

含水有机溶剂体系中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化乙酰乙酸乙酯不对称还原反应

徐玉¹, 王晓婷², 娄文勇^{2,3}, 宗敏华³

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 华南理工大学轻工与食品学院应用生物催化实验室, 广东广州 510640) (3. 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室, 广东广州 510640)

摘要: 本论文报道了含微水有机溶剂体系中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化乙酰乙酸乙酯不对称还原为 (*R*)-3-羟基丁酸乙酯。研究表明, *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞能遵循反Prelog规则高选择性地催化乙酰乙酸乙酯不对称还原。与单水相反应体系相比, 含有机溶剂体系不仅可有效地解决底物和产物的抑制作用, 而且可提高反应底物的浓度和产率。在所研究的不同有机溶剂中, 正己烷为该反应的最适有机相, 其能较好溶解底物且对 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的毒性较小, 从而导致反应的初速度较快, 产率较高。异丙醇为该反应的最佳辅底物, 其最适浓度为 60 mmol/L; 该反应体系中的最适正己烷体积百分比、反应温度、底物浓度分别为约 100.00% (水含量约为 0.01 wt%), 35 °C, 40 mmol/L。在此条件下, 反应的初速率、产率和产物的 *ee* 值分别为 0.72 μmol/min, 85.24% 和 99.00% 以上, 明显好于水单相反应体系进行该反应的结果。

关键词: 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞; 乙酰乙酸乙酯; (*R*)-3-羟基丁酸乙酯

文章编号: 1673-9078(2014)7-31-37

Biocatalytic Asymmetric Reduction of Ethyl Acetoacetate with Immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 Cells in a Micro-water-containing Organic Solvent

XU Yu¹, WANG Xiao-ting², LOU Wen-yong^{2,3}, ZONG Min-hua³

(1. School of Biosciences & Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)
(2. Lab of Applied Biocatalysis, School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (3. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In present study, the highly anti-Prelog stereoselective reduction of ethyl acetoacetate (EAA) to (*R*)-ethyl-3-hydroxybutyrate (EHB) with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells was successfully conducted in a micro-water-containing organic solvent. Use of organic solvent-containing system as the reaction medium, in place of aqueous monophasic system, could not only effectively eliminate the inhibition of the substrate and product, but also improve the concentration of the substrate and the product yield of the tested organic solvents, *n*-hexane was selected as the most suitable organic phase for the reaction, due to its good ability to dissolve the substrate and biocompatibility with *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells. Therefore, the bioreduction reaction with *n*-hexane became faster and the achieved product yield was relatively higher. Isopropanol was found to be the best co-substrate for the bioreduction and its optimal concentration was 60 mmol/L. For the bioreduction of EAA with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells, the optimum percentage of *n*-hexane, reaction temperature, substrate concentration were 100.00% (containing around 0.01 wt% water), 35 °C, 40 mmol/L, respectively. Under the optimized reaction conditions, the obtained initial reaction rate, yield and product *ee* was 0.72 μmol/min, 85.24% and 99.00% above, which was better than the results observed with aqueous monophasic system as the reaction medium.

Key words: immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells; ethyl acetoacetate; (*R*)-ethyl-3-hydroxybutyrate

收稿日期: 2014-02-22; 作者简介: 徐玉 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物工程; 通讯作者: 娄文勇教授, 宗敏华教授

基金项目: 国家自然科学基金 (2122606; 21376096); 广东省自然科学基金重点项目 (S2013020013049); 华南理工大学中央高校基本科研业务费 (2013 ZG 000 3); 全国百篇优秀博士学位论文作者资助项目 (201504)

手性醇是一种重要的手性合成中间体,广泛用于手性药物、农用化学品、香料和功能材料的合成^[1-2],例如2-辛醇是合成类固醇、生物杀虫剂等许多光学活性药物的重要手性中间体,也是制备高性能液晶及其器件不可缺少的重要手性原料^[3-4];对映体纯(*S*)-3-羟基丁酸乙酯(EHB)是灰绿霉素、食菌甲诱醇和核球壳菌前体等天然产物的手性源;对映体纯(*R*)-EHB则是合成L-肉碱、亚胺培南等碳青霉烯类抗生素等手性药物的重要中间体^[5]。生物催化法是指利用生物催化剂(酶或产酶全细胞)进行外消旋体拆分或手性化合物的不对称合成和转化的方法。生物催化法具有许多优势,如反应条件温和,生物催化剂活性高,产率高,产品光学纯度高,对环境友好等等^[6],因此利用生物催化EAA不对称还原合成对映体纯(*R*)-EHB具有重要意义。

目前国内外较多报道关于水相体系和有机溶剂/水两相反应体系中,利用酶或全细胞催化EAA不对称还原反应,产物大部分是(*S*)-EHB,且产率和产物的*e.e.*值较理想。最早在1986年,Ehrler^[7]等人利用面包酵母催化EAA不对称还原反应生成(*S*)-EHB,产率为70.00%,产物*e.e.*值为94.00%。朱文洲^[8]等人以压榨鲜酵母为生物催化剂,通过自制的多功能摇瓶来实现EAA不对称还原反应,获得(*S*)-EHB,产率为86.00%,产物*e.e.*值为70.00%。到2001年,Wolfson^[9]等人在甘油体系中利用固定化酵母催化EAA不对称还原反应,在最适反应条件下,所得转化率为99.00%,产物*e.e.*值达到99.00%。但遵循反Prelog规则的固定化细胞催化EAA不对称还原生成(*R*)-EHB的研究报道不多。本课题组最近从“中华开菲尔”菌粒中分离纯化得到的一株新菌*Acetobacter* sp. CCTCC M209061,其按照反Prelog规则,成功催化4-三甲基硅基-3-丁炔-2-酮不对称还原合成对映体纯的(*R*)-4-三甲基硅基-3-丁炔-2-醇^[10]。此外,该菌株亦能高效、高选择性的催化一系列芳香酮的不对称还原^[10]。研究表明与游离酶相比,微生物全细胞的稳定性及选择性更好,且不需要添加昂贵的辅酶^[11-12];而与游离细胞相比,固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M209061细胞具有较好的储藏稳定性、热稳定性和溶剂耐受性等明显优势^[13];同时采用固定化细胞进行反应有利于产物的分离和细胞的重复利用,从而能简化生产工序,降低生产成本。因此,本论文研究了含微水有机溶剂体系中固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M209061细胞催化EAA不对称还原反应的特性,并探讨各相关因素对该反应的影响规律,以期建立高效合成对映体纯(*R*)-EHB的生物催化反应体系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Acetobacter sp. CCTCC M209061由本课题组从“中华开菲尔菌粒(China kefir)”中分离纯化得到;乙酰乙酸乙酯(Ethyl acetoacetate, EAA)和三氟醋酸酐,纯度均为99%以上,购自阿法埃莎(天津)化学有限公司;3-羟基丁酸乙酯(Ethyl 3-hydroxybutyrate, EHB)、(*R*)-3-羟基丁酸乙酯(Ethyl (*R*)-3-hydroxybutyrate, (*R*)-EHB),正癸烷,纯度均为98%以上,购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。其它试剂均为市售分析纯。

日本岛津GC-2010型气相色谱仪和FID检测器,HP-Chiral手性柱(0.25 mm×30 m×0.25 μm, 10% Permethyated β-Cyclodextrin, 美国惠普公司)。卡尔费休水分测定仪787KF。

1.2 试验方法

1.2.1 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的培养及固定化

培养基组成(g/L):大豆蛋白胨65 g/L,果糖2.5 g/L,葡萄糖8.6 g/L, MnSO₄ 0.09 g/L^[4]。取一定量的游离细胞,将其均匀分散在含2% (*m/V*)海藻酸钠溶液中,形成均匀分布的细胞/海藻酸钠悬浮液,然后用注射器把悬浮液滴加入含2% (*m/V*) CaCl₂水溶液中(边滴边搅拌),浸泡30 min,过滤收集固定化细胞颗粒,固定化细胞中含*Acetobacter* sp. CCTCC M209061细胞的量约为10% (*m/m*)。用蒸馏水清洗三次后,将固定化细胞浸泡在1% (*m/V*)壳聚糖水溶液(pH 5.0)中20 min,再用蒸馏水清洗三次。最后将固定化细胞悬浮在含0.05% (*m/V*) CaCl₂的TEA-HCl缓冲液(100 mmol/L, pH 5.5)中,冷藏(4 °C)备用。

1.2.2 固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞对有机溶剂耐受性的研究

在第一组中8个25 mL具塞三角瓶中分别加入10 mL含0.45 g/mL固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M209061细胞(细胞湿重0.045 g/mL)的不同有机溶剂(无、乙酸乙酯、环己烷、正己烷、正辛烷、异辛烷、辛醇和甲苯);在第二组中8个25 mL具塞三角瓶中加入10 mL含0.45 mg/mL固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M209061细胞和40 mmol/L EAA底物的不同有机溶剂(无、乙酸乙酯、环己烷、正己烷、正辛烷、异辛烷、辛醇和甲苯);在30 °C、180 r/min的摇床

中培养 24 h。然后用去离子水洗涤固定化细胞 3 次后,于 30 °C 在 10 mL 10 g/L 葡萄糖溶液中培养 4 h,测其葡萄糖浓度,从而得出培养 4 h 的耗糖量。

$$\text{MAR}(\%) = \frac{\text{在有机溶剂中浸泡24h后的固定化细胞在葡萄糖溶液中培养4h的耗糖量}}{\text{对照组的耗糖量}} \times 100\%$$

MAR 值越大,表明固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞对有机溶剂的耐受性越强。

1.2.3 测定底物和产物在含有机溶剂体系中的分配系数

在具塞三角瓶中加入体积比为1:1的有机溶剂/TEA-HCl缓冲液(100 mmol/L, pH 5.5)双相体系,再分别添加 40 mmol EAA 或 EHB,置于恒温气浴振荡器(35 °C, 200 r/min)中振荡 24 h,从两相中取样,用 GC 分别测定两相体系中 EAA 或 EHB 浓度。EAA 和 EHB 在两相中的分配系数($K_{org/aq}$)即为它们在两相中的浓度之比。

1.2.4 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应

在 25 mL 具塞三角瓶中加入 10 mL 含 35 mmol/L EAA (底物浓度是基于整个反应体系的体积计算的)、不同体积比的有机溶剂(含 15.1 mmol/L 内标物癸烷且基于有机相的体积计算的)/TEA-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 5.5, 含 80 mmol/L 葡萄糖且基于水相的体积计算的),置于恒温气浴振荡器中,添加 0.45 g/mL 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞(游离细胞湿重 0.045 g/mL)开始反应(35 °C, 180 r/min),分别在水相和有机溶剂相定时取样。水相中取样 50 μ L,用 100 μ L 乙酸乙酯(含 15.1 mmol/L 内标物正癸烷)萃取底物和产物,用漩涡混合器振荡 3 min,离心(12,000 r/min) 5 min,取上清液。有机溶剂相取样 50 μ L,加入 50 μ L 相对应的有机溶剂(含 15.1 mmol/L 内标物正癸烷)稀释,再离心(12,000 r/min) 5 min,取上清液,供 GC 分析。

1.2.5 气相色谱(GC)和液相色谱(HPLC)分析

GC 分析条件:汽化室温度 250 °C,色谱柱柱温 75 °C,检测室温度 250 °C,维持 10 min,载气是氮气,柱流量 2.00 mL/min,分流比 50:1,进样量 1 μ L。在该分析条件下,内标正癸烷、EAA、EHB 的保留时间分别为 8.6, 17.5 和 16.4 min。EHB 用三氟醋酸酐酯化后其 S 型和 R 型酯化产物,在上述条件下(柱温 60 °C,柱流量 0.40 mL/min)的保留时间分别为 52.7 和 53.4 min。最大相对误差小于 1.00%。

HPLC 分析条件:仪器为 Waters 515 型泵,2410 型示差检测器, Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm \times 7.8 mm,

糖代谢活力保留值(Metabolic activity retention, MAR, %) 定义为:

Bio Rad Corp., USA); 流动相为 5.0 mmol/L 硫酸,流速为 0.5 mL/min; 柱温为 65 °C,检测器温度为 50 °C; 进样量 20 μ L。葡萄糖的保留时间约为 12.1 min。

1.2.6 反应初速度、最大产率和产物对映体纯度的确定

由反应初始单位时间内产物的增加量来计算初始反应速度,即

$$V_0 = C_t/t$$

根据产物(R)-EHB 的增加量与反应前底物的摩尔量的比值来计算产率,即

$$Y = C_t/C_0$$

根据产物的两种异构体的量计算产物的对映体纯度,用对映体过量值来表征,即

$$e.e.\% = 100\% \times (A-B) / (A+B)$$

其中, A 和 B 分别表示产物 EHB 的两种对映体的摩尔浓度(mmol/L), C_0 表示反应前底物的摩尔浓度(mmol/L), C_t 表示反应 t 分钟之后产物 EHB 的摩尔浓度(mmol/L), t 表示反应时间。

1.3 数据分析

产物(R)-EHB 与(S)-EHB 通过 GC 检测,采取内标法,且每个样品至少平行两次,取平均值即可。

2 结果与讨论

2.1 水单相体系和有机溶剂/缓冲液双相体系

中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应之比较

首先对比研究了水单相体系和有机溶剂/缓冲液双相体系中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应。由图 1 可知,水单相体系和有机溶剂/缓冲液双相体系中产物的 e.e. 值均保持在 99.00% 以上。同时尽管在水单相体系中反应初速度快且反应时间短,但是当反应底物浓度为 55 mmol/L 时,水单相体系中最大产率仅为 52.60%,而相应地在正己烷/缓冲液双相体系中,最大产率为 67.03%,表明了含有机溶剂/缓冲液双相体系在一定程度上解决了底物的抑制作用,提高了该反应效率。因此,本论文选择含

有机溶剂反应体系作为该反应介质进行后续的研究。

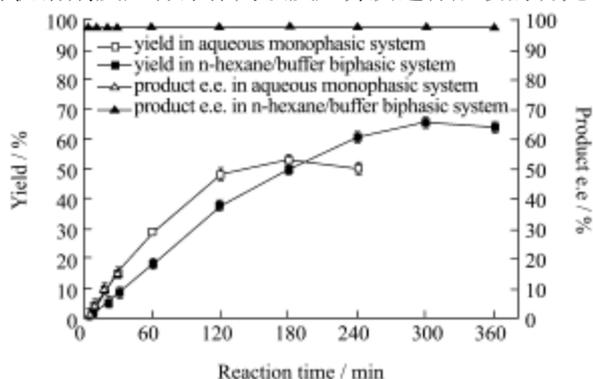


图1 水单相体系和正己烷/缓冲液双相体系中固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应之比较

Fig.1 Comparison of asymmetric reduction of EAA with immobilized *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 cells in aqueous monophasic system and in *n*-hexane/buffer biphasic system.

注：反应条件为水单相体系中：35 °C，220 r/min，55 mmol/L EAA，固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞 4.5 g，含 80 mmol/L 葡萄糖；正己烷/缓冲液双相体系中：35 °C，220 r/min，55 mmol/L EAA，固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞 4.5 g，含 80 mmol/L 葡萄糖，TEA-HCl buffer (100 mmol/L，pH 5.5) 与正己烷体积比为 1/2。

表 1 不同有机溶剂对固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应的影响

Table.1 Effect of various organic solvents on the biocatalytic asymmetric reduction of EAA by immobilized *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 cells

Organic solvents	Log P	Initial reaction rate / (μmol/min)	Yield / % ^a	e.e. / % ^b
Ethyl acetate/buffer	0.68	0.18	48.59	> 99.00
Methylbenzene/buffer	2.80	0.24	33.11	> 99.00
<i>n</i> -Octanol/buffer	2.90	0.34	31.37	> 99.00
Cyclohexane/buffer	3.00	0.40	45.62	> 99.00
<i>n</i> -Hexane/buffer	3.50	0.42	73.94	> 99.00
Isooctane/buffer	3.90	0.35	38.91	> 99.00
<i>n</i> -Octane/buffer	4.50	0.33	34.73	> 99.00

注：反应条件：35 °C，180 r/min，35 mmol/L 的 EAA，固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞 4.5 g，5 mL 含有 15.1 mmol/L 正癸烷(内标物)的不同有机溶剂和 5 mL TEA-HCl 缓冲液 (100 mmol/L，pH 5.5)，80 mmol/L 葡萄糖；^a The maximum yield；^b The product e.e.。

由表1可知，当反应体系中以乙酸乙酯为有机相时，反应初速度较慢，产率偏低，这可能是由于 Log P 值小于 2.0 的有机溶剂亲水性较强，对固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞的毒性较大。随着

有机溶剂 Log P 值的升高，反应初速度和产率均有明显的提高。固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞在含有正己烷的反应体系中表现出较高的催化活性，反应的初速度和产率均高于其他有机溶剂 (反应初速度：0.42 μmol/min；产率：73.94%)；但在有机溶剂 Log P 值高于 3.5 的反应体系中，反应的初速度和产率均随着有机溶剂疏水性的增强而减小 (反应初速度：0.35~0.33 μmol/min；产率：38.91%~34.73%)。在所研究的有机溶剂中，产物 e.e. 值都保持在 99.00% 以上，说明所考察的有机溶剂对该反应的产物对映体选择性影响甚微。

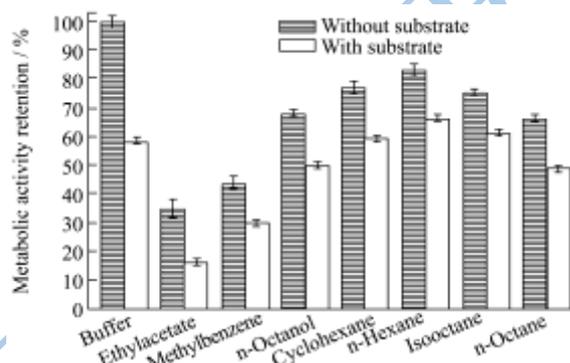


图2 不同有机溶剂对固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞的糖代谢活力保留值的影响

Fig.2 Effect of various organic solvents on the glucose metabolic activity retention (MAR) of *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 cells

表 2 EAA 和 EHB 在含不同有机溶剂体系中的分配系数

Table 2 Partition coefficients of EAA and EHB in various organic solvent-containing systems

Media	Partition coefficients between the two phases	
	EAA	EHB
Ethyl acetate	12.49	4.63
Methylbenzene	6.51	1.20
<i>n</i> -Octanol	2.53	1.11
Cyclohexane	1.68	0.90
<i>n</i> -Hexane	1.60	1.02
Isooctane	1.84	0.60
<i>n</i> -Octane	1.01	0.14

为了更好地理解不同有机溶剂对该反应速度、产率和产物的 e.e. 值之影响，我们考察了固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞对不同有机溶剂的耐受性 (图 2)，发现在这 7 种有机溶剂中，当 Log P < 3.5 时，固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞的 MAR 随着有机溶剂 Log P 的增大而增大；当 Log P > 3.5 时，固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞的 MAR 随着 Log P 的增大而减小。由此可知固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞对不同有机

溶剂的耐受性不同,其中对正己烷的耐受性最好。这就很好地解释了固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞在正己烷/缓冲液体系内催化 EAA 不对称还原反应的初速度和产率最高。另一方面,根据表 2 可知底物 EAA 和产物 EHB 在乙酸乙酯/缓冲液双相体系中的分配系数最高,但是由于乙酸乙酯对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的毒性较大,产率较低。因此综合考虑,在所研究的 7 种不同有机溶剂中,正己烷为该反应的最适有机相。

2.2 正己烷体积百分比对反应的影响

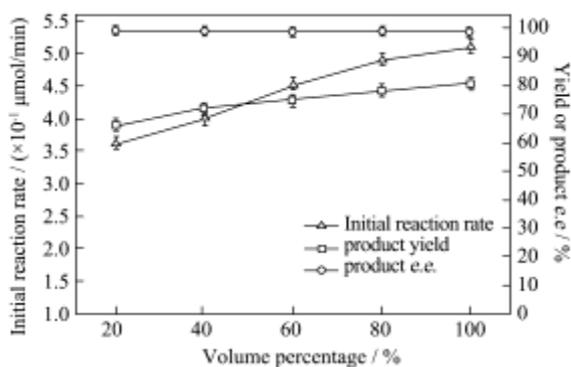


图3 正己烷体积百分比对反应的影响

Fig.3 Effect of volume percentage of *n*-hexane on the reaction

注:反应条件:35℃,180 r/min,35 mmol/L EAA,固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞 4.5 g (细胞湿重 0.45 g),含不同正己烷体积百分比的正己烷(含 15.1 mmol/L 内标物正癸烷)/TEA-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 5.5, 含 80 mmol/L 葡萄糖)的反应液。

众所周知,两相体积比通过影响两相的界面面积来影响水/有机溶剂双相体系的生物转化。图3表明,反应初速度和产率均随着正己烷体积百分比增大而增大,而产物的 *e.e.* 值一直保持在 99.00% 以上。当正己烷体积百分比增大至约为 100.00% 即反应体系为正己烷单相体系时,反应初速度和产率达到最大值,分别为 0.51 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 和 80.72%。但之前的研究发现,若用纯的有机溶剂作为生物催化的介质,反应初速度和产率会出现剧烈下降,说明体系中的水含量是生物催化剂得以维持催化活性的重要因素,而且经卡尔费休水分测定仪测出反应介质中水含量为 0.01 wt%。在此研究中,固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞在正己烷体系中表现出最佳的催化活性,可能是因为:一方面,固定化材质的亲水性较强,使得固定化小球的凝胶微孔中饱含水分子,细胞被保护在饱含水的微环境中;另一方面,EAA 和 EHB 在正己烷/缓冲液两相体系中的分配系数相对较高(表2),当正己烷体积百分比

达到约 100.00% 后,即反应介质为正己烷,EAA 和 EHB 绝大部分存在于正己烷中,仅有少量溶解于固定化小球所含的水中,故对细胞的毒性减小。因此,最适的正己烷体积百分比约为 100.00%,即最适反应介质为含微水的正己烷(水含量为 0.01 wt%)。

2.3 不同辅底物对反应的影响

表 3 不同辅底物对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称反应的影响

Table 3 Effect of various co-substrates on the asymmetric reduction of EAA catalyzed by immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

Co-substrates	Initial reaction rate	Yield	<i>e.e.</i>
	/($\mu\text{mol}/\text{min}$)	/% ^a	/% ^b
No co-substrate	0.00	0.00	0.00
Methanol	0.25	10.89	>99.00
Ethanol	0.22	13.81	>99.00
Isopropanol	0.51	80.72	>99.00
t-Butanol	0.14	25.43	>99.00
n-Butanol	0.11	12.85	>99.00
Glycerol	0.21	16.47	>99.00

注:反应条件:35℃,180 r/min,10 mL 正己烷(含 15.1 mmol/L 的内标物正癸烷),35 mmol/L EAA,80 mmol/L 不同辅底物,4.5 g 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞;^a The maximum yield, ^b The product *e.e.*

由表 3 可以看出,当反应中没有辅底物时,EAA 不能被固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化,反应初速度和最大产率均为零;分别添加了各种辅底物后,该反应才能顺利进行。当辅底物为异丙醇时,反应的初速度、最大产率均为最高。在所研究的 6 种辅底物中,产物的 *e.e.* 值保持在 99.00% 以上。因此,选用异丙醇作为正己烷体系中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应的最适辅底物。

2.4 底物浓度对反应的影响

如图 4 所示,当底物浓度低于 40 mmol/L 时,反应初速度随底物浓度的增大而加快,最大产率几乎没有变化,一直保持在 83.19% 左右;当底物浓度从 40 mmol/L 增大至 50 mmol/L 时,反应初速度和最大产率均随着底物浓度的增大而明显下降。在所研究的底物浓度范围内,产物 *e.e.* 值均保持在 99.00% 以上。综合考虑反应初速度和产率,在含微水的正己烷反应体系中,该反应的最适底物浓度为 40 mmol/L。

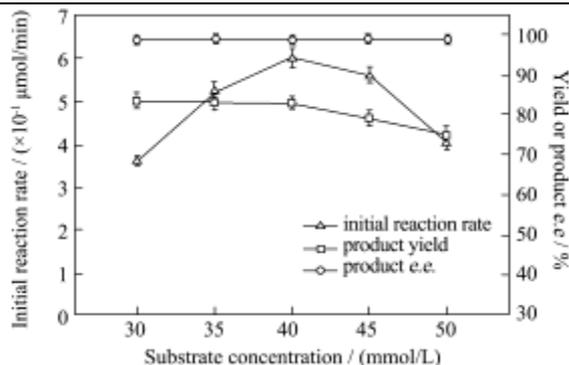


图4 底物浓度对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应的影响

Fig.4 Effect of substrate concentration on the bioreduction of EAA with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

注：反应条件：35 °C，180 r/min，10 mL正己烷（含15.1 mmol/L的内标正癸烷），不同浓度的底物，80 mmol/L异丙醇，4.5 g固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M209061细胞。

2.5 辅底物浓度对反应的影响

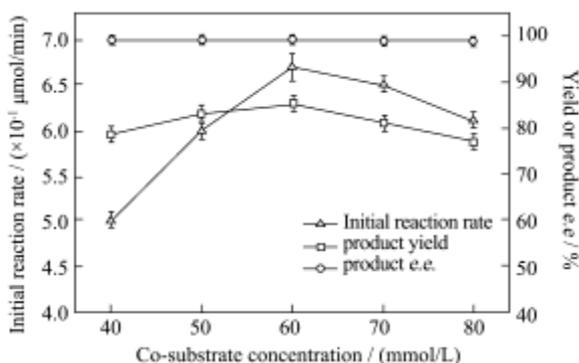


图5 辅底物浓度对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应的影响

Fig.5 Effect of co-substrate concentration on the bioreduction of EAA with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

注：反应条件：35 °C，180 r/min，10 mL正己烷（含15.1 mmol/L的内标正癸烷），不同浓度的异丙醇，40 mmol/L EAA，4.5 g固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M209061细胞（细胞湿重0.45 g）。

众所周知，辅底物浓度过低不利于辅酶的再生和循环利用，限制了反应的顺利进行；过高则对反应有一定的抑制作用，因此有必要研究辅底物浓度对该反应的影响。图4表明，当辅底物异丙醇浓度小于60 mmol/L时，反应初速度和最大产率均随着辅底物异丙醇浓度的增加而迅速升高，当异丙醇浓度增大为60 mmol/L时达到最大；当异丙醇浓度大于60 mmol/L以上时，反应初速度减慢，最大产率开始减小。这可能是因为适当浓度的异丙醇不仅有助于辅酶的循环再生，

还能增加细胞膜的通透性，有利于底物EAA进入固定化细胞与酶相结合以及产物EHB沿相反方向的扩散；当异丙醇浓度过高时，其氧化生成的丙酮浓度也较高，对固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M209061细胞产生一定的毒性，使细胞活力下降。因此，该反应的最适辅底物浓度以60 mmol/L为宜。

2.6 反应温度对反应的影响

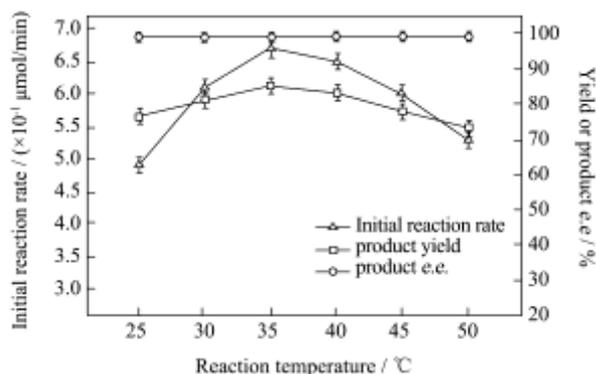


图6 反应温度对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应的影响

Fig.6 Effect of reaction temperature on the bioreduction of EAA with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

注：反应条件：不同的反应温度，180 r/min，10 mL正己烷（含15.1 mmol/L的内标正癸烷），60 mmol/L异丙醇，40 mmol/L EAA，4.5 g固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M209061细胞。

由图6可以看出，当反应温度为低于35 °C时，反应初速度和最大产率随着反应温度的升高而增大，当温度高于35 °C时，随着反应温度继续升高，反应初速度变慢，最大产率减小，可能是因为温度过高致使部分酶蛋白开始变性失活，反应速度下降，产率减小。当温度在25 °C至50 °C范围内变化时，产物e.e.值几乎不受温度变化的影响，均在99.00%以上。显然，该反应温度以35 °C为佳。

2.7 水相以及正己烷单相中 EAA 不对称还原反应的比较

由表4可知在水相体系中，固定化*Acetobacter* sp. CCTCC M20906细胞催化EAA不对称还原反应的最适底物浓度为35 mmol/L，在最适反应条件下所得的产率、初速度以及产物e.e.值分别为82.57%，1.28 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ，99.00%以上。而在正己烷体系中虽然反应初速度略有下降（0.72 $\mu\text{mol}/\text{min}$ vs. 1.28 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ），但最适底物浓度和产率有所增大，明显好于水单相反应体系中进行该反应获得的结果。但是，在含微水的正己烷反应体系中，固定化*Acetobacter* sp. CCTCC

M209061细胞的操作稳定性不太理想, 其连续使用3批次(每批次4 h)后仅保留初始活性的20.00%左右(图7),

这主要是因为有机溶剂正己烷对微生物细胞有一定毒性。

表4 水相以及正己烷单相中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 EAA 不对称还原反应的比较

Table 4 Comparison of aqueous buffer system and *n*-hexane monophasic system on asymmetric bioreduction of EAA Catalyzed by immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

Reaction media	Optimal substrate concentration/(mmol/L)	Initial reaction rate /($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Yield /% ^a	<i>e.e.</i> /% ^b	Time /h
Buffer	35	1.28	82.57	>99.00	2.00
<i>n</i> -Hexane	40	0.72	85.24	>99.00	4.00

注: 反应条件: 水相体系: 10 mL TEA-HCl 缓冲液 (100 mmol/L, pH 5.5), 35 mmol/L EAA, 4.5 g 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞 (细胞湿重 0.45 g), 80 mmol/L 葡萄糖, 35 °C, 200 r/min; 正己烷体系: 10 mL 正己烷 (含 15.1 mmol/L 内标正癸烷), 40 mmol/L EAA, 4.5 g 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞 (细胞湿重 0.45 g), 60 mmol/L 异丙醇, 35 °C, 220 r/min; a The maximum yield, b The product *e.e.*

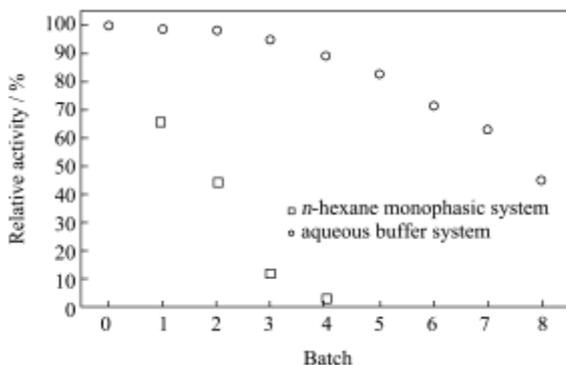


图7 水相以及正己烷单相中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的操作稳定性

Fig.7 Operational stability of immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells in aqueous buffer system and *n*-hexane monophasic system

注: 反应条件: 水相体系: 10 mL TEA-HCl 缓冲液 (100 mmol/L, pH 5.5), 35 mmol/L EAA, 4.5 g 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞 (细胞湿重 0.45 g), 80 mmol/L 葡萄糖, 35 °C, 200 r/min. 正己烷体系: 10 mL 正己烷 (含 15.1 mmol/L 内标正癸烷), 40 mmol/L EAA, 4.5 g 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞 (细胞湿重 0.45 g), 60 mmol/L 异丙醇, 35 °C, 220 r/min.

3 结论

在含微水的正己烷反应体系中 (水含量为 0.01 wt%), 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞能够高选择性地催化 EAA 不对称还原为 (*R*)-EHB。在最优反应条件下, 获得产率以及产物 *e.e.* 值分别为 85.24% 和 99.00% 以上, 明显好于水单相反应体系中得到的结果。这是因为含微水有机溶剂体系可以解除水单相体系中底物和产物的抑制作用, 提高反应效率。但是由于有机溶剂对细胞仍然存在一定的毒性, 固定化细胞的操作稳定性也不太理想, 且大量使用有机溶

剂易造成环境污染。因此, 本课题组正在尝试采用生物相容性更好的, 对细胞毒性更小的离子液体来替代有机溶剂用于该反应, 可望取得更好的结果。

参考文献

- [1] Goldberg K, Schroer K, Lutz S, et al. Biocatalytic ketone reduction-a powerful tool for the production of chiral alcohols [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, 76 (2): 237-248
- [2] Zilbeyaz K, Kurbanoglu E B. Production of (*R*)-1-(4-Bromophenyl)-ethanol by locally isolated *Aspergillus niger* using ram horn peptone [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1549-1552
- [3] Pocięcha D, Glogarova M, Gorecka E, et al. Behavior of frustrated phase in ferroelectric and antiferroelectric liquid crystalline mixtures [J]. Phys. Rev. E., 2000, 61 (6): 6674-6677
- [4] Xue L, Zhou D, Tang L, et al. The asymmetric hydration of 1-octene to (*S*)-(+)-2-octanol with a biopolymer-metal complex, silica-supported chitosan-cobalt complex [J]. React. Funct. Polym., 2004, 58: 117-121
- [5] 李宗科. 碳青霉烯类抗生素国外研究动态 [J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11): 812-815
LI Zong-Ke. The trend in research of carbapenem antibiotics [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2001, 10(11): 812-815
- [6] Tian J, Guo Q, Chen Y, et al. Study on industrial metabolism of carbon in a Chinese fine chemical industrial park [J]. Environmental Science Technology, 2012, 47: 1048-1056
- [7] Ehrler J, Giovannini F, Lamatsch B, et al. Stereoselectivity of yeast reductions-an improved procedure for the preparation of ethyl (*S*)-3-hydroxybutanoate and ethyl (*S*)-2-hydroxybutanoate [J]. Chimia. 1986, 40: 172-173
- [8] 朱文洲, 许建和, 俞俊棠. 面包酵母催化乙酰乙酸乙酯的不对称还原反应 [J]. 华东理工大学学报, 2000, 4(26): 154-156

- ZHU Wen-zhou, XU Jian-he, YU Jun-tang. Asymmetric reduction of ethyl acetoacetate using baker's yeast [J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2000, 4(26): 154-156
- [9] Wolfson A, Dlugy C. Baker's yeast catalyzed asymmetric reduction in glycerol [J]. Tetrahedron Asymmetry, 2006, 17: 2043-2045
- [10] Xiao Z J, Zong M H, Lou W Y, et al. Highly enantioselective reduction of 4-(trimethylsilyl)-3-buten-2-one to enantiopure (*R*)-4-(trimethylsilyl)-3-buten-2-ol using a novel strain *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 [J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 5560-5565
- [11] Pinheiro L, Marsaioli A J. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds [J]. Journal of Molecular Catalysis B, 2007, 44: 78-86
- [12] 娄文勇, 郭强, 郁惠蕾等. 近平滑假丝酵母细胞催化乙酰基三甲基硅烷不对称还原反应[J]. 催化学报, 2009, 12: 1276-1280
- LOU Wen-yong, GUO Qiang, YU Hui-lei, et al. Asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane catalyzed by *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 Cells [J]. Chinese Journal of Catalysis, 2009, 12: 1276-1280
- [13] Chen X H, Wang X T, Lou W Y, et al. Immobilization of *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 for efficient asymmetric reduction of ketones and biocatalyst recycling [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 119
- [14] Chen X H, Lou W Y, Zong M H, et al. Optimization of culture conditions to produce high yields of active *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells for anti-Prelog reduction of prochiral ketones [J]. BMC Biotechnol, 2011, 11: 110