

Alcaligenes faecalis CGMCC 1.2006 整细胞催化邻氯扁桃腈动态动力学拆分制备(*R*)-邻氯扁桃酸

徐红梅, 何从林, 熊文娟, 韦燕禅, 夏仕文*

(重庆邮电大学 生物信息学院, 重庆 400065)

摘要: 从6株粪产碱杆菌中筛选出对邻氯扁桃腈具有较高芳基乙腈水解酶活性和中等对映选择性的 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006. 研究了反应介质对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的调控作用. 反应介质中水溶性辅溶剂如甲醇的加入降低芳基乙腈水解酶活性, 但显著提高对映选择性. 而非离子表面活性剂的加入具有相反的作用. 系统优化了底物浓度、细胞浓度、pH、温度和反应时间等反应条件对芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的影响. 在最优反应条件下, 采用分批补料策略, (*R*)-邻氯扁桃酸的产量在22 h内达到32.2 g/L, 产率82.4%, ee 93.1%. 以邻氯苯甲醛和氰化钾为底物合成(*R*)-邻氯扁桃酸, 收率89.5%, ee 98.6%.

关键词: 芳基乙腈水解酶; *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006; 邻氯扁桃腈; (*R*)-邻氯扁桃酸; 动态动力学拆分

中图分类号: Q814.1; O643.3

文献标志码: A

(*R*)-邻氯扁桃酸是抗血栓药物氯吡格雷的关键手性中间体, 其制备方法主要包括不对称合成法和消旋体拆分法^[1]. 化学(生物)不对称合成法以手性金属催化剂或羰基还原酶催化邻氯苯甲酰甲酸甲酯不对称氢化形成(*R*)-邻氯扁桃酸甲酯, 然后水解为(*R*)-邻氯扁桃酸^[2-4]. 以邻氯苯甲醛和氢氰酸为底物, 采用醇酐酶催化合成(*R*)-邻氯扁桃腈, 然后采用化学法或腈水合酶/酰胺酶水解为(*R*)-邻氯扁桃酸^[5-7]. 生物拆分法通过邻氯扁桃酸(*S*)-对映体的酶催化降解^[8]或 α -乙酰氧基邻氯苯乙酸的酯酶催化不对称水解形成(*R*)- α -乙酰氧基邻氯苯乙酸, 然后通过化学水解获得(*R*)-邻氯扁桃酸^[9].

腈水解酶中的芳基乙腈水解酶能够催化扁桃腈及其衍生物对映选择性水解为(*R*)-扁桃酸及其衍生物, 未反应的(*S*)-扁桃腈及其衍生物在碱性条件下水解为苯甲醛衍生物和氢氰酸, 自动消旋为扁桃腈及其衍生物. 通过动态动力学拆分, (*R*)-扁桃酸及其衍生物的理论收率为100%. 以扁桃腈为原料, 采用腈水解酶法生产(*R*)-扁桃酸已成为 BASF、Mitsubishi Rayon 等公司的工业化方法^[10]. 与扁桃腈相比, 邻氯扁桃腈因邻位氯原子取代基的存在, 采用芳基乙腈水解酶水解时通常具有较低的活性和

对映选择性以及低的底物浓度. 采用生物催化剂工程和介质工程策略是提高芳基乙腈水解酶水解邻氯扁桃腈活性和对映选择性的有效途径之一. DeSantis 等^[11]采用基因挖掘技术从环境中提取 DNA, 对创建的基因文库进行筛选, 发现在200多个腈水解酶中, 腈水解酶 I 能够作用于邻氯扁桃腈, (*R*)-邻氯扁桃酸收率>95%, ee93%. Schreiner 等^[12]以突变粪产碱杆菌腈水解酶在 pH4.5 下拆分 10 mmol/L 邻氯扁桃腈, 转化率 100%, ee>99%. He 等^[13]以 *Alcaligenes faecalis* ECU0401 芳基乙腈水解酶催化 20mmol/L 邻氯扁桃腈动态动力学拆分, 收率 99.1%, ee 99.9%. Zhang 等^[14]以 *Labrenzia aggregate* DSM13394 重组腈水解酶在甲苯-水两相反应体系中, 拆分邻氯扁桃腈, (*R*)-邻氯扁桃酸产率 94.5%, ee 96%.

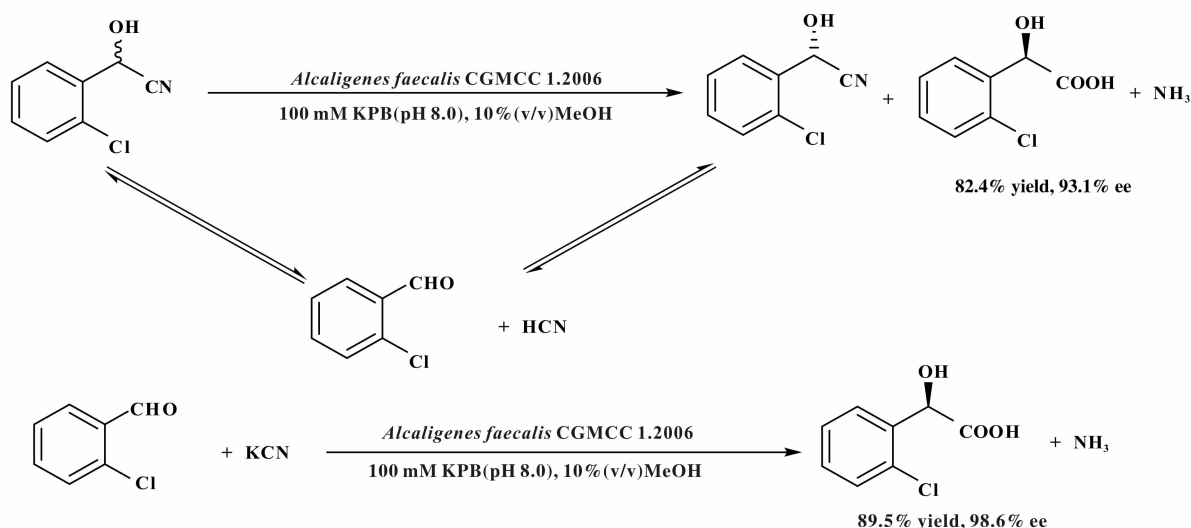
从6株粪产碱杆菌中筛选出对邻氯扁桃腈具有较高活性和对映选择性的 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006, 采用介质工程策略有效提高芳基乙腈水解酶的对映选择性. 在优化反应条件的基础上, 分别以邻氯扁桃腈、邻氯苯甲醛和氰化钾为底物, 采用分批补料策略和单批反应, 实现了(*R*)-邻氯扁桃酸的高收率和高对映选择性制备(图示1).

收稿日期: 2014-01-20; 修回日期: 2014-02-21.

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC, 2009BB5286).

作者简介: 徐红梅(1977-), 女, 硕士, 讲师.

* 通讯联系人, E-mail: xiasw@cqupt.edu.cn.



图示1 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 整细胞催化合成 (*R*)-邻氯扁桃酸

Scheme 1 Synthesis of (*R*)-*o*-chloromandelic acid by whole cells of *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006

1 实验部分

1.1 实验材料

邻氯扁桃腈以邻氯苯甲醛和氢氰酸为原料按文献[15]合成, 纯度>98%。(*R*)-、(*S*)-和邻氯扁桃酸购自 Sigma 公司, 邻氯苯甲醛、氰化钾和其他试剂购自国药集团。 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.767、1.924、1.1799、1.7686、1.2006、1.1837 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基 培养基 1(g/L): 蛋白胨 5, 牛肉膏 5, 酵母膏 0.5, NaCl 2, pH7.0。培养基 2(g/L): 葡萄糖 10, 麦芽糖 2, 酵母膏 2, 蛋白胨 0.8, 谷氨酸钠 13, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 2, 组氨酸 1, 蛋氨酸 1, 1.5% (v/v) 异戊腈(诱导剂)。

1.2.2 培养条件 取斜面保存的菌种接种于 5 mL 培养基 1 中, 28 ℃、100 r/min 下恒温摇床振荡预培养 48 h。预培养液作为种子接种于 50 mL 培养基 2 中, 28 ℃、100 r/min 下恒温摇床振荡培养 24 h, 补加 1.5% (v/v) 异戊腈, 然后继续培养 24 h。离心收获细胞(8 000 r/min, 10 min), 用生理盐水洗涤 2 次, 重新悬浮于生理盐水中, 4 ℃下保存备用。细胞生物量采用浊度法测定。 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 的浊度和细胞干重对应关系为 1 个 OD₆₁₀ 相当于 0.465 mg 干重细胞。

1.2.3 菌种筛选 反应液含 100 mmol/L 磷酸盐

缓冲液(pH 8.0), 30 mmol/L 邻氯扁桃腈, 68 OD₆₁₀ 细胞量, 总体积为 2 mL。30 ℃、160 r/min 下振荡反应 24 h, 离心去除细胞。反相 HPLC 测定反应液中邻氯扁桃酸浓度。反应液用乙酸乙酯萃取, 手性 HPLC 测定邻氯扁桃酸 ee。

1.2.4 腈水解酶活性测定 反应液含 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0), 30 mmol/L 邻氯扁桃腈, 16.7 mg *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 干重细胞, 总体积为 2 mL。30 ℃、160 r/min 下振荡反应 30 min, 加入 0.1 mL 2 mol/L 盐酸中止反应。反应液离心去除细胞, 反相 HPLC 测定邻氯扁桃酸浓度。腈水解酶活性定义为每分钟产生 1 μmol (*R*)-邻氯扁桃酸对应的细胞量(干重, g)。

1.2.5 分析方法 (*R*)-邻氯扁桃酸采用反相 HPLC 法在 Agilent-1000 高效液相色谱仪上测定。色谱柱: Waters Spherisorb S5 ODS2 (4.6 × 150 mm), 流动相: 0.1 mol/L 磷酸/乙腈(70:30, v/v), 流速: 1 mL/min, 检测波长: 254 nm。邻氯扁桃酸、邻氯苯甲醛和邻氯扁桃腈的保留时间分别为 3.16、8.98、17.03 min。邻氯扁桃酸产率定义为邻氯扁桃酸与扁桃腈的物质量之比。ee 值采用手性 HPLC 测定。色谱柱: Chiralpak AD 柱 (4.6 × 250 mm, Daicel), 流动相: 正己烷/异丙醇/三氟乙酸(80/20/1, v/v), 流速: 0.5 mL/min, 检测波长: 254 nm。(*S*)-、(*R*)-邻氯扁桃酸的保留时间分别为 14.4、15.4 min, (*S*)-、(*R*)-邻氯扁桃腈的保留时

间分别为 18.4、20.2 min. (*R*)-邻氯扁桃酸的对映体过量 (ee) = $(A_R - A_S) / (A_R + A_S) \times 100\%$, 其中 A_R 、 A_S 分别为 (*R*)、(*S*)-邻氯扁桃酸的峰面积.

2 结果与讨论

2.1 产 (*R*)-选择性芳基乙腈水解酶菌株筛选

以邻氯扁桃腈为底物, 评价 6 株粪产碱杆菌整

细胞催化转化为 (*R*)-邻氯扁桃酸的活性和对映选择性. 表 1 的筛选结果表明, 选择的所有菌株均具有转化邻氯扁桃腈为 (*R*)-邻氯扁桃酸的能力并表现出中等对映选择性. 其中 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 具有较高的芳基乙腈水解酶活性和较高的对映选择性.

表 1 产 (*R*)-选择性芳基乙腈水解酶菌株筛选
Table 1 Screening of (*R*)-selective arylacetonitrilase-producing strains

Strain	Yield/%	ee /%
<i>Alcaligenes faecalis</i> CGMCC 1.767	58.3	44.6
<i>Alcaligenes faecalis</i> CGMCC 1.2006	83.8	73.0
<i>Alcaligenes faecalis</i> CGMCC 1.924	35.0	41.9
<i>Alcaligenes faecalis</i> CGMCC 1.7686	41.8	40.8
<i>Alcaligenes faecalis</i> CGMCC 1.1799	48.5	54.0
<i>Alcaligenes faecalis</i> CGMCC 1.1837	68.0	44.2

Reaction mixture (2 mL) contained 30 mmol/L *o*-chloromandelonitrile, 16.7 mg dry weight cells, 100 mmol/L KPB (pH 8.0), 30 ℃, 160 r/min, 24 h

2.2 辅溶剂对芳基乙腈水解酶活性和选择性的影响

研究了 7 种水溶性辅溶剂对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的影响(表 2). 结果表明, 10% (*v/v*) 二甲亚砜的加

入增大芳基乙腈水解酶活性, 稍微增加对映选择性. 选择的其他水溶性辅溶剂不同程度地降低芳基乙腈水解酶活性, 但显著提高对映选择性. 对醇溶剂, 随链长的增大, 芳基乙腈水解酶活性显著降

表 2 水溶性辅溶剂对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的影响
Table 2 Effect of cosolvents on activity and enantioselectivity of *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 arylacetonitrilase

Cosolvent/(10%, <i>v/v</i>)	Relative activity/%	ee/%
Control	100	73.0
Methanol	81.5	91.4
Ethanol	61.0	94.5
2-propanol	50.0	94.6
1-butanol	0	-
Acetone	89.6	84.3
DMSO	115	76.3
Acetonitrile	83.8	91.2

Reaction mixture (2 mL) contained 30mmol/L *o*-chloromandelonitrile, 10% (*v/v*) cosolvent, 16.7 mg dry weight cells, 100 mmol/L KPB (pH 8.0). 30 ℃, 160 r/min, 30 min. 100% activity corresponded to 40 μmmol/min · g dew

低, 10% (*v/v*) 正丁醇使酶完全失活. 进一步的研究表明, 酶活性随甲醇浓度增大而降低, 20% 甲醇存在下, 活性降低 50%, 50% 甲醇使腈水解酶完全失活, 表明 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1. 2006 芳基乙腈水解酶对高浓度甲醇的耐受性差(图 1). 尽管乙腈对对映选择性的影响与甲醇类似, 但 20% 乙腈存在下, 活性仅为 24%, 酶对高浓度乙腈的耐受性更差. 从酶活性和对映选择性考虑, 以下研究选择 10% (*v/v*) 甲醇为辅溶剂.

2.3 活性剂对芳基乙腈水解酶活性和选择性的影响

研究了 10% (*v/v*) 甲醇存在下, 4 种非离子表面活性剂对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC1. 2006 芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的影响(表 3). 1% (*v/v*) Tween-20、Tween-80、Triton X-100 显著提高芳基乙腈水解酶活性, Plysurf 对酶活性无影响. 非离子表面活性剂的加入可能改善了细胞的通透性, 从而提高酶活性, 但显著降低对映选择性.

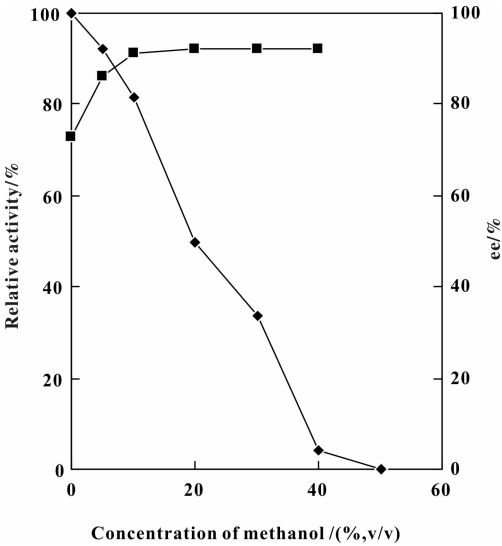


图 1 甲醇浓度对芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的影响
Fig. 1 Effect of methanol concentration on the activity (◆) and enantioselectivity (■) of *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 arylacetonitrilase

表 3 非离子表面活性剂对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1. 2006 芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的影响

Table 3 Effect of non-ionic surfactants on activity and enantioselectivity of *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1. 2006 arylacetonitrilase

Surfactant / (1% , v/v)	Relative activity/%	ee / %
Control	100	91.4
Tween-20	127	72.4
Tween-80	138	76.0
Triton X-100	144	68.7
Plysurf	101	81.7

Reaction mixture (2 mL) contained 30 mmol/L *o*-chloromandelonitrile, 10% (*v/v*) methanol, 1% (*v/v*) surfactant, 16.7 mg dry weight cells, 100 mmol/L KPB (pH 8.0). 30 ℃, 160 r/min, 30 min. 100% activity corresponded to 32.6 μmol/min · g dry weight cells

2.4 反应条件优化

底物浓度和细胞浓度. 分别考察了底物浓度和细胞浓度对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1. 2006 芳基乙腈水解酶催化邻氯扁桃腈动态动力学拆分产率和对映选择性的影响(图 2、图 3). 当邻氯扁桃腈浓度小于 20 mmol/L 时, (*R*)-邻氯扁桃酸产率随底物浓度增大而增大. 底物浓度高于 30 mmol/L, 对芳基乙腈水解酶有显著抑制作用, 100 mmol/L 底物使酶完全失活. 当细胞浓度小于 8.4 mg (干重)/mL 反应液时, (*R*)-邻氯扁桃酸产率随细胞浓度增大而增大. 因为质量扩散阻力, 更高的细胞浓度不能显

著改善拆分产率. 邻氯扁桃腈浓度和细胞浓度对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1. 2006 芳基乙腈水解酶的对映选择性无影响. 为了拆分反应能够经济有效的进行, 选择邻氯扁桃腈浓度和细胞浓度分别为 30 mmol/L 和为 8.4 mg (干重)/mL 反应液.

pH 和温度. 选择柠檬酸-氢氧化钠 (pH3.0 ~ 5.0, 100 mmol/L)、KPB (pH6.0 ~ 8.0, 100 mmol/L)、Tris-HCl (pH9.0 ~ 11.0, 100 mmol/L) 3 个缓冲体系, 考察 pH 对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1. 2006 芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的影响(图 4). pH<5 时, 反应几乎不能进行, 此后酶活性随 pH

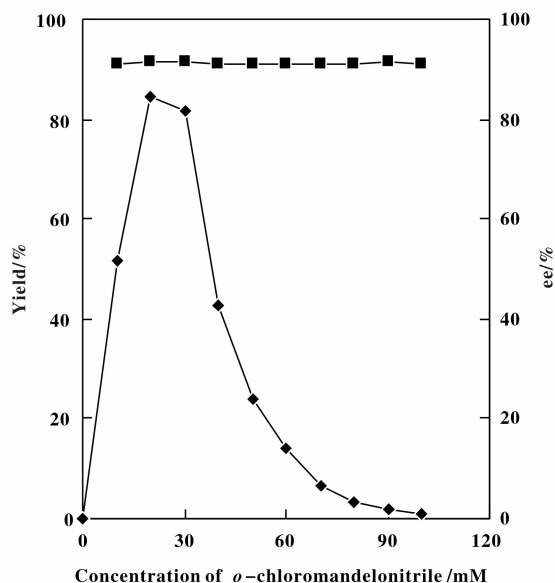


图2 邻氯扁桃腈浓度对(*R*)-邻氯扁桃酸产率和 ee 值的影响

Fig. 2 Effect of *o*-chloromandelonitrile concentration on the yield (◆) and ee (■) of (*R*)-*o*-chloromandelic acid. Reaction mixture (2ml) contained 10-100 mmol/L *o*-chloromandelonitrile, 10% (*v/v*) methanol, 16.7 mg dry weight cells, 100 mmol/L KPB (pH8.0). 30 °C, 2 h, 160 r/min

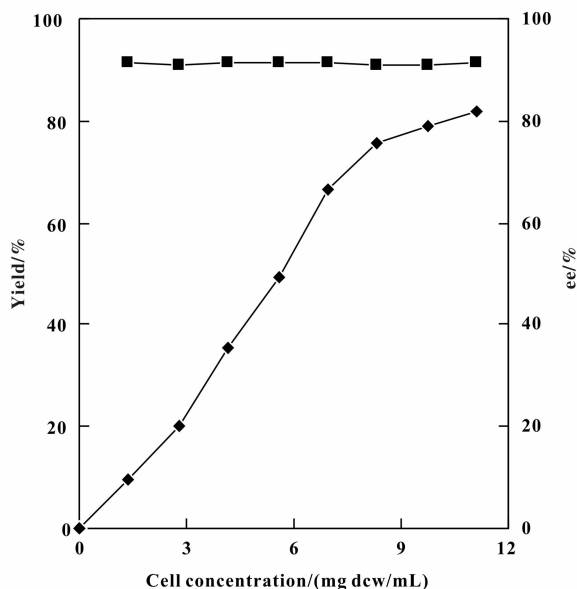


图3 细胞浓度对(*R*)-邻氯扁桃酸产率和 ee 值的影响

Fig. 3 Effect of cell concentration on the on the yield (◆) and ee (■) of (*R*)-*o*-chloromandelic acid. Reaction mixture (2 ml) contained 30 mmol/L *o*-chloromandelonitrile, 10% (*v/v*) methanol, 2.8-22.3 mg dry weight cells, 100 mmol/L KPB (pH8.0). 30 °C, 2 h, 160 r/min

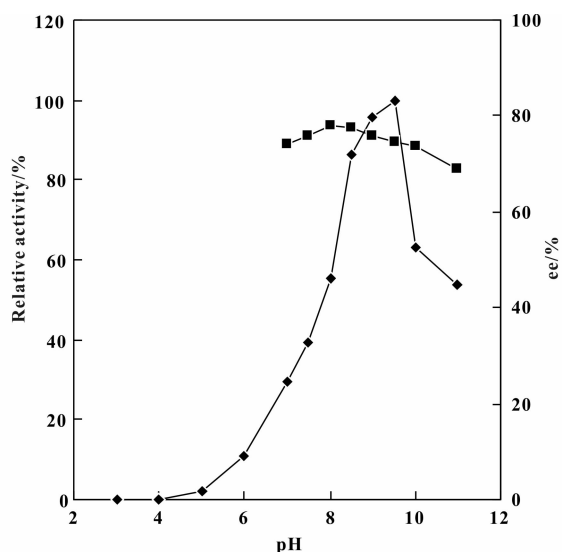


图4 pH 对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的影响

Fig. 4 Effect of pH on the activity (◆) and enantioselectivity (■) of *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 arylacetone nitrilase. Reaction mixture (2ml) contained 30mmol/L *o*-chloromandelonitrile, 10% (*v/v*) methanol, 16.7 mg dry weight cells, 100mmol/L buffer (pH3.0-11.0). 30 °C, 30 min, 160 r/min. 100% activity corresponded to 58.8 μmmol/min · g dry weight cells

增大而增大. pH 为 9.5 时酶具有最高活性, 此后随 pH 增大而降低. pH 8.0 时对映选择性最高, 此后随着 pH 增大, 对映选择性降低. 温度小于 50 °C, 酶活性随温度升高而增大. 高于 50 °C, 因酶热失活, 活性随温度升高而降低. 小于 40 °C, 对映选择性随温度升高而增大. 高于 40 °C, 对映选择性随温度升高稍有降低(图 5).

反应时间. *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 细胞催化邻氯扁桃腈对映选择性水解为(*R*)-邻氯扁桃酸, 整个反应过程中 ee 值保持稳定, 邻氯扁桃腈 2 h 内消耗完全, (*R*)-邻氯扁桃酸收率为 86.3%, ee 91.4%. 邻氯扁桃腈的化学稳定性差, 存在与邻氯苯甲醛和氢氰酸的化学平衡. 邻氯苯甲醛浓度由初始的 2.77 mmol/L 降至 1.09 mmol/L. 进一步的反应, 观察到邻氯苯甲醛的缓慢降解(图 6).

2.5 分批补料制备(*R*)-邻氯扁桃酸

为提高 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 细胞的利用率和(*R*)-邻氯苯甘氨酸的制备效率, 采用分批补料策略制备(*R*)-邻氯扁桃酸(图 7). 分批补料 7 批, 累积加入邻氯扁桃腈浓度为 210 mmol/L, 反

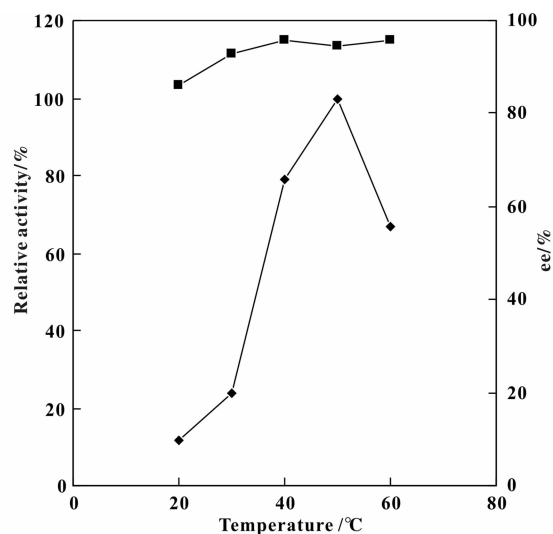


图5 温度对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 芳基乙腈水解酶活性和对映选择性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the activity (◆) and enantioselectivity (■) of *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 arylacetamidase. Reaction mixture (2 ml) contained 30 mmol/L *o*-chloromandelonitrile, 10% (v/v) methanol, 16.7 mg dry weight cells, 100 mmol/L KPB (pH8.0). 20-60 °C, 30 min, 160 r/min. 100% activity corresponded to 138 μmmol/min · g dry weight cells

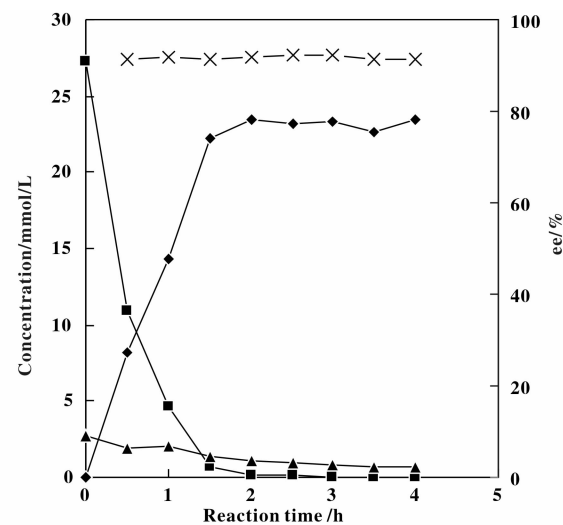


图6 邻氯扁桃腈水解产生(*R*)-邻氯扁桃酸的时间进程
Fig. 6 Time course of (*R*)-2-chloromandelic acid production from *o*-chloromandelonitrile. Reaction mixture (2 ml) contained 30 mmol/L *o*-chloromandelonitrile, 10% (v/v) methanol, 16.7 mg dry weight cells, 100 mmol/L KPB (pH8.0). 30 °C, 160 r/min. *o*-chloromandelonitrile (■), (*R*)-*o*-chloromandelic acid (◆), *o*-chlorobenzaldehyde (▲), ee (×)

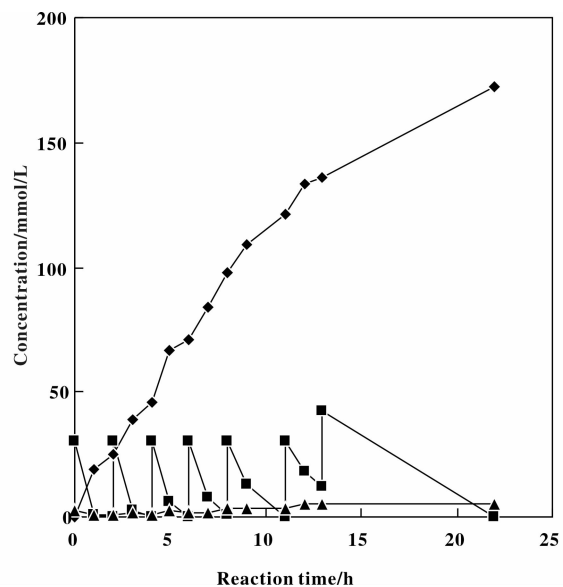


图7 分批补料产生(*R*)-邻氯扁桃酸

Fig. 7 Fed-batch production of (*R*)-*o*-chloromandelic acid from *o*-chloromandelonitrile. Reaction mixture (20 mL) contained 30mmol/L *o*-chloromandelonitrile, 10% (v/v) methanol, 100 mmol/L KPB (pH8.0), 167mg dry weight cells. 30 °C, 160 r/min. 30 mmol/L *o*-chloromandelonitrile was fed at the indicated time intervals. *o*-chloromandelonitrile (■), (*R*)-*o*-chloromandelic acid(◆), 2-chlorobenzaldehyde (▲)

应 22 h 后, 邻氯扁桃腈完全消耗. (*R*)-邻氯扁桃酸的产量为 173 mmol/L, 对应于 32.2 g/L, 产率 82.4%, ee 93.1%. 此外邻氯扁桃腈在反应过程中的化学水解导致 5.05 mmol/L 邻氯苯甲醛累积, 产率 2.4%. 根据物料平衡分析, 约 15.2% 的底物和产物在反应过程中降解.

2.6 邻氯苯甲醛和氰化钾为底物合成(*R*)-邻氯扁桃酸

以 30 mmol/L 邻氯苯甲醛和 30 mmol/L 氰化钾替代邻氯扁桃腈作为底物, *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 细胞催化合成 (*R*)-邻氯扁桃酸 (表 4). 因为水溶液中邻氯苯甲醛、氰根离子与邻氯扁桃腈的化学平衡, 邻氯扁桃腈在反应过程中作为芳基乙腈水解酶的底物进行动态动力学拆分. 反应完成后反应液中未检测到邻氯苯甲醛存在, (*R*)-邻氯扁桃酸的收率和 ee 值均高于以邻氯扁桃腈为底物. 进一步的研究证实由于邻氯苯甲醛对 *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 芳基乙腈水解酶强烈的抑制作用, 细胞不能循环使用. 以邻氯扁桃腈为底物, *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 细胞能够循环使用

7 个批次,因而具有更高的催化效率.

表 4 邻氯苯甲醛和氰化钾为底物合成 (R)-邻氯扁桃酸

Table 4 Production of (R)-o-chloromandelic acid from o-chlorobenzaldehyde plus cyanide by *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006

	(R)-2-chloromandelic acid	
	Yield/%	ee/%
Control	85.6	92.1
+10% (v/v) Methanol	89.5	98.6

Reaction conditions: reaction mixture (2 ml) contained 30mmol/L o-chlorobenzaldehyde, 30 mmol/L KCN, 16.7 mg dry weight cells, 100 mmol/L KPB (pH8.0), 30 ℃, 160 r/min, 24 h

3 结论

Alcaligenes faecalis CGMCC 1.2006 整细胞催化邻氯扁桃腈动力学拆分具有较高活性和中等对映选择性. 采用介质工程策略,在反应体系中添加水溶性辅溶剂,能够有效提高芳基乙腈水解酶的对映选择性. 在磷酸盐缓冲液-10% (v/v) 甲醇溶剂体系中,采用分批补料策略,*Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 整细胞细胞使用批次达到 7 批,(R)-邻氯扁桃酸产量达到 32.4 g/L,产率 82.4%,ee93.1%. 以邻氯苯甲醛和氰化钾为底物直接合成 (R)-邻氯扁桃酸具有比扁桃腈为底物时更高的收率和对映选择性. 我们建立的方法为以芳基乙腈水解酶为生物催化剂对映选择性动态动力学拆分邻氯扁桃腈制备 (R)-邻氯扁桃酸提供了一条实用的途径.

参考文献:

[1] Qian Jing (钱 晶), Xu Sai-zheng (徐赛珍), Xue Ya-pin (薛亚平), *et al.* Progress of synthesis of (R)-2-chloromandelic acid((R)-邻氯扁桃酸的制备技术进展)[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*(化工进展), 2011,**30**: 396-406.

[2] Sun Y H, Wan X B, Wang J P, *et al.* Ru-catalyzed asymmetric hydrogenation of α -ketoesters with $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ as additive[J]. *Org Lett*, 2005, **7**:5425-5427.

[3] Ema T, Ide S, Okita N, Sakai T. Highly efficient chemoenzymatic synthesis of methyl (R)-o-chloromandelate, a key intermediate for clopidogrel, via asymmetric reduction with recombinant *Escherichia coli* [J]. *Adv Synth Catal*, 2008, **350**:2039-2044.

[4] Ema T, Okita N, Ide S, Sakai T. Highly enantioselective and efficient synthesis of methyl (R)-o-chloromandelate

with recombinant *E. coli*: toward practical and green access to clopidogrel [J]. *Org Biomol Chem*, 2007, **5**: 1175-1176.

[5] Glieder A, Weis R, Skranc W, *et al.* Comprehensive stepby-step engineering of an (R)-hydroxynitrile lyase for large-scale asymmetric synthesis [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2003, **42**:4815-4818.

[6] Van Langen L M, Selassa R P, van Rantwijk F, *et al.* Cross-linked aggregates of (R)-oxynitrilase: a stable, recyclable biocatalyst for enantioselective hydrocyanation [J]. *Org Lett*, 2005, **7**:327-329.

[7] Osprian I, Fechter M H, Griengl H. Biocatalytic hydrolysis of cyanohydrins: an efficient approach to enantiopure α -hydroxy carboxylic acids[J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, **24/25**:89-98.

[8] Ju X, Yu H L, Pan J, *et al.* Bioproduction of chiral mandelate by enantioselective deacylation of α -acetoxyphenylacetic acid using whole cells of newly isolated pseudomonas sp ECU1011 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86**: 83-91.

[9] He Y C, Xu J H, Pan J, *et al.* Preparation of (R)-(-)-mandelic acid and its derivatives from racemates by enantioselective degradation with a newly isolated bacterial strain *Alcaligenes* sp. ECU0401 [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2008, **31**: 445-451.

[10] Gong J S, Lu Z M, Li H, *et al.* Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, **11**:142-159.

[11] De Santis G, Zhu Z L, Greenberg W A, *et al.* An enzyme library approach to biocatalysis: Development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 9024 - 9025.

[12] Schreiner U, Hecher B, Obrowsky S, *et al.* Directed

- evolution of *Alcaligenes faecalis* nitrilase[J]. *Enzyme and Microb Technol*, 2010, **47**:140–146.
- [13] He Y C, Zhang Z J, Xu J H, *et al.* Biocatalytic synthesis of (*R*)-(-)-mandelic acid from racemic mandelonitrile by cetyltrimethylammonium bromide-permeabilized cells of *Alcaligenes faecalis* ECU0401[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, **37**:741–750.
- [14] Zhang C S, Zhang Z J, Li C X, *et al.* Efficient production of (*R*)-*o*-chloromandelic acid by deracemization of *o*-chloromandelonitrile with a new nitrilase mined from *Labrenzia aggregate* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **95**:91–99.
- [15] Jenkins S S. The preparation and some properties of the chloromandelic acids, their methyl esters and amides[J]. *J Am Chem Soc*, 1931, **53**:2341–2343.

Preparation of (*R*)-*o*-Chloromandelic Acid Via Dynamic Kinetic Resolution of *o*-Chloromandelonitrile by Whole Cells of *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006

XU Hong-mei, HE Cong-lin, XIONG Wen-juan, WEI Yan-chan, XIA Shi-wen*

(School of Bioinformatics, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China)

Abstract: *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006 with higher arylacetone nitrilase activity and moderate enantioselectivity towards *o*-chloromandelonitrile was screened from six microbial strains belonging to *Alcaligenes faecalis*. The regulating effects of reaction medium on both activity and enantioselectivity of arylacetone nitrilase were studied. The addition of water-soluble co-solvents such as methanol into the reaction medium decreased the activity of arylacetone nitrilase, but enhanced the enantioselectivity significantly. Addition of non-ionic surfactants possessed the reverse effects. The effects of reaction conditions such as substrate concentration, cell concentration, pH, temperature and reaction time on the activity and enantioselectivity of arylacetone nitrilase were also optimized systematically. Under the optimal reaction conditions, the fed-batch production of (*R*)-*o*-chloromandelic acid was attained with 32.2 g/L productivity within 22 h, in 82.4% yield and 93.1% ee. With *o*-chlorobenzaldehyde and potassium cyanide as the substrates, (*R*)-*o*-chloromandelic acid was also produced in 89.5% yield and 98.6% ee.

Key words: arylacetone nitrilase; *Alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006; *o*-chloromandelonitrile; (*R*)-*o*-chloromandelic acid; dynamic kinetic resolution