

微生物法还原氯代苯乙酮制备手性醇

欧志敏 吴坚平 杨立荣* 岑沛霖

(浙江大学材料与化工学院生物工程研究所 杭州 310027)

关键词: 氯代苯乙酮, 选择性还原, 手性醇

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)04-0523-04

手性醇是合成手性药物、农业化学品、香料和液晶等物质的重要中间体^[1]。21 世纪是手性药物发展迅速的时期,手性醇合成方法的成熟与改进对于手性药物的合成具有积极的促进作用。光学活性的苯乙醇及其衍生物可用于合成手性药物,如 L-氯丙那林、R-沙丁胺醇^[2]、R-肾上腺素、S-心得安、S-舒喘宁、S-氟西汀和 R-托莫西汀^[3,4]等。目前,生产手性醇的主要方法有化学法和生物法两种^[5]。利用微生物中酶的立体选择性能合成一些化学方法难以合成的手性中间体^[5]。化学法中采用的反应体系一般为有机溶剂,而微生物法采用水相体系,微生物法比化学法的成本更低。生物法中,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,直接用微生物进行反应有利于还原过程中实现辅酶原位再生,同时省略了酶的分离纯化过程。多年来一些学者对 D-泛酸钙^[6]、L-肉碱^[7]、R-氟西汀^[8]等药物中间体——手性醇的微生物法生产作过大量研究,国内研究较少。本文对微生物法选择性地还原氯代苯乙酮类化合物制备手性氯代苯乙醇的反应进行了研究(反应通式如图 1 所示),在获得高光学纯度产物上取得了较好结果。

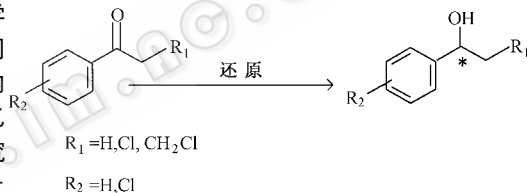


图 1 氯代苯乙酮的还原反应通式

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) P2、B5、2.36、2.53,产肮假丝酵母(*Candida utilis*) 1257、2.12 假丝酵母(*Candida pseudotropicalis*) 104、(*Candida famata*) 2.270 膜醯毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens* Hansen) 2.89 汉逊酵母(*Hansenula jadinii*) 2.36 和红酵母(*Rhodotorula glutinis*) 2.102 等实验菌种均由浙江工业大学王普教授馈赠及本实验室保藏。

1.1.2 培养基: MYPG 斜面培养基: 每升含麦芽汁 10g, 酵母粉 3g, 蛋白胨 5g, 葡萄糖 10g, 琼脂 20g。液体培养基: 每升含葡萄糖 30g, 酵母粉 3g, 硫酸铵 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g, KH_2PO_4 1g。pH 均为自然。

1.1.3 主要化学试剂: 苯乙酮、2-氯甲基-苯乙酮、2'-氯-苯乙酮、3'-氯-苯乙酮、4'-氯-苯乙酮、DL-苯乙醇均购自 ACROS 公司; S-2-氯甲基-苯乙醇和 R-2-氯甲基-苯乙醇购自 FLUKA 公司。外消旋的 2'-氯-1-苯乙醇、3'-氯-1-苯乙醇和 4'-氯-1-苯乙醇采用硼氢化钠还原相应的酮制得^[9]。

1.2 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(160r/min)培养 24h 后,取 1mL 培养液转接到 10mL 的液体培养基中,放入摇床中继续培养 24h。

1.3 还原反应

将 1.2 中获得的菌液离心分离,用 0.85% 的生理盐水洗涤两次,将洗涤后的菌体分散在 50mmol/L 磷

* 通讯作者。Tel 86-571-87952363; Fax 86-571-86912625; E-mail: lryang@zju.edu.cn

作者简介: 欧志敏(1973-)女,辽宁人,博士研究生,研究方向为生化制药和酶工程。E-mail: zozznm@163.com

收稿日期: 2002-09-29, 修回日期: 2003-03-31

酸缓冲液(pH7.0)中,加入一定量的(2' , 3' , 4')-氯代苯乙酮或 2-氯甲基-苯乙酮或苯乙酮(10 ~ 20mg),放入 30℃摇床(160r/min)中反应 60h。

1.4 分析方法

反应结束后,用适量的乙酸乙酯提取,用气相色谱分析。HP6890 气相色谱仪,色谱柱:HP Chiral 10% β-Cyclodextrin(30m × 0.32mm × 0.25μm)。

1.5 数据处理方法

$$\text{产率} = \frac{P}{\frac{M_p}{M_s} \times q} \times 100\%$$

M_s : 底物酮的分子量; M_p : 产物醇的分子量; q : 反应初始时底物酮的质量; P : 反应结束时产物醇的质量。

$$\text{光学纯度(ee\%)} = \frac{R - S}{R + S} \times 100\%$$

R : R 型产物的浓度; S : S 型产物的浓度。

2 结果和讨论

2.1 菌种的筛选

首先,以 2'-氯-苯乙酮为底物(10mg)对 11 株菌种进行了考察,其中 *S. cerevisiae* P2 ,*S. cerevisiae* B5 ,*C. pseudotropicalis* 104 ,*C. utilis* 1257 等 4 种酵母(细胞干重为 43mg)具有对映体选择性还原能力,其它几种菌株不能还原 2'-氯-苯乙酮,产率均为(表 1)。

表 1 以 2'-氯-苯乙酮(10mg)为底物筛选具有对映体选择性还原能力的菌株

菌种	产率/ %	光学纯度(% ee)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P2	17	100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> B5	> 98	100
<i>Candida pseudotropicalis</i> 104	> 98	98
<i>Candida utilis</i> 1257	45	97

产物为 S 型

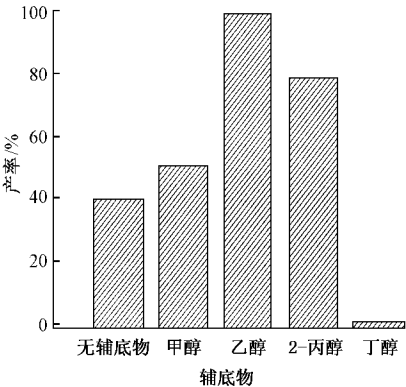


图 2 辅底物对 *S. cerevisiae* B5 还原 2'-氯-苯乙酮(10mg)产率的影响

2.2 辅底物(Co-substrate)的选择

据文献报道,添加适当的辅底物有利于提高产率^[10]。因此以甲醇(5%)、乙醇(5%)、2-丙醇(5%)和正丁醇(5%)为辅底物研究了添加辅底物对 *S. cerevisiae* B5(细胞干重为 43mg)还原 2'-氯-苯乙酮(质量为 10mg)产率的影响(图 2)。产物 R-2'-氯-1-苯乙醇的对映体过剩值均为 100%。

5% 甲醇、5% 乙醇和 5% 2-丙醇为辅底物均可提高反应的产率,其中乙醇提高反应产率的效果最佳。正丁醇(5%)为辅底物反应产率为 0,可能由于它对微生物中的氧化还原酶有抑制作用。

用乙醇为辅底物溶解有机底物有利于微生物对底物的还原。原因在于,一方面乙醇的存在使细胞的通透性增强,有利于有机底物进入微生物细胞;另一方面,乙醇为辅底物有利于在微生物系统中实现辅酶的原位再生。酵母细胞中含有乙醇脱氢酶,当以乙醇为辅底物时,有利于辅酶 NADH 的再生。如图 3 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。因此选择乙醇为辅底物进一步研究。

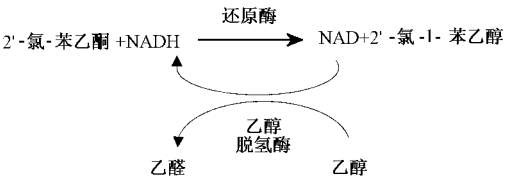


图 3 以乙醇为辅底物微生物实现辅酶原位再生的图解
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.3 乙醇浓度对反应产率的影响

以 *S. cerevisiae* B5 (细胞干重为 43mg) 对 2'-氯-苯乙醇(底物质量为 10mg) 的还原为例研究了乙醇浓度对反应产率的影响(图 4)。产物 R-2'-氯-1-苯乙醇的光学纯度均为 100%。说明乙醇浓度不同对酶的立体选择性无影响,但乙醇浓度不同对反应产率有显著影响。当乙醇浓度为 5% 时反应的产率高于 98% 随着乙醇浓度的增加,产率迅速下降,说明高浓度乙醇对氧化还原酶的活性有严重的抑制作用。以下实验均采用 5% 乙醇为辅底物进行研究。

2.4 缓冲液中的还原

以苯乙醇、2'-氯-苯乙醇、3'-氯-苯乙醇、4'-氯-苯乙醇和 2-氯甲基-苯乙醇为底物(均为 10mg),4 株酵母(细胞干重为 43mg) 能不同程度地还原上述 5 种底物(表 2)。通过不同菌株对底物还原立体选择性和产率的比较可以看出,4 种微生物不具有对苯乙醇的还原能力。*S. cerevisiae* B5 与 *C. pseudotropicalis* 104 对 4 种氯代苯乙醇的还原具有较好的立体选择性,*S. cerevisiae* B5 对底物还原的产率相对较高。根据以获得较好的立体选择性为前提,兼顾较高产率的原则,*S. cerevisiae* B5 对氯代苯乙醇选择性还原的效果最佳,它可将底物酮还原为 R 型醇。

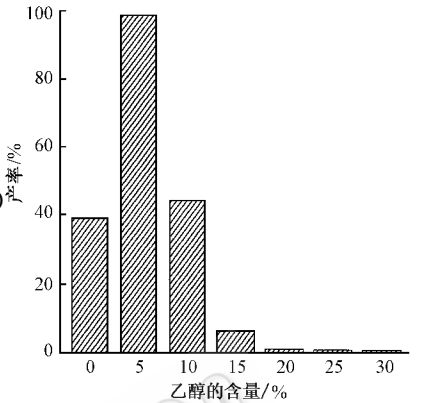


图 4 乙醇的含量对 *S. cerevisiae* B5 还原 2'-氯-苯乙醇(10mg) 产率的影响

表 2 在 pH7.0 缓冲液中微生物对 5 种底物酮的还原

底物	菌种	产率/%	对映体过剩值/%
<chem>Clc1ccccc1C(=O)C</chem>	1	17	100
	2	> 98	100
	3	> 98	98
	4	45	97
<chem>Clc1ccc(cc1)C(=O)C</chem>	1	0	/
	2	24	100
	3	0.8	100
	4	17	89
<chem>Clc1ccc(cc1)C(=O)C</chem>	1	27	67
	2	29	64
	3	3	65
	4	28	14 *
<chem>c1ccccc1C(=O)CCCl</chem>	1	30	74
	2	50	100
	3	48	100
	4	> 98	33 *
<chem>c1ccccc1C(=O)C</chem>	1	0	/
	2	0	/
	3	0	/
	4	0	/

1. *S. cerevisiae* P2 2. *S. cerevisiae* B5 3. *C. pseudotropicalis* 104 4. *C. utilis* 1257 ;* 产物为 S 型。
微生物对底物酮还原的立体选择性和产率与微生物所产氧化还原酶的种类、底物的空间结构有密切关系。*S. cerevisiae* B5 对 5 种底物的还原效果由好到差的顺序依次为 2'-氯-苯乙醇 2-氯甲基-苯乙醇, 4'-氯-苯乙醇, 3'-氯-苯乙醇 苯乙醇。*C. utilis* 1257 可将 2'-氯-苯乙醇和 3'-氯-苯乙醇还原为高光学纯度的 R 型醇,却将 2-氯甲基-苯乙醇和 4'-氯-苯乙醇还原成 S 型醇。微生物细胞中起作用的氧化还原酶作用于取代基不同位置的底物可产生不同构型的产物。*C. utilis* 1257 对底物的选择性不好。

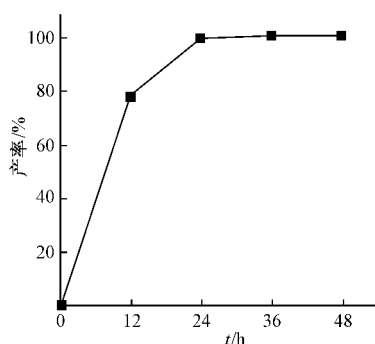


图5 *S. cerevisiae* B5
还原 2'-氯-苯乙酮的时间进程

2.5 *S. cerevisiae* B5 还原 2'-氯-苯乙酮的时间进程

S. cerevisiae B5 对 2'-氯-苯乙酮的还原能力最强, 实验进一步研究了 *S. cerevisiae* B5 还原 2'-氯-苯乙酮的时间进程。

在分散有细胞浓度为 2.15mg/mL(干重/反应体积) *S. cerevisiae* B5 的 pH7.0 的磷酸钠缓冲液中加入 10mg 2'-氯-苯乙酮和 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(图 5)。反应 24h 时, 产率 > 98%, 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%。

参 考 文 献

- [1] Kasai N, Suzuki T, Furukawa Y. Chiral C3 epoxides and halohydrins: their preparation and synthetic application. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998, **4**: 237 ~ 252.
- [2] 张毅立, 廖建, 陈代谟, 等. 苯乙醇胺类药物的不对称合成. 化学研究与应用, 1999, **11**(5): 480 ~ 483.
- [3] Chenevert R, Fortier G. Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of fluoxetine. *Chemistry Letters*, 1991, 1603 ~ 1606.
- [4] Corey E J, Reichard G A. Enantioselective and practical syntheses of R- and S-Fluoxetines. *Tetrahedron Letters*, 1989, **30**(39): 5207 ~ 5210.
- [5] 潘冰峰, 施邑屏, 李祖义. 不对称生物还原制备手性药物. 工业微生物, 1998, **28**(4): 42 ~ 45.
- [6] Shimizu S, Hattori S, Hata H, et al. Stereoselective enzymatic oxidation and reduction system for the production of (R)-pantoyl lactone from a racemic mixture of pantoyl lactone. *Enzyme Microb Technol*, 1987, **9**(7): 411 ~ 416.
- [7] Yasohara Y, Kizaki N, Hasegawa J, et al. Synthesis of optically active ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate by microbial reduction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 847 ~ 851.
- [8] 潘冰峰, 顾建新, 冯青. 白地霉 G38 生物转化制备抗忧郁药(R)-fluoxetine. 微生物学报, 1995, **35**(5): 353 ~ 357.
- [9] 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 Environment Microbiology*, 1990, **56**(8): 2374 ~ 2377.
- [10] Dahl A C, Fjeldberg M, Madsen J. Baker's yeast: improving the D-stereoselectivity in reduction of 3-oxo esters. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, **10**: 551 ~ 559.

Preparation of Chiral Alcohol by Stereoselective Reduction of Acetophenone and Chloroacetophenone with Yeast Cells

Ou Zhimin Wu Jianping Yang Lirong* Cen Peilin

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

Abstract: Four strains of microorganisms which have activity of chloroacetophenone reduction were screened, in which *Saccharomyces cerevisiae* B5 showed the highest activity and good stereoselectivity. This strains showed different activity on the reduction of various substrates in the following order: 2'-chloroacetophenone > 2-chloromethylacetophenone > 4'-chloroacetophenone > 3'-chloroacetophenone > acetophenone. Ethanol is the best cosubstrate and its optimal concentration is 5%.

Key words: Chloroacetophenone, Stereoselective reduction, Chiral alcohol

* Corresponding author. Tel 86-571-87952363; Fax 86-571-86912625; E-mail: lryang@zju.edu.cn

Received date 09-29-2002