

文章编号:1673-1689(2006)02-0066-04

## 面包酵母催化溶剂相不对称 还原合成(R)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯

石玉刚, 方云, 蒋南, 夏咏梅\*

(江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 研究有机溶剂中面包酵母催化 2-氧代-4-苯基丁酸乙酯(OPBE)不对称还原合成(R)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯((R)-HPBE), 分别考察有机溶剂种类、初始水含量、初始底物浓度、缓冲液 pH 值和添加剂等因素对 OPBE 转化率( $C_{OPBE}$ )、HPBE 产率( $Y_{HPBE}$ )及(R)-HPBE 的光学纯度( $ee\%$ )的影响。实验结果表明, 乙醚为适宜反应介质, 适宜 pH 为中性; 反应初始水含量和初始底物浓度分别以  $w(H_2O)=30\text{ g/L}$ 、 $c(OPBE)=5\text{ mmol/L}$  为佳。添加  $\alpha$ -氯代苯乙酮( $\alpha$ -PC)对酵母预处理 2 h 后, (R)-HPBE 的  $ee$  从 35.52% 提高为 82.25%,  $C_{OPBE}$  和  $Y_{HPBE}$  分别从 75.29% 和 46.02% 提高到 98.51% 和 75.82%。

**关键词:** 面包酵母; 不对称还原; (R)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯; 溶剂相

**中图分类号:** TQ 032

**文献标识码:** A

## Enantioselective Synthesis of Ethyl(R)-2-Hydroxy-4-Phenylbutyrate Mediated by *Saccharomyces cerevisiae* in Organic Solvents

SHI Yu-gang, FANG Yun, JIANG Nan, XIA Yong-mei\*

(School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** The asymmetric reduction of ethyl-2-oxo-4-phenylbutyrate (OPBE) catalyzed by bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in organic solvent to synthesize optically active ethyl-2-hydroxy-4-phenylbutyrate (HPBE) was investigated in detail. The conditions for asymmetric reduction were also studied. The reaction was run in aqueous diethyl ether at 30°C for 24h under the catalysis of bakers' yeast, which preincubated for 2h in the presence of phenacyl chloride. As a result, both higher chemical yield (78.25%) and higher stereoselectivity (82.25%  $ee$ ) were obtained at the optimum pH 7.0, dosage of water 30 g/L and substrate concentration 5 mmol/L, respectively.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*; asymmetric reduction; chiral ethyl-2-hydroxy-4-phenylbutyrate; organic phase

(R)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯((R)-HPBE)是合 成众多普利系列血管紧张肽-转化酶(ACE, 全称

收稿日期: 2005-04-12; 修回日期: 2005-07-01.

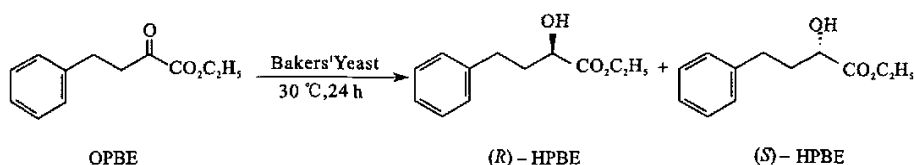
基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2004019).

作者简介: 石玉刚(1979-), 男, 湖北十堰人, 应用化学博士研究生; \* 责任作者.

angiotensin converting enzyme) 抑制剂的关键手性中间体。由于(R)-HPBE 在该类药物合成中的重要性, 众多学者报道了大量的制备方法<sup>[1]</sup>。微生物细胞内酶催化的氧化还原反应在手性药物或中间体的生物不对称合成方面有着重要的应用价值。面包酵母(Bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae*) 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, 利用面包酵母对一些前手性羰基化合物直接进行不对称还原, 获得高光学纯度的手性

醇作为手性药物“砌块”, 越来越引起人们的兴趣<sup>[2]</sup>。

作者以 2-氧代-4-苯基丁酸乙酯(OPBE) 为前手性底物, 用 *Saccharomyces cerevisiae* 催化溶剂相不对称还原合成(R)-HPBE (Scheme 1)。在平底酶反应器中考察面包酵母在有机溶剂相中的催化性能, 初步探讨环境因子对底物 OPBE 转化率、HPBE 得率和(R)-HPBE 对映体过量值(*ee*%) 的影响。反应式如下所示。



## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与仪器

*Saccharomyces cerevisiae*: 桃花包点干酵母, 梅山-马利酵母有限公司产品; トテイイースト dry yeast; オリエソタル酵母工業株式会社产品; OPBE, 纯度 99%, 武进卫星化学试剂厂产品; (R)-HPBE, 纯度 99%, ALDRICH 化学公司产品;  $\alpha$ -氯代苯乙酮( $\alpha$ -PC), 纯度 99%, 常州市江南医药原料厂产品; 其余试剂均为分析纯, 中国医药(集团)上海化学试剂公司产品。95-1 型磁热搅拌器; 上海医用仪器厂产品; R201 型旋转蒸发器; 上海申生科技有限公司产品; GC9790 型气相色谱分析仪; 福立分析仪器有限公司产品; Trace MS-GC 联用仪; FINNIGAN 仪器公司产品。

### 1.2 合成与分析方法

称取约 0.2 g OPBE 与 50 mL 选定溶剂置于带有水浴恒温, 磁力搅拌和冷凝回流装置的 50 mL 平底酶反应器中, 混合均匀并升温至 30 °C, 加入干面包酵母 50 mg/mL 搅拌下计时反应。反应结束后, 过滤去除酵母, 加入 5 g 无水硫酸钠干燥 3 h 后滤除干燥剂, 残液经减压蒸馏除去溶剂得到 HPBE 粗产物。产物 GC 分析条件: CP-Chirasil-Dex CB 手性柱(25 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m); 载气氮气流量 2.5 mL/min; 色谱柱/进样器/检测器温度为 160/250/250 °C; 进样量 0.2  $\mu$ L, 分流比 1:100; 氢离子火焰检测器。用面积归一化法计算 OPBE 转化率( $C_{\text{OPBE}}$ )及 HPBE 产率( $Y_{\text{HPBE}}$ ); 根据手性 GC 中两种对映体的峰面积比计算对映体纯度, 以对映体过

量值( $ee\% = (A_R - A_S) / (A_R + A_S)$ ) 表征。

## 2 结果与讨论

### 2.1 有机溶剂及初始加水量的影响

面包酵母在不同种类有机溶剂中的催化效果如表 1 所示。

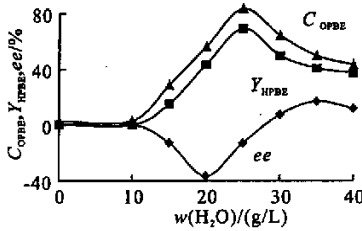
表 1 有机溶剂对面包酵母催化不对称还原 OPBE 的影响  
Tab. 1 The result of asymmetric reduction of OPBE in different organic solvents

溶剂	$w(\text{H}_2\text{O})/(\text{g/L})$			
	0		30	
	$ee/\%$ *	$Y_{\text{HPBE}}/\%$	$ee/\%$	$Y_{\text{HPBE}}/\%$
石油醚	-	0	-37.38	52.01
异丙醚	-	0	-18.99	64.44
乙酸乙酯	-	0	-4.85	17.16
乙醇	-	0	0.98	2.09
乙醇乙烯醚	-	0	-	0
二甲亚砜	-	0	-	0
二甲基甲酰胺	-	0	-	0
乙二醇二甲醚	-	0	0	1.24
正己烷	-	0	2.08	10.90
丙酮	-	0	6.69	0.40
二乙醚	0.56	0.90	7.93	49.94
苯	-	0	12.00	12.87

日本东方酵母 50 g/L,  $c(\text{OPBE}) = 20 \text{ mmol/L}$ , 30 °C, 24 h  
注: 正、负分别表示对应(R)-构型和(S)-构型

$w(\text{H}_2\text{O})$  为 30 g/L 时, 正己烷、丙酮、苯、乙醚中的产物  $ee\%$  都为正值, 其余为负值。据信, 介质

改变导致酶分子立体选择性翻转可能是极性改变使酶分子中疏水性氨基酸残基和亲水性氨基酸残基的位置发生较大变化使然<sup>[3]</sup>。此外,初始水含量对酶的立体选择性也有影响<sup>[4]</sup>, $w(\text{H}_2\text{O})$ 为零时,只有乙醚中发生不对称还原反应且 $ee\%$ 和产率很低; $w(\text{H}_2\text{O})=30\text{ g/L}$ 时,醚类溶剂如异丙醚和乙醚或烃类溶剂石油醚中, $Y_{\text{HPBE}}$ 较高( $\geq 50\%$ )但只有乙醚中(R)-HPBE含量略占优势( $ee\%=7.93$ );苯中 $ee\%$ 比乙醚的高但 $Y_{\text{HPBE}}$ 较低,说明对活性位点的抑制作用较强<sup>[5]</sup>。溶剂极性( $\lg P$ )被用来衡量酶与有机溶剂分子的兼容性<sup>[6,7]</sup>,作者实验表明,面包酵母在疏水性中等的醚类溶剂中 $Y_{\text{HPBE}}$ 和(R)-HPBE选择性都较好。图1表明,反应体系中加入适量水充当润滑剂可使酶维持催化活性所需要的柔性, $w(\text{H}_2\text{O})$ 增加到35 g/L时酵母在乙醚溶剂中由颗粒状变为粘稠状,发生传质困难,使得 $C_{\text{OPBE}}$ 和 $Y_{\text{HPBE}}$ 均下降。综合考虑 $C_{\text{OPBE}}$ 、 $Y_{\text{HPBE}}$ 和 $ee\%$ ,选择适宜 $w(\text{H}_2\text{O})$ 为30 g/L。



日本东方酵母 50 g/L,  $c(\text{OPBE})=20\text{ mmol/L}$ , diethyl ether, 30 °C, 24 h

图1 初始水质量浓度的影响

Fig.1 Effect of initial water content on the reaction

## 2.2 初始底物浓度的影响

生物催化还原反应中底物浓度有时会对反应产生较大影响<sup>[8,9]</sup>,表2为初始底物浓度 $c(\text{OPBE})$ 对还原反应的影响。实验结果表明,随着底物浓度的增加,不对称还原反应的(R)-HPBE的 $ee\%$ 、 $C_{\text{OPBE}}$ 和 $Y_{\text{HPBE}}$ 都随之下降。当 $c(\text{OPBE})$ 由5 mmol/L增加至20 mmol/L时, $ee\%$ 由41.78%降至7.93%,说明底物对面包酵母催化生成(R)-HPBE的活性中心的抑制作用大于对生成(S)构型的活性中心的作用; $C_{\text{OPBE}}$ 和 $Y_{\text{HPBE}}$ 由98.15%和77.77%降至64.39%和49.94%,说明底物浓度过高对该面包酵母有毒害作用,对其氧化还原酶的活力有一定抑制作用。

## 2.3 pH值的影响

配制不同初始pH值的缓冲液,考察pH值对 $C_{\text{OPBE}}$ 、 $Y_{\text{HPBE}}$ 和(R)-HPBE的 $ee\%$ 的影响,结果见图2。在本实验的pH值范围内, $C_{\text{OPBE}}$ 、 $Y_{\text{HPBE}}$ 和(R)-

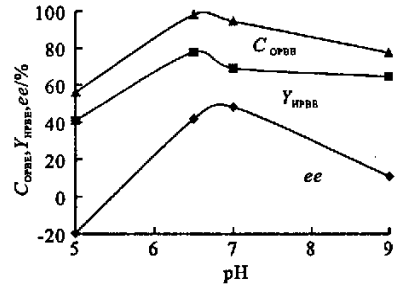
HPBE的 $ee\%$ 值随pH变化趋势基本一致。当pH=6.5时, $C_{\text{OPBE}}$ 和 $Y_{\text{HPBE}}$ 都达到最大。当pH=5时,酵母还原的产物中(S)构型占优势,随着pH值增加,(S)构型产物逐渐减少,(R)构型产物增加, $ee\%$ 值由负转正。由于酶是两性化合物,分子中存在着许多羧基和氨基等酸性或碱性基团,pH值的改变将会影响其电离,从而改变酶的空间构象并进而影响酶的活性和选择性。从图2可以看出过高或过低的pH值都对反应不利,最适pH值接近中性。因此,在反应研究过程中以加入去离子水来维持酶的催化活性。

表2 初始底物浓度对还原反应的影响

Tab.2 Effect of substrate concentration on the reaction

$c(\text{OPBE})/(\text{mmol/L})$	$C_{\text{OPBE}}/\%$	$Y_{\text{HPBE}}/\%$	$ee/\%$	构型
5	98.15	77.77	41.78	R
10	86.15	67.63	19.83	R
15	75.23	58.52	12.61	R
20	64.39	49.94	7.93	R

日本东方酵母 50 g/L, 乙醚,  $w(\text{H}_2\text{O})=30\text{ g/L}$ , 30 °C, 24 h



日本东方酵母 50 g/L,  $c(\text{OPBE})=5\text{ mmol/L}$ , 乙醚,  $w(\text{H}_2\text{O})=30\text{ g/L}$ , 30 °C, 24 h

图2 pH值的影响

Fig.2 Effect of pH on the reaction

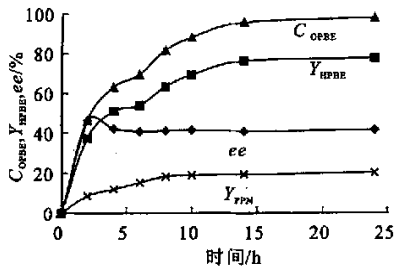
## 2.4 底物结构的影响

将OPBE水解成酸,再用异丙醇酯化,得到2-氧代-4-苯基丁酸异丙酯作为前手性底物进行不对称还原。实验结果表明:与乙酯底物相比,在日本东方酵母加入量50 g/L, $c(\text{OPBE})=5\text{ mmol/L}$ ,乙醚, $w(\text{H}_2\text{O})=30\text{ g/L}$ ,30 °C条件下反应24 h后, $ee\%$ 从35.52%降到-4.59%, $C_{\text{OPBE}}$ 和 $Y_{\text{HPBE}}$ 分别从75.29%和46.02%降到15%和10%。不同底物结构有可能造成酶催化活性和选择性的改变,催化活性和选择性显著降低的原因预计是因为异丙酯的体积比乙酯大,受空间位阻的影响,酶的活性中心难以与底物结合,降低了酶的催化活性和选择性。

## 2.5 优化条件下 $C_{\text{OPBE}}$ 、 $Y_{\text{HPBE}}$ 和 $ee\%$ 值的时间进程

取上述优化条件组合,考察 $C_{\text{OPBE}}$ 、 $Y_{\text{HPBE}}$ 和(R)-

HPBE 的  $ee\%$  值随反应时间的变化(图 3)。  $C_{OPBE}$  和  $Y_{HPBE}$  在开始阶段增大均较为迅速,反应至 15 h 已接近最大值。与在水相中反应比较<sup>[10]</sup>,溶剂相反应虽未发生 HPBE 的明显水解,但并不能完全阻止原料 OPBE 分解生成副产物苯丙醇(PPN)。



日本东方酵母 50 g/L,  $c(OPBE) = 5$  mmol/L, 乙醚,  $w(H_2O) = 30$  g/L, 30 °C

图 3 面包酵母催化溶剂相不对称还原反应的时间进程

Fig. 3 Time course of asymmetric reduction

## 2.6 添加剂对手性选择性的影响

上述实验结果表明即使在优化条件下(R)-HPBE 的手性选择性仍然偏低,因此有必要考虑通过添加剂的方式加以改善,文献报道<sup>[11]</sup>  $\alpha$ -氟代苯乙酮( $\alpha$ -PC)具有改善酵母不对称还原选择性的功能。在 50 mL 乙醚和 1.25 mL 去离子水中加入变化量的添加剂  $\alpha$ -PC,在带有水浴加热、磁力搅拌和冷凝回流装置的平底酶反应器中混合均匀并升温至 30 °C 后加入干面包酵母,磁力搅拌 2 h 后加入 0.052 g OPBE,反应 24 h 后结束反应,考察添加剂浓度对该生物催化还原反应的影响,结果如表 3 所示。体系中未添加  $\alpha$ -PC 时还原反应的  $C_{OPBE}$ 、 $Y_{HPBE}$  和 (R)-HPBE 的  $ee\%$  均较低。当  $\alpha$ -PC 质量浓度为 8 g/L 时,还原反应的  $C_{OPBE}$  ( $>98\%$ )、 $Y_{HPBE}$  ( $>75\%$ ) 达到最佳值,同时 (R)-HPBE 的光学纯度较高 ( $ee\% > 82$ )。但继续增加添加剂质量浓度,  $C_{OPBE}$ 、 $Y_{HPBE}$  和 (R)-HPBE 的  $ee\%$  都明显降低。这种浓度效应可以解释为  $\alpha$ -PC 与前手性底物 OPBE 在结构上较为相似,在预处理面包酵母过程中适量的  $\alpha$ -PC 与酵

母细胞中催化(S)构型的活性位优先结合,因而在随后的还原反应中与 OPBE 结合的主要是酵母细胞中催化(R)构型的活性位,从而提高了生物还原反应的立体选择性;过量添加剂会进一步占据酵母细胞中催化(R)构型的活性位,影响随后前手性底物与酵母细胞中催化(R)构型的活性位结合,降低了酶的催化活性并使该反应的立体选择性也降低。

表 3 添加剂质量浓度对反应的影响

Tab. 3 Effect of additive concentrations on the reaction

$\alpha$ -PC/(g/L)	$C_{OPBE}/\%$	$Y_{HPBE}/\%$	$ee/\%$	构型
0	75.29	46.0	235.52	R
1	95.48	70.26	58.59	R
2	95.87	70.65	61.88	R
4	97.72	70.70	63.48	R
6	97.95	74.48	75.47	R
8	98.51	75.82	82.25	R
10	89.53	65.08	66.94	-R
12	87.51	62.90	67.22	R

日本东方酵母 50 g/L,  $c(OPBE) = 5$  mmol/L, 乙醚,  $w(H_2O) = 25$  g/L, 30 °C, 24 h

## 3 结论

通过对面包酵母催化溶剂相不对称还原 OPBE 生成(R)-HPBE 的研究,得出以下结论:疏水性质的各种有机溶剂中还原反应的  $C_{OPBE}$ 、 $Y_{HPBE}$  和 (R)-HPBE 的  $ee\%$  均不同,乙醚为适宜反应介质但必须同时添加适量水。用  $\alpha$ -PC 对酵母预处理 2 h 后,各项指标明显提高。在日本东方酵母加入量 50 g/L,  $c(OPBE) = 5$  mmol/L, 乙醚,  $w(H_2O) = 30$  g/L, 30 °C 下反应时间 24 h 的适宜条件下, (R)-HPBE 的  $ee\%$  明显从 35.52% 提高到 82.25%,  $C_{OPBE}$  和  $Y_{HPBE}$  分别从 75.29% 和 46.02% 提高到 98.51% 和 75.82%。

## 参考文献:

- [1] 林文清, 张晓梅. (R)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯的合成 [J]. 合成化学, 2002, 10(5): 385-390.
- [2] Nakamura K, Matsuda T. Asymmetric reduction of ketones by the acetone powder of *Geotrichum candidum* [J]. J Org Chem. 1998, 63(24): 8957-8966.
- [3] 王智, 董桓, 曹淑桂. 手性拆分反应中酶立体选择性的调控 [J]. 自然科学进展, 2003, 13: 126-131.
- [4] 张玉彬. 生物催化的手性合成 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [5] De Smet M J, Kingma J, Witholt B. The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of escherichia coli [J]. Biochim Biophys Acta, 1978, 506: 64-80.

(下转第 73 页)

### 3 结 论

1) 预湿润处理可缩短白蘑菇的预冷时间,水分添加量为样品质量4%、5%和6%的样品,其预冷时

间仅为对照样的一半左右,预湿润处理不仅提高了产品质量而且节约了能源。

2) 样品处理量为4 kg时,综合考虑各项理化指标,水分添加量为样品总质量的5%时,样品的贮藏效果较好。

### 参考文献:

- [1] 石小琼,邓金星,张映斌. 真空预冷技术在子芋冷藏保鲜上的应用研究[J]. 农业工程学报,2001,(4):86-90.
- [2] 王海鸥,姜松. 真空冷却技术及其在食品工业的研究和应用[J]. 制冷,2004,(3):33-36.
- [3] Wang L J, Sun D W. Rapid cooling of porous and moisture foods by using vacuum cooling technology[J]. *Trends in Food & Technology*, 2001, 12, 174-184.
- [4] 邓东泉,孙恒,肖尤明,等. 真空预冷技术的现状和发展前景[J]. 食品工业科技, 2002,(7):73-75.
- [5] Tadhg B, Sun D W. Compensation for water loss in vacuum-precooled cut lily flowers[J]. *J agric Engng Res*, 2001, 79 (3),299-305.
- [6] 冯圣洪,张国强,陈在康,等. 果蔬真空预冷技术及其应用分析[J]. 食品科技, 2001,(6):21-22.
- [7] 蔡健,王薇. 蘑菇的营养保健作用和保鲜技术[J]. 中国食物与营养,2004,(3):20-21.
- [8] 张肇富. 蘑菇的细孔隙包装保鲜更佳[J]. 湖南包装,2000,(2):39.
- [9] 上官舟建. 双孢蘑菇的保鲜研究[J]. 中国食用菌,1994,(4):33-35.
- [10] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京:轻工业出版社,1989.
- [11] 徐艳阳,张懋,屠定玉,等. 真空冷冻与热风联合干燥毛竹笋[J]. 无锡轻工大学学报,2004,(6):27-32.
- [12] 韦公远. 果蔬真空预冷装置[J]. 保鲜与加工,2002,(3):31.
- [13] 陈羽白,林海英,赵华海,等. 菜心真空预冷效果的试验研究[J]. 农业工程学报,2003,(5):161-164.
- [14] Mc Donald K, Sun D W. Vacuum cooling technology for the food processing industry: a review[J]. *Journal of Food Engineering*, 2000,45,55-65.
- [15] Noble R A. A review of vacuum cooling of mushrooms[J]. *Mushroom Journal*, 1985, 149, 168-170.

(责任编辑:朱明)

(上接第69页)

- [6] Colja Laane, Sjeff Boeren, Kees Vos. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1987, 30: 81-87.
- [7] Gorman L S, Dordick J S. Papain Kinetics in the presence of a water-miscible organic solvent[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37: 967-972.
- [8] Nakamura K, Kondo S, Kawai Y. Asymmetric reduction of ketopantolactone by baker's yeast [J]. *Tetrahedron, Asymmetry*, 1993, 4: 1253-1254.
- [9] Nakanura K, Kondo S, Nakajima N. Mechanistic study for stereochemical control of microbial reduction of  $\alpha$ -Keto esters in an organic solvent [J]. *Tetrahedron*, 1995, 51: 687-694.
- [10] 蒋南. 化学-酶法合成(R)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯的研究 [D]. 无锡:江南大学, 2004.
- [11] Dao H D, Kawai Y, Hida K, et al. Reduction of alkyl 2-Oxo-4-phenylbutyrate as precursors of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 1998, 71: 425-432.

(责任编辑:朱明)