

酿酒酵母 B5 不对称还原制备手性药物 中间体 R-2'-氯-1-苯乙醇的研究

欧志敏* 吴坚平 杨立荣 岑沛霖 刘 璘 齐 楠

(浙江大学材料与化工学院生物工程研究所 杭州 310027)

摘 要 从 11 株微生物中筛选出 4 株具有不对称还原 2'-氯-苯乙酮能力的酵母,其中酿酒酵母 B5 的还原产率与对映体选择性最佳。确定了酿酒酵母 B5 对 2'-氯-苯乙酮还原的最佳反应时间为 24h,最佳 pH 8.0,最佳反应温度为 25℃,最佳共底物为 5%(体积比)乙醇。同时研究了底物浓度、微生物的量、微生物的培养条件等对反应产率和立体选择性的影响。细胞浓度为 10.75mg/mL(细胞干重/反应体积)的酿酒酵母 B5 可将 6.47mmol/L 的 2'-氯-苯乙酮 100%地转化为 R-2'-氯-1-苯乙醇,其对映体选择性为 100%。酿酒酵母 B5 可重复利用的特点可提高产物的产量。

关键词 2'-氯-苯乙酮, 2'-氯-1-苯乙醇, 不对称还原, 对映体选择性

中图分类号 TQ923 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0206-06

手性是自然界的本质属性之一,许多与生命活动有关的分子都具有手征性。手性化合物的最大市场之一是制药领域,含手性因素的化学药物有多种对映体,它们在人体内的药理活性、代谢过程及毒性存在着显著差异^[1]。具有特定功能基团的手性醇是合成许多手性药物的中间体。R-2'-氯-1-苯乙醇是合成 R-氯丙那林的重要手性合成子^[2]。R-氯丙那林是选择性 β_2 受体兴奋剂,对组织胺和乙酰胆碱所致支气管痉挛具有显著缓解作用,主要用于哮喘和支气管炎的治疗^[3]。

微生物产生的氧化还原酶具有立体专一性,可以实现潜手性化合物的不对称还原,获得高光学纯度的手性药物合成子。还原反应需要辅酶提供氢,因此辅酶也是反应物,辅酶和酶的价格昂贵,提纯工艺复杂,微生物细胞中含有酶和辅酶,用微生物进行反应有利于还原过程中实现辅酶原位再生,省略了酶的分离纯化过程,大大降低了成本。本文采用水相体系进行反应,比传统化学法中的介质——有机溶剂更便宜,大大降低成本,手性选择性好、转化率高、反应条件温和,因此具有较好的工业应用前景。

本文将采用微生物法还原 2'-氯-苯乙酮制备 R-氯丙那林的手性中间体 R-2'-氯-1-苯乙醇,该反应过程如图 1 所示,通过对酵母菌株的筛选和生物转化

条件的优化,提高手性选择性和转化率。

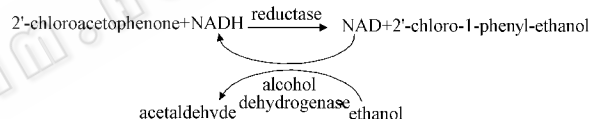


图 1 以乙醇为共底物生物转化 2'-氯-苯乙酮合成 2'-氯-1-苯乙醇的反应机理

Fig.1 Biotransformation of 2'-chloroacetophenone to 2'-chloro-1-phenyl-ethanol in the presence of ethanol as co-substrate

1 材料与方法

1.1 材料

2'-氯-苯乙酮购自 ACROS 公司,外消旋的 2'-氯-1-苯乙醇采用硼氢化钠还原 2'-氯-苯乙酮制得^[4]。

1.2 菌种

实验菌种为本实验室保藏的酵母菌种。

1.3 培养基

MYPG 斜面培养基(g/L):麦芽汁 10,酵母粉 3,蛋白胨 5,葡萄糖 10,琼脂 20。

液体培养基(g/L):葡萄糖 30,酵母粉 3,硫酸铵 5,7 H₂O·MgSO₄ 0.5,3 H₂O·K₂HPO₃ 1,KH₂PO₃ 1。

1.4 菌体培养

从斜面挑一环接种于 100mL 的液体培养基中,

置于 30℃ 摇床(160 r/min)培养 24h,获得种子;取 10mL 种子培养液转接到 100mL 的液体培养基中,放入摇床中继续培养 24h,收获的菌体即可用于生物转化。

1.5 还原反应

将 1.4 中获得的菌液取出一定量离心分离,沉淀用 0.85% 的生理盐水洗涤两次,将洗涤后的菌体加入到一定 pH 的磷酸缓冲液(0.1 mol/L)中,加入一定量的底物,放入 30℃ 摇床(160 r/min)中反应一段时间。

1.6 分析方法

反应结束后,用 5mL 乙酸乙酯萃取,从萃取液取样,用 HP6890 气相色谱仪分析。色谱柱采用手性柱,型号为 HP Chiral 10% β -Cyclodextrin(30m \times 0.32mm \times 0.25 μ m) 检测条件:载气为氮气,进样器、色谱柱和检测器温度分布为 250℃、130℃ 和 250℃;分流比为 1:100;进样量为 0.1 μ L;氢离子火焰检测器,以十六烷为内标的内标法进行检测。样品的标准谱图见图 2。

2 结果与讨论

2.1 具有还原能力的菌种的选择

将酵母湿细胞分散在 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液中(使细胞浓度为 2.15mg/mL(干重/反应体积)),加入 6.47mmol/L 2'-氯-苯乙酮和 5%(体积比)的乙醇,从本实验室保存的 11 株微生物中筛选出了 4 株具有对映体选择性还原能力的菌株,结果如表 1 所示。图 3 显示了酿酒酵母 B5 还原 2'-氯-苯乙酮反应结束后的气相色谱图,可以看到,图中产物没有 S-2'-氯-1-苯乙醇的峰,R-2'-氯-1-苯乙醇的对映体过剩值达到 100%。因此,在筛选的 11 株酵母中,酿酒酵母 B5 为还原 2'-氯-苯乙酮产生 R-2'-氯-1-苯乙醇的最佳微生物。

表 1 4 种酵母催化 2'-氯-苯乙酮还原的实验结果

Table 1 The result of reduction of 2'-chloroacetophenone with four strains of yeast

Strains	Yield/%	Enantiometric excess(ee%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P2	10	99.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> B5	74	100
<i>Candida pseudotropicalis</i> 104	32	97.0
<i>Candida utilis</i> 1257	54	95.9

The cell concentration of *Saccharomyces cerevisiae* B5 is 2.15 mg/mL (dry weight/reaction volume); The substrate concentration is 6.47 mmol/L.

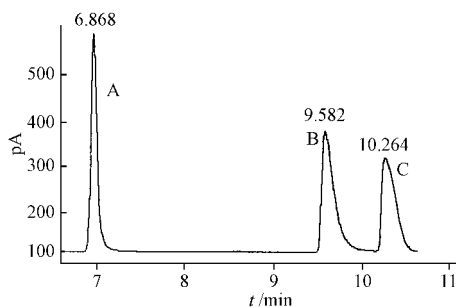


图 2 标准品的气相色谱图

Fig.2 Chromatographic profile of the standards

A. 2'-chloroacetophenone; B. S-2'-chloro-1-phenyl-ethanol; C. R-2'-chloro-1-phenyl-ethanol

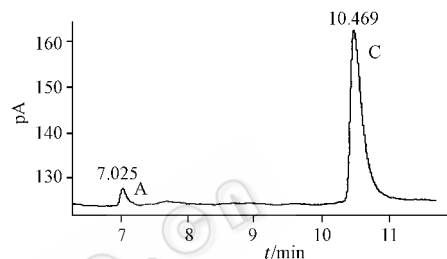


图 3 酿酒酵母 B5 细胞浓度为 2.15mg/mL (干重/反应体积)转化 2'-氯-苯乙酮 (6.47mmol/L)的气相色谱图

Fig.3 The chromatographic graph of biotransformation of

2'-chloroacetophenone with *Saccharomyces cerevisiae* B5

A. 2'-chloroacetophenone; C. R-2'-chloro-1-phenyl-ethanol

2.2 共底物的种类及添加量的确定

有机底物在水相中不溶解,而微生物只有分散在水相中才有较高活力,所以本文采用添加共底物的方法来增加底物在水相中的分散。据文献报道,添加适当的共底物有利于提高产率或改变反应的立体选择性^[5]。以甲醇、乙醇、2-丙醇、正丁醇、葡萄糖、乳酸、甘油为共底物,研究了添加共底物对酿酒酵母 B5 还原 2'-氯-苯乙酮的影响。将酵母湿细胞分散在 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液中(使细胞浓度为 2.15mg/mL(干重/反应体积)),加入 6.47mmol/L 2'-氯-苯乙酮和 5%(体积比)共底物,反应在 30℃ 摇床中进行,反应时间为 24h。

如图 4.1 所示,以甲醇、乙醇、2-丙醇、正丁醇、葡萄糖、甘油为共底物时产物 R-2'-氯-1-苯乙醇的对映体过剩值均为 100%。当甲醇、乙醇、2-丙醇、正丁醇、葡萄糖和甘油含量分别占反应体系的 5%(体积比)、5%(体积比)、2%(体积比)、0.5%(体积比)、0.5%(质量比)、5%(质量比)时,产物的产率较高,分别达到了 26%、74%、55%、20%、47% 和 41%,比不加共底物时 17% 的产率得到了大幅度提高。

图 4.2 显示了以乳酸为共底物时,乳酸浓度对产物手性醇的对映体过剩值的影响。与醇类化合物作为共底物不同,随着乳酸浓度的提高产物 R 型手性醇的含量降低, S 型手性醇产物的产率增加,在高乳酸浓度时,产物基本上都是 S 型。乳酸作为共底物时酶催化反应立体选择性改变的机理还有待于研究。

一定量的葡萄糖和甘油有利于微生物通过代谢过程产生氧化还原过程中所需的重要辅酶 NAD(P)H,辅酶 NAD(P)H 的及时再生有利于提高反应的产率,而葡萄糖和甘油的量过高时不利于还原过程的进行。酵母细胞中含有各种醇脱氢酶,当以低碳醇为共底物时,也有利于辅酶 NADH 的再生。如图 1 所示,在乙醇脱氢酶的作用下,乙醇脱氢生成乙醛,与此同时,将 NAD^+ 还原成 NADH,为氧化还原酶提供了 NADH,提高了产物产率。同时醇类的存在改善了细胞的通透性,有利于有机底物进入微生物细胞。过高的醇浓度将导致氧化还原酶失活。根据以上实验数据,5%(体积比)的乙醇为共底物对提高产率的效果最好,因此选择 5%(体积比)的乙醇为共底物进一步研究。

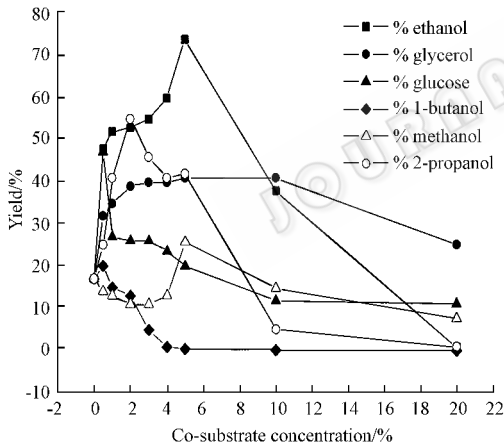


图 4.1 共底物的种类和添加量对酿酒酵母 B5 (细胞浓度为 2.15mg/ml(干重/反应体积)) 转化 2'-氯-苯乙酮 (6.47mmol/L) 的影响

Fig.4.1 The effect of the co-substrates on the biotransformation of 2'-chloroacetophenone with *Saccharomyces cerevisiae* B5

2.3 酿酒酵母 B5 还原 2'-氯-苯乙酮的时间进程和重复使用

在分散有细胞浓度为 2.15mg/ml(干重/反应体积)酿酒酵母 B5 的 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液中加入 6.47mmol/L 底物和 5%(体积比)乙醇,于 30℃ 摇床中反应,每隔 12h 取样,GC 检测对映体过剩值和产率,结果见图 5。从图中可以看出,反应 24h 时,产

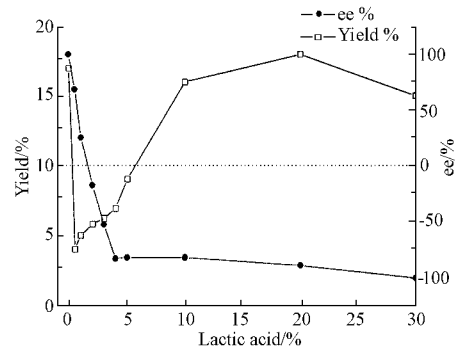


图 4.2 乳酸为共底物对酿酒酵母 B5 (细胞浓度为 2.15mg/ml(干重/反应体积)) 转化 2'-氯-苯乙酮 (6.47mmol/L) 的影响

Fig.4.2 The effect of lactic acid as co-substrate on the biotransformation of 2'-chloroacetophenone with *Saccharomyces cerevisiae* B5

率已接近 70%,反应时间延长,产率没有大的变化,其原因可能是一定量的产物对还原过程存在抑制作用。确定最佳反应时间为 24h。GC 分析表明,产物的对映体过剩值不随反应时间而改变,为 100%。

将已经反应 24h 后的酿酒酵母 B5 离心分离后,重新分散在 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液中(使细胞浓度为 2.15mg/mL(干重/反应体积)),分别加入 6.47mmol/L 底物、6.47mmol/L 底物与 0.5%(质量比)的葡萄糖、6.47mmol/L 底物与 5%(体积比)乙醇,继续反应 24h,实验结果如表 2 所示。可以看出反应 24h 后的酿酒酵母 B5 仍具有一定的还原能力,特别是加入共底物后,酵母活细胞具有一定的辅酶再生能力,产率仍保持在较高的水平,说明酵母细胞可以重复使用。

以 24h 为周期,每次加入 6.47mmol/L 底物与 5%(体积比)乙醇,细胞浓度为 2.15mg/ml(干重/反应体积)的酿酒酵母 B5 可重复使用 15 次,重复使用可提高产物产量,提高工业应用价值。

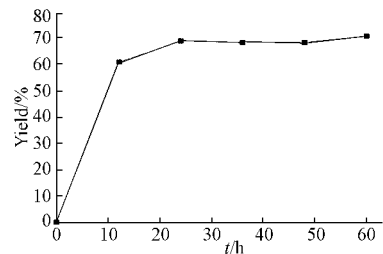


图 5 酿酒酵母 B5 还原 2'-氯-苯乙酮的时间进程 (底物浓度为 6.47mmol/L 酿酒酵母 B5 的浓度为 2.15mg/ml(干重/反应体积))

Fig.5 Time course of *Saccharomyces cerevisiae* B5 reduction reaction of 2'-chloroacetophenone

表 2 连续添加底物或底物与共底物的结果

Table 2 The addition of substrate consequently and the addition of substrate with co-substrate consequently

Samples	Yield/ %	ee%
6.47mmol/L 2'-chloroacetophenone	2	100
6.47mmol/L 2'-chloroacetophenone + 0.5% (g/g) glucose	46	100
6.47mmol/L 2'-chloroacetophenone + 5% (V/V) ethanol	69	100

2.4 酿酒酵母 B5 培养条件及还原反应通气量的影响

分别在厌氧和好氧条件下培养酿酒酵母 B5 后,取湿菌体分散在 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液中(使细胞浓度为 2.15mg/mL(干重/反应体积)),加入 6.47mmol/L 底物和 5%(体积比)乙醇,分别在震荡与静止的条件下 30℃ 反应 24h 取样分析,结果列于表 3。可以看到,好氧培养比厌氧培养的酿酒酵母 B5 转化底物能获得的更高的产率,震荡反应比静止反应能获得的更高的产率。表明好氧培养的酿酒酵母 B5 具有较高的氧化还原酶活,更适合于催化羰基还原反应。震荡培养时有利于强化传质,能促进底物扩散进入微生物细胞进行还原反应及产物释放到胞外。在震荡反应的条件下,氧传递也得到了强化,氧的存在可以促进共底物乙醇氧化为乙醛的反应,增加了 NADH 的供给,大幅度提高了产物产率。

表 3 酿酒酵母 B5 培养条件及是否振荡反应对还原的影响

Table 3 The influence of cultivation condition of *Saccharomyces cerevisiae* B5 and reaction condition on reduction

Culture condition	Reaction condition	Yield/ %	ee%
Anoxybiotic cultivation	Shaking	20	100
Anoxybiotic cultivation	No shaking	12	100
Oxybiotic cultivation	Shaking	71	100
Oxybiotic cultivation	No shaking	38	100

The substrate concentration is 6.47 mmol/L, the cell concentration of *saccharomyces cerevisiae* B5 is 2.15 mg/mL(dry weight/ reaction volume).

2.5 不同量酿酒酵母 B5 对还原产率的影响

菌体加入量对产物产率影响的实验结果见图 6。实验数据显示,当底物量保持不变为 6.47mmol/L 时,产物产率随菌体用量的增加而提高。当加入的菌体浓度达 10.75mg/mL(干重/反应体积)时,产率接近 100%。菌体的量增加,参加还原反应的辅酶量增多,在底物量不变的情况下增加辅酶的量有助于提高产物产率。因此,当底物量不变时加大菌体量有助于提高反应产率。实验中用不同量酿酒酵母 B5 进行反应时,产物的对映体过剩值始终保持 100%。

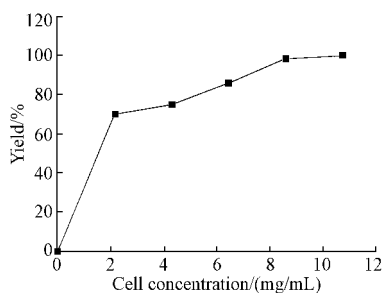


图 6 不同量酿酒酵母 B5 对还原产率的影响(底物含量为 6.47mmol/L)

Fig.6 The effect of cell concentration of *Saccharomyces cerevisiae* B5 on the formation of (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol

2.6 底物量对还原产率的影响

在酿酒酵母 B5 的量(细胞浓度为 2.15mg/mL(干重/反应体积))不变的情况下改变底物的量,结果示于图 7。产物的对映体过剩值在加入各种底物量的条件下均为 100%。产率随底物量的升高而迅速下降,当底物加入量为 19.4mmol/L 时,反应产率为 0.8%。说明底物含量过高对微生物有毒害,对氧化还原酶的活力存在抑制作用。

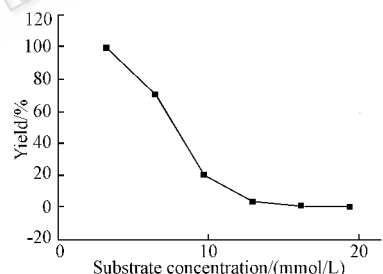


图 7 底物的量对还原产率的影响(酿酒酵母 B5 的浓度为 2.15 mg/mL(干重/反应体积))

Fig.7 The effect of the concentration of the substrate on the formation of (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol

2.7 反应溶液 pH 对产率的影响

分别取酿酒酵母 B5 湿菌体洗涤后分散在不同 pH 的磷酸缓冲液中(使细胞浓度为 2.15mg/mL(干重/反应体积)),加入 6.47mmol/L 底物和 5%(体积比)乙醇,置于 30℃ 摇床中反应 24h,结果如图 8 所示。酿酒酵母 B5 在 pH 5.0~10.0 的广泛 pH 范围内具有较好的还原能力,产率变化不大,但以 pH 8.0 为最好。同时,在实验的 pH 值条件下产物醇的对映体过剩值均为 100%。

2.8 反应温度对还原产率的影响

分别取湿菌体洗涤后分散在 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液中(使细胞浓度为 2.15mg/mL(干重/反应体积)),加入 6.47mmol/L 底物和 5%(体积比)乙醇,置于不同温度的摇床中反应 24h,结果如图 9 所示。

当温度在 20 ~ 35℃ 之间时,反应产率变化不大,但温度升高到 40℃ 时产率迅速下降。主要原因是较高的温度可使氧化还原酶失活速率加快。反应的最适温度为 25℃。产物手性醇的对映体过剩值不随反应温度的变化而改变,在实验中的各种温度条件下产物的对映体过剩值均为 100%。

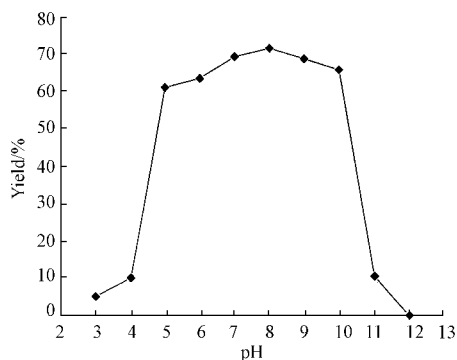


图 8 反应溶液 pH 对产率的影响(底物含量为 6.47mmol/L, 酿酒酵母 B5 的浓度为 2.15 mg/mL(干重/反应体积))

Fig.8 The effect of pH on the formation of (R)-2'-chloro-1-phenylethanol

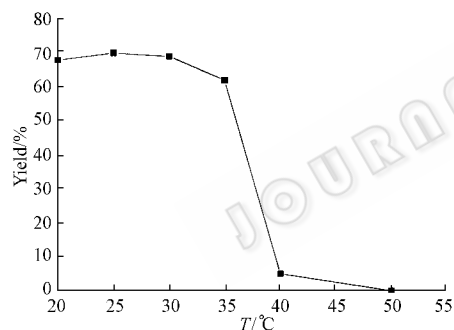


图 9 反应温度对还原产率的影响(底物含量为 6.47mmol/L, 酿酒酵母 B5 的浓度为 2.15 mg/mL(干重/反应体积))

Fig.9 The effect of temperature on the formation of (R)-2'-chloro-1-phenylethanol

3 结 论

综上所述,以 5%(体积比)乙醇为共底物增加了有机底物在水中的分散,有利于微生物还原底物。酿酒酵母 B5 对 2'-氯-苯乙酮的还原具有很好的立体选择性,反应条件温和,易控制,在 pH 8.0, 25℃, 5% 的乙醇为共底物的优化反应条件下可以获得较高的还原产率,细胞浓度为 10.75mg/mL 的酿酒酵母 B5 可将 6.47mmol/L 的 2'-氯-苯乙酮 100% 地转化为 R-2'-氯-1-苯乙醇,这说明在实验中的 11 株菌株中,酿酒酵母 B5 是还原 2'-氯-苯乙酮的最佳菌株。采用微生物在水相中还原获得高光学纯度的手性醇比化学法还原更经济,更节约成本,具有较好的应用价值。本文的研究工作为微生物法还原羰基化合物制备手性药物中间体 R-2'-氯-1-苯乙醇打下了良好的基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] YOU T H(尤田靶). Modern Study Method of Chiral Compound(手性化合物的现代研究方法), Hefei: University of Science & Technology of China Press, 1993
- [2] Wei Z L, Li Z Y, Lin G Q. Anti-prelog microbial reduction of aryl α -halomethyl α -hydroxymethyl ketones with *Geotrichum sp.* 38, *Tetrahedron*, 1998, **54**(43):13059 - 13072
- [3] WANG R I(王汝龙), YUAN Z P(原正平). *Pharmaceutical* (药物), Beijing: Chemistry Industry Press, 2000
- [4] Shimizu S, Kataoka M, Katoh M *et al.* Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by a microbial aldehyde reductase in an organic solvent water diphasic system. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56**(3):2374 - 2377
- [5] Dahl A C, Fjeldberg M, Madsen J Ø. Bakers' yeast: improving the D-stereoselectivity in reduction of 3-oxo esters. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, **10**(3):551 - 559

Saccharomyces cerevisiae B5 Efficiently and Stereoselectively Reduces 2'-chloroacetophenone to R-2'-chloro-1-phenylethanol in the Presence of 5% Ethanol

OU Zhi-Min* WU Jian-Ping YANG Li-Rong CEN Pei-Lin LIU Lin QI Nan

(Institute of Biochemical Engineering, College of Material Science and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, china)

Abstract (R)-chlorprenaline, a selective activator of β_2 receptor and an effective drug for bronchitis and asthma, is industrially prepared from (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol. In this communication, we describe (1) the identification of *Saccharomyces cerevisiae* B5 as an effective host for stereoselective reduction of 2'-chloroacetophenone to (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol; (2) the presence of ethanol enhances the conversion; and (3) the biochemical factors that effect the yield of the product.

Among the four yeast strains capable of reduction 2'-chloroacetophenone to (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol we screened, *Saccharomyces cerevisiae* B5 showed the highest activity and stereoselectivity, and was used for the subsequent study. The effect of the presence of methanol, ethanol, 2-propanol, 1-butanol, glucose, glycerol and lactic acid was first investigated, as it was previously reported that they increased the yield and stereoselectivity of the reaction. The addition of the co-substrate methanol, ethanol, 2-propanol, 1-butanol, glucose and glycerol favored the formation of the 2'-chloroacetophenone to (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol. Lactic acid inhibited the enzyme activity. Ethanol is the best co-substrate among the seven co-substrates and under the optimum concentration of 5%, the yield of (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol was increased from 17% to 74%. The oxidation of ethanol regenerates NADH required for the reduction.

The effects of the reaction time, pH, cell concentration, substrate concentration and temperature on the reduction were investigated next. The enantiometric excess of (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol reached 100% under the optimal condition: pH 8.0, 25°C and 5% ethanol. The product yield went up with the increasing *Saccharomyces cerevisiae* B5 concentration and reached 100% when the cell dry weight was 10.75 mg/mL and 2'-chloroacetophenone was 6.47 mmol/L. The yield of (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol decreased sharply with the increase of substrate concentration, as the high concentration of substrates is toxic to the cell and inhibits the activity of reductases. The aerobic cultivation of the yeast and shaking during the reaction increased the yield of (R)-2'-chloro-1-phenyl-ethanol. The yeast can be reused up to 15 times. This research paves the way for economical preparation of chiral 2'-chloroacetophenone to R-2'-chloro-1-phenylethanol.

Key words 2'-chloroacetophenone, R-2'-chloro-1-phenylethanol, asymmetric reduction, enantioselectivity