

脂肪酶不对称立体选择性能改善的研究进展

聂尧, 徐岩, 王栋

(江南大学生物工程学院教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:脂肪酶已广泛用于制备光学纯手性化合物的不对称反应中,但大多数酶催化拆分外消旋化合物的立体选择性不很理想。目前,改善脂肪酶立体选择性的研究主要从改造脂肪酶蛋白结构、优化体系的反应条件、改善反应过程以及对映选择性抑制等方面进行。通过微波照射也能在一定程度上改善脂肪酶催化反应的立体选择性。本文主要介绍了几种改善脂肪酶催化不对称反应的立体选择性的方法。

关键词:脂肪酶;立体选择性;不对称反应

中图分类号:Q814.1 文献标识码:A 文章编号:1009-606X(2002)06-0570-07

1 前言

生物转化因具有反应条件比较温和、产物比较单一、高选择性等优点,已广泛用于药物前体化合物的转化、生物催化不对称合成、光学活性化合物的拆分等领域。目前,已有部分手性化合物通过生物转化的方法进行工业生产。BASF 公司利用脂肪酶拆分外消旋醇,得到较高产率的光学纯对映体,并已达到每年上千吨的生产规模;DSM 公司利用大肠杆菌产青霉素酰基转移酶,水解青霉素 G/V,得到光学纯 6-氨基青霉烷酸(6-APA),其年产量也已达上千吨;Lonza 公司利用微生物细胞中的烟酸羟化酶转化烟酸,得到 6-羟基烟酸,产率为 65 g/L^[1]。

近年来随着酶技术研究的不断深入,利用酶的高度立体选择性在有机相中进行生物转化的研究越来越多,并已成为制备光学活性化合物的重要途径^[2-4]。由于脂肪酶可以在有机相中催化不对称酯化、转酯和水解等反应,因此脂肪酶已广泛用于制备具有光学活性的醇、脂肪酸及其酯、内酯等医药、农药中间体。

尽管利用脂肪酶催化不对称反应制备光学活性化合物有很多优点,但目前绝大多数脂肪酶催化拆分外消旋化合物的反应只具有部分的立体选择性($E < 10$),酶的催化活性和立体选择性不很理想。因此,需要在提高脂肪酶的立体选择性方面进行更加深入的研究,以提高酶促拆分外消旋体、制备光学纯化合物的效果。近几年,人们对反应体系中影响脂肪酶立体选择性的因素及改善脂肪酶立体选择性的方法进行了许多研究和尝试,并取得了一定的进展。

2 改变脂肪酶的酶蛋白结构或构象提高催化的立体选择性

2.1 固定化脂肪酶

在有机溶剂中使用固定化酶,可以调节和控制酶的活性与选择性。目前常用的固定化方法是把酶固定在不溶的聚合物载体或无机载体上,其原理是为蛋白分子与载体的互补表面提供多点的相互作用,从而把自然构象固定下来。但在大分子底物转化中,其聚合物载体的存在大大降低了酶

收稿日期:2002-04-05, 修回日期:2002-06-10

基金项目:教育部高等学校骨干教师资助计划项目资助课题(教科司[2000]65号)。

作者简介:聂尧(1977-),男,河北省唐山市人,硕士研究生,研究方向:酶工程;徐岩,责任作者。

的结合容量和反应能力。

交联酶晶体(CLECs)是新近发展的一种无载体酶固定化新方法^[5,6]。这种新型酶晶体催化剂既具有催化活性和选择性高、反应条件温和等特点,又具有均相化学催化剂的操作稳定性高、易回收利用等特点。其制备包括两个步骤:酶的分批结晶和晶体的化学交联。它们可以分别提高酶的立体选择性,以及稳定性和活性。对皱折假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase, CRL)进行分批结晶和化学交联后,得到的酶晶体作用于不同底物,其立体选择性明显高于粗酶,如表 1 所示。

表 1 脂肪酶交联酶晶体和粗酶的立体选择性的比较
Table 1 Comparison of enantioselectivities between CLECs and crude lipase

Substrate	<i>E</i> (CLECs)	<i>E</i> (crude)
Menthol	≥100	16
Ibuprofen	≥100	7.2
Hydroxyhexanoic acid	55	2

脂肪酶直接加入到有机溶剂中进行反应时,它们常聚集成团而不利于发挥催化作用。利用表面活性剂包被脂肪酶即为脂质包被酶(lipid-coating enzyme),处理后的脂肪酶形成了一个独特的催化活性构型,酶的活性和选择性都显著提高。Okahata 等^[7]用双十二烷基 *N*-D-葡萄糖基-L-谷氨酸和双十二烷基 *N*-D-葡萄糖基-D-谷氨酸对莓实假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas fragi* lipase, PFL)修饰后,该酶拆分消旋体(R, S)-1-苯乙醇的立体选择性大大提高,对(R)-对映体的活性可达 50~58 μmol/(L·s·mg),而对(S)-对映体的活性仅为 0.2 μmol/(L·s·mg)。

2.2 对脂肪酶进行化学修饰

在有机溶剂中,通过对脂肪酶进行化学修饰,改变其在反应体系中的酶蛋白构象,也能够改善脂肪酶对不同对映体的立体选择性。Wu 等^[8]对柱状假丝酵母脂肪酶(*Candida cylindracea* lipase, CCL)进行非共价修饰,显著提高了脂肪酶拆分混旋羧酸酯的立体选择性。用脱氧胆酸盐和有机溶剂(乙醚-乙醇, 1:1)处理 CCL 后,酶蛋白打开后重新折叠形成一种更加稳定的构象,脂肪酶比天然酶水解(±)-芳基丙酸酯和(±)-苯氧丙酸酯具有更好的立体选择性,*E* 值可从 4~10 提高到 100 以上。利用胆盐、有机溶剂和调节温度来提高酶的立体选择性也是对酶蛋白构象进行非共价修饰。

2.3 体外定向进化技术

酶的体外定向进化技术是通过人为创造条件,模拟自然进化机制(随机突变、重组和自然选择),在细胞体外改造酶基因,并定向选择出所需性质的突变酶。酶的体外定向进化不仅使酶演化出非天然特性,还能定向进化某一代谢途径,改善酶的稳定性、底物特异性和对映选择性等。Reetz 等^[9]通过体外定向进化技术改善脂肪酶的立体选择性,用以催化对硝基苯 2-乙基癸酸酯不对称水解。在研究中,利用错误倾向聚合酶链反应(epPCR)使由 933 对碱基组成的铜绿假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas aeruginosa* lipase, PAL)基因的 1~2 个碱基发生突变,并使变异基因在 *E. coli* 中扩大表达,最后在反应中根据立体选择性对突变型加以筛选。定向进化前,野生型菌株脂肪酶催化不对称水解反应得到(S)-对映体的 e.e.值只有 2%;定向进化后,第 1 代变异株脂肪酶催化反应得到产物(S)-对映体的 e.e.值达到 31%,至第 4 代变异株,产物 e.e.值可达到 81%,如表 2 所示。由此可见,通过体外定向进化改善脂肪酶立体选择性的效果是显而易见的。当然,要想通过这种方法获得立体选择性更好的脂肪酶,还需要对变异基因及变异酶蛋白结构进行更加深入的研究。

表 2 体外定向进化对脂肪酶立体选择性的影响

Table 2 Effects of *in vitro* directed evolution on the enantioselectivity of lipase

Generation	e.e. of product (%)	<i>E</i>
0 (wild-type)	2	1.00
1	31	2.10
2	57	4.40
3	75	9.40
4	81	11.3

2.4 生物印记技术

在生物分子识别理论的指导下,利用酶与配体的相互作用,诱导、改变酶分子的构象,制备具有结合特定配体能力的新型生物催化剂,是修饰、改造酶的一种新方法.利用生物印记方法可以调控酶的立体专一性和底物专一性. Sellergren 等^[10]曾利用生物印记的方法,设计合成了具有立体选择性的生物催化剂.他们首先根据酶的活性部位合成配体,这些配体通过共价键、氢键等形式与酶分子相连,除去配体后,即可得到印记酶.这种印记酶具有特定的对映选择性和催化活性.

2.5 蛋白质工程和抗体酶技术

利用蛋白质工程技术进行定点突变,是改变酶在有机介质中选择性的手段之一.但目前通过蛋白质工程技术成功构建高立体选择性的活性酶分子还比较有限,仅有少数报道利用此技术提高了酶的催化活性和稳定性.因此,还需对脂肪酶的活性中心结构及其调控基因进行更加深入的研究,以达到改善脂肪酶立体选择性的目的.

抗体酶是人工制造的酶类似物,该技术也已应用于非水酶学的研究中. Janda 等^[11]用脂肪酶催化水解反应的底物 α -甲基苯酯(R 或 S)的过渡态类似物诱导,制备了具有脂肪酶活性的抗体酶,该酶对外消旋底物呈明显的对映选择性.

3 通过优化反应体系提高脂肪酶催化反应的立体选择性

3.1 溶剂对有机相中脂肪酶立体选择性的影响

在有机介质中,通过改变溶剂的极性可以改变酶的立体选择性.溶剂极性能在一定程度上使酶的活性中心构象发生改变,直接影响外消旋化合物的两个对映体与酶活性中心的结合,从而影响酶的立体选择性. Carrea 等^[12]用洋葱伯克霍尔德氏菌脂肪酶催化反式索布瑞醇的拆分反应,发现不同极性的溶剂会显著影响酶的立体选择性,如表 3 所示.

表 3 不同极性的溶剂对脂肪酶立体选择性的影响

Table 3 Effects of solvent polarity on the enantioselectivity of lipase

Solvent	Water	Acetonitrile	Toluene	<i>iso</i> -propyl ether	Dioxane	<i>n</i> -propanol	Carbon tetrachloride
$\lg P$		-0.33	2.5	1.9	-1.1	0.28	3.0
<i>E</i>	17	82	120	152	164	181	502

高修功等^[13]曾利用脂肪酶在不同溶剂中催化辛酸与外消旋 2-辛醇不对称酯合成.研究中发现,酶在不同极性的有机溶剂中,其结构刚性是不同的,酶在低介电常数有机溶剂(如环己烷)中的刚性比在高介电常数溶剂(如二甲基甲酰胺)中高,即在限定范围内,低介电常数的溶剂更有利于使酶呈现出高立体选择性.

Yennawar 等^[14]在研究脂肪酶的立体选择性与溶剂极性关系时发现,酶在甲苯、环己烷等环状溶剂中的立体选择性高于非环状溶剂,如乙腈、己烷等.而 Parida 等^[15]在研究中还观察到另一种现象,溶剂对脂肪酶立体选择性的影响还因底物的不同而变化.当底物为 2-醇酸时,柱状假丝酵

母脂肪酶(*Candida cylindracea* lipase, CCL)的对映选择性随溶剂 $\lg P$ 值的增大而升高,当底物为 2-氯丙酸时,该酶的对映选择性随溶剂 $\lg P$ 值的增大而降低。

另外,溶剂还会影响产物的构型,使酶的立体选择性发生翻转。许建和等^[16]在反应中使用了由一种主溶剂(异辛烷)和一种助溶剂(甲苯)组成的混合溶剂系统,结果发现酶的立体选择性随甲苯含量的变化发生了逆转,产物比旋光度由异辛烷中的正值(S-型)变为甲苯中的负值(R-型),见表 4。

表 4 混合溶剂系统中甲苯含量对酮洛芬酶促酯化立体选择性的影响

Table 4 Effects of the content of toluene in mixed solvent system on the enantioselectivity of lipase-catalyzed esterification of (R,S)-Ketoprofen

Content of toluene (%)	0	2	10	50	100
$[\alpha]_D$ of product	+41.6	+44.2	+44.2	+9.5	-20.2

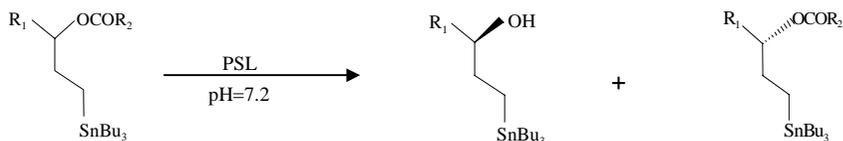
大量结果表明,通过改变溶剂可以调节和控制酶的立体选择性、改变酶的动力学特性和稳定性等酶学性质。但溶剂对酶的立体选择性的影响规律和机制尚不十分清楚,还需进一步研究,包括从机理上解释某些特定溶剂对脂肪酶选择性的影响,以及基于机理的预测和实验验证,从而更好地控制酶的选择性并为酶促有机合成提供理论指导。

3.2 反应体系中水分含量对脂肪酶立体选择性的影响

Gerlach^[17]在利用猪胰脂肪酶催化外消旋 2-辛醇对映选择性酯化时发现,反应体系中含水量的增加,会导致酶反应速率和立体选择性的降低。若使用真空干燥的酶,并在反应体系中加入分子筛除水,可提高反应的立体选择性。这是因为当体系中水份含量较高时,酶构象过于柔软和伸展,使其选择性下降。但若将酶完全干燥除水,酶分子内部的相互作用会将酶分子束缚,使其处于闭锁状态,酶也就不具有催化活性和选择性了。另外,在限定范围内增加水份含量,可增加有机溶剂中原来刚性很强的酶构象的柔软性和移动性,从而可以提高酶的立体选择性。Kitaguchi 等^[18]在研究中发现,当加水量在一个有限的范围内(0%~0.125%)增加时,酶的催化活性和对映选择性都有所提高。

3.3 底物结构对脂肪酶立体选择性的影响

在研究南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* lipase B, CALB)对仲醇的选择性时发现,如果在手性碳上存在 2 个大小不同的基团时,脂肪酶对其立体选择性较高。在脂肪酶的活性中心区域,有一种类似于“口袋”的结构,这个“口袋”适用于接受反应较快的对映体上的较小基团,由“口袋”结构的大小可以推测出具有哪种基团的底物更有利于反应的进行,而使脂肪酶表现出更高的立体选择性^[19]。因此,通过选择不同的底物可以提高脂肪酶催化不对称反应的立体选择性。



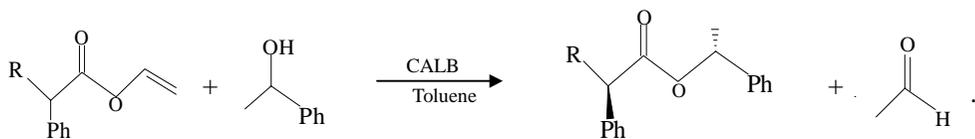
在利用假单胞菌脂肪酶催化上式所示的反应中,通过改变底物侧链烷基的结构,可极大地影响拆分的结果,见表 5。

表 5 不同结构的底物对脂肪酶催化不对称反应的 E 值的影响

Table 5 Effects of substrate structure on E value of lipase-catalyzed asymmetric reaction

R_1	CH_3	$n\text{-C}_5\text{H}_{11}$	$n\text{-C}_5\text{H}_{11}$	$n\text{-C}_5\text{H}_{11}$
R_2	CH_3	CH_3	CH_2SMe	CH_2Oph
E	>460	8	>172	>152

Yang 等^[20]在利用南极假丝酵母脂肪酶 CALB 催化苯基乙醇转酯反应生成相应的光学纯酯的研究中发现,在所有反应中,CALB 对于(R, S)-1-苯基乙醇表现出很高的对映选择性($E > 100$),得到(S)-苯基乙醇和产物中(R)-醇酯的对映过量值分别达到 $>94\%$ 和 $>99\%$,而对于羧酸乙烯基酯的对映选择性较低,其 E 值只有 10 左右.其转酯反应的途径如下:



另外,在利用脂肪酶催化不对称酯化反应中,选择不同的酰化剂,反应的立体选择性也不同. Wu 等^[21]研究了利用脂肪酶催化 DL-薄荷醇的不对称酯化,发现选择不同的酸酐,如醋酸酐、丙酸酐、丁酸酐,脂肪酶催化反应的立体选择性也不同. 杨红^[22]在研究脂肪酶催化 2-辛醇和不同链长脂肪酸不对称酯合成反应时发现,对于不同链长的脂肪酸,脂肪酶具有不同的底物专一性和立体选择性. 其中假丝酵母脂肪酶(*Candida Sp* lipase, CSL)和假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas Sp* lipase, PSL)的立体选择性随脂肪酸碳链的增长而增加,碳链长度为 8C(辛酸)或 10C(癸酸)时达到最高,然后又逐渐下降. 这与脂肪酶活性中心的结构及其对不同大小的基团的选择性有关.

4 通过改善反应过程提高脂肪酶的立体选择性

4.1 利用两步法反应提高酶促拆分的选择性

Straathof 等^[23]用两步酯化的方法来提高脂肪酶动力学拆分对映体的立体选择性. 研究通过顺序酶法拆分由缩水甘油丁酸酯制备缩水甘油乙酸酯. 首先,利用猪胰脂肪酶(*Porcine pancreas* lipase, PPL)催化脱水丁酮不对称转酯形成(R)-缩水甘油. 然后,脂肪酶催化(R)-缩水甘油转酯形成缩水甘油乙酸酯. 通过两步法反应,缩水甘油乙酸酯的对映过量值由单一拆分反应的 65%升至 89%.

4.2 利用脂肪酶两次拆分法提高酶促拆分的效果

两次拆分法可优化部分拆分反应的拆分效果. 在对消旋底物的第一次拆分反应进行到转化率约 50%时,分离回收底物和产物. 取以上光学活性的底物或产物作为第二次拆分的底物,并选择适当的酶系统,进一步提高其中原比例较高的对映体的光学纯度. 在实际操作中,为了避免低化学产率和重复操作,对某种对映体的拆分次数通常不大于两次. 两次拆分法研究的重点是如何在第一次和第二次拆分反应中选择适当的酶系统、底物的形式和终止反应时的转化率等. Druexhammer 等^[24]在合成手性咪喃衍生物的过程中,首先试用多种酶催化拆分外消旋体,但产物 e.e. 值较低,拆分反应的 E 值仅为 5. 改用两次拆分法后,(R)-对映体的 e.e. 值达到 94%.

5 改善脂肪酶立体选择性的其它方法

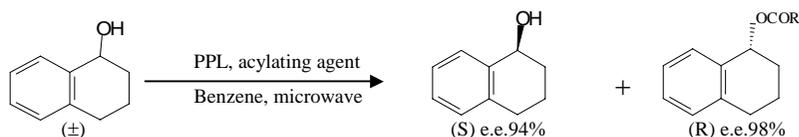
5.1 通过对映选择性抑制提高脂肪酶催化反应的立体选择性

在水相和非水相中用生物催化剂进行对映选择性拆分已经日益成为一种非常重要的拆分对映体的方法. DextroAmethorphan (DM)和 levomethorphan (LM)可以作为柱状假丝酵母脂肪酶(*Candida cylindracea* lipase, CCL)催化水解(±)-芳基丙酸酯和(±)-芳氧基丙酸酯的有效对映选择性抑制剂. Guo 等^[25]在研究中发现,当添加 DM 或 LM 时,脂肪酶拆分(±)-甲基 2-(2,4-二氯苯氧基)丙酸酯(DCPP)的立体选择性可以提高 20 倍. 在反应过程中,当酶与抑制剂结合后,会加强酶催化不同对

映体反应的动力学差异,从而有利于对两种对映体进行动力学拆分。另外,在酶与底物结合后,抑制剂还可以同该结合体发生作用,同样会强化两种对映体在反应动力学上的差别,以利于拆分。人们曾试图推导 DM 对映选择性抑制的机理,但由于不溶底物形成油-水界面,脂肪酶结合在界面上,依靠渗透作用酶与底物发生作用,很难确定反应的动力学参数 V_{\max} 和 K_m 。因此,在抑制机理方面,还需要进行更加深入的研究。

5.2 通过微波照射提高脂肪酶催化反应的选择性

在某些酶催化转酯反应中,微波照射是一种较为有效的提高反应速率和立体选择性的方法。如猪胰脂肪酶(*Porcine pancreas lipase*, PPL)催化外消旋萘酚的酰化反应,经微波照射可使反应的立体选择性提高 3~9 倍,反应速率增加 4~6 倍^[26],反应式如下:



6 结 语

在改善脂肪酶立体选择性的过程中,不仅可以通过改变有机溶剂和反应体系等溶剂工程的手段调节和控制酶的催化活性、选择性和稳定性,而且可以通过固定化和化学修饰方法对酶进行改造以提高其选择性。目前,在对固定化,化学修饰等传统方法进行研究的基础上,随着分子生物技术、化学修饰技术和介质工程等领域的研究的不断深入和发展,一些正在被开发和研究的方法,如体外定向进化、生物印迹、蛋白质工程等也已用于改善脂肪酶立体选择性的研究中。

虽然已有较多方法用于改善脂肪酶的立体选择性,但有机溶剂中酶的结构与功能的关系,反应体系中水份含量、有机溶剂的种类和组成以及底物结构对脂肪酶立体选择性的影响机理尚不十分清楚。因此,对改善脂肪酶立体选择性的机理的研究,以及在此基础上开发切实有效的改善方法,进一步调节和控制酶的催化活性和选择性将是人们今后研究的重点。

参考文献:

- [1] Schmid A, Dordick J S, Hauer B et al. *Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow* [J]. *Nature*, 2001, 409(1): 258-268.
- [2] Cambou B, Klivanov A M. Preparation of Optically Active Esters and Alcohols Using Esterase-catalyzed Stereospecific Transesterification in Organic Media [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106(9): 2687-2692.
- [3] Bevinakatti H S, Banerji A A. Practical Chemoenzymatic Synthesis of Both Enantiomers of Propranolol [J]. *J. Org. Chem.*, 1991, 56(18): 5372-5375.
- [4] Bosetti A, Bianchi D, Cesti P, et al. Enzymatic Resolution of 1,2-diols: Comparison Between Hydrolysis and Transesterification Reactions [J]. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1992, (18): 2395-2398.
- [5] Khalaf N, Govardhan C P, Lalonde J J, et al. Cross-linked Enzyme Crystals as Highly Active Catalysts in Organic Solvents [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118(23): 5494-5495.
- [6] Clair N, Navia M A. Cross-linked Enzyme Crystals as Robust Biocatalysts [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114(18): 7314-7316.
- [7] Okahata Y, Fujimoto Y, Ijiro K. A Lipid-coated Lipase as an Enantioselective Ester Synthesis Catalyst in Homogeneous Organic Solvents [J]. *J. Org. Chem.*, 1995, 60(7): 2244-2250.
- [8] Wu S H, Guo Z W, Sih C J. Enhancing the Enantioselectivity of *Candida* Lipase Catalyzed Ester Hydrolysis via Noncovalent Enzyme Modification [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112(5): 1990-1995.
- [9] Reetz M T, Zonta A, Schimossek K, et al. Creation of Enantioselective Biocatalysts for Organic Chemistry by in Vitro Evolution [J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1997, 36(24): 2830-2832.

- [10] Sellergren B, Shea K J. Enantioselective Ester Hydrolysis Catalyzed by Imprinted Polymers [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1994, 5(8): 1403–1406.
- [11] Janda K D, Benkovic S J, Lerner R A. Catalytic Antibodies with Lipase Activity and R or S Substrate Selectivity [J]. *Science*, 1989, 244(4903): 437–440.
- [12] Carrea G, Ottolina G, Riva S. Role of Solvents in the Control of Enzyme Selectivity in Organic Media [J]. *Trends in Biotechnology*, 1995, 13(2): 63–70.
- [13] 高修功, 曹淑桂, 章克昌. 脂肪酶活性和选择性受溶剂不同物化参数控制 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 1997, 29(4): 337–341.
- [14] Yennawar H P, Yennawar N H, Farber G K. A Structural Explanation for Enzyme Memory in Nonaqueous Solvents [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117(2): 577–585.
- [15] Parida S, Dordick J S. Substrate Structure and Solvent Hydrophobicity Control Lipase Catalysis and Enantioselectivity in Organic Media [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113(6): 2253–2259.
- [16] 许建和, 刘军民, 许学书, 等. 混合溶剂系统对脂肪酶酯化活性和选择性的影响 [J]. *生物工程学报*, 1999, 15(2): 267–269.
- [17] Gerlach D, Schreier P. Esterification in Organic Media for Preparation of Optically Active Secondary Alcohols: Effects of Reaction Conditions [J]. *Biocatalysis*, 1989, 2(4): 257–263.
- [18] Kitaguchi H, Itoh I, Ono M. Effects of Water and Water-mimicking Solvents on Lipase-catalyzed Esterification in an Apolar Solvent [J]. *Chem. Lett.*, 1990, (7): 1203–1206.
- [19] Uppenberg J, Obrner N, Norin M, et al. Crystallographic and Molecular-modeling Studies of Lipase B from *Candida Antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols [J]. *Biochemistry*, 1995, 34(51): 16838–16851.
- [20] Yang H, Henke E, Bornscheuer UT. Highly Efficient Double Enantioselection by Lipase-catalyzed Transesterification of (R, S)-carboxylic Acid Vinyl Esters with (R, S)-1-phenylethanol [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, 10: 957–960.
- [21] Wu W H, Akoh C, Phillips R S. Lipase-catalyzed Stereoselective Esterification of DL-menthol in Organic Solvents using Acid Anhydrides as Acylating Agents [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18(7): 536–539.
- [22] 杨红. 有机相中脂肪酶催化拆分外消旋化合物反应及其机制的研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 1995. 40–43.
- [23] Straathof A J J, Rakels J L L, Heijnen J J, et al. Improvement of Lipase-catalyzed Kinetic Resolution by Tandem Transesterification [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17(7): 623–628.
- [24] Drueckhammer D G, Barbas C F, Nozaki K, et al. Chemoenzymic Synthesis of chiral Furan Derivatives: Useful Building Blocks for Optically Active Structures [J]. *J. Org. Chem.*, 1988, 53(8): 1607–1611.
- [25] Guo Z W, Sih C J. Enantioselective Inhibition: A Strategy for Improving the Enantioselectivity of Biocatalytic Systems [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111(17): 6836–6841.
- [26] Lin G, Lin W Y. Microwave-promoted Lipase-catalyzed Reactions [J]. *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39(24): 4333–4336.

Progress in Improving the Asymmetric Enantioselectivity of Lipase for Catalyzing Asymmetric Reaction

NIE Yao, XU Yan, WANG Dong

(Key Lab. Ind. Biotech., Ministry of Edu., School of Biotech., Southern Yangtze Univ., Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: Lipase has been extensively used in asymmetric reaction for producing optically pure compounds. Focused on improving the enantioselectivity of lipase for catalyzing asymmetric reaction, the recent researches have been summarized in this article, including reformation of lipase structure, reaction condition optimization, improvement of asymmetric reaction process and enantioselective inhibition. Microwave irradiation can also be used to enhance the enantioselectivity of lipase in some level. Some traditional and new approaches, such as immobilization of enzyme, chemical modification, in vitro directed evolution, bio-imprinting, and optimization of reaction conditions were introduced.

Key words: lipase; enantioselectivity; asymmetric reaction