

微生物短杆菌(*Brevibacterium* sp.)选择性降解制备(R)-扁桃酸

张辉, 徐岩

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:以外消旋扁桃酸为底物, 筛选出一株短杆菌 *Brevibacterium* sp. CCSYU 10011, 该菌能转化外消旋扁桃酸为(R)-扁桃酸. 用全细胞转化法研究发现, 其转化过程是不对称降解过程, 即选择性降解了(S)-扁桃酸, 进而获得(R)-扁桃酸. 考察了温度、pH、底物浓度及细胞量等因素对(S)-扁桃酸降解的影响, 转化结束后, 收率为 48.7%, 对映体过量值(e.e.) 可达 99%.

关键词: (R)-扁桃酸; 不对称降解; 全细胞转化; *Brevibacterium* sp.

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2006)05-0818-04

1 前言

(R)-扁桃酸(α -羟基苯乙酸, Mandelic acid)是一种重要的手性中间体, 被广泛应用于多种药物的合成, 如半合成青霉素和头孢菌素等抗生素^[1,2]、减肥药物^[3]、抗肿瘤药物^[4]及其他药物^[5,6]. 由于其应用非常广泛、市场需求量大, 国内外已有许多学者尝试了各种途径来制备, 包括色谱法、化学法和生物法等. 其中, 制备手性色谱柱进行拆分^[7]分离效果较好, 但仅限于检测及实验室制备. 化学工业上主要是利用手性拆分剂拆分扁桃酸消旋体^[8], 但手性拆分剂价格昂贵, 并有一定毒性. 生物法制备光学纯扁桃酸成为国际上研究的热点^[9-17].

目前国际上已报道的制备(R)-扁桃酸的生物方法主要有不对称水解扁桃酸的衍生物^[9,10]、不对称氧化 1,2-苯乙二醇^[11]、脂肪酶动力学拆分消旋体扁桃酸^[12]、不对称还原苯甲酰甲酸^[13-15]、双菌去消旋制备^[16,17]等. 然而, 以上方法还存在一定不足, 如产品光学纯度低、收率低、底物价格昂贵、需要辅酶再生、后提取工艺复杂等, 影响了(R)-扁桃酸大规模生产. 随着化学工业的发展, 消旋体扁桃酸的生产技术已日趋成熟^[18], 其生产成本也在不断下降. 因此, 本研究拟从实验室保藏菌种中筛选出一株特异性的微生物, 在无需辅助底物的条件下, 利用微生物全细胞直接转化外消旋扁桃酸, 获得较高光学纯度和收率的(R)-扁桃酸, 简化产品的分离过程, 为低成本制备(R)-扁桃酸进行有益的探索.

2 材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌种及试剂

所用菌种均为工业生物技术教育部重点实验室保藏. (R)-和(S)-扁桃酸及苯甲酰甲酸标样购自 Sigma 公司, 外消旋扁桃酸购于国药集团化学试剂公司, 其余化学试剂均为市售色谱纯和分析纯.

2.1.2 筛选培养基

细菌培养基成分(%): 葡萄糖 0.5, 肉膏 1, 蛋白胨 1, 酵母膏 0.2, 无机盐溶液 5(ϕ); pH 7.0.

酵母培养基成分(%): 葡萄糖 4, 酵母膏 0.3, 无机盐溶液 10(ϕ); pH 7.0.

霉菌培养基成分(%): 葡萄糖 2, 肉膏 0.5, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.3, 无机盐溶液 5(ϕ); pH 7.0.

无机盐溶液成分(%): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 13, KH_2PO_4 7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8, NaCl 0.1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.09, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01.

2.2 实验方法

2.2.1 菌种培养方法

从菌种斜面接种一环菌体至培养基装液量为 10% 的 250 mL 三角瓶中, 在 30 °C 下 150 r/min 振荡培养 48 h, 将菌体离心并用生理盐水洗涤, 收集细胞用于转化.

2.2.2 转化方法

在 2 mL 含 30 mmol/L 外消旋扁桃酸的 0.2 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中加入 1.0 g/L(细胞干重 40 mg)菌体细胞, 30 °C 下 200 r/min 转化 48 h, 离心去除菌体, 收集上清, 用 3 mol/L 盐酸调节 pH 至 1.0, 再加入 2.5 倍体积的乙酸乙酯萃取, 低温真空干燥. 将残余固体用正己烷和异丙醇的混合液(体积比 9:1)溶解, 高效液相检测.

2.2.3 反应产物光学纯度和转化率的测定

样品用高效液相色谱仪(HP1100)进行分析, 具体条件如下: 手性柱 Chiralcel OD-H 柱(4.6 mm \times 250 mm,

收稿日期: 2005-12-26, 修回日期: 2006-03-24

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2003CB716008); 新世纪优秀人才支持计划资助项目; 长江学者和创新团队发展计划资助项目(编号: IRT0532)

作者简介: 张辉(1980-), 男, 江苏省扬州市人, 硕士研究生, 发酵工程专业; 徐岩, 通讯联系人, E-mail: yxu@sytu.edu.cn.

Daicel Co., Ltd., Japan), 流动相为正己烷:异丙醇:三氟乙酸=90:10:0.1, 检测波长 UV 225 nm, 流速为 0.5 mL/min, 柱温 18 °C, (*S*)-扁桃酸和(*R*)-扁桃酸的保留时间分别为 15.9 和 19.6 min. 产物(*R*)-扁桃酸的光学纯度通过对映体过量值(e.e., %)来评价:

$$\text{对映体过量值(e.e., \%)} = [(S_S - S_R) / (S_S + S_R)] \times 100\%$$

$$(R)\text{-扁桃酸得率(\%)} = (S_R / S_0) \times 100\%$$

式中 S_S , S_R 为反应后(*S*)-和(*R*)-对映体的峰面积, S_0 为反应前(*S*)-和(*R*)-对映体的峰面积之和.

3 结果与讨论

3.1 合成(*R*)-扁桃酸的菌种筛选

对本实验室保藏的细菌、酵母和霉菌等微生物进行了筛选, 不同菌种转化外消旋扁桃酸所得产物的光学纯度和产率分布如图 1 所示. 从结果可以看出, 部分菌种能将外消旋的扁桃酸转化成单一对映体扁桃酸, (*R*)-和(*S*)-对映体均有, 并能获得较高的光学纯度和收率. 另外, 不同菌种转化外消旋扁桃酸得到(*R*)-扁桃酸的能力也不尽相同, 表明不同微生物在不对称转化手性化合物方面具有生物多样性.

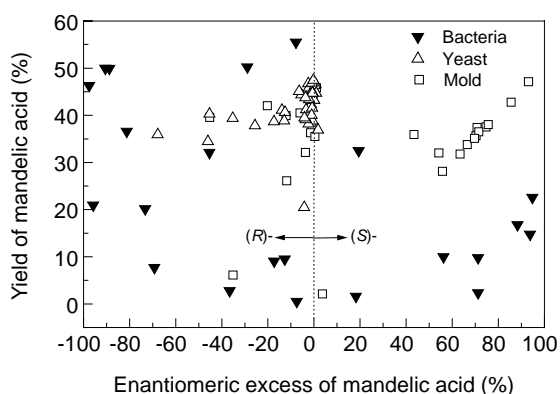


图 1 筛选结果

Fig.1 Result of screening to yeast, mold and bacteria

通过筛选得到能转化外消旋扁桃酸为(*R*)-扁桃酸的部分菌株, 见表 1. 从表可以看出, 具有选择性转化外消旋扁桃酸为(*R*)-扁桃酸能力的菌株均为细菌, 尤其是 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 具有更高的光学选择性和转化能力, 故最终选定其作为研究对象.

表 1 外消旋扁桃酸经微生物转化为(*R*)-扁桃酸

Table 1 (*R*)-mandelic acid production from racemate by microbacteria

Microbacterium	e.e. (%)	Yield (%)
<i>Brevibacterium</i> sp. CCSYU10011	97.5	46.3
<i>Brevibacterium lactosus</i> CCSYU10016	88.8	49.9
<i>Brevibacterium flavum</i> CCSYU10018	81.2	36.6
<i>Micrococcus</i> sp. CCSYU10019	95.8	21.0
<i>Proteus rettgeri</i> CCSYU10020	90.5	50.0

3.2 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 制备(*R*)-扁桃酸的反应途径

以相同初始条件开始转化, 定时取样测定, 获得 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 转化过程曲线. 从图 2 可以看出, (*S*)-扁桃酸浓度从转化开始后便不断下降, 直至消耗完, 而(*R*)-扁桃酸浓度却基本保持不变. e.e.值和(*R*)-扁桃酸变化情况也与此对应, e.e.值一直在升高, 最终可大于 99%, (*R*)-扁桃酸得率一直维持在 50%左右. 因此可以推测 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 转化外消旋扁桃酸获得(*R*)-扁桃酸是一个选择性降解的过程, 即菌体本身的酶系优先降解了(*S*)-型对映体. 在转化过程中, 利用液相色谱分析法^[19]对中间体进行了考察, 在转化液中检测到了 2 个中间体苯甲酰甲酸和苯甲酸, 苯甲酰甲酸在 24 h 累积到最高, 随后急剧下降, 而苯甲酸一直维持在较低的浓度, 在 48 h 时这两种物质已几乎完全降解(数据未列出). 由此推测 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 代谢扁桃酸的过程可能是(*S*)-扁桃酸经脱氢氧化为苯甲酰甲酸, 再经脱羧氧化为苯甲酸, 最后被完全降解. 这与 Shimao 等^[19]报道的 *Pseudomonas putida* 代谢扁桃酸的途径相似, 但 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 最终可完全降解(*S*)-扁桃酸, 而对(*R*)-扁桃酸作用不明显, 可见其并不含有消旋酶, 这又呈现出了生物的多样性. 具体酶系的作用机理将在后续工作中进行深入研究. 本工作主要考察了环境因素对该菌降解(*S*)-对映体的影响.

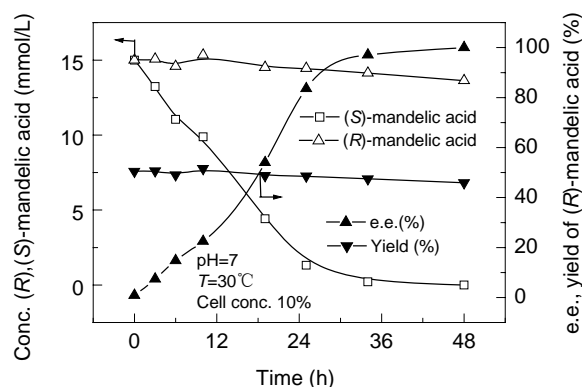


图 2 *Brevibacterium* sp. 合成(*R*)-扁桃酸的过程

Fig.2 Process of (*R*)-mandelic acid production from racemate by *Brevibacterium* sp. CCSYU10011

3.3 温度对 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 不对称降解(*S*)-扁桃酸的影响

温度对酶催化转化反应的影响有两个方面, 一方面随着温度升高, 活化分子增多, 酶反应速度加快, 提高转化速率; 另一方面随着温度升高, 酶蛋白逐步变性失活, 反应速率降低, 转化效率降低.

从图3可以看出,温度对 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 降解(S)-扁桃酸能力的影响较为明显,在35℃时,降解速度最快,在36 h时(S)-扁桃酸残余量不到0.2 mmol/L,而当温度高于或低于35℃时,(S)-扁桃酸的降解速度有所下降,这可能与菌种自身的酶学特性有关,因此选择35℃作为反应最适温度,在48 h时 e.e. 值为99%,(R)-扁桃酸收率为48.7%。

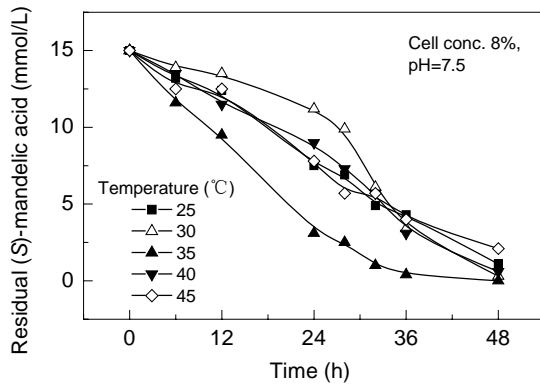


图3 转化温度对(S)-扁桃酸降解的影响

Fig.3 Effect of temperature on degradation of (S)-mandelic acid

3.4 pH 值对 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 不对称降解(S)-扁桃酸的影响

反应体系的pH值不仅影响酶蛋白的构型和酶的稳定性,而且还影响酶的活性中心必需基团的解离状态和底物的解离状态,从而影响酶的立体选择性和催化活性.配制了不同pH值的磷酸缓冲液,定时取样考察反应体系pH对(S)-扁桃酸降解过程的影响.从图4可以看出,当反应体系pH低于7.0时,(S)-扁桃酸的降解速度非常缓慢,在pH 5.5~6.0时几乎没有转化,而pH在7.0~8.5范围内,对转化的影响不明显,均能获得较好的降解效果,可见该菌转化适合在中性及微碱性条件下进行。

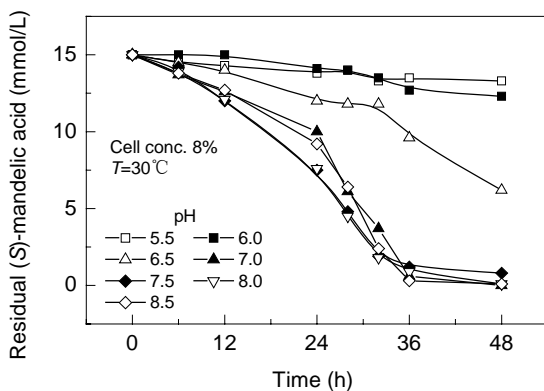


图4 反应体系pH对(S)-扁桃酸降解的影响

Fig.4 Effect of pH on degradation of (S)-mandelic acid

3.5 底物浓度对 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 不对称降解(S)-扁桃酸的影响

考察不同底物浓度对(S)-扁桃酸降解的影响,结果见图5.从图可以看出,在30 mmol/L浓度下,转化36 h后(S)-对映体就几乎完全降解,而随着底物浓度的增加,完全降解(S)-扁桃酸需要的时间增加,尤其底物浓度为120 mmol/L时,初始反应速度明显降低,这可能是因为随着底物浓度增加,酶的活性中心被(S)-扁桃酸分子所饱和,催化速度不能再提高,且底物中的高浓度(R)-对映体可能对转化过程产生了抑制,目前研究阶段采用30 mmol/L的底物浓度。

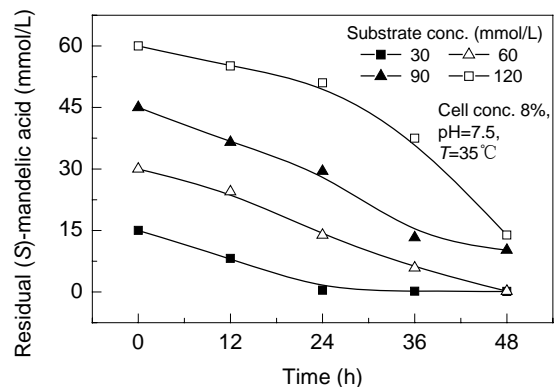


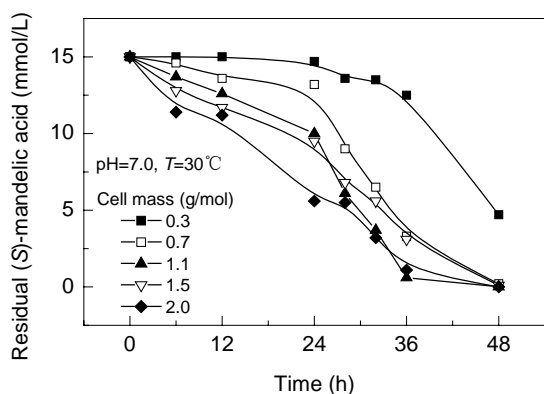
图5 底物浓度对(S)-扁桃酸降解的影响

Fig.5 Effect of substrate concentration on degradation of (S)-mandelic acid

3.6 菌体量对 *Brevibacterium* sp. CCSYU10011 不对称降解(S)-扁桃酸的影响

在利用微生物全细胞转化制备光学纯扁桃酸的过程中,实际起催化作用的是细胞中的酶或酶系,因此体系中的菌体量会直接影响参与反应的酶量,进而影响其催化转化的反应速度以及最终转化效果。

菌体量对反应速度和转化效果的影响具体表现在反应时间和产率上,而相对于一定的底物浓度,菌体量的影响作用可以通过其与底物量的比值来表示.在底物浓度为30 mmol/L时,考察了体系中细胞(干重)/底物量(g/mol)对转化的影响,即在一定反应条件下转化单位摩尔底物需要的菌体量,结果如图6所示.从图可以看出,反应初期随着反应体系中细胞/底物相对量的增加,(S)-扁桃酸降解速度也加快.当反应至36 h,细胞/底物为1.1 g/mol时已能获得较好的降解效果,再增加细胞/底物相对量对转化并无太大提高,因此从高效利用菌体的考虑,在此底物浓度下最适细胞/底物相对量为1.1 g/mol.

图 6 菌体量对(*S*)-扁桃酸降解的影响Fig.6 Effect of cell mass on degradation of (*S*)-mandelic acid

4 结论

以外消旋扁桃酸为底物, 采用静息细胞转化法, 从实验室保藏菌种中筛选出一株短杆菌 *Brevibacterium sp.* CCSYU10011, 能选择性降解(*S*)-扁桃酸, 从而获得(*R*)-扁桃酸. 确定了最优转化条件为: 温度 35℃, pH 7~8, 底物浓度 30 mmol/L, 细胞/底物相对量 1.1 g/mol, 最终产物 e.e.值可达 99%, 收率为 48.7%.

此法最大理论收率为 50%, 与传统动力学拆分^[12]相同, 但该反应无需辅助底物, 以廉价的微生物菌体细胞代替了昂贵的纯酶, 在转化结束后, (*S*)-扁桃酸几乎能完全降解, 且无副产物, 转化液经萃取后蒸干, 即可得到光学纯度较高的(*R*)-扁桃酸, 简化了产品的分离工艺. 由于消旋体扁桃酸在国内已经实现了大规模生产, 价格低廉, 因而利用生物转化法选择性降解消旋体制备光学纯扁桃酸具有一定的竞争优势.

参考文献:

- [1] Furlenmeier A, Quitt P, Vogler K, et al. 6-Acyl Derivatives of Aminopenicillanic Acid [P]. US Pat.: 3957758, 1976-05-18.
- [2] Yoshioka K, Harada S, Ochiai M, et al. Antibiotic Derivatives, Their Production and Use [P]. US Pat.: 4897489, 1990-01-30.
- [3] Ferris M J. Arylethanolamine Derivatives, Their Preparation and Use in Pharmaceutical Compositions [P]. US Pat.: 4588749, 1986-05-13.
- [4] Surivet J P, Vatlè J M. Total Synthesis of Antitumor *Goniothalamus* Styryllactones [J]. *Tetrahedron*, 1999, 55: 13011-13028.
- [5] Mills J, Schmiegel K K, Shaw W N. Phenethanolamines, Compositions Containing the Same, and Method for Effecting Weight Control [P]. US Pat.: 4391826, 1983-07-05.
- [6] Sargent B J, Heal D J, Fernandez M I. Therapeutic Agents [P]. US Pat.: 5753665, 1998-05-19.
- [7] Muto M. Material for Resolution of Optical Isomers, Its Preparation and Use [P]. European Pat.: EP0098707, 1984-01-18.
- [8] Franck J, Takahiko H, Tamizo K. Resolution of (\pm)-Mandelic- and (\pm)-2-(Chlorophenoxy) Propionic Acid Derivatives by Crystallization of Their Diastereomeric Amides with (*R*)- or (*S*)- α -Arylethylamines [J]. *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40: 2509-2512.
- [9] Yadav G D, Sivakumar P. Enzyme-catalysed Optical Resolution of Mandelic Acid via *RS*(\pm)-Methyl Mandelate in Non-aqueous Media [J]. *Biochem. Eng.*, 2004, 19: 101-107.
- [10] Kaul P, Banerjee A, Mayilraj S, et al. Screening for Enantioselective Nitrilases: Kinetic Resolution of Racemic Mandelonitrile to (*R*)-(-)-Mandelic Acid by New Bacterial Isolates [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15: 207-211.
- [11] Oda S, Kikuchi Y, Nanishi Y. Synthesis of Optically Active Mandelic Acid via Microbial Oxidation of Racemic 1-Phenyl-1,2-ethanediol [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992, 56(8): 1216-1220.
- [12] Robert F C, Kevin F, Tord I, et al. Enzymatic Resolution of Substituted Mandelic Acids [J]. *Tetrahedron Lett.*, 2003, 44: 5477-5481.
- [13] Yamazaki Y, Maeda Hidekatsu. Enzymatic Synthesis of Optically Pure (*R*)-(-)-Mandelic Acid and Other 2-Hydroxycarboxylic Acids: Screening for the Enzyme, and Its Purification, Characterization and Use [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1986, 50(10): 2621-2631.
- [14] Vasic-Racki D, Jonas M, Wandrey C, et al. Continuous (*R*)-Mandelic Acid Production in an Enzyme Membrane Reactor [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989, 31: 215-222.
- [15] Kim M H, Yun S E. Construction of an Electro-enzymatic Bioreactor for the Production of (*R*)-Mandelate from Benzoylformate [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2004, 26: 21-26.
- [16] Tsuchiya S, Miyamoto K, Ohta H. Highly Efficient Conversion of (\pm)-Mandelic Acid to Its (*R*)-(-)-Enantiomer by Combination of Enzyme-mediated Oxidation and Reduction [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1992, 14(12): 1137-1142.
- [17] Takahashi E, Nakamichi K, Furui M. *R*-(-)-Mandelic Acid Production from Racemic Mandelic Acids Using *Pseudomonas polycolor* IFO 3918 and *Micrococcus freudenreichii* FERM-P 13221 [J]. *J. Ferment. Bioeng.*, 1995, 80(3): 247-250.
- [18] 陈红飙, 林原斌, 刘展鹏. D/L 扁桃酸的合成研究 [J]. *合成化学*, 2002, 10(2): 186-188.
- [19] Shimao M, Nakamura T, Okuda A, et al. Characteristics of Transposon Insertion Mutants of Mandelic Acid-utilizing *Pseudomonas putida* Strain A10L [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1996, 60(7): 1051-1055.

Production of (*R*)-Mandelic Acid by Asymmetric Degradation of the Racemate with *Brevibacterium sp.* CCSYU10011

ZHANG Hui, XU Yan

(Key Lab. Industrial Biotechnol., Ministry of Education, Sch. Biotechnol., Southern Yangtze Univ., Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: (*R*)-mandelic acid is a useful chiral synthon for the production of various pharmaceutical. In order to prepare (*R*)-mandelic acid from *rac*-mandelic acid, *Brevibacterium sp.* CCSYU10011 was screened from various microorganisms, of which the resting cells could convert the racemate to (*R*)-isomer. The process of bioconversion showed that the microorganism asymmetricly degraded (*S*)-mandelic acid from the racemate and (*R*)-mandelic acid was maintained. The factors affecting biotransformation efficiency were investigated, including temperature, pH, substrate concentration and cell biomass. Under the optimal conditions, 48.7% yield and 99% enantiomeric excess value were obtained.

Key words: (*R*)-mandelic acid; asymmetric degradation; resting cell; *Brevibacterium sp.*