

毕赤酵母不对称合成阿托伐他汀中间体

周剑平, 任宇红, 张敏洁, 孙晓锋, 魏东芝

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

摘要: 阿托伐他汀可通过抑制 HMG-CoA 还原酶与底物的结合来抑制胆固醇的合成, 而 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯是阿托伐他汀合成的重要中间体。通过对实验室保藏菌种进行筛选, 得到一株巴氏毕赤酵母 X-33 可将 5-邻苯二甲酰亚胺-3-氧代戊酸乙酯还原为 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯。在磷酸盐缓冲液体系中考察了初始底物浓度、反应时间、辅助底物、葡萄糖添加量、pH、温度等因素对产物收率和对映体选择性的影响, 获得了较佳的反应条件。选择底物投料量为 7 g/L 时, 当菌体浓度 120 g/L, 葡萄糖添加量 120 g/L, pH 6.5, 温度 35 °C, 反应时间 12 h, 产物 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯的收率可达到 93.12%, 对映体过量值可达到 98.55%。

关键词: 毕赤酵母, 不对称还原, 5-邻苯二甲酰亚胺-3-氧代戊酸乙酯, (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯

Asymmetric synthesis of atorvastatin intermediate by *Pichia pastoris* X-33

Jianping Zhou, Yuhong Ren, Minjie Zhang, Xiaofeng Sun, and Dongzhi Wei

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Ethyl (R)-3-hydroxy-5-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-pentanoate is a potential intermediate for the synthesis of HMG-CoA reductase inhibitor (atorvastatin) that can lower the cholesterol level in human blood. In this study, in order to synthesize ethyl (R)-3-hydroxy-5-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-pentanoate by bioreduction, the yeast strains in our lab were screened. Ethyl (R)-3-hydroxy-5-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-pentanoate was found to be produced efficiently from ethyl 5-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-3-oxopentanoate by *Pichia pastoris* X-33. The effects of initial substrate concentration, reaction time, co-substrate, amount of yeast cells, pH, as well as the temperature on the yield and enantiomeric excesses (e.e. value) of product were examined in mono-phase system. The optimal reaction conditions are as follows: substrate concentration 7 g/L, cell concentration 120 g/L, glucose concentration 120 g/L, pH 6.5, temperature 35 °C, reaction time 12 h, and the yield 93.12% with the high e.e. value of 98.55%.

Keywords: *Pichia pastoris* X-33, asymmetric reduction, ethyl 5-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-3-oxopentanoate, ethyl (R)-3-hydroxy-5-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)-pentanoate

Received: May 31, 2010; **Accepted:** August 18, 2010

Supported by: Key Project of the National Science and Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (No. 2008BAI63B07).

Corresponding author: Yuhong Ren. Tel: +86-21-64252163; E-mail: yhren@ecust.edu.cn

“十一五”国家科技支撑计划 (No. 2008BAI63B07) 资助。

阿托伐他汀(立普妥)是目前世界上十分畅销的调血脂药物。该药物是 HMG-CoA 还原酶的抑制剂,可通过抑制 HMG-CoA 还原酶与底物的结合来抑制胆固醇的合成,同时,阿托伐他汀还可以降低低密度脂蛋白(LDL)和甘油三酯(TG)的浓度,升高高密度脂蛋白(HDL)的浓度,从而对动脉粥样硬化和冠心病的防治有重要意义^[1-3]。阿托伐他汀的合成过程中,难点在于侧链两个手性羟基的合成,早期的研究均采用化学方法合成,不仅需要高成本的金属催化剂,且反应条件激烈,需多步反应才能实现^[4-5]。这就使生物催化法在合成药物手性中间体方面显示出了更大的吸引力和更佳的优势。生物催化法在制备手性化合物方面,具有效率高、条件温和、成本低、步骤少、环境污染少、不需添加昂贵的辅酶、产物对映体过量值高等优点,这给药物制造工业带来了新的发展前景^[6]。

(R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯作为光学活性物质,是合成阿托伐他汀的重要中间体之一。本文利用从本实验室保藏的菌株中筛选到的一株对映体选择性较好的巴氏毕赤酵母 X-33,在磷酸盐缓冲液体系中对转化 5-邻苯二甲酰亚胺-3-氧代戊酸乙酯的反应条件进行了研究。采用该方法得到的产物收率可达 93% 以上,能得到高光学纯度的手性产物,且反应专一性强、副产物少、后处理简单,具有很好的工业开发应用前景。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂和培养基

燕山面包酵母 Baker's yeast 1 购自河北马利食品有限公司,马利面包酵母 Baker's yeast 2 购自中澳合资哈尔滨马利酵母有限公司,酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 购自上海工业微生物研究所,巴氏毕赤酵母 *Pichia pastoris* Gs115、巴氏毕赤酵母 *Pichia pastoris* X-33 购自美国 Invitrogen 公司。

5-邻苯二甲酰亚胺-3-氧代戊酸乙酯、(R)-3-羟基

-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯购自浙江京新药业公司,甲醇、正己烷、异丙醇(均为 HPLC 级)购自 TEDIA 公司,其他化学试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂公司。

YPD 培养基(g/L):葡萄糖 20,酵母粉 10,蛋白胨 20,琼脂粉 20(固体)。

1.2 不对称还原反应

还原反应过程如图 1 所示。

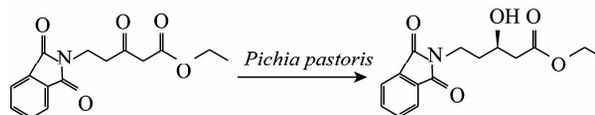


图 1 生物还原 5-邻苯二甲酰亚胺-3-氧代戊酸乙酯合成 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯

Fig. 1 Bioreduction of ethyl 5-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-3-oxopentanoate to ethyl (R)-3-hydroxy-5-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)pentanoate.

酵母在摇瓶中 30 °C、180 r/min 培养 32 h,6 000 r/min、4 °C 离心 5 min,弃去上清液,所得湿菌体用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次后用于转化反应。

取适量湿菌体,悬浮于 25 mL 缓冲液中,加入适量 5-邻苯二甲酰亚胺-3-氧代戊酸乙酯和辅助底物,180 r/min 下反应 24 h。所有实验均重复 3 次。

1.3 HPLC 测定 3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯的浓度

将 1.2 所得的反应液离心去菌体后,洗涤 2 次后定容至 50 mL。用 Agilent 1100 series HPLC 监测系统测定产物 3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯的收率,色谱柱为 XDB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)。流动相:甲醇/水(体积比为:50/50),流速:1 mL/min,柱温:30 °C,波长:219 nm。底物和产物结构经质谱、HNMR 及旋光度检测确定。

1.4 HPLC 测定 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯的对映体过量值(e.e.值)

反应液处理过程如下:将反应液上清用等体积的乙酸乙酯进行萃取,萃取液于 40 °C 水浴旋转蒸发,得到淡黄色油状液体,配制成溶液(以异丙醇做溶剂)。用 Agilent 1100 series HPLC 监测系统测定

产物 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯的 e.e. 值, 色谱柱为 Chiralcel OD-H (4.6 mm×250 mm, 5 μm)。流动相: 正己烷/异丙醇 (体积比为: 90/10), 流速: 1 mL/min, 柱温: 30 °C, 波长: 219 nm。

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

产羧基还原酶的微生物主要以酵母居多, 对本实验室保藏的各类酵母进行初筛和复筛, 得到一株产羧基还原酶的巴氏毕赤酵母 X-33, 复筛结果如表 1。以摇瓶发酵得到的菌体为酶源, 毕赤酵母 X-33 产酶较稳定, 产物收率较高, 立体选择性较好。综合考虑, 本实验选择该菌株作为催化菌株。

表 1 菌种复筛结果

Table 1 Multiple isolation of the strains

Type of Yeast	Yield (%)	e.e. (%)	Conformation
Baker's yeast 1	76.70	1.80	S/R
Baker's yeast 2	79.28	30.11	S/R
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87.68	21.16	S/R
<i>Pichia pastoris</i> Gs115	74.20	96.10	R
<i>Pichia pastoris</i> X-33	81.71	97.52	R

2.2 底物浓度对反应的影响

由图 2 可知, 随着底物浓度的增加, 产物的收率逐渐降低, 这可能是由于存在底物抑制或者产物抑制, 也有可能是底物和产物在缓冲液中的溶解性不佳所致。底物浓度对 e.e. 值的影响不大。

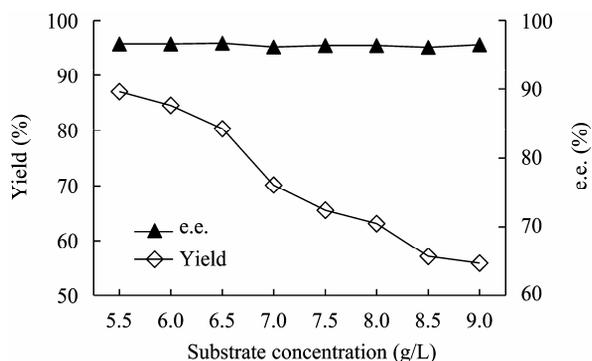


图 2 底物浓度对产物收率和 e.e. 值的影响

Fig. 2 Effect of substrate concentration on yield and enantiomeric excesses of product.

2.3 时间对还原反应时间的影响

如图 3 所示, 随着反应时间的增加, 产物收率逐步提高, 反应前 12 h 是产物迅速合成阶段, 收率达到 86.79%。但随着反应时间的延长, 超过 12 h 后, 产物的积累、底物浓度的降低以及部分酶的失活等众多因素的影响使得反应速度逐渐下降, 收率基本不再变化。反应时间对 e.e. 值影响不大。根据产物的收率和 e.e. 值确定 12 h 为较佳反应时间。

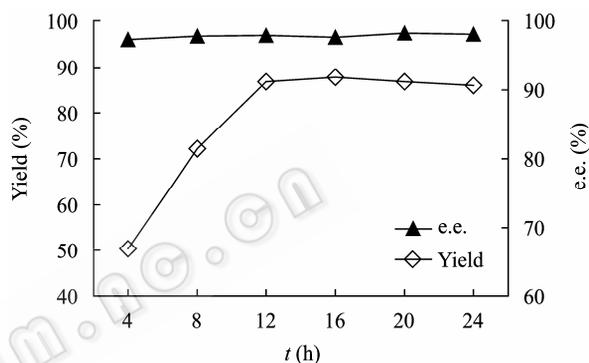


图 3 反应时间对产物收率和 e.e. 值的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on yield and enantiomeric excesses of product.

2.4 菌体浓度对反应的影响

菌体浓度在一定程度上代表着反应体系中酶的浓度, 因此菌体浓度的增加, 有助于加快反应速度, 但是菌体浓度增加的同时也增加了成本。因此有必要寻求一个处于收率和菌体量之间的最佳配比。

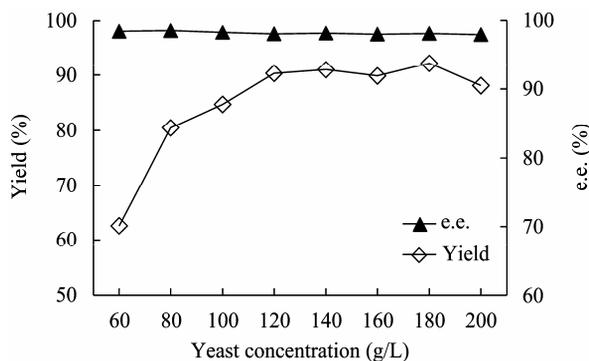


图 4 菌体浓度对产物收率和 e.e. 值的影响

Fig. 4 Effect of yeast concentration on yield and enantiomeric excesses of product.

由图 4 可知,随着菌体浓度的增加,产物的收率逐步提高;当菌体浓度达到 120 g/L 之后,产物收率达较高水平,且基本维持稳定,可能是底物已消耗完或者一部分底物被分解。菌体浓度对 e.e.值影响不大,e.e.值一直维持在 98%左右。所以综合考虑,我们选择 120 g/L 作为最佳菌体浓度。

2.5 辅助底物对反应的影响

催化 5-邻苯二甲酰亚胺-3-氧代戊酸乙酯还原为 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯不仅需要羧基还原酶,细胞内的一些脱氢酶也起着重要的作用,可氧化一些辅助底物,促进 NADPH 的再生,持续不断的提供还原反应所需的氢。常见的脱氢酶有葡萄糖脱氢酶、甲酸脱氢酶和醇脱氢酶等^[7],所以有必要对辅助底物进行筛选,结果见表 2。

表 2 辅助底物对产物收率和 e.e.值的影响

Table 2 Effect of co-substrates on yield and enantiomeric excesses of product

Co-substrate	Yield (%)	e.e. (%)
Blank	16.54	81.65
Sucrose	14.42	84.17
Glucose	86.23	97.69
Glycerol	47.42	96.53
Methanol	38.02	96.14
Isopropanol	6.62	91.70

各类辅助底物的添加量为 120 g/L。由表 2 可知,不同的辅助底物会不同程度地影响产物的收率和 e.e.值。无辅助底物时,酵母细胞只能利用自身的糖原进行辅酶再生,但是自身产生的辅酶 NAD(P)H 的量是有限的,且不能进行循环再生,所以反应的收率很低,仅达 16.54%,且对映体选择性较低,为 81.65%。以蔗糖或者异丙醇为辅助底物时,反而会降低产物的收率,可能是其对细胞产生了毒害作用。甘油、甲醇和葡萄糖作为辅助底物时可增加产物的收率,提高反应的立体选择性。其中又以葡萄糖作为辅助底物时效果最佳,产物收率和 e.e.值均最高。

2.6 葡萄糖添加量对反应的影响

考察了不同的葡萄糖浓度对反应的影响。从图

5 可以看出,当葡萄糖浓度低于 120 g/L 时,产物的收率随着葡萄糖浓度的增加而提高。继续增加葡萄糖的浓度,产率却有所下降,可能是高浓度的葡萄糖对菌体的生长不利,或者影响了羧基还原酶的活性。葡萄糖添加量对产物的 e.e.值影响不大。

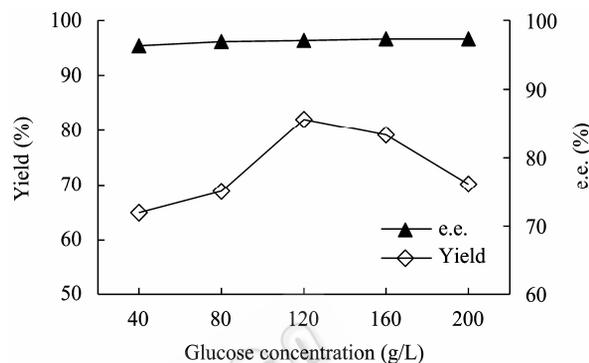


图 5 葡萄糖浓度对产物收率和 e.e.值的影响

Fig. 5 Effect of glucose concentration on yield and enantiomeric excesses of product.

2.7 pH 对反应的影响

配制不同 pH 的磷酸盐缓冲液,考察 pH 对还原反应的影响,结果如图 6 所示。在酸性条件下,产物收率随着 pH 的升高而增加,当 pH 达到 6.5 时,收率最高,随着 pH 值的继续提高,产物收率则略微下降。pH 对产物的 e.e.值影响不大。

2.8 温度对反应的影响

考察了不同反应温度对产物收率和 e.e.值的影响。酶只有在一定的温度下才能保持最佳的催化活

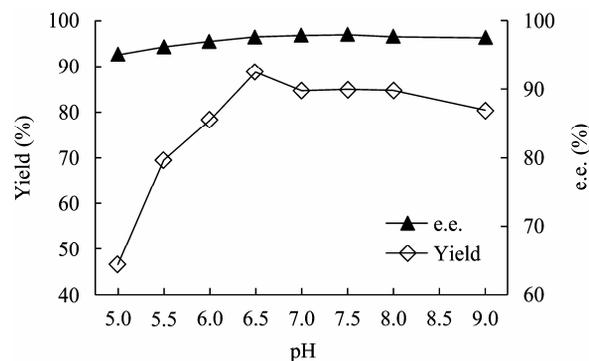


图 6 pH 对产物收率和 e.e.值的影响

Fig. 6 Effect of pH on yield and enantiomeric excesses of product.

性。低温下酶的活性较低, 但高温也会导致酶的失活。表 3 显示了随着温度的升高, 产物的收率逐渐提高, 当温度为 35 °C 时收率最高, 再升高温度收率则明显下降, 这可能是由于酶的变性失活。产物的 e.e. 值随温度的升高略有降低, 但影响不大。

表 3 反应温度对产物收率和 e.e. 值的影响

Table 3 Effect of reaction temperature on yield and enantiomeric excesses of product

Temperature (°C)	Yield (%)	e.e. (%)
25	84.37	97.89
30	86.23	97.69
35	93.12	97.07
40	75.21	96.52

3 结论

对实验室保藏的菌种进行筛选得到一株巴氏毕赤酵母 X-33, 可将 5-邻苯二甲酰亚胺-3-氧代戊酸乙酯不对称还原为 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯。对催化反应的条件进行了研究, 并确定了最佳的反应条件: 选择底物投料量为 7 g/L, 菌体浓度为 120 g/L, 葡萄糖添加量为 120 g/L, pH 为 6.5, 温度为 35 °C。在以上条件下, 产物 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯的收率最高可达到 93.12%, 对映体过量值可达到 98.55%。在不对称还原 5-邻苯二甲酰亚胺-3-氧代戊酸乙酯为 (R)-3-羟基-5-邻苯二甲酰亚胺基戊酸乙酯的反应中, 巴氏毕赤酵母 X-33 表现出非常好的立体选择性, 且 e.e. 值

基本不受环境因素的影响, 可进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Ding H, Wu LS, Chen YL. A review on study and development of four semisynthetic and total synthetic 'Statin' drugs. *Prog Pharm Sci*, 1999, 23(2): 65-71.
丁洪, 吴林森, 陈永乐. 四种半合成及全合成他汀类药物的研究与开发. *药学进展*, 1999, 23(2): 65-71.
- [2] Amidjojo M, Franco-Lara E, Nowak A, et al. Asymmetric synthesis of *tert*-butyl (3R,5S) 6-chlorodihydroxyhexanoate with *Lactobacillus kefir*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69(1): 9-15.
- [3] Patel RN. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31(6): 804-826.
- [4] Wang JY, Shen JF, Wang LX, et al. Progress in total synthesis of atorvastatin. *Chin J Synth Chem*, 2007, 15(5): 519-527.
王继宇, 沈健芬, 王立新, 等. 阿托伐他汀的全合成研究进展. *合成化学*, 2007, 15(5): 519-527.
- [5] Patel JM. Biocatalytic synthesis of atorvastatin intermediates. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, 61(3/4): 123-128.
- [6] Woodley JM. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(6): 321-327.
- [7] Lv CQ, Jiang ZY, Wang J. Progress in regeneration of NAD(P)⁺ and NAD(P)H. *Chin J Org Chem*, 2004, 24(11): 1366-1379.
吕陈秋, 姜忠义, 王姣. 烟酰型辅酶 NAD(P)⁺ 和 NAD(P)H 再生的研究进展. *有机化学*, 2004, 24(11): 1366-1379.