



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101503712 B

(45) 授权公告日 2012.05.23

(21) 申请号 200810107595.5

(22) 申请日 2008.12.26

(73) 专利权人 湘潭大学

地址 411105 湖南省湘潭市羊牯塘

(72) 发明人 曾虹燕 夏葵 姜和 蔡联辉

黄理 赵方方 余静芳

(51) Int. Cl.

C12P 7/04(2006.01)

C12N 11/02(2006.01)

C12R 1/865(2006.01)

(56) 对比文件

US 6451587 B1, 2002.09.17, 全文.

CN 101230320 A, 2008.07.30, 全文.

CN 101314787 A, 2008.12.03, 全文.

US 5112750 A, 1992.05.12, 全文.

CN 1597970 A, 2005.03.23, 全文.

杨忠华等. 酵母催化 2-辛酮不对称还原

为 2-辛醇.《化工学报》.2004, 第 55 卷(第 8 期), 1301-1305.

李泳宁等. 非水相固定化酵母催化(S)-2-辛醇的不对称合成.《药物生物技术》.2006, 第 13 卷(第 6 期), 第 446-450 页.

黄和等. 面包酵母催化羟基不对称还原合成手性醇的研究.《生物加工过程》.2004, 第 2 卷(第 2 期), 第 52-55 页.

审查员 孙跃辉

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

一种固定化微生物制备光学纯(R)-2-辛醇的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种微生物法制备高光学纯(R)-2-辛醇的方法及其微生物。本发明固定化细胞合成法具有如下优势:1、固定化工艺简单,固定化酵母细胞在反应体系中有一定的抗毒性,催化效果好,可重复使用。2、非极性大孔吸附树脂为载体制备的固定化细胞,弹性好,对温度、pH 值的耐受性强,机械强度高,酶活稳定,半衰期长。3、在有机溶剂/缓冲溶液两相中进行反应,可减少有机溶剂对细胞的毒害作用,提高其催化活性。4、固定化酵母细胞催化制备光学纯(R)-2-辛醇,工艺简单,不需添加昂贵的辅酶,条件温和,反应时间短,几无副产物,光学纯度高达 90.25% e. e., 后续处理简单,产物易分离,环境友好。

1. 一种固定化微生物制备光学纯 (R)-2-辛醇的方法,其特征包括以下步骤:

(1)、非极性大孔吸附树脂预处理:将非极性大孔吸附树脂用去离子水清洗后用含 0.5-5.0%的 NaOH 溶液浸泡 24-48h,用去离子水清洗至中性,烘干;

(2)、面包酵母固定化:常规培养面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)DX213 CCTCC NO:M 207082,得菌液,将非极性大孔吸附树脂浸泡于菌液中,菌液温度 25-35℃,pH 值为 6.0-8.0,摇瓶转数 100-400rpm,固定菌种 24-48h,滤去菌液,并用生理盐水洗涤,将固定化细胞热处理 10-60min,制得非极性大孔吸附树脂固定化面包酵母;

(3)、固定化面包酵母催化 2-辛酮制备光学纯 (R)-2-辛醇:将固定化细胞溶于 0.1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,使其浓度为 0.2-0.5g/mL,倒入有机溶剂二氯甲烷或石油醚的一种中,使有机溶剂/缓冲溶液体积比为 25/20 或 30/8;然后分 2-5 批次添加 2-辛酮使其质量浓度为 20-80mmol/L,辅助底物为葡萄糖,添加量为 0.5-3.0g,反应体系中缓冲溶液 pH 值为 3.0-10.0,反应温度 26-36℃,反应时间 2-72h,得光学纯 (R)-2-辛醇。

2. 根据权利要求 1 所述的一种固定化微生物制备光学纯 (R)-2-辛醇的方法,其特征是常规培养的培养基组成为每 L 培养液所含组分以 g 计:葡萄糖 20.0-60.0,酵母膏 1.0-10.0,蛋白胨 1.0-10.0,  $K_2HPO_4$  0.2-4.0,  $KH_2PO_4$  0.5-5.0,  $MgSO_4$  0.02-2.0。

## 一种固定化微生物制备光学纯 (R)-2-辛醇的方法

### 技术领域

[0001] 微生物制备光学纯 (R)-2-辛醇的方法,属于微生物不对称催化前手性化合物合成光学纯化合物的技术领域。

### 背景技术

[0002] 2-辛醇又称为仲辛醇,常被用于精细有机合成,可用于生产手性化学材料和香料。(R)-2-辛醇是制备高性能液晶和液晶器件的重要手性材料,可以大幅度提高液晶质量,使低档液晶(无手性)变为高档液晶(手性)。同时它也是合成许多光学活性药物和农药的重要中间体。目前所知的制备光学纯 2-辛醇的方法主要有三条途径:(1)化学法。通常是利用化学法制备光学纯 2-辛醇,存在需要添加昂贵并具有毒性的手性催化剂(马钱子碱),操作复杂,拆分难度较大,收率低,造成环境污染等不足[马宏义,河南化工.2004,8:15-16;迟淑娟等,辽宁化工.2007,19(4):196-198]。(2)酶法。利用脂肪酶催化拆分外消旋体 2-辛醇制备光学纯 2-辛醇,但催化剂不可重复使用,副产物多,收率低,后续处理复杂,产物不易分离,在实际应用中受到一定的限制[高红娟等,精细化工.2008,25(4):338-341;石贤爱等,华南理工大学学报(自然科学版).2006,34(12):30-34;单天宇等,催化学报.2008,29(4):403-408;朱洁等,催化学报.1998,19(3):255-259;戴大章等,高等学校化学学报.2007,28(12):2307-2310;江娟等,化工进展.2006,25(8):947-962]。(3)细胞法。由于微生物细胞含有完整的酶体系,例如酵母细胞中含有丰富的氧化还原酶系,可以实现辅酶的还原再生,不需另外添加昂贵的辅酶因子,几无副产物,收率大大提高,简化了后续处理过程,但细胞不可重复使用,产物分离还是过于复杂[李泳宁等,药物生物技术.2006,13(6):446-450;杨忠华等,化工学报.2004,55(8):1301-1305;胡建等,化工学报.2006,57(10):2383-2387]。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种固定化微生物催化制备光学纯 (R)-2-辛醇的方法。

[0004] 本发明是通过如下方式实现:

[0005] 一种固定化微生物制备光学纯 (R)-2-辛醇的方法,其特征包括以下步骤:

[0006] (1)、非极性大孔吸附树脂预处理:将非极性大孔吸附树脂用去离子水清洗后用含 0.5-5.0%的 NaOH 溶液浸泡 24-48h,用去离子水清洗至中性,烘干;

[0007] (2)、面包酵母固定化:常规培养面包酵母 DX213 *Saccharomyces cerevisiae*DX213 CCTCC NO:M 207082,得菌液,将非极性大孔吸附树脂浸泡于菌液中,菌液温度 25-35°C, pH 值为 6.0-8.0,摇瓶转数 100-400rpm,固定菌种 24-48h,滤去菌液,并用生理盐水洗涤,将固定化细胞热处理 10-60min,制得非极性大孔吸附树脂固定化面包酵母;

[0008] (3)、固定化面包酵母催化 2-辛酮制备光学纯 (R)-2-辛醇:将固定化细胞溶于 0.1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,使其浓度为 0.2-0.5g/mL,倒入有机溶剂四氢呋喃、

二氯甲烷、正己烷、甲苯、正乙烷或石油醚的一种中,使其有机溶剂 / 缓冲溶液体积比为 5/30-35/0,然后分 2-5 批次添加 2- 辛酮,使其质量浓度 24-60mmol/L,以葡萄糖、蔗糖、1,2- 丙二醇、甲醇或柠檬酸中的一种为辅助底物,添加量为 0.5-3.0g,反应体系中缓冲溶液 pH 值为 3.0-10.0,反应温度 26-36℃,反应时间 2-72h,得光学纯 (R)-2- 辛醇。

[0009] 常规培养的培养基组成为每 L 培养液所含组分以 g 计:葡萄糖 20.0-60.0,酵母膏 1.0-10.0,蛋白胨 1.0-10.0,  $K_2HPO_4$  0.2-4.0,  $KH_2PO_4$  0.5-5.0,  $MgSO_4$  0.02-2.0。

[0010] 相对于传统的化学法、酶法和细胞法,本发明固定化细胞合成法具有如下优势:1、固定化工艺简单,固定化酵母细胞在反应体系中有一定的抗毒性,催化效果好,可重复使用。2、非极性大孔吸附树脂为载体制备的固定化细胞,弹性好,对温度、pH 值的耐受性强,机械强度高,酶活稳定,半衰期长。3、在有机溶剂 / 缓冲溶液两相中进行反应,可减少有机溶剂对细胞的毒害作用,提高其催化活性。4、固定化酵母细胞催化制备光学纯 (R)-2- 辛醇,工艺简单,不需添加昂贵的辅酶,条件温和,反应时间短,几无副产物,光学纯度高达 90% e. e.,后续处理简单,产物易分离,环境友好。

### 具体实施方式

[0011] 下面结合实施例对本发明做进一步说明:

[0012] 本发明是在体积比为 5/30-35/0 的有机溶剂 / 缓冲溶液两相体系中,起始底物 2- 辛酮 24-60mmol/L,添加 0.5-3.0g 的辅助底物于 26-36℃ 中反应 2-72h;产物经分离纯化后,得到光学纯 (R)-2- 辛醇。面包酵母 DX213 (*Saccharomyces cerevisiae* DX213) 菌种在申请人申请“一种面包酵母及其催化生产生物柴油的生产方法”专利(申请号:200710035224.6,申请日:2007.6.27)时,已于 2007 年 6 月 18 日保藏在中国武汉武汉大学中国典型培养物保藏中心,保藏编号 CCTCC NO:M 207082。

[0013] 实施例 1

[0014] 将 D-101 型非极性大孔吸附树脂用去离子水清洗多次后用 0.5% 的 NaOH 浸泡 48h,用去离子水清洗至中性,烘干;

[0015] 在培养基中接入面包酵母进行常规培养,培养基的组成为每 L 培养液所含组分以 g 计:葡萄糖 20.0,酵母膏 1.0,蛋白胨 5.0,  $K_2HPO_4$  1.0,  $KH_2PO_4$  1.0,  $MgSO_4$  0.2,制得菌液,将 D-101 型非极性大孔吸附树脂浸泡于菌液中,菌液温度 30℃,pH 值为 6.5,摇瓶转数 150rpm,固定菌种 28h,滤去菌液,并用生理盐水洗涤,将固定化细胞热处理 15min,制得非极性大孔吸附树脂固定化面包酵母细胞。

[0016] 将 D-101 型非极性大孔吸附树脂固定化面包酵母细胞溶于 0.1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,使其质量为 0.3g/mL,倒入甲苯,使甲苯与缓冲溶液的体积比为 15/20。然后,分二批次添加 2- 辛酮于甲苯 / 缓冲溶液的混合液中,使其质量浓度 30mmol/L,辅助底物葡萄糖添加量为 0.7g。反应体系中缓冲溶液 pH 值为 7.0,反应温度 28℃,反应时间 38h。分离催化剂,静置分层,上层为含光学纯 (R)-2- 辛醇的混合液,用等体积乙酸乙酯萃取,加入无水硫酸镁于乙酸乙酯萃取液中,静止过夜,除去残余水分,回收剩余乙酸乙酯,得光学纯 (R)-2- 辛醇。光学纯 (R)-2- 辛醇的产率为 16.56%,光学纯度为 30.57% (液相色谱)。

[0017] 实施例 2

[0018] 将 H103 型非极性大孔吸附树脂用去离子水清洗多次后用 2.0% 的 NaOH 浸泡 30h,

去离子水清洗至中性,烘干;

[0019] 在培养基中接入面包酵母进行常规培养,培养基的组成为每 L 培养液所含组分以 g 计:葡萄糖 60.0,酵母膏 8.0,蛋白胨 1.0,  $K_2HPO_4$  2.0,  $KH_2PO_4$  2.0,  $MgSO_4$  0.5, 制得菌液,将 H103 型非极性大孔吸附树脂浸泡菌液中,菌液温度  $28^{\circ}C$ , pH 值为 7.0,摇瓶转数 200rpm,固定菌种 40h,滤去菌液,并用生理盐水洗涤,将固定化细胞热处理 60min,制得非极性大孔吸附树脂固定化面包酵母细胞。

[0020] 将 H103 型非极性大孔吸附树脂固定化面包酵母细胞溶于 0.1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,使其质量为 0.3g/mL,倒入石油醚,使石油醚与缓冲溶液体积比为 25/20。然后,分四批次添加 2-辛酮于石油醚 / 缓冲溶液的混合液中,使其质量浓度 50mmol/L。辅助底物葡萄糖添加量为 2.0g。反应体系中缓冲溶液 pH 值为 6.5,反应温度  $35^{\circ}C$ ,反应时间 42h。分离催化剂,静置分层,上层为含光学纯 (R)-2-辛醇的混合液,用等体积乙酸乙酯萃取,加入无水硫酸镁于乙酸乙酯萃取液中,静止过夜,除去残余水分,回收剩余乙酸乙酯,得光学纯 (R)-2-辛醇。光学纯 (R)-2-辛醇的产率 86.46%,光学纯度为 90.25% (液相色谱)。

[0021] 实施例 3

[0022] 将 HPD-300 型非极性大孔吸附树脂用去离子水清洗多次后用 4.0% 的 NaOH 浸泡 24h,去离子水清洗至中性,烘干;

[0023] 在培养基中接入面包酵母进行常规培养,培养基的组成为每 L 培养液所含组分以 g 计:葡萄糖 30.0,酵母膏 4.0,蛋白胨 6.0,  $K_2HPO_4$  1.0,  $KH_2PO_4$  2.0,  $MgSO_4$  0.5, 制得菌液,将 HPD-300 型非极性大孔吸附树脂浸泡于菌液中,菌液温度  $28^{\circ}C$ , pH 值为 7.0,摇瓶转数 180rpm,固定菌种 48h,滤去菌液,并用生理盐水洗涤,将固定化细胞热处理 55min,制得非极性大孔吸附树脂固定化面包酵母细胞。

[0024] 将 HPD-300 型大孔吸附树脂固定化面包酵母细胞溶于 0.1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,使其质量为 0.3g/mL,倒入二氯甲烷,使二氯甲烷与缓冲溶液体积比为 30/8。然后三批次添加 2-辛酮于二氯甲烷 / 缓冲溶液的混合液中,使其质量浓度 25mmol/L,辅助底物葡萄糖添加量为 2.0g。反应体系中缓冲溶液 pH 值为 8.0,反应温度  $27^{\circ}C$ ,反应时间 45h。分离催化剂,静置分层,上层为含光学纯 (R)-2-辛醇的混合液,用等体积乙酸乙酯萃取,加入无水硫酸镁于乙酸乙酯萃取液中,静止过夜,除去残余水分,回收剩余乙酸乙酯,得 (R)-2-辛醇。(R)-2-辛醇的产率 86.46%,光学纯度为 90.25% (液相色谱)。