

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12P 7/16 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200580014840.2

[45] 授权公告日 2009 年 12 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100567497C

[22] 申请日 2005.4.29

[21] 申请号 200580014840.2

[30] 优先权

[32] 2004.5.10 [33] AT [31] A800/2004

[86] 国际申请 PCT/IB2005/001556 2005.4.29

[87] 国际公布 WO2005/108593 德 2005.11.17

[85] 进入国家阶段日期 2006.11.9

[73] 专利权人 IEP 有限责任公司

地址 德国威斯巴登

[72] 发明人 A·古普塔 A·特申特舍

M·博布科瓦

[56] 参考文献

WO 9318138 A 1993.9.16

WO 2005049816 A 2005.6.2

WO 2004111082 A 2004.12.23

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 周铁 李连涛

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

2-丁醇制备方法

[57] 摘要

本发明涉及通过用羰基还原酶和辅酶酶促催化还原 2-丁酮而制备 2-丁醇的方法，且其特征在于：为还原 2-丁酮，使含有羰基还原酶和辅酶的水相和与所述水相不相混溶并含有 2-丁酮的醇相相接触，前提是在醇相中存在的醇是能够使辅酶再生和具有高于水的沸点的仲醇，接着使产生的 2-丁醇在随后被分离。

1. 通过借助羧基还原酶和辅酶酶促催化还原 2-丁酮而制备 2-丁醇的方法，其特征在于：

(a) 为还原 2-丁酮，使含有羧基还原酶和辅酶的水相和不与所述水相混溶且含有 2-丁酮的醇相相接触，其前提是，在醇相中存在的醇是能够再生辅酶并具有高于水的沸点的仲醇，接着

(b) 分离形成的 2-丁醇。

2. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述醇相中的醇是 2-戊醇、2-己醇、2-庚醇、2-辛醇或者 4-甲基-2-戊醇。

3. 权利要求 2 的方法，其特征在于，所述醇相中的醇是 2-庚醇或者 2-辛醇。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其特征在于，醇相中的仲醇和 2-丁酮以 1:2-1:10 的 2-丁酮:仲醇摩尔比使用。

5. 权利要求 4 的方法，其特征在于，所述摩尔比为 1:2.5-1:5。

6. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其特征在于，2-丁酮以至少 5 体积%的量使用，以总反应混合物计。

7. 权利要求 6 的方法，其特征在于，2-丁酮以 10-25 体积%的量使用，以总反应混合物计。

8. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其特征在于，每千克 2-丁酮使用至少 2000 单位的羧基还原酶。

9. 权利要求 8 的方法，其特征在于，每千克 2-丁酮使用至少 10000 单位的羧基还原酶。

10. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其特征在于，使用由近平滑假丝酵母得到的羧基还原酶。

11. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其特征在于，通过蒸馏进行所形成的 2-丁醇的分离。

12. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其特征在于，使用能够制备基本上对映体纯的 S-2-丁醇或者 R-2-丁醇的羧基还原酶。

2-丁醇制备方法

本发明涉及制备 2-丁醇的方法，和特别是借助羧基还原酶和辅酶来酶促催化还原 2-丁酮制备 R-2-丁醇和 S-2-丁醇的方法。

在制备药物活性物质时，2-丁醇和特别是手性化合物 R-2-丁醇和 S-2-丁醇是理想的中间产物。

制备对映体纯的 2-丁醇即 R-2-丁醇和 S-2-丁醇是昂贵的，这是因为将 2-丁酮直接化学催化不对称还原成 R-2-丁醇或者 S-2-丁醇至今是不可能的。直接酶促还原的方法迄今也还未有记载。对映体纯的 R-2-丁醇和 S-2-丁醇在大工业规模上仅能绕道通过拆分外消旋体而制备。

已知羧基还原酶（其它名称：醇脱氢酶，氧化还原酶）为用于还原羧基化合物或者用于氧化仲醇的催化剂。这些酶需要辅酶，例如 NAD(P)H。借助由高加索酸奶粒状乳杆菌（*Lactobacillus kefir*）得到的羧基还原酶和辅酶 NADPH 还原酮由例如 US 5342767 已知。

来自莫拉菌属（*Moraxella* sp.）的醇脱氢酶的提纯和表征由 Eur. J. Biochem. 254, 356-362(1998)已知。

在含水介质中借助羧基还原酶将 2-丁酮还原为 2-丁醇是困难的，这是因为反应混合物不容易后处理和 2-丁醇非常好地溶于水中。此外，用于分离 2-丁醇和水的萃取和蒸馏方法在技术上是昂贵的。

借助羧基还原酶来将 2-丁酮酶促还原成 2-丁醇的另一问题在于辅助因素 NADH 或者 NADPH 的再生。现今通常使用的借助 2-丙醇再生 NAD(P)H 的方法在这里同样是麻烦的，这是因为 2-丙醇使得产物 R-2-丁醇和 S-2-丁醇更加困难，并且其与 R-2-丁醇和 S-2-丁醇的完全分离极其昂贵。

在借助 2-丙醇同时进行 NAD(P)H 辅酶再生情况下在含水介质中在酶促还原 2-丁酮时的另一问题在于大多数酶在 2-丙醇和 2-丁醇含量超过 20% 时失活。这意味着，当采用过量的 2-丙醇开始时，所采用的 2-丁酮的最终浓度必须远低于 10% (w/v)。这些低的可实现的底物浓度或者产物浓度再次使得从反应混合物中分离 R-2-丁醇或者 S-2-丁醇变得困难。

现在，根据本发明的通过借助羧基还原酶和辅酶来酶促催化还原

2-丁酮而制备 2-丁醇的方法的任务在于解决上述问题，且其特征在于：

(a) 为还原 2-丁酮，使含有羧基还原酶和辅酶的水相和不与所述水相混溶且含有 2-丁酮的醇相相接触，其前提是，在醇相中存在的醇是能够再生辅酶并具有高于水的沸点的仲醇，

接着

(b) 分离形成的 2-丁醇。

因此，在根据本发明的方法中借助羧基还原酶将 2-丁酮转化为 2-丁醇的反应在两相体系中进行，所述两相体系由其中溶解有酶和辅酶的水相和由所述仲醇和 2-丁醇形成的有机相组成。

所述辅酶再生借助不与水混溶且同时具有尽可能明显高于水的沸点的仲醇进行。经证实有利的是 2-戊醇、2-己醇、2-庚醇、2-辛醇和 4-甲基-2-戊醇，其中优选 2-庚醇和 2-辛醇。

作为辅酶而言 NADH 和 NADPH 是特别合适的。此外，在本发明方法中，不与水混溶的仲醇导致羧基还原酶的稳定化。

使用不与水混溶的仲醇进行辅酶再生的优点在于，所述仲醇可以以相对于待还原的底物 2-丁酮计更高程度的过量使用。由此同时实现在进料中更高的 2-丁酮浓度和更高的转化率。因此，优选的是醇相中的仲醇和 2-丁酮以 1:2 至 1:10 (2-丁酮:仲醇) 的摩尔比使用，其中 1:2.5 至 1:5 的摩尔比是特别优选的。

根据本发明方法的另一优选方案在于，以至少 5 体积%、优选 10-25 体积% 的量使用 2-丁酮，以总反应混合物计。

所述羧基还原酶优选以每千克 2-丁酮至少 2000 单位、但优选至少 10000 单位羧基还原酶的量使用，其中上限宜为每千克 2-丁酮 250000 单位羧基还原酶。其中酶单位 1U 对应于每分钟 (min) 转化 $1\mu\text{mol}$ 2-丁酮所需的酶量。

经证实特别有效的是，源自近平滑假丝酵母 (Candida Parapsilosis) 的那些酶作为羧基还原酶或者醇脱氢酶。优选的是采用能够制备基本上为对映体醇的 S-2-丁醇或者 R-2-丁醇的羧基还原酶。在此发现，来自近平滑假丝酵母的羧基还原酶能够将 2-丁酮立体有择地还原成 S-2-丁醇，其中取决于所选择的方法条件，可实现超过 98% 所需的对映体的对映体纯度。

在本发明方法中形成的 2-丁醇存在于仲醇相中并可以与仲醇一起

从水相中萃取出来。然后可以以简单的方式蒸馏得到 2-丁醇。

在本发明方法中还可以使用相应的对映体纯 S-醇以进行辅酶再生。

在反应混合物的总体积中水相和有机相的份额可以变化，其中水相的份额可以降低到 3 体积%，这导致在由不与水混溶的醇形成的相中存在超过大于 90% 的所采用的 2-丁酮和 R-2-丁醇或者 S-2-丁醇。

本发明方法的另一优点在于相对简单地后处理和分离高纯度形式的 R-2-丁醇或者 S-2-丁醇。产物 R-2-丁醇或者 S-2-丁醇的分离通过从高沸点的不与水混溶的仲醇中分离出有机相和蒸馏 2-丁酮/2-丁醇而进行。

然后可以借助蒸馏得到由大于 99% 化学纯度且具有大于 98% 的对映体纯度的 2-丁醇/2-丁酮混合物组成的手性产物 R-2-丁醇或者 S-2-丁醇。

在根据本发明方法中所用的底物 2-丁酮的浓度优选高于 5 体积%，特别优选为 10 体积% 至 25 体积%。

以水相计，辅酶 NAD(P)H 的浓度为 0.01mM 至 10mM，特别是 0.1mM 至 1mM。

在本方法所用的水相中优选添加缓冲剂，例如 pH 值为 5-10，优选 pH 值为 6-9 的磷酸钾、Tris/HCl 或者三乙醇胺缓冲液。

在本发明方法中，所述羧基还原酶可以是完全纯化或者部分纯化的，以细胞溶解产物形式或者以整个细胞形式使用。其中所采用的细胞可以以天然形式或者渗透化形式使用。

所述温度例如为约 10℃-60℃，优选为 25℃-35℃。

根据本发明的方法可以例如在由玻璃或者金属制成的封闭反应容器中进行。为此，将组分各自引入到反应容器中并在例如氮气或者空气的气氛下搅拌。反应时间为 1 小时至 48 小时，特别是 2 小时至 24 小时。

代替来自近平滑假丝酵母的羧基还原酶，还可以使用其它的能够将 2-丁酮对映体有择地还原为 S-2-丁醇或者 R-2-丁醇的羧基还原酶。

借助下面的实施例来更详细地描述本发明。

实施例 1

在本实施例中指出了由 2-丁酮制备 S-2-丁醇和 S-2-丁醇的产率对所使用的 2-丁酮/仲醇（2-庚醇）的比率的依赖性。作为羧基还原酶使用的是来自近平滑假丝酵母的羧基还原酶。辅酶再生借助 2-庚醇进行。在下面表 1 中示出了对于具有不同的 2-丁酮/2-庚醇比率的三种进料的转化数据。

表1

组成	进料1	进料2	进料3
缓冲剂 (100mM TEA pH = 7.0)	1 ml	1 ml	1 ml
2-丁酮	2.5 ml (0.027 mol)	2.5 ml (0.027 mol)	2.5 ml (0.027 mol)
NAD	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg
2-庚醇	10 ml (0.068 mol)	15 ml (0.103 mol)	20 ml (0.137 mol)
来自近平滑假丝酵母的ADH	60 单位	60 单位	60 单位
参数			
体积	13.5 ml	18.5 ml	23.5 ml
2-丁酮/2-庚醇的摩尔比	1: 2.5	1: 3.8	1: 5
以% (v/v) 表示的2-丁酮浓度	18.5%	13.5%	10.6 %
产率 (% S-丁醇)	43 %	61 %	70 %
S-丁醇对映体纯度	99 % S	99 % S	99 % S

所述反应按照如下方式进行，首先将缓冲液添加到反应容器中，然后将 NAD 和酶溶解在其中。然后将 2-庚醇和 2-丁酮添加到反应容器中。

然后在良好的均匀混合条件下在 30℃ 对所述反应混合物进行保温。当不再能观察到 2-丁酮的继续转化和因而达到反应平衡时即终止反应。

由表 1 可知，S-2-丁醇的产率随 2-庚醇的浓度增加而显著提高。

· 实施例 2

在该实施例中借助三种进料表明，水相可以被还原，而基本上没有改变产率。

表2

组成	进料4	进料5	进料6
缓冲剂 (100mM TEA pH = 7.0)	2.5 ml	5 ml	10 ml
2-丁酮	5 ml (0.054 mol)	5 ml (0.054 mol)	5 ml (0.054 mol)
NAD	1 mg	1 mg	1 mg
2-庚醇	30 ml (0.206 mol)	30 ml (0.206 mol)	30 ml (0.206 mol)
来自近平滑假丝酵母的ADH	500 单位	500 单位	500 单位
参数			
体积	37.5 ml	40 ml	45 ml
2-丁酮/2-庚醇的摩尔比	1: 3.8	1: 3.8	1: 3.8
以% (v/v) 表示的2-丁酮浓度	13.3 %	12.5 %	11 %
产率 (% S-丁醇)	55 %	58 %	56 %
S-丁醇对映体纯度	98 % S	98 % S	98 % S

实施例 3

由该实施例表明，辅酶再生可以借助不同仲醇进行。三种进料的结果在下面表 3 中示出。

表3

组成	进料7	进料8	进料9
缓冲剂 (100mM TEA pH = 7.0)	20 ml	20 ml	6 ml
2-丁酮	5 ml (0.054 mol)	5 ml (0.054 mol)	1 ml (0.0108 mol)
NAD	0.5 mg	0.5 mg	1 mg
仲醇	30 ml 4-甲基-2- 戊醇 (0.23 mol)	30 ml 2-己醇 (0.23 mol)	4 ml 2-戊醇 (0.036 mol)
来自近平滑假丝酵母的ADH	500 单位	500 单位	100 单位
参数			
体积	55 ml	55 ml	11 ml
2-丁酮/2-庚醇的摩尔比	1: 4.3	1: 4.3	1: 3.3
以% (v/v) 表示的2-丁酮浓度	9 %	9 %	9 %
产率 (% S-2-丁醇)	78%	70%	68 %
S-2-丁醇对映体纯度	96 % S	98 % S	98 % S

实施例 4

通过该实施例表明了工业规模下的 S-2-丁醇的制备。

为了制备 S-2-丁醇，将 4.96 升缓冲液 (TEA 100mM, pH = 7.0) 添加到调温到 30℃ 的搅拌反应器中。然后将 4.96 g NAD 溶解在缓冲液中并向缓冲液中添加 300000 单位来自近平滑假丝酵母的羧基还原酶。所述反应混合物用 76.11 升 (60.9kg) 2-辛醇覆盖，然后添加 12.5 升 (10kg) 底物 2-丁酮。

然后开动搅拌，并将所述反应混合物在良好的均匀混合条件下保温 12 小时。在 12 小时后 68% 的 2-丁酮转化为具有 98.4% 的对映体纯度的 S-2-丁醇。

在反应结束后分离并干燥含有 2-丁酮/S-2-丁醇的庚醇相。2-丁酮/S-2-丁醇混合物首先借助蒸馏从庚醇相 (沸点约 158-161℃) 中获得，然后在第二次蒸馏中分离 2-丁酮 (沸点 80℃) 和 S-2-丁醇 (沸点 = 97-100℃)。

以这种方式可以获得化学纯度大于 99% 的 S-2-丁醇。