



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410102099.2

[43] 公开日 2005 年 8 月 31 日

[11] 公开号 CN 1661025A

[22] 申请日 2000.8.1  
[21] 申请号 200410102099.2  
分案原申请号 00122272.4  
[30] 优先权  
[32] 1999. 8. 2 [33] EP [31] 99115237.2  
[71] 申请人 DSM IP 资产公司  
地址 荷兰海尔伦  
[72] 发明人 福冈正束 平贺光晖 关原达

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
代理人 封新琴 巫肖南

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 左旋二酮的微生物生产方法

[57] 摘要

生产(6R)-2, 2, 6-三甲基环己烷-1, 4-二酮(左旋二酮)的方法, 包括使 2, 6, 6-三甲基-2-环己烯-1, 4-二酮与至少一种能够将 2, 6, 6-三甲基-2-环己烯-1, 4-二酮转化为(6R)-2, 2, 6-三甲基环己烷-1, 4-二酮的酵母接触, 该酵母选自说明书所述的种类。接触是在水、水可混溶性有机溶剂或水与所述水可混溶性有机溶剂的混合物中进行的, 其中含有至少一种可同化的碳源。在反应完成后从反应介质中分离所得(6R)-2, 2, 6-三甲基环己烷-1, 4-二酮。左旋二酮是一种有用的中间体, 用于类胡萝卜素、特别是(3R, 3'R)-玉米黄质的制备。

ISSN 1008-4274

1、生产(6R)-2,2,6-三甲基环己烷-1,4-二酮的方法，其特征在于使2,6,6-三甲基-2-环己烯-1,4-二酮与至少一种酵母接触，该酵母能够将2,6,6-三甲基-2-环己烯-1,4-二酮转化为(6R)-2,2,6-三甲基环己烷-1,4-二酮，选自戴耳克氏糖酵母(单孢糖酵母、戴耳克氏圆孢酵母)、魏莱氏糖酵母、拜列氏接合糖酵母和热带假丝酵母，和这些种类的功能等价物、次代培养物、突变体和变种，接触是在水、水可混溶性有机溶剂或水与所述水可混溶性有机溶剂的混合物中进行的，其中含有至少一种可同化的碳源，然后在反应完成后从反应介质中分离所得(6R)-2,2,6-三甲基环己烷-1,4-二酮。

2、根据权利要求1的方法，其特征在于该酵母选自戴耳克氏糖酵母 HUT 7116(单孢糖酵母 IFO 0298)、戴耳克氏糖酵母(戴耳克氏圆孢酵母)HUT 7102、魏莱氏糖酵母 HUT 7106、拜列氏接合糖酵母 ATCC 11486 和热带假丝酵母 IFO 1403，及其功能等价物、次代培养物、突变体和变种。

3、根据权利要求1或2任意一项的方法，其特征在于所用酵母在用于该方法之前预先通过在生长培养基中培养进行制备，培养基含有一种可同化的碳源、一种可同化的氮源、无机盐等，然后从培养基中分离酵母细胞。

4、根据权利要求1至3任意一项的方法，其特征在于在该方法中用于生产(6R)-2,2,6-三甲基环己烷-1,4-二酮的酵母是通过截留法得到的固定化酵母。

5、根据权利要求4的方法，其特征在于得到该固定化酵母的截留法使用的是疏水性可光致交联的树脂作为载体，该树脂每分子具有至少两个不饱和烯键，通过照射发生聚合。

6、根据权利要求1至5任意一项的方法，其特征在于2,6,6-三甲基-2-环己烯-1,4-二酮与该酵母的接触是在20至40℃的温度范围内，优选为25至30℃，在3.0至6.0的pH下，优选为4.0至5.0。

7、根据权利要求1至6任意一项的方法，其特征在于它是利用流化床反应釜或固定床反应釜进行的。

## 左旋二酮的微生物生产方法

5 本发明是对申请号为 00122272.4、申请日为 2000 年 8 月 1 日，发明名称为：“左旋二酮的微生物生产方法”的申请的分案申请。

10 本发明涉及(6R)-2,2,6-三甲基环己烷-1,4-二酮(以下称之为左旋二酮)的微生物生产，特别涉及以高产率生产高纯度左旋二酮的方法，即用一种特殊的酵母进行 2,6,6-三甲基-2-环己烯-1,4-二酮(以下称之为酮基异佛尔酮)的催化反应。

左旋二酮以前是通过酮基异佛尔酮内碳-碳双键的还原进行生产的，方法是使所述酮基异佛尔酮与发面酵母(例如酿酒酵母)接触，后者起到对映选择性生物催化剂的作用(《维生素、颜料和生长因子的生物工程》Erick J. Vandamme, p.71, Elsevier Applied Science, London and New York)。不过，发面酵母不适用于工业生产，因为左旋二酮的产率太低。

使用发面酵母的生产方法所面临的进一步问题、以及为了研究出工业可行的生产方法而必须克服的问题是：

1)酵母细胞不能再利用，因为酵母的反应活性寿命短。

20 2)复杂的纯化方法是必要的，因为在催化反应后难以从培养溶液中分离酵母。

为了提高从酮基异佛尔酮生产左旋二酮的产率，也为了克服其他问题，人们进行了深入研究，结果发现，某些酵母株能够比以前更有效地从酮基异佛尔酮产生左旋二酮。因此，本发明提供了生产左旋二酮的方法，其特征在于使酮基异佛尔酮与至少一种酵母接触，该酵母能够将酮基异佛尔酮转化为左旋二酮，该酵母选自鲁氏糖酵母 (*Saccharomyces rouxii*) (鲁氏接合糖酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*))、戴耳克氏糖酵母 (*Saccharomyces delbrueckii*) (单孢糖酵母 (*Saccharomyces unisporus*))、戴耳克氏圆孢酵母 (*Torulaspora delbrueckii*)、魏莱氏糖酵母 (*Saccharomyces willianus*)、拜列氏接合糖酵母 (*Saccharomyces bailii*) 和热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)，和这些种类的功能等价物、次代培养物、突变体和变种，接触是在水、水可混溶性有机溶剂或水与所述水可混溶性有机溶剂的混合物中进行的，其中含有至少一种可同化的碳源，然后在反应完成后从反应介质中分离所得的左旋二酮。

进一步发现, 通过某些工艺并利用适合于所述催化反应的这种固定化酵母截留进行反应的酵母, 能够生产高纯度左旋二酮, 而产率甚至更高。这代表本发明的一个优选特征。

在本发明方法中作为原料或“底物”使用的酮基异佛尔酮是熟知的底物, 其本身通过文献已知方法能够容易地合成, 例如美国专利 3,960,966 所报道的方法。

本方法可以使用任何具有将酮基异佛尔酮转化为左旋二酮的能力、并且属于鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)、戴耳克氏糖酵母(单孢糖酵母、戴耳克氏圆孢酵母(*Torulaspora delbrueckii*))、魏莱氏糖酵母、拜列氏接合糖酵母和热带假丝酵母及其功能等价物、次代培养物、突变体和变种的酵母, 优选为选自下组已保藏酵母的至少一种:

鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 (IFO 0494),  
戴耳克氏糖酵母 HUT 7116(单孢糖酵母 IFO 0298),  
戴耳克氏糖酵母(戴耳克氏圆孢酵母(*Torulaspora delbrueckii*))HUT 7102,  
魏莱氏糖酵母 HUT 7106,  
拜列氏接合糖酵母 ATCC 11486 和  
热带假丝酵母 IFO 1403,  
及其功能等价物、次代培养物、突变体和变种。

鲁氏糖酵母 HUT 7191、戴耳克氏糖酵母 HUT 7116 和戴耳克氏糖酵母 HUT 7102 是按照于 1987 年发布的 HUT 目录列出的。不过, 于 1999 年 9 月发布的 HUT 目录将这些微生物的第一种和第三种分别重新分类为鲁氏接合糖酵母 HUT 7191 和戴耳克氏圆孢酵母(*Torulaspora delbrueckii*) HUT 7102, 不再列出戴耳克氏糖酵母 HUT 7116。于 1996 年发布的 IFO 目录将“HUT 7116”分为单孢糖酵母 IFO 0298。

在这些酵母中, 鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 (IFO 0494)是一种最优选用于本发明方法的酵母。

这些优选的酵母已经保藏在下列至少一个保藏单位中: 美国菌种保藏中心(ATCC), University Boulevard Manassas, VA20100-2209, U.S.A., HUT 培养物保藏中心, Department of Fermentation Technology, Hiroshima University and Institute for Fermentation (IFO), 17-85 Jusohonmachi 2-chome,

Yodogawa-ku, Osaka, Japan。任何人如果需要,都可以从有关保藏单位得到。

本发明方法所用酵母可以在用在所述方法之前预先制备,方法是将酵母在生长基中培养,生长基中含有可同化的碳源、可同化的氮源、无机盐等,然后通过离心等常规方法从培养基中分离酵母细胞。酵母的培养一般是在 20 至 40 °C 的温度范围内,优选为 25 至 30 °C,在 3.0 至 6.0 的 pH 范围内,优选为 4.3 至 4.7,培养 6 至 48 小时,优选为 20 至 30 小时,在需氧条件下进行。适合的可同化碳源包括蔗糖、山梨醇、葡萄糖等,其中葡萄糖是优选的。适合的可同化的氮源包括硫酸铵、硝酸钠、蛋白胨、氨基酸、玉米浆、麦芽浸膏、麸浸膏、酵母浸膏等。适合的无机盐包括硫酸镁、氯化钠、碳酸钙、磷酸氢二钾等。

本发明方法在水、水可混溶性有机溶剂或水与所述水可混溶性有机溶剂的混合物中进行。作为水可混溶性有机溶剂,适合使用低级(C<sub>1-6</sub>-)链烷醇,尤其是甲醇、乙醇或丙醇。不过,基于经济和容易操作的原因,水是优选使用的溶剂。

本方法一般在 20 至 40 °C 的温度范围内进行,优选为 25 至 30 °C。对任何其他反应条件的组合来说,技术人员可以确定最佳的更窄的温度范围。pH 通常为 3.0 至 6.0,优选为 4.0 至 5.0。反应通常可以在开始反应后 2 至 40 小时结束,优选在确认反应介质中的酮基异佛尔酮浓度已经达到非常低或接近零值之后,利用一种分析方法进行确认,例如气相色谱法。最初的酮基异佛尔酮浓度通常为 0.3 至 2.0 重量%,优选为 0.9 至 1.0 重量%。

作为可同化的碳源,必须存在于反应介质中,它是酵母从酮基异佛尔酮产生左旋二酮的能源,可以使用蔗糖、山梨醇、葡萄糖等,其中葡萄糖是优选的。介质中最初的碳源浓度通常为 2.0 至 8.0 重量%,优选为 2.5 至 3.5 重量%。

本发明方法可以以分批、半连续或连续的方式进行。在一种具体的实施方式中,将酵母悬浮在溶剂中,即水、水可混溶性有机溶剂或二者的混合物,将混悬液加入到反应釜中。然后将酮基异佛尔酮和葡萄糖溶于另外的溶剂中,将溶液调至 pH 3.0 至 6.0,优选为 4.0 至 5.0,连续加入到反应釜内的酵母混悬液中。反应介质内开始换气后,继续向反应釜内的酵母混悬液中加入酮基异佛尔酮和葡萄糖的溶液,将所得溶液通过过滤从反应釜中连续除去。调节加入和除去的速率使之大致相等,以保持反应釜内的体

积相同。催化反应一般在 20 至 40 °C 的温度范围内进行，优选为 25 至 30 °C。作为调节 pH 的介质，适合使用含水的硫酸或氢氧化钠。酮基异佛尔酮与酵母反应的时间可因主要条件而异。不过，所述时间可以预先确定，方法是调节进料速率和除去速率，使被除去溶液中的酮基异佛尔酮是连续耗尽的。

在根据本发明方法的酮基异佛尔酮与酵母的催化反应的一个方面中，在水或含水溶剂中呈漂浮状态的酵母、或呈固定状态的酵母可以用于流化床反应釜或固定床反应釜。不过，即使酵母的活性已经降低，也可容易地进行固定形式酵母的再活化，利用该酵母可以生产大量左旋二酮，而与它以前反复用于催化反应无关。因此，利用固定形式的酵母可以提高左旋二酮的生产率。

本发明方法可以用流化床反应釜或固定床反应釜进行。另外，当固定化酵母被用于与酮基异佛尔酮的第一步催化反应时，一般优选的是所述固定化酵母的活化在反应之前进行。进行这种活化的方法可以是在适合于酵母生长的条件下，使固定化酵母与适当的营养基接触，同时进行通气和搅拌。

#### 1：流化床反应釜的使用

将酮基异佛尔酮和葡萄糖溶于水或含水溶剂。然后将所得溶液和固定化酵母加入到反应釜中。通过换气和搅拌引发催化反应。酮基异佛尔酮的浓度通常为 0.3 至 2.0 重量%，优选为 0.9 至 1.0 重量%，葡萄糖的浓度通常为 2.0 至 4.0 重量%，优选为 2.5 至 3.0 重量%。催化反应可以在 20 至 40 °C 的温度范围内，优选为 25 至 30 °C，在 3.0 至 6.0 的 pH 范围内，优选为 4.3 至 4.7。换气速率(空气体积/介质体积/分钟：vvm)适宜为 0.5 至 3vvm，优选为 1 至 2vvm。反应时间可因条件而异。不过，反应通常在反应开始后约 8 至 10 小时停止，优选在确认酮基异佛尔酮的量已经耗尽之后。

为了在催化反应完成后分离左旋二酮，从反应釜中仅除去所得溶液，然后用水或含水溶剂洗涤固定化酵母。然后通过常规方法可以从合并后的溶液与洗液中分离左旋二酮。用洗涤溶剂洗涤，固定化酵母能够被再次活化，在后面的催化反应中可反复使用。

#### 2：固定床反应釜的使用

将固定化酵母置于反应釜中。将酮基异佛尔酮和葡萄糖溶于水或含水

溶剂中, 将溶液的 pH 调为 3.0 至 6.0, 优选为 5.0。酮基异佛尔酮的浓度通常为 0.3 至 2.0 重量%, 优选为 0.9 至 1.0 重量%, 葡萄糖的浓度通常为 2.0 至 4.0 重量%, 优选为 2.5 至 3.0 重量%。将所得溶液加入到反应釜中, 与固定化酵母反应。催化反应适合在 20 至 40 °C 的温度范围内进行, 优选为 25 至 30 °C。反应时间可因条件而异。不过, 反应通常在反应开始后约 24 至 48 小时停止, 优选在确认酮基异佛尔酮的量已经耗尽之后。催化反应终止后的过程与上述情况相同, 只是其中所用的是流化床反应釜而已。

固定酵母的方法是已知的: 例如参见 W. M. Fogarty 等《微生物酶与生物工程》第 2 版, Elsevier Applied Science, pp. 373-394 (1983)或日本专利公报 61265/1994。

用于截留法固定酵母的载体实例包括:

- (i)大分子多糖凝胶, 例如藻酸钠、角叉菜胶钾、明胶和琼脂, 是从天然产物提取的;
- (ii)壳聚糖珠粒, 由来源于天然产物的大分子多糖组成;
- (iii)陶瓷珠粒; 和
- (iv)疏水性可光致交联的树脂, 每分子含有至少两个不饱和烯键, 经过照射发生聚合。

在上述载体中, 经过照射发生聚合的疏水性可光致交联的树脂、即上述第 iv 种, 是最优选使用的。

疏水性可光致交联的树脂包括:

- (iv,a)由聚丙二醇与(甲基)丙烯酸之间的反应形成的尿烷加合物,
- (iv,b)由聚乙二醇与(甲基)丙烯酸之间的反应形成的尿烷加合物,
- (iv,c)聚乙烯醇, 和
- (iv,d)尿烷加合物(iv,a)与(iv,b)的混合物。

该疏水性可光致交联的树脂是商业上可得到的, 例如“BEL ENTG-3800”, 来自 Kansai Paint Co., Ltd., Hyogo-ken, Japan。

利用上述照射聚合的疏水性可光致交联的树脂作为载体固定酵母的方法实例包括下列步骤:

- 制备下列(a)、(b)、(c)和(d)的液态混合物: (a)疏水性可光致交联的树脂, (b)光聚合引发剂, 例如苯偶姻、丙酮、苯偶姻甲醚、萘酚或 2-羟基-2-甲基苯基乙基酮( $C_6H_5COC(CH_3)_2OH$ ), (c)用以稀释疏水性可光致交联的树脂的溶

剂, 例如石油醚、苯、己烷、乙二醇或甲醛, 和(d)酵母,

将所述含有组分(a)、(b)、(c)和(d)的混合物滴注到含水溶剂中, 其中含有一种洗涤剂, 例如月桂基硫酸钠或甘油脂肪酸酯, 以形成固体珠粒, 在该阶段珠粒的直径通常约为 0.1 至 5mm, 优选约为 0.5 至 3.0mm, 不过也可以有所不同,

用波长约 250 至 600nm 的射线照射珠粒 2 至 5 分钟。

原始液态混合物中各组分的重量比、即(a):(b):(c):(d)通常分别为 100:0.1-5:10-200:0.001-50, 但是并不限于此。

参与本发明方法的催化反应所得左旋二酮的纯化方法实例包括下列步骤:

将所得溶液与洗液的混合物过滤或离心, 除去固体杂质和酵母细胞, 使所得滤液与吸附树脂接触, 例如疏水性树脂,

用一种亲水性有机溶剂从树脂上洗脱所吸附的左旋二酮, 该洗脱溶剂例如低级醇, 如甲醇或乙醇, 或丙酮。

利用这样一种方法能够得到高纯度的左旋二酮。

所述疏水性树脂的实例为改性交联聚苯乙烯(SP-207)和交联聚苯乙烯(SP-800 和 SP-850) (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan)。在这些树脂中, SP-850 是最优选的, 因为每单位体积对左旋二酮的吸附能力极高。疏水性吸附树脂与体积 10 至 20 倍于树脂的溶液接触, 使溶剂中的左旋二酮能够被有效地吸附在该疏水性树脂上。在进行洗脱步骤时, 优选的是使用两倍体积于树脂的甲醇作为洗脱溶剂。收集洗脱液, 浓缩, 然后冷却所得浓洗脱液, 使从疏水性吸附树脂上洗脱下来的左旋二酮结晶。然后通过过滤或离心, 可以以这种高产率方式分离得到左旋二酮晶体。

利用本发明的方法, 能够生产纯度超过 99%的左旋二酮, 回收率为 70 至 80%。

下列实施例详细阐述本发明。

### 实施例 1

#### 酵母的筛选

将商业上可得到的发面酵母(可从 Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan 得到; 用于对比)和从公共保藏单位(ATCC、HUT 或 IFO)得到的酵母分别在含有葡萄糖、蛋白胨和酵母浸膏的培养基中在 30 °C 下培养 45 小时, 然

后离心收集培养物中的酵母细胞。

啤酒糖酵母 ATCC 7754(也用于对比),

鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 (IFO 0494),

戴耳克氏糖酵母 HUT 7116(单孢糖酵母 IFO 0298),

5 戴耳克氏糖酵母(戴耳克氏圆孢酵母(*Torulaspora delbrueckii*))HUT 7102,

魏莱氏糖酵母 HUT 7106,

拜列氏接合糖酵母 ATCC 11486,

热带假丝酵母 IFO 1403。

10 在每种情况下, 将所收集的酵母细胞悬浮在离子交换水中, 浓度为 80g/l, 将含水介质的 pH 调为 4.2。在单独的操作中, 将酮基异佛尔酮和葡萄糖溶于离子交换水中, 浓度均为 17g/l, 将含水介质的 pH 调为 4.2。将酵母悬液与含有异佛尔酮和葡萄糖的水溶液混合, 体积比为 1:1, 然后在 30℃ 下进行反应 16 小时。反应完成后, 用气相色谱法分析七种情况下的左旋二酮浓度, 由此计算每单位酵母的左旋二酮生产率, 进行评价。结果如表 1 所示。

15

| 用于筛选的酵母                                                     | 左旋二酮生产率<br>(g/kg 酵母细胞/h) |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 发面酵母(Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)                | 8.8                      |
| 啤酒糖酵母 ATCC 7754                                             | 9.8                      |
| 鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 (IFO 0494)                           | 25.7                     |
| 戴耳克氏糖酵母 HUT 7116(单孢糖酵母 IFO 0298)                            | 16.7                     |
| 戴耳克氏糖酵母(戴耳克氏圆孢酵母( <i>Torulaspora delbrueckii</i> ))HUT 7102 | 16.0                     |
| 魏莱氏糖酵母 HUT 7106                                             | 14.8                     |
| 拜列氏接合糖酵母 ATCC 11486                                         | 12.6                     |
| 热带假丝酵母 IFO 1403                                             | 10.5                     |

从结果可明显看出, 本发明所用每种酵母的左旋二酮生产率都比发面酵母(8.8)和啤酒糖酵母 ATCC 7754 (9.8)高( $\geq 10.5$ , 高达 25.7)。

## 实施例 2

### 利用固定化酵母进行催化反应

使用搅拌发酵器, 将鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 (IFO 0494) 和发面酵母在 30 °C 下培养 24 小时, 培养基含有给定重量百分比的酵母浸膏(0.5%)、蛋白胨(1.0%)、葡萄糖(2.0%)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.5%)和  $\text{MgSO}_4$  (0.2%)。在培养开始后的约 12 小时生长阶段内, 葡萄糖被酵母细胞耗尽, 然后以恒定速率加入葡萄糖。离心从培养物中收集细胞, 然后悬浮在离子交换水中, 浓度为 100g/l。预先制备含有 200ppm 对苯醌的可光致交联的树脂(ENTG-3800)混合物, 在室温下贮藏一周以上备用。将树脂与对苯醌的混合物、藻酸钙溶液(1.8 重量%)、细胞悬液和 2-羟基-2-甲基苯基乙基酮分别以 55.5:22.2:22.2:0.1 的重量比混合。将混合物通过注射器针头滴注到氯化钙溶液(3.0 重量%)中, 以形成直径 3mm 的固体珠粒。从氯化钙溶液中分离珠粒, 立即用紫外线(360nm)照射 3 分钟。照射后, 珠粒用离子交换水洗涤。从而完成固定化酵母的制备。

在反应的每种情况中都使用带有缓冲板的垂直延长的泡罩塔反应釜(5 升)。反应釜内装 800g 分别固定化的酵母。加入 3.5 倍固定化酵母体积的溶液, 溶液含有酵母浸膏(0.1%)、葡萄糖(2.0%)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2%)和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1%), 以 7.0 升/分钟的速率开始换气, 以活化酵母。固定化酵母和活化溶液的温度保持在 30 °C, 在活化过程中加入氢氧化钠水溶液使 pH 保持在 4.5。24 小时后活化完成, 从反应釜中仅除去活化溶液。然后, 向反应釜中加入 35g 酮基异佛尔酮和 75g 葡萄糖, 加入离子交换水至体积为 3.5 升。以 7.0 升/分钟的速率开始换气, 引发催化反应。固定化酵母和反应混合物的温度保持在 30 °C, 在发酵过程中加入 4.5N 氢氧化钠溶液使 pH 保持在 4.5。

图 1 用固定化鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 显示反应溶液中酮基异佛尔酮和左旋二酮浓度改变的时间过程。

一旦反应完成, 除去反应溶液, 向其中加入酮基异佛尔酮和葡萄糖, 再一次进行催化反应。反应以相同方式重复 10 次, 即进行 10 个反应循环。

作为对比, 图 2 在上述相同条件下用发面酵母显示反应溶液中酮基异佛尔酮和左旋二酮的浓度变化。

随后, 在完成每次重复反应后, 从反应釜中除去反应溶液, 向其中加

入 3.5 倍固定化酵母体积的水, 以 7.0 升/分钟的速率进行换气 10 分钟, 以洗涤固定化酵母。然后萃取洗涤溶液, 再向反应釜中加入酮基异佛尔酮和葡萄糖, 再次进行催化反应。催化反应和固定化酵母的洗涤以相同方式重复进行 10 次(10 个循环)。

- 5 图 3 用鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 显示左旋二酮经过连续发酵恢复为酮基异佛尔酮的变化, 包括或不包括洗涤过程。

### 实施例 3

#### 左旋二酮的工业规模生产

- 培养鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 (IFO 0494), 通过实施例 2  
10 所述相同方法制备大量固定化酵母。

催化反应使用带有缓冲板( $1\text{m}^3$ )的垂直延长的泡罩塔反应釜。反应釜内装 230g 预先制备的固定化酵母。向其中加入 3.5 倍固定化酵母体积的溶液, 溶液含有给定重量百分比的酵母浸膏(0.1%)、葡萄糖(2.0%)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2%) 和  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1%), 以  $0.4\text{Nm}^3/\text{分钟}$  的速率开始换气, 以活化酵母。固定化酵母和活化溶液的温度保持在  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , 在活化过程中加入氢氧化钠水溶液使 pH 保持在 4.5。24 小时后活化完成, 从反应釜中除去活化溶液。然后, 向反应釜中加入 9kg 酮基异佛尔酮和 30kg 葡萄糖, 加入离子交换水至体积为  $1000\text{ 升}$ 。以  $0.4\text{Nm}^3/\text{分钟}$  的速率开始换气, 引发催化反应。固定化酵母和溶液的温度保持在  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , 在反应过程中加入氢氧化钠溶液使 pH 保持在  
15  
20 4.5。

一旦酮基异佛尔酮的量已被耗尽, 反应即完成, 从反应釜中除去所得溶液。然后向反应釜中加入 3.5 倍固定化酵母体积的水, 以  $0.4\text{Nm}^3/\text{分钟}$  的速率进行换气 15 分钟, 以洗涤固定化酵母。排放洗涤溶液后, 向反应釜中加入等量上述酮基异佛尔酮和葡萄糖, 再次进行反应。反应时间通常约为 8  
25 小时, 不过如果发酵连续进行超过 20 次, 酵母的生产活性将下降, 反应时间将超过 10 小时, 导致生产效率降低。因此, 利用上述相同方法每 20 次进行固定化酵母的活化。结果, 尽管固定化酵母已经反复用于催化反应 100 次, 酵母的活性也没有下降。

进行左旋二酮的纯化方法是, 用所得溶液与所萃取的洗涤溶液的混合物结晶左旋二酮。所得混合物用超滤法过滤, 过滤面积为  $5\text{m}^2$ 。流速设为 250 升/小时。以 200 升/小时速率将滤液上 200 升柱子, 柱子装有 150 升疏  
30

水性吸附树脂 SEPABEADS SP-850 (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan), 以吸附左旋二酮、酮基异佛尔酮和副产物, 例如 actinol。一次吸附操作使用 3000 升滤液。将在柱子内吸附了左旋二酮、酮基异佛尔酮和副产物的树脂加热至 50 ℃, 以 200 升/小时速率向柱子中加入预加热至 50 ℃的

5 甲醇溶液, 以洗脱左旋二酮、酮基异佛尔酮和副产物。一次洗脱操作使用 200 升甲醇。将含有左旋二酮、酮基异佛尔酮和副产物的甲醇溶液用浓缩器在 60 ℃减压下浓缩 6 倍。将含有左旋二酮、酮基异佛尔酮和副产物的浓缩液冷却至 5 ℃, 在该温度下保持 12 小时以上, 以结晶左旋二酮。将残留的酮基异佛尔酮和副产物溶于甲醇。过滤收集所结晶的左旋二酮, 用甲醇洗

10 涤, 以除去表面的酮基异佛尔酮和副产物, 然后干燥。从而完成生产过程, 得到纯度超过 99%的左旋二酮晶体。

利用上述方法, 重复生产左旋二酮的反应 100 次。生产了约 500kg 左旋二酮, 总产率基于所用酮基异佛尔酮来说, 约为 70%, 纯度超过 99%。

实施例 4

15                      固定化形式酵母的左旋二酮生产率的评价

进行发面酵母与鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 (IFO 0494)的左旋二酮生产率对比, 后者在自由细胞条件下具有非常高的生产左旋二酮的能力, 其中两种酵母都处于固定化状态。

测量固定化酵母的活性的方法如下:

20                      利用实施例 1 所述相同方法制备固定化酵母, 进行活化。将酮基异佛尔酮和葡萄糖溶于离子交换水, 最终浓度分别为 10g/l 和 50g/l , pH 调为 4.5 。将固定化酵母(30g)悬浮在提前制备的酮基异佛尔酮和葡萄糖混合物(30ml)中, 在 30 ℃下引发反应。当酮基异佛尔酮已被耗尽时, 反应完成。用气相色谱法分析反应溶液中的左旋二酮浓度, 然后从这些结果评价每种

25 酵母的左旋二酮生产率(g 左旋二酮/kg 酵母/小时), 如下所示:

|                                              | 生产率  |
|----------------------------------------------|------|
| 发面酵母(Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) | 0.69 |
| 鲁氏糖酵母(鲁氏接合糖酵母)HUT 7191 (IFO 0494)            | 4.88 |

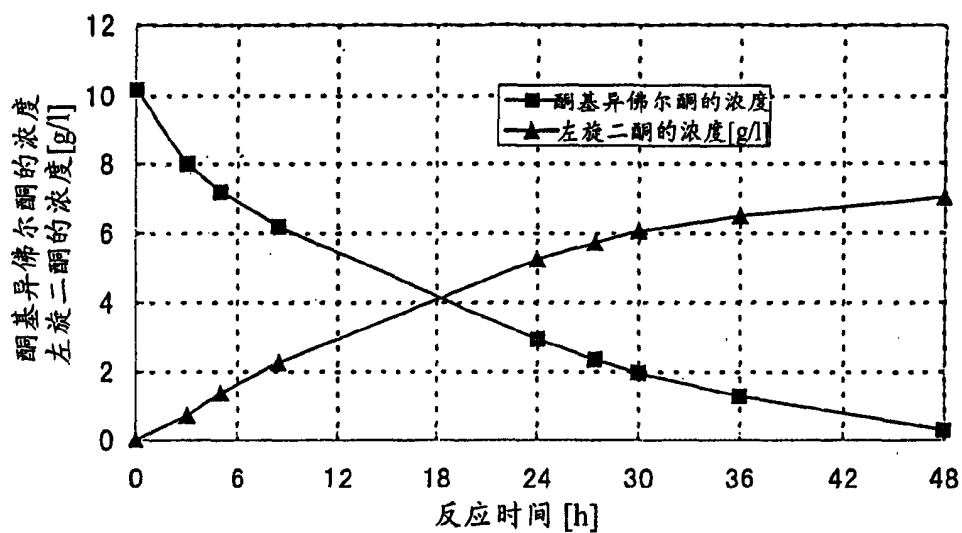


图 1

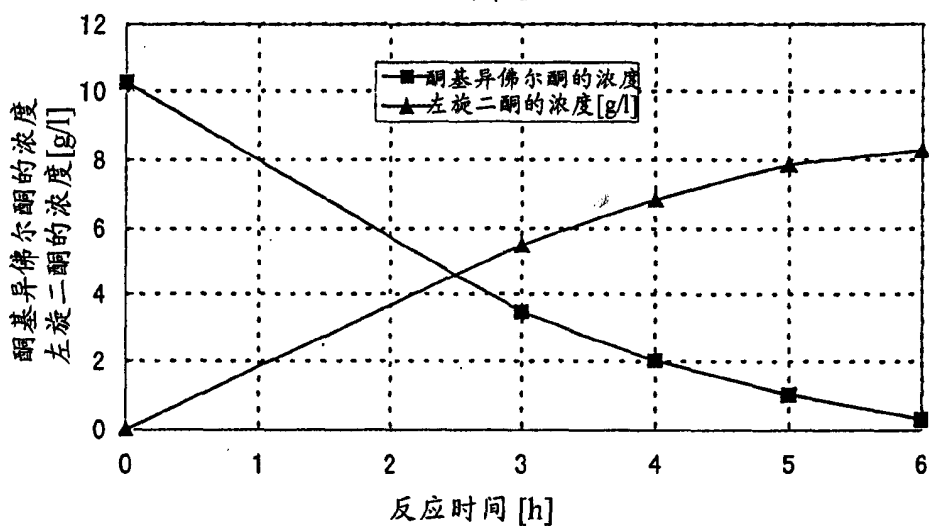


图 2

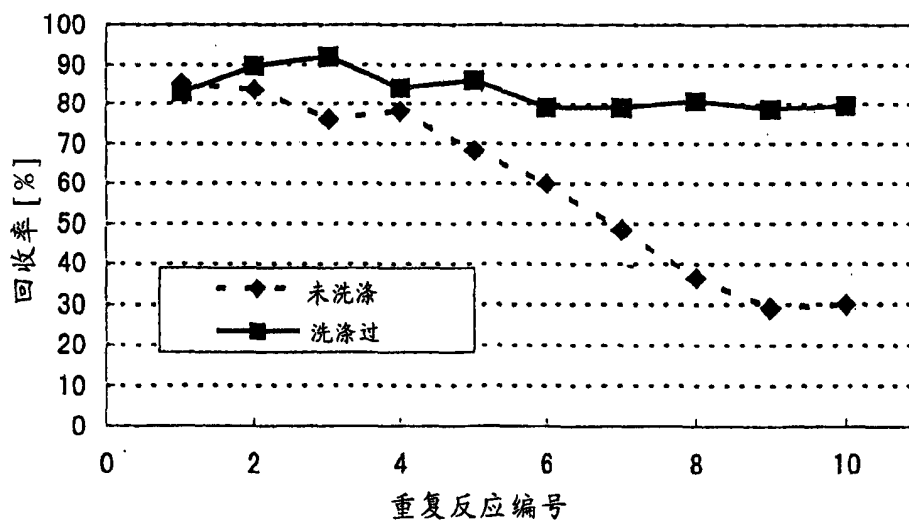


图 3