

# 白地霉 G38 生物转化制备抗忧郁药 (R)-fluoxetine\*

潘冰峰 顾建新 冯 青 李祖义

(中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

**摘 要** 从 200 株菌中筛选出具有双酮化合物还原活力较高的菌株 7 株, 其中以白地霉 (*Geotrichum* sp.) G38 活力最高, 而且有较好的区域选择性和立体选择性。白地霉 G38 能对  $\beta$ -羰基苯丙酸乙酯进行不对称还原, 生成(R)- $\beta$ -羟基苯丙酸乙酯, 用于制备抗忧郁药(R)-fluoxetine。用二甲基硅橡胶包埋白地霉菌体取代替游离菌体进行生物转化, 可以提高反应的立体选择性, 对映体过量值从 49% 提高到 81%。

**关键词** 生物转化 白地霉 G38,  $\beta$ -羰基苯丙酸乙酯, (R)-fluoxetine

生命与手性密切相关, 凡涉及到生命现象和生理活性物质几乎都离不开有关分子的

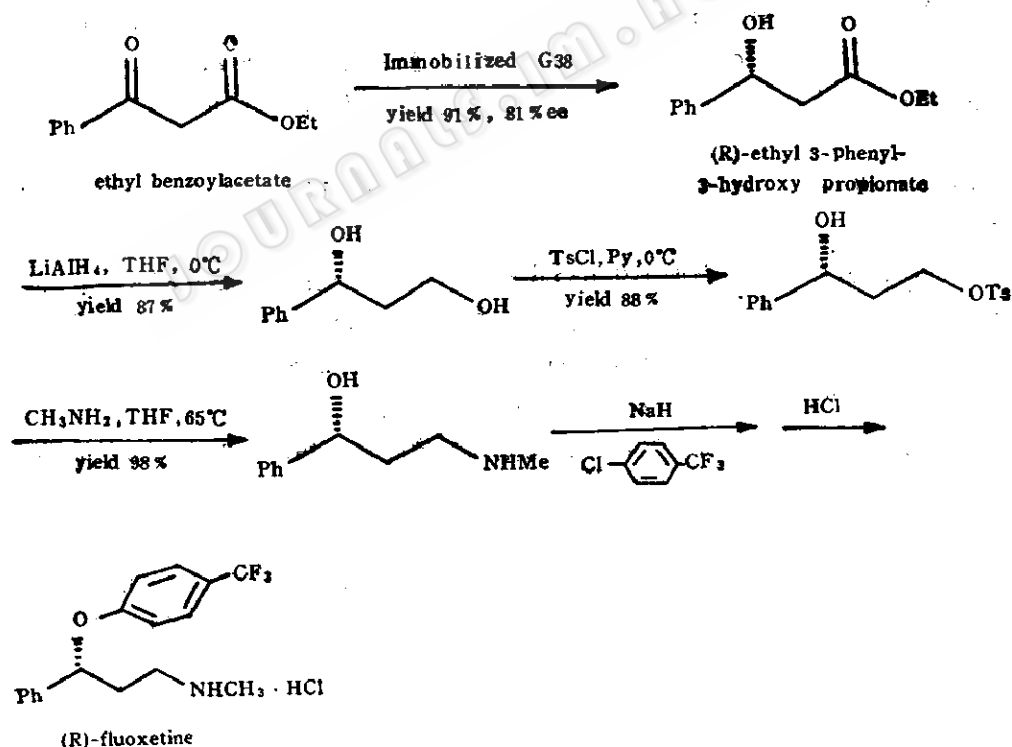


图 1  $\beta$ -羰基苯丙酸乙酯的微生物还原及用于 (R)-fluoxetine 的合成

Fig. 1 Synthesis of (R)-fluoxetine from ethyl benzoylacetate using microbial-chemical approach

\* 中国科学院“八·五”重点应用项目。  
本文于 1994 年 3 月 21 日收到。

空间立体构型问题,不同构型的手性分子具有不同的生理活性。利用酶反应的立体专一性,用生物转化法取代部分传统的化学方法,可以很方便地制备具有所需手性中心的化合物。因此,近年来生物转化在有机合成领域中的应用越来越广泛。其中研究和应用最广泛的是羰基还原,特别是 $\beta$ -羰基酯和羰基羧酸的不对称还原<sup>[1]</sup>。

我们筛选出一株白地霉(*Geotrichum* sp.) G38,可以不对称还原双酮化合物,显示出良好的立体选择性和区域选择性,并有较高的活力。用此菌株对 $\beta$ -羰基苯丙酸乙酯进行不对称还原,再经四步反应合成了(R)-fluoxetine(图1),它是一种有效的抗忧郁药物。最近的研究表明,它对治疗焦虑不安、酒精中毒、过度肥胖和慢性疼痛等也有良好的效果<sup>[2]</sup>。本文对生物转化的条件进行了研究,确定了最适条件,并发现用二甲基硅橡胶包埋的细胞代替游离细胞进行生物转化,可以提高对映体过量值。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

黑曲霉(*Asp. niger*) A15、A22、A31;白地霉(*Geotrichum* sp.) G38、G39、G95;啤酒酵母(*Saccharomyces* sp.) S44均由本实验室筛选获得。

### 1.2 培养基

1.2.1 PDA斜面培养基(%):马铃薯20,蔗糖(或葡萄糖)2,琼脂2,自然pH。

1.2.2 沙氏斜面培养基(%):葡萄糖2,酵母膏1,蛋白胨1,琼脂2,自然pH。

1.2.3 培养液A(%):葡萄糖2,酵母膏0.5,大豆粉0.5,氯化钠0.5,磷酸氢二钾0.5, pH6.5。

1.2.4 培养液B(%):葡萄糖10,酵母膏1,尿素0.1, pH6.5。

### 1.3 菌体培养

1.3.1 黑曲霉:将在PDA斜面上生长3d的菌体,挑一白金耳于培养液A上,28℃往复摇床(120r/min)培养40~48h,纱布过滤后得菌丝体,再用0.8%氯化钠洗涤三次。

1.3.2 啤酒酵母:经沙氏斜面培养2d后,接于培养液B,28℃往复摇床培养48h,离心(3500r/min, 10min)后可得菌体,再用0.8%氯化钠洗涤三次。

1.3.3 白地霉:从在沙氏斜面上生长良好的菌体中挑少许于培养液B中,28℃往复摇床培养48h,过滤,0.8%氯化钠洗涤三次。

### 1.4 白地霉 G38 的固定化

二甲基硅橡胶5g,羟基硅油0.5g,正硅酸乙酯0.25g和辛酸亚锡0.07g混和均匀,加入湿白地霉菌体0.5g,搅拌均匀,在室温搅拌下将此混和物缓慢倒入万分之一鼠李糖脂溶液中,继续搅拌2h,即可得到颗粒状的固定化细胞。

### 1.5 双酮化合物的还原

取0.2g菌体置于pH7.0的磷酸缓冲液中,加入5mg底物,在30℃振荡反应24h。

### 1.6 分离纯化及分析

反应结束后,用乙醚提取,硫酸镁干燥后减压除去溶剂,用HPLC定量分析还原情况。Shimadus LC-6M高压液相仪,色谱柱:Shim-pack CLC-ODS(6mm×15cm);柱温:30℃,流速:1ml/min,流动相:正己烷:异丙醇(20:1,V/V),检测:UV 254或

示差。

产物结构分析使用 IR-440 红外仪和 EM-360, XL-200 核磁共振仪。产物旋光度测定使用 Perkin-Elmer241MC 旋光仪。

$\beta$ -羟基苯丙酸乙酯光学纯度测定: 将  $\beta$ -羟基苯丙酸乙酯与 MPPA-Cl 反应制成 Mosher 酯以后用 GC 分析 (FFAP, 50m  $\times$  0.2mm, 220 $^{\circ}$ C)。

## 2 结果和讨论

### 2.1 高活力双酮化合物还原菌株的筛选

以 1-苯-1, 3-丁二酮和 1, 2-二苯乙二酮为底物, 从 100 株酵母菌和 100 株霉菌中筛选出七株能不同程度还原上述底物的菌株(见表 1)。还原产物经 IR 和 NMR 分析, 分别为 1-苯-3-羟基丁酮和 1, 2-二苯羟基乙酮。在这七株菌株中, 以白地霉 G38 活力最高, 它的还原产物旋光度分别为  $[\alpha]_D = -44.4^{\circ}$  ( $c = 0.6$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $ee = 95\%$ , [文献 [3]  $[\alpha]_D = -46.6^{\circ}$  ( $c = 7.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )] 和  $[\alpha]_D = 109.3^{\circ}$  ( $c = 2.2$ , 丙酮),  $ee = 93\%$ , [文献 [4]  $[\alpha]_D = -114^{\circ}$  ( $c = 1.54$ , 丙酮)], 绝对构型分别为 R 和 S。以上数据表明, 白地霉对双酮化合物的还原不仅具有较高的活力, 而且具有较好的区域选择性和立体选择性。

表 1 微生物对 1-苯-1, 3-丁二酮和 1, 2-二苯乙二酮的还原  
Table 1 Microbial reduction of 1-phenyl-1, 3-butanedione and benzil

菌 种 Strain	转 化 率 Conversion (%)	
	1-苯-1, 3-丁二酮 1-phenyl-1, 3-butanedione	1, 2-二苯乙二酮 benzil
<i>Asp. niger</i> A15	55.2	87.9
A22	51.9	80.4
A31	18.3	53.1
<i>Saccharomyces</i> S44	37.3	42.7
<i>Geotrichum</i> sp. G38	90.5	92.2
G39	85.5	88.1
G95	78.8	81.2

### 2.2 白地霉 G38 还原 $\beta$ -羟基苯丙酸乙酯

取 50 g 白地霉 G38 湿菌体悬浮于 0.1 mol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液 250 ml 中, 加入  $\beta$ -羟基苯丙酸乙酯 1.0 g, 30 $^{\circ}$ C 下振荡反应 48 h, 过滤除去细胞, 水相用乙醚提取, 干燥后减压除去乙醚, 柱层析分离纯化产物 (石油醚: 乙酸乙酯, 10:3, V/V), 得产物 830 mg, 产率为 83%。产物经红外、核磁和质谱分析为  $\beta$ -羟基苯丙酸乙酯。  $[\alpha]_D = -26.5^{\circ}$  ( $c = 1.9$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), 49% ee, 产物为 R 型。

IR(neat): 3100—3480, 2965, 1735, 1630, 1590, 1500  $\text{cm}^{-1}$ ;

NMR( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_H$  1.1(t, J = 7.5 Hz, 3H), 2.6(d, J = 7 Hz, 2H), 2.9(s, 1H)  
4.05(q, J = 7.5 Hz, 2H), 5.01(t, J = 7 Hz, 1H), 7.26(m, 5H);

MS: 194(M), 177, 176, 121, 103, 91, 77。

### 2.3 溶液 pH 对转化率的影响

将 0.2 g 菌体及 5 mg  $\beta$ -羧基苯丙酸乙酯分别置于 20 ml 不同 pH 的磷酸缓冲液中, 30℃ 振荡反应 24 h, 转化率见图 2。当 pH 在 6.0~8.0 之间时, 转化率最高。

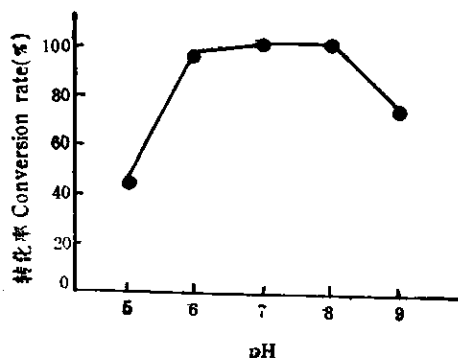


图 2 pH 对转化率的影响

Fig. 2 Effect of pH on conversion rate

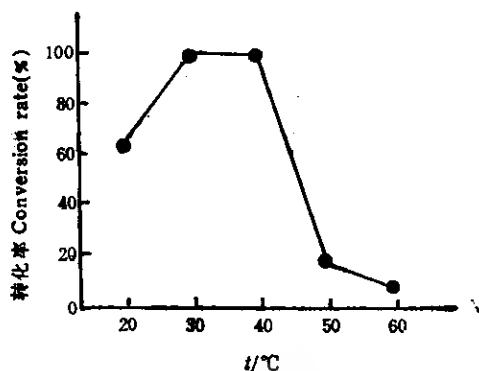


图 3 反应温度对转化率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on conversion rate

### 2.4 反应温度对转化率的影响

0.2 g 菌体和 5 mg 底物加入 20 ml 0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液中, 于不同温度下反应 24 h, 转化率见图 3。当温度在 30~40℃ 时, 转化率最高。

### 2.5 通气量对转化率的影响

20 ml 反应液分别在 50 ml、100 ml、150 ml 和 250 ml 纱布封口的三角瓶中以及密闭不透气的三角瓶中于 30℃ 振荡反应 24 h, 它们的转化率分别为 92.1%、90.5%、94.5%、93.4% 和 93.0%。结果表明通气量对转化率没有明显的影响。

### 2.6 不同反应溶液对转化率的影响

0.2 g 菌体和 5 mg 底物分别置于 20 ml 生理盐水、自来水、5% 葡萄糖溶液、5% 蔗糖溶液和 0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液中, 30℃ 振荡反应 24 h, 转化率分别为 95.1%、98.0%、97.6%、94.3% 和 98.5%。结果表明不同的反应溶液对还原率影响不明显。

### 2.7 表面活性剂对反应转化率的影响

$\beta$ -羧基苯丙酸乙酯是较难溶于水的化合物, 而表面活性剂可以增加有机物在水中的溶解度, 从而有可能加快反应速度, 提高反应转化率。我们在反应液中分别加 0.2% 的蔗糖酯、鼠李糖脂、槐糖脂、槐糖乙酯、Tween 60, 以不加表面活性剂的作为对照, 30℃ 振荡反应 24 h, 转化率分别为 97.9%、86.1%、49.5%、30.2%、97.9% 和 95.9%。结果表明除了蔗糖酯和 Tween 60 可以稍提高反应转化率外, 其他三种表面活性剂都不同程度降低了反应的转化率。

### 2.8 用固定化白地霉还原 $\beta$ -羧基苯丙酸乙酯

用固定化细胞取代游离细胞进行生物转化有许多优点, 特别是有可能提高反应的立体选择性<sup>[7]</sup>。我们选择二甲基硅橡胶作为包埋材料, 因为包埋条件温和, 颗粒强度好, 毒性低, 具有优良的通气性等<sup>[6]</sup>, 而且由于二甲基硅橡胶具有疏水性, 因此对于疏水性底物

更具优越性。

取相当于 25 g 湿菌体的固定化白地霉 G38 悬浮于 0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液中,加入  $\beta$ -羧基苯丙酸乙酯 1.0 g, 30℃ 下振荡反应 48 h, 过滤除去固定化细胞。按前述方法分离纯化得产物 910 mg, 产率为 91%,  $[\alpha]_D = 43.9^\circ$  ( $c = 1.9$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), 81%ee。

从上述结果可看出,用固定化细胞取代游离细胞进行  $\beta$ -羧基苯丙酸乙酯的还原,不仅使菌体利用率和产率提高,而且产物的光学纯度也有很大的提高。

### 参 考 文 献

- [1] Ward O P, Young C S. *Enzyme Microb Technol*, 1990, 12(7): 482~493.
- [2] Murphy D L, Mueller E A, Garrick N A *et al.* *J Clin Psychiatry*, 1986, 47(4, suppl.): 9~15.
- [3] Glanzer B I, Faber K, Griengl H. *Enzyme Microb Technol*, 1988, 10(12): 744~749.
- [4] Konishi J, Ohta H, Tsuchihashi G I. *Chem Lett*, 1985, 8:1111~1112.
- [5] Sakai T, Nakamura T, Fukuda K *et al.* *Bull Chem Soc Jpn*, 1986, 59(10): 3185~3188.
- [6] Oreel P. *Enzyme Microb Technol*, 1988, 10(9): 518~523.

## ISOLATION OF A STRAIN OF HIGH ACTIVITY OF DICARBONYL COMPOUND REDUCTION— *GEOTRICHUM* sp. G38 AND USED IN PREPARATION OF (R)-FLUOXETINE

Pan Bingfeng Gu Jianxin Feng Qing Li Zuyi

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai 200032)

**Abstract** Seven strains of microorganisms which have activity of dicarbonyl compound reduction were isolated, in which *Geotrichum* sp. G38 showed the highest activity and good regioselectivity and stereoselectivity. Using *Geotrichum* sp. G38, ethyl benzoylacetate was reduced to (R)-ethyl 3-Phenyl-3-hydroxy propionate which was the intermediate in preparing (R)-fluoxetine. The ee value was improved from 49% to 81% when silicone-immobilized cells was used instead of free cells in biotransformation.

**Key words** Biotransformation, *Geotrichum* sp. G38, Ethyl benzoylacetate, (R)-fluoxetine