

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2006 )17-1555-04

## 酵母发酵液催化不对称还原反应合成( S )-4-氯-3-羟基-丁酸乙酯的条件优化

马小魁 ( 陕西师范大学生命科学院 陕西 西安 710062 )

**Optimization for the asymmetric synthesis of ( S )-ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate directly catalyzed by yeast fermentation broth**

MA Xiao-Kui

College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**【Abstract】** AIM : To optimize the asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate ( COBE ) to ( S )-ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate [ ( S )-CHBE ] directly catalyzed by yeast ( *Saccharomyces cerevisiae* ) fermentation broth. **METHODS** : The variation of COBE, ( S )-CHBE and reductive sugar in reaction course and the influence of some reaction conditions ( substrate, energy source ) on asymmetric synthesis of ( S )-CHBE directly catalyzed by yeast fermentation broth were examined respectively, and the optimal conditions of asymmetric synthesis of ( S )-CHBE were optimized by orthogonal test design. **RESULTS** : The consumption of substrate and formation of product were mostly in the initial reaction course as well as consumption of reductive sugar. Repeated feeding strategy of substrate and energy source was favored for the formation of ( S )-CHBE. The optimum reaction conditions were sucrose repeated feeding strategy II ( feeding 5 g/120 mL after 2 h of reaction ), substrate feeding strategy IV [ 0.5( 3 ) ], buffer concentration 2 g/120 mL,  $\beta$ -cyclodextrin concentration 2 g/120 mL. **CONCLUSION** : Optically active ( S )-CHBE is synthesized by yeast fermentation broth with 96% yield and 100% ee ( enantiometric excess ) under the optimum reaction conditions.

**【Keywords】** yeast fermentation broth; asymmetric reduction; ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate; ( S )-ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate; orthogonal text

**【摘要】**目的 : 优化酵母发酵液直接催化4-氯乙酰乙酸乙酯( COBE )合成( S )-4-氯-3-羟基-丁酸乙酯( ( S )-CHBE )的反应条件。方法 : 考察酵母发酵液催化该反应过程中基质变化的规律, 研究底物和能源供体对反应的影响, 并通过正交实验设计法优化反应条件。结果 : 在酵母发酵液催化 COBE 不对称

还原反应的过程中, 底物和还原糖消耗、产物合成相对集中在反应的前期, 反复分批式添加底物和蔗糖有利于反应效率的提高; 正交实验优化反应条件的结果表明, 酵母发酵液直接催化 COBE 不对称还原反应合成( S )-CHBE 的最佳反应条件为: 蔗糖添加方式 II( 反应开始 2 h 后添加 5 g/120 mL ), 底物添加方式 IV [ 0.5( 3 ) ], 缓冲剂添加量 2 g/120 mL,  $\beta$ -环糊精添加量为 2 g/120 mL, 反应后测定产物的产率达 96%, ee( 对映体过量值 ) 达 100%。结论 : 通过反应条件优化提高了酵母发酵液的催化效果。

**【关键词】** 酵母发酵液; 不对称还原反应; 4-氯乙酰乙酸乙酯; ( S )-4-氯-3-羟基-丁酸乙酯; 正交实验

**【中图分类号】** Q554.3 **【文献标识码】** A

## 0 引言

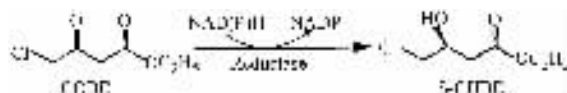
近年来, 通过生物催化剂<sup>[1-3]</sup>催化羰基化合物的不对称还原反应合成光学活性醇的相关研究备受关注。其中( S )-CHBE 是合成降血脂、降胆固醇、心血管药及抗生素等药物的光学活性中间体, 市场需求很大。有关利用酵母干细胞和基因工程菌催化 COBE 不对称还原反应合成( S )-CHBE 的报道多为基础性研究<sup>[4-5]</sup>。我们在前期研究酵母发酵液直接催化 COBE 不对称还原反应合成( S )-CHBE 反应的基础上<sup>[6]</sup>, 进一步考察反应过程中基质的变化规律和底物、能源供体及添加方式对反应的不同影响, 优化反应条件, 为建立成熟的生产操作工艺条件奠定技术基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  为市售化学纯, 其他材料参照文献[6]的实验部分 1.1 试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 目标化合物的合成路线** 酵母发酵液催化 COBE 的不对称还原反应合成( S )-CHBE 的合成路线为:



**1.2.2 生物催化剂制备** 参照文献[6]实验部分 1.2 的方法培养酵母发酵液作为生物催化剂。

收稿日期 2006-05-08; 接受日期 2006-06-19

作者简介: 马小魁, 讲师。Tel: (029) 85308451 Email: bioma2003@

163.com

1.2.3 酵母发酵液催化 COBE 不对称还原反应合成 (S)-CHBE 反应条件和过程基本参考文献 [6] 实验部分 1.3 COBE 的不对称还原反应, 其中手性添加剂改为  $\beta$ -环糊精 1.2 g, 缓冲剂改为  $K_2HPO_4-Na_2CO_3$  (8/2, m/m) 1 g, 其他反应条件改为文献 [6] 报道的优化条件, 即 酵母菌最佳培养时间为 16~18 h, 最佳反应温度和 pH 值分别为 29~31℃ 和 7.2.

1.2.4 底物和产物浓度测定 参照文献 [6] 实验部分 1.3.

1.2.5 反应产物产率和光学纯度的分析计算 以产物产率 (Y) 和对映体过量值 (ee) 表示反应的程度和产物的光学纯度, 其表达式分别如下:

$$Y = \frac{n_{S-CHBE}}{n_{COBE}} \times 100\%$$

式中  $n_{COBE}$  为反应初始时底物 COBE 的摩尔数,  $n_{S-CHBE}$  为反应结束后产物 (S)-CHBE 的摩尔数.

$$ee = \frac{c_S - c_R}{c_S + c_R} \times 100\%$$

式中  $c_S$  和  $c_R$  分别为 S 型和 R 型产物的浓度.

1.2.6 还原糖测定 采用 DNS 法.

1.2.7 酵母发酵液催化不对称还原反应 ( $V_{COBE} = 1.5$  mL) 的条件优化 采用正交实验设计法安排实验考察底物和蔗糖添加方式、 $\beta$ -环糊精和缓冲剂 ( $K_2HPO_4-Na_2CO_3$  (8/2, m/m)) 添加量等因素对酵母发酵液催化 1.5 mL COBE (相当于 91 mmol/L) 不对称还原反应合成 (S)-CHBE 反应的影响. 底物添加方式分别考察: I 一次性加入底物 1.5 mL; 反复分批式补加底物 (包括: II 开始时加入 1.0 mL, 在反应进行 2 h 后再补加 0.5 mL; III 反应开始时加入 1.0 mL, 反应开始 4 h 后再补加 0.5 mL; IV 反应开始时加入 0.5 mL, 后每隔 2 h 加入 0.5 mL 两次, 即 0.5 (3)). 蔗糖添加方式分别考察: I 一次性加入 15 g; 反复分批式补加 (包括: II 反应开始时加入 10 g, 反应进行 2 h 后再补加 5 g; III 反应开始时加入 10 g, 反应开始 4 h 后补加 5 g 等方式). 选择  $L_9(3^4)$  正交表进行表头设计、安排和实施试验.

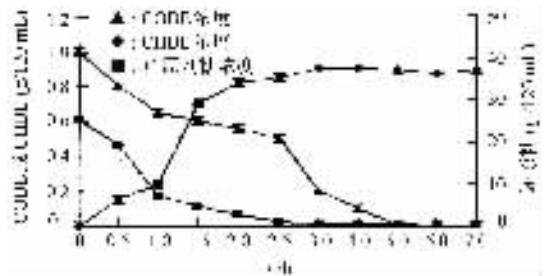
统计学处理: 用正交设计助手 II v3.1 (专业版) 统计软件分析 (F 检验) 实验结果.

## 2 结果

### 2.1 COBE 不对称还原反应过程中的基质变化规律

在酵母发酵液催化 COBE 不对称还原反应合成 (S)-CHBE 的反应过程中, 底物和产物随反应时间的变化规律 (图 1) 显示: 在酵母发酵液催化 COBE 不对称还原反应的过程中, 底物和还原糖消耗、产物合成

相对集中在反应的前期, 在反应开始前 4 h 内, 底物消耗快, 产物生成多, 在反应后期, 两者的变化都不是很明显, 还原糖在反应开始后的前 3 h 内下降很快, 后期的变化不明显. 因此, 在反应条件控制优化中要注意反应过程前期工艺条件的控制, 降低反应的初始底物浓度, 提高反应效率. 从多次实验看, 反应时间为 7 h 为好.



COBE 4-氯乙酰乙酸乙酯 (S)-CHBE (S)-4-氯-3-羟基-丁酸乙酯. 反应条件: 酵母发酵液 120 mL,  $V_{COBE} = 1$  mL, pH = 7.0, T = 30℃, 摇床转速 220 r/min,  $\beta$ -环糊精 1.2 g; 以下反应条件除非注明和此相同.

图 1 酵母发酵液催化不对称还原反应合成 (S)-CHBE 过程中基质的变化规律

2.2 底物浓度和添加方式对反应的影响 以酵母发酵液催化不同浓度 COBE 的不对称还原反应, 结果 (图 2) 显示: 随着 COBE 的浓度增大, 反应产物产率先是增大, 然后逐渐减小, 产物光学纯度随着底物浓度的增大一直递减; 当底物浓度超过一定值 (1.4 g/100 mL) 时, 底物残留量逐渐增多.

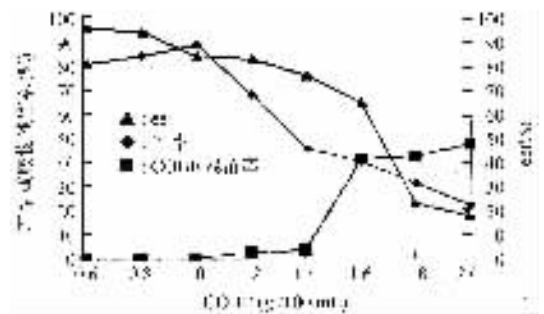


图 2 底物初始浓度对酵母发酵液催化 COBE 不对称还原反应的影响

为了增大底物的投放量, 将 1.5 mL COBE 分别采用不同的方式添加后进行反应, 反应结果显示: 一次性加入底物 1.5 mL (方式 I) 时, 底物残留 59.4%, 产物产率和光学纯度分别为 67.5% 和 84.0%; 反复分批式补料的三种方式对反应较为有利, 以方式 III 添加底物时, 即反应开始时加入 1.0 mL, 反应开始 4 h 后补加 0.5 mL, 反应结束后底物残留稍多, 产物产率和光学纯度分别达到 86.0% 和 89.5%; 其他两种反

复分批式补料方式比以方式Ⅲ添加底物时对反应更为有利。为了提高底物的初始浓度,在以下的多因素优化实验中,考察当以方式Ⅰ和反复分批式方式Ⅱ和Ⅳ分别添加底物时对反应的影响。

**2.3 能源供体对反应的影响** 考察五种能源供体对酵母发酵液催化还原反应的不同影响,结果(图3)显示:以蔗糖为能源时,酵母发酵液催化COBE还原生成(S)-CHBE的产率和对映体过量值最高,底物残余量最少,以乙醇作为能源供体时,反应的产率和对映体过量值很低,但是组间比较没有显著性。由于乙醇作为酵母菌生物催化还原反应的产物之一,可能会抑制酵母菌转化酶的活性。反应过程中观察到以乙醇为能源供体时,底物残留量大,刺激性气味浓,没有酵母菌发酵培养时的固有香味。以下实验,以蔗糖作为酵母发酵液催化COBE不对称还原反应的能源物质。

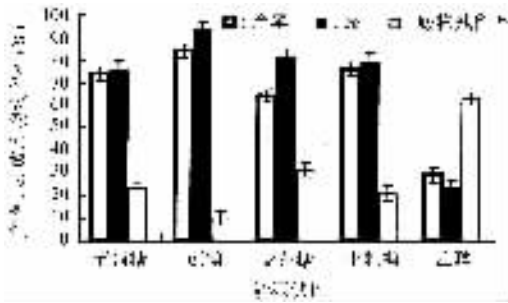


图3 能源供体对酵母发酵液催化不对称还原反应合成(S)-CHBE产物的影响( $\bar{x} \pm s$ )

考察了能源供体蔗糖的浓度对酵母发酵液催化不对称还原反应合成(S)-CHBE的影响,结果(图4)显示,增加蔗糖浓度在一定范围内有利于反应效率的提高,当蔗糖浓度超过12.5 g/100 mL(即15 g/120 mL)时,可以观察到在反应体系中有蔗糖颗粒的存在,随着反应的进行,过量的蔗糖会逐渐溶解,但反应体系溶液的粘度很大,产物提取困难。综合来看,蔗糖的初始浓度以8.33 g/100 mL(即10 g/120 mL)较好。

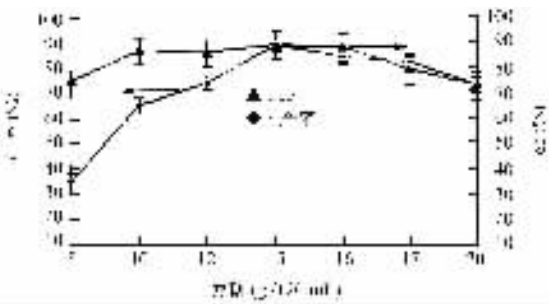


图4 蔗糖添加量对酵母发酵液催化不对称还原反应合成(S)-CHBE的影响( $V_{COBE} = 1.5 \text{ mL}$ )

催化COBE不对称还原反应合成(S)-CHBE的影响,结果显示:以方式Ⅰ添加蔗糖时,不利于酵母发酵液催化COBE的不对称还原反应,在反应中可以观察到蔗糖颗粒的存在;反复分批式(repeated feeding strategy)添加能源有利于酵母发酵液的催化反应,其中以方式Ⅱ添加时,底物残留少,产物产率和ee值分别为89.0%和94.0%;以方式Ⅲ添加时,底物残留多,产物产率和ee值分别只达到43.0%和23.0%。蔗糖对酵母发酵液催化还原作用的影响主要是通过代谢提供辅酶,但反应体系中如果存在过量的蔗糖可能会抑制酵母菌及酶的活性,增加反应溶液的粘度,影响反应效率的提高。

**2.4 酵母发酵液催化不对称还原反应( $V_{COBE} = 1.5 \text{ mL}$ )的条件优化** 结合文献[6]和单因素的实验考察结果,正交实验设计的因素和水平按照表1设置。选用统计软件正交设计助手Ⅱ v3.1的 $L_9(3^4)$ 正交表进行表头设计、安排、实施和分析试验(表2)。

表1 酵母发酵液催化合成(S)-CHBE的正交实验设计因素水平表

水平	因素			
	蔗糖流加方式(A)	底物流加方式(B)	缓冲剂量(C)	$\beta$ -环糊精(D)
1	Ⅲ	Ⅱ	1	1
2	Ⅱ	Ⅰ	1.5	1.5
3	Ⅰ	Ⅳ	2.0	2.0

表2 酵母发酵液催化不对称还原反应合成(S)-CHBE的正交试验与结果( $V_{COBE} = 1.5 \text{ mL}$ )

实验	L1(A)	L2(B)	L3(C)	L4(D)	产率(%)
1	1	1	1	1	56.0
2	1	2	2	2	14.0
3	1	3	3	3	90.0
4	2	1	2	3	86.0
5	2	2	3	1	34.0
6	2	3	1	2	94.0
7	3	1	3	2	68.0
8	3	2	1	3	13.0
9	3	3	2	1	73.0
均值1	53.3	70.0	54.3	54.3	
均值2	71.3	20.3	57.7	58.7	
均值3	51.3	85.7	64.0	63.0	
极差(R)	20.0	65.4	9.7	8.7	

考察了以不同的方式补加蔗糖时,对酵母发酵液

应用正交设计助手Ⅱ v3.1的极差和方差分析模

块分析的数据显示:底物添加方式对反应的影响最大(  $R$  值最大,  $F$  检验  $P < 0.05$  ),蔗糖的添加方式次之,缓冲剂添加量的影响最小;正交实验设计的因素作用效应图(图略)显示,酵母发酵液直接催化 COBE 不对称还原反应合成(  $S$  )-CHBE 的最佳反应条件(反应体系体积 120 mL)为:蔗糖添加方式 II(反应开始 2 h 后添加 5 g),底物添加方式为 IV[ 0.5(3) ],缓冲剂添加量为 2 g,  $\beta$ -环糊精添加量为 2 g.

按照最佳反应条件的组合安排进行实验,反应结束后测定产物的产率达 96%,  $ee$  高达 100%.

### 3 讨论

有关细胞或酶催化不对称还原反应的细胞反应动力学的报道很少,尤其对于能源供体和底物消耗、产物合成之间的关系很少涉及.一次性添加底物和能源物质限制了底物浓度的进一步增大和反应效率的提高<sup>[7-8]</sup>.我们通过考察酵母发酵液催化 COBE 还原生成(  $S$  )-CHBE 反应过程中基质消耗和产物生成、还原糖的变化规律,以及底物和还原糖的添加方式对其催化反应的影响,通过反复分批式流加底物,降低了 COBE 对细胞的毒害,并通过流加蔗糖,提高了反应的效率,这为进一步建立和优化酵母发酵液催化不对称还原反应合成(  $S$  )-CHBE 的生产操作工艺奠定了技术基础.

我们报道过在酵母发酵液催化 COBE 的不对称还原反应过程中,COBE 可能部分水解导致反应体系 pH 下降,影响细胞或酶的活力,通过添加适量的缓冲剂有利于降低这种不利影响,使反应持续进行<sup>[6]</sup>;而且,缓冲剂的缓冲范围和用量、底物的浓度和添加方式以及手性添加剂的添加量之间存在着一定的关系.通过正交实验设计方法对这些影响这类反应的多因

素进行优化和分析,可以综合考虑这些因素对酵母发酵液催化 COBE 不对称还原反应合成(  $S$  )-CHBE 的影响,进一步提高反应效果,这对于建立酵母发酵液催化 COBE 不对称还原反应合成(  $S$  )-CHBE 的生物转化反应器操作模式和操作工艺很有意义.对于建立酵母发酵液催化含卤类的羰基化合物的反应体系和其他细胞包括基因工程菌培养液直接催化同类型底物合成手性药物的研究有借鉴意义.

### 【参考文献】

- [1] Yamamoto H, Matsuyama A, Kobayashi Y. Synthesis of ethyl(  $S$  )-4-chloro-3-hydroxybutanoate using fabG-homologues[ J ]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 61: 133-139.
- [2] Engelking H, Pfaller R, Wich G, et al. Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-acetoacetate with recombinant *Pichia pastoris*[ J ]. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15( 22 ): 3591-3593.
- [3] Erdelyi B, Szabo A, Seres G, et al. Stereoselective production of (  $S$  )-1-aryl- and 1-arylethanol by freshly harvested and lyophilized yeast cells[ J ]. Tetrahedron: Asymmetry, 2006, 17( 23 ): 268-274.
- [4] Cramarossa MR, Nadini A, Bondi M, et al. Biocatalytic reduction of ( + )- and ( - )-carvone by bacteria[ J ]. Comptes Rendus Chimie, 2005, 8( 5 ): 849-852.
- [5] Chen JH, Wang KP, Houg JY, et al. Sequential design of pH profiles for asymmetric bioreduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate using a new experimental design method[ J ]. Enzyme Microbiol Technol, 2006, 38( 5 ): 689-696.
- [6] 马小魁,王喆之,陈五岭.酵母发酵液直接催化 4-氯乙酰乙酸乙酯不对称还原生成 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯[ J ].催化学报, 2006, 27( 4 ): 314-318.
- [7] 黄和,杨忠华,姚善涇.面包酵母催化羰基不对称还原合成手性醇的研究[ J ].生物加工过程, 2004, 2( 2 ): 52-55.
- [8] 钟萍,孙志浩.生物催化不对称还原方法生产(  $S$  )-4-氯-3-羟基丁酸乙酯[ J ].过程工程学报, 2005, 5( 6 ): 665-669.

编辑 许福明