

酵母细胞催化 4-氯-乙酰乙酸乙酯的 不对称还原反应

闫 婕 陈五岭 秦 蓉

(西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:研究了酵母细胞催化 4-氯-乙酰乙酸乙酯还原为手性化合物 4-氯-(S)-3-羟基丁酸乙酯反应的工艺条件, 讨论反应条件对产物得率及对映体过量(e. e. 值)的影响。将质量分数 5% 的酵母加入培养基中静置培养 12 h 后, 加入 20% 质量分数的蔗糖、2.5% 质量分数的底物, 在 30℃、pH 值 7.2、200 r/min 振荡培养 8 h, 最大产率和产物 e. e. 值分别可达 91.7% 和 97.8%。而手性助剂 L-谷氨酰胺和 L-半胱氨酸并未对实验结果有明显影响。

关键词:酵母; 不对称还原; 4-氯-(S)-3-羟基丁酸乙酯

中图分类号: R972; TQ929

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)04-0046-03

Asymmetric bioreduction of ethyl-4-chloro-acepoacepape catalyzed by baker's yeast

YAN Jie, CHEN Wu-ling, QIN Rong

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Asymmetric bioreduction of the chiral compound (s) ethyl-4-chloro-3-hydroxybutanoate from ethyl-4-chloro-acepoacepape by yeast cells, and the effects of some conditions on the yield and enantiometric excess (e. e.) of the product were studied. When 20% of sucrose as energy source, 5% of yeast and 2.5% of substrate were added to the reaction, at 30℃ and pH value 7.2, the maximum yield and e. e. of the product is as high as 91.7% and 97.8%, respectively, after 8 hours of vibration cultivation. L-glutamine and L-cysteine as additives didn't affect the results obviously.

Key words: yeast; asymmetric bioreduction; (s) ethyl-4-chloro-3-hydroxybutanoate

人体内的生物大分子如蛋白质、核酸、多糖等具有不同的立体构型, 药物分子空间排列上的微小差别就可导致与生物大分子亲和力的明显差异, 进而影响药物的药理作用、临床效果和毒副作用等。现在世界各大制药公司、研究机构竞相进行手性药物的研究与开发, 而我国的相关研究尚处于起步阶段。4-氯-(S)-3-羟基丁酸乙酯是抗高血压和抗心绞痛药物氨氯地平(Amlodipine)的重要手性中间体, 国内尚未见利用酵母细胞还原 4-氯-乙酰乙酸乙酯的相关报道。笔者利用酵母细胞还原 4-氯-乙酰乙酸乙酯为 4-氯-(S)-3-羟基丁酸乙酯, 初步摸索其反应的最佳条件。

1 材料和方法

1.1 材料

酵母菌种, 自保藏菌种; 4-氯-乙酰乙酸乙酯, 西安太宝化工有限责任公司; 其他试剂为市售分析纯。

1.2 实验方法

培养基的配制: 蔗糖 3%, K_2HPO_4 0.6%, KH_2PO_4 0.6%, $MgSO_4$ 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.8% (以上均为质量分数, 下同), pH 值自然, 按以上配方配制液体培养基, 121℃, 30 min 灭菌后备用。

酵母细胞培养: 将保藏菌种转入豆芽汁半固体培养基活化 5 代后, 加入上述配方的液体培养基静置培养 12 h。

酵母细胞转化: 向已培养好的酵母醪液中加入反应体系, 蔗糖 20%, 底物 2.5%, 200 r/min 振荡培养 8 h, 整个过程应维持 pH 值 7.2, 恒温 30℃。

1.3 测定方法

反应液中产物得率的测定采用气相色谱仪(上海分析仪器厂, 102GD 型)。色谱条件为: 色谱柱 $\Phi 2 \text{ mm} \times 3 \text{ 000 mm}$, 有机 401 担体涂 SE-30 硅酮固定液, 柱前压 0.32 MPa, 柱温 265℃; 氢气作载气。测定时取 1 mL 反应液, 加入 40 μL 正辛醇(内标物)和 1 mL 乙酸乙酯(萃取剂), 用振荡器振荡 5 min; 离

心2 min(10 000 r/min)后,取 10 μ L 有机相进行气相色谱分析。根据4-氯-3-羟基丁酸乙酯,正辛醇的出峰峰高和事先测出的相对校正因子,可计算出反应液中4-氯-3-羟基丁酸乙酯的浓度。

产物对映体过量值的测量所用仪器为数字式自动旋光仪(WZZ-1S型,上海物理光学仪器厂)。在反应结束后取反应液 10 mL,加入 10 mL 乙酸乙酯,用振荡器振荡混合 5 min,再离心(3 500 r/min) 10 min 使两相分层;将有机相移入旋光管,补加乙酸乙酯至充满,充分混合后,测定旋光度 α 值。从测好旋光值的有机相中取样 1 mL,加 40 μ L 十三烷(内标物),混匀后取 10 μ L 进行气相色谱分析。根据4-氯-3-羟基丁酸乙酯与十三烷的出峰峰高和事先测出的相对校正因子计算出旋光管中4-氯-3-羟基丁酸乙酯的浓度 c 。

2 结果与讨论

2.1 不同菌种对转化反应的影响

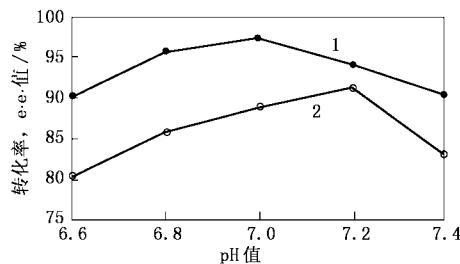
张金红等^[1]实验证明:不同的菌种对同一种的化合物转化效果不同。本实验结果亦显示不同的菌种对4-氯-乙酰乙酸乙酯的转化效果有较大差别,其中酵母2的产物得率和产物对映体过量百分数(e.e. 值)都较理想,具有大规模工业生产价值。

表1 不同菌种对转化反应的影响

菌种	产率/%	e.e. 值/%
酵母1	88.2	52.5
酵母2	82.7	96.3
酵母3	85.2	61.7
酵母4	82.0	68.9

2.2 pH 值对转化反应的影响

将反应体系的 pH 值控制在不同范围,其余条件不变,测定不同的酸碱度对转化反应结果的影响,结果如图1。实验结果显示:pH 值不仅影响反应速度,而且影响产率和产物 e.e. 值。这与姜文勇^[2]等的试验结果相似。图1表明使用酵母细胞进行转化反应适宜的 pH 值为 7.2。

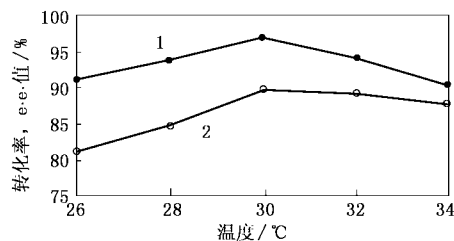


1—e.e. 值;2—转化率

图1 pH 对转化反应的影响

2.3 温度对转化反应的影响

反应温度低于 30 $^{\circ}$ C 时,随着温度的升高,产率及产物的 e.e. 值逐渐增大,高于 30 $^{\circ}$ C 后,e.e. 值继续缓慢增大,但产率却显著下降。其原因可能是因为温度过高,底物开始挥发并且水解速度加快,最终导致产物得率下降。由图2中可看出反应温度为 30 $^{\circ}$ C 时,转化反应的效果最为理想。



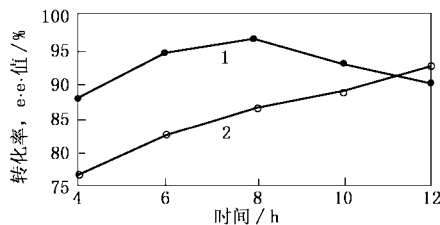
1—e.e. 值;2—转化率

图2 温度对转化反应的影响

2.4 反应时间对转化反应的影响

反应时间过短,则底物转化不完全,底物利用率低,产物得率低;反应时间过长,产物得率升高,但由于产物开始出现消旋化,所以其 e.e. 值亦开始下降。

图3是反应时间对转化反应的影响。



1—e.e. 值;2—转化率

图3 反应时间对转化反应的影响

(上接第15页)

参考文献

[1] 欧胜彬,杨辉,等.[J].广西轻工业,2002,(4):10-12.
 [2] 吴振强,梁世中.[J].环境污染与防治,2002,(1):13-16.
 [3] 林树钱.中国药用菌生产与产品开发[M].北京:中国农业出版社,2000.331-332.

[4] 林鹿,高等.[J].环境科学,1997,18(1):23-25.
 [5] Lopez M J, Elorrieta M A, et al.[J].Bioresource Technology,2002,81:123-129.
 [6] 冉艳红,于淑娟,杨连生,等.[J].微生物学通报,2003,2:32-36.
 [7] 冉艳红,于淑娟,杨连生,等.[J].华南理工大学学报,2003,3:40-44. ■

2.5 蔗糖浓度对转化反应的影响

蔗糖为酵母菌的生长提供能源,但所加入的蔗糖的浓度又会对转化反应产生影响。蔗糖含量过低,会导致酵母菌因能源供应不足而使生长受限,体内的相关酶将减少合成甚至停止合成,从而影响转化效果。但在反应体系中过多地加入蔗糖却会使转化率降低,这可能是由于高浓度糖液加大了渗透压,从而改变了细胞膜的通透性或者抑制了酵母菌的生长所引起的,确切原因有待进一步研究。

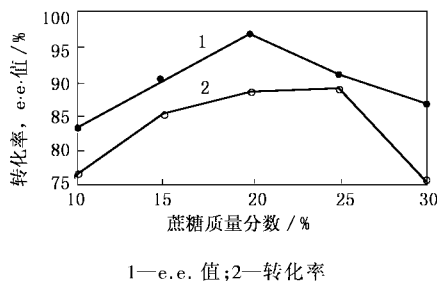


图 4 蔗糖浓度对转化反应的影响

2.6 底物浓度对转化反应的影响

以不同的比例向反应体系中加入 4-氯-乙酰乙酸乙酯,测定不同的底物加入量对反应结果的影响。如图 5 所显示,如果底物加量过小,反应结束时产物得率会太低;但如果加量过大,会因底物对细胞和酶均有较强的毒性,易对其产生抑制作用而导致反应不完全,产率低且残留大。这与王佳亮等^[3]得到的结果一致。

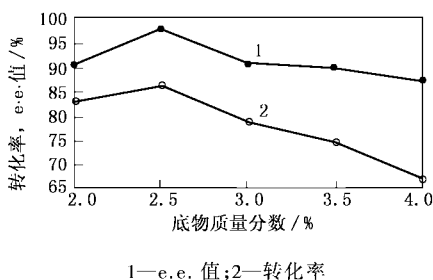


图 5 底物浓度对转化反应的影响

2.7 手性助剂对转化反应的影响

李关宾等^[4]曾利用 *L*-谷氨酰胺有效拆分几种药物旋光对映体。Hayakawa R 等^[5]用 *L*-半胱氨酸

做手性助剂进行拆分也取得了不错的效果。因为未见有手性助剂用于生物转化试验的相关报道,故在本次试验中,安排以下一组试验,用以测试手性助剂对不对称还原是否有影响。在其他实验条件相同的条件下,第一、二组平行样分别加入 1 g *L*-谷氨酰胺和 1 g *L*-半胱氨酸,第三组不加任何手性助剂作为对照组。结果显示 *L*-谷氨酰胺和 *L*-半胱氨酸并未明显改变产率或 e.e. 值。

表 2 手性助剂对转化反应的影响

菌株	产率 / %	e.e. 值 / %
<i>L</i> -谷氨酰胺	84.1	97.1
<i>L</i> -半胱氨酸	85.3	96.0
对照组	84.9	96.4

3 结语

研究探索了利用酵母活细胞开发光学纯的医药中间体,以期得到反应条件温和、光学纯度高、收率高的试验路线。利用酵母细胞催化 4-氯-乙酰乙酸乙酯的不对称还原反应的适宜反应条件为:将酵母以 5% 的比例加入培养基中静置培养 12 h 后,加入 20% 的蔗糖,2.5% 底物,温度 30℃,pH 值 7.2,200 r/min 振荡培养 8 h,而手性助剂 *L*-谷氨酰胺和 *L*-半胱氨酸并未对实验结果有明显影响。另外在实验中还发现,如果在反应体系中加入合适的缓冲体系,可维持反应体系 pH 的长时间稳定,且对试验结果有显著的影响。

参考文献

- [1] 张金红,姚传义,俞耀庭,等.[J].南开大学学报,1999,32(4):39-41.
- [2] 姜文勇,宗敏华,范晓丹,等.[J].生物化学与生物物理进展,2002,29(2):297-301.
- [3] 王佳亮,王建军,杨柳,等.[J].生物工程学报,2001,17(4):467-470.
- [4] 李关宾,林秀丽,主沉浮,等.[J].分析化学研究简报,2000,28(10):1287-1290.
- [5] Hayakawa R, Shimizu M.[J].Synlett,1999,(8):1298. ■

国际橡塑展将于 6 月召开

“第十八届中国国际塑料橡胶工业展览会”将于 2004 年 6 月 29 日~7 月 2 日在上海新国际博览中心举行。该展由香港雅式展览公司主办,并已连续第十五年获得欧洲塑料和橡胶工业机械制造商协会(EUROMAP)独家赞助,多年来得到多个海外及国内专业协会的鼎力支持。

鉴于去年展会期间共吸引 4 万多名来自 64 个国家及地区的观众,因此主办方计划全数租用 5 个大型展馆,并设有 7 个产品专区,以为海内外各参展商提供最优质的服务。