

文章编号:2095-0411(2016)06-0001-06

重组 *E. coli* CCZU-K14 高效合成(S)- 3-羟基-4-氯丁酸乙酯研究

何玉财,张丹平,王利群,卿 青,张 跃
(常州大学 制药与生命科学学院,江苏 常州 213164)

摘要:为了避免在反应过程中加入昂贵的辅酶因子 NAD^+ 及有效地转化 4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE)合成(S)-3-羟基-4-氯丁酸乙酯((S)-CHBE),在水相反应体系中加入 *L*-谷氨酰胺(200mmol/L)以提高重组 *E. coli* CCZU-K14 细胞内 NADH 的浓度以及催化活性。当与不添加 *L*-谷氨酰胺相比,添加 *L*-谷氨酰胺后催化活性提高了 1.1 倍。进一步,在含 *L*-谷氨酰胺(200mmol/L)反应体系中加入 β -环糊精($n(\beta\text{-环糊精}):n(\text{COBE})=0.4:1$)。与不添加 β -环糊精相比,添加 β -环糊精后 *E. coli* CCZU-K14 催化活性提高了 1.35 倍。在 *L*-谷氨酰胺- β -环糊精-水反应体系中,催化还原 3 000mmol/L COBE 反应 12h,(S)-CHBE ($>99\%$ *e.e.*)的产率达到 94.9%。总之,研究结果为生物催化不对称高效合成(S)-CHBE 工业化生产奠定了基础。

关键词:*E. coli* CCZU-K14; 4-氯乙酰乙酸乙酯;(S)-3-羟基-4-氯丁酸乙酯;*L*-谷氨酰胺; β -环糊精

中图分类号:Q 814

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2016.06.001

Effective Synthesis of Ethyl (S)-4-Chloro-3-Hydroxybutanoate by Recombinant *E. coli* CCZU-K14

HE Yucai, ZHANG Danping, WANG Liqun, QING Qing, ZHANG Yue

(School of Pharmaceutical Engineering & Life Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: To avoid adding additional expensive cofactor NAD^+ and effectively biotransform ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate (COBE) into ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate ((S)-CHBE), *L*-glutamine (200mmol/L) was used to enhance the intracellular NADH content and the catalytic activity of *E. coli* CCZU-K14. A 1.1-fold of biocatalytic activity was increased over the control without *L*-glutamine. Furthermore, β -cyclodextrin ($n(\beta\text{-cyclodextrin}):n(\text{COBE})=0.4:1$) was added into this reaction media containing *L*-glutamine (200mmol/L), and the biocatalytic activity of *E. coli* CCZU-K14 was increased by 1.35-fold than that without β -cyclodextrin. In this β -cyclodextrin-*L*-glutamine-water media, (S)-CHBE ($>99\%$ *e.e.*) was obtained from 3 000mmol/L COBE at 94.9% yield after 12h. In conclusion, these results will lay the foundation for the effective industrial production of (S)-CHBE.

Key words: *E. coli* CCZU-K14; ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate; ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate; *L*-glutamine; β -cyclodextrin

收稿日期:2016-06-02。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21102011);江苏省自然科学基金资助项目(BK20141172);常州大学教改课题(GJY2014068)。

作者简介:何玉财(1979—),男,辽宁开原人,博士,副教授,主要从事生物催化研究。

(S)-3-羟基 4-氯丁酸乙酯((S)-CHBE)是一种重要的手性中间体,可用于合成 β -1,4-二氢吡啶类钙离子通道阻断剂和 HGM-CoA 还原酶抑制剂等手性药物^[1-4]。不对称还原催化 4-氯乙酰乙酸乙酯(COBE)合成(S)-CHBE 具有理论产率可高达 100% 的特点,值得深入研究。目前,还原 COBE 合成(S)-CHBE 可通过化学法和生物法两种途径:化学法是通过昂贵的金属催化剂加氢还原 COBE 合成(S)-CHBE,并且反应条件较为苛刻或/和产物光学纯度不高等缺点^[5];生物合成(S)-CHBE 因其具有选择性高和反应条件温和等优点^[5-10],更符合当今节能减排和绿色合成的环保要求,从而引起许多专家学者的极大兴趣。然而,利用还原酶不对称催化还原 COBE 合成(S)-CHBE 需辅酶 NADH 或 NADPH 参与,因而在生物催化反应中需额外添加 NAD(P)⁺ 作为辅因子促进辅酶循环^[3-4,11],却增加了合成(S)-CHBE 的成本。因此,有效地对 NAD(P)H 进行再生是很有必要的。

众所周知,通过微生物细胞中的辅酶再生系统进行原位辅酶再生可很好地解决辅酶再生问题^[1,9]。另外,可选择合适的前体直接或间接参与细胞内 NAD(P)H 的合成^[12-14],从而提高细胞内 NAD(P)H 含量,进一步提高不对称还原效率。因此,筛选到合适的前体取代 NAD(P)⁺ 并实现辅酶原位再生是非常有意义的研究工作。

除此之外,在还原反应的过程中底物 COBE 的不溶性会影响底物扩散^[15-17],并可能会产生底物抑制,从而降低了生物还原催化效率。据报道, β -环糊精是一种环状寡糖分子,它具有外腔亲水和内腔疏水的空腔结构,从而可与难溶于水的底物形成包合物^[15-18]。因此,在反应体系中加入 β -环糊精可以用于提高疏水化合物的溶解性以及其生物利用度,降低底物对催化剂的抑制作用,实现(S)-CHBE 的高效合成。

前期,课题组成功挖掘构建了 NADH 依赖型还原酶重组菌株 *E. coli* CCZU-K14^[9]。为了避免在生物催化 COBE 还原反应的过程中加入昂贵的辅因子 NAD⁺,本研究进行全细胞催化时从 D-核糖、L-核糖、D-谷氨酰胺、L-谷氨酰胺、L-天冬氨酸、烟酸、木糖和甘氨酸中筛选合适的前体用于提高 *E. coli* CCZU-K14 胞内 NADH 含量和(S)-CHBE 的生物合成效率。进一步,添加 β -环糊精提高底物的溶解性以及还原酶的活性。最后,建立高效的生物催化反应体系实现 3 000 mmol/L COBE 高效合成

(S)-CHBE。

1 实验部分

1.1 实验试剂

OXID 蛋白胨和酵母提取物购自上海思域化工科技有限公司。NAD⁺ 和 NADH 购自上海捷倍思基因技术有限公司。卡那抗生素和 IPTG 购于上海生工生物有限公司。天冬氨酸、烟酸、D-核糖、L-核糖、D-谷氨酰胺、L-谷氨酰胺、木糖、甘氨酸、葡萄糖、氯化钠、 β -环糊精(β -CD)和 4-氯乙酰乙酸乙酯等购于国药化学试剂有限公司。

1.2 实验仪器

超净工作台 SW-CJ-1FD(苏净集团,中国);紫外-可见分光光度计(Beckman);恒温振荡摇床(上海智成,中国);pHS-2C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂,中国);LDZX-50KBS 全自动蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂,中国);JY9Z-II 超声破碎仪(宁波新芝科器研究所,中国);TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂,中国);Agilent GC6820 气相色谱(安捷伦科技有限公司);CP-Chirasil-Dex CB 手性气相色谱柱(30 m \times 0.25 m \times 0.25 μ m, Agilent);W201 恒温水浴锅(上海申生科技有限公司,中国)。

1.3 菌株、培养基及培养条件

用于生物催化还原 COBE 合成(S)-CHBE (>99% *e.e.*)的 NADH 依赖型还原酶重组菌株 *E. coli* CCZU-K14^[9]保存于常州大学生物工程实验室。

LB (Luria-Bertni)培养基(1 L):10 g NaCl,10 g 蛋白胨,5 g 酵母提取物,pH 7.0。于 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

E. coli CCZU-K14 种子液培养:在 50 mL 的灭菌 LB 培养基中,接入 *E. coli* CCZU-K14,于 37℃、160 r/min 摇床培养 15 h,获得种子液。

E. coli CCZU-K14 增殖培养:在 500 mL 的灭菌培养基中,接入 10 mL *E. coli* CCZU-K14 种子液,于 37℃、160 r/min 摇床培养,当 OD₆₀₀ 达到 0.60,加入诱导剂 IPTG (终浓度为 5×10^{-5} mol/L),诱导 6 h 后,利用离心机(8 000 $\times g$, 30℃)收获 *E. coli* CCZU-K14 细胞,进一步用于生物催化 COBE 反应。

1.4 实验步骤

1.4.1 前体的选择

将 10.0 g (湿重) *E. coli* CCZU-K14 细胞悬浮于 200 mL 磷酸缓冲溶液 (pH 7.0, 100 mmol/L) 中,加入 1 500 mmol/L 葡萄糖和 200 mmol/L 不同前体(D-核糖、L-核糖、D-谷氨酰胺、L-谷氨酰胺、L-天冬氨酸、烟酸、木糖或甘氨酸)或 100 μ mol/L NAD^+ ,并加入 1 000 mmol/L COBE,于 30℃、160 r/min 恒温摇床中反应 1 h,反应结束后用等体积乙酸乙酯溶液萃取,取萃取液用气相色谱检测 COBE 和 CHBE 浓度^[1,9]。

1.4.2 L-谷氨酰胺浓度优化

将 10.0 g (湿重) *E. coli* CCZU-K14 细胞悬浮于 200 mL 磷酸缓冲溶液 (pH 7.0, 100 mmol/L) 中,加入 1 500 mmol/L 葡萄糖、1 000 mmol/L COBE 和 0~350 mmol/L L-谷氨酰胺,于 30℃、160 r/min 恒温摇床中反应 1 h,反应结束后,等体积乙酸乙酯萃取,取萃取液用气相色谱检测 COBE 和 CHBE 浓度^[1,9]。

1.4.3 β -环糊精浓度优化

将 10.0 g (湿重) *E. coli* CCZU-K14 细胞悬浮与 200 mL 磷酸缓冲溶液 (pH 7.0, 100 mmol/L) 中,加入 1 500 mmol/L 葡萄糖、1 000 mmol/L COBE、200 mmol/L L-谷氨酰胺和一定浓度的 β -环糊精(n (β -环糊精): n (COBE)为 0.2~0.6),于 30℃、160 r/min 恒摇床中反应。反应结束后,等体积乙酸乙酯萃取,气相色谱检测 COBE 和 CHBE 浓度^[1,9]。

1.4.4 细胞中 NADH 浓度的测定

将 10.0 g (湿重) *E. coli* CCZU-K14 细胞悬浮于 200 mL 磷酸缓冲溶液 (pH 7.0, 100 mmol/L) 中,加入 1 500 mmol/L 葡萄糖和 1 000 mmol/L COBE,加入 200 mmol/L L-谷氨酰胺,10 mmol/L EDTA,于 30℃、160 r/min 恒摇床中处理 30 min,快速冻融法破碎细胞,离心测上清液利用 HPLC 分析 NADH 浓度,于恒温 30℃、流速 1.0 mL/min 和检测波长 254 nm 条件下检测。流动相:25 mmol/L 三乙胺,用磷酸调节 pH 至 6.0,加入乙腈(φ (乙腈)=3%)。

1.4.5 还原反应活力测定

还原反应活力测定的条件:反应混合物 3 mL,包含有 0.1 mmol/L 的 NADH,2 mmol/L 的底物 COBE,100 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0),在

30℃下保温 2 min 后,加入适量的粗酶液(细胞破碎液),开始检测 340 nm 处吸光度的减少来表征还原酶的活性。

2 结果与讨论

2.1 水相反应体系中添加前体对还原 COBE 的影响

据报道,一些小分子化合物可作为 NADH 合成的前体^[12-14]。本研究采用 100 μ mol/L NAD^+ 和不同 200 mmol/L 的小分子化合物(L-天冬氨酸、L-核糖、D-核糖、L-谷氨酰胺、D-谷氨酰胺、D-木糖、烟酸和甘氨酸)对细胞中还原酶活性及产物(S)-CHBE 的光学纯度(*e.e.*)的影响进行了考察。如图 1 所示,这些前体对产物(S)-CHBE 的光学纯度(*e.e.*)没有影响。与添加 NAD^+ 相比,当在反应体系中加入 L-天冬氨酸或烟酸时,还原活性明显下降。添加 L-谷氨酰胺和甘氨酸均能促进还原酶活性,而 L-谷氨酰胺比甘氨酸具有明显地促进作用。很有可能,L-谷氨酰胺能够参与合成 NADH 使得反应体系中 *E. coli* CCZU-K14 胞内 NADH 的浓度提高,从而避免在反应体系中添加额外的 NAD^+ 并降低反应成本。

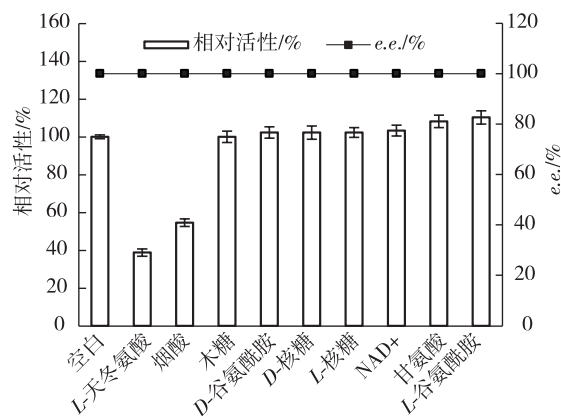


图1 不同前体对生物催化活性及(S)-CHBE 光学纯度的影响

Fig.1 Effects of different precursors on the biocatalytic activity and the optical purity of (S)-CHBE

进一步,考察不同浓度 L-谷氨酰胺(0~350 mmol/L)对细胞内 NADH 浓度和生物催化活性的影响。如图 2 所示,随着 L-谷氨酰胺的浓度的增加,*E. coli* CCZU-K14 还原酶活性也有所增加。当 L-谷氨酰胺的浓度达到 200 mmol/L 时,还原催化活性达到了最大值,为不添加 L-谷氨酰胺时还原

酶酶活的 1.1 倍。研究发现,当 *L*-谷氨酰胺的浓度低于 200mmol/L 时,胞内 NADH 的浓度随着 *L*-谷氨酰胺浓度的增加而增加;当 *L*-谷氨酰胺的浓度达到 200mmol/L 时,细胞内的 NADH 浓度也达到了最大值;继续增加 *L*-谷氨酰胺的浓度,细胞内 NADH 的浓度降低。可见,*L*-谷氨酰胺(200mmol/L)可作为前体会促进细胞内 NADH 的合成,并提高细胞内 NADH 的浓度,从而提高还原酶催化还原效率。高浓度的 *L*-谷氨酰胺(>200mmol/L)可能会抑制辅酶再生系统。因此,本研究选择 *L*-谷氨酰胺(200mmol/L)取代额外添加的 NAD^+ 。

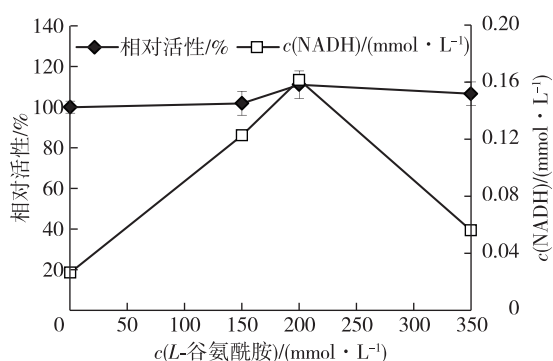


图2 *L*-谷氨酰胺对催化活性及胞内 NADH 浓度的影响
Fig.2 Effects of *L*-glutamine on the catalytic activity and intracellular NADH concentration

为了验证 *L*-谷氨酰胺(200mmol/L)是否能提高 COBE 还原合成(S)-CHBE 效率,本研究对 1 000mmol/L 和 3 000mmol/L COBE 的催化还原反应进行了考察。结果如图 3 所示,1 000mmol/L COBE 反应 2h,(S)-CHBE 的产率为 79.7%;延长反应时间至 6h 后可完全转化 COBE 为(S)-CHBE。在邻苯二甲酸二丁酯-水(φ (邻苯二甲酸二丁酯)=50%)两相体系中,重组 *E. coli* CCZU-Y10 催化 1 000 mmol/L COBE 24h,(S)-CHBE 产率为 99.0%^[10]。可见,在 *L*-谷氨酰胺(200mmol/L)-水相体系中,*E. coli* CCZU-K14 还原 COBE 效果较高。当 *E. coli* CCZU-K14 分别催化 3 000mmol/L COBE 8h 和 12h 时,还原产物(S)-CHBE 的浓度分别为 1 585.4 mmol/L 和 2 177.2 mmol/L。继续延长催化反应到 24h 时,(S)-CHBE 产率为 80.0%。因此,在反应体系中添加 *L*-谷氨酰胺(200mmol/L)可避免额外添加 NAD^+ ,并且 *E. coli* CCZU-K14 还原酶生物催化剂具有较高的催化反应活性合成(S)-CHBE。然而,*E. coli* CCZU-K14 催化 3 000 mmol/L COBE 合成(S)-CHBE 产率仍需进一步

提高。

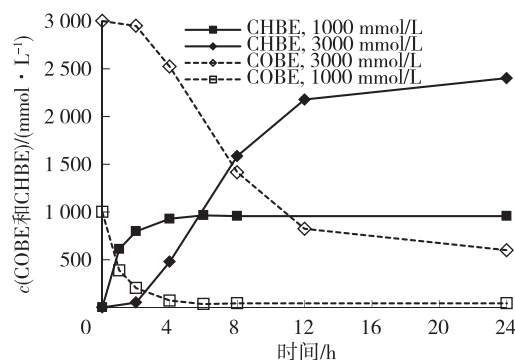


图3 在 *L*-谷氨酰胺(200mmol/L)存在下催化还原 1 000~3 000mmol/L COBE 进程

Fig.3 Time courses for the biocatalytic reduction of 1 000—3 000mmol/L COBE in the presence of *L*-glutamine (200mmol/L)

2.2 在 β -环糊精-*L*-谷氨酰胺-水体系中不对称还原 COBE

在全细胞生物催化还原的过程中,底物的疏水性会对单水相反应体系造成一定的影响^[17]。据报道, β -环糊精可提高疏水性底物在水相中的溶解度^[16],从而提高生物催化的效率。如图 4 所示,考察了 $n(\beta\text{-环糊精}):n(\text{COBE})$ 对还原酶活性影响。研究发现,在反应体系中 β -环糊精可能与 COBE 形成包合物,并且该包合物与未被环糊精包合的 COBE 形成一个动态的平衡,由研究结果可知, $c(\beta\text{-环糊精}):c(\text{COBE})$ 为 0.4 时还原酶活性最高,为不添加 β -环糊精时还原酶酶活的 1.35 倍。当 $c(\beta\text{-环糊精}):c(\text{COBE})$ 的比例继续提高时,还原酶活性提高并不明显,并且对产物的 *e.e.* 没有影响。因此, β -环糊精与 COBE 最适为 $n(\beta\text{-环糊精}):n(\text{COBE})=0.4:1$ 。

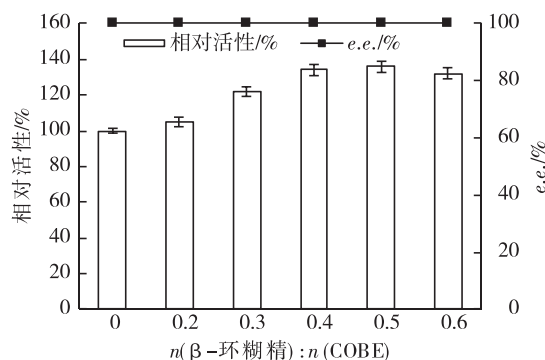


图4 β -环糊精添加量对催化活性的影响

Fig.4 Effects of β -cyclodextrin dosage on the catalytic activity

研究报道 β -环糊精可与疏水性底物形成包合物^[17],从而提高疏水性底物的溶解度以及生物利用度。为了研究反应体系中 β -环糊精的作用机制,本研究对 β -环糊精、 β -环糊精-COBE 作用产物以及底物 COBE 进行了红外光谱表征。如图 5 所示,底物 COBE 在 $1\,731\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,659\text{ cm}^{-1}$ 处有 C=O 的特殊吸收峰。很明显, β -环糊精与 COBE 形成的混合物在 $1\,731\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,659\text{ cm}^{-1}$ 处吸收减弱。因此,COBE 可能与 β -环糊精形成了包合物,从而可降低潜在的底物抑制。

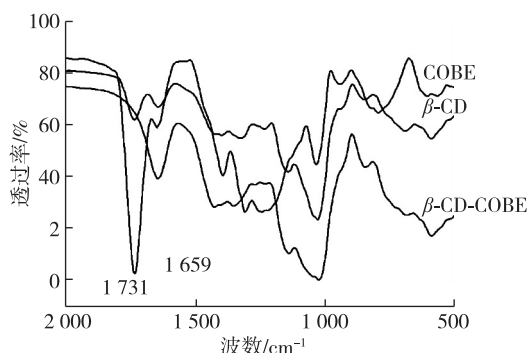


图 5 FTIR 分析 COBE、 β -环糊精及其作用产物

Fig.5 FTIR assay of COBE, β -cyclodextrin and their product

进一步,在含 β -环糊精 ($n(\beta\text{-环糊精}):n(\text{COBE})=0.4:1$) 和 *L*-谷氨酰胺 (200 mmol/L) 水相体系 (*L*-谷氨酰胺- β -环糊精-水) 中监测 *E. coli* CCZU-K14 催化 COBE 合成 (S)-CHBE 反应进程,结果由图 6 所示,当底物浓度为 1 000 mmol/L 时,经过 2h 底物完全转化为 (S)-CHBE,可见 *E. coli* CCZU-K14 催化 COBE 的活性高于文献[3-4, 10]的报道。当底物浓度为 3 000 mmol/L 时,8h 时 (S)-CHBE 浓度为 2 610 mmol/L, (S)-CHBE 产率为 87.0%。催化还原 12h, (S)-CHBE 为 2 846 mmol/L,其产率为 94.9%。而在不添加 β -环糊精时, *E. coli* CCZU-K14 催化还原 3 000 mmol/L 的 COBE 在 12h 时 (S)-CHBE 的产率仅为 72.6% (图 3)。据报道,在甲苯-水 ($\varphi(\text{甲苯})=50\%$) 两相体系中,重组 *Streptomyces coelicolor* 还原酶可高效催化 COBE 合成 (S)-CHBE 产率为 93.0%^[1],但是在反应体系中使用了高比例的甲苯。因此,在生物兼容的 *L*-谷氨酰胺- β -环糊精-水反应体系中, *E. coli* CCZU-K14 可以成功实现 3 000 mmol/L COBE 高效还原,具有潜在的应用前景。

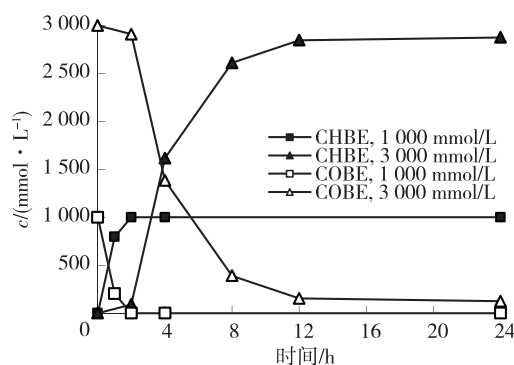


图 6 在 *L*-谷氨酰胺- β -环糊精-水介质中催化 1 000 ~ 3 000 mmol/L COBE 进程

Fig.6 Time courses for the biocatalytic reduction of 1 000 ~ 3 000 mmol/L COBE in *L*-glutamine- β -cyclodextrin-water media

2.3 (S)-CHBE 的制备

在 200 mL *L*-谷氨酰胺- β -环糊精-水体系中生物转化 1 000 mmol/L COBE 反应 2h 后的反应液加热到 60°C 并维持 30 min,使反应介质中的蛋白质完全变性,进一步冷却后利用离心机分离除去变性的细胞碎片和蛋白质沉淀。获得的离心上清液利用 2 mol/L NaOH 调节 pH 到 8.5,然后用等体积的甲苯萃取 3 次,萃取液旋转蒸发浓缩。由于 1 000 mmol/L COBE 的转化率达到 100%,获得的粗产品直接采用减压蒸馏的方法精制,无需进行柱层析分离纯化。系统的真空压力为 200 Pa 时,收集沸点为 $90\sim 101^\circ\text{C}$ 之间的蒸馏产物,获得产品 28.95 g,收率为 87.2%。对产品 (S)-CHBE 进行分析,其化学纯度为 99.0%,光学纯度 $e.e. > 99\%$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.29 (t, 3H, $J = 7.2\text{ Hz}$), 2.63 (d, 2H, $J = 7.2\text{ Hz}$), 3.61 (d, 2H, $J = 2.8\text{ Hz}$), 4.19 (m, 2H, $J = 7.2\text{ Hz}$), 4.24~4.29 (m, 1H)。

3 结 论

药物中间体的研究是目前的研究热点^[19-20]。研究发现,不对称还原 COBE 的水相反应体系中添加的最适前体为 *L*-谷氨酰胺 (200 mmol/L),可避免添加额外的辅因子 NAD^+ ,并且可提高 *E. coli* CCZU-K14 COBE 还原酶催化活性。另外,在反应体系中加入 β -环糊精可以与底物形成包合物,提高底物 COBE 的生物利用度以及还原酶活性。在含 β -环糊精 ($n(\beta\text{-环糊精}):n(\text{COBE})=0.4:1$) 和 *L*-谷氨酰胺 (200 mmol/L) 水相体系 (*L*-谷氨酰胺- β -环糊

精-水)中,*E.coli* CCZU-K14 细胞可成功地催化还原 3 000 mmol/L 的 COBE,产物(S)-CHBE (*e.e.*>99%)产率 94.9%。总之,本研究为还原酶催化剂高效合成手性中间体提供了一条新思路。

参考文献:

- [1] WANG L J, LI C X, NI Y, et al. Highly efficient synthesis of chiral alcohols with a novel NADH-dependent reductase from *Streptomyces coelicolor* [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(14): 7023-7028.
- [2] WANG Q, SHEN L, YE T, et al. Overexpression and characterization of a novel (S)-specific extended short-chain dehydrogenase/reductase from *Candida parapsilosis* [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 123: 690-694.
- [3] YAMAMOTO H, MITSUHASHI K, KIMOTO N, et al. A novel NADH-dependent carbonyl reductase from *Kluyveromyces aestuarii* and comparison of NADH-regeneration system for the synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(3): 638-649.
- [4] YE Q, CAO H, MI L, et al. Biosynthesis of (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate ethyl using *Escherichia coli* co-expressing a novel NADH-dependent carbonyl reductase and a glucose dehydrogenase [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(22): 8911-8914.
- [5] 郁惠蕾, 黄磊, 倪燕, 等. 羰基生物还原法合成手性醇的研究进展[J]. *生物加工过程*, 2013, 11(3): 71-82.
- [6] KALIAPERUMAL T, KUMAR S, GUMMADI SN, et al. Asymmetric synthesis of (S)-ethyl-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *Candida parapsilosis* ATCC 7330 [J]. *J Ind Microb Biotechnol*, 2010, 37(2): 159-165.
- [7] XU Q, TAO W Y, HUANG H, et al. Highly efficient synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by a novel carbonyl reductase from *Yarrowia lipolytica* and using mannitol or sorbitol as cosubstrate [J]. *Biochem Eng J*, 2016, 106: 61-67.
- [8] 徐慰倬, 张莹, 来琳琳, 等. 他汀类药物中间体的生物催化合成研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2012, 22(1): 51-58.
- [9] HE Y C, TAO Z C, ZHANG X, et al. Highly efficient synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate and its derivatives by a robust NADH-dependent reductase from *E. coli* CCZU-K14 [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 161: 461-464.
- [10] HE Y C, YANG Z X, ZHANG D P, et al. Biosynthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by NADH-dependent reductase from *E. coli* CCZU-Y10 discovered by genome data mining using mannitol as co-substrate [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(8): 2042-2053.
- [11] HE Y C, ZHANG D P, TAO Z C, et al. Discovery of a reductase-producing strain recombinant *E. coli* CCZU-A13 using colorimetric screening and its whole cell-catalyzed biosynthesis of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 172: 342-348.
- [12] LIU L M, LI Y, SHI Z P, et al. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: increase of NAD⁺ availability [J]. *J Biotechnol*, 2006, 126(2): 173-185.
- [13] NIE Y, YAN X, QING S H, et al. A new strategy to improve the efficiency and sustainability of *Candida parapsilosis* catalyzing deracemization of (R,S)-1-phenyl-1,2-ethanediol under non-growing conditions: increase of NADPH availability [J]. *J Microb Biotechnol*, 2009, 19(1): 65-71.
- [14] MA B, PAN S J, ZUPANCIS M L, et al. Assimilation of NAD⁺ precursors in *Candida glabrata* [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 66(1): 14-25.
- [15] ZIDOVETZKI R, LEVITAN I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies [J]. *BBA Biomembranes*, 2007, 1768(6): 1311-1324.
- [16] ZHANG Q F, NIE H C, SHANGGUAN X C, et al. Aqueous solubility and stability enhancement of astilbin through complexation with cyclodextrins [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(1): 151-156.
- [17] LUCAS-ABWLLAN C, FORTEA M I, GABALDON J A, et al. Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays [J]. *Food Chem*, 2008, 111(1): 262-267.
- [18] MOSINGER J, TOMANKOVA V, NEMCOVA I, et al. Cyclodextrins in analytical chemistry [J]. *Anal Lett*, 2001, 34(12): 1979-2004.
- [19] 韩峰, 徐崇福, 李贞奇, 等. 药物中间体 α -2 酰基环己酮的合成工艺 [J]. *常州大学学报(自然科学版)*, 2010, 22(4): 24-27.
- [20] 王昕宁, 徐崇福, 陈颖, 等. 药物中间体 4-氯苯基苄基酮的合成 [J]. *常州大学学报(自然科学版)*, 2012, 24(2): 31-34.

(责任编辑:殷丽莉)