas fluorescens* lipase on chitosan crosslinked with polyaldehyde starch for kinetic resolution of sec-alcohols[J]. *Process Biochem*, 2022, **122**(2): 238–247.
- [19] Long W S, Kow P C, Kamaruddin A H, *et al.* Comparison of kinetic resolution between two racemic ibuprofen esters in an enzymic membrane reactor[J]. *Process Biochem*, 2005, **40**(7): 2417–2425.
- [20] Persson M, Costes D, Wehtje E, *et al.* Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **30**(7): 916–923.
- [21] Yuce-Dursun B, Cigil A B, Dongez D, *et al.* Preparation and characterization of sol-gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2016, **127**: 18–25.
- [22] Smith M E, Banerjee S, Shi Y, *et al.* Investigation of the cosolvent effect on six isoenzymes of PLE in the enantioselective hydrolysis of selected α , α -disubstituted malonate esters[J]. *ChemCatChem*, 2012, **4**(4): 472–475.
- [23] Zaks A, Klivanov A M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents[J]. *J Biol Chem*, 1988, **263**(7): 3194–3201.
- [24] Wolff A, Zhu L, Wong Y W, *et al.* Understanding the influence of temperature change and cosolvent addition on conversion rate of enzymatic suspension reactions based on regime analysis[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **62**(2): 125–134.
- [25] Griengl H, Klempier N, Pöchlauer P, *et al.* Enzyme catalysed formation of (*S*)-cyanohydrins derived from aldehydes and ketones in a biphasic solvent system[J]. *Tetrahedron*, 1998, **54**(48): 14477–14486.
- [26] Ding J, Yang Z, Zhao Y, *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of ethyl(*R*)-2-benzyloxy-2-isopropylhydrogenmalonate: A useful combination of chemical synthesis with enzymatic methods[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, **83**(4): 763–767.
- [27] Jiang B, Xie R, Tang K. Resolution of (*R,S*)-4-BrMA catalyzed by *pseudomonas cepacia* lipase in an organic phase[J]. *Catal Lett*, 2023, **153**(8): 2352–2358.

Optimizing the Enzymatic Kinetic Resolution of (*R/S*)- δ -Tetradecalactone by Response Surface Methodology

PENG Yan, LI Chun-ni, LONG Xian-wei, LI Jun-cheng, LU Qun*

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: A series of lipases were screened using δ -tetradecalactone as substrate by pre-column derivatization HPLC analysis. *Aspergillus niger* lipase (ANL) and *Pseudomonas cepacia* lipase (PCL) with specific hydrolysis substrate of (*R/S*)-5-hydroxytetradecanoic acid were obtained. The effects of pH, temperature, cosolvent, enzyme-ester ratio and reaction time on the optical purity (ee_p) and yield (Y) of the product were investigated. The optimum reaction conditions were determined by response surface analysis (CCD). After optimization, (*S*)-5-hydroxytetradecanoic acid ($ee_{p1} \geq 99.9\%$, yield 42.0%) and (*R*)-5-hydroxytetradecanoic acid ($ee_{p2} \geq 99.9\%$, yield 49.0%) were obtained. The system meets the requirements of green chemistry and has good application potential.

Key words: lipase; specific resolution; response surface method; hydroxyl fatty acids