

水相体系中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 (S)-3-氯苯丙醇不对称合成

黄宇美¹, 徐玉¹, 赵冰怡¹, 娄文勇^{1,2}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院应用生物催化研究室, 广东广州 510640)

(2. 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: 光学纯的 3-氯苯丙醇是合成抗抑郁类药物的重要中间体。本论文报道了水相体系中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞高效、高选择性地催化 3-氯苯丙酮不对称还原为 (S)-3-氯苯丙醇, 采用聚乙烯醇与海藻酸钠的混合载体对醋酸杆菌细胞进行固定化, 所得的固定化细胞的稳定性(热稳定性、pH 稳定性及操作稳定性)均明显优于游离细胞。同时, 固定化后的微生物细胞具有较好的重复利用性, 连续反应 3 个批次后固定化细胞仍保留了 80.0% 以上的活性, 而游离细胞的相对活性则小于 20%。在所研究的体系中, 葡萄糖为该反应的最佳辅底物, 其最适浓度为 50.0 mmol/L; 该反应体系中的最适缓冲液 pH 值、反应温度、底物浓度分别为 5.5、30 °C 和 3.0 mmol/L。在此条件下, 反应的初速度、产率以及产物的 e.e. 值依次为 1.77 mM/h, 88.9% 和 99.0% 以上。

关键词: 固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞; 3-氯苯丙酮; (S)-3-氯苯丙醇

文章编号: 1673-9078(2015)9-124-131

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.021

Asymmetric Synthesis of (S)-3-Chloro-1-phenylpropanol with Immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 Cells in a Monophasic System

HUANG Yu-mei¹, XU Yu¹, ZHAO Bing-yi¹, LOU Wen-yong^{1,2}

(1. Lab of Applied Biocatalysis, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Optically pure 3-chloro-1-phenyl-1-propanol is an important intermediate for the synthesis of drugs for treating depression. In the present study, biocatalytic asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone to (S)-3-chloro-1-phenyl-1-propanol with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells was successfully conducted in a monophasic aqueous system with high efficiency and selectivity. The immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells exhibited higher stabilities (thermal, pH, and operational stability) than the free cells. In addition, the immobilized microbial cells exhibited a relatively good recyclability; the relative activity of immobilized cells remained over 80%, while that of the free cells under the same condition was less than 20%. In the studied system, glucose was the best co-substrate at an optimum concentration of 50 mmol/L. The optimum buffer pH, reaction temperature, and substrate concentration in this reaction system were 5.5, 30 °C, and 3.0 mmol/L, respectively. Under the optimized reaction conditions, the initial reaction rate, yield, and product e.e. were 1.77 mM/h, 88.9%, and above 99.0%, respectively.

Key words: immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells; 3-chloropropiophenone; (S)-3-chloro-1-phenyl-1-propanol

据世界卫生组织发布的《2002 年世界卫生报告》^[1], 抑郁症已经是世界上位居第四位的常见疾病。研

收稿日期: 2014-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21222606; 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 (2013ZG0003); 全国百篇优秀博士论文作者资助项目 (201504)

作者简介: 黄宇美 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为手性药物的生物合成及催化

通讯作者: 娄文勇 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向为生物催化

究表明, 光学纯的 3-氯苯丙醇是合成抗抑郁类药物的重要中间体, 其中 (S)-3-氯苯丙醇可用于合成抗抑郁药 (R)-托莫西汀, (R)-3-氯苯丙醇可用于合成抗抑郁药 (S)-托莫西汀, 并且 (R)-托莫西汀的药效是 (S)-托莫西汀的 9 倍^[2-4]。目前, 由 3-氯苯丙酮不对称还原制备 (S)-3-氯苯丙醇的方法主要有化学催化法和生物催化法两种, 与前者相比, 生物催化法具有以下优势: 反应条件比较温和、立体选择性高、反应效率高等^[5]。因此, 利用生物催化 3-氯苯丙酮不对称还原为 (S)-3-氯苯丙

醇具有十分重要的意义。

迄今,国内外有关生物催化法制备(S)-3-氯苯丙醇的研究报道不多,且结果均不太理想。用微生物细胞催化 3-氯苯丙酮还原的报道最早见于 1992 年,伊藤美智夫等人^[6-7]采用多种微生物细胞催化 3-氯苯丙酮的还原,所得产物的构型均为 S 型,最高对映体过剩值(产物 *e.e.*)可达 99.0%以上,但产率甚低,仅为 3.9%。其后,欧志敏^[8]等从 20 株酵母菌中筛选出了两种能高选择性地催化 3-氯苯丙酮不对称还原成 3-氯苯丙醇的菌株 *Saccharomyces cerevisiae* B₅ 和 *Candida utilis*104,但其产物构型均是 R 型。Yang^[9-10]等利用经过热处理的固定化 *Candida utilis* 和固定化 *Saccharomyces cerevisiae* CGMCC 2266 细胞催化 3-氯苯丙酮的还原,所得产物均为 S 型。通过三次分批添加底物,在 1 g/L(约 6.0 mmol/L)的底物浓度下产物 *e.e.* 值可达 99.0%,但产物终浓度仅为 0.85 g/L 左右,且反应时间为 48 h 以上。

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^[11]。此外,该菌株亦能高效、高选择性地催化 3-氯苯丙酮不对称还原成(S)-3-氯苯丙醇,且获得较高的产率及产物的 *e.e.* 值。研究表明,与游离酶相比,采用微生物全细胞作为催化剂不需要进一步纯化酶以及添加昂贵的辅酶^[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];除此之外,固定化细胞在一定程度上可重复使用,易与反应介质分离,进而可降低生产成本,简化生产工艺。因此,本论文研究了水相体系中固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原生成(S)-3-氯苯丙醇的反应特性,并系统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(S)-3-氯苯丙醇的生物催化反应体系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

醋酸杆菌 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 是本课题组从“中华开菲尔菌粒(China kefir)”中分离纯化得到的微生物菌种,保存于华南理工大学应用生物催化研究室;巴氏醋杆菌 *Acetobacter pasteurianus* 购自广东省微生物研究所;三角酵母 *Trigonopsis variabilis* AS2.1611 购自中国普通微生物菌种保藏中心;面包酵

母 *Sigma baker's yeast* 购自上海 Sigma-Aldrich 公司;近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis* CCTCCM203011 来源于江南大学,由徐岩教授赠送;红酵母 *Rhodotorula* sp. AS2.2241 由华东理工大学许建和教授赠送;其余微生物菌株来自广州华南理工大学生物科学与工程学院微生物菌种保藏中心;3-氯苯丙酮(3-chloropropiophenone,纯度为 96%)、正十四烷(纯度大于 99%)和(R)-3-氯苯丙醇((R)-3-chloro-1-phenyl propanol,纯度为 98%)购买于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司。(S)-3-氯苯丙醇((S)-3-chloro-1-phenylpropanol,纯度为 98%)购买于 J&K 百灵威试剂公司。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, 20% Permethylated β-Cyclodextrin, 美国惠普公司)。

1.2 试验方法

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

Acetobacter sp. CCTCC M209061 (醋酸杆菌)的培养如下:

培养基:大豆蛋白胨 65 g/L,果糖 2.5 g/L,葡萄糖 8.6 g/L,硫酸锰 0.09 g/L, pH 为 5.7

种子培养:以 10%的接种量接种于 90 mL 已灭菌的液体培养基中并置于气浴恒温振荡器中,在 30 ℃、80 r/min 下培养 24 h 即可得一级种子。24 h 后同样的条件重新接种于另一瓶新鲜的液体培养基中,继续培养 24 h 可得二级种子。

扩大培养:二级种子液以 10%的接种量接种于 90 mL 已灭菌的液体培养基中,在 30 ℃、80 r/min 下培养 30~36 h,收集菌体备用。

取一定量的游离细胞,将其均匀分散于含 8%(m/V)聚乙烯醇以及 1%(m/V)海藻酸钠的混合载体溶液中,形成均一的混合溶液;接着通过注射器将这均匀的混合溶液滴加入含饱和硼酸以及 2%氯化钙的混合溶液中,边滴加边搅拌并且浸泡 30 min;然后将所得的固定化颗粒转移至 0.5 mol/L 的硫酸钠溶液中继续浸泡 90 min;过滤收集固定化颗粒,固定化细胞中含 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的量约为 6.25%(m/m)。将所得固定化颗粒用去离子水洗 3 次,最后置于 TEA-HCl 缓冲液(含 0.05% (m/V) CaCl₂, 100.0 mmol/L, pH 5.0)中保存,冷藏(4 ℃)备用。

1.2.2 不同微生物菌株催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应

在 14 个 25 mL 的具塞三角瓶中分别加入 5 mL 含

3.0 mmol/L 的 3-氯苯丙酮、3%(m/V) DMSO(作底物的助溶剂)、50.0 mmol/L 葡萄糖的 TEA-HCl 缓冲液(100.0 mmol/L, pH 5.0)并置于恒温气浴振荡器中(30 °C, 180 r/min), 然后向各具塞三角瓶中分别添加细胞湿重为 0.05 g/mL 的不同微生物游离细胞(面包酵母 *Sigma baker's yeast*、红酵母 *Rhodotorula sp. AS2.2241*、三角酵母 *Trigonopsis variabilis AS2.1611*、热带假丝酵母 *Candida tropicalis CICC1316*、油脂酵母 *Lipomyces*、近平滑假丝酵母 *Candida Parapsilosis CCTCCM 203011*、皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum*、发酵性丝孢酵母 *Trichosporon rmentans*、浅黄金色单胞菌 *Chryseomonas luteola*、醋酸杆菌 *Acetobacter sp. CCTCC M209061*、巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*、巴氏醋杆菌 *Acetobacter pasteurianus GIM1.158*、蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*、产碱杆菌 *Alcaligenes*)开始反应, 反应过程中定时取样 50 μ L, 用 50 μ L 含 5.0 mmol/L 内标物(正十四烷)的乙酸乙酯萃取产物和残留底物, 离心 10 min(10,000 r/min)后取上清液, 供 GC 分析。

1.2.3 游离和固定化 *Acetobacter sp. CCTCC M209061* 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原之比较

在 2 个 25 mL 的具塞三角瓶中分别加入 5 mL 含 3.0 mmol/L 的 3-氯苯丙酮、3%(m/V) DMSO(作底物的助溶剂)、50.0 mmol/L 的葡萄糖的 TEA-HCl 缓冲液(100.0 mmol/L, pH 5.0)并置于恒温气浴振荡器中(30 °C, 180 r/min), 然后向各具塞三角瓶中分别添加 0.05 g/mL 游离细胞或 0.80 g/mL 固定化细胞(细胞湿重 0.05 g/mL)开始反应, 反应过程中定时取样 50 μ L, 用 50 μ L 含 5.0 mmol/L 内标物(正十四烷)的乙酸乙酯萃取产物和残留底物, 离心 10 min(10,000 r/min)后取上清液, 供 GC 分析。

1.2.4 游离和固定化 *Acetobacter sp. CCTCC M209061* 细胞的稳定性比较

热稳定性: 在 15 个 25 mL 的具塞三角瓶中分别加入 10 mL 含 0.025 g/mL 游离细胞或者 0.40 g/mL 固定化细胞(细胞湿重 0.025 g/mL)的 TEA-HCl 缓冲液(100.0 mmol/L, pH 5.0)。然后分成三组并且每组分别置于 30 °C、40 °C 和 45 °C 的气浴恒温振荡器中进行孵育。在此过程中定时取 0.25 g 游离细胞或 4.0 g 固定化细胞(细胞湿重 0.25 g)并且降温至 30 °C, 然后测其相对活性。

pH 稳定性: 在 15 个 25 mL 的具塞三角瓶中分别加入 0.25 g 游离细胞或者 4.0 g 固定化细胞(细胞湿重 0.25 g), 并分成三组, 每组分别加入 10 mL pH 为 3.0,

5.0 以及 7.0 的 TEA-HCl 缓冲液(100.0 mmol/L), 然后于 30 °C 下进行孵育。在此过程中定时取 0.25 g 游离细胞或者 4.0 g 固定化细胞(细胞湿重 0.25 g)并且采用 TEA-HCl 缓冲液(100.0 mmol/L, pH 5.0)洗涤后, 测其相对活性。

操作稳定性: 在 25 mL 的具塞三角瓶中分别加入 5 mL 含 3.0 mmol/L 的 3-氯苯丙酮、3%(m/V) DMSO(作底物的助溶剂)、50.0 mmol/L 的葡萄糖的 TEA-HCl 缓冲液(100.0 mmol/L, pH 5.0)并置于恒温气浴振荡器中(30 °C, 180 r/min), 然后向各具塞三角瓶中分别添加 0.05 g/mL 游离细胞或 0.80 g/mL 固定化细胞(细胞湿重 0.05 g/mL)开始反应。游离细胞每批次的反应时间为 6.0 h, 6.0 h 后离心出游离细胞(4 °C, 10000 r/min, 6 min)并用 pH 为 5.0 的缓冲液洗涤三次, 然后加入 5 mL 含 3.0 mmol/L 的 3-氯苯丙酮(3%的 DMSO)、50.0 mmol/L 的葡萄糖的 TEA-HCl 缓冲液(100.0 mmol/L, pH 5.0)进行反应, 再次离心出游离细胞, 依此方法操作 5 个批次(每批次为 6.0 h)。而固定化细胞每批次的反应时间为 10.0 h, 10.0 h 后经过滤分离且用 pH 为 5.0 的缓冲液洗涤三次之后重复利用, 其他反应条件与游离细胞一致。

1.2.5 水相中固定化 *Acetobacter sp. CCTCC M209061* 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的条件优化

单因素试验优化反应条件。基本反应条件为: 不同辅底物、辅底物浓度、缓冲液 pH 值、反应温度、产物浓度、底物浓度。改变其中一个条件, 固定其他条件, 研究辅底物、辅底物浓度、缓冲液 pH 值、反应温度、产物浓度、底物浓度对水相中 3-氯苯丙酮不对称还原反应的影响。各因素的变化范围如下: 不同辅底物(无、乙醇、异丙醇、甘油、葡萄糖、果糖), 不同辅底物浓度 30.0~80.0 mmol/L, pH 值 3.0~7.0, 温度 25~45 °C, 产物浓度 0.00~1.25 mmol/L, 底物浓度 1.0~5.0 mmol/L。

1.2.6 气相色谱(GC)分析

GC 分析条件: 汽化室温度 250 °C, 检测室温度 250 °C, 色谱柱温度 140 °C; 载气为氮气, 流速、分流比、进样量分别为 1.56 mL/min、30:1、1 μ L。在该分析条件下, 内标正十四烷, 3-氯苯丙酮, (R)-3-氯苯丙醇和(S)-3-氯苯丙醇的保留时间分别为 4.92, 16.11, 26.42 和 27.21 min。每个样品平行三次, 取平均值。最大相对误差小于 2.0%。

1.2.7 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(S)-3-氯苯丙醇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 3-氯苯丙醇的两种对映体的

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 3-氯苯丙醇的摩尔浓度(mmol/L), t 表示反应时间。

2 结果与讨论

2.1 水相中不同微生物菌株催化 3-氯苯丙酮

不对称还原反应

表 1 水相体系中不同微生物菌株催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应

Table 1 Biocatalytic asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone by different microbial strains in monophasic aqueous system

Entries	Strains	Initial reaction rate/(mM/h)	Time/h	Yield/% ^a	Config	e.e./% ^b
1	<i>Sigma baker's yeast</i>	0.28±0.01	12.0	32.10±0.18	S	90.50±1.44
2	<i>Rhodotorula sp.</i> AS2.2241	n.r.	12.0	n.r.	n.r.	n.r.
3	<i>Trigonopsis variabilis</i> AS2.1611	0.37±0.01	10.0	16.70±0.26	S	93.30±1.81
4	<i>Candia tropicalis</i> CICC1316	n.r.	12.0	n.r.	n.r.	n.r.
5	<i>Candida parapsilosis</i> CCTCCM203011	0.44±0.01	12.0	45.20±0.72	S	77.20±1.15
6	<i>Lipomyces</i>	n.r.	12.0	n.r.	n.r.	n.r.
7	<i>Trichosporon cutaneum</i>	n.r.	12.0	n.r.	n.r.	n.r.
8	<i>Trichosporon rmentans</i>	n.r.	12.0	n.r.	n.r.	n.r.
9	<i>Chryseomonas luteola</i>	n.r.	12.0	n.r.	n.r.	n.r.
10	<i>Acetobacter sp.</i> CCTCC M209061	3.85±0.03	6.0	83.90±0.59	S	>99.0
11	<i>Acetobacter pasteurianus</i> GIM1.158	0.59±0.01	4.0	28.00±0.44	S	74.60±0.59
12	<i>Bacillus megaterium</i>	n.r.	12.0	n.r.	n.r.	n.r.
13	<i>Bacillus cereus</i>	n.r.	12.0	n.r.	n.r.	n.r.
14	<i>Alcaligenes</i>	n.r.	12.0	n.r.	n.r.	n.r.

注: ^a The maximum yield. ^b The product e.e.. n.r.: no reaction.

本文首先从 14 株供试微生物菌株中进行筛选, 以期获得能高效催化 3-氯苯丙酮不对称还原制备(S)-3-氯苯丙醇的菌株。由表 1 可知, 仅有 5 株微生物菌株可以催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应, 即面包酵母 *Sigma baker's yeast*、三角酵母 *Trigonopsis variabilis* AS2.1611、近平滑假丝酵母 *Candida Parapsilosis* CCTCCM 203011、醋酸杆菌 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061、巴氏醋杆菌 *Acetobacter pasteurianus* GIM1.158, 且所得产物的构型均为 S 型。但是这 5 种微生物菌株催化反应的产率较低, 产物 e.e. 值不理想。而醋酸杆菌 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的效果最佳, 其反应初速度为 3.85 mM/h, 产率为 83.9%, 产物 e.e. 值高达 99.0% 以上。因此, 在本研究中选用醋酸杆菌 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 作为制备(S)-3-氯苯丙醇的生物催化剂。

2.2 游离和固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC

M209061 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原之比较

由图 1 可知, 游离与固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞二者均能高选择性地催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应, 产物 e.e. 值均为 99.0% 以上。但是游离细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的初速度要大于固定化细胞(3.85 mM/h vs 1.63 mM/h), 且达到反应平衡时所需要的时间明显要短于固定化细胞(6.0 h vs 10.0 h)。其原因可能是细胞经固定化后, 底物、产物的传质阻力增大。考虑到固定化细胞的稳定性(热稳定性、pH 稳定性及操作稳定性)均明显优于游离细胞, 且其催化 3-氯苯丙酮不对称还原成(S)-3-氯苯丙醇的产率与游离细胞相当(82.9% vs 83.9%), 产物的 e.e. 值为 99.0% 以上, 故选用固定化 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 细胞作为制备(S)-3-氯苯丙醇的生物催化剂。

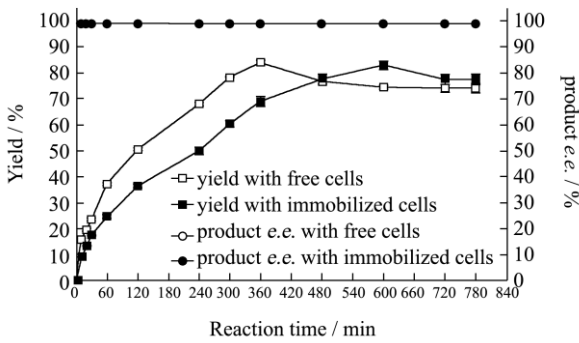


图1 游离与固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的比较

Fig.1 Comparison of asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone between free and immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

2.3 游离和固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的稳定性比较

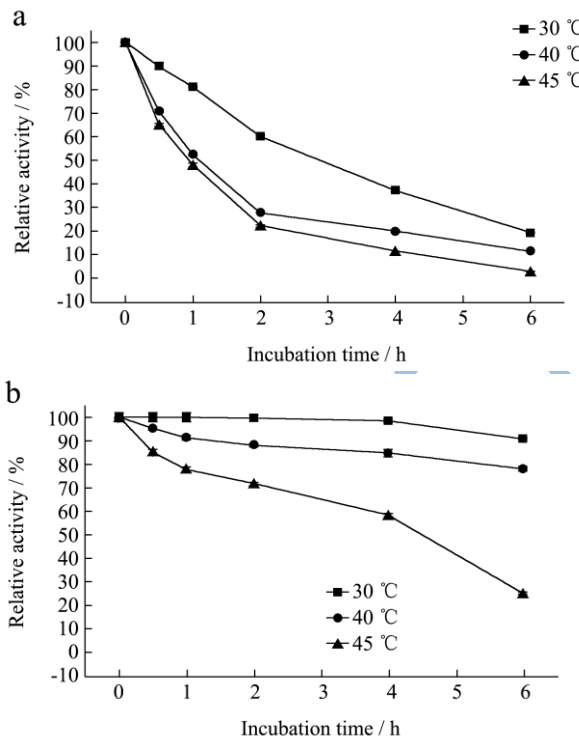


图2 游离(a)和固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞 (b)的热稳定性的比较

Fig.2 Comparison of thermal stability between free (a) and immobilized (b) *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

首先对比研究了游离细胞与固定化细胞的热稳定性。由图2 A、B可知，在30 °C下孵育6.0 h后，游离细胞的相对活性低于20.0%，而固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的相对活性大于90.0%；在40 °C下孵育4.0 h后，前者的相对活性仅

剩20.0%，而后的相对活性为80.0%以上；继续延长孵育时间至6.0 h，固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的相对活性为游离细胞的680%。在45 °C下孵育后，两者的相对活性区别更明显。可见 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞固定化后热稳定性得到了有效提高。

游离和固定化细胞的pH稳定性如图3a、b所示，在pH为5.0的缓冲液中孵育6.0 h后，固定化细胞保留了90.0%以上的初始活性，而游离 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞仅残存38.2%的活性；在pH为3.0或7.0的缓冲液中孵育6.0 h，游离细胞活性的损失更明显，仅残留20%的活性，而相同条件下固定化细胞的活力损失低于50%。由此可见，固定化提高了 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞对pH的耐受性。

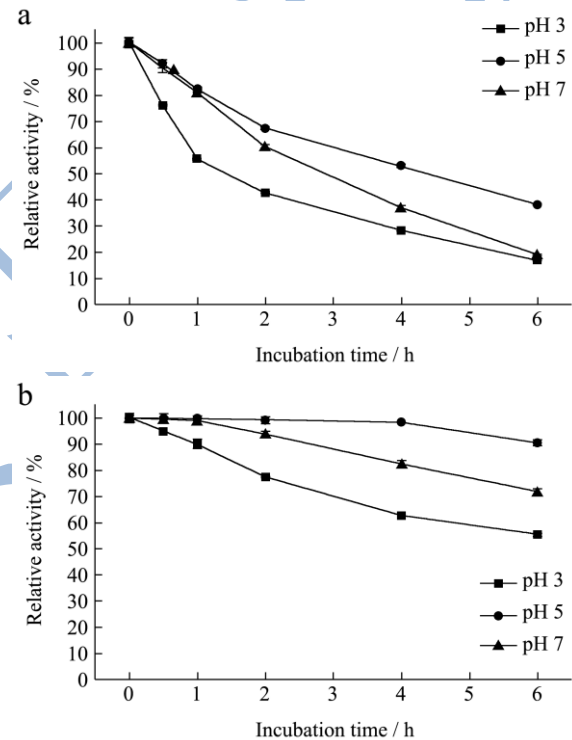


图3 游离(a)和固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞 (b)的pH稳定性的比较

Fig.3 Comparison of pH stability between free (a) and immobilized (b) *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

随后，考察了游离和固定化细胞的操作稳定性。如图4所示，连续反应3个批次(游离与固定化细胞每批次时间分别为6.0 h和10.0 h)，固定化细胞仍保留了80.0%以上的活性，而游离细胞的相对活性仅为18.3%；继续增加反应批次至5批，游离细胞的活性很低，几乎不能催化3-氯苯丙酮不对称还原反应的发生，但相应的固定化细胞的相对活性大于50.0%。显然，固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的操作

作稳定性高于游离细胞。另一方面,产物的 *e.e.*值不受细胞重复使用批次的影响。

以上结果表明, *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞经聚乙烯醇与海藻酸钠的混合载体固定化后,其稳定性(热稳定性、pH 稳定性、操作稳定性)得到了明显提高。因此,本研究采用固定化细胞作为该反应的生物催化剂。

2.4 不同辅底物对反应的影响

由表 2 可知,当不添加辅底物时,几乎检测不到反应体系中有产物的存在;以乙醇、异丙醇及甘油作为辅底物时,反应初速度和最大产率均较低;采用葡萄糖以及果糖作为辅底物时,产率明显提高。考虑到果糖作为辅底物时反应初速度较低、反应时间较长,

表 2 不同辅底物对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的影响

Table 2 The effect of different co-substrates on the biocatalytic asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

Co-substrates	Initial reaction rate/(mM/h)	Time/h	Yield/% ^a	<i>e.e.</i> / % ^b
No co-substrate	n.r.	-	n.r.	-
Ethanol	0.06±0.00	12.0	1.90±0.03	>99.0
Isopropanol	0.21±0.01	12.0	5.00±0.02	>99.0
Glycerin	0.05±0.00	12.0	2.40±0.01	>99.0
Glucose	1.63±0.02	10.0	82.90±1.07	>99.0
Fructose	0.11±0.00	12.0	67.30±0.11	>99.0

2.5 辅底物浓度对反应的影响

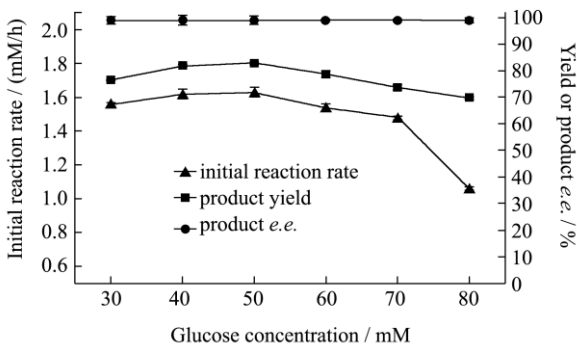


图 5 葡萄糖浓度对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的影响

Fig.5 Effect of the co-substrate concentrations on asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

图 5 表明随着辅底物浓度的增大,反应初速度以及产率也增大并且在辅底物浓度为 50.0 mmol/L 时达到最大(最大产率为 82.9%),进一步增大辅底物浓度(50.0 mmol/L~80.0 mmol/L)相反会导致反应初速度以及产率呈现不利的趋势即开始下降。而在所研究的葡

萄糖作为该不对称还原反应的辅底物。

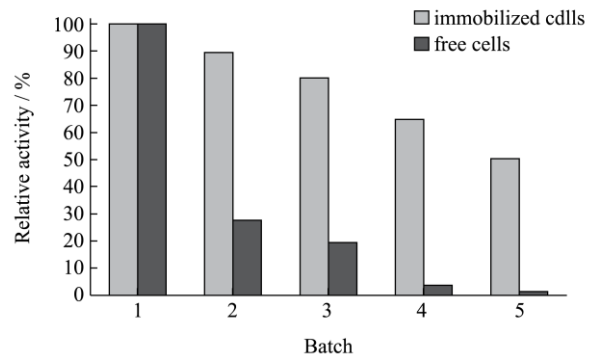


图 4 游离和固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞的操作稳定性的比较

Fig.4 Comparison of operational stability between free and immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

萄糖浓度范围内,产物的 *e.e.*值均没有什么变化。因此最适的辅底物浓度为 50.0 mmol/L。

2.6 缓冲液 pH 值对反应的影响

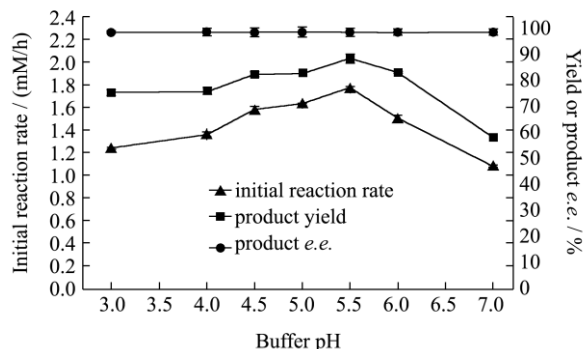


图 6 缓冲液 pH 对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的影响

Fig.6 Effect of buffer pH on asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

缓冲液 pH 对生物催化不对称还原反应有显著影响,一方面,缓冲液 pH 影响细胞膜上载体蛋白、底物以及产物分子的解离状态,从而影响底物分子与酶

的结合；另一方面，缓冲液 pH 值通过影响酶的构象影响酶反应的初速度、产率以及反应的选择性等。如图 6 所示，随着 pH 值由 3.0 增大至 5.5，反应初速度与产率呈逐渐上升的趋势，且在 pH 为 5.5 时达到最大产率 88.9%。进一步增大 pH 值则导致反应初速度与产率急剧下降。在所研究的 pH 值范围内，产物的 *e.e.* 值均大于 99.0%。综合考虑反应初速度以及最大产率，选择 pH 为 5.5 的 TEA-HCl 缓冲液作为反应介质。

2.7 反应温度对反应的影响

图 7 表明，温度由 25 °C 上升到 30 °C 时，初速度由 1.21 mM/h 增大至 1.77 mM/h，产率由 82.9% 增大为 88.9%，且在此过程中未见产物 *e.e.* 值的变化。当温度由 30 °C 继续上升至 45 °C 时，无论是反应初速度还是产率均有所下降，其原因可能是温度高于 30 °C 时，参与催化反应的酶开始变性失活。因此，该反应的最适温度为 30 °C。

2.8 产物浓度对反应的影响

表 3 外加产物对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的影响

Table 3 The effect of appended products on the biocatalytic asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

Addition of product/(mmol/L)	Initial reaction rate/(mM/h)	Time/h	Yield/% ^a	<i>e.e.</i> /% ^b
0.00	1.77±0.03	10.0	88.90±0.54	>99.0
0.25	1.46±0.01	10.0	87.70±0.91	>99.0
0.50	1.35±0.02	10.0	84.00±0.32	>99.0
0.75	1.11±0.01	10.0	83.20±0.72	>99.0
1.00	1.02±0.01	10.0	74.10±0.82	>99.0
1.25	0.95±0.01	10.0	71.00±1.03	>99.0

表 4 水相体系中底物浓度对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的影响

Table 4 The effect of substrate concentrations on the biocatalytic asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

Substrate concentration/(mmol/L)	Initial reaction rate/(mM/h)	Time/h	Yield/% ^a	<i>e.e.</i> /% ^b
1.0	0.97±0.01	8.0	91.00±0.72	>99.0
2.0	1.35±0.01	10.0	90.70±1.03	>99.0
3.0	1.77±0.02	10.0	88.90±1.76	>99.0
4.0	1.74±0.01	10.0	87.10±0.96	>99.0
5.0	1.56±0.01	10.0	80.60±1.05	>99.0

2.9 底物浓度对反应的影响

由表 4 可知，当 3-氯苯丙酮的浓度由 1.0 mmol/L 增大至 3.0 mmol/L 时，反应初速度由 0.97 mM/h 增大至 1.77 mM/h，这说明在此范围内不存在底物抑制现象；继续增大底物浓度导致反应初速度下降，说明开始出现底物抑制现象。另外，底物浓度的变化不影响

如表 3 所示，在反应体系中添加不同浓度的(S)-3-氯苯丙醇，可发现添加产物会导致反应的初速度以及产率明显下降，且当产物浓度很低(0.25 mmol/L)时，就已出现产物抑制现象。另一方面，添加产物不影响产物的 *e.e.* 值。

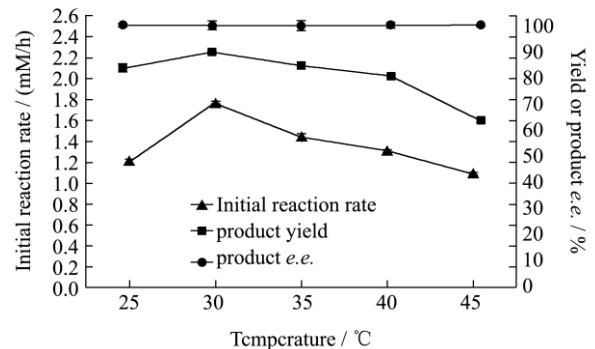


图 7 反应温度对固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞催化 3-氯苯丙酮不对称还原反应的影响

Fig.7 Effect of reaction temperature on asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone with immobilized *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells

产物 3-氯苯丙醇的 *e.e.* 值，在所研究的范围内，3-氯苯丙醇的 *e.e.* 值一直保持在 99% 以上。因此水相体系中该反应最适合的底物浓度为 3.0 mmol/L。

3 结论

在水相体系中，*Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞能够高选择性地催化 3-氯苯丙酮不对称还原生成

3-氯苯丙醇。相比游离细胞,经聚乙烯醇与海藻酸钠的混合载体固定化后,固定化 *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 细胞呈现出较高的热稳定性、pH 稳定性以及操作稳定性。在最优反应条件下,获得产率以及产物 *e.e.* 值分别为 88.9% 和 99.0% 以上。由此可见,该固定化细胞有催化 3-氯苯丙酮不对称还原生成 3-氯苯丙醇的潜力,并有望进一步用于手性药物中间体 3-氯苯丙醇的工业化制备。

参考文献

- [1] Chumpradit S, Kung M P, Panyachotipun C, et al. Iodinated Tomoxetine Derivatives as Selective Ligands for Serotonin and Norepinephrine Uptake Sites[J]. *J. Med. Chem.*, 1992, 35 (23): 4492-4497
- [2] Fronza G, Fuganti C, Grasselli P, et al. The mode of Baker's yeast transformation of 3-chloropropiophenone and related ketones. Synthesis of (2*S*)-[2-2H] propiophenone, (R)-fluoxetine, and (R)- and (S)-fenfluramine[J]. *J. Org. Chem.*, 1991, 56: 6019-6023
- [3] Schneider M P, Goergens U. An efficient route to enantiomerically pure antidepressants: tomoxetine, nisoxetine and fluoxetine [J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 1992, 3: 525-528
- [4] Corey E J, Reichard G. Enantioselective and practical syntheses of R- and S-fluoxetines [J]. *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30: 5207-5210
- [5] 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
- [6] M, I.Y, Kobayashi. JP: Patent 04, 234989, 1992
- [7] M, I.Y, Kobayashi. JP: Patent 04, 316489, 1992
- [8] 欧志敏.微生物法还原羰基化合物制备手性药物中间体的研究[D].浙江:浙江大学生物工程研究所, 2003
- [9] OU Zhi-Min. Study on Preparation of Chiral Pharmaceutical Intermediates by Asymmetric Reduction of Carbonyl Compounds with Yeast Cells [D]. Zhejiang Province : Biological Engineering Research Institute of Zhejiang University, 2003
- [9] Yang G S, Ou Z M, Yao S J, et al. Asymmetric reduction of (S)-3-chloro-1-phenyl-propanol from 3-chloropropiophenone by preheated immobilized *Candida utilis* [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2009, 31:1879-1883
- [10] Yang G S, Ou Z M, Yao S J, et al. Asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone to (S)-3-chloro-1-phenylpropanol using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* CGMCC 2266 cells [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 2009, 57:83-88
- [11] Xiao Z J, Zong M H, Lou W Y, et al. Highly enantioselective reduction of 4-(trimethylsilyl)-3-butyne-2-one to enantiopure (R)-4-(trimethylsilyl)-3-butyne-2-ol using a novel strain *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100, 5560-5565
- [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
- [12] 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.