

假丝酵母 C-5 的不对称生物还原作用研究

李祖义 顾建新 潘冰峰

(中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

生命与手性密切相关,凡涉及到生命现象和生理活性物质几乎都离不开有关分子的空间立体构型问题,不同构型的手性分子具有不同的生理活性。利用酶反应的立体专一性,用生物转化法取代部分传统的化学方法,可以很方便地制备具有所需手性中心的化合物。因此,近年来生物转化在有机合成领域中的应用越来越广泛。其中研究和应用最广泛的是 β 羰基酯和羧基羧酸的不对称还原^[1]。手性醇是化学合成中广泛使用的前体,已有许多是从它们的前体酮经过不对称生物还原而制备^[2-6]。本文基于在考察还原活性时,同时考察其还原的立体、区域选择性,固以 1-苯-1,3-丁二酮和 1,2-二苯乙二酮作为底物。从酿酒酵母、黑曲霉和假丝酵母筛选高还原活性的菌株。并研究了菌株最佳的还原条件。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1-苯-1,3-丁二酮和 1,2-二苯乙二酮为东京化成产品。

1.2 菌 种

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) A15、A22、A31;假丝酵母 (*Candida* sp.) C-2、C-5、C-16、C-34;酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) S44 均由本实验室筛选获得。

1.3 培 养 基

1.3.1 斜面培养基(%):土豆汁(PDA)斜面培养基。

1.3.2 沙氏斜面培养基(%):葡萄糖 2,酵母膏 1,蛋白胨 1,琼脂 2,自然 pH。

1.3.3 培养液 A(%):葡萄糖 2,酵母膏 0.5,大豆粉 0.5,氯化钠 0.5,磷酸氢二钾 0.5, pH6.5。

1.3.4 培养液 B(%):葡萄糖 10,酵母膏 1,尿素 0.1, pH6.5。

1.4 菌 体 培 养

1.4.1 黑曲霉:将在 PDA 斜面上生长 3d 的菌体,挑取带菌丝的培养基接入培养液 A 中,28℃ 往复摇床 (120r/min) 培养 40~48h,纱布过滤后得菌丝体,再用 0.8% 氯化钠洗涤 3 次。

1.4.2 酿酒酵母:经沙氏斜面培养 2d 后,接于培养液 B,28℃ 往复摇床培养 48h,离心 (3500r/min, 10min) 后可得菌体,再用 0.8% 氯化钠洗涤 3 次。

1.4.3 假丝酵母:从在沙氏斜面上生长良好的菌体中挑少许于培养液 B 中,28℃ 往复摇床培养 48h,过滤,0.8% 氯化钠洗涤 3 次。

1.5 菌 体 干 重 测 定

称取一定重量的湿菌体,于 105℃ 烘干至恒重得干菌重量,可以确定湿菌与干菌的重量比。

1.6 双 酮 化 合 物 的 还 原

取相当于 0.2g 干重的菌体,置于 pH7.0 的磷酸缓冲液中,加入 5mg 1-苯-1,3-丁二酮或 1,2-二苯乙二酮,在 30℃ 振荡 (200r/min) 反应 24h。

1.7 分离纯化及分析

反应结束后,用乙醚提取,硫酸镁干燥后减压去溶剂,用 HPLC 定量分析还原情况。Shimadus LC-6M 高压液相仪,色谱柱:Shim-pack CLC-ODS(6mm × 15cm);柱温:30℃,流速:1ml/min,流动相:正己烷:异丙醇(20:1, V/V),检测:UV₂₅₄或示差。

产物结构分析使用 IR-440 红外仪和 EM-360、XL-200 核磁共振仪。产物旋光度测定使用 Perkin-Elmer 241MC 旋光仪。根据产物旋光度与文献上标准旋光度的比值可以确定产物的 ee 值和绝对构型。

2 结果和讨论

2.1 微生物对 1-苯-1,3-丁二酮(A)和 1,2-二苯乙二酮(B)的还原作用

以 1-苯-1,3-丁二酮(A)和 1,2-二苯乙二酮(B)为底物,从 150 株酵母和 212 株霉菌中筛选出 8 株不同程度还原上述底物的菌株(表 1)。还原产物经 IR 和 NMR 分析,分别为 1-苯-3-羟基丁酮和 1,2-二苯羟基乙酮。在这 8 株菌株中,以假丝酵母 C-5 活力最高,它的还原产物比旋光度分别为 $[\alpha]_D = -44.4'$ ($c=0.6, \text{CHCl}_3$), ee = 95%, [文献[7] $[\alpha]_D = -46.6'$ ($c=7.0, \text{CHCl}_3$)和] $[\alpha]_D = +109.3'$ ($c=2.2$, 丙酮), ee = 93%, [文献[8] $[\alpha]_D = -114'$ ($c=1.54$, 丙酮)], 绝对构型分别为 R 和 S。以上数据表明,假丝酵母 C-5 对双酮化合物的还原不仅具有较高的活力,而且具有较好的区域选择性和立体选择性。

表 1 微生物对 1-苯-1,3-丁二酮和 1,2-二苯乙二酮的还原

Strains	1-phenyl, 3-butanedione		Benzil	
	Conversion/ %	ee/ %	Conversion/ %	ee/ %
<i>Aspergillus niger</i> A15	55.2	90	87.9	92
A22	51.9	85	80.4	87
A31	18.3	95	53.1	89
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S44	37.3	86	42.7	88
<i>Candida</i> sp. C-5	91.5	95	93.2	93
C-2	87.6	92	89.2	91
C-16	72.2	94	75.2	92
C-34	72.1	89	78.5	91

2.2 假丝酵母 C-5 还原双酮化合物的时间进程

1g 湿菌(相当于 0.2g 干菌),置于 20ml 5% 的葡萄糖溶液中,加入底物 1-苯-1,3-丁二酮(A)和 1,2-二苯乙二酮(B)各 20mg 进行反应,不同时间取样,HPLC 测定还原率。从图 1 可以看出,反应 2h 还原率达 50% 以上,10h 可达 90% 以上。

2.3 不同量假丝酵母 C-5 对还原率的影响

称取不同湿重 0.1、0.2、0.5、1.0 和 2.0g 的菌体,分别置于 20ml 5% 葡萄糖溶液中,加入底物各 10mg,摇床反应 2h,乙醚提取后,HPLC 测还原率(图 2)。两种底物,均以 1.0g 湿菌为好,这时还原率均可达 90% 左右,而若再加大菌的投入量,反应 2h 还原率仍在 90% 左右。

2.4 反应溶液对还原率的影响

1g 湿菌置于 20ml 不同反应溶液(5% 葡萄糖,5% 蔗糖,蒸馏水,自来水,0.2mol/L 磷酸缓冲液 pH7.5)中,分别加入两种底物各 10mg,反应 2h。表 2 可见,反应溶液的不同对还原率影响不是很大,这些溶液均为中性溶液。

2.5 反应溶液 pH 对还原率的影响

1g 湿菌置于 20ml 不同 pH 的 0.2mol/L 磷酸缓冲液中,分别加入两种底物各 10mg,摇床反应 2h。

表3即为不同反应pH对还原率的影响。从中看出,反应溶液pH对还原率的影响不是很大,但以pH6.0为好。

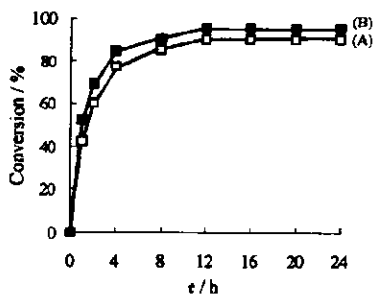


图1 假丝酵母C-5还原A,B的时间进程

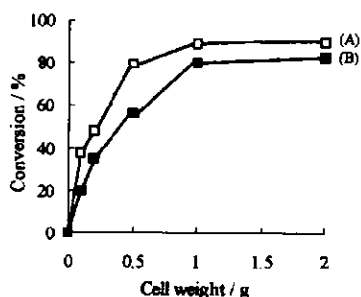


图2 不同量假丝酵母C-5对还原率的影响

表2 反应溶液对还原率的影响

Solution	Conversion/%	
	A	B
5% Sucrose	95.5	84.2
5% Glucose	97.4	87.9
Tap water	94.4	91.5
Distilled water	98.5	84.1
Buffer	98.1	86.7

表3 反应溶液pH对还原率的影响

pH	Conversion/%	
	A	B
3.0	83.7	78.3
4.0	90.8	81.2
5.0	96.2	84.4
6.0	98.9	89.7
7.0	97.0	86.8
8.0	97.1	86.4

2.6 供氧情况对还原率的影响

1g湿菌置于20ml 5%葡萄糖溶液中,分别加入2种底物各10mg,静置或摇床反应2h,还原情况见表4。静置和摇动2种情况对还原率的影响甚小,即通气量多少对反应影响不大。

表4 供氧程度对还原率的影响

Aeration	Conversion/%	
	A	B
Standing	96.5	88.1
Shaking	97.4	87.9

2.7 反应温度对还原率的影响

1g湿菌置于20ml 0.5mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)中,加入底物1,2-二苯乙二酮10mg,摇床反应2h。温度对还原率影响较大(图3)。最适温度在30~40℃左右。

综合上述实验结果,假丝酵母C-5能快速不对称还原1-苯-1,3-丁二酮和1,2-二苯乙二酮,产物分别为1-苯-3-羟基丁酮和1,2-二苯羟基乙酮。二者的ee值都在90%以上,显示出良好的立体选择性和区域选择性,并且具有很高的活力。1g湿菌体细胞,2h就能还原2种底物各10mg,转化率可达90%以上。该反应的最适温度在35℃左右,但对其他条件要求甚低,反应溶液的不同(葡萄糖,蔗糖,蒸馏水,自来水,缓冲液),pH的不同(pH4.0~8.0),供氧情况的不同(摇动,静置)时,还原率仍为90%左右。说明环

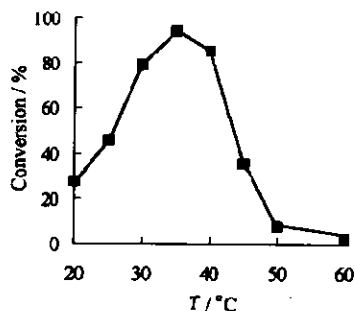


图3 反应温度对还原率的影响

境的变化对该菌的活力影响甚小,这又是它的一大优点。上述特点为假丝酵母 C-5 在有机合成中的应用奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Ward O P, Young C S. *Enzyme Microb Technol*, 1990, 12(7):482~493
- 2 Jonse B. *Tetrahedron*, 1986, 42:3351~3403
- 3 Kislich K. *Acta Biotechnol*, 1991, 11:559~570
- 4 Lilly M. *Chem Enz Sci*, 1994, 49:151~159
- 5 Csuk p, Glanzer G. *Chem Rev*, 1991, 91:49~97
- 6 Servi S. *Synthesis*, 1990, 1:1~25
- 7 Glanzer B I, Faber K, Griengl H. *Enzyme Microb Technol*, 1988, 10(12):744~749
- 8 Konishi J, Ohta H, Tsuchihashi G I. *Chem Lett*, 1985, 8:1111~1112

Study on the Asymmetric Bioreductions of *Candida* sp. C-5

Li Zuyi Gu Jianxin Pan Bingfeng

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract Eight strains of microorganisms which have activity of dicarbonyl compound reduction were isolated from hundreds of strains of yeasts and fungi, in which *Candida* sp. C-5 showed the highest activity and good regioselectivity and stereoselectivity. The effect of reaction time, biomass, reaction solution, pH, aeration and temperature on the bioreduction was investigated.

Key words Biocatalysis, bioreduction, *Candida* sp.