

水/有机溶剂双相中固定化啤酒酵母细胞 催化有机硅酮不对称还原*

娄文勇 宗敏华** 范晓丹 卢杰泉 杜伟

(华南理工大学生物工程系, 广州 510640)

摘要 研究了水/有机溶剂双相中, 固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原成(-)-1-三甲基硅乙醇的反应, 系统探讨了振荡速度、有机溶剂疏水性、水相与有机溶剂相体积比、水相 pH 值和反应温度对反应速度、产率和产物光学纯度的影响。结果表明, 上述因素对固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应均有较显著的影响。正己烷为该反应最好的有机溶剂, 振荡速度以 150 r/min 为宜, 水相与有机溶剂相体积比以 1:2 较佳, 适宜的 pH 值为 8, 最佳反应温度为 25~30℃。在该优化反应条件下, 反应最大产率和产物的光学纯度分别高达 96.8% 和 95.7% (ee)。

关键词 三甲基硅乙酮, 固定化细胞, 啤酒酵母, 不对称还原, (-)-1-三甲基硅乙醇

学科分类号 Q556.1

具有 Si-C 结构的有机硅化合物是一类非天然的人工合成物质。近年来的研究表明, 许多有机硅化合物不仅在非对称合成及功能材料中占有非常重要的地位, 而且具有特殊的生物活性, 其作为药物, 比碳结构类似物有更佳的药效、更高的选择性和更小的毒性, 硅替换是药物设计的一条有效途径^[1,2]。有机硅化合物在诸多领域内的重要性, 激发人们争相进行其合成与转化的研究。化学合成许多有机硅化合物的条件甚为苛刻, 并且, 反应物或产物在此极端的条件下可能不稳定, 难以得到目的产物, 手性有机硅化合物的合成尤为如此。生物合成法因具有高效性、高立体选择性、反应条件温和、成本低以及环境污染小等优点而日益受到有机化学家的青睐。自 20 世纪 80 年代末, Tacke 等^[3,4]一直探索生物细胞催化有机硅化合物的转化作用, 发现酵母、细菌、藻类、悬浮培养植物细胞均能催化有机硅化合物的不对称羰基/羟基转化。自 20 世纪 90 年代初, 人们相继报道了醇脱氢酶及脂肪酶催化有机硅醇的脱氢、酯化和转酯^[5~11]。最近, Zani 等^[12]研究了游离面包酵母细胞催化一系列不同结构有机硅酮的不对称还原反应, 发现当底物为 1-三甲基硅-1-丁酮时, 最大产率和产物光学纯度分别为 70% 和 60% (ee); 当底物为带有苯基的有机硅酮如苯基三甲基硅甲酮时, 产物光学纯度增至 95% (ee), 但最大产率降至 65%。迄今, 尚未见水/有机溶剂两相中固定化酵母细胞催化有机硅酮不对称还原反应的报道。本文研究了水/有机

溶剂双相中固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原成(-)-1-三甲基硅乙醇的反应, 系统探讨了振荡速度、有机溶剂的疏水性、水与有机溶剂相体积比、水相 pH 值和反应温度对这一反应的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 华南理工大学生物工程系菌种保藏室保藏; 三甲基硅乙酮 (acetyltrimethylsilane)、正壬烷 (内标), 购自 Aldrich 公司; (±)-1-三甲基硅乙醇, 购自 Sigma 公司; 其他试剂为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 啤酒酵母细胞固定化: 培养 24 h 的啤酒酵母细胞离心 (3 500 r/min, 10 min) 分离, 洗涤两次, 得到游离啤酒酵母细胞。把一定量的游离啤酒酵母细胞分散在等重量的蒸馏水中, 然后将它加入到含 2% 海藻酸钠的蒸馏水中形成细胞/海藻酸钠悬浮液 (边倒入边搅拌), 用注射器把悬浮液滴入 2% 的 CaCl₂ 溶液中 (边滴边搅拌), 过滤收集固定化细胞颗粒。将固定化细胞悬浮在含 20% 葡萄糖、

* 国家自然科学基金 (20076019) 及广东省自然科学基金 (000444) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 020-87111452, E-mail: btmhzong@letterbox.scut.edu.cn

收稿日期: 2001-07-25, 接受日期: 2001-09-12

0.05% CaCl_2 的溶液中, 冷藏 (4°C) 备用.

1.2.2 固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应: 在 50 ml 带塞三角瓶中装入 10 ml 含有 14 mmol/L 三甲基硅乙酮的脱水有机溶剂, 加入 10 μl 正壬烷 (内标) 以及一定体积和 pH 值、含有 20% 葡萄糖和 0.05% CaCl_2 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 加入 1.5 g 固定化细胞开始反应, 于一定温度和振荡速度下水浴振荡, 定时从有机相中取样 0.1 ml 供气相色谱检测 (99% 以上的三甲基硅乙酮和 1-三甲基硅乙醇均溶于有机相中). 反应终止后, 取 5 ml 有机相, 用同一有机溶剂稀释至 20 ml, 供旋光仪检测产物 1-三甲基硅乙醇的旋光性.

1.2.3 气相色谱分析: 仪器为美国惠普 HP4890D 型气相色谱仪, 配备 3398A 工作站, 氢火焰离子检测器; 手性柱为 β 环糊精柱, 柱径 0.32 mm, 柱长 30 m; 分析条件为气化室温度 250°C , 检测室温度 250°C , 柱温 71°C 维持 1 min 后, 以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 100°C ; 载气为氮气, 流速为 2.5 ml/min; 分流比 1:100; 进样量 2 μl . 在该分析条件下, 底物三甲基硅乙酮、内标正壬烷、产物 1-三甲基硅乙醇的两对映体 (+)-1-三甲基硅乙醇和 (-)-1-三甲基硅乙醇的保留时间分别为 3.374 min、5.202 min、5.417 min 和 5.747 min.

1.2.4 产率、反应速度及产物光学纯度的确定: 根据产物 1-三甲基硅乙醇的增加来计算产率, 由反应初始单位时间内产物的增加计算初始反应速度, 根据产物的两种异构体的量计算产物光学纯度, 用对映体过量值 (ee) 来表征, 即 $ee = (A - B) / (A + B)$. 其中, A 和 B 分别表示反应后产物 1-三甲基硅乙醇的两种对映体的浓度.

2 结果与讨论

2.1 水相和水/有机溶剂双相中反应过程比较

水相和水/有机溶剂双相中固定化啤酒酵母细胞都可催化三甲基硅乙酮不对称还原反应, 但两者催化的反应速度、产率和产物的光学纯度均有较大的差异. 从反应过程曲线 (图 1) 可知, 水相中固定化细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的初速度较大, 产率随反应时间的增大而迅速增大, 但产物的光学纯度随之迅速减小 (产率由 17.3% 增至 84.1% 时, 相应的 ee 值由大于 99% 减至 82.7% 左右), 反应 10h 后几乎达到平衡, 此时的产率为 84.1%, 产物光学纯度为 82.7%. 水/有机溶剂双

相中固定化细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的初速度小于水相中, 反应 12h 内, 产率随时间增加直线上升, 随后反应速度逐步下降, 产率缓慢增大, 产物的光学纯度随反应时间的增大而缓慢降低 (ee 值由大于 99% 减至 95% 左右), 但一直比水相中的反应产物光学纯度要高. 反应进行到 46h 时达到平衡, 产率和产物光学纯度分别达到 90.1% 和 95.3%, 比 Zani 最近报道在单水相中所获的产率和产物光学纯度均高^[12]. 可见, 固定化啤酒酵母细胞在水/有机溶剂双相中催化三甲基硅酮不对称还原反应的初速度虽然降低了, 但最大产率和产物光学纯度均有较大的提高, 这是因为在单水相反应体系中, 存在底物和产物抑制作用, 如 Huber 等^[13]用 *Trigonopsis variabilis* 细胞催化有机硅酮还原时, 发现有底物和产物抑制现象存在; 但在两相反应体系中, 水相中产物和底物的浓度均较低, 反应初速度较小, 但可有效地解除产物和底物的抑制作用, 同时平衡向着产物合成的方向移动, 使最大产率提高; 双相中的有机溶剂可能抑制了与酵母醇脱氢酶选择性不同的其他同工酶的活性, 使产物的光学纯度提高. 所生成的硅醇主要为 (-)-1-三甲基硅乙醇.

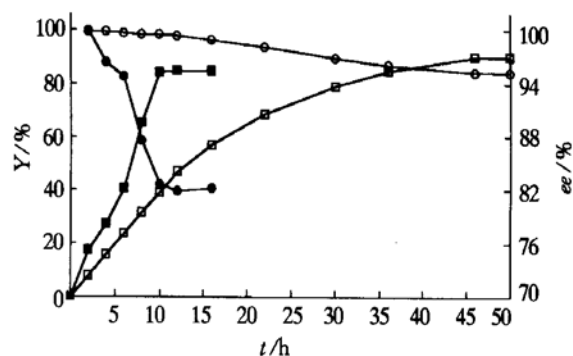


Fig 1 Reaction time course of the asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane catalyzed by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in aqueous phase and water/organic solvent biphasic

reaction medium: 10 ml 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.3) + 10 ml n-hexane or 10 ml water; $t = 30^\circ\text{C}$; 0.15 g/ml immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells; shake speed: 150 r/min. ■—■: Yield (Y) in aqueous phase; □—□: Yield in water/organic solvent biphasic; ●—●: ee in aqueous phase; ○—○: ee in water/organic solvent biphasic.

2.2 振荡速度对反应的影响

振荡速度影响底物和产物在反应中的传质, 从而影响固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对

称还原反应的初速度 (图 2). 振荡速度小于 150 r/min 时, 反应初速度随着振荡速度的增大而迅速增大, 说明振荡速度小于 150 r/min 时, 非极性底物三甲基硅乙酮通过亲水性海藻酸钙进入啤酒酵母细胞这一传质过程, 对反应初速度影响较大; 当振荡速度达到 150 r/min 时, 反应初速度基本不随振荡速度的增加而变化, 说明已基本消除传质限制. 因此, 选择本实验的振荡速度为 150 r/min. 在此振荡

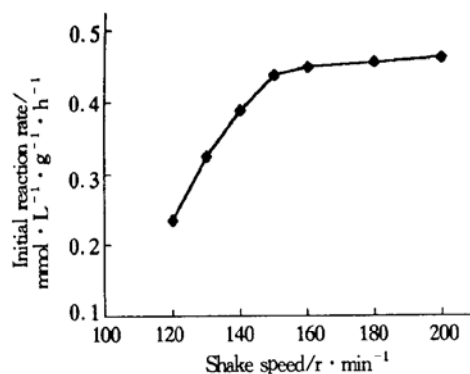


Fig. 2 Effect of shake speed on the initial reaction rate

reaction medium: 10 ml 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.3) + 10 ml n-hexane; $t = 30^\circ\text{C}$; 0.15 g/ml immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells.

速度下, 反应初速度为 0.438 mmol/L·g·h.

2.3 有机溶剂对反应的影响

有机溶剂是影响水/有机溶剂双相中固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的重要因素之一. 由于有机溶剂影响酵母细胞中的醇脱氢酶及其同工酶的构象, 从而影响它们的相对活性及立体选择性, 因此, 有机溶剂对反应初速度、最大产率和产物的光学纯度均有极大的影响. 本研究选用不同疏水性 (用 $\lg P$ 表示) 的 6 种有机溶剂 (正辛烷、正庚烷、正己烷、环己烷、异丙醚、乙酸乙酯) 作为两相反应体系的有机相. 从表 1 可见, $\lg P$ 为 3.5~4.0 的有机溶剂适宜作为双相的有机相用于啤酒酵母催化生物转化过程. 在疏水性较弱的乙酸乙酯和异丙醚中, 固定化细胞催化反应初速度、最大产率和产物的光学纯度较疏水性较强的正己烷、正庚烷要差, 这可能是疏水性较弱的有机溶剂对啤酒酵母的毒性较大. 但是, 就正辛烷、正庚烷和正己烷而言, 随着疏水性的增强, 反应初速度、最大产率以及产物光学纯度 (ee) 都减小. 因此, 我们选定正己烷为最适有机溶剂.

Table 1 Effect of hydrophobicity of organic solvents on the reaction*

Organic solvent	$\lg P$	Reaction rate/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	t/h	Yield/%	$ee/\%$
n-octane	4.50	0.294	60	85.5	81.3
n-heptane	4.00	0.365	50	90.3	92.6
n-hexane	3.50	0.421	46	91.6	94.9
cyclohexane	3.00	0.305	56	88.2	92.4
diisopropyl ether	1.90	0.233	68	80.7	90.1
ethyl acetate	0.68	0.182	72	83.3	87.8

* reaction medium: 10 ml 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.3) + 10 ml different organic solvents; $t = 30^\circ\text{C}$.

2.4 水相与有机溶剂相体积比对反应的影响

为揭示水相与有机溶剂相体积比对固定化啤酒酵母细胞催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的影响规律, 比较了有机相体积 (10 ml) 固定, 水相体积不同的水/有机溶剂双相中的不对称还原反应, 结果见表 2. 一般而言, 有机溶剂对酶或细胞有毒性, 当酶分子和活细胞直接与有机溶剂接触时, 会变性、失活. 随着水与有机溶剂相体积比的增大, 酶或活细胞与有机溶剂接触的几率减少, 它们失活的程度降低, 在相同的条件下, 反应初速度应不断增加. 但本研究所得到的结果并非如此 (表 2). 这一方面是因为实验中用的是固定化细胞, 固定化

不但增强了细胞的稳定性, 而且啤酒酵母细胞包埋在海藻酸钙中, 避免了与有机溶剂直接接触, 故失活之可能性较小. 另一方面是因为分配在水相中的底物浓度随着水与有机溶剂相体积比的增大而减小, 从而使反应速度降低. 当水/有机溶剂 (体积比) $> 1/2$ 时, 反应初速度非但不随水与有机溶剂相体积比的增大而增大, 反而随之减小. 两相体积比不仅影响反应速度, 并对最大产率也有一定的影响, 但对产物光学纯度影响不大. 综合考虑, 水与正己烷的体积比为 5/10~15/10 范围内较好. 就体积比为 5/10 而言, 反应 42 h 达到平衡, 产率为 94.3%, 产物的光学纯度为 94.4% (ee).

Table 2 Effect of the volume ratio of water phase to organic phase on the reaction^{*}

V_w/V_o	Reaction rate/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	t/h	Yield/ %	ee/ %
3/10	0.354	48	90.2	93.4
5/10	0.411	42	94.3	94.4
10/10	0.341	46	93.9	94.5
15/10	0.320	52	92.6	94.1
20/10	0.300	52	91.4	94.6
25/10	0.264	60	87.4	93.2
30/10	0.248	64	89.5	94.1

^{*} reaction medium: different volumes of 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.3) + 10 ml n-hexane; $t = 30^\circ\text{C}$.

2.5 水相 pH 值对反应的影响

pH 值不仅影响反应速度, 而且影响最大产率和产物光学纯度 (表 3). 使三甲基硅乙酮还原成 (-)-1-三甲基硅乙醇, 起主要催化作用的是固定化细胞内的酵母醇脱氢酶, 它的化学本质是蛋白质, 具有两性电离解特性. pH 值可改变酶活性部位上有关基团的解离状态, 故影响酶的活性, 也就影响细胞的活性. 由表 3 可见, pH 值从 5.5 上升到 8.0,

Table 3 Effect of pH in water phase on the reaction^{*}

pH	Reaction rate/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	t/h	Yield/ %	ee/ %
5.5	0.296	56	86.5	95.1
6.0	0.283	56	84.3	94.1
6.5	0.309	52	83.6	93.8
7.1	0.325	54	89.7	95.8
7.3	0.331	48	93.2	94.3
7.5	0.340	48	95.3	92.8
8.0	0.382	45	94.5	95.4
8.5	0.367	50	90.6	94.2
9.0	0.333	52	86.7	93.9

^{*} reaction medium: 5 ml 50 mmol/L Tris-HCl buffer (with different pH) + 10 ml n-Hexane; $t = 30^\circ\text{C}$.

反应速度随之上升, 但 pH 值继续上升, 反应速度却有所下降, 说明固定化细胞在两相中催化反应的速度在 pH=8 时达到最大, 但该反应的最大产率和产物光学纯度并非在此 pH 值下最高. 由于在啤酒酵母细胞内起催化该反应的酶除醇脱氢酶外, 还有多种同功酶, 不同的酶所对应的最适 pH 值也不

同, 因此, 在不同的 pH 值下, 酵母醇脱氢酶和其同功酶的相对活性、立体选择性均有较大的差异, 从而影响产物的光学纯度. 综合考虑 pH 值对此反应速度和产物光学纯度的影响, 选择 pH 值为 8 左右为宜. 在此 pH 值条件下, 反应 45 h, 产率和产物的光学纯度分别为 94.5% 和 95.4%.

2.6 反应温度对反应的影响

温度可影响反应初速度, 但更重要的是它能影响反应的最大产率和产物的光学纯度 (表 4). 反应温度从 20°C 升至 30°C 时, 反应的最大产率基本保持在 97% 左右, 而产物的光学纯度逐渐增大, 由 92.6% 增至 95.7%; 当反应温度高于 30°C 时, 最大产率随着反应温度的上升较显著地下降, 温度由 25°C 升至 45°C , 最大产率由 97% 降到 41.1%, 而产物的光学纯度略有增大, 由 95.7% 增至 96.5%. 本实验还验证了固定化啤酒酵母细胞在所研究的温度范围内仍然具有活性, 这不仅说明了啤酒酵母细胞经固定化后, 其热稳定性增强, 还说明了此反应属于放热反应, 温度升高, 不利于产物生成; 随着温度的降低, 反应平衡向着产物合成的方向移动, 最大产率增大, 但反应速度减小, 达平衡时间过长. 为了在较短的时间内获得高产率和高光学纯度的产物, 反应温度以 $25\sim 30^\circ\text{C}$ 为宜.

Table 4 Effect of reaction temperature on the reaction^{*}

$t/^\circ\text{C}$	Reaction rate/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	t/h	Yield/ %	ee/ %
20	0.328	54	97.0	92.6
25	0.334	50	97.0	95.5
30	0.429	40	96.8	95.7
35	0.488	34	82.6	96.0
40	0.531	30	62.7	96.1
45	0.649	24	41.1	96.5

^{*} reaction medium: 5 ml 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8) + 10 ml n-Hexane.

参 考 文 献

- Colvin E W. Silicon reagents in organic synthesis. New York: Academic Press, 1988. 1~5
- Tacke R, Zilch H. Sila-substitutions: a useful strategy for drug design. Endeavour, New Series, 1986, 10 (4): 191~197
- Tacke R, Hengelsberg H, Zilch H. Enantioselective microbial reduction of 1, 1-dimethyl-1-sila-cyclohexan-2-one with growing cells of the yeast *Kloeckera cortices* (ATCC20109). J Organometal Chem, 1989, 379: 211~216
- Tacke R, Wagner S A, Brakmann S, et al. Synthesis of acetyltrimethyl (phenyl) silane and its enantioselective conversion

- into (*R*)-(*1*-hydroxyethyl) dimethyl (phenyl) silane by plant cell suspension cultures of *Symphytum officinale* L. and *Ruta graveolens* L. J Organometal Chem, 1993, **458**: 13~ 17
- 5 Zong M H, Fukui T, Kawamoto T, *et al.* Bioconversion of organosilicon compounds by horse liver alcohol dehydrogenase: the role of the silicon atom in enzymatic reaction. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, **36** (1): 40~ 43
 - 6 Fukui T, Zong M H, Kawamoto T, *et al.* Kinetic resolution of organosilicon compounds by stereoselective dehydrogenation with horse liver alcohol dehydrogenase. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, **38** (2): 209~ 213
 - 7 Tanaka A, Fukui T, Zong M H, *et al.* Bioconversion of non-natural organic compounds: esterification and dehydrogenation of organosilicon compounds. Ann N Y Acad Sci, 1992, **672**: 431~ 435
 - 8 Fukui T, Kawamoto T, Tanaka A. Enzymatic preparation of optically active silyl-methanol derivatives having a stereogenic silicon atom by hydrolase-catalyzed enantioselective esterification. Tetrahedron: Asymmetry, 1994, **5** (1): 73~ 82
 - 9 Uejima A, Fukui T, Fukusaki E, *et al.* Efficient kinetic resolution of organosilicon compounds by stereoselective esterification with hydrolases in organic solvent. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, **38** (4): 482~ 486
 - 10 邱树毅, 姚汝华, 宗敏华. 固定化脂肪酶催化有机硅烷醇的酯化反应. 生物化学与生物物理进展, 1996, **23** (4): 369~ 372
Qiu S Y, Yao R H, Zong M H. Prog Biochem Biophys, 1996, **23** (4): 369~ 372
 - 11 宗敏华, 程潜, 林影. 有机相中酶促有机硅烷醇的转酯. 生物化学与生物物理进展, 1999, **26** (3): 259~ 261
Zong M H, Cheng Q, Lin Y. Prog Biochem Biophys, 1999, **26** (3): 259~ 261
 - 12 Zani P. Biotransformations of organosilicon compounds: enantioselective reduction of acyl silanes by means of baker's yeast. J Mol Catal B: Enzymatic, 2001, **11**: 279~ 285
 - 13 Huber P, Bratovanov S, Bienz S, *et al.* Chiral silicon groups as auxiliaries for enantioselective synthesis: access to optically active silanes by biotransformation and the enantiospecific preparation of (*R*)-(+)-1-phenylethanol. Tetrahedron: Asymmetry, 1996, **7** (1): 69~ 78

Asymmetric Microbial Reduction of Organosilyl Ketone with Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Water/ organic Solvent Biphasic System*

LOU Wen-Yong, ZONG Min-Hua**, FAN Xiao-Dan, LU Jie-Quan, DU Wei

(Department of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract Asymmetric microbial reduction of acetyltrimethylsilane to (–)-1-trimethylsilyl-ethanol with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in water/organic solvent biphasic system was studied. The effects of shake speed, the hydrophobicity of organic solvent, volume ratio of water phase to organic phase, pH of aqueous phase and reaction temperature on the initial reaction rate, maximum yield and enantiomeric purity of the product were systematically explored. All the factors mentioned above have important effects on the reaction. *n*-Hexane is found to be the best organic solvent for the reaction. The optimum shake speed, volume ratio of water phase to organic phase, pH and reaction temperature are 150 r/min, 1/2, 8 and 25~ 30 °C respectively for the reaction, under which the maximum yield and enantiomeric purity of the product are as high as 96.8% and 95.7% (*ee*) respectively.

Key words acetyltrimethylsilane, immobilized cells, *Saccharomyces cerevisiae*, asymmetric reduction, (–)-1-trimethylsilyl-ethanol

* This work was supported by grants from the Chinese National Natural Science Foundation (20076019) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (000444).

** Corresponding author. Tel: 86-20-87111452, E-mail: btmhzong@letterbox.scut.edu.cn

Received: July 25, 2001 Accepted: September 12, 2001