

烯丙基化合物对面包酵母立体选择性的影响机理

李彦, 倪宏亮, 姚善泾

(浙江大学化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310027)

摘要: 添加烯丙基化合物可以控制酵母催化不对称还原反应的立体选择性, 以 4-氯-3-羧基丁酸乙酯(COBE)为模型底物, 用丙烯酰胺和烯丙基醇对酵母进行预处理, 产物(S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯(S-CHBE)的对映体过量值(*e.e.*)可以增加至 94%; 而用烯丙基溴预处理, 则可以得到 *R* 型产物. 通过 DNS 法和 API ZYM 试验条证明烯丙基类化合物对细胞及胞内酶系存在毒害作用, 且作用大小取决于烯丙基所带基团. 预处理后的酵母细胞经 PBS 缓冲液多次洗涤后, 其活性可以逐渐得到恢复. 随着底物浓度的增加, 经烯丙基醇预处理的酵母细胞, 其 *S* 型产物的 *e.e.* 值维持在 90% 左右, 而经烯丙基溴处理后, 反应得到的 *R* 型产物的 *e.e.* 值则从 90% 下降到 45% 左右. 说明烯丙基类化合物竞争性地吸附于酶的活性区域, 且其所带基团决定了被吸附酶的类型. 以抑制剂类似物处理酵母细胞, 其反应结果说明酵母体内催化不对称还原反应的两类酶存在着空间位阻效应.

关键词: 不对称还原; 4-氯-3-羧基丁酸乙酯; 酶抑制剂; 立体选择性; 催化机理

中图分类号: Q554 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2007)05-1004-05

1 前言

面包酵母(Baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*)能催化大多数 β -羧基酯不对称还原反应, 生成的 β -羟基酯具有光学活性, 是合成手性药物和其他手性化合物的重要中间体, 但反应的立体选择性不高, 影响了其规模化生产. 人们尝试了各种方法^[1,2]提高这类反应的立体选择性, 其中利用酶抑制剂处理酵母细胞是一种有效而直接的方法, 它能够显著地改变其催化 β -羧基酯不对称还原反应的立体选择性. Nakamura 等^[3]利用氯乙酸乙酯处理酵母细胞, 催化乙酰乙酸甲酯的还原, 得到了相反构型的产物; Hayakawa 等^[4]向反应液中加入 L-半胱氨酸等含硫化合物, 使酵母细胞催化 1-乙酸基-2-烷基酮的立体选择性得到了提高; 此外, 向反应体系中加入不饱和羧基化合物^[5]或烯丙基醇等烯丙基类化合物^[6,7]也能明显提高产物的对映体过量值(Enantiomeric excess, *e.e.*).

目前已有许多文献报道添加烯丙基类化合物能够显著改变酵母的立体选择性, 但这些研究未能就反应机理提出令人满意的解释. 而研究反应立体选择性变化的原因与机理, 对于深入了解活性酵母在催化过程中内部相关酶的变化, 探讨酵母立体选择性变化的原因, 研究反应过程中酶与抑制剂、底物间的相互作用关系, 以及进一步有目的地改变产物的构型, 都有十分重要的意义.

本工作以 4-氯-3-羧基丁酸乙酯(Ethyl 4-Chloro-3-oxobutanoate, COBE)不对称还原合成具有光学活性的 4-氯-3-羟基丁酸乙酯(Ethyl 4-Chloro-3-

hydroxybutanoate, CHBE)为模型体系, 分别用丙烯酰胺、烯丙基溴、烯丙基醇等烯丙基类酶抑制剂对酵母细胞进行预处理, 研究烯丙基类化合物对酵母活性和立体选择性的影响及其机理.

2 实验

2.1 材料和试剂

面包干酵母由广东梅山酵母有限公司生产; COBE 和 CHBE 为分析纯, 购自 Acros 公司; 正癸烷为分析纯, 购自 Sigma 公司; 乙酸乙酯等其他化学试剂均为分析纯, 购自中国医药(集团)上海化学试剂公司; 胰蛋白胍(Tryptone)和酵母抽提物(Yeast extract)为 Bio Basci Inc 产品; API ZYM 试验条购自法国 BioMerieux 公司.

2.2 面包酵母的培养与预处理

在 250 mL YEPD 培养基(组成为酵母抽提物 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 胰蛋白胍 20 g/L, pH 7.0)中接入 1 g 由干酵母经单菌落纯化得到的酵母菌体, 在摇床(175 r/min, 35 °C)中恒温培养 24 h 后离心(8000 r/min, 5 min), 收集菌体, 用 5 mmol/L PBS(Phosphate Buffered Saline, pH 7.0, 下同)缓冲液洗涤 2 次.

取 4 g 洗涤后的菌体悬浮于 50 mL PBS 缓冲液中, 分别加入一定浓度的不同酶抑制剂(空白组不加作为对照), 于摇床(175 r/min, 30 °C)中处理 1 h.

2.3 胞内水解酶活性的检测

用 API ZYM 试验条检测酵母细胞内水解酶活性, 方法如下: 在 25 mL PBS 缓冲液中加入 2 g 湿酵母菌体, 预处理后不加底物, 取 1 mL 悬浮液, 以去离子水稀释

收稿日期: 2006-11-27, 修回日期: 2007-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20576118); 高等学校博士点学科专项科研基金资助项目(编号: 20050335131)

作者简介: 李彦(1982-), 男, 四川省成都市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 姚善泾, 通讯联系人, E-mail: yaosj@zju.edu.cn.

至其混浊度在 McFarland No.5~6 之间. 于试验条各杯中接入 65 μL 稀释后的菌悬液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 4 h. 培养结束后向试验条各杯中分别加入 1 滴 ZYM A 与 ZYM B 试剂, 静置 5 min 后以 1000 W 太阳灯照射 10 s(灯与试验条距离约 10 cm)显色.

使用 Ultrospec 3300 Pro 分光光度计定量分析显色结果, 取试验条各杯中样品 60 μL , 加入 1 mL 去离子水稀释, 于 226 nm 下测定其吸光值.

2.4 COBE 不对称还原反应与产物的分离和分析

酵母经预处理后, 向悬浮液中加入 340 μL COBE(底物浓度约 50 mmol/L)和 0.5 g 葡萄糖(浓度 10 g/L, 辅助底物), 再于摇床(175 r/min, 30 $^{\circ}\text{C}$)中恒温反应 2 h. 反应结束后, 取 5 mL 混合液, 加入 3 mL 乙酸乙酯萃取, 振荡混合后离心分离. 萃取 2 次, 合并有机相, 加入无水 MgSO_4 干燥后用气相色谱分析产物浓度, 以正癸烷为内标. 采用毛细管柱 CYCLODEXB(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)分析样品, FID 检测. 利用 Rudolph Autopol IV 型自动旋光仪测定萃取产物的旋光值; 利用 HPLC 手性柱 CHIRALPAKAD-H 测定对映体过量值.

用 CHBE 的得率(Yield)来定量表达酵母催化的效率, 计算式为

$$\text{Yield} = C_{\text{CHBE}} / C_i \times 100\%,$$

式中, C_i , C_{CHBE} 分别为反应起始时 COBE 的摩尔浓度和反应结束时 CHBE 的摩尔浓度.

反应的立体选择性以产物的对映体过量值表示, 定义式为

$$e.e. = (C_S - C_R) / (C_S + C_R),$$

其中, C_S 和 C_R 分别为以 HPLC 测得的 S-和 R-CHBE 的浓度.

3 结果与讨论

3.1 烯丙基类化合物预处理对酵母不对称还原反应结果的影响

面包酵母经烯丙基类化合物预处理后, 其不对称还原 COBE 反应的收率与立体选择性均有显著的改变, 如表 1 所示.

表1 不同预处理条件对收率和 *e. e.* 值的影响

Table 1 Effect of pretreatment on the reaction yield and *e. e.*

Pretreatment	Product	Yield (%)	<i>e. e.</i> (%)
Blank	S-CHBE	88	50
Allyl alcohol 0.5 g/L	S-CHBE	17	94
Allyl bromide 2.0 g/L	R-CHBE	34	72
Acrylamide 1.0 g/L	S-CHBE	67	76

酵母细胞经烯丙基类化合物预处理后, 产物的 *e. e.* 值明显上升, 最高可达 94%. 使用烯丙基溴处理酵母细

胞, 能够得到 R 构型的产物, *e. e.* 值可达 76%. 但使用烯丙基溴与烯丙基醇进行预处理, 产物收率会出现较大程度的下降, 而经丙烯酰胺处理的酵母细胞, 则能维持一个相对较高的收率. 这 3 种烯丙基类化合物对酵母细胞内部产生了何种作用及其改变反应立体选择性的机理是所要研究的内容.

3.2 酶抑制剂预处理对酵母细胞活性的影响

分别取 2 g 酵母菌体悬浮于 25 mL PBS 缓冲液中, 经过烯丙基溴、烯丙基醇和丙烯酰胺等酶抑制剂预处理后, 加入 0.25 g 葡萄糖(浓度 10 g/L)于摇床中培养 2 h, 用 DNS 法测定菌悬液中残留葡萄糖浓度, 以酵母的糖耗速率表征酵母细胞的活性, 得到不同抑制剂对酵母细胞活性的影响情况, 结果如图 1 所示.

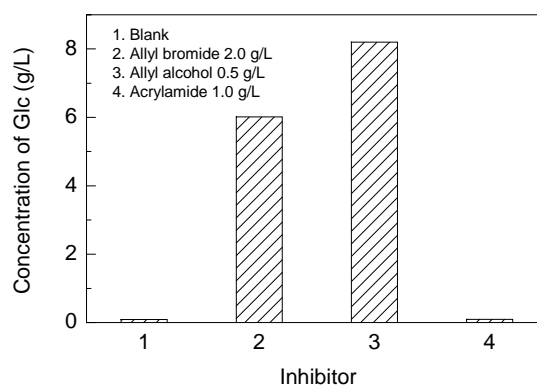


图 1 不同抑制剂处理对酵母细胞活性的影响

Fig.1 Influence of inhibitors on the activities of yeast cells

与空白实验相比, 经烯丙基溴和烯丙基醇预处理后, 酵母消耗葡萄糖的能力明显下降, 说明这两种有机溶剂对细胞有一定的毒害作用, 抑制了酵母细胞的活性; 而丙烯酰胺处理过的酵母, 其糖耗的能力没有明显下降, 说明烯丙基类酶抑制剂对细胞的毒性与其所带的官能团密切相关, 由此产生的胞内酶活的降低将会影响产物的收率与立体选择性.

3.3 酶抑制剂预处理对酵母细胞内水解酶活性的影响

API ZYM 试验条与分光光度计相结合可定量检测 19 种水解酶的活性变化情况. 为进一步考察烯丙基类化合物对酵母细胞生理活性的影响, 测定了经过酶抑制剂预处理的酵母细胞内 5 种水解酶的活性变化, 包括碱性磷酸盐酶及酸性磷酸酶等, 得到了如图 2 所示的结果. 由图可知, 经烯丙基类化合物处理后, 酵母细胞内几种水解酶的活性都有一定的变化. 经丙烯酰胺处理后胞内相关水解酶的活性有一定程度的增加, 而经烯丙基溴和烯丙基醇处理后胞内水解酶的活性有不同程度的下降. 这与上述糖耗能力变化的结果完全一致, 即丙烯酰胺对酵母细胞的毒害作用较小, 而其他两种溶剂的毒害作用

较大. 由此可以推断, 经过烯丙基类化合物预处理后细胞催化 COBE 效率的降低, 除胞内的氧化还原酶受到影响是一个重要因素以外, 细胞内包括水解酶在内的多数酶系活性的降低也是主要原因之一.

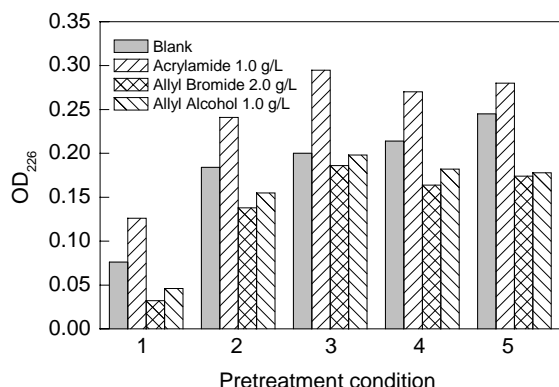


Fig.2 Influence of pretreatment conditions on the activities of intracellular hydrolases

由于烯丙基类化合物对酵母细胞存在一定的毒害作用, 造成细胞及胞内酶系的活性下降, 导致产物收率随体系中有有机溶剂浓度的上升而下降. 杨忠华等^[7]利用烯丙基醇与烯丙基溴对面包酵母进行预处理, 使产物的 *e.e.*值提高至 90%以上, 收率则降低至 50%~70%, 这与本结果在趋势上是一致的.

3.4 酶抑制剂对酵母的作用方式

从以上结果可知, 酵母经烯丙基类化合物预处理后会导致细胞活性降低, 而研究烯丙基类化合物与细胞内酶的作用方式, 对于预处理后细胞恢复活力的可能性, 以及探讨烯丙基类化合物与底物同时存在时的反应机理是非常重要的.

3.4.1 缓冲液洗涤对预处理效果的影响

酵母菌体经烯丙基类化合物预处理后, 离心收集菌体, 室温下加入 5 mmol/L 的 PBS 缓冲液搅拌均匀, 于 8000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液. 同样的条件下, 菌体经反复洗涤后进行催化反应, 结果示于图 3. 由图可见, 酵母菌体经 2.0 g/L 烯丙基溴预处理后, 所得产物构型为 *R* 型, *e.e.*值约为 70%. 菌体经过 PBS 缓冲液洗涤后, 产物的收率提高, *e.e.*值下降, 且此趋势随洗涤次数的增加而更为明显. 经 0.5 g/L 烯丙基醇处理的酵母菌体, 产物的收率随洗涤次数的增加而上升, 而 *S*-CHBE 的 *e.e.*值随之下降. 采用缓冲液洗涤后的菌体其催化活性均表现出与未经预处理的酵母催化能力接近的趋势, 说明烯丙基类酶抑制剂对细胞催化性能的影响

具有可逆性, 很可能是酶抑制剂可逆地吸附于酵母细胞中酶的活性区域, 一旦这些抑制剂被洗掉, 酶的活性就可以得到恢复.

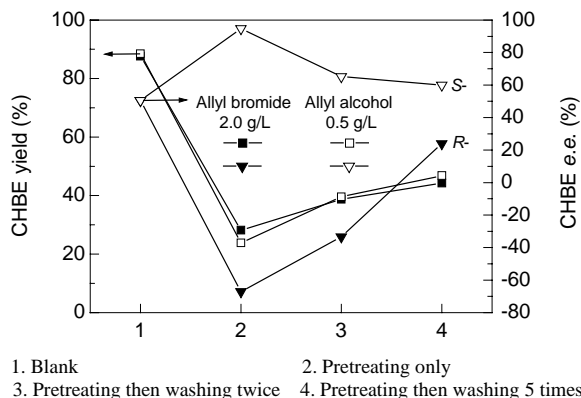


Fig.3 Reaction results of cells washed by phosphate buffer

3.4.2 底物浓度对预处理效果的影响

面包酵母不对称催化 COBE 还原的过程已被证明是由两类具有不同米氏常数(K_m)与催化常数(k_{cat})的 *R* 和 *S* 型酶分别控制的^[8,9]. Vitinius 等^[10]利用面包酵母同时催化还原两种底物, 得到两类不同构型的产物, 且 *e.e.*值均有提高. 这说明两类酶的活性部位存在结构差异. 实验证明, 烯丙基溴主要作用于 *S* 型酶的活性区域, 使 *S*-CHBE 的 *e.e.*值下降甚至改变产物构型; 而烯丙基醇和丙烯酰胺主要作用于 *R* 型酶的活性区域, 显著提高 *S*-CHBE 的对映体过量值.

为进一步考察烯丙基类化合物作为酶抑制剂在反应中所起的作用, 向经过烯丙基醇或烯丙基溴预处理的酵母悬浮液中加入不同浓度的底物, 于相同条件下反应, 结果如图 4 所示.

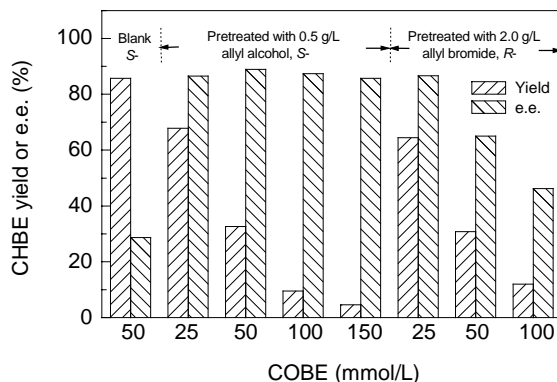
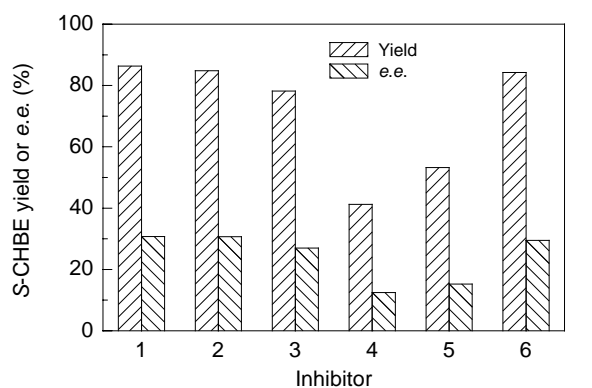


Fig.4 Influence of substrate concentrations on the effects of pretreatment by inhibitors

高浓度的 COBE 对酵母细胞存在一定的毒性^[11], 因此当加入的底物浓度大于 50 mmol/L 时, 产物收率有较明显的下降. 经烯丙基醇处理的酵母, 在不同底物浓度下, 产物(*S*-CHBE)的 *e.e.*值维持在 90%左右; 而以烯丙基溴处理的酵母, 其产物(*R*-CHBE)的 *e.e.*值则随底物浓度的升高由 90%下降到 45%. 这一结果与 Paolo 等^[2]的结论一致: 若抑制剂作用于不占优势的酶, 则对反应结果影响较小; 反之则对结果有较大影响. 在空白条件下, *R*型酶在反应中处于劣势地位, 因此改变底物浓度, 对使用烯丙基醇预处理的效果影响不大; 而作用于 *S*型酶的烯丙基溴, 由于底物浓度升高, 使底物在与酶抑制剂争夺 *S*型酶的过程中逐渐占有优势, 导致产物 *R*-CHBE 的 *e.e.*值下降. 这说明烯丙基类化合物是作为竞争性抑制剂吸附于酶的活性位点.

3.5 抑制剂类似物对酵母立体选择性的影响

选取与抑制剂结构相似的化学试剂溴乙烷、溴化钠、烯丙基氯、苄醇和苄氯对酵母细胞进行处理, 以探讨各基团在反应中的作用, 结果示于图 5. 由图可知, 经过烯丙基氯与多种含溴试剂预处理的酵母细胞, 产物收率与 *e.e.*值无明显变化. 说明抑制剂吸附于酶活性区域的过程是由烯丙基与其所连接的基团共同决定的. 烯丙基能够非特异地结合于 *S*型和 *R*型酶的活性区域, 而不同的基团则决定了抑制剂与酶结合的紧密程度. 烯丙基醇、丙烯酰胺与 *R*型酶之间的吸附作用力可能是由羟基和酰胺基与酶的某些结构形成的氢键提供的, 而烯丙基溴中的溴原子在与 *S*型酶的结合过程中也起到了不可替代的作用.



1. Blank 2. Bromethyl 1 g/L 3. Sodium bromide 1 g/L
4. Benzyl alcohol 2 g/L 5. Benzyl chloride 2 g/L 6. Allyl chloride 2 g/L

图 5 抑制剂类似物对反应收率及立体选择性的影响
Fig.5 Influence of inhibitor analogs on the yield and enantioselectivity

苯甲基与烯丙基化合物在结构和化学性质上有许多相似之处, 但使用苄醇和苄氯处理酵母细胞, *S*-CHBE 的收率与对映体过量值却出现了不同程度的下降, 这可

能是由于两类酶不同的空间位阻所造成的. 由 Athanasiou 等^[12]和 Shieh 等^[13]的研究可知, β -羰基所连基团的空间位阻对两类酶尤其是 *R*型酶的催化活性有较大影响, 而底物 α' 位基团的大小对其能否与 *S*型酶结合起着重要的作用. 烯丙基与苯甲基类化合物可能与底物 β -羰基吸附于酶的不同区域, 但苄氯与苄醇由于空间位阻只能部分吸附于 *S*型酶的活性区域, 阻碍了底物与 *S*型酶的结合, 从而导致产物的收率和 *S*-CHBE 的 *e.e.*值下降.

上述结果说明, 烯丙基类化合物是作为竞争性抑制剂, 通过烯丙基与所带基团的共同作用, 分别吸附于两类酶的活性位点, 阻碍了酶与底物的结合, 导致相应构型的产物对映体过量值下降, 总收率下降. 但抑制剂与酶的结合是可逆的, 且结合的紧密程度也不同. 其作用机理可以用图 6 表示.

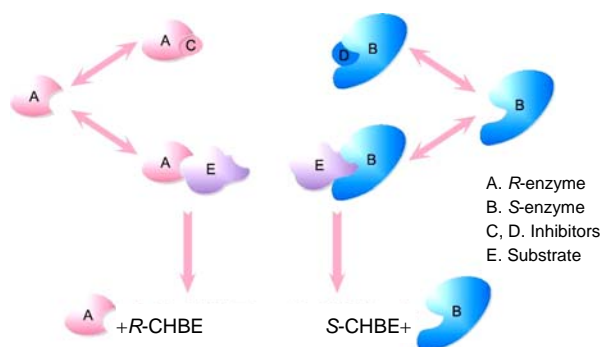


图 6 烯丙基类化合物影响反应立体选择性示意图
Fig.6 Sketch of influence of allyl compounds on enantioselectivity of reaction

4 结论

烯丙基类化合物作为酶抑制剂能显著地改变酵母细胞催化 COBE 不对称还原的立体选择性, 但同时细胞活性及胞内酶系存在一定的抑制作用, 使其收率降低. 用 PBS 缓冲液洗涤经过预处理的酵母细胞以及增加底物浓度的反应结果说明, 烯丙基类化合物提高不对称还原反应立体选择性的反应机理可能是作为竞争性抑制剂可逆地吸附在 *R*或 *S*型酶的活性区域, 阻碍了底物与该类酶的结合, 从而提高相反构型产物的对映体过量值. 以抑制剂结构类似物对酵母细胞进行预处理的反应结果表明, *R*型与 *S*型酶可能具有不同的空间位阻效应, 苄醇与苄氯由于位阻效应只能与 *S*型酶结合, 导致 *S*-CHBE 的收率与对映体过量值均有所下降.

参考文献:

- [1] Yasohara Y, Kizaki N, Hasegawa J, et al. Synthesis of Optically Active Ethyl 4-Chloro-3-hydroxybutanoate by Microbial Reduction [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 51(6): 847-851.

- [2] Davoli P, Forni A, Moretti I, et al. (*R*)-(+ and (*S*)-(–) Ethyl 4,4,4-Trifluoro-3-hydroxy Butanoate by Enantioselective Baker's Yeast Reduction [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1999, 25(1/2): 149–152.
- [3] Nakamura K, Kawai Y, Ohno A. A New Method to Synthesize (*L*)-b-Hydroxyl Esters by the Reduction with Bakers' Yeast [J]. *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31(2): 267–270.
- [4] Hayakawa R, Shimizu M, Fujisawa T. The Baker's Yeast Reduction of 1-Acetoxy-2-alkanones in the Presence of a Sulfur Compound [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, 8(19): 3201–3204.
- [5] Nakamura K, Kawai Y, Oka S, et al. Stereochemical Control in Microbial Reduction: Part 8. Stereochemical Control in Microbial Reduction of β -Keto Esters [J]. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1989, 62: 875–879.
- [6] Nakamura K, Inoue K, Ushio K, et al. Effect of Allyl Alcohol on Reduction of β -Keto Esters by Bakers' Yeast [J]. *Chem. Lett.*, 1987, 4: 679–682.
- [7] 杨忠华, 姚善涇. 有效控制活性酵母催化 β -羰基酯不对称还原反应立体选择性的研究 [J]. *催化学报*, 2004, 25(10): 805–808.
- [8] Shieh W R, Gopalan A S, Sih C J. Stereochemical Control of Yeast Reductions: Characterization of the Oxidoreductases Involved in the Reduction of β -Keto Esters [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107: 2994–2995.
- [9] Nakamura K, Kawai Y, Nakajima N, et al. Stereochemical Control of Microbial Reduction: A Method for Controlling the Enantioselectivity of Reductions with Bakers' Yeast [J]. *Org. Chem.*, 1991, 56(15): 4778–4783.
- [10] Vitinius U, Schaffner K, Demuth M. New Strategies Improve the Efficiency of the Baker's Yeast Reduction of Ketoesters: Near UV Irradiation and a Two-substrate Application [J]. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2005, 169: 197–210.
- [11] 杨忠华, 姚善涇. 水相中酵母细胞催化 4-氯乙酰乙酸酯不对称还原反应 [J]. *催化学报*, 2004, 25(6): 434–438.
- [12] Athanasiou N, Smallridge J A, Trehwella A M. Baker's Yeast Mediated Reduction of β -Keto Esters and β -Keto Amides in an Organic Solvent System [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2001, 11: 893–896.
- [13] Shieh W R, Gopalan A S, Sih C J. Stereochemical Control of Yeast Reductions: 5. Characterization of the Oxidoreductases Involved in the Reduction of β -Keto Esters [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107(10): 2993–2994.

Mechanism of Effects of Allyl Compounds on Asymmetric Reduction of Baker's Yeast

LI Yan, NI Hong-liang, YAO Shan-jing

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract: In the process of asymmetric reduction of β -ketoesters by baker's yeast, the enantioselectivity of yeast cells could be controlled by allyl compounds added in the reaction system. 4-Chloro-3-oxobutanoate (COBE) was used as the model substrate. After yeast cells were pretreated with acrylamide and allyl alcohol, the enantiomeric excess (*e.e.*) of *S*-CHBE increased to 94%, while pretreated with allyl bromide, *R*-CHBE could be detected. The allyl compounds were proved to be toxic to the cells and intracellular enzymes by DNS and API ZYM system respectively. Furthermore, the toxicity was determined by the groups the allyl carried. Washed with PBS buffer for several times, the activity of pretreated yeasts could be recovered gradually. As the concentration of substrate increased, the *e.e.* of *S*-CHBE catalyzed by allyl alcohol-pretreated yeast remained at 90%. On the other hand, the *e.e.* of *R*-CHBE catalyzed by allyl bromide-pretreated yeast dropped from 90% to 45%. These results suggested that allyl compounds acted as competitive enzyme inhibitors adsorbed on the active site of enzymes, and different groups of allyl compounds determined the types of subjected enzymes. The result in pretreatment of the yeast with inhibitor analogs showed that the enzymes had steric hindrance for both inhibitor and substrate.

Key words: asymmetric reduction; 4-chloro-3-oxobutanoate (COBE); enzyme inhibitor; enantioselectivity; catalysis mechanism