



固定化细胞拆分(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯的研究

张利坤¹, 肖延铭^{1*}, 钱敏帆¹, 严燕兵¹, 李敬亚²

¹长兴制药股份有限公司, 工业生物催化与转化浙江省工程研究中心, 浙江 长兴 313100

²郑州大学化学与分子工程学院, 河南 郑州 450001

摘要:【目的】筛选鉴定一株产酯酶用于选择性拆分(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯的菌株, 利用该菌株固定化细胞催化拆分外消旋底物。【方法】通过富集培养、罗丹明 B 平板初筛及复筛培养获得一株选择性拆分(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯的菌株, 通过对其形态、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析, 确立该菌株系统发育地位。优化了利用硅藻土-戊二醛吸附交联法对该菌体细胞固定化的条件, 研究固定化细胞催化性质及操作稳定性。【结果】该菌为革兰氏阴性菌, 鉴定其为甲基球状菌属 (*Methylophila*)。固定化体系最优条件: 聚乙烯亚胺 0.15% (V/V), 戊二醛 0.2% (V/V), 硅藻土 6 g/L, 菌体质量浓度 100 g/L。与游离细胞相比, 固定化细胞最适 pH 由 8.0 变为 8.5, 最适温度由 35 °C 变为 40 °C, pH 稳定性和温度稳定性都有所提高。Cu²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺能促进酶活, Zn²⁺、Fe²⁺抑制酶活。固定化细胞的有机溶剂耐受性较游离细胞有所提高。动力学分析细胞固定化后 K_m 值变大, 底物亲和力降低。利用固定化细胞水解(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯, 底物浓度 200 g/L, 反应 20 h, 保留构型为 S 型, 得率 47.8%, 对映体过量值 ee_s 为 99.4%, 重复使用 12 次后仍保留初始酶活的 80% 以上。【结论】开发了利用 *Methylophila* sp. cxzy-L013 固定化细胞选择性拆分(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯的工艺, 该工艺具有良好的工业应用前景。

关键词: (R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯, 生物催化, 菌种筛选, 固定化细胞, 酯酶

随着手性化学技术在制药、农药以及非生物等领域不断进步, 在生物活性方面获得至少含有一个手性中心化合物的方法受到人们越来越多的关注^[1]。生物催化与化学反应相比, 具有反应条件温和、催化效率高、副反应少^[2]的特点, 是代替传

统化学拆分反应的最佳选择^[3]。由于酯酶具有高催化活性和优良区域选择性, 无需辅助因子参与, 该类酶应用于光学纯化合物的制备已经成为生产手性化合物的一种重要方法^[4]。

目前制备固定化细胞的方法主要有吸附法、

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2015AA021004)

*通信作者。Tel: +86-572-6210258; E-mail: hrbxym1286@yeah.net

收稿日期: 2017-12-20; 修回日期: 2018-03-23; 网络出版日期: 2018-05-29

共价结合法、交联法、包埋法等, 固定化方法还可以联用以实现优势互补, 提高细胞的活性与稳定性, 如吸附交联法、包埋-交联法、包埋-吸附法、包埋-共价结合法等^[5]。

左乙拉西坦(Levetiracetam)化学名称为(S)- α -乙基-2-氧合-1-乙酰胺吡咯烷, 是一种乙酰吡咯烷类化合物的新型抗癫痫药物^[6]。该药治疗指数很高, 药动学理想, 口服吸收快且安全, 生物利用度可达 100%, 是一种高效、毒副作用小的广谱抗癫痫药, 具有极高的开发价值^[7-8]。(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯是生产左乙拉西坦的重要中间体, 一条有效途径是通过对其(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯进行生物拆分, 获得高光学纯度的(S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯, 如图 1。王普等^[9]使用产酯酶耐酪氨酸豕村氏菌选择性水解(S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸乙酯, 制备(S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸, 底物浓度 12 g/L, 反应 24 h, 产率和 *ee* 值分别为 48%和 99%; 宣磊等^[10]使用产酯酶蜡状芽孢杆菌选择性水解(R)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯, 制备(S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯, 底物浓度 20 g/L, 反应 13 h, 转化率 54.04%, *ee_s* 值达到 99.9%。上述工艺中底物投量较低, 难以实现工业化, 此类工艺要达到具有产业化价值的要求, 需寻找催化活性高、拆分效果好的新型酯酶。

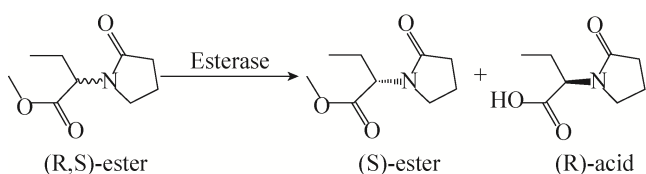


图 1. 生物催化拆分(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯
Figure 1. Enantioselective hydrolysis of rac- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester catalyzed by biocatalysts.

本文利用以(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯为产酯酶诱导剂的培养基从土壤、污泥等样品中筛选能选择性水解(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯的菌种, 并进行菌种鉴定。在此基础上, 优化了固定化细胞工艺条件, 并对游离细胞和固定化细胞催化性质进行研究, 最后利用固定化细胞水解(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯, 考察了其操作稳定性。

1 材料和方法

1.1 土样及试剂

浙江台州华海药业川南一分厂、川南二分厂污水处理池、生产车间周边等 35 份样本。聚乙烯醇(PVA) (1750 \pm 50), 中国医药集团上海化学试剂公司; 海藻酸钠, 国药集团化学试剂有限公司; 50%聚乙烯亚胺水溶液(分子量 70000), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 硅藻土(粒径 19.6 μ m), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 25%戊二醛溶液, 国药集团化学试剂有限公司; (R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯, 华海药业川南二分厂技术中心; 其他常规试剂均为市售分析纯。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基(g/L): K_2HPO_4 2.1, KH_2PO_4 0.4, NaCl 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $CaCl_2$ 0.025, NH_4NO_3 0.5, 酵母粉 1.0, 蛋白胨 2.0, (R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯 1.0。

1.2.2 罗丹明 B 初筛培养基(g/L): K_2HPO_4 2.1, KH_2PO_4 0.4, NaCl 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $CaCl_2$ 0.025, NH_4NO_3 0.5, 酵母粉 1.0, 蛋白胨 2.0, 琼脂 20, 121 $^{\circ}C$ 灭菌 20 min。待培养基冷却至 50 $^{\circ}C$

加入 10 mL 过滤除菌后罗丹明(1 mg/mL)和 12 mL PVA 乳化液, 摇匀后倒平板。PVA 底物乳化液的制备: (1) 聚乙烯醇(PVA)溶液: 2.0 g PVA 加去离子水 800 mL 加热溶解, 冷却, 用 0.2 mol/L NaOH 溶液滴定至 pH 7.5 后过滤, 再定容至 1000 mL, 制成 2% 的 PVA 水溶液。(2) 量取制得的 PVA 水溶液 450 mL, 再加入(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯 150 mL, 用高速匀浆机充分搅拌, 取出备用(现配现用)。

1.2.3 复筛固体培养基(g/L): K₂HPO₄ 2.1, KH₂PO₄ 0.4, NaCl 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.025, NH₄NO₃ 0.5, 酵母粉 1.0, 蛋白胨 2.0, 琼脂 20。

1.2.4 复筛摇瓶培养基(g/L): K₂HPO₄ 2.1, KH₂PO₄ 0.4, NaCl 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.025, NH₄NO₃ 0.5, 酵母粉 1.0, 蛋白胨 2.0, (R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯 1.0。

1.3 催化拆分(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯菌株的筛选

富集培养: 称取 2 g 土样加入 30 mL 灭菌后的生理盐水中, 30 °C、180 r/min 摇床振荡 30 min, 吸取 2 mL 悬液加入到富集培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床培养 3–4 d, 然后吸取 2 mL 再次转接到新鲜富集培养基中, 如此重复富集培养 5 次。

平板筛选: 无菌生理盐水稀释富集培养液, 稀释梯度为 10⁻⁷、10⁻⁹、10⁻¹¹、10⁻¹³, 取 0.1 mL 菌悬液涂布在初筛平板培养基上, 30 °C 培养 3–5 d, 365 nm 紫外灯下观察平板上菌体生长状况, 在平板上挑取形成荧光圈的菌株, 划线纯化至纯种, 保存在斜面试管复筛培养基上。

复筛: 将分离纯化后的菌株接入复筛摇瓶培养基, 30 °C、180 r/min 摇床培养 3–4 d。取发酵液, 通过 HPLC 检测, 选取拆分效果理想的菌株。

1.4 产酯酶菌株 *Methylophila* sp. cxzy-L013 固定化细胞的制备

采用硅藻土-戊二醛吸附交联法制备固定化细胞: 称取 0.6 g 硅藻土与一定量菌体用 Tris-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 8.0)悬浮定容至 100 mL, 加入聚乙烯亚胺使其终浓度为 0.1% (V/V), 交联 1 h, 再加入戊二醛使其终浓度为 0.2% (V/V), 继续交联 1 h, 抽滤水洗备用。

1.5 固定化细胞催化水解(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯

300 mL 催化反应体系: 500 mL 的转化瓶中, (R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯终浓度 200 g/L, 以水为反应介质, 固定化酶投量 1.5% (M/V), 200 r/min 机械搅拌, 反应温度 40 °C, 用 20% (M/V) Na₂CO₃ 溶液维持 pH 8.5 左右。

1.6 分析方法

1.6.1 (R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯及其水解产物的 HPLC 分析: 取一定量水解反应液加 HCl 至 pH 为 4.0 左右, 乙酸乙酯萃取, 取一定量有机相, 氮气吹干, 加入流动相溶解。流动相中正己烷: 异丙醇: 三氟乙酸=80: 20: 0.2, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μ L, 大赛璐(Daice) CHIRALPAK AS-H 250 mm \times 4.6 mm 色谱柱。保留底物对映体过量值(ee_s)和收率 C 按公式(1–2)计算。

$$ee_s(\%) = \frac{[S]_S - [S]_R}{[S]_S + [S]_R} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

$$C(\%) = \frac{C_s}{C_p + C_s} \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

式中, [S]_S 和 [S]_R 分别为样品中 S 和 R 型甲酯的含量, ee_s 为(S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯的对映体过量值, C_p 为产物的摩尔浓度, C_s 为保

留底物的摩尔浓度。

1.6.2 酶活力测定:取 0.5 g 菌体或含有相同菌泥量固定化细胞, 加入含 1% (M/V)的(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯 Tris-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 8.0), 反应体系 20 mL, 37 °C 反应 10 min, 强酸终止反应, 液相检测产物生成量。以游离细胞的活力为 100%, 计算固定化细胞的活力收率。在上述条件下, 1 min 产生 1 μ mol (R)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸所需的酶量为一个酶活力单位(U)。比酶活即 1 g 固定化细胞所具有的酶活力单位。

2 结果和分析

2.1 菌种的筛选和鉴定

2.1.1 菌种的筛选: 脂肪酶/酯酶能够分解油脂, 加入罗丹明 B 的阳离子会与脂肪酶水解得到的脂肪酸发生络合作用, 在 365 nm 紫外灯下产生荧光, 可利用该方法对产酯酶/脂肪酶的菌株进行快速筛选, 结果如图 2。经过罗丹明 B 平板初筛, 挑取有荧光圈菌株接种到复筛摇瓶培养基, 30 °C 培养 3 d, 取菌液进行 HPLC 分析, 成功获得了一株能不对称水解(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯的菌株, 该菌株主要水解 R-甲酯, 保留构型为 S-甲酯, S-甲酯对映体过量值 $ee_s > 99\%$, 将该菌株初步命名为 cxzy-L013。

2.1.2 菌种形态和生理生化鉴定: 将菌株 cxzy-L013 划线于 LB 固体培养基, 30 °C 培养 3–5 d, 挑取菌落进行革兰氏染色, 在显微镜下观察, 菌体呈短圆杆状, 单个分散排列, 大小为(0.3–0.4) μ m \times (1.0–1.2) μ m, 为革兰氏阴性菌。菌株在 LB 平板上菌落呈规则状圆形, 边缘整齐, 直径 0.5–1.0 mm, 表面隆起, 湿润, 有光泽, 乳白色。在以葡萄糖、甘油为碳源的培养基上生长缓慢, 以甲醇、甲胺

盐酸盐、甲酸铵为碳源时生长较快。该菌株生理生化鉴定在本实验室完成, 部分生理生化特征结果如表 1。该菌株种生理生化特征与已报道 *Methylopila* 菌株 JZL-4^{T[11]}较为相似。

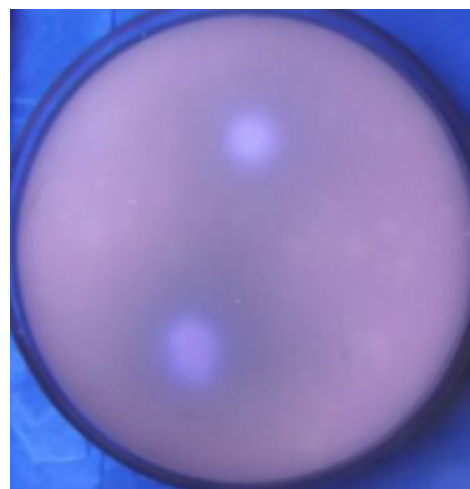


图 2. 罗丹明 B 平板

Figure 2. Rhodamine B medium. Using rac- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester as the inducer and Rhodamine B as the indicator.

表 1. 菌株 cxzy-L013 生理生化特征

Table 1. Physiological and biochemical tests for strain cxzy-L013

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Lysine decarboxylase	–	Sucrose	+
Arginine decarboxylase	–	Glucose	+
Ornithine decarboxylase	–	Raffinose	+
O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)	–	Xylose	+
Oxidase	+	Maltose	–
Catalase	+	Citrate	–
Voges-Proskauer (V-P)	–	Esculin	–
Urea	+	H ₂ S production	–
Methyl red (MR)	–	D-sorbitol	+
Starch	+	Dichloromethane	–
Gelatin	–	Methanol	+
Casein	+	Gelatin	–
Nitrate reduction to nitrite	+	Indole	+

+ : growth or positive; – : not growth or negative.

2.1.3 16S rRNA 分子生物学鉴定:以菌株 cxzy-L013 基因组为模板,采用通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增,将扩增序列交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,16S rDNA 序列长度为 1411 bp,将该序列在 NCBI 网站上用 BLAST 检索 GenBank 中相关菌株的 16S rDNA 序列,并进行核苷酸同源性比对,发现它与 *Methylophil* *oligotropha* strain 2395A、*Methylophil* *musalis* strain MUSA、*Methylophil* *jiangsuensis* strain JZL-4 有 98% 的相似性,该菌株 16S rRNA 基因序列的系统进化树如图 3。菌株与 *Methylophil* *oligotropha* strain 2395A 系统发育关系较为密切,结合菌株形态和生理生化特征,鉴定 cxzy-L013 为甲基球状菌属(*Methylophil*),将其命名为 *Methylophil* sp. cxzy-L013。

2.2 固定化细胞制备条件的优化

2.2.1 固定化试剂添加量的确定:聚乙烯亚胺与戊二醛联用较单一使用戊二醛固定化效果好。聚

乙烯亚胺与戊二醛通过交联能够在细胞表面形成一层聚合物膜^[12],提高固定化细胞稳定性。固定化体系中其他因素不变,分别考察不同体积分数聚乙烯亚胺以及戊二醛对固定化细胞酶活影响,以最高酶活为 100%,结果如图 4-A。当聚乙烯亚胺浓度为 0.15% (V/V),固定化细胞酶活力达到最高,高浓度的聚乙烯亚胺与戊二醛交联较为彻底,减弱了戊二醛与细胞蛋白交联作用,导致酶活回收率下降。当戊二醛浓度为 0.2% (V/V)时,固定化细胞酶活力达到最高,随后又大幅下降,可能是因为醛基与蛋白分子上的氨基发生多点结合,导致酶蛋白构象发生变化,使部分蛋白变性。固定化体系中其他因素不变,考察硅藻土添加量对固定化细胞酶活影响,以最高酶活为 100%,结果如图 4-B。加入硅藻土比未加硅藻土制备的固定化细胞酶活有明显提高,当硅藻土加量为 6 g/L,酶活力达到最大,随后有所降低。

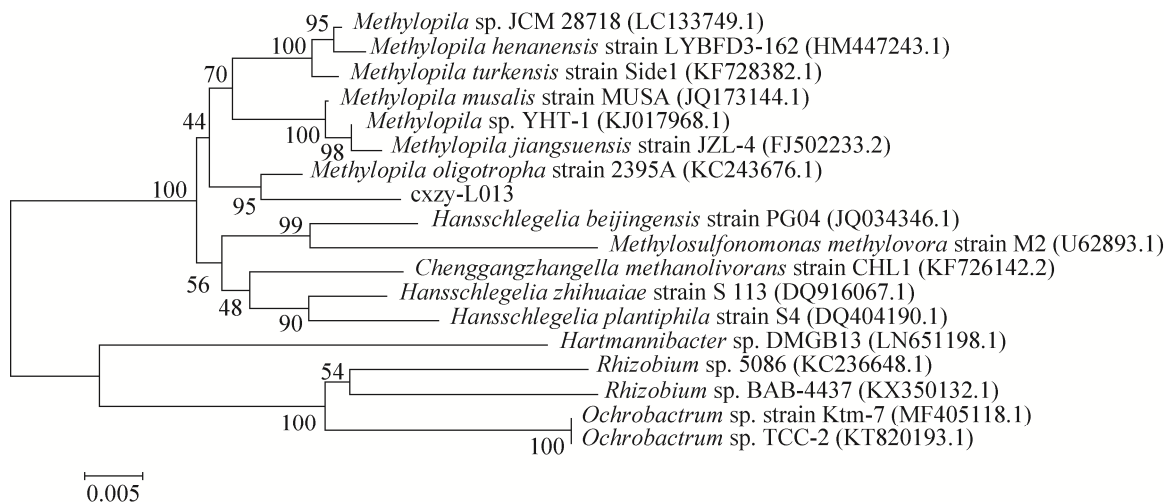


图 3. 菌株 cxzy-L013 的 16S rDNA 系统发育树

Figure 3. 16S rDNA phylogenetic tree of strain cxzy-L013. The numbers on branches indicate bootstrap values. The tree rooted was constructed by Kimura-2-Parameter model and N-J method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicate the percentage of bootstrap supporting. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. Bar=0.5% sequence divergence.

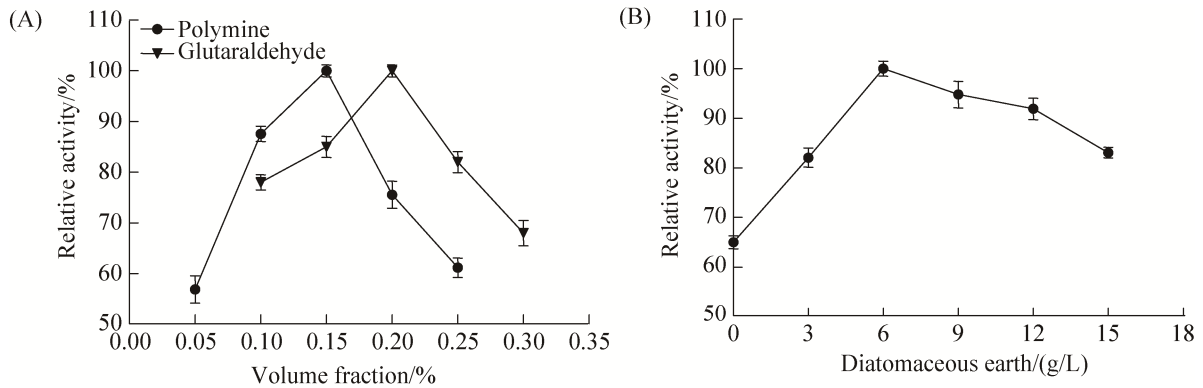


图 4. 固定化试剂添加量对固定化酶活的影响

Figure 4. Effect of immobilized reagent concentration on activity of immobilized cells. A: polymine and glutaraldehyde; B: diatomaceous earth.

2.2.2 菌体细胞添加量的确定: 固定化体系中其他因素不变, 固定化相同体积不同浓度的菌悬液, 测定固定化细胞酶活回收率和比酶活, 结果如图 5。随着菌体浓度提高, 酶活回收率整体呈下降趋势。当菌体浓度为 100 g/L 时, 比酶活达到最大 419.5 U/g, 此时酶活回收率为 75.9%, 细胞浓度过高, 可能硅藻土颗粒覆盖细胞较多, 增加传质阻力。

2.3 固定化细胞的催化性质

2.3.1 温度和 pH 对酶活力影响: 在不同的温度下, 分别测定游离细胞与固定化细胞酯酶的酶活, 以最高酶活为 100%, 结果如图 6-A。游离细胞的最适温度为 35 °C, 而固定化细胞为 40 °C。固定化细胞在 50 °C 仍保留 80% 以上酶活, 较游离细胞温度适应范围变宽。不同 pH 下, 分别测定游离细胞与固定化细胞酯酶的酶活, 以最高酶活为 100%, 结果如图 6-B。游离细胞的最适 pH 为 8.0, 而固定化细胞为 8.5, 向碱性方向偏移了 0.5 个单位, 固定化细胞对不同 pH 的适应能力明显强于游离细胞。将游离细胞与固定化细胞分别在不同温度下保温 6 h, 酶活的稳定性如图 7-A。在

30–45 °C 范围内固定化细胞仍保留 90% 以上的初始酶活, 在 50 °C 时游离细胞保留 45.6% 的初始酶活, 而固定化细胞仍保留 83.8% 的初始酶活, 较游离细胞的温度稳定性好。在 4 °C 下将游离细胞与固定化细胞分别在不同 pH 下保温 24 h, pH 稳定性如图 7-B。在 pH 6.0–7.0 范围内, 固定化细胞剩余酶活明显高于游离细胞, 在 pH 7.0–10.0 范围内, 固定化细胞剩余酶活仍保留初始时的 90% 以上, 表明固定化细胞 pH 适应范围较游离细胞更宽。

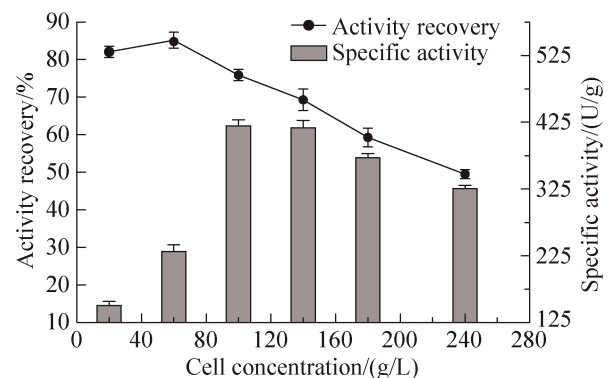


图 5. 菌体加量对固定化酶活的影响

Figure 5. Effect of cell addition on activity of immobilized cells.

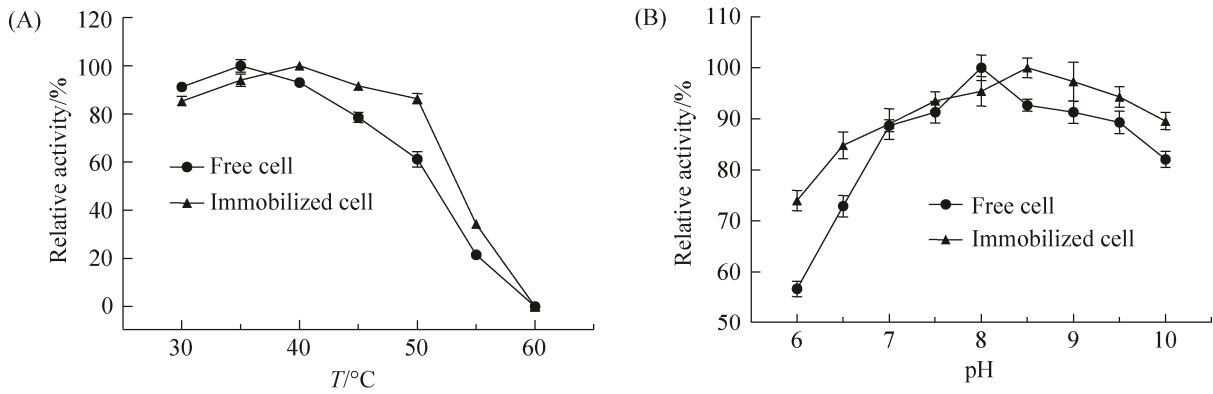


图 6. 温度(A)和 pH (B)对酶活力的影响

Figure 6. Effect of temperature (A) and pH (B) on enzyme activity.

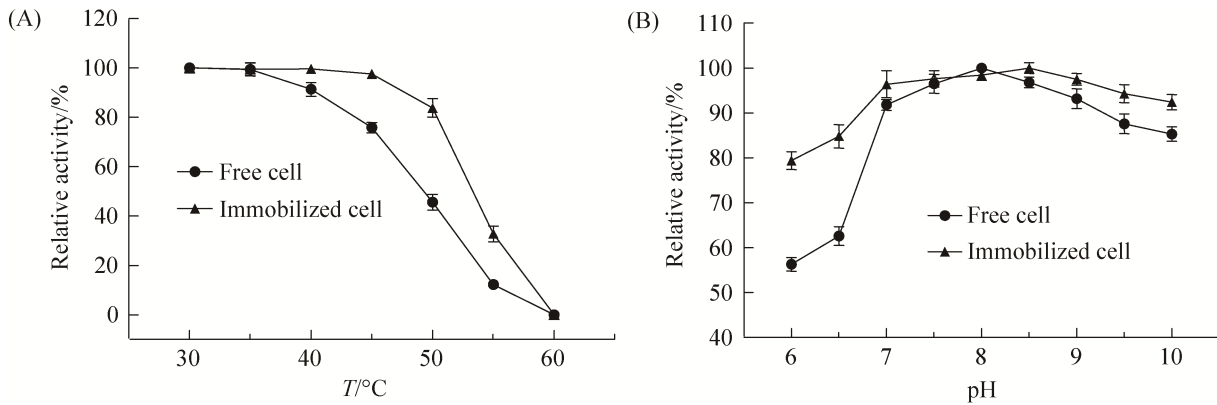


图 7. 温度(A)和 pH (B)对酶稳定性的影响

Figure 7. Effect of temperature (A) and pH (B) on enzyme's stability.

2.3.2 金属离子对酶活影响：分别测定加入 10 mmol/L 不同金属离子后游离细胞与固定化细胞的酶活，以不加金属离子时的酶活(CK)为 100%，结果如图 8。金属离子对固定化细胞和游离细胞影响相差不大， Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 能促进酶活， Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶活有一定的抑制，其他金属离子对酶活的影响较小。

2.3.3 有机溶剂对酶活影响：测定加入不同有机溶剂对酶活的影响，以未加入有机溶剂为对照(CK)，分别测定不同有机溶液及浓度下游离细胞与固定化细胞反应 1 h 的转化率,反应结果如表 2。

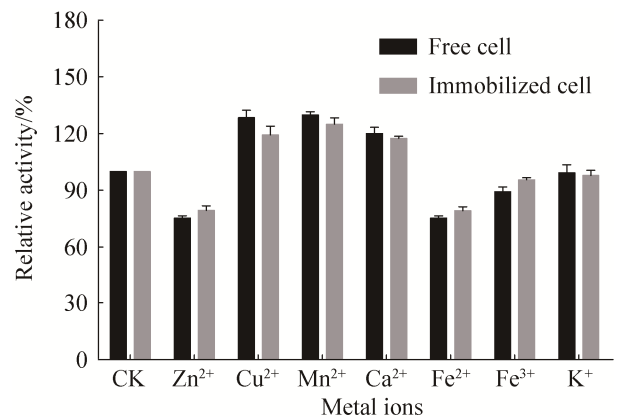


图 8. 金属离子对酶活的影响

Figure 8. Effect of various metal ions (10 mmol/L) on enzyme's activity.

表 2. 不同有机溶剂对酶活影响

Table 2. Effect of various organic solvent on enzyme activity in aqueous solution

Organic solvent	Solvent concentration/% (V/V)	Conversion of free cells/%	Conversion of immobilized cells/%
CK	0	21.8	16.9
Methanol	10	14.9	13.8
Isopropanol	10	27.9	21.6
Tert-butyl methyl ether	10	22.4	18.5
Toluene	10	29.6	27.3
	30	6.9	14.7
n-hexane	10	25.4	21.6
	30	3.8	11.9

10%的甲醇对酶活力有抑制作用, 10%的异丙醇、甲苯、正己烷对酶活有明显促进作用。30%甲苯和正己烷对酶活有明显抑制作用, 但相比游离细胞, 对固定化细胞影响较弱, 表明固定化细胞对有机溶剂耐受性有所提高。不同有机溶剂对游离细胞和固定化细胞的选择性没有明显的影响, (S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯的对映体过量值 ee_s 均大于 99%。

2.3.4 酶动力学测定: 测定了不同底物浓度下游离细胞与固定化细胞的酶反应速度, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法进行曲线拟合, 如图 9。游离细胞与固定化细胞米氏常数 K_m 分别为 3.59 mmol/L 和 3.85 mmol/L, V_{max} 为 0.35 mmol/(min·L) 和 0.27 mmol/(min·L)。相较于游离酶, 固定化细胞的 K_m 值变大, 可能是由于固定化细胞传质阻力增加, 使底物与酶的亲和力减弱。

2.4 固定化细胞催化水解(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯

(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯经固定化细胞催化 20 h, (R)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯已经被完全水解为酸, 保留构型为(S)- α -乙基-2-

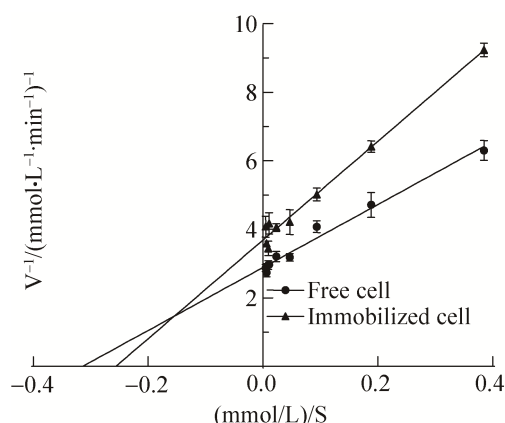


图 9. 酶反应速率和底物浓度的双倒数图

Figure 9. Double reciprocal of enzyme reaction rate and substrate concentration.

氧-1-吡咯烷乙酸甲酯, 得率为 47.8%, 对映体过量值 ee_s 为 99.4%。利用 HPLC 分析了水解 6 h 和 20 h 的情况, 如图 10。

2.5 固定化细胞操作稳定性

将固定化细胞按文中 1.5 转化工艺反应 20 h 后, 抽滤水洗用于下次催化反应, 考察固定化细胞操作稳定性, 结果如图 11。固定化细胞连续使用 12 次后仍可保留初始酶活的 80% 以上, 且连续使用 6 次后酶活有小幅上升, 可能是由于连续使用过程中交联度降低及细胞通透性增加, 减少底物传质阻力。该固定化细胞具有良好的操作稳定性。

3 结论

获得高光学纯度的(S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯是制备左已拉西坦的关键, 目前国内外仍采用化学法合成左已拉西坦, 苯乙胺是生产左乙拉西坦的重要拆分剂, 其对环境污染较严重, 导致化工厂污水治理费用较高, 而寻求生物拆分剂是左已拉西坦生产工艺转型的一条重要途径。本文从土样中筛选到一株可以选择性拆分(R,S)- α -

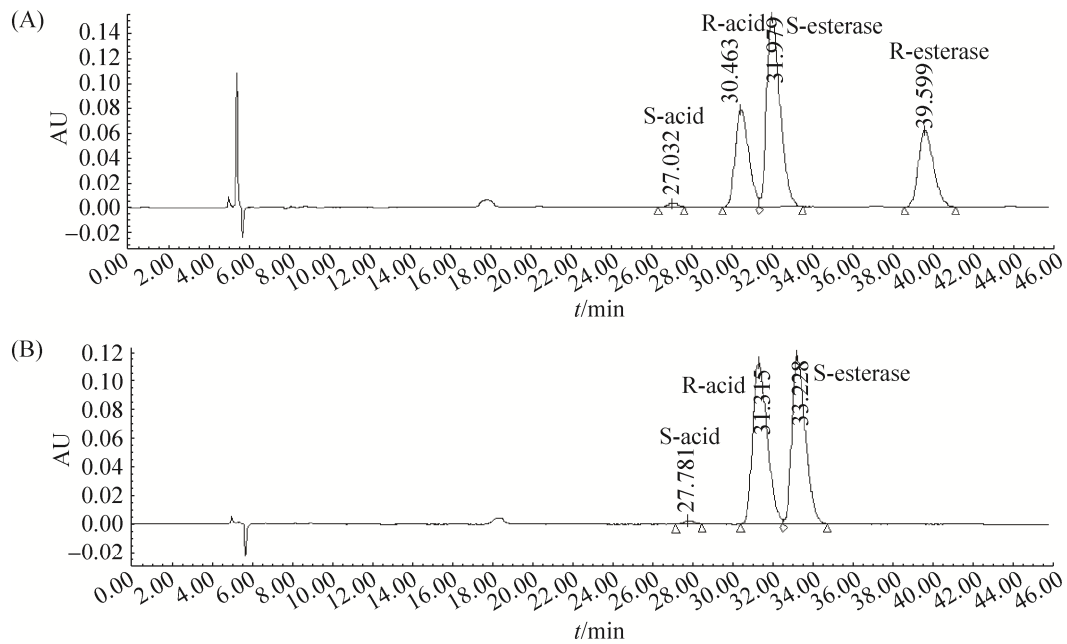


图 10. 固定化细胞水解外消旋甲酯反应 6 h 和 20 h 的 HPLC 图

Figure 10. HPLC graphs in the course of hydrolysis of racemic methyl ester catalyzed by immobilized cells. A: reaction 6 h; B: reaction 20 h.

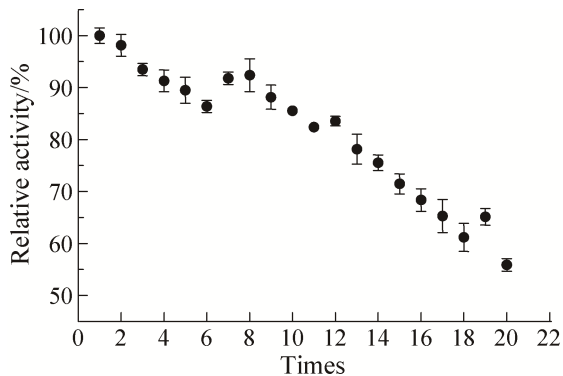


图 11. 固定化细胞操作稳定性

Figure 11. Recycling experiment for immobilized cells.

乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯菌种, 通过其形态、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析, 鉴定为甲基球状菌属 (*Methylopila*), 将该菌种命名为 *Methylopila* sp. cxzy-L013。

在对菌株 cxzy-L013 选用硅藻土-戊二醛吸附交联法固定化条件优化研究中发现聚乙烯亚胺添

加 0.15% (V/V)、戊二醛 0.2% (V/V)、硅藻土 6 g/L、菌体质量浓度 100 g/L 的条件下制备的固定化细胞比酶活达到最大 419.5 U/g, 酶活回收率为 75.9%。与游离细胞相比, 固定化细胞催化性质发生改变, 最适 pH 由 8.0 变为 8.5, 最适温度由 35 °C 变为 40 °C, pH 稳定性和温度稳定性都有所提高。金属离子对固定化细胞和游离细胞影响相差不大, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 能促进酶活, Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶活有一定的抑制作用。相较于水相反应体系, 10% 的异丙醇、甲苯、正己烷对酶活有明显促进作用, 10% 的甲醇、30% 甲苯和正己烷对酶活有明显抑制作用, 固定化细胞的有机溶剂耐受性较游离细胞有所提高。游离细胞与固定化细胞米氏常数 K_m 分别为 3.59 mmol/L 和 3.85 mmol/L, V_{\max} 为 0.35 mmol/(min·L) 和 0.27 mmol/(min·L), 固定化细胞与底物的亲和力较游离细胞要小。

利用固定化细胞水解(R,S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯, 底物浓度 200 g/L, 反应 20 h, 保留构型为 S 型, 得率 47.8%, 对映体过量值 ee_s 为 99.4%, 重复使用 12 次后仍可保留初始酶活的 80% 以上。目前笔者已利用该固定化细胞进行 5 批次的 1500 L 中试转化验证, 前两批转化符合预期, 后三批所需反应时间逐渐延长, 最后一批反应 30 h 将(R)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸甲酯水解完全, 由于固定化细胞在每次转化后需进行压滤以备下次使用, 该操作会损失部分固定化细胞, 可以在后续反应批次中补加一定量固定化细胞, 以达到与前两批转化相同的效果。如加大转化体系投酶量, 底物添加量仍有进一步提高的可能。该工艺具有一定的工业化应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Garrison AW. Issues on the enantioselectivity of chiral agrochemicals. *Chimica Oggi*, 2002, 20(10): 28–32.
- [2] Carrea G. Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. *Trends in Biotechnology*, 1984, 2(4): 102–106.
- [3] Bornscheuer UT. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26(1): 73–81.
- [4] Barros MD, Macedo GA. Biochemical characterization of esterase from soybean (*Glycine max* L.). *Food Science and Biotechnology*, 2011, 20(5): 1195–1201.
- [5] Qu WX, Yue XF. Progress in cell immobilization techniques and its application. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2007, (6): 121–123. (in Chinese)
- [6] Sander JW, Mitchell TN. Levetiracetam: a new antiepileptic drug for the adjunctive therapy of chronic epilepsy. *Drugs of Today*, 2001, 37(10): 665–673.
- [7] Genton P, van Vleymen B. Piracetam and levetiracetam: close structural similarities but different pharmacological and clinical profiles. *Epileptic Disorders*, 2000, 2(2): 99–105.
- [8] Löscher W, Richter A. Piracetam and levetiracetam, two pyrrolidone derivatives, exert antidystonic activity in a hamster model of paroxysmal dystonia. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 391(3): 251–254.
- [9] Wang P, Yan R, Huang J, He JY. Preparation of (S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidineacetic acid by microbial resolution. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2014, 42(6): 640–645. (in Chinese)
王普, 严人, 黄金, 何军邀. 生物拆分制备(S)- α -乙基-2-氧-1-吡咯烷乙酸工艺研究. *浙江工业大学学报*, 2014, 42(6): 640–645.
- [10] Xuan L. Study on microbial enzymatic synthesis of the chiral intermediate of levetiracetam. Master Dissertation of Zhejiang University of Technology, 2013. (in Chinese)
宣磊. 微生物酶法合成左乙拉西坦手性中间体的研究. *浙江工业大学硕士学位论文*, 2013.
- [11] Li L, Zheng JW, Hang BJ, Doronina NV, Trotsenko YA, He J, Li SP. *Methylopila jiangsuensis* sp. nov., an aerobic, facultatively methylotrophic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(7): 1561–1566.
- [12] Chen J, Zheng YG, Shen YC. Biosynthesis of *p*-methoxyphenylacetic acid from *p*-methoxyphenylacetoneitrile by immobilized *Bacillus subtilis* ZJB-063. *Process Biochemistry*, 2008, 43(9): 978–983.

Resolution of rac- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester by immobilized cell

Likun Zhang¹, Yanming Xiao^{1*}, Minfan Qian¹, Yanbing Yan¹, Jingya Li²

¹ Zhejiang Engineering Research Center of Industrial Biocatalysis and Transformation, Changxing Pharmaceutical Co., Ltd., Changxing 313100, Zhejiang Province, China

² College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Abstract: [Objective] We screened and identified a strain capable of enantioselectively hydrolyzing rac- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester, followed by using immobilized cells to catalyze the racemic ester. [Methods] We used rac- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester as esterase induction in the medium inoculated with soils to enrich the target microorganism. The strain with high activity for enantioselective hydrolysis of rac- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester was identified by 16S rRNA sequence analysis, morphological observation, physiological and biochemical properties. We optimized the immobilization conditions of the strain, studied the catalytic properties and operated stability of immobilized cells. [Results] We isolated a gram-negative bacterial strain which was identified as *Methylopila*. The optimal immobilization conditions were shown as follows: 0.15% (V/V) of polyimine, 0.2% (V/V) of glutaraldehyde, 6 g/L diatomite and 100 g/L cells. Compared with free cells, the optimum pH of immobilized cells changed from 8.0 to 8.5, the optimum temperature changed from 35 °C to 40 °C, the stability of pH and temperature was improved. Cu²⁺, Mn²⁺ and Ca²⁺ can improve enzyme activity, but Zn²⁺ and Fe²⁺ inhibited it. The organic solvent tolerance of immobilized cells was higher than that of free cells. Affinity of immobilized cells with substrates decreased with the increased K_m value. We used the immobilized cells to catalyze rac- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester at the concentration of 200 g/L for 20 h, the remaining substrate was (S)-ester with $ee_s > 99.4\%$ and the yield reached 47.8%. The relative activity of the immobilized cells remained 80% after 12 batches. [Conclusion] We established a process to produce (S)- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester from rac- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester by *Methylopila* sp. cxy-L013 immobilized cells as the catalyst, which has a great potential for industrialization.

Keywords: rac- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidineacetic acid methyl ester, biocatalysis, strain screening, immobilized cells, esterase

(本文责编: 李磊)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2015AA021004)

*Corresponding author. Tel: +86-572-6210258; E-mail: hrbxym1286@yeah.net

Received: 20 December 2017; Revised: 23 March 2018; Published online: 29 May 2018