

利用完整细胞不对称合成 R-苯乙醇胺的研究

王佳亮 王建军 杨柳 赵国刚 吴襟 孙万儒*

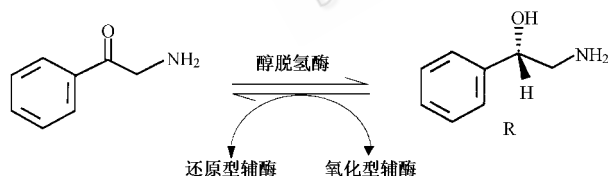
(中国科学院微生物研究所,微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

关键词 氨基苯乙酮, R-苯乙醇胺, 醇脱氢酶, 手性

中图分类号 TQ920.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0467-04

在化学合成药物中,有许多在化学结构上属于邻羟基胺类化合物(Φ -CHOH-CH₂NH₂),如治疗心血管病药物 β -受体阻滞剂类,多巴、儿茶酚胺类神经系统药物,抗哮喘的氨哮素以及一些抗爱滋病药物。羟基连接的手性碳原子构型决定着化合物的生物学功能,通常 R 型对映体有效,而 S 型对映体往往低效、无效,甚至有毒副作用^[1]。因此探索邻羟基胺类化合物的手性化方法对于发展该类手性药物具有重要意义。

手性邻羟基胺的化学不对称合成比较困难,因此发展了化学合成和酶法相结合的方法^[2-5],其中包括利用脂肪酶拆分^[6]和利用醇脱氢酶催化氧化还原反应进行不对称合成^[7-10],但催化低级脂肪族邻羟基胺的氧化还原反应,还未见有催化芳香族邻羟基胺类化合物氧化还原反应的报道。我们获得了具有高度不同手性选择性的芳香族邻羟基胺醇脱氢酶的产生菌株,并对其中的蛛菌属(*Arachnia sp.*)P163 的产酶条件进行了研究^[11],本文将介绍该菌用于氨基苯乙酮的还原制备 R-苯乙醇胺的反应条件研究。



1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 本实验室筛选得到的蛛菌(*Arachnia sp.*)P163。

1.1.2 试剂 2-氨基-1-苯基乙醇(苯乙醇胺)Fluka 产品,氨基苯乙酮(苯乙胺酮)及 R-苯乙醇胺, NAD, NADH, 为 Sigma 产品。NADP 和 NADPH 为 B W 产品。胰蛋白胍, 酵母粉为 Oxoid 公司产品, β -羟丙基环糊精为 Acros 产品。其他为市售分析纯试剂。

1.2 仪器设备

紫外可见光光度计为 Shimadzu 公司 UV-2201 型,毛细管

电泳仪为 BECKMAN 公司 P/ACE System MDQ 型。

1.3 实验方法

1.3.1 斜面培养基(1L): NaCl 10 g, 酵母粉 5 g, 胰蛋白胍 10 g, 苯乙醇胺 1.0 g, 琼脂 20 g, 调 pH 至 7.0, 0.1 Pa 灭菌 30 min, 制成斜面, 备用。

1.3.2 发酵培养基(1L): 上述斜面培养基成分中去除琼脂, 250 mL 三角瓶中加入 80 mL 培养基, 0.1 Pa 灭菌 30 min, 备用。

1.3.3 培养及菌体收获 摇瓶培养基接种后, 于 30 °C 240 r/min 摇床培养 40 h。之后 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 所得菌体用适量 pH7.0, 0.02 mol/L 磷酸缓冲液洗 2 次, 离心得菌体, 于低温保存。

1.3.4 还原转化反应 适量的菌体悬浮于 10.0 mL 含 0.1% (W/V) 氨基苯乙酮的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)中, 反应体系中还含有适量葡萄糖, 充分混合, 密封隔氧, 30 °C 240 r/min 摇床反应一定时间, 然后 10000 r/min 离心 10 min, 取 0.1 mL 上清加入 0.9 mL 超纯水, 经 0.22 μ m 的滤膜过滤, 用于毛细管电泳分析。其余上清液减压浓缩, 干燥, 溶解在乙醇中, 上硅胶柱进行色谱分离, 分别收集产物和未反应的底物, 浓缩后结晶, 干燥, 得产物。

1.3.5 手性毛细管电泳分析^[12] 30 cm 石英毛细管。电泳缓冲液为 0.1 mol/L 磷酸, 用三乙醇胺调 pH 值至 3.0, 每毫升中加入 45 mmol β -羟丙基环糊精, 分离电压为 16 kV。每次使用前用无水甲醇或乙醇冲洗毛细管 5 min, 每次上样前分别用 0.1 mol/L NaOH 超纯水, 依次冲洗 1 min, 再用电泳缓冲液冲洗 0.5 min, 6.98 kPa 下进样 2 s, 然后加电压进行分离。计算产物 R-苯乙醇胺的对映体过量(ee)值。

2 结果和讨论

2.1 蛛菌 P163 转化氨基苯乙酮的反应产物

依照标准还原反应条件进行反应, 对反应产物进行手性毛细管电泳分析。用 R-苯乙醇胺为标准物, 利用内标法确

定 R 和 S 光学异构体的峰位置。如图 1 结果所示, 蛛菌 P163 菌体细胞催化氨基苯乙酮还原反应, 产生 R-苯乙醇胺, 催化该反应的酶为苯乙醇胺醇脱氢酶。

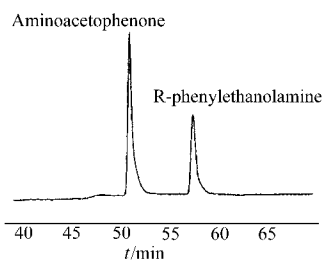


图 1 菌体细胞催化氨基苯乙酮还原反应产物的毛细管电泳结果

Fig.1 Chiral capillary electrophoresis of product of reduction of aminoacetophenone by the cells of *Arachnia* sp. P163 strain

2.2 底物浓度对还原反应的影响

取 0.05 g 菌体在 1.0 mL 还原反应体系中转化不同浓度的底物, 转化 6 h 后用手性毛细管电泳检测。由如图 2 结果可以看出, 对于一定量的菌体, 还原反应体系中的底物浓度越高, 在相同反应时间内相对转化率也越低; 在底物浓度为 0.4% (W/V) 左右时产物积累量最大, 但转化率只有 30% 左右, 随底物浓度增加对菌体的还原转化能力的抑制作用加大。底物浓度高于 1.6% (W/V) 时, 菌体催化还原转化反应的能力完全被抑制。由于底物在化学结构上含有一活泼的羰基, 有较强烈的化学修饰作用, 对细胞和酶均有毒性, 易产生抑制作用。

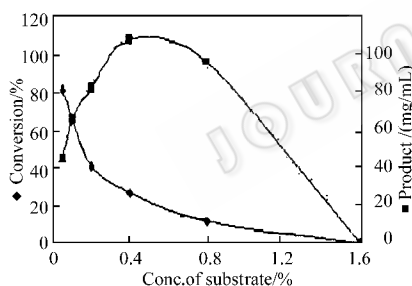


图 2 底物浓度对菌体还原转化的影响

Fig.2 Effect of substrate concentration on conversion by the cells

2.3 产物对还原转化反应的影响

在反应体系中加入不同浓度的产物苯乙醇胺, 转化 6 h 后用手性毛细管电泳检测, 结果见图 3。在反应体系中产物浓度的增加引起转化率的降低, 说明产物对反应有抑制作用。如果在反应体系中加入 1.6% (W/V) 的 2-苯乙醇胺, 还原反应同样被抑制。这有两种可能, 一是反应产物苯乙醇胺对催化还原反应的醇脱氢酶有强烈的抑制作用, 或者能够抑制细胞内与辅酶再生有关的酶, 导致还原性辅酶供给不足, 使还原反应无法正常进行, 确切原因需进一步研究。

2.4 菌体量对还原转化的影响

在含有 0.1% 的氨基苯乙酮的反应体系中, 使用不同量菌体进行还原转化 6 h 后用手性毛细管电泳检测, 图 4 结果表明使用 0.05 g 菌体进行还原转化 6 h, 其转化率可达到 75%, 更多的菌体并不能提高转化率。菌体过量, 转化率反而有所

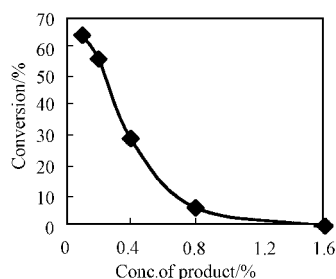


图 3 产物对还原反应的抑制作用

Fig.3 Inhibition of the product for reduction

降低。说明菌体细胞存在少量能够降解还原产物的能力。

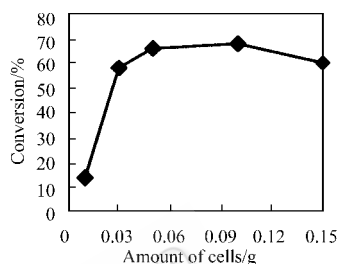


图 4 菌体量对还原转化的影响

Fig.4 Effect of amount of the cells on reduction

2.5 反应系统 pH 对菌体还原转化的影响

使用不同 pH 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液制备还原反应系统, 其余条件不变, 测定还原转化结果。图 5 所示表明使用菌体进行还原转化反应的适宜的 pH 范围为 6~9, 最适为 7.5。由于还原反应是在菌体细胞内进行, 外界的 pH 在一定范围内变化对细胞内的影响较小。因此, 还原反应的最适 pH 范围较宽。

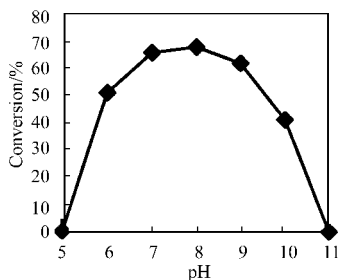


图 5 反应系统 pH 对还原转化的影响

Fig.5 Effect of pH of reaction system on conversion by the cells

2.6 不同能源化合物对菌体还原转化的影响

菌体细胞中的醇脱氢酶催化氨基苯乙酮还原时要不断消耗作为电子供体的还原型辅酶, 静休细胞为保持正常生理氧化还原状态, 会不断进行辅酶再生, 但辅酶再生需要能量。为此, 在反应体系中加入不同的能量化合物, 保持终浓度为 5% (W/V) 不变, 转化 6 h 后, 测定转化结果如表 1。

从该表中可以看到, 不提供能量化合物, 反应转化率只有 37%。醇类化合物不仅不能提高反应转化率, 有一定程度的抑制作用。糖类和柠檬酸盐可作为辅酶再生的能源使用, 对菌体的还原转化有利。由此可以认为反应所需的辅酶还原力主要由糖酵解过程提供。

表 1 不同的能源化合物对菌体还原转化的影响

Table 1 Effect of different compounds on conversion in the reaction system by the cells

	Glucose	Lactose	Starch	Sodium citrate	Ethanol	Isopropanol	None
Conversion/%	66	42	51	60	28	35	37

在反应系统中分别加入不同浓度的葡萄糖,进行转化,并测定转化结果如图 6。

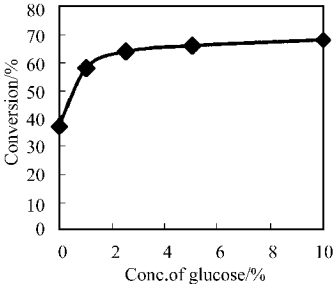


图 6 葡萄糖浓度对菌体还原转化的影响

Fig.6 Effect of concentration of glucose on conversion by the cells

结果表明反应系统中加入 2.0% 的葡萄糖能将还原转化率提高到 65% 左右,进一步增加葡萄糖量并不能提高转化率。说明在确定的反应条件下,辅酶再生不是还原转化反应的限制步骤,而是由醇脱氢酶和细胞特性所决定。

2.7 温度对菌体还原转化的影响

在不同温度下进行还原转化反应,转化 6 h 测定结果如图 7。菌体的还原转化反应的最适温度为 30~35℃,当温度超过 37℃ 时转化率急剧下降。表明该酶耐热性较低。

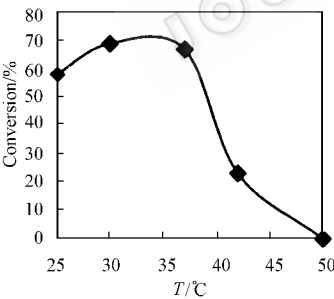


图 7 温度对还原转化反应的影响

Fig.7 Effect of temperature on conversion by the cells

2.8 氧气对菌体还原转化的影响

在通气的有氧反应体系中,定量检测未发现产物产生和积累,6 h 后底物完全消耗光。说明氧化条件下,还原反应被抑制,底物直接被氧化、降解。因此,利用该菌进行还原转化反应时保持反应系统的还原性条件是必需的,应当尽可能地隔绝氧气。

2.9 细胞还原转化的时间进程

在以上实验确定的还原转化体系中,进行苯乙胺酮的还原转化,每隔一定时间取样,用手性毛细管电泳进行分析,结果见图 8。

从图中可以看到,利用株菌 P163 菌体进行的还原转化

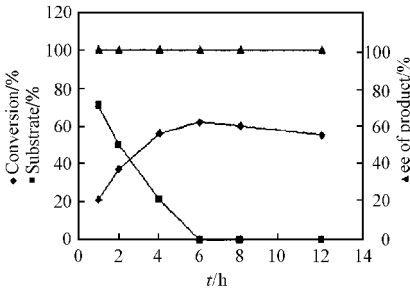


图 8 完整细胞催化还原反应的过程

Fig.8 Course of reduction of aminoacetophenone by intact cells

反应在 6 h 左右基本完成,转化率为 65%,产物的 ee 值始终保持 100%。说明该菌产生的苯乙醇胺醇脱氢酶的立体选择性很高,随着时间的推移,产物被缓慢降解,但产物的 ee 值不变。细胞中存在能够降解产物的其他酶,这点还有待进一步研究。

株菌 P163 菌体细胞对氨基苯乙酮进行还原转化的结果表明,该菌所产的苯乙醇胺醇脱氢酶在能够催化氨基苯乙酮还原产生苯乙醇胺,具有高度立体选择性,且不受外界条件的影响,产物为 R 型,ee 值为 100%。但产物苯乙醇胺和底物苯乙胺酮对催化的还原反应有抑制作用,因此反应浓度较低。完整细胞催化的还原转化反应需要在无氧条件下,提供葡萄糖,通过糖酵解代谢途径提供能量进行辅酶再生,保证底物还原转化反应的正常进行。

REFERENCES (参考文献)

[1] Ariens E J. Stereochemistry , a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology . *Eur J Clin Pharmacol* , 1984 , **26** :663 ~ 668

[2] Jones J B. Enzymes in organic synthesis . *Tetrahedron* ,1988 ,**42** (13) 3351 ~ 3403

[3] Liisa T Kanerva. Biocatalytic ways to optically active 2-amino-1-phenylethanols . *Acta chemica Scandinavica* ,1996 ,**50** 234 ~ 247

[4] Yaping Hong , Yan Gao , Xiaoyi Nie *et al* . Zepp , asymmetric reduction of α -ketoinines with oxazaborolidine catalysts :A novel , practical approach to chiral aryethanolamines . *Tetrahedron Letter* ,1994 ,**35** (31) 5551 ~ 5554

[5] Ulrich Ader , Manfred P Schneider. Enzyme assisted preparation of enantiomerically pure β -adrenergic blockers I. Afaciles screening method for suitable biocatalysts . *Tetrahedron Asymmetry* ,1992 ,**3** (2) 201 ~ 204

[6] Liisa T Kanerva , Katri Rahiala , Eero Vanttinen. Lipase catalysis in the optical resolution of 2-amino-1-phenylethanol derivatives . *J Chem Soc Perkin Trans* .1992 ,**1** :1759 ~ 1762

[7] Pickard M A , Higgins I J , Turner J M. Purification and properties of L-1-aminopropan-2-ol :NAD Oxidoreductase from a *Pseudomonad* grown on DL-1-aminopropan-2-ol . *J gen Microbiol* ,1968 ,**54** :115 ~ 126

[8] Katri Lundell , Liisa T Kanerva. Enantiomers of ring-substituted 2-amino-1-phenylethanols by *Pseudomonas cepacia* lipase . *Tetrahe-*

- [9] Eugenia C S Brenelli *et al.* Enantioselective synthesis of (R) (-)-phenylethanamines using Baker's yeast reduction of some α -substituted methyl phenyl ketones. *Indian J Chem* ,1992 **31B** :821 ~ 823
- [10] Taeko Izumi , Katsumi Fukaya. Baker 's yeast reduction of α -(acyl-amino) acetophenones and lipase catalyzed resolution of 2-acylamino-1-arylethanol. *Bull Chem Soc Jpn* ,1998 **66** :1216 ~ 1221
- [11] WANG J L (王佳亮) ,WANG J J (王建军) ,YANG L (杨柳) *et al.* Isolation and fermentation conditions of strains producing 1-phenyl-2-amino-ethanol alcohol dehydrogenase. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) 2001 ,in press
- [12] WANG J J (王建军) ,ZHENG G J (郑国钧) ,SHA Q (沙倩) *et al.* Enantiomeric Separation of Chiral Compounds by Capillary Electrophoresis with Sulfated β -Cyclodextrin as Chiral Selector. *Analytical Chemistry* (分析化学) 2001 **29** (3) :1 ~ 4

Studies on Asymmetric Synthesis of R-phenylethanolamine by Whole Cells of *Arachnia sp.* P163

WANG Jia-Liang WANG Jian-Jun YANG Liu ZHAO Guo-Gang WU Jin SUN Wan-Ru*

(State Key Laboratory of Microbiology Resources Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract Effects of various factors on asymmetric synthesis of R-phenylaminoethanol from aminoacetophenone by the whole cells of *Arachnia sp.* P163 producing alcohol dehydrogenase for phenylethanol amine was investigated. It found that , although the reduction was inhibited by the substrate and the product , but it has the very high stereoselectivity. The reduction was normally carried out with 2% glucose for reproduction of coenzyme in the reaction system without oxygen. The conversion yield and ee value of the product achieved 65% and 100% , respectively.

Key words R-phenylethanolamine , aminoacetophenone , dehydrogenase , chirality

Received January 5 2001

This work was supported by grant from NSFC (39670846).

* Corresponding author. Tel 86-10-62587206 ; Fax 86-10-62560912 ; E-mail : sunwr@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>