

生物不对称合成 R-(-)-扁桃酸的影响因素

肖美添^{1,2}, 黄雅燕¹, 盛军¹, 孟春¹, 石贤爱¹, 郭养浩¹

(1. 福州大学药物生物技术与工程研究所, 福建 福州 350002; 2. 华侨大学化工系, 福建 泉州 362011)

摘要:研究了酵母细胞(*Saccharomyces cerevisiae*)生物不对称还原苯乙酮酸合成 R-(-)-扁桃酸的过程中,环境因子对底物的转化效率和产物对映体过量值的影响.结果表明,高浓度的底物苯乙酮酸对酵母细胞的催化还原活性具有较显著的抑制效应. pH 6.5、温度 32°C、严格厌氧为较适宜条件,底物苯乙酮酸的转化率和产物扁桃酸的得率分别可达 97.0%和 96.1%,R-(-)-扁桃酸的对映体过量值(ee)为 95.1%.

关键词: R-(-)-扁桃酸; 不对称还原; 立体选择性; 手性合成

中图分类号: O621.3⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2004)01-0032-05

1 前言

生物不对称催化合成已成为有机化学重要的研究方向之一,微生物细胞内酶催化的氧化还原反应在手性药物中间体和手性药物的生物不对称合成方面有着重要的应用价值.酵母活细胞内含有大量氧化还原酶(如醇脱氢酶)和完备的辅酶再生系统,利用酵母活细胞对一些潜手性化合物直接进行不对称还原,获得高光学纯度的手性药物“砌块”,已经越来越引起人们的兴趣^[1].扁桃酸是合成环扁桃酯、羟苄唑、匹莫林等药物的重要中间体^[2].自20世纪90年代以来,手性药物开发已形成热潮.研究开发单构型扁桃酸系列衍生物具有良好的开发前景和巨大的发展空间.国内外生物化学家在羰基化合物不对称还原方面做了较多工作,但主要着重于乙酰乙酸酯类和部分芳香酮类化合物的不对称还原,而对催化芳香酮酸类化合物不对称还原的研究还鲜见报道^[3-7].黄雅燕等^[8]筛选出一株酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae* sp. strain by1),对底物苯乙酮酸和苯乙酮酸甲酯皆具有较高的转化活力和光学选择性.本工作进一步探讨环境因子对底物苯乙酮酸的转化率和产物 R-(-)-扁桃酸对映体过量值的影响.

2 材料与amp;方法

2.1 材料

2.1.1 菌种及试剂

酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae* sp. strain by1)为本研究所保藏菌种;苯乙酮酸(纯度>99%)由南京工业大学吴怡祖博士馈赠;R-(-)-扁桃酸和 S-(+)-扁桃酸标准品购自 Sigma 公司,羟丙基-β-环糊精购自 Fluka 公司,其它试剂均为分析纯.

2.1.2 培养基

种子培养基(g/L): 蛋白胨 5, 葡萄糖 30, K₂HPO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, KCl 0.5, Fe₂(SO₄)₃ 0.01.

收稿日期: 2003-07-14, 修回日期: 2003-10-08

基金项目: 福建省科技计划重点项目(编号: 2003H023); 福建省自然科学基金资助项目(编号: E0310019)

作者简介: 肖美添(1968-), 男, 福建省泉州市人, 博士研究生, 研究方向生物化工; 郭养浩, 通讯联系人, Tel: (0591)7893046, E-mail: bioeng@fzu.edu.cn.

生产培养基(g/L)：葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 5, K₂HPO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, KCl 0.5, Fe₂(SO₄)₃ 0.01, ZnSO₄ 0.01.

2.2 方法

2.2.1 酵母培养和生物转化

将保存的酵母菌种 by1 接到种子培养基中, 30°C 温度下培养. 对数生长期中后期的培养物作为种子液, 移接于带有 pH 自动控制系统的生物反应器(500 ml 生产培养基)中, 接种量 8%, 磁力搅拌, 恒温培养. 接种后 28 h, 生物量(细胞干重)达 1.7~2.0 g/L 时, 加入底物苯乙酮酸(以下若无特殊说明, 初始浓度均为 15 mmol/L). 定期取样, 离心取上清液, 分别进行高效液相色谱和毛细管电泳分析.

2.2.2 分析方法

底物(苯乙酮酸)和产物(总扁桃酸)含量采用高效液相色谱仪(Varian ProStar)分析, C-18 反相柱(Beckman), φ4.6 mm×250 mm, 流动相为甲醇-磷酸盐缓冲液(体积比 1:9), 检测波长 220 nm, 流速 1 ml/min, 柱温 30°C.

底物转化率=已转化底物浓度/初始底物浓度×100%, 产物得率=总扁桃酸浓度/初始底物浓度×100%.

R 和 S 型扁桃酸对映体的含量采用毛细管电泳仪(9P/ACE™ MDQ, Beckman Coulter Co.)分析, 中性熔融硅毛细管柱(I.D. 75 μm, 有效长度 50 cm), 检测波长 214 nm, 分离电压 20 kV; 缓冲液为含 150 g/L 羟丙基-β-环糊精的 100 mmol/L Tris 磷酸溶液(pH 7.6).

$$R \text{ 型扁桃酸对映体过量值 } ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100\%$$

其中[R]和[S]分别为 R 型和 S 型扁桃酸的含量(mmol/L).

3 结果与讨论

3.1 生物不对称还原苯乙酮酸生成 R-(−)-扁桃酸

采用诱变筛选的高效酵母菌株 by1 可成功实现底物苯乙酮酸的不对称还原^[8], 制备 R-(−)-扁桃酸反应过程如图 1 所示. 在初始底物浓度 15 mmol/L 条件下, 经过 72 h 微生物转化, 底物转化率可达 80%以上, 所得产物总扁桃酸中 R-扁桃酸的 ee 值可达 90%.

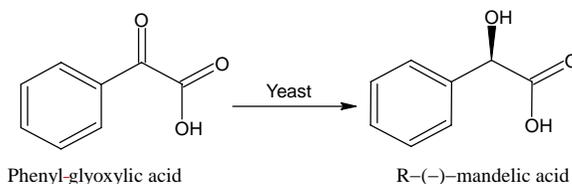


图 1 苯乙酮酸的生物还原反应

Fig.1 Reduction of phenylglyoxylic acid to R-(−)-mandelic acid by yeast by1

3.2 pH 值对微生物还原反应的影响

配制不同初始 pH 值的培养液, 培养过程中维持 pH 恒定, 培养 48 h, 考察 pH 值对底物转化率、总扁桃酸得率和 R-扁桃酸对映体过量值(ee)的影响, 实验结果见图 2, 表明在本实验的 pH 范围内, 底物转化率和目标产物 R-扁桃酸的 ee 值随 pH 变化呈单调上升趋势, 均在 pH 7.0 时达到最大. 在 pH 5.0~6.5 范围内, 随 pH 增大, 产物得率上升; 当 pH 高于 6.5 时, 虽然底物转化率增

大,但产物得率反而下降.这是由于底物苯乙酮酸不稳定,容易发生脱羧反应,生成苯甲醛或苯甲醇等副产物.

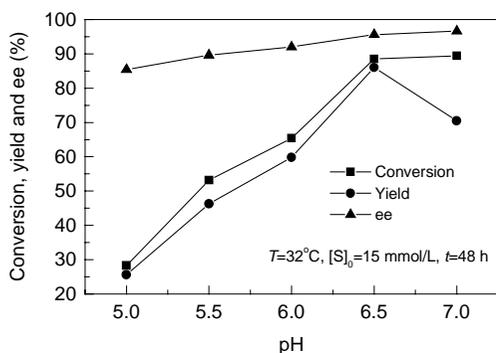


图2 pH对转化率、产物得率和 ee 值的影响
Fig.2 Effect of pH on conversion, yield and enantiomeric excesses of product

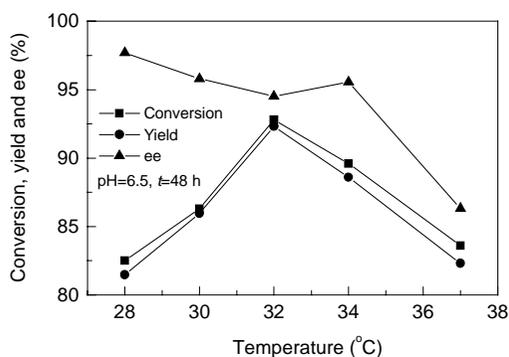


图3 温度对转化率、产物得率和 ee 值的影响
Fig.3 Effect of temperature on conversion, yield and enantiomeric excesses of product

3.3 温度对微生物还原反应的影响

在恒定 pH 6.5 条件下,考察不同反应温度对苯乙酮酸不对称还原反应的影响.由图 3 可知,反应温度为 32°C 时,底物转化率和产物得率均达最大,明显高于其它温度实验点.在反应时间相同时,温度升高,反应速度加快,转化率和产物得率增大.但温度过高导致酵母细胞内的氧化还原酶失活,从而使反应速度降低,转化率和产物得率也降低.反应温度在 28°C 时,产物 ee 值较高,反应温度为 28~34°C 时,产物 ee 值皆在 94.5% 左右,而反应温度升至 37°C,产物的 ee 值急速下降.这表明反应温度过高,将影响酵母细胞内氧化还原酶的表现活性和对映体选择性,导致转化率、产物得率和 R-扁桃酸的 ee 值下降.

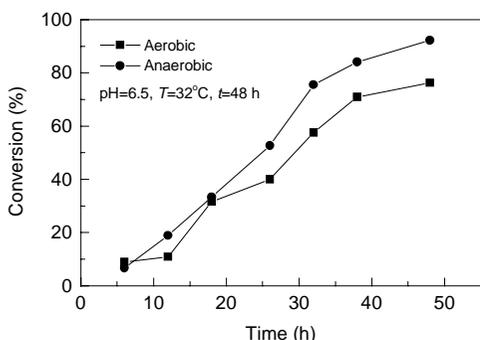


图4 溶氧条件对底物转化率的影响
Fig.4 Effect of oxygen concentration on conversion of substrate

3.4 溶氧条件对微生物还原反应的影响

在相同条件下,平行进行两组反应,一组连续供氧培养[DO 浓度约 $(2\sim3)\times 10^{-6}$],另一组封闭严格厌氧培养(DO 浓度为 0),考察溶氧条件对还原反应的影响,结果见图 4.实验表明,苯乙酮酸的转化速率在厌氧条件下明显高于同期好氧条件.厌氧条件培养 48 h 时,底物苯乙酮酸的转化率为 92.3%,而好氧条件仅为 76.3%.酵母细胞将苯乙酮酸不对称还原生成扁桃酸,需要胞内还原型辅酶(NADH)的参与.厌氧条件下胞内扁桃酸还原酶表现活力较高,可能与胞内辅酶(NADH)浓度较高有关.不同溶氧条件对目标产物 R-(-)-扁桃酸的 ee 值的影响不显著,培养 48 h,厌氧条件下产物 ee 值为 94.3%,而好氧条件下为 93.8%.综合考虑底物转化率和 R-扁桃酸的 ee 值两个因素,R-扁桃酸酵母细胞转化反应应选择厌氧条件.

3.5 初始底物浓度对微生物还原反应的影响

分别移取种子液到 5 瓶 150 ml 新鲜培养液中(500 ml 的锥形瓶),接种量为 8%,控制 pH 6.5、

温度 32°C、振荡培养 28 h，加入不同终浓度的苯乙酮酸，继续培养 36 h。实验结果(表 1)表明，底物转化率和产物得率随初始底物浓度的升高而迅速下降，当底物初始浓度为 20 和 25 mmol/L 时，转化率和产物得率均较低，均小于 20%。从转化前 36 h 的平均转化速率看，随着初始底物浓度的增加，转化速率增大，初始底物浓度 15 mmol/L 的转化速率达最大 0.319 mmol/(L·h)，而初始底物浓度 20 mmol/L 的转化速率明显下降，仅为 0.102 mmol/(L·h)，这说明高浓度的底物对底物转化速率的影响较显著。选择合适的底物浓度有利于提高底物的转化速率和产物的产量，减少后处理产品分离费用。

表 1 初始底物浓度对酵母细胞还原反应的影响

Table 1 Effect of initial substrate concentration on reduction reaction by yeast cells

Entry	Initial substrate conc. (mmol/L)	Conversion (%)	Yield (%)	ee (%)	Average transform velocity [mmol/(L·h)]
1	5	92.3	89.0	95.6	0.128
2	10	87.4	85.6	94.2	0.243
3	15	76.6	72.0	94.8	0.319
4	20	18.4	15.4	93.7	0.102
5	25	7.6	4.4	95.4	0.042

在相同的细胞浓度下，底物浓度对酵母细胞的生物转化速率、目标产物得率和光学选择性均有显著的影响。一般情况下，对于酵母细胞的不对称还原，降低底物浓度，能提高产物得率和酵母细胞的立体选择性。例如 Ods 等^[2]利用生物界面反应器不对称还原乙基-2-氧基-4-苯丁酸酯(EOPB)，生成乙基-(R)-2-羟基-4-苯丁酸酯(R-EHPB)，初始底物(EOPB)浓度为 1.4%(φ)时，产率 50.8%，ee 值 71%(R)，而初始底物(EOPB)浓度为 1.8%(φ)时，产率仅达 30.0%，ee 值 55%(R)；Houng 等^[6]采用树脂吸附底物乙基-4-氯-乙酰乙酸酯，催化还原过程缓慢“释放”，降低反应液中底物的实际反应浓度，以提高产物的 ee 值。本实验中未观察到不同底物浓度对目标产物光学纯度的显著影响，在本实验的底物浓度范围内，R-扁桃酸的 ee 值均保持在 93%~95%。

3.6 转化率、产物得率和 ee 值随培养时间的变化

在上述工作基础上，控制 pH 6.5、反应温度 32°C、酵母培养液菌体浓度(细胞干重)约为 2.0 g/L 时，加入终浓度为 15 mmol/L 的底物苯乙酮酸，严格厌氧培养，底物转化率、产物得率和 ee 值(R)随培养时间的变化见图 5。由图可知，随反应进行，转化率和产物得率增大均较为迅速，反应至 28 h，转化率和产物得率达到最大值，生物转化反应基本完成。反应 32~45 h 阶段，转化率和产物得率未见升高，而超过 45 h 后，酵母菌体开始部分自溶，转化率基本持平，而产物得率却有所降低，这可能是因为产物扁桃酸进一步代谢生成了其它副产物，过长的反应时间不利于提高产物得率。但在整个生物转化过程中，产物的对映体过量值均较高，产物 ee 值保持在 93%~95%左右。实验表明，目标产物 R-扁桃酸具有较高的反应稳定性。本研究结果为进一步中试放大和工业化生产 R-扁桃酸提供了依据。

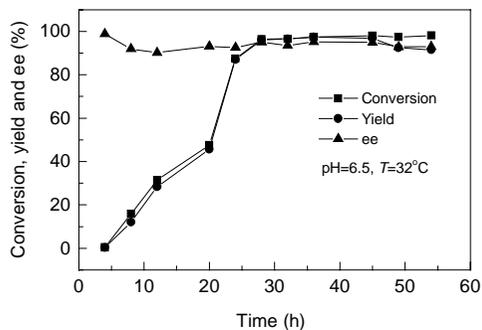


图 5 转化率、产物得率和 ee 值随培养时间的变化
Fig.5 Effect of time course on conversion, yield and enantiomeric excesses of product

4 结论

在本实验考察的环境因素范围内(pH 5.0~7.0、温度 28~34°C、供氧与厌氧及底物初始浓度 5~25 mmol/L), 酵母菌株 sp. strain by1 对底物苯乙酮酸的还原均具有很好的立体选择性, 目标产物 R-扁桃酸的 ee 值均保持在 94%左右, 而外界条件对底物转化率和产物总扁桃酸得率的影响较显著. 高浓度(>20 mmol/L)的底物苯乙酮酸对酵母细胞的生物还原过程具有显著的抑制效应. 在优化条件下(pH 6.5、反应温度 32°C、底物苯乙酮酸初始浓度为 15 mmol/L、严格厌氧培养), 生物转化 28 h, 底物转化率可达 97.0%, 产物扁桃酸的得率可达 96.1%, 产物(R-扁桃酸)ee 值为 95.1%.

参考文献:

- [1] Nakamura K, Matsuda T. Asymmetric Reduction of Ketones by the Acetone Powder of *Geotrichum candidum* [J]. J. Org. Chem., 1998, 63(24): 8957-8966.
- [2] Oda S, Inada Y, Kobayashi A, et al. Production of Ethyl (R)-2-Hydroxy-4-phenylbutanoate via Reduction of Ethyl-2-oxo-4-phenylbutanoate in an Interface Bioreactor [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998, 62(9): 1762-1767.
- [3] Patel R N. Biocatalytic Synthesis of Intermediates for the Synthesis of Chiral Drug Substances [J]. Current Opinion Biotechnol., 2001, 12(6): 587-604.
- [4] 欧志敏, 吴坚平, 杨立荣, 等. 酿酒酵母 B5 不对称还原制备手性药物中间体 R-2'-氯-1-苯乙醇的研究 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(2): 206-211.
- [5] 刘湘, 孙培冬, 李明, 等. 面包酵母用于苯乙酮的不对称还原研究 [J]. 分子催化, 2002, 16(2): 107-110.
- [6] Houg J Y, Liao J S. Applying Slow-release Biocatalysis to the Asymmetric Reduction of Ethyl 4-Chloroacetoacetate [J]. Biotechnol. Lett., 2003, 25: 17-21.
- [7] 朱文洲, 许建和, 俞俊棠, 等. 面包酵母催化乙酰乙酸乙酯的不对称还原反应 [J]. 华东理工大学学报, 2000, 26(2): 154-156.
- [8] 黄雅燕, 肖美添, 李忠琴, 等. R-(-)-扁桃酸脱氢酶产生菌的筛选 [J]. 药物生物技术, 2003, 10(4): 223-225.

Influencing Factors of Asymmetric Biosynthesis of R-(-)-mandelic Acid

XIAO Mei-tian^{1,2}, HUANG Ya-yan¹, SHENG Jun¹, MENG Chun¹, SHI Xian-ai¹, GUO Yang-hao¹

(1. Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350001, China;

2. Department of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou, Fujian 362011, China)

Abstract: R-(-)-mandelic acid is an important multifunctional pharmaceutical intermediate in the preparation of chiral drugs. A sp. strain by1 from 18 strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactoballus*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans* had been screened for transforming phenylglyoxylic acid to R-(-)-mandelic acid. In this article, to study further the asymmetric bioreduction of phenylglyoxylic acid to mandelic acid by *Saccharomyces cerevisiae* sp. strain by1, the effect of biochemical factors on the conversion efficiency of substrate phenylglyoxylic acid and enantiomeric excess of product R-mandelic acid were investigated in detail. For some conditions tested in our experiments, the sp. strain by1 showed very high enantioselectivity toward the bioreduction of the substrates. The enantiomeric excess value of desired product R-(-)-mandelic acid reached up to 94.0%. Whereas, the conversion of substrate and the yield of product mandelic acid were influenced evidently by the environmental factors. The substrate conversion and the yield of product decreased sharply with the increase of initial substrate concentration up to 20 mmol/L. The high concentration of substrates inhibits strongly the activity of redoxase of yeast cells. Under the optimal conditions: pH 6.5, 32°C, initial concentration 15 mmol/L, absolute anaerobic cultivation 28 h, the substrate conversion rate of 97.0% and yield of product mandelic acid of 96.1% and enantiomeric excess value of R-(-)-mandelic acid of 95.1% could be obtained. This research paces the way for economic preparation of chiral R-(-)-mandelic acid.

Key words: R-(-)-mandelic acid; asymmetric reduction; enantioselectivity; chiral synthesis