

[研究简报]

光控生物不对称还原苯乙酮的研究

王梦亮, 杜刚, 刘滇生
(山西大学现代化学研究所, 太原 030006)

关键词 光合细菌; 不对称还原; 光电子传递; 苯乙酮; 手性醇

中图分类号 O621.25⁺4.2 文献标识码 A 文章编号 0251-0790(2006)09-1686-03

含手性因素的化学药物有多种对映体, 它们在人体内的药理活性、代谢过程及毒性存在着显著差异^[1,2]. 手性醇作为合成手性药物的重要中间体^[3], 在当今制药领域中有着广泛的用途. 在生物催化方面, 由于其区域性和立体选择性强、反应条件温和、操作简便、公害少, 且能完成一些化学合成难以进行的反应而受到有机化学家、药物化学家和微生物学家的广泛关注. 在于整体微生物催化方面, 国内外研究得最多的是酵母和一些真菌类的生物等. 但对于具有光合作用的微生物催化剂还原酮类化合物的研究还未见报道. 由于在不对称还原过程中光能微生物可以利用光能, 通过电子传递, 将 NAD(P)H 再生. 因此, 在催化还原酮类化合物方面, 可依靠光能, 不需其它共底物, 具有比其它微生物更为独特的优越性.

本文以类球红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides*)为生物催化剂, 将苯乙酮催化还原成具有光学活性的手性醇. 研究了反应条件对该反应的影响.

1 实验部分

1.1 试剂及仪器 类球红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides*)为本实验室保存菌种; 苯乙酮(中国医药集团上海化学试剂公司)和苯乙醇(Sigma公司)为分析纯试剂; 其它试剂均为国产分析纯试剂.

SICT GC-930 气相色谱仪(上海海欣色谱仪器有限公司), 氢火焰离子检测器, 60 m × 0.25 mm 毛细管柱, 配备 cdmc 工作站; GC-7900 气相色谱仪(天美公司), FID 氢火焰检测器, d-7900 工作站, 微量进样器 1 μL, GP CHIRASIL-DEX-CB 手性柱(25 m × 0.25 mm)(安捷伦), WZZ-1 自动指示旋光仪(上海物理光学仪器厂).

1.2 光合细菌的培养 将类球红杆菌在 30 °C 光照及厌氧条件下培养 5 d(OD = 1.0), 离心收集菌体备用.

1.3 还原反应及产物分析 将类球红杆菌用 tris-HCl(pH = 7.2)溶液洗涤 2 次, 将 10 g(湿重)菌体加入到装有 50 mL 培养基(pH = 7.2)的三角瓶中, 加入 0.1 mL 底物, 充满氮气, 盖上瓶塞, 在 30 °C 下, 钨灯(500 W)为光源, 光照培养 72 h. 反应结束后, 将反应液离心, 取上清液, 加入 NaCl 至饱和, 再用 10 mL 乙醚萃取 2 次. 合并萃取液, 用无水 MgSO₄干燥后, 减压蒸馏得到产品. 产物用气相色谱分析, 气化室温度 250 °C, 检测室温度 250 °C, 柱温 150 °C; 载气为氮气, 流速为 2.5 mL/min, 进样量为 1 μL. 1-苯乙酮的保留时间为 11.8 min, 苯乙醇保留时间为 17 min, 采用峰面积归一化法计算化学产率. 用 GC 及 WZZ-1 自动指示旋光仪测定产物的光学产率^[4].

2 结果与讨论

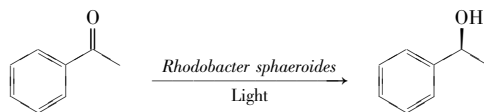
2.1 光照对类球红杆菌还原苯乙酮的影响 生物催化剂在还原苯乙酮时需要还原型辅酶 [NAD(P)H] 参与, 由于光合细菌可以捕获光子的能量, 通过电子传递完成 NAD(P)⁺到 NAD(P)H 的转换过程, 因此认为光合细菌也能利用光能还原酮类化合物, 进而产生手性醇. 以类球红杆菌为生物

收稿日期: 2005-07-26.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20171030)资助.

联系人简介: 刘滇生(1952 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事生物化工研究. E-mail: dsliu@sxu.edu.cn

催化剂, 苯乙酮为底物, 由光源提供能量, 反应式见 Scheme 1. 结果见表 1.



Scheme 1 Light-control asymmetric reduction of acetophenone

Table 1 Effect of light on the reduction of acetophenone by *Rhodobacter sphaeroides**

Condition	t/h	Yield(%)	e. e. (%)	config.
Light	24	76	>99	S
	72	90	>99	S
No light	24	—	—	—
	72	—	—	—

* *Rhodobacter sphaeroides*: 10 g(wet mass) in 50 mL culture media (pH = 7.2); acetophenone : 0.1 mL; anaerobic environment; filled with nitrogen; 30 °C.

结果表明, 类球红杆菌在光照下, 具有很高的产率和选择性, 反应 72 h 后, 化学产率和光学产率分别可达到 90% 和 99%, 并且 1-苯乙醇的产率随着光照时间的增长而增加. 然而在无光照条件下反应不能进行, 说明光照在类球红杆菌还原反应过程中起到了关键的作用.

2.2 光合抑制剂对不对称还原反应的影响 DCMU 是一种光合作用抑制剂, 它的加入可以抑制生物体的光合作用, 进一步说明光能对苯乙酮手性还原的调控作用. 其浓度对抑制苯乙酮手性还原反应的影响见图 1. 由图 1 可以看出, 随着 DCMU 浓度的增加, 产物 1-苯乙醇的化学产率降低, 在 5 mmol/L 时产率仅为 8.0%. 这是由于高浓度的 DCMU 几乎完全使参与反应的光合细菌受到电子传递的抑制, 从而导致还原型辅酶的再生受到抑制, 而使还原反应受阻, 导致产率降低.

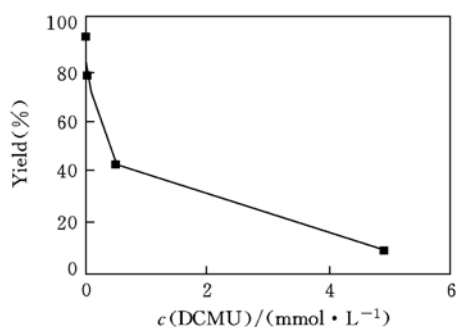


Fig. 1 Effect of concentration of DCMU

Rhodobacter sphaeroides: 10 g(wet mass) in 50 mL culture media (pH = 7.2); acetophenone: 0.1 mL; anaerobic environment; filled with nitrogen; 30 °C; 72 h.

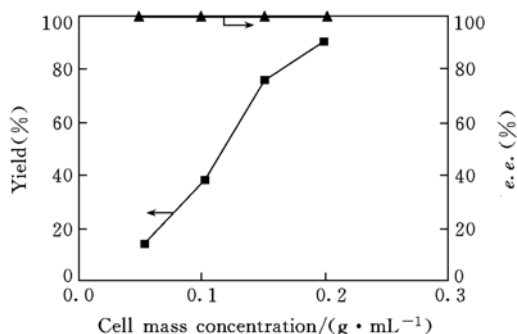


Fig. 2 Effect of cell mass concentrations

Acetophenone: 0.1 mL in 50 mL culture media (pH = 7.2); anaerobic environment; filled with nitrogen; 30 °C; 72 h.

2.3 细胞浓度的影响 图 2 表明, 产率随着细胞浓度的增加而增加, 当细胞的质量浓度达到 0.2 g/mL 时, 产率为 90%, 但光学产率却无变化. 这可能是由于非天然物质苯乙酮对于细胞有明显的毒害作用, 进而抑制了其生物活性^[5]. 因此, 低浓度的细胞得不到很好的还原效果. 由此可见, 0.2 g/mL 的细胞浓度比较合适.

2.4 底物浓度的影响 底物浓度对产物的生成有显著的影响. 如图 3 所示, 反应的最佳底物浓度为 17.0 mmol/L. 当底物浓度达到 66.4 mmol/L 时, 反应几乎完全受到抑制, 这是由于大量底物的存在降低了光合细菌的生物活性所致.

2.5 pH 的影响 反应体系的 pH 值影响着酶的活性和辅酶的再生^[6]. 例如 Ni 等^[7]在研究 *Rhodotorula* sp. AS2. 2241 催化苯乙酮时, 发现在 pH = 5 ~ 8 时活性最佳. 本文在研究光合细菌还原反应时, 发现在 pH = 4 时产率很低, 但随着 pH 值的升高产率增加, pH = 7 ~ 8 时产率达到最大值(图 4).

2.6 反应时间的影响 反应产率随着时间的增加不断增加, 24 h 后达到 76%, 72 h 后可达到 90%, 之后趋于稳定, 这可能是由于产物的大量生成抑制了细胞的进一步的催化作用所致.

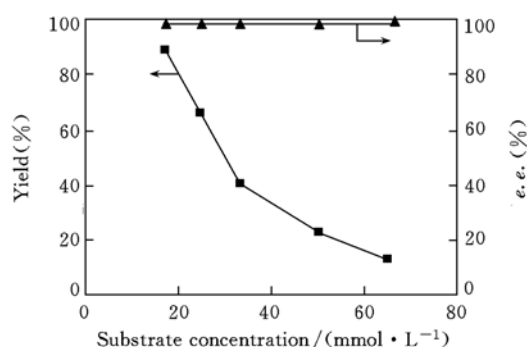


Fig. 3 Effect of substrate concentration

Rhodobacter sphaeroides 10 g (wet mass), in 50 mL culture media (pH = 7.2); anaerobic environment; filled with nitrogen; 30 °C; 72 h.

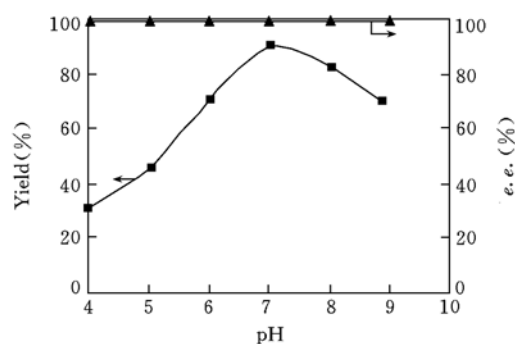


Fig. 4 Effect of pH

Rhodobacter sphaeroides; 10 g (wet mass) in 50 mL culture media; acetophenone 0.1 mL; anaerobic environment; filled with nitrogen; 30 °C; 72 h.

3 结 论

综上所述, 类球红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides*)作为生物催化剂, 可以直接利用光能催化苯乙酮生成手性醇, 具有很好的效果. 化学产率达到 90%, *e. e.* 可以达到 99%. 这不仅为深入研究生物合成手性醇提供了一种有效的生物催化剂, 而且也生物合成醇类化合物的研究开辟了新的空间.

参 考 文 献

- [1] Thomas Wirth. Tetrahedron[J], 1999, **55**: 1—28
- [2] Wandrey C., Liese A., Kihumbu D.. Organic Process Research & Development[J], 2000, **4**(4): 286—290
- [3] Malyala R. V., Rode C. V., Arai M. *et al.*. Applied Catalysis A: General[J], 2000, **193**: 71—86
- [4] ZI Guo-Fu(自国甫), YIN Cheng-Lie(尹承烈). Acta Chemica Sinica(化学学报)[J], 1998, **56**: 484—488
- [5] Faber K.. Biotransformations in Organic Chemistry[M], Beijing: Beijing Publishing Corporation, 1999: 175—176
- [6] Luo Di-Heng, Zong Min-Hua, Xu Jian-He. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic[J], 2003, **24/25**: 83—88
- [7] Ni Ye, Xu Jian-He. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic[J], 2002, **18**: 233—241

Light-control Asymmetric Reduction of Acetophenone by Microorganism

WANG Meng-Liang, DU Gang, LIU Dian-Sheng*

(Institute of Modern Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract *Rhodobacter sphaeroides* as a new biocatalysts were investigated in the asymmetric reduction of ketones to chiral alcohols. The cells were used in an aqueous system for the asymmetric reduction of acetophenone to prepare (*S*)-1-phenyl-ethanol by photo-electron-transfer reactions. It is found that higher product yield and product enantiomeric excess could be achieved. The results show that the enantiomer excess of the chiral alcohols was up to 99% (*e. e.*) and the yield is more than 90%. The effects of DCMU and the optimal reaction conditions on the reaction were investigated. The results show that the reaction was controlled by light completely, the optimal substrate concentration is 17.0 mmol/L, the optimal cell mass concentration is 0.2 g/mL, the optimal pH is 7—8, the optimal reaction time was 72 h.

Keywords Photosynthetic bacteria; Asymmetric reduction; Photo electron-transfer; Acetophenone; Chiral alcohols

(Ed.: H, J, Z)