

# 盐对酶促对羟基苯甘氨酸酯不对称水解的影响

张媛媛<sup>1</sup>, 范晓丹<sup>2</sup>, 宗敏华<sup>2</sup>, 吴虹<sup>2</sup>

(1. 广东轻工职业技术学院食品与生物工程系, 广东广州 510300)

(2. 华南理工大学应用生物催化研究室, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文探讨了以盐为添加剂时, 盐的种类、酶的种类及底物结构对酶促外消旋对羟基苯甘氨酸酯不对称水解的影响。结果表明, 在所研究的 17 种盐中, 盐酸盐及草酸盐对 Novozym 435 催化对羟基苯甘氨酸甲酯水解无影响, 磷酸钾仅可加快反应速度, 碳酸氢盐、铵盐磷酸钠、醋酸钠均既能增加反应速度又能提高对映体选择性; 其中碳酸氢铵为最适添加剂, 可使产物对映体选择率 E 值达 78。添加碳酸氢铵可分别提高蛋白酶 Alcalase 催化该反应的反应初速度及 E 值 1.30 倍和 3 倍; 却使蛋白酶 Papain 催化同一反应的反应初速度和 E 值下降 35% 及 60%。以碳酸氢铵为添加剂, Novozym 435 催化对羟基苯甘氨酸乙酯和丙酯的 E 值可由 5、23 分别提高至 25、28。

**关键词:** 盐; 不对称水解; 动力学拆分; 脂肪酶; 对羟基苯甘氨酸酯

文章编号: 1673-9078(2012)8-898-902

## Effect of Salt Additives on Enzymatic Enantioselective Hydrolysis of Racemic *p*-Hydroxyphenylglycine Esters

ZHANG Yuan-yuan<sup>1</sup>, FAN Xiao-dan<sup>2</sup>, ZONG Min-hua<sup>2</sup>, WU Hong<sup>2</sup>

(1. Department of Food and Bioengineering, Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China)

(2. Laboratory of Applied Biocatalysis, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The effects of salt additives, enzymes and substrate structure on enzymatic hydrolysis of racemic *p*-hydroxyphenylglycine ester were examined systematically, when the salt was used as additive. Among seventeen sorts of salts tested, chloride salts and oxalates have slight effect on Novozym 435-catalyzed hydrolysis of racemic *p*-hydroxyphenylglycine methyl ester, while potassium phosphate only increased the reaction rate but did not influence enzymatic enantioselectivity. Bicarbonate salts, ammonium salts, sodium phosphate and sodium acetate all could not only markedly accelerate the reaction but also improve its enantioselectivity in comparison with the reaction without adding salts, of which ammonium bicarbonate was showed to be the best additive for the reaction (E value of 78 was achieved). When Alcalase was used as catalyst, the initial reaction rate and E value of *p*-hydroxyphenylglycine methyl ester hydrolysis in *tert*-butanol were boosted by the addition of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  with 30% and nearly 3-fold, respectively, as compared to the result without the salt addition into the reaction system. However, interestingly,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  inhibited papain-catalyzed hydrolysis of racemic *p*-hydroxyphenylglycine methyl ester to some extent, decreasing the initial reaction rate with 35% and E value with 60%. For the Novozym 435-catalyzed hydrolysis of racemic *p*-hydroxyphenylglycine ethyl ester and butyl ester, the E value of both substrates were markedly improved by adding  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in the same reaction system from 5 to 25 and from 23 to 28, respectively.

**Key words:** salt; enantioselective hydrolysis; kinetic resolution; lipase; *p*-hydroxyphenylglycine ester

近年来, 随着非水相酶学的发展, 外消旋体动力学拆分已成为制备对映体纯药物的有效途径之一<sup>[1,2]</sup>。但是, 如何进一步提高非水介质中酶促拆分反应的反应速度及对映体选择性则是利用非水相酶催化制备对映体纯药物的难点。

一些研究者发现, 于反应体系中添加一些有机碱

如三乙胺, 可极大提高有机介质中脂肪酶催化的转酯反应的对映体选择性<sup>[3-5]</sup>。但是相对于此发现, 以铵盐或其他盐作为添加剂来提高有机介质中酶促水解性能的报道却很少, 仅有几篇相关的报道<sup>[6,7]</sup>。即使在这些报道中, 应用的添加剂都是对映体纯的有机铵盐。而我们在探索利用脂肪酶 Novozym 435 催化外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解反应制备对映体纯 D-对羟基苯甘氨酸时, 发现在反应体系中添加一些无机盐该反应可有效进行<sup>[8]</sup>。直接于反应介质中添加一些无机盐,

收稿日期: 2012-04-26

基金项目: 广东省自然科学基金(020839)

作者简介: 张媛媛(1979-), 女, 硕士, 讲师, 从事非水相酶催化研究

很可能是提高非水介质中水解反应的酶促速度和对映体选择性的一种新手段。这一方法,将减少以往有机介质酶促水解报道中对于对映体纯有机铵盐,这一昂贵手性纯试剂的依赖,降低了通过有机介质不对称水解反应制备对映体纯药物的生产成本,大大增加其工业化生产的可能,具有良好的应用前景。为进一步研究该方法的可能性,本文以叔丁醇中外消旋对羟基苯甘氨酸酯的酶促水解为反应模型,系统研究了以盐为添加剂时,盐的种类、酶的种类及底物结构对该反应的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

Novozym 435 和蛋白酶 Alcalase 由丹麦 Novo 公司赠送;蛋白酶 Papain、对羟基苯甘氨酸甲酯、对羟基苯甘氨酸和氨基甲酸铵购自美国 Sigma 和 Aldrich 公司;高氯酸,色谱纯,购自天津市科密欧化学试剂开发中心;外消旋对羟基苯甘氨酸由河北辛集思泰达石化有限公司赠送;其它化学试剂均为市售分析纯。

Waters 600-996PAD 高效液相色谱仪,采用 Crownpak CR(+)手性柱(4 mm×150 mm,美国 Daicel Chemical Industries 公司)和 996PAD 检测器,检测波长为 228 nm,流动相为 0.011 mol/L 的高氯酸(pH 2.0),流速为 0.8 mL/min,进样量 20 μL。对羟基苯甘氨酸甲酯底物的 D 型和 L 型两种对映体的保留时间分别为 5.23 min 和 25.54 min;生成的产物对羟基苯甘氨酸的 D 型和 L 型两对映体的保留时间分别为 2.78 min 和 9.32 min。由于色谱操作条件稳定且有自动控制进样装置,本研究采用外标法。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 盐对酶促外消旋对羟基苯甘氨酸酯不对称水解的影响

在 50 mL 具塞三角瓶中分别装入含有 20 mmol/L 外消旋对羟基苯甘氨酸酯的叔丁醇 5 mL, 20 μL 蒸馏水和一定量的铵盐,置于恒温水浴振荡器内振荡(130 r/min, 30 °C),然后加入 45 U 的酶启动反应或不加酶开始非酶反应。定时取样 100 μL 供高效液相色谱分析。

#### 1.2.2 转化率、对映体过剩值、对映体选择率的计算

根据反应后底物对羟基苯甘氨酸酯的减少量与反应前底物的量的比值来计算转化率。根据反应初始阶段单位时间内产物的增加量来计算初始反应速度。产物的对映体过剩值 eep 由公式  $eep = (A - B) / (A + B) \times 100$  计算, A 和 B 分别表示 D-对羟基苯甘氨酸和 L-对羟基苯甘氨酸的浓度。产物的对映体选择率 E 由公

式  $E = \ln[1 - c(1 + eep)] / \ln[1 - c(1 - eep)]$  计算,式中 c 为转化率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 盐种类对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯水解的影响

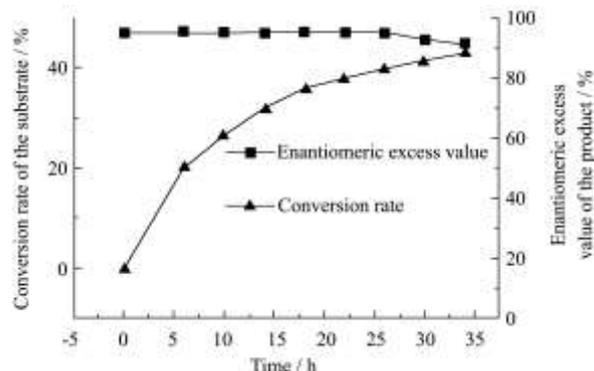


图1 以  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  为添加剂叔丁醇中外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解反应的时间曲线

Fig.1 Time courses of the hydrolysis of racemic p-hydroxyphenylglycine methyl ester in tert-butanol with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  as additive

在叔丁醇反应介质中添加  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 脂肪酶 Novozym 435 能高效地催化对羟基苯甘氨酸甲酯的不对称水解,反应初速度达 0.49 mmol/(L·h),具体反应的时间进程见图 1。由图 1 可知,反应时间少于 14 h 时,底物转化率上升迅速;反应时间超过 20 h 时,底物转化率随反应的进行上升缓慢,这可能一方面是因为反应趋于平衡,另一方面是反应体系中存在产物抑制;反应前期, eep 基本保持不变(约 95%),但超过 26 h 时,产物 eep 开始明显下降,这表明该反应超过 26 h 时 Novozym 435 对该反应的对映体选择性开始下降。综合考虑底物转化率和产物 eep,反应时间选择为 26 h。进一步考察碳酸氢铵作用时发现,在不添加碳酸氢铵的条件下,无论酶是否存在,水解反应均不能进行。而只添加  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  不添加酶时,也未见底物进行任何转化。但同时添加酶与  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  时,水解反应可有效进行,反应 26 h,底物转化率和 eep 分别达到 39.8% 和 95.2%,产物的对映体选择率 E 为 78,这说明是  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  激活了脂肪酶 Novozym435,使其展现出较高的催化活性及对映体选择性。

有研究表明<sup>[9-11]</sup>,酶冻干前,添加盐为冻干保护剂可显著提高  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶、青霉素酰化酶等酶的催化活性。在反应体系中,尽管盐的添加方式与上述报道不同,但作用机理可能相似。为此,我们尝试了向反应体系中直接添加酶冻干中常用盐,以研究其它盐对有机介质中对羟基苯甘氨酸甲酯水解的影响。结果发现,在所研究的 9 种盐中,6 种盐(KCl、NaCl、

LiCl、MgCl<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) 对该反应没有影响。NaAC、Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 均能加快该水解反应(见表 1), 酶促反应初速度(V<sub>0</sub>)分别可达 0.43 mmol/(L·h)、0.51 mmol/(L·h)、1.03 mmol/(L·h)。其中NaAC、Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 同时也能增加该反应的选择性, 反应 50 h, eep 也分别可达 84.1%和 71.0%。而 K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 对对映体选择性的影

响甚微。后续研究发现, NaAC、Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 的不同浓度对该反应的对映体选择性影响较小(数据略)。至此, 在所研究的 10 种盐中, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、NaAC、Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 对酶催化反应影响较大, 而其中影响最显著的是 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>。

表 1 不同盐对叔丁醇中外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解反应的影响

Table 1 Effect of different salts on the hydrolysis of racemic p-hydroxyphenylglycine methyl ester in tert-butanol

Salt	Concentration/(mmol/L)	Novozym435/U	V <sub>0</sub> /[mmol/(L·h)]	Conversion/%	eep/%	E
None	0	0	0	0	0	
None	0	45	0	0	0	
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	20	0	0	0	0	
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	20	45	0.49	39.8	95.2	78
NaAC	120	45	0.43	33.5	83.5	17
NaAC	120	0	0	0	0	
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	120	45	0.48	47.2	72.3	12
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	120	0	0.01	4.7	0	1
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	120	45	0.86	76.1	1.7	1
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	120	0	0.54	52.6	0	1

2.2 碳酸氢盐和铵盐对酶促对羟基苯甘氨酸甲酯水解的影响

表 2 不同碳酸氢盐和铵盐对叔丁醇中外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解反应的影响

Table 2 Effect of different bicarbonate salts and ammonium salts on the hydrolysis of racemic p-hydroxyphenylglycine methyl ester in tert-butanol

Salt	V <sub>0</sub> / [mmol/(L·h)]	Conversion / %	eep / %	E
KHCO <sub>3</sub>	0.42	28.3	91.7	33
NaHCO <sub>3</sub>	0.37	38.0	90.5	35
氨基甲酸铵	0.91	41.3	89.2	33
碳酸铵	0.99	44.4	89.7	39
醋酸铵	0.31	25.1	88.6	22
醋酸铵/三乙铵	0.34	33.9	85.5	13
氯化铵/三乙铵	0.32	25.4	87.3	20

为探索碳酸氢铵能促进对羟基苯甘氨酸甲酯的不对称水解反应的有效成份, 研究了 20 mmol/L 的另外两种碳酸氢盐 (NaHCO<sub>3</sub>、KHCO<sub>3</sub>) 和其它五种铵盐或铵盐的组合[氨基甲酸铵、碳酸铵、醋酸铵、醋酸铵/三乙铵(摩尔比为 1:1)、氯化铵/三乙铵(摩尔比为 1:1)]对 Novozym 435 催化对羟基苯甘氨酸甲酯水解的影响。由表 2 可知, 反应 26 h, 反应体系中添加 NaHCO<sub>3</sub> 或 KHCO<sub>3</sub> 均可促进对羟基苯甘氨酸甲酯的不对称水解, 反应初速度(V<sub>0</sub>)和底物转化率都大于 0.37 mmol/(L·h)和 28%, eep 也均在 90% 以上, 这说明 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

不仅能加速水解反应的进行同样能提高对映体选择性。在反应体系中添加各种铵盐的组合, 不对称水解反应也都能有效进行并且 eep 也在 85.5%~89.7% 之间。这说明 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>或 NH<sub>3</sub> 对提高酶反应活性和对映体选择性同样具有重要的作用。

2.3 盐酶激活作用机理的探讨

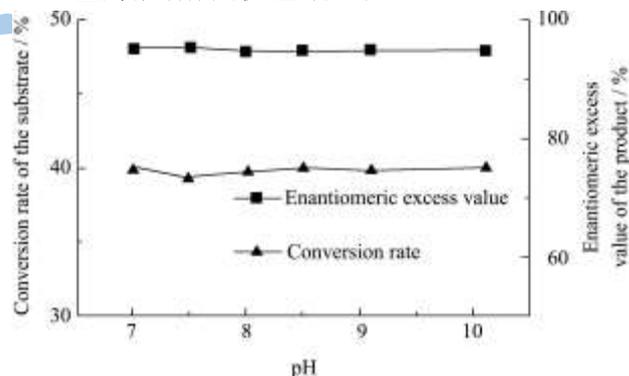


图 2 缓冲液 pH 值对以 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 为添加剂酶促外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解反应的影响

Fig.2 Effect of buffer pH on enzymatic hydrolysis of racemic p-hydroxyphenylglycine methyl ester with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> as additive

在本研究范围内, 能有效促进叔丁醇介质中外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解的盐有: 碳酸氢盐 (碳酸氢铵、碳酸氢钠、碳酸氢钾)、铵盐 (氨基甲酸铵, 碳酸铵, 醋酸铵, 醋酸铵/三乙铵, 氯化铵/三乙铵)、磷酸钠、醋酸钠。这些盐的激活作用原理可能来自两方面。首先, 这些盐都是碱性盐, 可能影响了微

水介质的 pH 值, 进而改变了酶的电离状态, 从而提高了酶活性及选择性。此外, 碱性物质可与产物对羟基苯甘氨酸形成离子对, 能加速底物的转化。Parker 等<sup>[3,12]</sup>就证实了碱可将酶分子表面的酸移除而有助于其催化能力的恢复。因此, 尝试用不同 pH 值的 Tris-HCl 缓冲液代替蒸馏水, 来验证  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  对酶促外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解反应 pH 的影响。由图 2 可见, 无论微水环境是蒸馏水还是 pH 值 7.0~10.1 的缓冲液, 酶促对羟基苯甘氨酸甲酯水解反应的反应初速度和对映体选择性都极为相似。这说明  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  的存在的确影响了反应体系及酶分子微环境的 pH。所用缓冲液的缓冲能力较弱, 不足以消除  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  对反应体系 pH 值的影响。

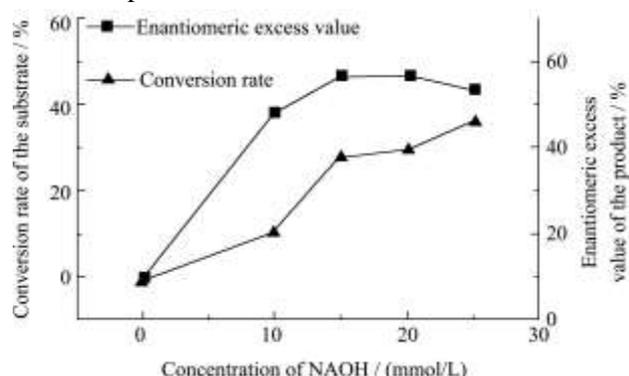


图3 NaOH浓度对酶促外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解反应的影响

Fig.3 Effect of concentration of NaOH on enzymatic hydrolysis of racemic p-hydroxyphenylglycine methyl ester

实验还考察了不同浓度 NaOH 对酶促外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解的影响。由图 3 可知, 反应体系中添加 NaOH 对底物的水解也有一定的促进作用, 底物转化率随 NaOH 浓度的增大而增大, 但所得对映体选择性均不高, eep 都低于 50%。这说明  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  的添加对有机介质中酶促对羟基苯甘氨酸甲酯水解反应所产生的影响, 是添加 NaOH (碱) 所不能取代的。

另一方面,  $\text{NaAC}$ 、 $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_3\text{PO}_4$  这三种盐对酶的调节作用很可能与它们的盐离子拥有较高的 Jones-Dole B 系数有关。Jones-Dole B 系数表征某种添加剂增加或降低水黏度的程度。Ru 等<sup>[13]</sup>发现在有机介质中, Jones-Dole B 系数越高的盐离子越能在和酶冻干后增加酶的水含量及提高酶活。当阳离子相同时(同为  $\text{Na}^+$ 时),  $\text{PO}_4^{3-}$ 对酶的反应速度的影响大于  $\text{AC}^-$ ,  $\text{AC}^-$ 的作用大于  $\text{Cl}^-$ , 这符合 Jones-Dole B 系数规律 ( $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{AC}^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 的 Jones-Dole B 系数分别为+0.590、+0.250、-0.007); 当阴离子相同时(同为  $\text{PO}_4^{3-}$ 时),  $\text{K}^+$ 的作用效果高于  $\text{Na}^+$ , 这虽与 Jones-Dole B 系数规律不符, 但有趣的是现有研究都表明钾盐对酶的激活

均优于钠盐, 这表明这些盐对酶的作用机理很可能与盐对冻干酶的激活机制相同, 虽然其确切的作用机理尚待阐明。

#### 2.4 碳酸氢铵对酶促反应中酶种类的影响

表3 碳酸氢铵对叔丁醇中 Alcalase 和 Papain 催化外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解的影响

Table 3 Effect of ammonium bicarbonate on the hydrolysis of racemic p-hydroxyphenylglycine methyl ester catalyzed by papain or alcalase in tert-butanol

Enzyme	$\text{NH}_4\text{HCO}_3$ / (mmol/L)	$V_0$ / [mmol/(L·h)]	Conversion / %	eep / %	E
Papain	20	0.17	10.5	38.8	2
Papain	0	0.26	19.8	61.3	5
Alcalase	20	0.73	68.4	45.3	11
Alcalase	0	0.56	41.3	50.6	4

在所研究的盐中, 碳酸氢铵为最适的添加剂。为确定  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  在非水介质中对酶的激活作用并不仅仅局限于 Novozym 435, 我们继续探讨了添加  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  对其它酶的影响。在尝试的其他 6 种脂肪酶 (Lipozyme RMIM、Lipozyme TLIM、Lipozyme IM、Lipase-OF、Lipase MY、CRL) 和 4 种蛋白酶 (Alcalase、Neutrase、Protamex、Papain) 中, 仅有 2 种蛋白酶 (Alcalase 和 Papain) 可催化对羟基苯甘氨酸甲酯水解。由表 3 可见, 反应 26 h 时, 当 Alcalase 为催化剂时, 添加  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  可分别使反应初速度及 E 值提高 30% 及 3 倍。但当 Papain 为催化剂时,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  的添加却使对羟基苯甘氨酸甲酯水解的反应初速度下降 35%, 对映体选择比 E 值也由 5 降为 2。可见, 添加  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  不仅对脂肪酶催化外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解有促进作用, 对蛋白酶催化该底物的水解反应也有影响, 但其作用效果因酶种类的不同而有差异。

#### 2.5 碳酸氢铵对酶促反应中底物种类的影响

表 4 展示了碳酸氢铵对脂肪酶 Novozym435 催化对羟基苯甘氨酸乙酯、对羟基苯甘氨酸丙酯水解的影响。由表 4 可知, 在相同反应条件下,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  可提高对羟基苯甘氨酸乙酯和对羟基苯甘氨酸丙酯水解的转化率 (乙酯的转化率从 7.9% 提高到 33.2%, 丙酯转化率从 4.8% 提高到 12.1%) 并使对羟基苯甘氨酸乙酯水解反应的 E 值由 5 提高到 25, 同样也使对羟基苯甘氨酸丙酯水解反应的 E 值由 23 增加到 28。因此, 碳酸氢铵对酶促对羟基苯甘氨酸乙酯及丙酯的水解均有积极的影响, 但对对羟基苯甘氨酸丙酯水解的激活作用要弱于对羟基苯甘氨酸乙酯, 这可能由丙酯较大的空间位阻引起的。太大的空间位阻可能会抑制酶催化, 从而削弱了  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  对酶的激活作用。

表 4 碳酸氢铵对叔丁醇中 Novozym 435 催化其它酯水解的影响

**Table 4 Effect of ammonium bicarbonate on Novozym 435-catalyzed hydrolysis of the other racemic *p*-hydroxyphenylglycine esters in tert-butanol**

Substrate	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> / (mmol/L)	V <sub>0</sub> / (mmol/L·h)	Conversion / %	ee <sub>p</sub> / %	E
<i>p</i> -hydroxyphenyl glycine ethyl ester	20	0.36	33.2	88.5	25
<i>p</i> -hydroxyphenyl glycine ethyl ester	0	0.10	7.9	67.5	5
<i>p</i> -hydroxyphenyl glycine butyl ester	20	0.15	12.1	92.2	28
<i>p</i> -hydroxyphenyl glycine butyl ester	0	0.02	4.8	91.3	23

### 3 结论

3.1 盐对酶促外消旋对羟基苯甘氨酸酯水解的反应的影响因盐的种类、酶的种类及底物结构的不同而有明显差异。在所研究的 17 种盐中，碳酸氢盐、铵盐、磷酸钠、醋酸钠均可提高 Novozym 435 催化外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯不对称水解的反应速度和对映体选择性，磷酸钾只可加快反应速度，而盐酸盐及草酸盐对该反应无影响。其中添加碳酸氢铵影响最为显著，产物对映体选择率 E 可达 78。添加 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，可提高蛋白酶 Alcalase 催化外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解的反应初速度 1.30 倍，使其对映体选择比 E 值提高近 3 倍，却对蛋白酶 Papain 催化同一反应有一定抑制作用，使反应初速度下降 35%，对映体选择比 E 值由 5 降为 2。添加 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，可加快 Novozym 435 催化外消旋对羟基苯甘氨酸乙酯和丙酯水解反应的速度，并使对羟基苯甘氨酸乙酯水解反应的 E 值由 5 提高到 25，对羟基苯甘氨酸丙酯水解反应的 E 值由 23 增大到 28。

3.2 直接向反应体系中添加一些简单盐，这一方法将为提高有机介质中不对称酶促水解的反应速度和对映体选择性，提供一种简便易行的新策略。

### 参考文献

[1] Solyman L, Liljeblad A, Lazar L. Lipase-Catalysed Kinetic Resolution in Organic Solvents: An Approach to Enantiopure  $\alpha$ -methyl- $\beta$ -alanine Esters [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, 13: 1923-1928

[2] Deasy R E, Brossat M, Moody T S. Lipase Catalysed Kinetic Resolutions of 3-Aryl Alkanoic Acids [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2011, 22(1): 47-61

[3] Parker M C, Brown S A, Robertson L. Enhancement of *Candida antarctica* Lipase B Enantioselectivity and Activity in Organic Solvents [J]. *Chemical Communications*, 1998: 2247-2248

[4] Quiros M, Parker M C, Tumer N J. Tuning Lipase Enantioselectivity in Organic Media Using Solid-State Buffers [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2001, 66: 5074-5079

[5] 程咏梅, 吴坚平, 徐刚, 等. 有机相中利用脂肪酶催化的醇解反应拆分烯丙醇酮乙酸酯 [J]. *催化学报*, 2010, 31(2): 225-228

[6] Rakels J L L, Straathof A J J, Heijnen J J. Improvement of Enantioselective Enzymatic Ester Hydrolysis in Organic Solvents [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1994, 5(1): 93-100

[7] Theil F. Enhancement of Selectivity and Reactivity of Lipases by Additives [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56: 2905-2919

[8] 张媛媛, 宗敏华, 娄文勇. 脂肪酶催化外消旋对羟基苯甘氨酸甲酯水解制备对映体纯 D-对羟基苯甘氨酸的新方法 [J]. *催化学报*, 2005, 26(2): 106-110

[9] Serdakowski A L, Dordick J S. Enzyme Activation for Organic Solvents Made Easy [J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(1): 48-54

[10] Lindsay J P, Clark D S, Dordick J S. Combinatorial Formulation of Biocatalyst Preparations for Increased Activity in Organic Solvents: Salt Activation of Penicillin Amidase [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85(5): 553-560

[11] Morgan J A, Clark D S. Salt-Activation of Nonhydrolyase Enzymes for Use in Organic Solvents [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85(4): 456-459

[12] Maugard T, Remaud-Simeon M, Monsan P. Kinetic Study of Chemoselective Acylation of Amino-Alditol by Immobilized Lipase in Organic Solvent: Effect of Substrate Ionization [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1387(1-2): 177-183

[13] Ru M T, Hirokane S Y, Lo A S. On the Salt-Induced Activation of Lyophilized Enzymes in Organic Solvents: Effect of Salt Kosmotropicity on Enzyme Activity [J]. *Journal of the American Chemistry Society*, 2000, 122(8): 1565-1571