

生物转化法生产L-苯基乙酰基甲醇的研究进展

李丹¹, 林建群¹, 林慧彬², 林建强¹, 曲音波¹

(1. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100; 2. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

摘要: 综述了L-苯基乙酰基甲醇(L-PAC)生物转化机理、菌种选育、转化体系选择、生产过程优化、下游处理等方面的研究进展。目前, 主要采用具有高活性的丙酮酸脱羧酶的 *Saccharomyces* 属和 *Candida* 属菌株, 以苯甲醛和丙酮酸为底物转化生产 L-PAC。生成副产物和底物苯甲醛的毒性是限制产量提高的主要因素。通过菌株筛选和选育可减少副产物生成并提高菌株耐受性。通过控制及优化转化过程参数、分批补加底物、采取固定化细胞或固定化酶措施及建立适宜的两相转化体系, 能有效提高产量。

关键词: L-苯基乙酰基甲醇; 生物转化; 麻黄碱

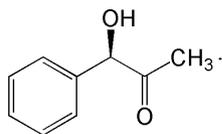
中图分类号: TQ223.142

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2009)01-0190-10

1 前言

L-苯基乙酰基甲醇(L-Phenylacetyl Carbinol, L-PAC), 又称为 1-羟基-1-苯基丙酮(1-Hydroxy-1-phenylacetone)、 α -羟基苯基甲基酮(α -Hydroxy benzyl methyl ketone), 是一种化学性质十分活泼的邻位羟基酮类化合物, 易形成分子内和分子间半缩酮类环状化合物^[1], 其分子量为 150, 分子式为 $C_9H_{10}O_2$, 结构为



L-PAC 是一种重要的有机合成中间体, 在制药业中作为前体合成 L-麻黄碱(L-Ephedrine)、D-伪麻黄碱(D-Pseudoephedrine)^[2], 还可用于合成安非他命(Amphetamine)、苯胺和苯丙胺等药物^[3]。

1921年, Neuberg 等^[4]首次采用生物转化法用酵母由苯甲醛和丙酮酸合成了 L-PAC。随后, Hildebrandt 等^[5]将 L-PAC 与甲基胺反应合成了麻黄碱, 获得美国专利。利用酵母选择性还原 1-苯基-1,2-丙二酮(1-Phenyl-1,2-propanedione)也能实现 L-PAC 的生物转化^[6]。利用生物途径合成 L-PAC 吸引了越来越多科学家的注意, 西方国家已获得许多相关生产技术的专利^[5,7-10]。近年来, 由于滥采滥挖, 导致野生麻黄草资源退化、匮乏和土地荒漠化。2000年6月国务院下达了《关于禁止采集和销售发菜制止滥挖甘草和麻黄草有关问题的通知》。由于麻黄草资源限制, 大多数麻黄碱生产企业因原料不足而处于半停产状态, 开工率只有 30%, 麻黄碱产量不足已严重

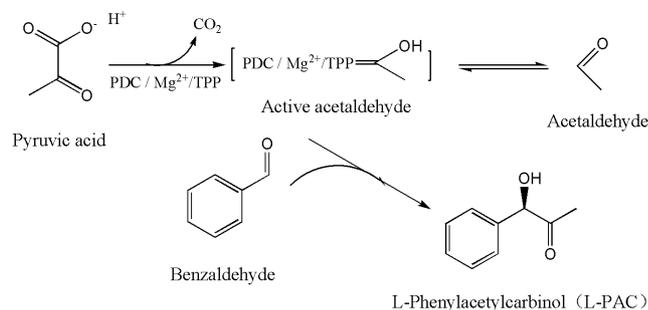
影响了我国医药企业的发展和麻黄碱类药品在国际市场上的竞争力, 开发新的技术路线生产麻黄碱成为亟待解决的问题。化学法合成麻黄碱条件严格, 产生的是 DL-麻黄碱和 DL-伪麻黄碱的外消旋体, 异构体的拆分困难, 成本太高^[11], 国内只有深圳沃兰德和内蒙古赤峰等厂家利用该法。生物合成法反应条件温和、反应速度快、产率高、产品光学纯度高, 国外已实现了产业化。目前我国生物转化法生产 L-PAC 和麻黄碱的研究较少, 极有必要加强研究, 加速推进产业化。本文就生物转化法生产 L-PAC 的机理、菌种选育、转化体系的选择、过程优化、下游处理和检测方法等方面的国内外最新研究进展作了较全面的概述。

2 生物转化机理

2.1 丙酮酸脱羧酶催化生产 L-PAC

Bringer-Meyer 等^[12]证实丙酮酸脱羧酶(Pyruvate Decarboxylase, PDC)是转化产生 L-PAC 的关键酶。PDC 是一种焦磷酸硫胺素(Thiamin Pyrophosphate, TPP)依赖性的非氧化酶, 广泛存在于各种微生物中。在 TPP 及 Mg^{2+} 的辅助下, PDC 能使 α -酮基羧酸脱羧, 其聚醛酶活性又能使其与醛类发生缩合反应, 生成手性 α -羟基酮类化合物^[13]。在微生物中, PDC 催化丙酮酸脱羧产生乙醇是主要的反应。PDC 结合丙酮酸生成活性乙醛, 活性乙醛被释放, 在醇脱氢酶(Alcohol Dehydrogenase, ADH)催化下生成乙醇。作为一个分支反应, 在苯甲醛存在的情况下, PDC 的聚醛酶活性能将活性乙醛与苯甲醛聚合, 生成 L-PAC, 见图 1^[14]。

PDC 在自然界中分布广泛, 酿酒酵母属

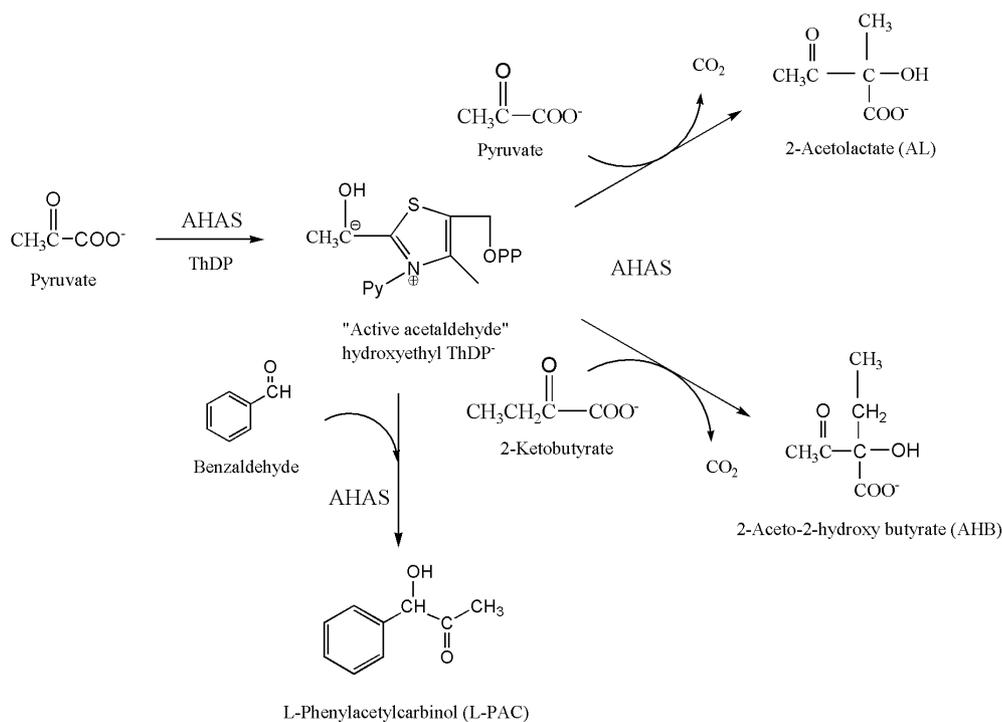
图 1 丙酮酸脱羧酶(PDC)催化合成 L-PAC 机制^[14]Fig.1 Catalytic mechanism of PDC in L-PAC biosynthesis^[14]

(*Saccharomyces species*)、有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora uvarum*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces species*)、曲霉属(*Aspergillus species*)等真菌,运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)、胃八叠球菌(*Sarcina ventriculi*)、醋酸杆菌属(*Acetobacter species*)、解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)等细菌中都含有 PDC^[15]. 酵母的 PDC 酶活力较高,酵母细胞对苯甲醛、L-PAC 等底物和产物的耐受性也较高,是全细胞生物转化生产

L-PAC 的理想微生物种类. 但在进行全细胞发酵时,在醇脱氢酶的作用下会生成苯甲醇、乙醛、PAC 二醇(1-Phenyl-1,2-propenediol, PAC-diol)等还原性副产物;此外,活性乙醛还可与另一分子丙酮酸反应,生成 3-羟基丁酮^[16]. 这些副反应降低了 L-PAC 的转化率,且对菌体细胞也有不同程度的毒害作用.

2.2 乙酰羟酸合酶催化生产 L-PAC

乙酰羟酸合酶(Acetoxyacid Synthase, AHAS or Acetolactate Synthase, EC 4.1.3.18)是一种二磷酸硫胺素(Thiamin Diphosphate, ThDP)依赖性酶,催化丙酮酸和 2-酮酸生成 S-乙酰羟酸,具有高度立体选择性^[17]. Engel 等^[18]发现 AHAS 能高效地催化苯甲醛和丙酮酸反应合成 L-PAC. AHAS 能催化丙酮酸脱羧,形成 ThDP-结合活性乙醛(E-HEThDP). 这一中间体可与另一分子的丙酮酸形成 2-乙酰乳酸,或与另一分子的 2-丁酮酸形成 2-乙酰-2-羟丁酸^[19]. 在苯甲醛存在的情况下, E-HEThDP 可以将活性乙醛和苯甲醛缩合形成 L-PAC, 见图 2^[17].

图 2 乙酰羟酸合酶(AHAS)的催化机制^[17]Fig.2 Catalytic mechanism of AHAS^[17]

AHAS 存在于多种原核生物和酵母中,鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)及多种杆状细菌具有不同的 AHAS 同工酶^[17]. 大肠杆菌中的 3 种 AHAS 同工酶(AHASI, AHASII, AHASIII)在室温下均能保持稳定,都具有很高的 L-PAC 起始转化率和立体选择性. 其中, AHASI 底物利用率、

L-PAC 生成率最高、对苯甲醛的耐受力最好,可达 80 mmol/L(AHASII 只能耐受 40 mmol/L),对 L-PAC 的反馈抑制不敏感、底物范围相对宽泛,除苯甲醛外,其他芳香醛也能作为底物与丙酮酸生成相应的产物,是 3 种酶中最有效的. AHASIII 转化率相对低,但立体选择性最好^[18].

与 PDC 催化系统相比, AHAS 的活性位点能很好地防止质子化, 因此转化后只有痕量乙醛产生, 底物利用率和转化率更高. AHAS 值得进一步研究, 特别是提高其对有机物的稳定性, 以应用于酶转化法工业合成 L-PAC.

2.3 非对称还原 1-苯基-1,2-丙二酮生产 L-PAC

Takeshita 等^[20]发现通过酵母还原 1-苯基-1,2-丙二酮(1-Phenyl-1,2-propanedione)(1)可生成手性 L-PAC(2). 该法存在另 2 种副产物: 1-苯基-1,2-丙二醇(1-Phenyl-1,2-propanediol)(3)和 1-苯基-2-羟基丙酮(1-Phenyl-2-hydroxy-propanone)(4), 且副产物(4)的产量远大于 L-PAC(见图 3^[6]). 通过添加酶抑制剂 MVK (Methyl Vinyl Ketone)能有效阻断反应 II 和 IV, 减少副产物(3)的量. 但由于各途径都涉及一种到多种酶, 影响因素复杂. 通过条件优化, 阻断途径 III, 强化途径 I, 提高底物(1)的立体选择性, 是实现其不对称还原、过量生产 L-PAC 的关键^[6]. 与生物转化法相比, 此法影响因素复杂, 反应不易控制, 产物分离困难, 目前仍处于实验室研究阶段.

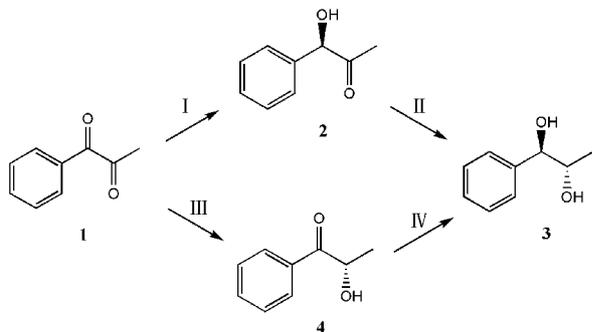


图3 酶催化还原 1-苯基-1,2-丙二酮生产 L-PAC 机理^[6]

Fig.3 Mechanism of L-PAC production by enzymatic catalytic reduction of 1-phenyl-1,2-propanedione^[6]

3 生物转化菌种

不同种类的微生物其胞内关键酶(如聚醛酶)活性不同, 关键酶及菌体对酶转化底物和产物的耐受性不同, 催化副反应的酶活性也不同, 从而使不同微生物具有不同的 L-PAC 转化效率. 对于以 PDC 进行转化的菌株, 理想的转化菌株应具有高 PDC 活性、低 ADH 活性及对苯甲醛、苯甲醇、L-PAC 具有高耐受性^[21]. 为此, 对包括细菌、酵母菌、霉菌等多种微生物转化生产 L-PAC 进行了细致的研究.

与细菌和霉菌相比, 各种酵母菌的 L-PAC 产量较高, 对底物和产物的耐受性也较好^[22,23]. 不同种类的酵母菌中, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)转化生成 L-PAC 的产量较高, 但对苯甲醛的耐受性一般; 裂殖酵

母(*Schizosaccharomyces pombe*)对苯甲醛耐受性最好, 但聚醛酶活性较低; 产阮假丝酵母(*Candida utilis*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)及白假丝酵母(*Candida albicans*)具有较高的聚醛酶活性和中等的对苯甲醛的耐受性^[14]. 目前研究 L-PAC 转化常用的菌株是酿酒酵母和产阮假丝酵母. 相对于其他转化菌株, 它们是食品添加剂的安全生物(Generally Regarded as Safe, GRAS), 且在严格好气的情况下不会产生乙醇, 生长也只需最小的营养供给, 发酵密度高^[24]. 其中, 又以产阮假丝酵母生成的副产物最少, 几乎没有苯甲醇生成, 乙醛、3-羟基丁酮等副产物也相对较少.

少数细菌如运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)能利用苯甲醛和乙醛为底物生成 L-PAC. 由于乙醛成本低于丙酮酸, 在工业上有很大优势^[25]. *Z. mobilis* 胞内 PDC 含量是酵母的 5 倍, 但由于其 PDC 对醛的亲合力较差, 所以 L-PAC 产量较低^[26]. 一般而言, 能发酵葡萄糖的菌株都具有聚醛酶活性, 但一些不能发酵葡萄糖的菌株, 如 *Candida rugosa* 也具有聚醛酶活性^[14]. 而 *C. utilis* 的 PDC 脱羧酶活性几乎是聚醛酶活性的 3 倍^[27].

通过驯化、温度和紫外及化学诱变、定点突变等手段改造菌株, 可筛选出各种品质优良的菌株用于 L-PAC 生产. 酿酒酵母进行长期诱导、驯化后, 对苯甲醛的耐受性可达 0.9%^[28]. 采用紫外、化学联合诱变, 可获得耐受高苯甲醛浓度、具有高转化活力、遗传稳定性良好的酵母菌变异株^[29]. 通过亚硝酸诱变, 酿酒酵母转化苯甲醛的能力大大增强, 提高了 L-PAC 产量^[30]. 而通过定点突变改造运动发酵单胞菌的 PDC, 提高其聚醛酶活也使 L-PAC 产量得以提高^[31,32]. Nikolova 等^[33]发现酿酒酵母突变株在 ADHI, ADHII, ADHIII 缺失时仍然有乙醇和苯甲醇生成, 推断可能还存在同功酶 ADHIV. 到目前为止, 对 L-PAC 生产菌株进行基因工程和代谢工程育种的报道仍较少见.

4 转化体系的选择

4.1 全细胞转化法

Nikolova 等^[33,34]最初用酿酒酵母全细胞转化生产 L-PAC, 产量只有 1~3 g/L, 副产物苯甲醇的浓度为 0.1~0.5 g/L. Mochizuki 等^[35]通过进一步优化转化条件, L-PAC 产量达到 15 g/L, 副产物苯甲醇为 5 g/L. 目前, 面包酵母全细胞工业化生物转化 L-PAC 的产量可达 10~12 g/L^[36]. 全细胞转化 L-PAC 的最高浓度一般在 10~22 g/L, 相对于苯甲醛的产率为 55%~70%^[36-39].

全细胞转化不需要裂解细胞、纯化酶, 制备简单, 且能在较高温度下保持良好的催化稳定性, 酶活性还可

以再生. 与酶转化法相比, 能以蔗糖、糖蜜等为底物代替丙酮酸, 降低了原料成本; 生成少量的副产物乙醇在一定程度上提高了苯甲醛的溶解度^[40]. 但全细胞转化法也有其缺点: 底物苯甲醛有较高的细胞毒性, 限制了反应体系中苯甲醛浓度的提高, 影响生产效率; 醇脱氢酶或其他氧化还原酶使苯甲醛部分转化为副产物苯甲醇, 造成底物损耗^[41]; 细胞存在底物输入、产物输出细胞的传质限制. 但比较而言, 全细胞生物转化生产 L-PAC 省去了酶转化法酶的分纯化步骤, 辅酶可以自动再生, 不需要添加昂贵的辅酶或构建复杂的辅酶再生系统, 细胞的大量制备方法简单, 成本低, 固定化细胞还可以再生. 因此, 全细胞转化法还是比较经济可行的, 并且已实现了工业化生产^[36].

4.2 部分纯化的 PDC 酶转化法

湿菌体经玻璃珠研磨、丙酮沉淀后, 获得部分纯化的 PDC, 用于催化生产 L-PAC. Shin 等^[42]通过控制产阮假丝酵母的发酵条件和葡萄糖的脉冲供给, 提高 PDC 酶活, 并确定了部分纯化的 PDC 用于生产 L-PAC 的最佳条件. 在 8~10 h 内 L-PAC 浓度达 28.6 g/L, 使苯甲醛的理论产率达到 95.3%. 产阮假丝酵母的 PDC 对苯甲醛的耐受力高, 稳定性好, 副产物少, 酶法转化 L-PAC 的最高产量可达 50~51 g/L^[43,44]. Rosche 等^[45]使用爪哇根霉(*Rhizopus javanicus*)NRRL 13161 部分纯化的 PDC, L-PAC 产量达 50.6 g/L(337 mmol/L), 苯甲醛的摩尔转化率达 97%.

用酶法生产 L-PAC, 酶活性高, 不存在传质障碍, 提高了底物的利用率、生产速率和产物浓度, 苯甲醛能获得最大转化率且无副产物苯甲醇产生^[40]. 但该方法也存在一些不利因素: (1) 需要进行 PDC 的预分离, 成本较高; (2) 需要辅酶因子—焦磷酸硫胺素(TPP)再生体系或不断添加辅酶因子, 增加了技术难度和成本; (3) 由于没有细胞基质的保护, 酶在丙酮处理、冷冻干燥等过程中结构发生改变, 稳定性降低; 高浓度底物对酶有抑制、失活作用; 转化过程中释放的 CO₂ 也易造成酶在气液界面失活^[25]; (4) 由于不能通过糖酵解途径得到丙酮酸, 必须使用价格较高的丙酮酸, 而目前即使经过反应条件优化丙酮酸最高转化率也只有 50%~60%^[40], 增加了底物成本; 此外, 丙酮酸快速脱羧导致乙醛大量积累及转化体系的 pH 波动均使 PDC 迅速失活, 降低经济效益.

为使 PDC 酶转化方法更具实用性, 有必要利用固定化酶方法, 增加酶的稳定性和酶的使用次数, 降低催化剂的相对成本; 同时, 还必须构建简单实用的辅酶再生体系, 避免使用价格昂贵的辅酶.

4.3 固定化细胞或固定化酶转化法

固定化细胞或酶能最大限度地降低底物抑制, 稳定和延长转化时间, 提高催化剂反复使用次数, 简化产物回收. Nikolova 等^[34]比较了多种不同的固定化材料, 发现不同的固定化材料对菌体生成 L-PAC 和苯甲醇的比例有影响. 其中, 用亲水性的光诱导聚合的高聚物 ENT-4000(含聚乙二醇)固定酵母, 能获得最高浓度的 L-PAC(3.75 mmol/L); 而用聚丙烯乙二醇(Polypropyleneglycol, PU3)包埋, 能使 L-PAC 与苯甲醇的比例最大化(1:0.08). Mahmoud 等^[26]用海藻酸钠固定 *S. cerevisiae*, 菌体能耐受 0.6% 苯甲醛, L-PAC 产量提高了 7.5 倍. Shin 等^[46]利用海藻酸钙固定 *C. utilis*, 分批补料供给葡萄糖, 并使苯甲醛浓度维持在 2 g/L、呼吸熵(Respiratory Quotient, RQ)保持在 5~7, 最终获得 15.2 g/L 的 L-PAC. 固定化酵母菌半连续转化生产 L-PAC 可重复使用 7 次, 持续转化超过 200 h^[47]. Mandwal 等^[48]用 100 g/L 聚丙烯酰胺(Polyacrylamide gel)固定酿酒酵母转化 L-PAC, 在搅拌罐中可反复使用 14 次, L-PAC 产量提高了 31%. 固定化细胞使用后, 经活化可延长使用周期. Mahmoud 等^[47]发现以较低的起始细胞浓度开始转化, 在第 1 次循环后立即活化, L-PAC 产量提高了 1.5 倍, 但之后的 3~7 次循环活化对产量影响不大. Shin 等^[40]用聚丙烯酰胺固定化 *C. utilis* 的 PDC, 使其能够耐受 300 mmol/L 的苯甲醛, 在连续转化过程中半衰期达 32 d.

固定化的主要缺点是传质阻力增加及固定化颗粒大量制备步骤比较繁琐. 但由于固定化有利于提高细胞或酶对底物和产物的耐受性, 固定化细胞或酶可以重复使用, 从而相对降低了催化剂成本. 因此, 固定化仍然是较理想的 L-PAC 生物转化的方式之一.

4.4 非传统介质中的转化法

从水相转化体系中抽提产物并将其与其他副产物分离, 过程复杂, 操作困难. 向反应体系中引入有机介质, 不仅能简化产物分离过程, 还可以增加反应物溶解度, 使反应平衡发生移动, 改变反应的选择性, 提高生产效率及产量^[49].

采用两相转化体系可减少苯甲醛的毒害和 L-PAC 的反馈抑制, 提高产量. Nikolova 等^[50,51]研究了面包酵母转化生产 L-PAC 的两相溶剂系统, 在其所研究的溶剂中, 己烷和十六烷效果最佳, 能获得最高的 L-PAC 产量; 而二甲苯、氯仿效果最差. Kostraby 等^[49]在此基础上, 利用比己烷更廉价、低毒的石油精(沸程为 40~60 °C)作有机相, 室温下 24 h L-PAC 的转化率达到 30%, 对映体纯度达到 86%. Rosche 等^[52]利用 *C. utilis* 休止细胞两

相转化系统生产 L-PAC, 发现庚醇、辛醇作为溶剂时, 均具有很高的 L-PAC 产量, 而庚醇转化速度更快、副产物 3-羟基丁酮量更少, 但其价格是辛醇的 2 倍. 从经济上考虑, 获得相近的 L-PAC 终浓度, 1-辛醇作为溶剂更适宜. 当辛醇/水体积比为 1:1、于 21℃ 转化 15 h, L-PAC 在辛醇中的浓度可达 103 g/L, 在水相中的浓度为 12.8 g/L. 与传统的水相全细胞转化相比, 苯甲醛转化率提高了 26%, L-PAC 浓度提高了 3.9 倍, 生产效率提高了 3.1 倍, 达到 3.9 g/(L·h), 细胞催化效率提高了 6.9 倍, 达到 10.3 g/g.

Standford 等^[53]利用部分纯化的 *C. utilis* 的 PDC 在辛醇-水两相体系中转 L-PAC, 与水相体系相比, 转化速率提高了 46%, PDC 的半衰期可达 170~175 h, 辛醇中的苯甲醛浓度可达 1800 mmol/L, 而水相中仍维持 20~50 mmol/L 的低苯甲醛浓度. 在辛醇/水体积比 1:1、起始酶活 8.5 U/mL、快速搅拌条件下, 49 h 后辛醇中的 L-PAC 可达 937 mmol/L(141 g/L), 水相中含量为 127 mmol/L(19 g/L). Rosche 等^[54]利用 *Z. mobilis* 的 PDC 在辛醇-水两相体系中进行催化反应, 单位酶活的 L-PAC 产量达到 11 mg/U PDC. 根据 Eckstein 等^[55]的两相平衡模型, 低溶剂比会获得更高的平衡转化率. Gunawan 等^[56]将辛醇/水由 1:1 降至 0.43:1, 利用部分纯化的 *C. utilis* 的 PDC 于 4℃ 下生产 L-PAC, 辛醇相中的 L-PAC 产量

增加至 183 g/L, 总产率提高 10%. 在 0.43:1 相比、20℃ 下, 辛醇中 L-PAC 含量增至 212 g/L, 总产率提高 30%, 但副产物量也随之增加.

Rosche 等^[52]发现, 与部分纯化的 *C. utilis* PDC 两相转化系统相比, 利用 *C. utilis* 休止细胞两相转化系统, 可使 4℃ 下 L-PAC 生成速率提高 4 倍, 且在 21℃ 下副产物 3-羟基丁酮量不随温度升高而增加. 这可能与休止细胞受有机溶剂影响小、能保持良好的催化稳定性有关.

两相转化体系中引入有机溶剂, 在全细胞转化时会严重影响细胞活力, 在酶法转化时易造成酶在两相界面失活. 这些缺点可通过用休止细胞代替生长细胞^[57]、调整搅拌方式及速率^[53]等手段克服. 但某些有机溶剂会严重阻碍糖酵解, 细胞无法利用葡萄糖, 必须以较为昂贵的丙酮酸为底物, 增加了成本^[52]. 通过溶剂优化有望克服上述缺点, 筛选合适的溶剂体系是两相转化体系成功的关键. 另外, 以乳浊液形式提供苯甲醛和丙酮酸也可获得相对较高的 L-PAC 产量(50.6 g/L)^[45].

两相转化体系对脂溶性底物具有缓释效应, 从而减少了底物对生物体的毒性作用. 此外, 脂溶性产物也被富集到有机相中, 降低了水相中的浓度, 减小了产物抑制, 有利于 L-PAC 的高产及产品的分离提取, 是一种较理想的 L-PAC 生物转化方式. 本研究小组利用两相转化系统使 L-PAC 浓度比水相转化体系提高了 4.5 倍.

表 1 不同转化方法 L-PAC 产量的比较
Table 1 Productivity of L-PAC with different methods

Method of biotransformation		L-PAC yield (g/L)	Microorganism	Ref.
Traditional biotransformation	Batch cultivation with benzaldehyde, glucose and free cells	3.3	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	[58]
	Glucose added to the free cells, benzaldehyde dosed at intervals	4.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[59]
	Batch cultivation with benzaldehyde, pyruvate and free cells	43.3	<i>Candida utilis</i>	[16]
	Batch cultivation with benzaldehyde, pyruvate and pyruvate decarboxylase	51.2	<i>Candida utilis</i>	[44]
Biotransformation using immobilized cells or PDC	Semicontinuous process with benzaldehyde and acetaldehyde in the presence of β -cyclodextrin and glucose using immobilized cells	5.3	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	[60]
	Benzaldehyde and glucose were converted by immobilized cells in a stirred tank reactor	29	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[48]
	Fed-batch process with benzaldehyde and glucose, using immobilized cells	15.2	<i>Candida utilis</i>	[46]
	Batch cultivation with benzaldehyde, pyruvate and immobilized pyruvate decarboxylase	27.1	<i>Candida utilis</i>	[40]
Biotransformation in two-phase system	Free cells with benzaldehyde and pyruvate in aqueous/octanol two-phase system with 1:1 phase ratio	103 (Octanol phase) 12.8 (Aqueous phase)	<i>Candida utilis</i>	[52]
	Partially purified pyruvate decarboxylase with benzaldehyde and pyruvate in aqueous/octanol two-phase system with 1:1 phase ratio	140.6 (Octanol phase) 19.1 (Aqueous phase)	<i>Candida utilis</i>	[53]
	Partially purified pyruvate decarboxylase with benzaldehyde and pyruvate in aqueous/octanol two-phase system with 1:0.43 phase ratio	212.4 (Octanol phase) 25.8 (Aqueous phase)	<i>Candida utilis</i>	[56]

5 优化生产条件

5.1 减少细胞毒害

L-PAC 转化率低很大程度上是因为苯甲醛、苯甲醇、乙醛、L-PAC 等具有细胞毒性的底物、副产物和产物抑制了菌体的活性, 甚至影响细胞膜的通透性. 另一方面, 底物、副产物对酶也有抑制作用. 苯甲醇能强烈抑制酵母的 PDC^[2], 苯甲醛对真菌的 PDC 有抑制和钝

化作用^[36], 副产物乙醛是真菌 PDC 的可逆抑制剂^[61,62]、对运动发酵单胞菌 PDC 有很强的抑制作用^[32]. 虽然浓度为 15 g/L 的 L-PAC 对运动发酵单胞菌的 PDC 没有明显的抑制作用^[36], 但更高浓度的 L-PAC、3-羟基丁酮是否对 PDC 有抑制作用还不清楚. 通过以下方法可以有效减缓底物和副产物的毒害和抑制作用.

(1) 分批添加苯甲醛, 控制其浓度. 提高苯甲醛初始浓度虽然会提高 L-PAC 的初始生成速率, 但会严重降

低酵母菌的活力,导致转化提前终止. Long 等^[2]发现 0.5 g/L 苯甲醛会减缓 *S. cerevisiae* 生长, 1~2 g/L 会抑制生长, 3 g/L 会使细胞活力大幅下降. 通过分批补加或半连续补加方法, 使苯甲醛维持在较低的浓度, 可减轻对细胞的毒害, 延长 L-PAC 生产周期, 获得较高的总产量. Agarwal 等^[59]发现当苯甲醛浓度<4 mmol/L(0.6 g/L)时, 产物主要是苯甲醇; 要获得最大的 L-PAC 转化率, 苯甲醛浓度应保持在 4~16 mmol/L(0.6~2.4 g/L). Rogers 等^[36]通过分批补料, 使苯甲醛浓度维持在 1~2 g/L, 延长了细胞转化生产 L-PAC 的时间. Mochizuki 等^[35]通过逐步添加苯甲醛, 使其浓度保持在 50 mmol/L, 获得 10.5 g/L 的 L-PAC, 苯甲醛转化率达 35%. Mahmoud 等^[47]使用固定化酿酒酵母, 半连续添加苯甲醛(0.2 mL/15 min)能使苯甲醛总浓度提高至 12 g/L 而不影响细胞转化活性, L-PAC 产量提高至 10 g/L. 宁华中等^[63]发现, 酵母菌在不同生长阶段和培养条件下对苯甲醛的耐受性不同, 在转化的前 1/3 时间加入占总量 1/2 的苯甲醛, L-PAC 产率高于按时间平均加入.

通过控制苯甲醛浓度及加速 L-PAC 的生成, 可有效减少副产物苯甲醇的产生. Mochizuki 等^[35]发现, 全细胞转化开始 2 h 内, 由于部分丙酮酸形成乙酰辅酶 A 提供 NADH, 苯甲醇的合成较快, 但随着 L-PAC 的累积, 苯甲醇的生成变慢, 在随后的 3~6 h, L-PAC 迅速增加, 当其浓度达 33 mmol/L(约 5 g/L)时, 苯甲醇的合成几乎停止. 因此推测 L-PAC 可能是醇脱氢酶的抑制剂.

(2) 使用助溶剂. 苯甲醛在水中(100 g)的溶解度为 0.03 g, 助溶剂可提高其溶解度. 常用的助溶剂包括乙醇、甘油、PEG 等. 添加乙醇(2~3 mol/L)可使 L-PAC 的起始合成速率增加 1.4 倍, 因为乙醇增加了苯甲醛的溶解度, 并影响 PDC 的活性中心. 但在较高底物浓度下(100 mmol/L 苯甲醛), 添加乙醇并不能提高 L-PAC 的产量^[16,45], 推测在高浓度苯甲醛和 L-PAC、各种副产物存在的情况下, 乙醇可能加速了酶的钝化. 添加 2 mol/L 甘油能使酶转化法生产 L-PAC 的初始转化速率提高 50%, L-PAC 终浓度由 40 g/L 增至 51 g/L^[64]. 添加 0.75 mol/L 山梨糖醇、100 g/L PEG 也有类似的作用. 而 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)虽能使苯甲醛完全溶解, 但并未使 L-PAC 产量提高^[65]. 因此认为 L-PAC 产量受限并非因为苯甲醛的低溶解度, 而是高浓度苯甲醛造成严重的细胞毒害从而影响转化^[26].

环糊精可与苯甲醛形成包含络合物(Inclusion complexes), 使其缓慢释放, 减少苯甲醛的毒害作用. 高浓度 β -环糊精对防止苯甲醛氧化有一定作用^[60]. Mahmoud 等^[65]发现添加 0.5%~1%环糊精还能轻微促进

细胞生长, 加快葡萄糖代谢速率, 1% β -环糊精能使固定化酵母的苯甲醛转化率由 57%增至 77%, L-PAC 产量达 12 g/L. Shukla 等^[60]利用 2% β -环糊精提高了戴尔凯氏有孢圆酵母(*Torulasporea delbrueckii*)对苯甲醛、乙醛的耐受力, 可在高达 9 g/L 的苯甲醛浓度下转化生产 L-PAC.

Satianegara 等^[57]在研究 *C. utilis* 部分纯化的 PDC 的两相转化体系时发现, 人工合成的阴离子表面活性剂 AOT[Sodium bis(2-ethyl-1-hexyl) sulfosuccinate]具有与环糊精相似的作用, 该体系加入 50 mmol/L AOT 后, 虽然没有增加苯甲醛在两相体系中的分配系数, 但由于降低了底物进入酶微环境的速率, 并能避免酶在两相界面中失活, 24 h L-PAC 的产量可达 210 mmol/L(约 32 g/L).

(3) 丙酮酸利于 PDC 在苯甲醛乳浊液中保持稳定^[64]. 在含 2 mol/L 甘油、345 mmol/L 苯甲醛、420 mmol/L 丙酮酸的转化体系中, 转化开始的第 1 h, PDC 酶活没有任何损失. 同样条件下去除丙酮酸, 不到 30 min, PDC 完全失活. 丙酮酸应以缓冲液的形式添加, 以避免因改变体系 pH 而影响产量. 丙酮酸与苯甲醛的量保持一定比例有利于 L-PAC 产量的增加^[63]. Vojtisek 等^[37]通过缓慢添加 8.5%丙酮酸钠, 使 L-PAC 总产量提高 30%, 并发现全细胞转化反应中, 反应开始 6 h 后补加丙酮酸钠, 转化又恢复原初始速率, 而不补加丙酮酸钠的则不再生成 L-PAC. 说明丙酮酸钠浓度很大程度上决定了 PDC 的活性和 L-PAC 的生成. 当转化液丙酮酸耗尽后, 胞内的丙酮酸浓度将决定 L-PAC 的合成水平.

(4) 形成生物被膜(Biofilm)可以提高菌体对苯甲醛耐受力^[66]. 运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 经 50 mmol/L 苯甲醛处理 1 h, 生物膜体系的 PDC 活性仍可保存 45%, 而浮游细胞体系的 PDC 则完全失活. 而经 30 mmol/L 苯甲醛处理 3 h, 生物膜体系剩余的 PDC 酶活性是浮游细胞体系的 6 倍^[66].

5.2 反应条件控制

(1) 细胞转化法溶解氧浓度控制. 转化液中的溶解氧(Dissolved Oxygen, DO)浓度可通过调整通气量、搅拌速度、加液量、充氮气和添加消泡剂等多种方法进行控制^[21,35]. Shin 等^[42]发现呼吸熵为 4~5 时, 最适宜 *C. utilis* 的生长及 L-PAC 转化. 而通过控制呼吸熵, 优化野生型 *C. utilis* 的代谢, 可使 L-PAC 产量达 22 g/L^[36]. Agarwal 等^[59]在优化酿酒酵母转化过程参数时发现, DO 保持在 75%~85%时苯甲醛转化率可达 86%. Sambamurthy 等^[67]在 PDC 起始酶活 7 U/mL、苯甲醛 200 mmol/L 的条件下, 通过调整通气率, 使苯甲醛转化率达 95%. Mandwal 等^[48]发现 0.75 L/(L·min)的通气量最有利于细胞积累丙

酮酸及诱导 PDC 聚醛酶活. 若在生长过程中逐渐降低通氧量至 0.3 L/(L·min), 则会增强 ADH 活性, 生成大量苯甲醇^[68]; 而过高的通气量[1 L/(L·min)]和过低的呼吸熵(1~4)也会降低 L-PAC 的产量^[36,48]. 利用朝鲜糖酵母(*Saccharomyces coreanus*)转化生产 L-PAC 时, 细胞在好氧条件下充分生长, 再降低通氧量进行生物转化, 能获得最高的 L-PAC 产量^[69].

(2) 温度. 不同种属的转化菌株的最适产酶、转化温度有所不同. 酿酒酵母的转化温度多在 28~30℃^[63,70,71]. 假丝酵母 30℃时 L-PAC 的产量是相同条件下 20℃时产量的 1.5 倍^[21]. 产朊假丝酵母在 21℃下的 L-PAC 产量是 4℃下的 2.8 倍, 但副产物 3-羟基丁酮也有所增加^[16]. 而酶转化法温度过高会导致酶的稳定性下降、产量降低; 相对较低的转化温度有助于提高产量, 但也延长了转化时间, 使生产成本增加^[42].

(3) 转化时间. Voet 等^[72]认为, *S. cerevisiae* 转化生产 L-PAC 可分为 3 个阶段: 前期为苯甲醛适应期, L-PAC 生产速率较低; 中期 L-PAC 生产速率最高; 后期由于产物抑制和底物、副产物的毒害作用, L-PAC 生产速率逐渐降低. 多数全细胞转化实验表明, L-PAC 产量在转化开始 10 h 内即可达最大值, 24 h 后产量不再上升, 而副产物产量有所升高^[21]. 酶法转化在 4℃和适宜的苯甲醛浓度下, *C. utilis* 的 PDC 转化时间一般为 20 h, 10℃时 *S. cerevisiae* 的 PDC 转化时间为 5~6 h^[73]. 爪哇根霉部分纯化 PDC 转化反应表明^[45], 29 h 后, 尽管仍剩余 43% 的 PDC 聚醛酶活性, 但 L-PAC 量却不再增加.

随着转化时间的增加, L-PAC 在一些非酶因素的外消旋作用下, 对映体纯度会下降^[74]. 为了在较高温度下获得最大的产量和最高的对映体纯度, 需选择最佳的回收 L-PAC 时间.

(4) 添加剂. 添加剂有助于降低底物抑制或减少副反应, 提高菌体活性. 在全细胞转化中加入尼克酸(Nicotinic acid)的类似物可减少副产物苯甲醇的生成, 并使 L-PAC 产量提高 20%^[75,76]. 加入 2% Vc 有利于 L-PAC 合成^[71]. 添加丙酮、乙醛等氢受体竞争 ADH, 能减少苯甲醇生成, 降低底物损耗^[69]. Shukla 等^[58]通过添加 0.6% 乙醛, 使 L-PAC 产量由 3.5 g/L 增加到 4.5 g/L. 加入乙醛虽能提高产量, 但会抑制 PDC 对丙酮酸的分解^[35], 并有一定的细胞毒性. 此外, α -萘氧乙酸(α -Naphthoxyacetic acid)及 EDTA、乳清、麦芽汁等均能刺激、增强 L-PAC 的合成^[30,77]. 在酶法转化中, 添加 1 mol/L KCl 有利于保持 PDC 的稳定, 增加 L-PAC 产量^[45]. 在 *C. utilis* 部分纯化的 PDC 两相转化体系中添加麦角固醇、磷脂酰胆碱等细胞膜成分, 能增强 PDC 稳定性,

使 L-PAC 产量提高 2.4~2.8 倍^[57].

(5) pH. Shin 等^[42]发现, 初始 pH 值为 7 最适宜 *C. utilis* 的 PDC 转化生产 L-PAC, 而初始 pH 值为 6 则最适宜生产乙醛. pH>7 时, 酵母的四聚体 PDC 会解离为无功能的亚基, 使酶活下降甚至失活^[78]. 在以葡萄糖为碳源的分批发酵中, pH 值的自然波动反而有利于提高 PDC 的比酶活. Chen 等^[27]发现, 在氧限制条件下[0.1 L/(L·min)], pH 波动(6.0~2.9)的 PDC 比酶活至少是恒定 pH(6.0, 5.0, 4.0, 3.0)条件下的 2.7 倍, 可达 385 U/g. 推测这是细胞应对 pH 降低的一种保护机制, 即通过提高 PDC 比酶活来转化胞内累积的不挥发性有机酸丙酮酸, 以保持胞内 pH 平衡.

与其他缓冲液相比, 用磷酸钾缓冲液控制 pH 时产量较低. 因为磷酸是酵母 PDC 的竞争性抑制剂, 降低了 PDC 与丙酮酸的亲和作用^[79]. 而以高浓度(2~2.5 mol/L) MOPS [3-(N-morpholino) propane sulfonic acid]作为小型酶法转化体系的缓冲液有利于提高 PDC 的稳定性. 为使转化更加经济有效, 还可适当减少 MOPS 量, 通过添加适量盐或醇作为稳定剂, 添加醋酸保持中性 pH^[45], 均可增加 L-PAC 的产量.

(6) Mg^{2+} . 除了作为 PDC 的辅助因子外, 低浓度(0.5 mmol/L)的 Mg^{2+} 在酶法转化中还有助于减少由非酶因素引起的丙酮酸损失, 提高丙酮酸利用率^[44]. Mg^{2+} 浓度由 20 mmol/L 降至 0.5 mmol/L 时, 减少了 17% 的丙酮酸非酶损耗, 使丙酮酸的摩尔转化率由 59% 提高到 74%.

6 L-PAC 提取和检测

用等体积的乙醚抽提转化产物 3~5 次, 合并有机相, 减压蒸干, 可获得 L-PAC 粗品^[75,80]. Long 等^[81]研究了进一步纯化 L-PAC 的方法, 即转化产物用等体积的醚抽提后, 添加 $NaHCO_3$ 溶液除去酸, 加入 10% 偏亚硫酸氢钠(Sodium metabisulphite)结合其中的醛和醇, 乙醚洗涤后再用固体 $NaHCO_3$ 释放醛和醇, 最后再利用硅胶柱分离. 在此基础上, Shukla 等^[82]对 L-PAC 的分离纯化作了系统、详尽的叙述. 通过硅胶柱层析纯化、利用亚硫酸氢盐加合物制备法(Bisulphite adduct preparation method)经离子交换柱分离 L-PAC, L-PAC 纯度分别为 99% 和 82.5%, 收率为 90%. 在李继珩等^[1]的研究中, 转化产物经乙醚抽提 3 次, Na_2CO_3 及磷酸缓冲液洗涤, 再经 2 次硅胶柱层析, 即可获得 L-PAC 精品, 平均收率为 30.8%.

早期人们通过分光光度法、极谱法(Polarography)^[22]、滴定法^[83]检测 L-PAC 及其副产物. 这些方法灵敏度低, 在分析复杂的转化成分时存在误差.

近年来,气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)已普遍用于 L-PAC 及其副产物的检测^[45,60,84]。2002 年 Breuer 等^[85]在研究 PDC 定向进化时提出了一种高通量检测 L-PAC 的方法,该方法利用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride)与 L-PAC 的氧化还原反应显色,实现 L-PAC 的高通量光学分析,且 3-羟基丁酮等副产物不干扰测定结果。简单、快速的 L-PAC 检测方法主要是利用薄层层析,以氯仿、二氯乙烷和甲醇作为展开剂,2,4-二硝基苯肼为显色剂检测 L-PAC^[1,63,70]。此外,利用 Westerfeld 法也可对转化液中的 L-PAC 进行快速粗略定量,但副产物 3-羟基丁酮会严重干扰检测结果^[86]。

7 结论与展望

生物转化法生产 L-PAC,相对于化学合成法,产物具有光学活性、成本低、污染小,有很好的应用前景,但在我国还未实现工业化。在基础研究方面,目前主要转化菌株的 PDC 基因已经克隆^[87,88],可以尝试通过分子手段,通过关键酶转基因、副反应酶基因敲除等基因工程和代谢工程方法,提高菌株的 L-PAC 生产能力并减少副产物产生;也有必要研究菌株耐受有机底物、产物和溶剂的分子机制,利用分子遗传学手段提高菌株的耐受性;对于酶转化法,AHAS 比 PDC 有很多优越性,有必要对其进行深入研究。在应用研究方面,应利用杂交或诱变育种技术选育对有机物高耐受性和高产菌株进一步优化转化体系和转化条件,优化生物反应器和反应过程控制,研究更高效的大规模提取技术及过程中试放大,实现生物转化法生产 L-PAC 的产业化,为我国国民经济可持续性发展做出贡献。

参考文献:

- [1] 李继珩, 冯亚宁. L-苯基乙酰基甲醇分离纯化及性质研究 [J]. 化学世界, 2002, 43(3): 127-129.
- [2] Long A, Ward O P. Biotransformation of Benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of the Fermentation and Toxicity of Substrates and Products [J]. Biotechnol. Bioeng., 1989, 34(7): 933-941.
- [3] Astrup A, Buemann B, Christensen N J, et al. The Effect of Ephedrine/Caffeine Mixture on Energy Expenditure and Body Composition in Obese Women [J]. Metabolism, 1992, 41(7): 686-688.
- [4] Neuberg C, Libermann L. Zur Kenntnis der Carboligase [J]. Biochem. Z., 1921, 121: 311-325.
- [5] Hildebrandt G, Klavehn W. 1-Phenyl-2-methylamino-1-propanol [P]. US Pat.: 1956930(C.A.-28:4072), 1934-05-01.
- [6] Lourenco E, Rodrigues J A R, Moran P J S. Preparation of an (-)-Ephedrine Intermediate through Asymmetric Reduction of 1-Phenyl-1,2-propanedione by Anaerobically Pre-treated Baker's Yeast [J]. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2004, 29(1/6): 37-40.
- [7] Coughlin R W, Mahmoud W M, El-sayed A H. Enhanced Bioconversion of Toxic Substances [P]. US Pat.: 5173413, 1991-02-28.
- [8] Chipman D M, Barak Z E E V, Stanislav E, et al. Process for Preparing Chiral Aromatic Alpha-hydroxy Ketones Using 2-Hydroxy-3-oxoacid Synthase [P]. Eur. Pat.: EP1468101, 2003-01-23.
- [9] Smallridge J A, Trehwella M A, Wilkinson K A. Yeast-based Process for Production of L-PAC [P]. US Pat.: 7063969, 2000-12-13.
- [10] Seely R J, Hageman R V, Yarus M J, et al. Process for Making Phenylacetylcarbinol (PAC): Microorganism for Use in the Process and Method for Preparing the Microorganism [P]. PCT Int. Pat. Appl.: WO 9004 831(CI.C12N1/B), 1990-05-03.
- [11] Yamazaki K, Tamaki T, Uzawa S, et al. Participation of C₆-C₁ Unit in the Biosynthesis of Ephedrine in Ephedra [J]. Phytochemistry, 1973, 12(12): 2877-2882.
- [12] Bringer-Meyer S, Sahm H. Acetoin and Phenylacetylcarbinol Formation by the Pyruvate Decarboxylases of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biocatalysis, 1988, 1(4): 321-331.
- [13] Gunawan C, Satianegara G, Chen A K, et al. Yeast Pyruvate Decarboxylases: Variation in Biocatalytic Characteristics for (R)-Phenylacetylcarbinol Production [J]. FEMS Yeast Res., 2007, 7(1): 33-39.
- [14] Rosche B, Breuer M, Hauer B, et al. Screening of Yeasts for Cell-free Production of (R)-Phenylacetylcarbinol [J]. Biotechnol. Lett., 2003, 25(11): 841-845.
- [15] 蒋雅红, 游松. 丙酮酸脱羧酶及其在手性合成中的应用 [J]. 中国药物化学杂志, 2002, 12(2): 113-118.
- [16] Satianegara G, Breuer M, Hayer B, et al. Enzymatic (R)-Phenylacetylcarbinol Production in a Benzaldehyde Emulsion System with *Candida utilis* Cells [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 70(2): 170-175.
- [17] Vinogradov V, Vyazmensky M, Engel S, et al. Acetohydroxyacid Synthase Isozyme I from *Escherichia coli* has Unique Catalytic and Regulatory Properties [J]. Biochim. Biophys. Acta, 2006, 1760(3): 356-363.
- [18] Engel S, Vyazmensky M, Geresh S, et al. Acetohydroxyacid Synthase: A New Enzyme for Chiral Synthesis of R-Phenylacetylcarbinol [J]. Biotechnol. Bioeng., 2003, 83(7): 833-840.
- [19] Chipman D, Barak Z, Schloss J V. Biosynthesis of 2-Aceto-2-hydroxy Acids: Acetolactate Synthases and Acetohydroxyacid Synthases [J]. Biochim. Biophys. Acta, 1988, 1385(2): 401-419.
- [20] Takeshita M, Sato T. Synthesis of Optically Active 1-Phenyl-1,2-propanediol by Use of Baker's Yeast [J]. Chem. Pharm. Bull., 1989, 37(4): 1085-1086.
- [21] 赵伟, 沈安, 江宁. 微生物转化生产 L-苯基乙酰基甲醇(L-PAC)研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(2): 218-220.
- [22] Netravali J, Vojtisek V. Production of Phenylacetylcarbinol in Various Yeast Species [J]. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1982, 16(1): 35-38.
- [23] Cardillo R, Servi S, Tinti C. Biotransformation of Unsaturated Aldehydes by Microorganisms with Pyruvate Decarboxylase Activity [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1991, 36(3): 300-303.
- [24] 赵颖怡, 梁世中, 黄日波. 一种新的食品酵母表达系统: 产肌假丝酵母 [J]. 生物技术通讯, 2002, 13(6): 457-458.
- [25] Goetz G, Iwan P, Hauer B, et al. Continuous Production of (R)-Phenylacetylcarbinol in an Enzyme-membrane Reactor Using a Potent Mutant of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis* [J]. Biotechnol. Bioeng., 2001, 74(4): 317-325.

- [26] Mahmoud W M, El Sayed A H M M, Coughlin R W. Production of L-Phenylacetylcarbinol by Immobilized Yeast Cells: I. Batch Fermentation [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 36(1): 47–54.
- [27] Chen A K L, Breuer M, Hauer B, et al. pH Shift Enhancement of *Candida utilis* Pyruvate Decarboxylase Production [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 92(2): 183–188.
- [28] 梁新乐. 苯甲醛高耐受性酵母菌的选育 [J]. *生物学杂志*, 2003, 20(1): 30–39.
- [29] 李继珩, 尚广东. 高产苯基乙酰基甲醇菌株选育 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2001, 23(1): 16–20.
- [30] Ellaiah P, Krishna K T. Studies on the Production of Phenylacetylcarbinol from Benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Indian Drugs*, 1987, 24(4): 192–195.
- [31] Pohl M, Siegert P, Mesch K, et al. Active Site Mutants of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis* [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1998, 257(3): 538–546.
- [32] Bruhn H, Pohl M, Grotzinger J, et al. The Replacement of Trp392 by Alanine Influences the Decarboxylase/Carbolygase Activity and Stability of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis* [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 234(2): 650–655.
- [33] Nikolova P, Ward O P. Production of L-Phenylacetylcarbinol by Biotransformation: Product and By-product Formation and Activities of the Key Enzymes in Wild Type and ADH Isoenzyme Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1991, 38(5): 493–498.
- [34] Nikolova P, Ward O P. Effect of Support Matrix on Ratio of Product to By-product Formation in L-Phenylacetylcarbinol Synthesis [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1994, 16(1): 7–10.
- [35] Mochizuki N, Hiramatsu S, Sugai T, et al. Improved Conditions for the Production and Characterization of 1-Arylpropane-1,2-diols and Related Compounds [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995, 59(12): 2282–2291.
- [36] Rogers P L, Shin H S, Wang B. Biotreatment, Downstream Processing and Modelling [M]. Heidelberg: Springer Berlin, 1997. 33–59.
- [37] Vojtisek V, Netrval J. Effect of Pyruvate Decarboxylase Activity and of Pyruvate Concentration on the Production of 1-Hydroxy-1-phenylpropanone in *Saccharomyces carlsbergensis* [J]. *Folia Microbiol. (Praha)*, 1982, 27(3): 173–177.
- [38] Tripathi C K, Agarwal S C, Bihari V, et al. Production of L-Phenylacetylcarbinol by Free and Immobilized Yeast Cells [J]. *Indian J. Exp. Biol.*, 1997, 35(8): 886–889.
- [39] Oliver A L, Anderson B N, Roddick F A. *Advances in Microbial Physiology* [M]. Sheffield: University of Sheffield, 1999. 1–45.
- [40] Shin H S, Roger P L. Kinetic Evaluation of Biotransformation of Benzaldehyde to L-Phenylacetylcarbinol by Immobilized Pyruvate Decarboxylase from *Candida utilis* [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 49(4): 429–436.
- [41] 石贵阳, 董世建, 张梁, 等. 生物方法制备麻黄碱的研究进展 [J]. *生物技术*, 2004, 14(2): 63–65.
- [42] Shin H S, Rogers P L. Production of L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC) from Benzaldehyde Using Partially Purified Pyruvate Decarboxylase (PDC) [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 49(1): 52–62.
- [43] Rosche B, Sandford V, Breuer M, et al. Enhanced Production of R-Phenylacetylcarbinol (R-PAC) through Enzymatic Biotransformation [J]. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 2002, 19/20: 109–115.
- [44] Rosche B, Breuer M, Hauer B, et al. Increased Pyruvate Efficiency in Enzymatic Production of (R)-Phenylacetylcarbinol [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2003, 25(11): 847–851.
- [45] Rosche B, Leksawasdi N, Sandford V, et al. Enzymatic (R)-Phenylacetylcarbinol Production in Benzaldehyde Emulsions [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 60(1/2): 94–100.
- [46] Shin H S, Rogers P L. Biotransformation of Benzaldehyde to L-PAC by Immobilized *Candida utilis* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 44(1/2): 7–14.
- [47] Mahmoud W M, El Sayed A H M M, Coughlin R W. Production of L-Phenylacetylcarbinol by Immobilized Yeast Cells: II. Semicontinuous Fermentation [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 36(1): 55–63.
- [48] Mandwal A K, Tripathi C K, Trivedi P D, et al. Production of L-Phenylacetylcarbinol by Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2004, 26(3): 217–221.
- [49] Kostraby M M, Smallridge A J, Trewhella M. A: Yeast-mediated Preparation of L-PAC in an Organic Solvent [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, 77(7): 827–831.
- [50] Nikolova P, Ward O P. *Progress in Biotechnology* [M]. Amsterdam: Elsevier B V, 1992. 675–680.
- [51] Nikolova P, Ward O P. Whole Cell Biocatalysis in Nonconventional Media [J]. *J. Ind. Microbiol. Biothchnol.*, 1993, 12(2): 76–86.
- [52] Rosche B, Breuer M, Hauer B, et al. Cells of *Candida utilis* for *in vitro* (R)-Phenylacetylcarbinol Production in an Aqueous/Octanol Two-phase Reactor [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2005, 27(8): 575–581.
- [53] Sandford V, Breuer M, Hauer B, et al. (R)-Phenylacetylcarbinol Production in Aqueous/Organic Two-phase Systems Using Partially Purified Pyruvate Decarboxylase from *Candida utilis* [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 91(2): 191–197.
- [54] Rosche B, Breuer M, Hauer B, et al. Biphasic Aqueous/Organic Biotransformation of Acetaldehyde and Benzaldehyde by *Zymomonas mobilis* Pyruvate Decarboxylase [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 86(7): 788–794.
- [55] Eckstein M F, Peters M, Lembrecht J, et al. Maximize Equilibrium Conversion in Biphasic Catalysed Reactions: Mathematical Description and Practical Guidelines [J]. *Adv. Synth. Catal.*, 2006, 348(12/13): 1591–1596.
- [56] Gunawan C, Breuer M, Hauer B, et al. Improved (R)-Phenylacetylcarbinol Production with *Candida utilis* Pyruvate Decarboxylase at Decreased Organic to Aqueous Phase Volume Ratios [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30(2): 281–286.
- [57] Satiangara G, Rogers P L, Rosche B. Comparative Studies on Enzyme Preparations and Role of Cell Components for (R)-PAC Production in a Two-phase Biotransformation [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94(6): 1189–1195.
- [58] Shukla V B, Kulkarni P R. Process Parameters and Reusability of the Free Cell Mass of *Torulaspora delbrueckii* for the Production of L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC) [J]. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 17(3): 301–306.
- [59] Agarwal S C, Basu S K, Vora V C, et al. Studies on the Production of L-Phenylacetylcarbinol by Yeast Employing Benzaldehyde as Precursor [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1987, 29(6): 783–785.
- [60] Shukla V B, Kulkarni P R. Biotransformation of Benzaldehyde to L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC) by Free Cell of *Torulaspora delbrueckii* in the Presence of Beta-Cyclodextrin [J]. *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, 2002, 45(3): 265–268.
- [61] Gruber M, Wassenaar J S. Inhibition of Yeast Carboxylase by Acetaldehyde [J]. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1960, 38: 355–357.
- [62] Juni E. Evidence for a Two-site Mechanism for Decarboxylation of α -Keto Acids by α -Carboxylase [J]. *J. Biol. Chem.*, 1961, 236(8):

- 2302–2308.
- [63] 宁华中, 许激扬, 许娟, 等. 裂殖酵母生物合成 L-苯基乙酰基甲醇的研究 [J]. 药物生物技术, 2006, 13(1): 32–35.
- [64] Rosche B, Breuer M, Hauer B, et al. Role of Pyruvate in Enhancing Pyruvate Decarboxylase Stability towards Benzaldehyde [J]. J. Biotechnol., 2005, 115(1): 91–99.
- [65] Mahmoud W M, El Sayed A H M M, Coughlin R W. Effect of β -Cyclodextrin on Production of L-Phenyl-acetylcarbinol by Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnol. Bioeng., 1990, 36(3): 256–262.
- [66] Li X Z, Webb J S, Kjelleberg S, et al. Enhanced Benzaldehyde Tolerance in *Zymomonas mobilis* Biofilms and the Potential of Biofilm Applications in Fine-chemical Production [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72(2): 1639–1644.
- [67] Sambamurthy K, Elliah P, Krishna K T. Studies on Production of Phenylacetylcarbinol from Benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae* an Intermediate in the Production of L-Ephedrine [J]. Indian J. Pharmaceut. Sci., 1984, 46(1): 62.
- [68] Tripathi C M, Agarwal S C, Basu S K. Production of L-Phenylacetylcarbinol by Fermentation [J]. J. Ferment. Bioeng., 1997, 84(6): 487–492.
- [69] Shukla V B, Kulkarni P R. L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC): Biosynthesis and Industrial Applications [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2000, 16(6): 499–506.
- [70] 胥秀英, 郑一敏, 温寿祯, 等. 左旋麻黄素半生物合成研究: (I) L-苯基乙酰基甲醇生物合成条件研究 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 119–121.
- [71] 胥秀英, 郑一敏, 温寿祯, 等. 左旋麻黄素半生物合成的研究 [J]. 生物学杂志, 2001, 18(1): 18–19.
- [72] Voet J P, Vandamme E J, Vlarick C. L-Phenylacetylcarbinol Biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie. 1973, 13(4): 355–365.
- [73] 姚尧, 李继珩. 丙酮酸脱羧酶催化合成 L-苯基乙酰基甲醇的研究 [J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(2): 115–118.
- [74] Willeman W F, Straathof A J J, Heijnen J J. Reaction Temperature Optimization Procedure for the Synthesis of (R)-Mandelonitrile by *Prunus amygdalus* Hydroxynitrile Lyase Using a Process Model Approach [J]. Enzyme. Microb. Technol., 2002, 30(2): 200–208.
- [75] Gupta K G, Singh J, Sahni G, et al. Production of Phenylacetylcarbinol by Yeasts [J]. Biotechnol. Bioeng., 1979, 21(6): 1085–1089.
- [76] Smith P F, Hendlin D. Further Studies on Phenylacetylcarbinol Synthesis by Yeast [J]. Appl. Microbiol., 1954, 2(5): 294–296.
- [77] Groeger D, Schmauder H P, Mothes K. Isolation of L-Phenylacetyl Carbinol [J]. Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie, 1966, 6(4): 275–287.
- [78] Gounaris A D, Turkenkopf I, Buckwald S, et al. Pyruvate Decarboxylase: I. Protein Dissociation into Subunits under Conditions in which Thiamine Pyrophosphate is Released [J]. J. Biol. Chem., 1971, 246(5): 1302–1309.
- [79] Boiteux A, Hess B. Allosteric Properties of Yeast Pyruvate Decarboxylase [J]. FEBS Lett., 1970, 9(5): 293–296.
- [80] 郑一敏, 马开森, 胥秀英, 等. 左旋麻黄碱半生物合成研究: III. L-苯基乙酰基甲醇的提取技术 [J]. 精细化工, 2001, 18(6): 314–316.
- [81] Long A, James P, Ward O P. Aromatic Aldehydes as Substrates for Yeast and Yeast Alcohol Dehydrogenase [J]. Biotechnol. Bioeng., 1989, 33(5): 657–660.
- [82] Shukla V B, Kulkarni P R. Downstream Processing of Biotransformation Broth for Recovery and Purification of L-Phenylacetyl Carbinol (L-PAC) [J]. J. Sci. Ind. Res., 1999, 58(8): 591–593.
- [83] Smith P F, Hendlin D. Mechanism of Phenylacetylcarbinol Synthesis by Yeast [J]. J. Bacteriol., 1953, 65(4): 440–445.
- [84] Rosche B, Sandford V. Biotransformation of Benzaldehyde into (R)-Phenylacetylcarbinol by Filamentous Fungi or Their Extracts [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 57(3): 309–315.
- [85] Breuer M, Pohl M, Hauer B, et al. High-throughput Assay of (R)-Phenylacetylcarbinol Synthesized by Pyruvate Decarboxylase [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2002, 374(6): 1069–1073.
- [86] Epelbaum S, Chipman D M. Determination of Products of Acetohydroxy Acid Synthase by the Colorimetric Method [J]. Anal. Biochem., 1990, 191(1): 96–99.
- [87] 蒋雅红, 游松, 任杰, 等. 酿酒酵母丙酮酸脱羧酶基因的克隆及表达 [J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(4): 291–293.
- [88] 陆坚, 韦宇拓, 黄鲲, 等. 运动发酵单胞菌丙酮酸脱羧酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. 广西大学学报(自然科学版), 2003, 28(1): 32–35.

Research Progress in L-Phenylacetylcarbinol Production by Biosynthesis

LI Dan¹, LIN Jian-qun¹, LIN Hui-bin², LIN Jian-qiang¹, QU Yin-bo¹

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China;

2. Shandong Institute of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract: The research progress in biotransformation of L-phenylacetylcarbinol (L-PAC), including mechanism of biocatalysis, strain screening, biotransformation system, process parameters and downstream processing, was reviewed. Strains belonging to the genera of *Saccharomyces* and *Candida* I with high enzyme activity of pyruvate decarboxylase are widely used in biotransformation of L-PAC from benzaldehyde and pyruvate. The formation of by-products and toxicity of substrate significantly influence the production of L-PAC. By strain screening and breeding, suitable strains with high tolerance to benzaldehyde and effective reduction of byproducts can be obtained. By applying the process optimization methodologies of fed-batch culture, process control and process parameter optimization, utilization of cell or enzyme immobilization and adoption of aqueous and organic two-phase system, higher L-PAC production can be achieved.

Key words: L-phenylacetylcarbinol; biotransformation; ephedrine