

文章编号 :1009-038X(2003)01-0043-06

微生物法制备抗抑郁药 R-托莫西汀中间体

欧志敏¹, 吴坚平¹, 杨立荣¹, 岑沛霖¹, 柳彩波²

(1. 浙江大学 材料与化工学院, 浙江 杭州 310027 2. 浙江省化工集团公司, 浙江 杭州 310027)

摘 要:从 20 株酵母菌中筛选出了两种还原 3-氯-1-苯丙酮生成高光学纯度 R-3-氯-1-苯丙醇的较好菌株 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104, R-3-氯-1-苯丙醇的对映体过剩值为 100%。研究了温度、pH、反应时间、底物质量浓度、菌体添加量等微生物培养条件及反应条件对两种菌种还原 3-氯-1-苯丙酮的影响。以体积分数 5% 的乙醇为共底物, 可使 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 转化底物的产率分别从 17% 和 9% 提高到 50% 和 48%。

关键词:3-氯-1-苯丙酮; R-3-氯-1-苯丙醇; 产率; 对映体选择性

中图分类号:R 971.43

文献标识码:A

Preparation of Chiral Pharmaceutical Intermediate—— R-3-chloro-1-phenylpropanol with Microorganisms

OU Zhi-min¹, WU Jian-ping¹, YANG Li-rong¹, CEN Pei-lin¹, LIU Cai-bo²

(1. College of Material Science and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Zhejiang Chem-Tech Group Co. LTD., Hangzhou 310027, China)

Abstract: *Saccharomyces* B5 and *Candida* 104 which have activity of 3-chloropropiophenone reduction to R-3-chloro-1-phenylpropanol were isolated. The effect of co-substrate, reduction time, pH, temperature, substrate concentration and cell dry weight on the bioreduction was studied.

Key words: 3-chloro-1-propioophenone; R-3-chloro-1-phenylpropanol; yield; enantioselectivity

含手性因素的化学药物, 其对映体在人体内的药理活性、代谢过程及毒性存在着显著差异。1992 年, 美国 FDA 发布的手性药物指导原则激发了手性药物的开发, 市场的需求又促使了上市新药中手性药物呈上升趋势^[1]。

具有特定功能基团的手性醇是合成手性药物和其他手性化学品重要的中间体。3-氯-1-苯丙醇是一种重要的手性药物中间体, 光学纯的 3-氯-1-苯丙醇可用于制备 S-(+)-氟西汀、R-(-)-托莫西汀和

(±)-尼索西汀。其中, S-(+)-氟西汀是 R-(+)-氟西汀药效的 3 倍; R-(-)-托莫西汀是消旋体托莫西汀药效的 2 倍, 是 S-(-)-托莫西汀药效的 9 倍。以上 3 种药物均为抗抑郁药, 可通过图 1 途径制备^[2]。

微生物法还原羰基化合物是制备手性醇的重要手段之一, 其还原过程中需要有辅酶(NADH 或 NADPH)作为还原剂提供氢。直接采用微生物进行还原可实现辅酶的原位再生, 省略了酶的分离纯化过程, 理论上可将底物 100% 的转化成手性醇, 具有

收稿日期 2002-09-05; 修回日期 2002-10-22。

作者简介: 欧志敏(1973-), 女, 辽宁铁岭人, 生物化工博士研究生。

万方数据

较大的工业应用价值.作者筛选出了两种能还原 3-氯-1-苯丙酮产生高光学纯度 R-3-氯-1-苯丙醇的菌株,并对其反应条件进行了优化.

1 材料与方法

1.1 试剂

3-氯-1-苯丙酮,R-3-氯-1-苯丙醇,S-3-氯-1-苯丙醇均为 Fluka 公司产品.

1.2 菌种

酵母菌种为作者所在实验室保藏菌.

1.3 培养基

1.3.1 MYPG 斜面培养基 组分(g/L):麦芽汁 10,酵母粉 3,蛋白胨 5,葡萄糖 10,琼脂 20.

1.3.2 液体培养基 组分(g/L):葡萄糖 30,酵母粉 3,硫酸铵 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $K_2HPO_3 \cdot 3H_2O$ 1, KH_2PO_3 1.

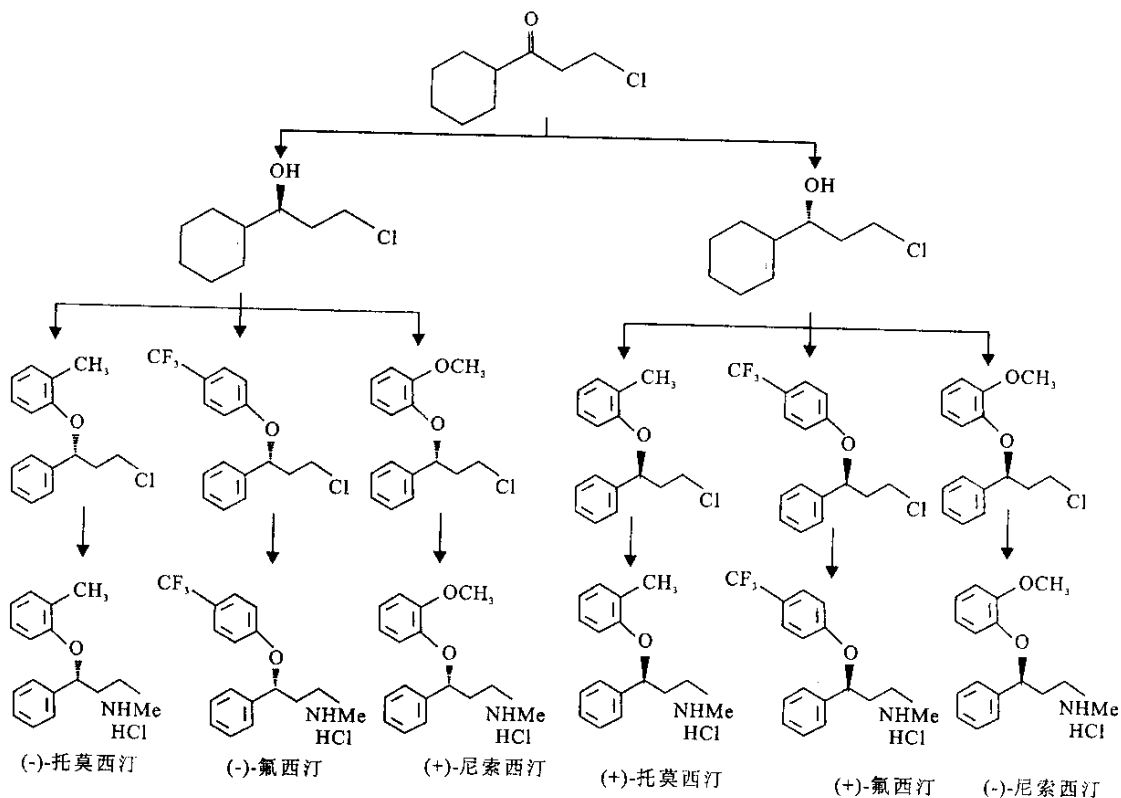


图 1 3-氯-1-苯丙醇制备手性抗忧郁药的途径

Fig.1 Preparation of chiral antidepressant drugs by 3-chloro-1-phenylpropanol

1.4 菌体培养方法

从斜面菌管挑一环菌接种于 100 mL 的液体培养基中,置于摇床中(30 ℃,160 r/min)培养 24 h,获得种子培养液.取 10 mL 种子培养液转接到 100 mL 的液体培养基中,放入摇床中继续培养 24 h,获得的菌体即可用于生物转化.

1.5 还原反应方法

将 1.4 中获得的菌液取出一定量进行离心分离,沉淀用生理盐水洗涤两次,将洗涤后的菌体分散在 20 mL pH 值为 7.0 的缓冲液中,加入一定量的底物,放入摇床(30 ℃,160 r/min)中反应一定时间. 万方数据

1.6 分析方法

还原反应结束后,用适量的乙酸乙酯萃取,从萃取液取样,用 HP6890 气相色谱仪进行分析,色谱柱采用手性柱.检测条件:检测器为离子火焰检测器,载气为氮气,进样器、色谱柱和检测器的温度分别为 250 ℃、130 ℃和 255 ℃.

1.7 数据处理方法

产物产率的计算公式:

$$\text{产率} = \frac{P}{\frac{M_P}{M_S} \times Q} \quad (1)$$

式中, M_S 为底物酮的相对分子质量; M_P 为产

物醇的相对分子质量; Q 为反应初始时底物酮的质量; P 为反应结束时产物醇的质量.

产物光学纯度的计算公式:

$$\text{对映体过剩值} = \frac{c_R - c_S}{c_R + c_S} \quad (2)$$

式中, c_R 为 R 型产物的浓度; c_S 为 S 型产物的浓度.

2 结果与讨论

2.1 菌种的筛选

将干重为 43 mg 的酵母湿细胞分散在 20 mL 缓冲液(pH 7.0,乙醇体积分数为 5%)中,加入 10 mg 3-氯-1-苯丙酮,从保存的 20 株酵母菌中筛选出了 4 株具有对映体选择性还原能力的菌株,结果见表 1.GC 检测的色谱图见图 2 和图 3.结果表明,*Candida* 1257 可将底物还原生成 S 构型的手性醇,其它 3 种酵母菌可将底物还原生成 R 构型的手性醇.酵母菌细胞中起还原作用的还原酶系是由几种同工酶构成,其中一些酶催化底物产生 R 型产物,另一些酶催化底物产生 S 型产物,酵母细胞不同,胞内所含同工酶的种类不同,因此,不同的酵母细胞可还原底物产生不同构型的产物.

表 1 具有还原 3-氯-1-苯丙酮能力的微生物的筛选
Tab.1 Screening microorganisms that can reduce 3-chloropropiophenone to 3-chloro-1-phenylpropanol

菌 种	产率 / %	光学纯度 / %
<i>Saccharomyces</i> P2	30	74
<i>Saccharomyces</i> B5	50	100
<i>Candida</i> 104	48	100
<i>Candida</i> 1257	100	33 *

注:* 产物为 S 型.

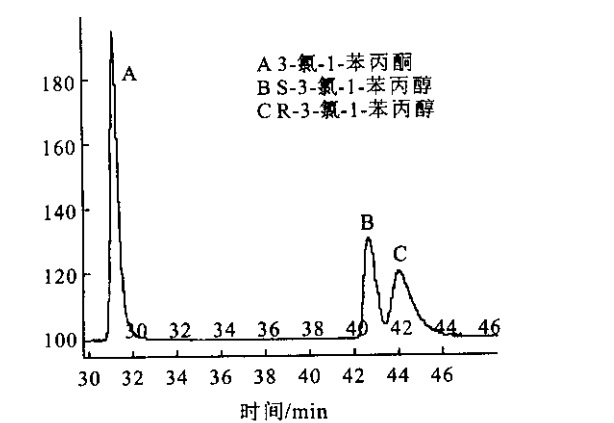


图 2 标准品的 GC 图谱
Fig.2 The chromatographic graph of standard sample

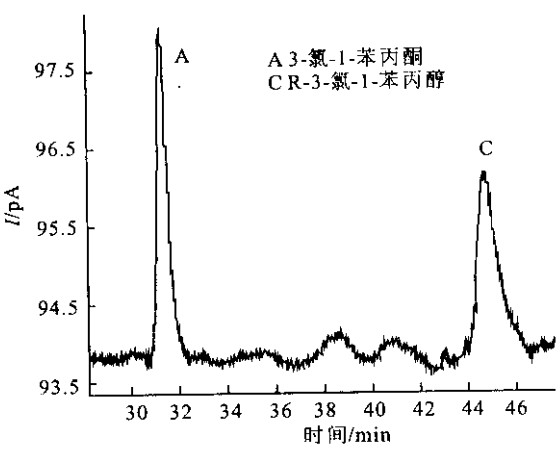
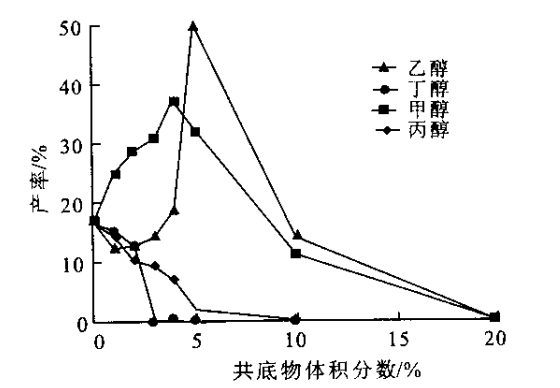


图 3 *Saccharomyces* B5 还原底物的 GC 图谱
Fig.3 The chromatographic graph of biotransformation with *Saccharomyces* B5

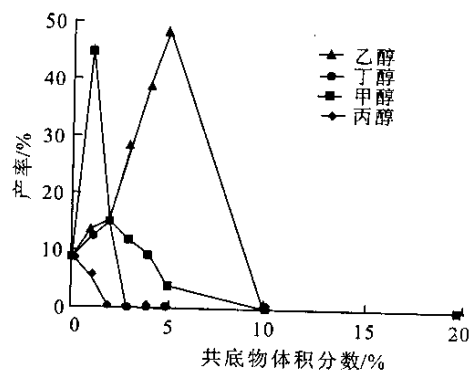
Saccharomyces B5 和 *Candida* 104 将底物还原生成的 R 型手性醇的对映体过剩值均为 100%, 两者的还原产率接近,因此确定 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 为还原底物生成 R 型手性醇的较佳微生物,并对其进行进一步研究.

2.2 共底物体积分数对 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 还原 3-氯-1-苯丙酮的影响

适量地添加共底物(cosubstrate)有助于提高反应的产率和控制反应的立体选择性^[3]. 因此,以甲醇、乙醇、2-丙醇、正丁醇为共底物,研究它们对微生物还原 3-氯-1-苯丙酮(10 mg)的影响,结果见图 4 和图 5.将干重为 43 mg 的酵母湿细胞分散在 20 mL pH 7.0 的缓冲液中,加入 10 mg 3-氯-1-苯丙酮和不同共底物,反应在 30 ℃ 摇床中进行,反应时间为 24 h.



酵母干重 43 mg ;底物质量 10 mg ;pH 7.0 ;30 ℃ 反应 24 h
图 4 共底物体积分数对 *Saccharomyces* B5 还原 3-氯-1-苯丙酮的影响
Fig.4 The effect of co-substrate on reduction with *Saccharomyces* B5



酵母干重 43 mg ;底物质量 10 mg ;pH 7.0 ;30 ℃反应 24 h
图 5 共底物体积分数对 *Candida* 104 还原 3-氯-1-苯丙酮的影响

Fig.5 The effect of co-substrate on reduction with *Candida* 104

不添加共底物时, *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 还原 3-氯-1-苯丙酮(10 mg)的产率分别为 17%和 9% .当以体积分数 4%的甲醇和 5%的乙醇为共底物时, *Saccharomyces* B5 还原底物的产率分别为 37%和 50% .当以体积分数 1%的甲醇、5%的乙醇和 1%的正丁醇为共底物时, *Candida* 104 还原底物的产率分别为 45%、48%和 15% .而以其它体积分数的甲醇、乙醇、2-丙醇、正丁醇为共底物都不能提高 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 还原底物的能力 .其原因可能是,由于酵母细胞中起还原作用的还原酶系是由几种同工酶组成,合适体积分数的共底物有利于几种同工酶同时发生作用,还原产率高 .而不适当的共底物或不合适的共底物体积分数可抑制一种或几种同工酶的活性,不利于还原反应进行 .从以上结果可知,体积分数 5%的乙醇溶液为共底物对 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 还原底物的效果均较好 .酵母细胞中含有醇脱氢酶,可催化乙醇脱氢生成乙醛,同时将氢转移给辅酶 I (NAD)生成还原型辅酶 I (NADH),NADH 可继续为还原底物酮的过程提供氢(见图 6) .乙醇为共底物有利于实现辅酶的原位再生 .因此,选择体积分数 5%的乙醇溶液为共底物进一步研究 .产物手性醇的对映体过剩值并不随共底物的种类与浓度的改变而改变,均为 100% .

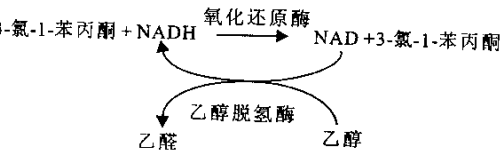
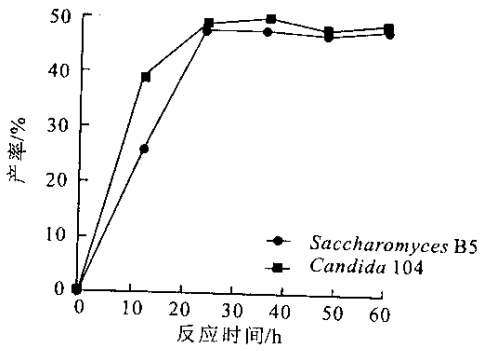


图 6 以乙醇为共底物有助于辅酶再生的机理
Fig. 6 The mechanism of regeneration of coenzyme with ethanol as cosubstrate

2.3 最佳反应时间的确定

将干重为 43 mg 酵母湿细胞分散在 20 mL pH 值为 7.0 的磷酸缓冲液中,加入 10 mg 底物和体积分数 5%的乙醇,于 30 ℃摇床中反应,每隔 12 h 取样,用 GC 检测对映体过剩值和产率,结果见图 7 .从图中可以看出,两种微生物反应 24 h 后,产率已接近 50% ,反应时间的延长对产率没有大的影响,故确定最佳反应时间为 24 h .GC 分析表明,产物的对映体过剩值不随反应时间而改变,均为 100% .



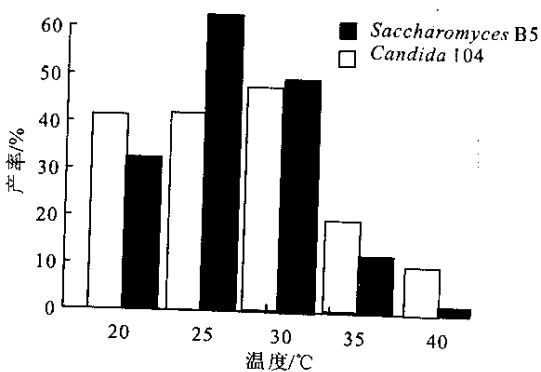
酵母干重 43 mg 底物质量 10 mg 共底物乙醇体积分数 5% ;
温度 30 ℃ ;pH 7.0

图 7 反应时间对 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 还原 3-氯-1-苯丙酮的影响

Fig.7 The effect of time on reduction

2.4 最佳温度的确定

反应温度对微生物转化的影响见图 8 . *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 对 3-氯-1-苯丙酮还原反应的最适温度分别为 25 ℃和 30 ℃ .微生物菌种不同,产生的氧化还原酶的种类不同,不同的氧化还原酶催化同一种底物的最佳温度也不同 .产物手性醇的对映体过剩值不随反应温度的变化而改变,均为 100% .



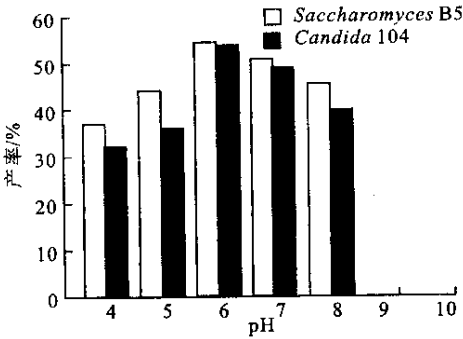
酵母干重 43 mg 底物质量 10 mg ;共底物乙醇体积分数 5% ;
pH 7.0 反应时间 24 h

图 8 温度对 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 还原 3-氯-1-苯丙酮的影响

Fig.8 The effect of temperature on reduction

2.5 最佳 pH 值的确定

分别取干重为 43 mg 的湿菌体洗涤后分散在不同 pH 值的 20 mL 磷酸缓冲液中,加入 10 mg 底物和体积分数 5% 的乙醇,置于 30 ℃ 摇床中反应 24 h,结果见图 9. *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 还原底物的最佳 pH 值均为 pH 6.0. pH 在 3.0 以下和 9.0 以上时,微生物丧失对底物的还原能力,说明过酸或过碱的条件对微生物活性的影响很大.产物手性醇的对映体过剩值不随 pH 的改变而变化.



酵母干重 43 mg ;底物质量 10 mg ;共底物乙醇体积分数 5% ;
温度 30 ℃ 反应时间 24 h

图 9 pH 值对 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 还原 3-氯-1-苯丙酮的影响

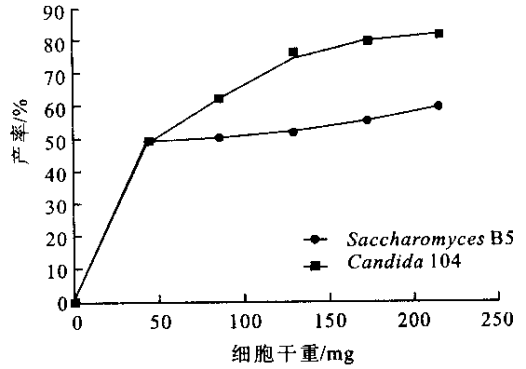
Fig.9 The effect of pH on reduction

2.6 微生物添加量对产率的影响

菌体添加量对产物产率的影响见图 10. 实验结果显示,产物产率随菌体用量的增加而提高,由于微生物菌体增加,不仅使参加反应的辅酶量增多,同时对辅酶的再生也有利,在底物质量浓度不变的情况下,辅酶量增加有助于提高产物的产率.因此,当底物质量浓度不变时加大菌体量有助于提高反应产率,同时产物的对映体过剩值始终保持 100%. *Candida* 104 菌体量的增加对还原产率提高幅度比 *Saccharomyces* B5 菌体量的增加对还原产率提高的幅度大,215 mg 的 *Candida* 104 可将产率提高到 81%.由此可见, *Candida* 104 比 *Saccharomyces* B5 更适于还原 3-氯-1-苯丙酮.

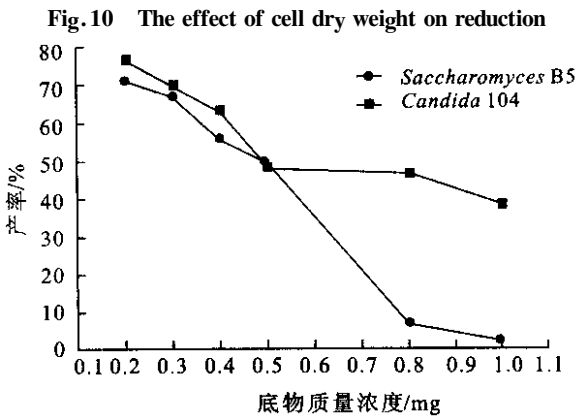
2.7 底物质量浓度对产率的影响

底物质量浓度对还原反应的影响见图 11. 产物的对映体过剩值不随底物的质量浓度而改变,均为 100%. 产率随底物质量浓度的升高而迅速下降,说明底物质量浓度过高对微生物有害,对氧化还原酶的活力存在抑制作用.由图可见,底物对 *Candida* 104 的毒性比对 *Saccharomyces* B5 的毒性小.因此 *Candida* 104 比 *Saccharomyces* B5 更适于还原 3-氯-1-苯丙酮.



底物质量 10 mg ;共底物乙醇体积分数 5% ;温度 30 ℃ ;
pH 7.0 ;反应时间 24 h

图 10 微生物添加量对产率的影响



酵母干重 43 mg ;共底物乙醇体积分数 5% ;温度 30 ℃ ;pH
7.0 反应时间 24 h

图 11 底物质量浓度对产率的影响

Fig.11 The effect of substrate concentration on yield

2.8 培养条件及反应条件对还原反应的影响

分别在厌氧和好氧条件下培养微生物后,取干重为 43 mg 的湿菌体分散在 20 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液中,加入 10 mg 底物和体积分数 5% 的乙醇,分别在振荡与静止的条件下 30 ℃ 反应 24 h,分析结果见表 2. 可以看到,厌氧培养的微生物不能转化 3-氯-1-苯丙酮,说明厌氧条件下培养的这两种微生物均不能产生用于还原反应的氧化还原酶.好氧培养的两种微生物,在振荡反应条件下能比静止条件下获得更高的产率.振荡反应时有利于强化传质,能促进底物扩散进入微生物细胞内进行还原反应及促进产物释放到胞外.

2.9 还原反应中微生物的重复利用

干重为 43 mg 的湿菌体洗涤后分散在 20 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液中,加入 10 mg 3-氯-1-苯丙酮和体积分数 5% 的乙醇,反应 24 h 后离心,上清液用于色谱检测,离心的细胞洗涤后继续分散在 pH 7.0 的 20 mL 磷酸缓冲液中,加入 10 mg 3-氯-1-苯

丙酮和体积分数 5% 的乙醇,继续反应 24 h,依次操作 5 次,结果见表 3.以体积分数 5% 的乙醇溶液为共底物时, *Saccharomyces* B5 可连续用于还原反应 4 次, *Candida* 104 可连续用于还原反应 3 次,可见 *Saccharomyces* B5 重复利用的效果比 *Candida* 104 好.

表 2 微生物培养条件及振荡对还原反应的影响
Tab.2 The effect of culture condition of microorganisms on reduction

菌 种	反应条件	厌氧培养		好氧培养	
		产率/ %	对映体 过剩值/%	产率/ %	对映体 过剩值/%
<i>Saccharomyces</i> B5	振荡	0	—	50	100
	静止	0	—	28	100
<i>Candida</i> 104	振荡	0	—	48	100
	静止	0	—	26	100

3 结 论

筛选出两种具有较好立体选择性的还原 3-氯-1-苯丙酮能力的菌株 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104,产生的 R-3-氯-1-苯丙醇的对映体过剩值为

表 3 还原反应中微生物的重复利用				
Tab.3 Reuse of microorganisms in reduction				
重复 利用次数	<i>Saccharomyces</i> B5		<i>Candida</i> 104	
	产率/ %	对映体 过剩值/%	产率/ %	对映体 过剩值/%
1	51	100	48	100
2	50	100	48	100
3	50	100	47	100
4	37	100	0	—
5	0	—	0	—

100%.以甲醇、乙醇、2-丙醇和正丁醇为共底物研究了添加共底物对两种微生物 *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 还原 3-氯-1-苯丙酮的影响,选择了体积分数 5% 的乙醇溶液为最佳共底物.在体积分数 5% 的乙醇溶液为共底物时, *Saccharomyces* B5 在 pH 6.0,25 ℃,24 h 具有较高的产率, *Candida* 104 在 pH 6.0,30 ℃,24 h 具有较高的产率.增加微生物的质量和降低 3-氯-1-苯丙酮的质量均可使产率升高. *Saccharomyces* B5 和 *Candida* 104 可分别连续重复利用 4 次和 3 次,微生物的连续重复利用可提高产品产量.

参考文献：

[1] 尤田 耙. 手性化合物的现代研究方法[M]. 合肥 中国科技大学出版社,1993. 1 – 10.
[2] Morris S, Ramachandran P V, Brown H C. Chiral synthesis via organoboranes. 18. Selective reductions 43. Diisopinocampheylchloroborane as an excellent chiral reducing reagent for the synthesis of halo alcohols of high enantiomeric purity. A highly enantioselective synthesis of both optical isomers of Tomoxetine, Fluoxetine, and Nisoxetine[J]. J Org Chem, 1988, 53 :2916 – 2920.
[3] Allan C, Morten F. Baker’s yeast : improving the d-stereoselectivity in reduction of 3-oxo esters[J]. Tetrahedron Asymmetry, 1999, 10 :551 – 559.

(责任编辑 朱 明)