

文章编号: 1001-3555(2008)04-0346-05

环糊精介入酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应

张文虎¹, 刘湘^{1,2*}, 方云¹, 方志杰², 许建和³

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122;

2. 南京理工大学 化工学院, 江苏 南京 210094;

3. 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:以苯乙酮、苯丙酮、4-甲基苯乙酮和4-氯苯乙酮为底物,研究了酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应,分别考察了添加剂 β -环糊精和羟丙基- β -环糊精对酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应的影响,结果表明芳环上取代基的空间效应和电子效应对转化率和对映体过量值有显著的影响.环糊精是通过提高酵母液的催化效率和对底物形成包结来影响反应结果的,其中底物芳环对位有无取代基是添加剂影响反应结果的关键因素.环糊精加入量根据底物的不同在3~20 mmol/L之间较合适.

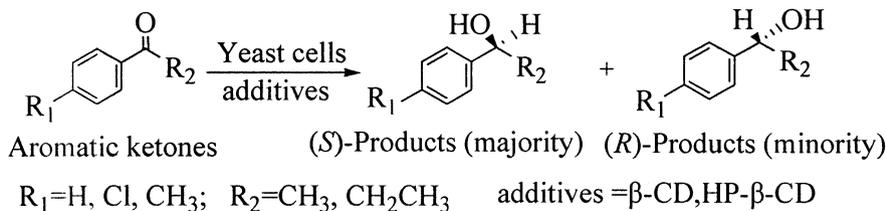
关键词:芳香酮;环糊精;酵母细胞;不对称还原;生物催化

中图分类号: O643.32 **文献标识码:** A

光学活性醇是天然产物及手性药物合成中重要的手性砌块(chiral building blocks).用化学方法对前手性芳香酮进行不对称还原是制备光学活性醇的重要途径^[1],现今具有高效专一和绿色节能特点的生物转化技术在不对称合成中的应用越来越受到重视^[2,3].微生物细胞中含有许多具有立体选择性的酶,使用全细胞催化不对称合成反应,不但可以省去繁杂的酶分离和纯化步骤,而且在催化反应过程中只需添加廉价的碳源(如蔗糖或葡萄糖)就能使细胞再生出催化不对称还原所需的价格昂贵的辅酶^[4],同时所有的酶和辅酶被保护在天然的细胞环境中,有利于生物催化反应的进行.

面包酵母(baker's yeast, 学名 *Saccharomyces*

cerevisiae)是被广泛利用的廉价微生物之一,其细胞内存在着丰富的氧化还原酶,可催化各种羰基化合物的不对称还原反应,并对该类反应具有高度的立体选择性.酵母细胞在羰基不对称还原反应中的应用已有许多报道^[3,5].国内学者也有将面包酵母细胞用于不对称合成反应的报道^[6~9].但存在一个普遍的问题就是底物容量小,在体系中加入一定量的能降低底物毒性的添加剂可提高底物的转化率和产物对映体过量(enantiomeric excess, 简称为 ee)值.环糊精(Cyclodextrin, 简称为 CD)具有腔内亲油、腔外亲水的两亲性能^[10],将环糊精这类添加剂加入到酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应体系中(如图式1所示),利用环糊精对底物的包结作用,



图式1 环糊精介入酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应

Scheme 1 Asymmetric Reduction of Aromatic Ketones by Yeast cells Catalyzed in the presence of Cyclodextrins

以降低底物毒性并增加底物水介质中的分散性. 我们着重考察在加入添加剂 β -环糊精(β -cyclodextrin,

收稿日期: 2007-11-09; 修回日期: 2008-02-25.

基金项目: 国家自然科学基金(No. 20672037); 863项目(No. 2006AA10Z310).

作者简介: 张文虎, 男, 生于1982年, 硕士, email: ahlz6364@yahoo.com.cn.

* 通讯联系人, Tel: 0510-89880672; Fax: 0510-85917763; E-mail: liuxiang@jiangnan.edu.cn.

简称为 β -CD)和羟丙基- β -环糊精(hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 简称为HP- β -CD)前后, 酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应的转化率和 ee 值的变化情况, 并从结构上探讨添加剂 β -CD和HP- β -CD对反应结果的影响。

1 实验部分

实验所用试剂苯丙酮、4-甲基苯乙酮、4-氯苯乙酮购于Fluka公司, 干酵母购于梅山-马利酵母有限公司, β -CD购于国药集团化学试剂有限公司, HP- β -CD购于西安德立生物化工有限公司, 苯乙酮、乙酸乙酯等其它试剂均为市售分析纯。

在500 mL三角瓶中加入pH 7.0的 KH_2PO_4 -NaOH缓冲液100 mL、17 g干酵母, 在33 °C时将三角瓶置于水浴恒温振荡仪中振荡0.5 h, 使面包酵母活化, 然后在三角瓶中加入一定量的添加剂(β -CD、HP- β -CD)和5 mmol底物, 振荡(120 r/min)反应24 h. 反应结束后, 将20 mL乙酸乙酯加入到反应液中, 充分振荡萃取后离心分离, 分出萃取液待用。

取5 mL待测液加入一定量的内标物十三烷, 再用气相色谱仪分析底物浓度和产物浓度. 采用温岭市福立分析仪器有限公司9790型色谱仪, CP-Chirosil-DexCB手性柱(25 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm , Varian公司), 柱温140 °C, 进样器和检测器的温度均为250 °C, 氮气作载气, 柱前压60 kPa, 进样量0.2 μL , 分流比50:1, FID检测器, 用上海军锐色谱数据工作站进行数据处理。

底物转化率定义为 $\text{Conversion} = [(c_0 - c)/c_0] \times 100\%$, 式中 c_0 和 c 分别为反应起始和结束后底物的浓度. 产物的对映体过量值定义为: $ee = [(c_S - c_R)/(c_S + c_R)] \times 100\%$, 式中 c_S 和 c_R 分别为S型产物和R型产物的浓度。

2 结果与讨论

实验采用反应温度33 °C、反应时间24 h、底物浓度50 mmol/L、酵母浓度170 g/L, 考察反应中底物的类型、添加剂(β -CD、HP- β -CD)种类及添加剂浓度对底物转化率和产物 ee 值的影响。

2.1 芳环上取代基的空间和电子效应对反应的影响

由表1中的数据, 发现底物苯丙酮、苯乙酮和4-甲基苯乙酮不对称还原产物的 ee 值分别是82.9%、94.4%和99.4%, 羰基左右基团体积差距

越大反应的 ee 值就大, 这一结果与Prelog规则^[11]

表1 酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应

Table 1 Asymmetric reduction of aromatic ketones by yeast cells catalyzed

Aromatic ketones	Conversion	ee^*
Acetophenone	87.9	94.4
Propiophenone	68.4	82.9
4-Methylacetophenone	62.9	99.4
4-Chloracetophenone	35.4	75.8

Reaction conditions: 33 °C, 24 h, $c_{(\text{ketone})} = 50$ mmol/L,

$$c_{(\text{yeast})} = 170 \text{ g/L} \quad * ee = \frac{c_S - c_R}{c_S + c_R} \times 100\%$$

c_S and c_R are the concentration of S and R products,

Determined by GC with a CP-Chirasil-Dex chiral Column.

是一致的. 同时发现, 苯环上连接基团的电子效应对产物 ee 值也有影响, 当苯环上带有供电子基团时有利于反应产物 ee 值的提高, 如S-1-苯基乙醇的 ee 值(94.4%)小于S-1-(4-甲基苯基)乙醇的 ee 值(99.4%); 相反, 苯环上连有吸电子基团时, 生成产物的 ee 值降低, 得到S-1-(4-氯苯基)乙醇的 ee 值(75.8%)小于S-1-苯基乙醇的 ee 值, 这一结论和文献^[12]是一致的. 因此, 在酵母细胞催化芳香酮的不对称还原中, 空间效应和电子效应共同影响着反应的 ee 值。

从转化率的角度来看, 在实验所选择的四种底物中, 苯乙酮的转化率最高, 达到87.9%, 由表1中的数据可以发现, 羰基两边基团体积增大不利于底物转化率的提高, 对电子效应而言, 无论是供电子基团还是吸电子基团都不利于转化率的提高. 空间效应和电子效应共同对转化率产生影响。

2.2 环糊精介入对底物芳香酮转化率的影响

由图1发现, 环糊精的加入对底物转化率有很大的影响. 环糊精的加入量与反应的转化率呈“规律性”变化, 它对底物转化率的影响可以分为两种情况: 一种是像苯乙酮、苯丙酮等苯环上没有取代基的情况; 另一种是如4-氯苯乙酮、4-甲基苯乙酮等苯环上连有取代基的情况. 不同的环糊精(β -CD、HP- β -CD)对底物转化率的影响也有一定的差异。

对于苯环上没有取代基的底物来说, 随着 β -CD加入量的增加, 底物的转化率是先升高后降低的, 如图1(a)所示. β -CD的加入一方面可以提高酵母液的催化效率^[13], 有利于反应的进行, 进而使反应转化率提高; 另一方面 β -CD可以对底物形成包结, 减少底物对酶的毒害作用, 也有利于反应转

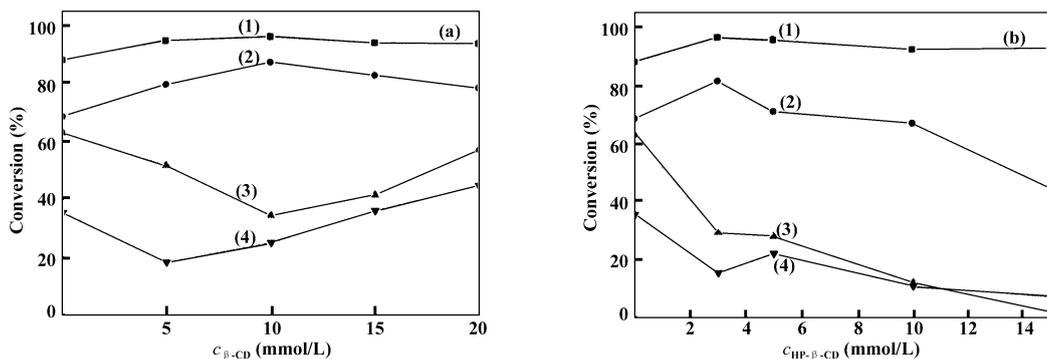


图1 β -CD 和 HP- β -CD 的浓度对底物转化率的影响

Fig. 1 Effects of concentration of β -CD and HP- β -CD on the substrate conversion

(1): acetophenone; (2): propiophenone; (3): 4-methylacetophenone; (4): 4-chloroacetophenone

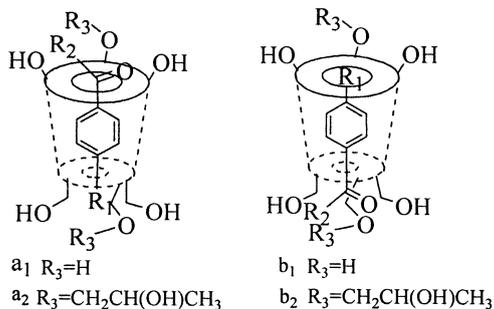
Reaction conditions are the same as in Table 1

化率的提高. 但随着 β -CD 量的增加, 过多的 β -CD 自身也会对酶产生抑制或者与底物过度包结使转化率降低. 当苯环上连有取代基的时候, 随着 β -CD 的加入, 反应的转化率先降低后升高, 这种现象也可以用 β -CD 能够提高酵母液的催化效率和对底物的包结作用来解释. 根据 Sfihi H 等^[14] 表述, β -CD 对底物的包结形式如图式 2(a₁、b₁) 所示, 对位有取代基 R₁ 时, 主要以图式 2 中 a₁ 与 b₁ 两种结构模

现 HP- β -CD 对转化率的影响比 β -CD 对转化率的影响更大. 当苯环上没有取代基时, 加入 HP- β -CD 与加入 β -CD 具有相似的作用, 对反应结果的影响也极为相似, 可以用解释 β -CD 的原理来解释 HP- β -CD 对反应结果的影响. 对于苯环上连有取代基 R₁ 的 4-甲基苯乙酮和 4-氯苯乙酮来说, 加入 HP- β -CD 后反应转化率都是降低的, 这是由于 HP- β -CD 和 β -CD 结构差别造成的. 如图式 2(a₂、b₂) 所示就是 HP- β -CD 参加反应时对芳香酮的可能的包结结构^[14], 由于 R₁ 和 R₃ 的作用, 使得 HP- β -CD 对底物包结作用更强, 不利于反应过程中芳酮从 HP- β -CD 空腔中释放出来, 进而影响了反应的转化率.

2.3 环糊精介入对产物芳香醇对映体过量值的影响

由图 2(a) 可以看到, 加入 β -CD 对苯乙酮和 4-甲基苯乙酮的不对称还原反应的对映选择性来说没有大的影响, 但对苯丙酮和 4-氯苯乙酮来讲却不同, 且二者 ee 值随加入添加剂量不同变化很大. 与转化率不同, 影响 ee 值变化的主要因素是羰基两边基团的体积差异, 电子效应起到次要的作用. 对于苯丙酮来说, 产物 ee 值随着 β -CD 加入量增加是逐步下降的, 出现这种现象的原因可能是由于 β -CD 对底物的包结作用不同引起的. β -CD 对底物的包结形式如图式 2(a₁、b₁), 羰基的芳环一端被“固定”在 β -CD 的疏水空腔内, 另一端 R₂ 留在空腔的外端. 由于乙基端有相对较大的空间体积, 同时用作还原剂的辅酶 NAD(P)H 也有一定的体积, 故而 β -CD 的加入不利于对映选择性反应的进行. 4-氯苯乙酮则不同, 由于对位连有吸电子的氯原子, 所以在加入 β -CD 后, 底物能够很好的被包结在 β -CD 空腔内, 且对底物的包结更加适合、形成包结



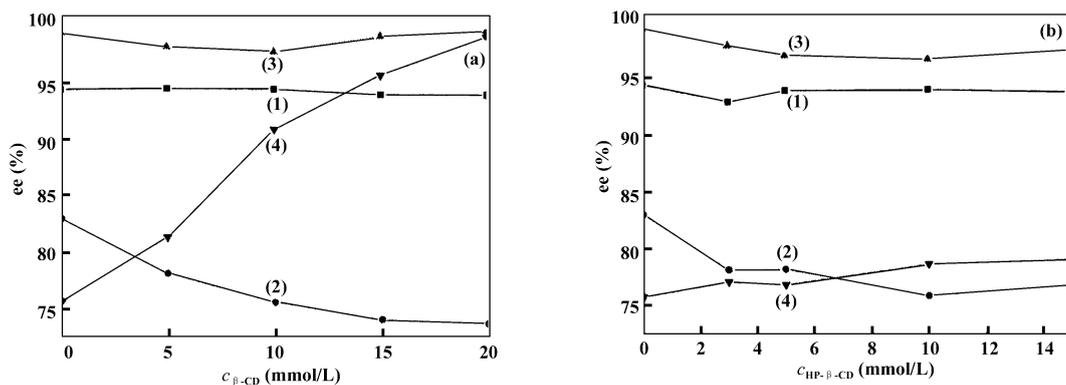
图式 2 芳香酮在 β -CD、HP- β -CD 空腔内部

排布的结构模型

Scheme 2 Structural models of the arrangement of aromatic ketones inside the β -CD and the HP- β -CD cavity

型形成包结物, 包结作用较大, 当形成包结物后不宜于“分开”. 在加入少量 β -CD 时, β -CD 主要是和底物形成包结物, 此时没有自由的 β -CD 可以提高酵母液的催化效率, 从而反应的转化率降低, 但是, 随着 β -CD 量的增加, 添加剂和底物达到某种动态的包结平衡后, 又有一定浓度的自由 β -CD 对酵母液产生影响, 提高酵母液的催化效率, 从而使反应的转化率升高.

HP- β -CD 比 β -CD 多了几个羟丙基, 所以其在水中的溶解度较大, 另外又由于羟丙基的存在它们对实验结果的影响也有不同, 观察图 1(b) 不难发

图2 β -CD 和 HP- β -CD 的浓度对反应转化率的影响Fig. 2 Effects of concentration of β -CD and HP- β -CD on the ee value

(1): acetophenone; (2): propiophenone; (3): 4-methylacetophenone; (4): 4-chloracetophenone

Reaction conditions and determination of enantiomeric excess are the same as in Table 1

物后更加稳定, 和自由的 4-氯苯乙酮相比, 根据多点依附理论^[15]包结后的底物更容易被选择性还原; 同时, 由于 β -CD 对底物的包结作用减少了它对某种酶的抑制或毒害作用, 也利于反应 ee 值的提高, 因此, 产物 S-1-(4-氯苯基)乙醇的 ee 值从 75.8% 增大到 98.7%, 比未加 β -CD 时提高了 22.9%.

从图 2(b) 可以看到, 除 4-氯苯乙酮以外, 加入 HP- β -CD 后反而使反应后产物的 ee 值有所降低了, 原因是在 HP- β -CD 的空腔两端连接几个羟丙基具有一定的空间位阻, 如图式 2(a₂, b₂) 所示, R₃ 的存在阻碍了还原剂的辅酶 NAD(P)H 与羰基的对映选择性作用, 从而使 ee 值有所降低. 另外的原因是 HP- β -CD 分子起包结作用的微环境发生了变化, 与 β -CD 相比, 由于羟丙基的引入使得 HP- β -CD 的“疏水空腔”内的电子密度发生了变化^[10], 使其包结底物时受到一定的影响, 在加入 HP- β -CD 后, 对 ee 值影响不如加入 β -CD 的影响大. 对于 4-氯苯乙酮而言, 由于氯的吸电子效应, 使得 HP- β -CD 的空腔内的电子密度向有利于对映选择性的方向变化, 与羟丙基空间位阻的不利因素相抵后, 使反应后产物的 ee 值略有增加, 如图 2(b) 所示.

由图 2 可见, 环糊精的加入量对反应的影响很大, ee 值变化甚至达到几十个百分点, 仔细分析不难发现, 添加剂的“最佳”加入量的多少因底物的不同而变化. β -CD 和 HP- β -CD 因存在结构上的差异所以在反应中的加入量上有一定的差别, 因 HP- β -CD 在水中的溶解度比 β -CD 大 20 多倍, HP- β -CD 与芳酮包结后, 对芳酮在水介质中的分散性好得多, 故 HP- β -CD 的加入量要比 β -CD 少.

3 结 论

酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应中, 底物羰基两边取代基的空间效应和电子效应对反应的结果 (ee 值、转化率) 起到决定性作用. 当在体系中加入环糊精后, 芳香酮取代基的空间效应和电子效应同样影响着反应结果. 环糊精对反应结果的影响是复杂的, 反应结果会因底物结构、添加剂种类和添加剂浓度的改变而变化, 甚至添加剂的加入方式也会影响反应结果. 但最根本的是底物结构, 它决定着添加剂对反应结果影响的程度和性质. 整个催化过程是酵母细胞催化和添加剂 (β -CD、HP- β -CD) 协同作用的结果. 添加剂 (β -CD、HP- β -CD) 是通过提高酵母液的催化效率, 以及对底物包结作用来影响反应结果的. 苯环对位上无取代基是添加剂对反应转化率影响的关键因素. 环糊精加入量根据底物的不同在 3 ~ 20 mmol/L 之间较合适. 在底物浓度为 50 mmol/L 时, 较合适的添加剂 β -CD 的加入量为 10 mmol/L, 而 HP- β -CD 的实验结果则不同, 较佳加入量为 3 mmol/L, 此时苯乙酮和苯丙酮的转化率有明显改善. 当 β -CD 的加入量为 20 mmol/L 时, S-(4-氯苯基)乙醇的 ee 值则有明显的提高.

参考文献:

- [1] Wills M. *Chem. Soc. Rev.* [J], 1995, **24**(3): 177 ~ 180
- [2] Nakamura K, Yamanaka R, Matasuda T, et al. *Tetrahedron: Asymmetry* [J], 2003, **14**(18): 2 659 ~ 2 681
- [3] Wei Zh-L, Li Z-Y, Lin G-Q. *Tetrahedron: Asymmetry* [J], 2001, **12**(2): 229 ~ 233

- [4] a. Yang F, Russell A J. *Biotechnol. Prog.* [J], 1993, **9**(3): 234~240
 b. Li Ye(李 晔). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化)[J], 2008, **22**(1): 86~96
 c. Wu Xiao-mei(吴小梅), Xin Jia-ying(辛嘉英), Zhang Ying-xin(张颖鑫), *et al. J. Mol. Catal. (China)* (分子催化)[J], 2006, **20**(6): 587~603
- [5] Csuk R, Glanzer B I. *Chem. Rev.* [J]. 1991, **91**(1): 49~52
- [6] Liu Xiang(刘 湘), Sun Pei-dong(孙培冬), Xu Jian-he(许建和), *et al. J. Mol. Catal. (China)* (分子催化)[J], 2002, **16**(2): 107~110
- [7] Yang Zhong-hua(杨忠华), Yao Shan-jing(姚善泾). *Chin. J. Catal.* (催化学报)[J], 2004, **25**(6): 434~439
- [8] Liu X, Zhu T Sh, Xu J H, *et al. Synth. Comm.* [J], 2001, **31**(10): 1521~1527
- [9] Liu Xiang(刘 湘), Fang Zhi-jie(方志杰), Xu Jian-he(许建和). *Chin. J. Catal.* (催化学报)[J], 2006, **27**(1): 20~24
- [10] Tong Lin-hui(童林荟). *The Chemistry of Cyclodextrin—Fundamentals & Applications* (环糊精化学—基础与应用), Beijing: Science Press(北京: 科学出版社) [M], 2001. 10~30
- [11] Prelog V. *Pure. Appl. Chem.* [J], 1964, **9**(1): 119~125
- [12] Zhu D M, Rios B E, Hua L, *et al. Tetrahedron: Asymmetry*[J], 2005, **16**(8): 1541~1546
- [13] Ma Xiao-kui(马小魁), Wang Zhe-zhi(王喆之), Chen Wu-ling(陈五岭). *Chin. J. Catal.* (催化学报)[J], 2006, **27**(4): 314~318
- [14] Sfihi H, Legrand A P, Guy A, *et al. Coll. Surf. A* [J], 1996, **115**: 115~126
- [15] Fersht A(弗斯特). *Enzyme Structure and Mechanism* (酶的结构和作用机制). Du Jin-zhu(杜锦珠), Ru Bing-gen(茹炳根), Wei Xin-Cheng(卫新成)译. Beijing: Peking Univ Press(北京: 北京大学出版社) [M], 1991. 240~245

Asymmetric Reduction of Aromatic Ketones by Yeast Cells Catalyzed in the Presence of Cyclodextrins

ZHANG Wen-hu¹, LIU Xiang^{1,2}, FANG Yun¹, FANG Zhi-jie², XU Jian-he³

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Chemical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China;

3. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The asymmetric reduction of aromatic ketones catalyzed by yeast cell was studied using acetophenone, propiophenone, 4-methylacetophenone and 4-chloroacetophenone as substrates. The influences of additive β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin on asymmetric reduction of aromatic ketones were also investigated respectively. The results show that the conversion rate and the enantiomeric excess value were markedly affected by both steric effect and electronic effect of substituted group. The reaction results were affected by cyclodextrins through enhancing the catalytic efficiency of yeast fermentation broth and inclusion with the substrate, among which p-substituted group of the substrate aromatic cycle is the key factor. Suitable amount of joined cyclodextrins is 3~10 mmol/L according as different substrates.

Key words: Aromatic ketones; Cyclodextrins; Yeast cells; Asymmetric reduction; Biocatalysis