

固定化啤酒酵母细胞催化有机硅酮不对称还原^{*}

娄文勇 宗敏华^{**} 范晓丹 卢杰泉 杜 伟

(华南理工大学生物工程系 广州 510640)

摘 要 研究了固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应,系统探讨了振荡速度、底物浓度、固定化细胞浓度、pH 值和反应温度对反应速度、产率和产物光学纯度的影响。结果表明,上述因素对固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应均有较显著的影响。振荡速度以 150r/min 为宜,底物浓度和固定化细胞浓度分别为 14mmol/L 和 0.15g/mL 较佳,适宜的 pH 值为 7.3,最佳反应温度为 25℃~30℃。在该优化反应条件下,反应最大产率和产物的光学纯度分别高达 84.9% 和 90.2% ee。

关键词 三甲基硅乙酮,固定化细胞,啤酒酵母,不对称还原,(-)-1-三甲基硅乙醇

中图分类号:Q556.1 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)04-0484-06

具有 Si-C 结构的有机硅化合物在自然界生物系统中尚未发现,但近年来的研究表明,许多有机硅化合物不仅在有机合成,尤其是不对称合成中占有较重要的地位,而且具有特殊的生物活性,其作为药物,比碳结构类似物有更佳药效、更高的选择性及更低的毒性,硅替换是药物设计的一条有效途径^[1~2]。化学合成许多有机硅化合物的条件甚为苛刻,并且,反应物或产物在此极端的条件下可能不稳定,难以得到目的产物,手性有机硅化合物合成尤为如此。生物合成法因具有高效性、高立体选择性、反应条件温和、成本低以及环境污染小等优点而日益受到青睐。80 年代末以来,Tacke 等人^[3~4]一直探索生物细胞催化有机硅化合物的转化作用,发现酵母、细菌、藻类、悬浮培养植物细胞均能催化有机硅化合物的不对称羰基/羟基转化。90 年代初以来,人们相继报道了醇脱氢酶及脂肪酶催化有机硅醇的脱氢、酯化和转酯^[5~11]。最近,Zani 等^[12]研究了游离面包酵母细胞催化一系列不同结构有机硅酮的不对称还原反应,发现当底物为 1-三甲基硅-1-丁酮时,最大产率和产物光学纯度分别为 70% 和 60% ee;当底物为带有苯基的有机硅酮如苯基三甲基硅甲酮时,产物光学纯度增至 95% ee,但最大产率降至 65%。迄今,国内尚未见固定化酵母细胞催化有机硅酮不对称还原反应的报道。本文研究了固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原成(-)-1-三甲基硅乙醇的反应,系统探讨了振荡速度、底物浓度、固定化细胞浓度、pH 值和反应温度对这一反应的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)华南理工大学生物工程系菌种保藏室保藏;三甲基

^{*} 国家自然科学基金(20076019)及广东省自然科学基金资助项目(000444)

^{**} 联系人, Tel (020) 87111452, E-mail: btmhzon@scut.edu.cn

作者简介 娄文勇(1975-)男,博士研究生,主要从事手性药物生物合成方面的研究。

收稿日期 2001-07-25,修回日期 2001-11-19 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

硅乙酮 (acetyltrimethylsilane) 正壬烷 (内标) 购自 Aldrich 公司 (±)-1-三甲基硅乙醇, 购自 Sigma 公司; 其他试剂为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 啤酒酵母细胞固定化 培养 24h 的啤酒酵母细胞离心 (3500r/min, 10min) 分离, 洗涤两次, 得到游离啤酒酵母细胞。把一定量的游离啤酒酵母细胞分散在等重量的蒸馏水中, 然后将它加入含 2% 海藻酸钠的溶液中形成细胞/海藻酸钠悬浮液 (边倒入边搅拌), 用注射器把悬浮液滴入含 2% CaCl_2 的溶液 (边滴边搅拌), 过滤收集固定化细胞颗粒。将固定化细胞悬浮在含 20% 葡萄糖、0.05% CaCl_2 的溶液中, 冷藏 (4℃) 备用。

1.2.2 固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应: 在 50mL 带塞三角瓶中装入 10mL 含有 14mmol/L 三甲基硅乙酮、20% 葡萄糖和 0.05% CaCl_2 的一定 pH 值 Tris-HCl 缓冲液 (50mmol/L), 加入一定量的固定化细胞开始反应, 于一定温度和振荡速度下水浴振荡, 定时从反应液中取样 0.5mL, 用 0.5 × 2mL 乙酸乙酯萃取两次, 然后加入 10μL 稀释后的内标 (正壬烷与乙酸乙酯的体积比为 1:39) 供气相色谱检测。反应终止后, 取 5mL 反应液, 用同一缓冲液稀释至 20mL, 供旋光仪检测产物 1-三甲基硅乙醇的旋光性。

1.2.3 气相色谱分析 仪器 美国惠普 HP4890D 型气相色谱仪, 配备 3398A 工作站, 氢火焰离子检测器; 手性柱: β-环糊精柱, 柱径 0.32mm, 柱长 30m; 分析条件: 气化室温度 250℃, 检测室温度 250℃, 柱温 71℃ 维持 1min 后, 以 1℃/min 的速率升温至 100℃, 载气为氮气, 流速为 2.5mL/min, 分流比 1:100, 进样量 2μL。在该分析条件下, 底物三甲基硅乙酮、内标正壬烷、产物 1-三甲基硅乙醇的两对映体 (+)-1-三甲基硅乙醇和 (-)-1-三甲基硅乙醇的保留时间分别为 3.37min、5.20min、5.41min 和 5.74min。

1.2.4 产率、反应速度及产物光学纯度的确定 根据产物 1-三甲基硅乙醇的增加来计算产率 (最大产率是反应达到平衡时的产率), 以初始反应时间内产物在单位时间内的增加计算初始反应速度, 根据产物的两种异构体的浓度计算产物光学纯度, 用对映体过量值来表征, 即 $ee = (A - B) / (A + B)$ 其中 A 和 B 分别表示反应后产物 1-三甲基硅乙醇的两种对映体的浓度)。

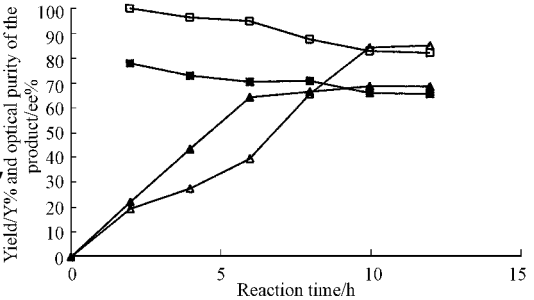


图 1 游离和固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应过程曲线

Fig.1 Reaction time course of the asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane catalyzed by immobilized and free *Saccharomyces cerevisiae* cells

2 结果和讨论

2.1 游离细胞和固定化细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应过程比较

游离啤酒酵母细胞和固定化啤酒酵母细胞都可催化三甲基硅乙酮不对称还原成 (-)-1-三甲基硅乙醇, 但两者催化的反应速度、产率和产物的光学纯度均有较大的差异。

△—Yield of the reaction catalyzed by immobilized cells;
□—ee of the product from reaction catalyzed by immobilized cells;
▲—Yield of the reaction catalyzed by free cells;
■—ee of the product from reaction catalyzed by free cells.
Reaction medium :10mL 50mmol/L Tris-HCl buffer (pH = 6.8); t = 30℃; 14mmol/L acetyltrimethylsilane; shake speed :150r/min.

从反应过程曲线(如图1)可知,游离细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的初速度较大,反应前6h,产率随着反应时间的增大而几乎成直线迅速增加,6小时后,反应速度下降。产物的光学纯度随着反应时间的增大而降低,反应进行10h,产率为67.6%,产物光学纯度为65.8% ee。固定化细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的初速度小于游离细胞,产物的光学纯度也是随反应时间的增大而降低,但一直比游离细胞催化的反应产物光学纯度要高,反应10h后基本达到平衡,此时的产率为84.1%,产物光学纯度为82.7% ee。可见,啤酒酵母细胞固定化后,反应的最大产率和产物光学纯度都有较大的提高。这可能是由以下几种因素造成的(1)生物细胞的酶系很复杂,在反应中起作用的有多种酶,它们的活力和立体选择性等因环境的变化而异(2)细胞在固定化过程中,某些立体选择性低的酶活力降低或失活,从而使反应的立体选择性提高(3)由于所用固定化载体的亲水性,固定化细胞内底物和产物浓度较游离细胞低,可能解除或减少了底物和产物对酶的抑制作用。细胞固定化后,反应的初速度有所降低,这是因为非极性底物三甲基硅乙酮通过亲水性的海藻酸钙扩散到酵母细胞内受到较大的阻碍。固定化细胞催化三甲基硅乙酮的不对称还原反应比游离细胞好,不仅表现在产率和产物光学纯度较高,而且固定化细胞便于储存,在4℃条件下放置两个星期,活力基本不变,而游离细胞在同样的条件下放置一天,活力就下降了40%。此外,固定化细胞便于回收,可重复利用。所生成的产物主要是(-)-1-三甲基硅乙醇。

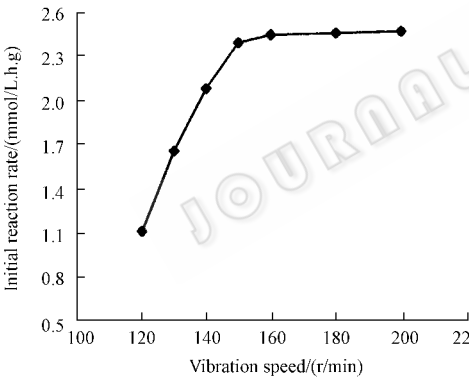


图2 振荡速度对反应初速度的影响

Fig.2 Effect of shake speed on initial reaction rate

Reaction medium :10mL 50mmol/L Tris-HCl buffer

(pH = 6.8); t = 30℃; 14mmol/L acetyltrimethylsilane;

1.6g immobilized cells.

2.2 振荡速度对反应的影响

振荡速度影响底物和产物在反应中的传质,从而影响反应初速度(如图2)。当振荡速度小于150r/min时,反应初速度随着振荡速度的增加而迅速增加,说明非极性底物三甲基硅乙酮通过亲水性海藻酸钙进入啤酒酵母细胞受到传质限制,对反应初速度影响较大;当振荡速度大于150r/min时,反应初速度基本不随振荡速度的增加而变化,说明已基本消除传质限制。因此,选择振荡速度为150r/min较宜。

2.3 底物浓度对反应的影响

底物浓度对该反应初速度、产率和产物光学纯度均有显著的影响(如图3)。从图3可知,三甲基硅乙酮的浓度由7mmol/L增至14mmol/L时,反应初速度基本保持不变,但随着三甲基硅乙酮的浓度继续增大,反应初速度迅速减小,当底物浓度由14mmol/L增至35mmol/L时,反应初速度由2.6mmol/L.g.h减至1.2mmol/L.g.h左右。反应的最大产率随底物浓度的增加而减少,产物光学纯度则随底物浓度的增加而提高。当三甲基硅乙酮的浓度为由14mmol/L增至35mmol/L时,产物光学纯度增加的幅度较小(由84.5% ee增至89.2% ee),而反应最大产率显著下降(由83.4%减至42.6%)。可知,该反应在所研究的底物浓度范围内显然存在底物抑制作用。综合考虑反应初速度、最大产率及产物光学纯度这三个因素,认为底物浓度以14mmol/L为宜。

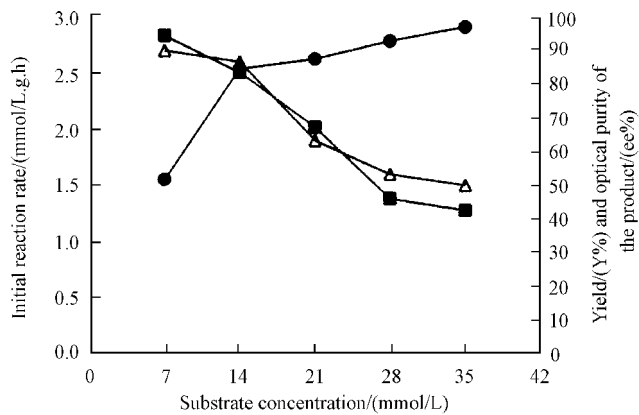


图 3 底物浓度对反应的影响

Fig.3 Effect of substrate concentration on the reaction

● ee% ; ■ Y% ; △ Initial reaction rate.

Reaction medium :10mL 50mmol/L Tris-HCl buffer (pH= 6.8) ; t = 30℃ ; 1.6g immobilized cells ; t = 12h.

2.4 固定化细胞浓度对反应的影响

固定化细胞浓度对该反应的初速度及立体选择性的影响如图 4 和表 1。从图 4 可见 ,固定化细胞浓度小于 0.15g/mL 时 ,反应初速度随之增大而迅速提高 ,而固定化细胞浓度大于 0.15g/mL 时 ,反应初速度随之增加而提高的趋势缓慢。由表 1 可知 ,不同浓度的固定化细胞催化此反应时 ,在相近产率下所对应的产物光学纯度也相近 ,这说明了固定化细胞浓度对该反应的立体选择性影响不大。综合考虑 ,固定化细胞浓度以 0.15g/mL 为宜。

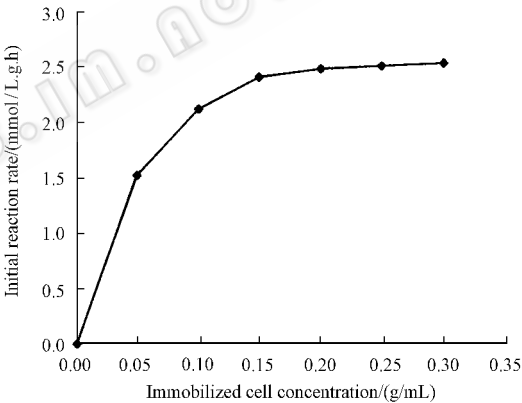


图 4 固定化细胞浓度对反应初速度的影响

Fig.4 Effect of immobilized cell concentration on the initial reaction rate

Reaction medium :10mL 50mmol/L Tris-HCl buffer (pH= 6.8) ; t = 30℃ ; 14mmol/L acetyltrimethylsilane.

2.5 pH 值对反应的影响

pH 值不仅影响反应速度 ,而且影响最大产率和产物光学纯度。由表 2 可见 ,pH 值从 5.8 上升到 7.5 ,反应速度随之上升 ,当 pH 值继续上升时 ,反应速度却随之下降 ,说明了固定化细胞催化的该反应速度在 pH = 7.5 时达到最大 ,但该反应的最大产率和产物光学纯度并非在此 pH 值下最高。这可能是由于啤酒酵母细胞内起催化该反应的酶除醇脱氢酶(主要酶)外 ,还有多种同功酶 ,不同的酶所对应的最适 pH 值也不同 ,因此 ,在不同的 pH 值下 ,酵母醇脱氢酶和其同功酶的相对活性、立体选择性均有较大的差异 ,从而影响产物的光学纯度。当 pH = 7.3 时 ,该反应的最大产率比其他 pH 值条件下较高 ,达到 84.4% ,对应的产物光学纯度高达 87.7% ee。综合考虑 pH 值对反应速度、最大产率和产物光学纯度的影响 ,选择缓冲液的 pH 值为 7.3。

表 1 固定化细胞浓度对产物光学纯度的影响

Table 1 Effect of the concentration of immobilized cells on optical purity of the product

Concentration of immobilized cells(g/mL)	t/h	Y/%	ee/%	t/h	Y/%	ee/%
0.05	3.0	24.2	95.0	7.0	48.9	87.4
0.10	2.0	23.9	96.5	5.0	52.4	85.7
0.15	1.5	24.4	96.9	3.0	47.8	88.2
0.20	1.5	24.6	96.2	3.0	49.7	87.2
0.25	1.0	23.2	97.0	2.0	47.9	87.7
0.30	1.0	25.2	96.6	2.0	48.7	86.5

Reaction medium :10mL 50mmol/L Tris-HCl buffer(pH = 6.8) ; t = 30℃ ; 14mmol/L acetyltrimethylsilane.

表 2 pH 值对反应的影响

Table 2 Effect of pH on the reaction

pH	Initial reaction rate(mmol/L . h . g)	t/h	Y/%	ee/%
5.8	1.73	12	72.4	82.2
6.4	1.81	11	70.3	83.6
6.8	1.94	10	80.9	83.9
7.1	2.04	9	82.3	88.2
7.3	2.14	9	84.4	87.7
7.5	2.33	6	77.2	85.1
8.0	2.03	8	71.2	83.4
8.5	1.61	12	63.8	85.3
9.0	1.70	11	58.4	88.4

Reaction medium :10mL 50mmol/L Tris-HCl buffer(different pH ; t = 30℃ ; 14mmol/L acetyltrimethylsilane ; 1.5g immobilized cells.

表 3 反应温度对反应的影响

Table 3 Effect of reaction temperature on the reaction

t/℃	Initial reaction rate(mmol/L . h . g)	t/h	Y/%	ee/%
20	1.09	13	85.7	83.9
25	1.29	12	85.1	89.7
30	1.44	10	84.9	90.2
35	1.64	8	63.5	91.3
40	1.99	6	44.2	93.4
45	2.53	4	37.5	> 99

Reaction medium :10mL 50mmol/L Tris-HCl buffer(pH = 7.3) ; 14mmol/L acetyltrimethylsilane ; 0.15g/mL immobilized cells.

2.6 反应温度的影响

温度可影响反应初速度 ,但更重要的是它能影响反应的最大产率和产物的光学纯度 (见表 3)。反应温度从 20℃ 升至 30℃ 时 ,反应的最大产率变化不大 ,均为 84% 以上 ,而产物的光学纯度逐渐增大 ,由 83.9% ee 增至 90.2% ee ;当反应的温度大于 30℃ 时 ,最大产率随着反应温度的上升较显著地下降 ,由 84.9% 降到 37.5% ,而产物的光学纯由 90.2% ee 增至 99% ee。本实验还验证了固定化啤酒酵母细胞在所研究的温度范围内仍然具有活性 ,这不仅说明了啤酒酵母细胞经固定化后 ,其热稳定性增强 ,还说明了此反应可能属于

放热反应,温度升高,不利于产物生成,随着温度的降低,反应平衡向着产物合成的方向移动,最大产率增大,但反应速度降低,平衡时间过长。为了在较短的时间内获得高产率和高产物光学纯度,反应温度以 25℃ ~ 30℃ 为佳。

参 考 文 献

- [1] Colvin E W. Silicon Reagents in Organic Synthesis. New York :Academic Press ,1988. 1 ~ 5.
- [2] Tacke R , Zilch H. *Endeavour New Series* ,1986 ,**10**(4) :191 ~ 197.
- [3] Tacke R , Hengelsberg H , Zilch H. *J Organomet Chem* , 1989 ,**379** :211 ~ 216.
- [4] Tacke R , Wagner S A , Brakmann S , *et al.* *J Organomet Chem* ,1993 ,**458** :13 ~ 17.
- [5] Zong M H , Fukui T , Kawamoto T , *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol* ,1991 ,**36**(1) :40 ~ 43.
- [6] Fukui T , Zong M H , Kawamoto T , *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol* ,1992 ,**38**(2) :209 ~ 213.
- [7] Tanaka A , Fukui T , Zong M H , *et al.* *Ann N Y Acad Sci* ,1992 ,**672** :431 ~ 435.
- [8] Fukui T , Kawamoto T , Tanaka A. *Tetrahedron :Asymmetry* ,1994 ,**5**(1) :73 ~ 82.
- [9] Uejima A , Fukui T , Fukusaki E , *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol* ,1993 ,**38**(4) :482 ~ 486.
- [10] 邱树毅 姚汝华 宗敏华.生物化学与生物物理进展 ,1996 ,**23**(4) :369 ~ 372.
- [11] 宗敏华 程 潜 林 影.生物化学与生物物理进展 ,1999 ,**26**(3) :259 ~ 261.
- [12] Zani P. *Journal of Molecular Catalysis B :Enzymatic* ,2001 ,**11** :279 ~ 285.
- [13] Huber P , Bratovanov S , Bienz S , *et al.* *Tetrahedron Asymmetry* ,1996 ,**7**(1) :69 ~ 78.

Asymmetric Microbial Reduction of Organosilyl Ketone with Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells

Lou Wenyong Zong Minhua Fan Xiaodan Lu Jiequan Du Wei

(Department of Biotechnology , South China University of Technology , Guangzhou 510640 , China)

Abstract : Asymmetric microbial reduction of acetyltrimethylsilane with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells was studied. The effects of shake speeds , substrate concentration , immobilized cell concentration , pH and reaction temperature on the initial reaction rate , maximum yield and optical purity of the product were systematically studied. All above mentioned parameters have important effects on the reaction. The optimum shake speed , substrate concentration , immobilized cell concentration , pH and reaction temperature were found to be 150r/min , 14mmol/L , 0.15g/mL , 7.3 and 25℃ ~ 30℃ respectively for the reaction , under which the maximum yield and optical purity of the product were as high as 84.9% and 90.2% ee.

Key words : Acetyltrimethylsilane , Immobilized cells , *Saccharomyces cerevisiae* , Asymmetric reduction (-)-1-Trimethylsilyl-ethanol

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(20076019) and from Natural Science Foundation of Guangdong province(000444)

** Corresponding author. Tel 86-20-87111452 , E-mail btmhong@scut.edu.cn