

生物催化不对称还原方法生产(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯

钟萍, 孙志浩

(江南大学生物工程学院生物催化研究室, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 通过筛选得到不对称还原 4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE)合成(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯(S-CHBE)对映选择性好的微生物菌株出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*)SW0202. 对其还原反应条件进行优化, 得到最佳转化条件为: 初始细胞浓度 0.32 g/mL(以湿菌体计), 底物浓度 20 g/L, pH 7.0, 温度 30 °C. 在此优化条件下, 产物浓度达 20.32 g/L, 摩尔转化率为 79.6%, 产物对映体过量值 e.e. 为 97.8%. 分批添加底物可显著减小底物的抑制作用.

关键词: (S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯; 4-氯乙酰乙酸乙酯; 出芽短梗霉菌; 生物催化; 不对称还原反应

中图分类号: Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2005)06-0665-05

1 前言

手性药物的研究与开发已成为当前世界新药发展的方向和热点. 光学活性的手性醇是合成手性药物的关键手性中间体. 生物催化法制备高对映体过量的手性化合物具有效率高、选择性强、成本低、装置简单、环境污染少等显著优势^[1].

手性 4-氯-3-羟基丁酸乙酯是合成 L-肉碱、HMG-CoA 还原酶抑制剂与 1,4-二氢吡啶类 β -阻滞剂等重要医药产品的手性原料^[2]. 从 20 世纪 80 年代起, 国外许多学者^[3-5]对生物不对称还原方法生产该化合物进行了广泛的研究, 虽然可得到立体选择性好、产量高的产物, 但大多需对细胞进行处理且需添加昂贵的辅酶, 不适应工业化生产的需要.

本实验室以 4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE)为底物筛选出一株高对映体选择性 β -羧基酯还原酶产酶菌株出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*)SW0202^[6]. 本研究用该菌株进行微生物转化生产高光学纯度的(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯(S-CHBE), 无需对细胞进一步处理, 不需要将酶从细胞中提取出来, 在酶催化过程中也不需要添加辅酶.

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌种

出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*) SW0202, 从实验室收集和保藏的菌中筛选得到并鉴定^[6].

2.1.2 培养基

斜面培养基: 麦芽汁琼脂培养基(以麦芽粉配成 10°

Be'的麦芽汁, 加 2%的琼脂制成).

种子培养基(g/L): 葡萄糖 40, 酵母浸膏 20, 麦芽提取物 10, 蛋白胨 10; pH 6.0.

发酵培养基(g/L): 麦芽糖 30, 酵母膏 20, 蛋白胨 3, (NH₄)₂SO₄ 5, KH₂PO₄ 2, MgSO₄·7H₂O 0.7; pH 6.0.

2.1.3 试剂与材料

COBE, (R)-CHBE 与(S)-CHBE 标准品均购自 Aldrich 公司; 底物 COBE 购自西安太宝化工有限公司; 其他材料市售, 试剂为分析纯.

2.1.4 主要仪器

VARIAN 3900 气相色谱仪, VARIAN CP WAX 52 CB 极性色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μ m), VARIAN CP-Chirasil Dex CB 手性色谱柱(25 mm×0.25 m×0.25 μ m).

2.2 实验方法

2.2.1 菌体培养

斜面培养: 28 °C 培养 5~7 d.

种子培养: 将 28 °C 培养 5 d 的斜面菌体接入装有 50 mL 培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 28 °C, 160 r/min 培养 36 h.

发酵培养: 将培养 36 h 后的种子液以 10%的接种量转接入 500 mL 三角瓶的液体培养基中, 装液量 50 mL, 28 °C, 160 r/min 发酵培养 24 h.

2.2.2 微生物转化反应

酶源收集: 将经发酵培养的菌液于 8000 r/min, 4 °C 下离心 15 min, 弃去上清液, 所得湿菌体用磷酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 6.6)洗涤, 离心所得湿菌体即为转化反应的酶源.

COBE 的不对称还原: 将一定量发酵液离心分离得

收稿日期: 2004-11-22, 修回日期: 2005-02-23

基金项目: 973 计划资助项目(编号: 2003CB716008); 国家自然科学基金资助项目(编号: 20476039)

作者简介: 钟萍(1977-), 女, 湖北省随州市人, 硕士研究生, 研究方向: 生物催化与手性技术; 孙志浩, 通讯联系人, E-mail: sunw@public1.wx.js.cn.

到的菌丝体悬浮于 25 mL 同一缓冲液中,加入一定量的底物 COBE,于 30 °C, 160 r/min 下反应 12 h,测定产物 (S)-CHBE 浓度,计算其摩尔转化率:

$$\text{转化率} = \frac{\text{反应生成产物CHBE的质量}}{\text{初始加入底物COBE的质量}} \times \frac{\text{底物COBE的相对分子质量}}{\text{产物CHBE的相对分子质量}} \times 100\%$$

2.2.3 分析方法

底物 COBE 与产物 CHBE 浓度的测定:反应结束后,样品用适量乙酸乙酯萃取,无水 MgSO₄ 脱水,过滤.使用气相色谱仪、极性色谱柱检测.

产物 CHBE 对映体过量值 e.e.测定采用手性气相色谱法:取乙酸乙酯萃取液 0.5 mL,置于 5 mL 具塞试管中,常温挥发干溶剂.然后滴入 2 滴乙酸酐和 2 滴吡啶,置于沸水浴中反应 1 h,稍冷,加 5 mL 乙酸乙酯稀释^[7].用气相色谱仪、手性色谱柱检测.

产物对映体过量值计算: $e.e.(\%) = (C_S - C_R) / (C_S + C_R)$,式中 C_S 为 S 型产物的浓度, C_R 为 R 型产物的浓度.

3 结果与讨论

3.1 产酶菌的筛选

具有 COBE 还原酶的微生物种属主要有酵母、霉菌、细菌和放线菌等^[8].本研究室从市场上购得的活性干酵母及实验室保藏的微生物菌株中,经初筛、复筛,获得一株产 β -羧基酯还原酶的菌株出芽短梗霉菌 (*Aureobasidium pullulans*) SW0202^[6],该菌产酶稳定,所得 CHBE 的转化率高,立体选择性好(e.e. 97.8%),转化产物的比旋光度 $[\alpha]_D^{24} = -19.25$ (CHCl₃ 36 g/L).本研究以该菌作为实验菌株.

3.2 出芽短梗霉菌不对称还原 COBE 生产 (S)-CHBE

3.2.1 辅助底物的种类对转化的影响

将 COBE 还原为 CHBE 的酶属氧化还原酶,需要辅酶 NADH 或 NADPH 参与反应.由于细胞中 NAD(P)H 的生理浓度不足以支持大量底物还原反应对辅酶的需要,必须加入细胞中辅酶再生所需要的底物(即辅助底物),在辅酶再生酶系的作用下将 NAD(P)⁺还原为 NAD(P)H.

添加适当的辅助底物有利于提高转化率,甚至能够影响反应的立体选择性^[9].本研究以葡萄糖、蔗糖、乙醇、丙三醇、正丁醇为辅助底物,在反应体系中分别加入 50 g/L 上述各辅助底物,于 30 °C, 160 r/min 下反应 12 h,考察其对 *Aureobasidium pullulans* SW0202 还原 COBE 生产 CHBE 的影响,结果如图 1 所示.由图可见,用葡萄糖作辅助底物所得转化率最高,而用正丁醇作辅助底物反而抑制了菌体的酶活.

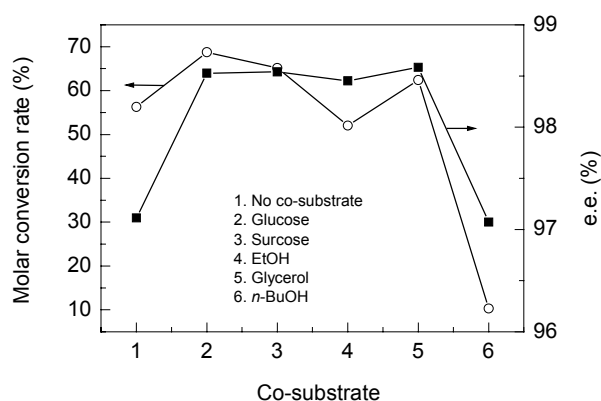


图1 辅助底物对转化的影响

Fig.1 Effect of co-substrates on the conversion rate and the enantiometric excess of CHBE

3.2.2 葡萄糖浓度对转化的影响

考察菌体对葡萄糖的利用情况及葡萄糖浓度对转化的影响.将 6 g 湿菌体(8000 r/min, 15 min)悬浮于 25 mL 含不同量葡萄糖的 0.1 mol/L (pH 6.6)磷酸钾缓冲液中,于 30 °C, 160 r/min 下反应 12 h,测定转化率及对映体过量值.

从图 2 可以看出,在 0~90 g/L 浓度范围内,葡萄糖浓度不影响产物的 e.e.值,葡萄糖浓度在 50 g/L 时转化率最高,为 68%.

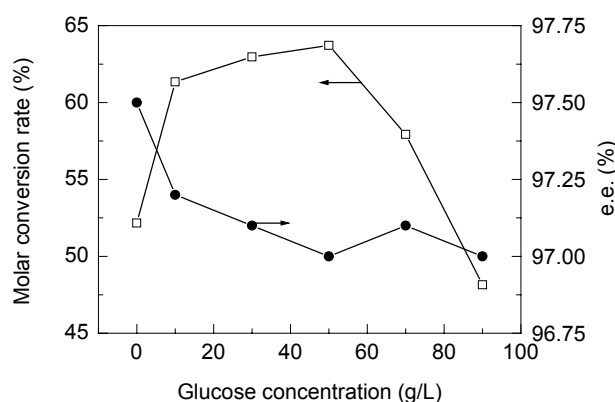


图2 葡萄糖浓度对转化的影响

Fig.2 Effect of glucose concentration on the conversion rate and the enantiometric excess of CHBE

3.2.3 底物添加方式的比较

在初步实验中发现,底物 COBE 对菌体的毒性较大,且底物严重抑制菌体中酶的催化活性,随着底物浓度的增加,其抑制作用逐渐增大.因此,解除底物的抑制作用是提高该菌转化能力的关键之一.

对底物的添加方式进行了研究.在 25 mL 0.1 mol/L 的 pH 6.6 磷酸盐缓冲液中加入 6 g 湿菌体及 36.5 g/L COBE, COBE 分不同批次加入,同时测定 pH,若 pH < 6.6,则用 1 mol/L Na₂CO₃ 调 pH 至 6.6,结果如表 1.可

见分次添加可解除底物对菌体的抑制作用,显著提高产物浓度,其转化率可以从一次性加入的 25.24%提高到分 10 次加入的 53.18%,因此分次流加是提高转化率的一条有效途径.

表 1 COBE 添加方式的比较

Substrate added (g/L)	CHBE concentration (g/L)	Conversion rate (%)
36.50×1	9.33	25.24
18.25×2	11.34	30.65
12.17×3	14.89	40.25
7.30×5	17.36	46.94
3.65×10	19.67	53.18

同时考察了一次性添加和分 10 次添加底物 36.5 g/L 反应过程中 pH 对转化的影响,结果如图 3 及表 2.

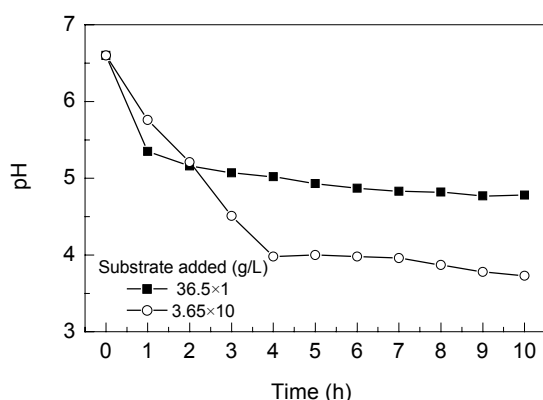


图 3 反应过程 pH 变化曲线
Fig.3 The time curve of pH

表 2 反应过程中 pH 对转化的影响

Substrate added (g/L)	pH	CHBE concentration (g/L)	Conversion rate (%)
36.50×1	Controlled	8.16	22.07
		9.33	25.24
3.65×10	Controlled	19.67	53.18
		11.84	32.01

由反应过程 pH 变化可以看出,随着时间的延长,反应体系的 pH 逐渐降低,底物浓度较高时,底物抑制作用居于主导地位, pH 的影响变得不显著;当底物抑制作用消除后, pH 成为影响转化率的重要因素,用 Na_2CO_3 调节 pH 之后,转化率从 32.01%提高到 53.18%,可见反应过程中需对 pH 进行调控.

3.2.4 底物浓度对转化率及对映体过量值的影响

在酶反应体系中,酶和底物是最基本的构成因素.底物的浓度直接影响酶催化的反应速度及反应的立体选择性.对转化反应的底物 COBE 的最适浓度进行了研究.将 6 g 湿菌体(8000 r/min, 15 min)悬浮于 25 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.6)中,加入不同浓度的 COBE,

在 30 °C, 160 r/min 条件下反应 12 h,测定其转化率及 e.e. 值,结果如图 4.

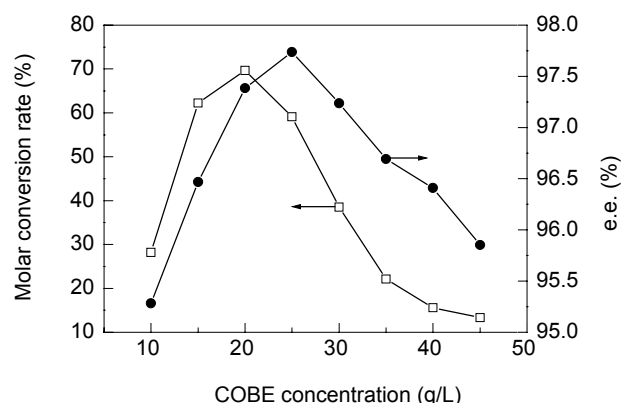


图 4 COBE 浓度对转化的影响

Fig.4 Effect of COBE concentration on the conversion rate and the enantiometric excess of CHBE

图 4 表明,随着 COBE 浓度的增加,转化率先增后减,在 COBE 初始浓度为 20 g/L 时,转化率达到峰值. COBE 初始浓度低于 20 g/L 时,底物几乎完全转化,溶液中检测不到底物,但由于 COBE 在水溶液中不稳定^[5],故最终的转化率较低.随着底物浓度的增大,COBE 的降解对产物浓度的影响变得不显著,故转化率逐渐增大,至 20 g/L 时达到最高值;但当底物浓度进一步增大,底物对转化反应的抑制作用也逐渐增大,成为该反应的主要影响因素,从实验结果来看,表现为产物浓度及转化率迅速降低.另外发现产物的 e.e.值也出现变化,当 COBE 的初始浓度低于 25 g/L 时, e.e.值逐渐增大,初始浓度为 25 g/L 时 e.e.值最大.有人^[7,10]认为,这可能是由于该菌中含有催化 β -羧基酯分别生成(R)-型和(S)-型产物的酶,而这两类酶具有不同的反应动力学参数 K_m (米氏常数)和 K_{cat} (催化常数)值.当底物浓度不同时,催化生成(R)-型和(S)-型产物的速率不同,因而 e.e.值也不相同. e.e.值略微下降,是否因过高的 COBE 浓度对(S)-型酶活的抑制作用略强所致,还有待进一步研究.

3.2.5 细胞浓度对转化的影响

利用微生物细胞进行 COBE 还原反应中,真正起作用的是细胞中的酶或酶系,反应体系中的菌体量直接影响参与反应的酶量,进而影响其催化转化的反应速度及最终转化率.考察了不同初始细胞浓度对转化率及对映体过量值的影响.25 mL 缓冲液中添加不同量的湿菌体,于 30 °C, 160 r/min 下反应 12 h,结果如图 5.由图可见,随着初始细胞浓度增加,产物 e.e.值基本不变,而转化率增加,初始菌体在 0.32 g/mL 时转化率最大,之后随菌体量增加转化率有所下降,可能是菌体降解产物所致.

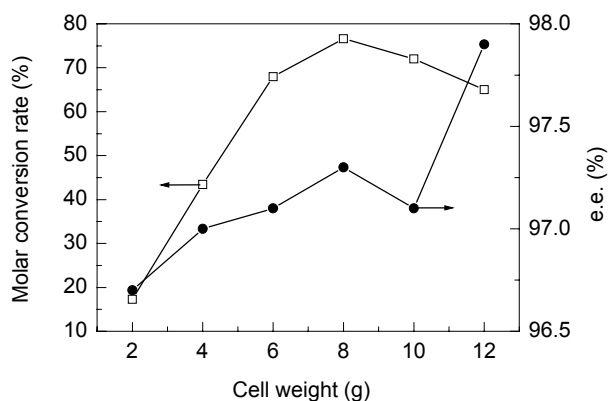


图5 细胞浓度对转化的影响

Fig.5 Effect of cell concentration on the conversion rate and the enantiometric excess of CHBE

3.2.6 温度对转化的影响

在恒定 pH 6.6, 160 r/min 下反应 12 h, 考察不同反应温度对还原反应转化率及对映体过量值的影响. 由图 6 可知, 随着温度的升高, 催化底物反应的酶活性加强, 转化率逐渐增大, 当反应温度达到 30℃时, 转化率达到最大. 但随着反应温度的进一步升高, 细胞内的氧化还原酶活性逐渐降低, 从而使反应速度降低, 转化率也随之下降, 因此, 该反应的最适温度为 30℃. 产物的 e.e. 值在这一温度范围内基本不变.

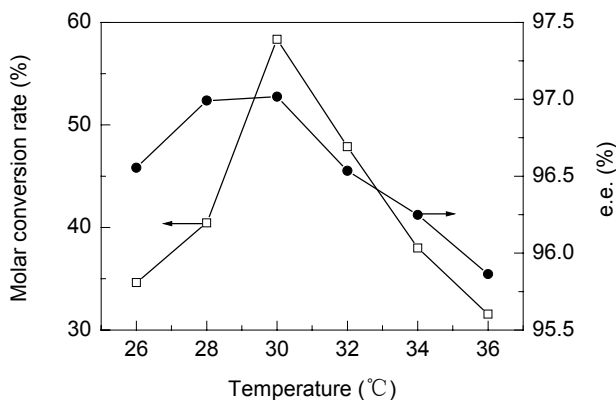


图6 温度对转化的影响

Fig.6 Effect of temperature on the conversion rate and the enantiometric excess of CHBE

3.2.7 反应体系 pH 对转化的影响

反应体系的 pH 值不仅影响酶蛋白的构型和酶的稳定性, 而且还影响酶的活性中心必需基团的解离状态和底物的解离状态, 从而影响酶的立体选择性和催化活性. 在最适 pH 条件下, 酶的反应速度最大, 高于或低于此 pH, 都会导致酶的活性降低, 影响酶的转化能力.

分别用 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液和硼酸-氯化钾-氢氧化钠缓冲液配制不同反应体系, 在 30℃下还原反应 12 h, 考察

pH 值对反应转化率的影响, 结果如图 7. 从图可以看出, pH 值为 7.0 时, 转化率达到最大. 各 pH 条件下, 其对映体过量值相差无几(数据略), 因此确定反应的最适 pH 值为 7.0.

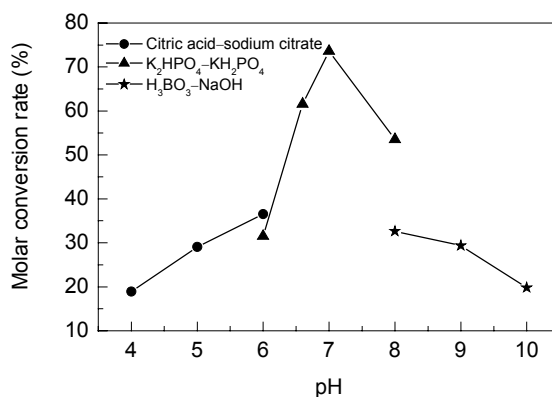


图7 pH 值对转化的影响

Fig.7 Effect of pH on the conversion rate of CHBE

3.2.8 转化时间曲线

在含有 50 g/L 葡萄糖、20 g/L COBE 的磷酸钾缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)中, 加入 8 g 湿菌体(8000 r/min, 15 min), 30℃下定时取样, 离心分离菌体, 所得上清液以等体积乙酸乙酯萃取, GC 分析产物的生成量, 结果见图 8. 由图可以看出, 在优化反应条件下, 该反应速度较快, 在 2 h 后反应已基本完成, 最高 CHBE 浓度达到 20.32 g/L; 随后, 随着反应时间的延长, 产物浓度有下降的趋势. 原因可能是菌体的存在会导致产物进一步的降解, 因此该反应不宜长时间进行, 以 2 h 为宜, 反应过程中 e.e. 值基本不变.

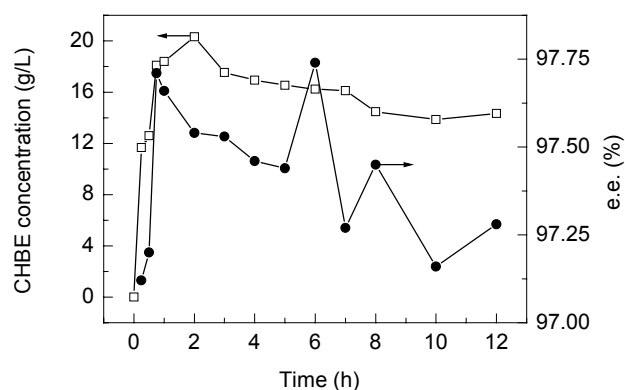


图8 转化反应时间曲线

Fig.8 The time curve of conversion

4 结论

(1) 筛选得到对映选择性较好的菌株短梗霉菌 (*Aureobasidium pullulans*)SW0202, 利用该菌进行 COBE

的不对称还原反应,无需添加辅酶,利用葡萄糖作辅助底物,可实现辅酶的再生.反应过程中由于葡萄糖逐渐转化为葡萄糖酸^[3],以提供反应所需的NAD(P)H,使体系pH逐渐降低,需对其进行调控,使其适于不对称还原反应的进行.改变底物的添加方式可减小底物的抑制作用,可通过流加或分次添加底物的方法提高微生物转化反应的转化率.

(2) 对短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*)SW0202制备光学纯(S)-CHBE的转化条件进行了研究,得到的优化反应条件为:初始菌体浓度0.32 g/mL(以湿菌体计),底物浓度20 g/L, pH 7.0, 温度30℃.在优化条件下,所得产物浓度达20.32 g/L,摩尔转化率为79.6%.转化产物经硅胶柱层析及减压蒸馏提纯,产品纯度为98.23%,其对映体过量值 e.e. 为97.8%,比旋光度 $[\alpha]_D^{24} = -19.25$ (CHCl₃ 36 g/L).

参考文献:

- [1] Santaniello E, Ferraboschi P. The Biocatalytic Approach to the Preparation of Enantiopure Chiral Building Blocks [J]. Chem. Rev., 1992, 92: 1071-1140.
- [2] John D S. Dehydrogenases and Transaminases in Asymmetric Synthesis [J]. Curr. Opin. Chem. Biol., 2001, 5: 120-129.
- [3] Yasohara Y, Kizaki N, Hasegawa J, et al. Synthesis of Optically Active Ethyl 4-Chloro-3-hydroxy-butanoate by Microbial Reduction [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 51: 847-851.
- [4] Yuri S, Eiji U, Hiroaki Y, et al. Stereoselective Reduction of Ethyl 4-Chloro-3-oxobutanoate by Fungi [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001, 65(7): 1676-1679.
- [5] Shimizu S, Kataoka M, Morikawa T, et al. Stereoselective Reduction of Ethyl 4-Chloro-3-oxobutanoate by a Microbial Aldehyde Reductase in an Organic Solvent-Water Diphaseic System [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56(8): 2374-2377.
- [6] 钟萍, 衡湘斐, 孙志浩. COBE 羧基还原酶产生菌的筛选及产酶条件研究 [J]. 工业微生物, 2005, 35(2): 7-13
- [7] Dahl A C, Madsen J O. Baker's Yeast: Production of D- and L-3-Hydroxy Esters [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1998, 9: 4395-4417.
- [8] Kita K, Kataoka M, Shimizu S. Review: Diversity of 4-Chloroacetoacetate Ethyl Ester-reducing Enzymes in Yeasts and Their Application to Chiral Alcohol Synthesis [J]. J. Biosci. Bioeng., 1999, 88(6): 591-598.
- [9] Dahl A C, Fjeldberg M, Madsen J O. Bakers' Yeast: Improving the D-Stereoselectivity in Reduction of 3-Oxo Esters [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1999, 10(3): 551-559.
- [10] 杨忠华, 姚善涇. 水相中酵母细胞催化4-氯-乙酰乙酸乙酯不对称还原反应 [J]. 催化学报, 2004, 25(6): 434-438.

Production of Ethyl (S)-(-)-4-Chloro-3-hydroxybutyrate by Asymmetrical Reduction of Ethyl 4-Chloroacetoacetate with *Aureobasidium pullulans* SW0202

ZHONG Ping, SUN Zhi-hao

(Laboratory of Biocatalysis, School of Biotechnology, Southern Yangtze University;

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: *Aureobasidium pullulans* SW0202 with high enantioselectivity for asymmetric reduction of ethyl 4-chloroacetoacetate (COBE) to ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate (S-CHBE) was isolated. The asymmetric reduction of COBE to optically active CHBE catalyzed by *Aureobasidium pullulans* SW0202 in aqueous phase was also investigated. The reduction was conducted in K₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer, and the concentrations of COBE and CHBE as well as optical purity of the product were determined by capillary gas chromatography (GC) and chiral capillary GC respectively. The results showed that the optimal conditions for the conversion were the initial cell concentration 0.32 g/mL(wet weight), the initial COBE concentration 20 g/L, pH 7.0 and the temperature 30℃. The molar conversion rate reached 79.6% (20.32 g/L CHBE), with 97.8% e.e. Subsequently the experimental results of batch supplement of substrate indicate that this strategy can greatly reduce substance inhibition.

Key words: ethyl (S)-(-)-4-chloro-3-hydroxybutyrate; ethyl 4-chloroacetoacetate; *Aureobasidium pullulans*; biocatalysis; asymmetric reduction