

生物催化 3-(4-氯苯基)-戊二腈去对称性水解合成光学纯巴氯芬的关键前体

徐美珍¹, 任杰², 龚劲松¹, 董文玥², 吴洽庆², 许正宏¹, 朱敦明²

1 江南大学医药学院制药工程研究室, 江苏 无锡 214122

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室, 天津 300308

徐美珍, 任杰, 龚劲松, 等. 生物催化 3-(4-氯苯基)-戊二腈去对称性水解合成光学纯巴氯芬的关键前体. 生物工程学报, 2013, 29(1): 31-40.

Xu MZ, Ren J, Gong JS, et al. Biocatalytic desymmetrical hydrolysis of 3-(4-chlorophenyl)-glutaronitrile to the key precursor of optically pure baclofen. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 31-40.

摘 要: 研究了利用生物催化剂制备 (S)-4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸。以 3-(4-氯苯基)-戊二腈为底物, 采用苯酚-次氯酸钠法对实验室保藏的菌株进行筛选, 得到一株产物立体选择性较高的菌株赤霉菌 *Gibberella intermedia* WX12, 并对其催化特性和发酵条件进行了初步研究。以 30 g/L 的乳糖和 20 g/L 的蛋白胨分别为碳、氮源, 发酵培养 96 h, 收集的菌体在 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 中 30 °C 催化反应 24 h, 将 3-(4-氯苯基)-戊二腈转化为 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸, 产率为 90 %。将产物化学转化为巴氯芬, 手性 HPLC 分析表明水解产物构型是 (S), 其对映异构体过量值 $ee > 99\%$ 。该产物可以用来合成光学纯的 (R)-和(S)-巴氯芬。

关键词: 腈水解酶, 3-(4-氯苯基)-戊二腈, 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸, 巴氯芬

Received: September 3, 2012; **Accepted:** December 3, 2012

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB710801), Tianjin Municipal Science & Technology Project (No. 09ZCKFSH01000).

Corresponding author: Zhenghong Xu. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: Zhengxu@jiangnan.edu.cn

Dunming Zhu. Tel: +86-22-84861962; Fax: +86-22-84861996; E-mail: zhu_dm@tib.cas.cn

国家重点基础发展计划 (973 计划) (No. 2011CB710801), 天津科技计划项目 (No. 09ZCKFSH01000) 资助。

Biocatalytic desymmetric hydrolysis of 3-(4-chlorophenyl)-glutaronitrile to the key precursor of optically pure baclofen

Meizhen Xu¹, Jie Ren², Jingsong Gong¹, Wenyue Dong², Qiaqing Wu², Zhenghong Xu¹, and Dunming Zhu²

¹ Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: We produced (S)-4-cyano-3-(4-chlorophenyl)-butyrate by highly stereoselective biocatalyst in this study. A nitrilase-producing strain, named *Gibberella intermedia* WX12, was isolated by 3-(4-chlorophenyl)-glutaronitrile as substrate in the screening with phenol-sodium hypochlorite method. The fermentation conditions and catalytic properties of this strain were investigated. The preferred carbon and nitrogen sources for nitrilase production were lactose (30 g/L) and peptone (20 g/L). After being cultivated for 96 h, the cells were collected for use in biotransformation. The hydrolysis of 3-(4-chlorophenyl)-glutaronitrile was performed at 30 °C in phosphate buffer (pH 8.0, 50 mmol/L) for 24 h to give (S)-4-cyano-3-(4-chlorophenyl)-butyric acid with 90% yield and >99% of *ee*, which can be used for the synthesis of (R)- and (S)-baclofen. The configuration of product was determined by chemically converting it to baclofen and comparison with the authentic sample by chiral HPLC analysis.

Keywords: nitrilase, 3-(4-chlorophenyl)-glutaronitrile, 4-cyano-3-(4-chlorophenyl)-butyric acid, baclofen

腈类化合物 (R-CN) 是有机合成中的重要中间体^[1], 它的水解反应被广泛应用于氨基酸、酰胺、羧酸及其衍生物的合成^[2-3], 在有机合成中占有极其重要的地位, 腈水解的方法主要有化学水解法和生物转化法^[4-6]。腈的传统化学水解需要强酸或强碱、高温、高压等反应条件, 生产成本低, 而且副产物多, 产量低, 环境污染严重; 相反, 生物转化法反应条件温和, 环境污染小, 并具有良好的化学选择性^[7]、区域选择性^[8]和对映选择性^[9]等优点。

巴氯芬 (Baclofen), 商品名力奥来素 (Lioresal), 化学名 β -4-氯苯基- γ -氨基丁酸, 是 γ -氨基丁酸的取代衍生物, 曾作为肌松药用于临床, 后续研究还发现其具有镇咳、抗癫痫、治疗顽固性呃逆、中风及脊髓损伤引起的疼痛、三叉

神经痛等临床作用^[10-11]。巴氯芬是一种手性药物, 存在一对对映异构体, 据文献报道, (R)-巴氯芬的活性是 (S)-巴氯芬的 100 倍^[11]。但由于光学纯的巴氯芬的合成成本较高, 目前市场上的巴氯芬药品仍是消旋体。

目前, 光学纯巴氯芬的合成方法主要集中于化学合成^[12-15]、手性拆分^[16-18]以及酶催化-化学合成^[19-20]。化学水解方法通常需要高温、强酸、强碱条件, 并伴随有大量盐类形成, 给分离纯化带来困难, 也造成一定的环境污染; 而酶法水解则具有高效性、高选择性、反应条件温和、环境污染小、成本低、产物光学纯度高等优点, 这符合原子经济性和绿色化学发展的要求。另外, 化学法很难实现二腈到单腈单酸的选择性水解, 而酶法却可轻易完成该反应, 故将传统的有机合成

与生物催化结合的方法(化学-酶法)在手性医药中间体合成方面显示了巨大的优势^[21]。而到目前为止,对腈的区域和立体选择性生物转化反应的研究还比较少,特别是以潜手性的二腈为底物,生物转化生成光学活性的单氰基羧酸化合物的反应更是稀少。王梅祥等^[20]利用红球菌 *Rhodococcus* sp. AJ270 细胞在催化转化 72 h 后实现了 3-(4-氯苯基)-戊二腈的选择性水解,生成的产物为 (S)-4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸,转化产物 *ee* 值为 26%,在体系中添加丙酮后 *ee* 提高至 63%。

本文从腈水解酶产生菌株的筛选入手,得到一株能将底物 3-(4-氯苯基)-戊二腈去对称性水解成 *S* 构型的 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸的菌株,并对其催化性能进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

种子培养基 (g/L): 牛肉膏 10, 葡萄糖 25, 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 5。pH 7.0, 115 °C 灭菌 20 min。发酵培养基 (g/L): 乳糖 30, 蛋白胨 10, NaCl 1.16, MgSO₄·7H₂O 0.12, KH₂PO₄ 2.72, 己内酰胺 2.26。pH 7.0, 115 °C 灭菌 20 min。

1.1.2 主要试剂和仪器

隔水式恒温培养箱 (上海一恒, GHP-9270); 恒温培养振荡器 (上海智城, ZHWY-200D); 超净工作台 (苏净安泰, SW-CJ-1FD); 1260 型高效液相色谱仪 (HPLC) 为 Agilent Technologies 公司产品; 手性分离柱 Crownpak CR^[+] 和 IB 均为 DAICEL 公司产品。蛋白胨、酵母粉为美国 BD 公司产品; 戊酸、丁二酸、2-, 3-, 4-氰基

吡啶为 TCI 公司产品; 戊二酸、消旋巴氯芬为 Alfa 公司产品; (R)-巴氯芬为 TRC 公司产品; 其他试剂为国产分析纯; HPLC 所用流动相为色谱纯。

1.2 催化转化反应

离心收集发酵培养后的菌体, 采用 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 洗涤菌体 3 次, 115 °C 烘干测菌体干重, 按 30 mg/mL 的菌体干重将菌体重悬至 5 mL 体系, 添加 3-(4-氯苯基)-戊二腈 0.04 g (终浓度 20 mmol/L), 催化反应在 30 °C、200 r/min 条件下进行。

1.3 酶活检测

酶活采用国际单位, 描述为: 30 °C 下每分钟生成 1 μmol 氨所需酶量为一个酶活单位 (U); 比酶活用每克干菌体 (DCW) 所产生的酶活表示 (U/g)。腈水解酶菌株按方法 1.2 所示进行转化反应, 酶活采用苯酚-次氯酸钠法测定反应中生成的氨来快速检测^[22]。

1.4 高产菌株的筛选及鉴定

本实验所采用的菌种由江南大学制药工程实验室保藏, 将甘油管菌种接到种子培养基中进行活化, 再按 1% 接种量转接至发酵培养基进行发酵培养, 按 1.2 中方法进行催化反应, 并按 1.3 中方法测定氨浓度并计算出酶活。

对实验室保存的所有腈水解酶菌株进行筛选, 得到对底物 3-(4-氯苯基)-戊二腈有活性的菌株 21 株, 转化率 50% 以上有 2 株 (XY32 和 CN7), 但是其产物均为 3-(4-氯苯基)-戊二酸, 不具有选择性; 转化率在 20% 以上的菌株有 7 株 (CA4-3、CN7、CA4-1、XY32、CN4、CN5、WX12)。最终选择产物为 3-(4-氯苯基)-4-氰基丁酸、转化

率为 34% 的 WX12 为出发菌株进行后续实验。

WX12 在察氏培养基固体平板上 30 °C 恒温培养箱中培养 4 d, 并进行形态学初步观察。分子生物学鉴定采用 ITS-5.8S rDNA 序列分析方法^[23]。菌体与石英砂混合后液氮研磨, 根据 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒操作步骤提取。以 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-GGAAGGRTGTATTTATTAG-3') 为引物^[23], 对菌株的 ITS-5.8S rDNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用

TIANGEN 试剂盒回收, 与载体 pMD18-T 连接, 转化于大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 经蓝白斑筛选并验证载体已成功连接到目的片段后由北京天一辉远生物科技有限公司完成测序。将所测得的序列与 GenBank 数据库中的已有序列进行 Blast 比对分析。系统进化分析由分子进化遗传分析软件 MEGA version 3.1 完成。

1.5 巴氯芬的合成

以 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸为底物, 经两步化学反应可合成巴氯芬^[20]: 第一步, 腈基氨化, 不完全水解生成酰胺; 第二步, 霍夫曼降解反应, 酰胺变成氨基 (图 1)。

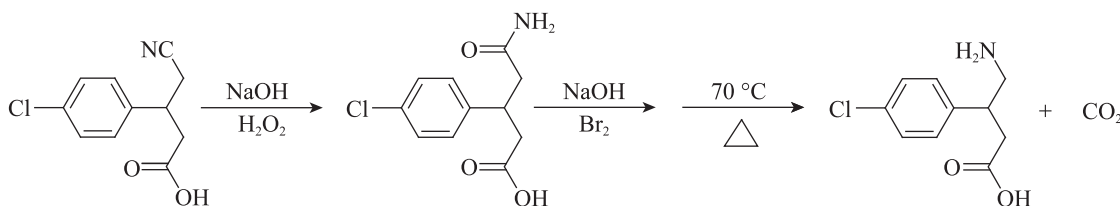


图 1 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸合成巴氯芬过程^[20]

Fig. 1 Synthesis of baclofen from 4-cyano-3-(4-chlorophenyl)-acid^[20].

在第一步的腈基氨化反应中, 每 200 mg 单腈单酸产物, 加入 3 mL 的 NaOH (2.5 mol/L) 和 6 mL H₂O₂, 反应过程中以 TLC 进行实时监测, 直至无单腈单酸残余。终止反应, 边搅拌边加入浓 HCl 进行中和, 可发现有白色小颗粒状固体析出, 至固体析出不再增多为止, 冰浴 1 h, 抽滤, 旋干, 可得到白色粉末状产物单酰胺单酸 156 mg (产率 72.3%)。

第二步反应中, 单酰胺单酸先用 2.5 mol 的 1 mol/L 的 NaOH 溶解, 另外 2.5 mol 的 1 mol/L 的 NaOH 与 1.2 mol 的 Br₂ (38.8 μ L) 冰浴下混合,

冰浴下缓慢加入到单酰胺单酸溶解液中, 冰浴中反应 30 min, 常温反应 30 min, 40 °C 反应 30 min, 70 °C 反应约 2 h (实验过程中进行波层色谱层析 (HPLC) 实时监测, 当底物完全消耗后终止反应)。缓慢滴加浓盐酸使中和至 pH=6, 离心, 上清和沉淀分别进行 TLC 和 HPLC 检测。

1.6 分析方法

1.6.1 产物 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸的检测

转化反应终止后用浓盐酸将样品调至酸性 (pH 2), 再加入等体积甲基叔丁基醚, 涡旋仪混匀后于 12 000 r/min 离心 1 min。取上层有机相用

薄层色谱层析 (TLC) 进行初步检测。展开剂为二氯甲烷:冰醋酸=50:1, 在 254 nm 的紫外灯下观察。吹干展开剂, 将层析板置于溴甲酚绿乙醇溶液中数秒后, 使其受热至有样品显色 (底物无颜色; 产物显黄色)。有产物点出现的样品取 2 mL 有机相, 充分挥发, 等体积 HPLC 流动相 (正己烷:异丙醇=1:9) 溶解, HPLC 定量检测, 检测条件为:大赛璐键合型手性柱 CHIRALPAK® IB (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 含 0.05% 冰醋酸的异丙醇/正己烷=9/1 为流动相, 流速 0.4 mL/min, 波长为 230 nm 处检测。

以经核磁鉴定的产物和底物 3-(4-氯苯基)-戊二腈为标样, 测定此条件下物质的摩尔量与峰面积之间的关系, 分别满足线性关系 $y_1(\text{底物})=6014A_1+31.92$ ($R^2=0.999$) 与 $y_2(\text{产物})=2359A_2-339.0$ ($R^2=0.999$)。故

$$\text{产率} = \frac{\text{生成产物的量 (mol)}}{\text{初始底物的量 (mol)}} \times 100\%。$$

1.6.2 巴氯芬的检测

采用薄层层析法 (TLC) 定性检测, 通过茚三

酮显色; 手性 HPLC 检测^[24]条件为: Daicel 手性色谱柱 CROWNPAK® CR(+)/(-) (4.0 mm×150 mm, 5 μm), 含 10% 甲醇、pH 1.5 的高氯酸水溶液为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 200 nm, 柱温 40 °C。(R)-巴氯芬和(S)-巴氯芬的保留时间分别为 $t_S=17.3$ min, $t_R=27.1$ min, 故 (S)-巴氯芬 (即产物(S)-4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸) 的对映体过量值为:

$$ee = \frac{A_S - A_R}{A_S + A_R} \times 100\%。$$

式中, A_S : 液相色谱分析 (S)-巴氯芬的峰面积。 A_R : 液相色谱分析 (R)-巴氯芬的峰面积。

2 结果

2.1 高产菌株鉴定

通过筛选获得了一株编号为 WX12 的菌株, 在发酵培养基中成菌球状, 平板观察为白色丝状, 显微观测形态如图 2 所示, 分子生物学鉴定结果为赤霉菌 *G. intermedia* WX12, 对该菌株的系统发育分析结果见图 3。

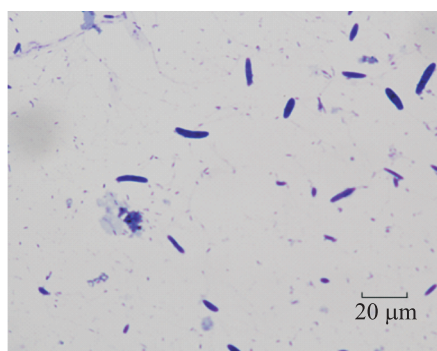
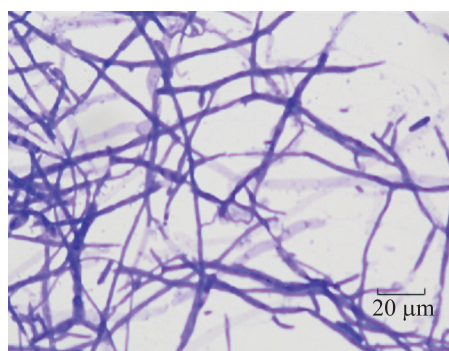


图 2 赤霉菌 WX12 的显微镜观测图

Fig. 2 Microscope pictures of *Gibberella intermedia* WX12.

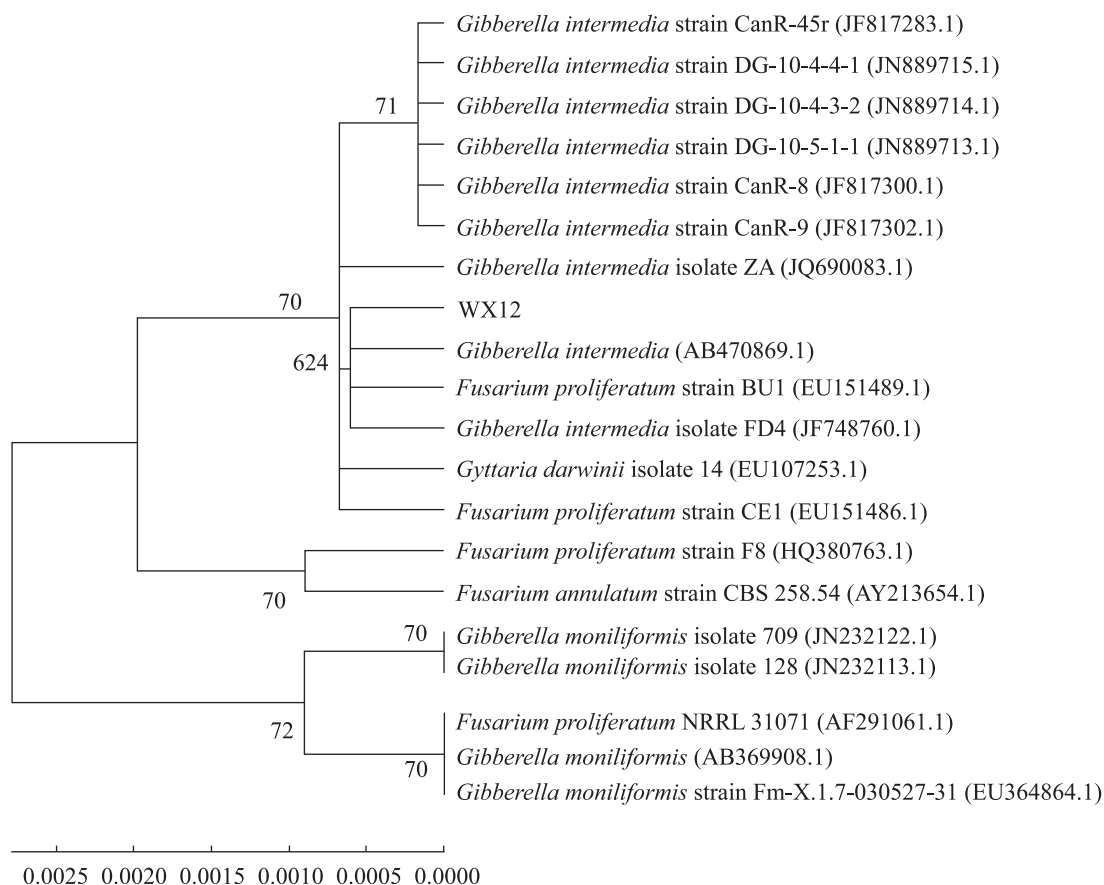


图3 通过 neighbor-joining 法构建的基于菌株 WX12 的 ITS 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS sequences of strain WX12 constructed by the neighbor-joining method.

2.2 发酵产酶曲线

种子液以 1% 的接种量转接到发酵培养基进行发酵培养, 定时取样, 按方法 1.2 称量菌体干重, 静息细胞催化转化反应 8 h 后苯酚-次氯酸钠法测定酶活。由图 4 可知: 发酵培养 96 h, 菌体干重和酶活均达到最大值, 分别为 3.94 g/L 和 49.57 U/g。

2.3 催化特性研究

2.3.1 最适温度和 pH

按方法 1.2 中的转化体系, 分别在不同 pH 值的缓冲液和不同温度转化反应 24 h, 得到 WX12 的最佳转化条件为: 30 °C (图 5A), pH=8.0

的磷酸钠缓冲液 (图 5B)。

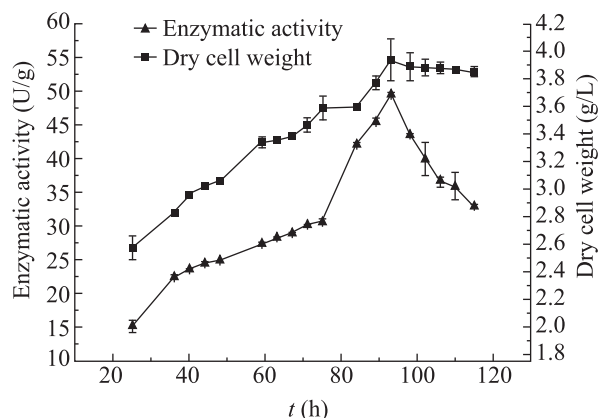


图4 WX12 发酵产酶曲线

Fig. 4 Time course of enzyme production for WX12.

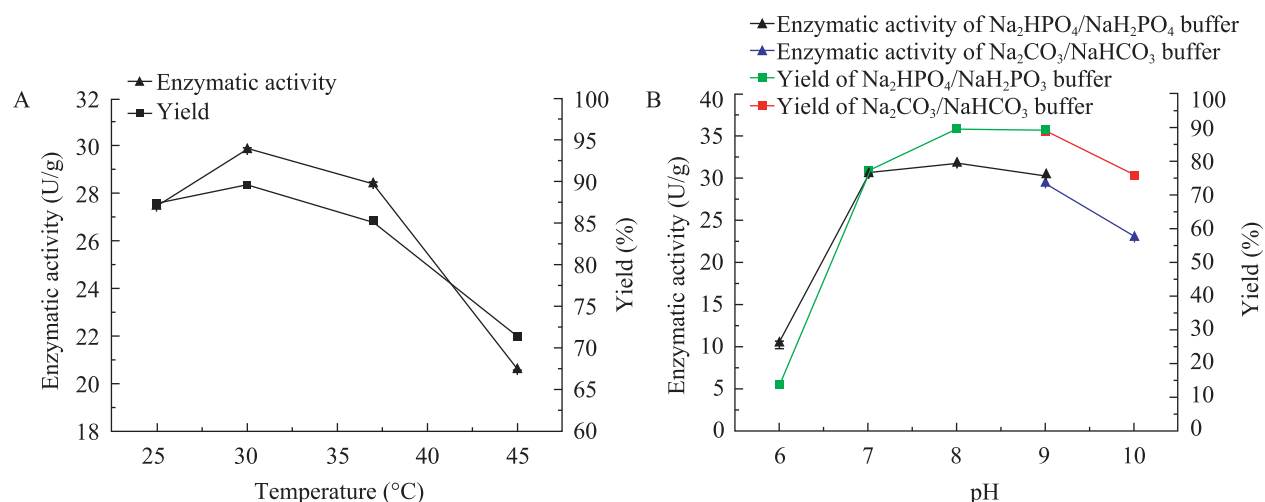


图 5 温度和 pH 对转化过程的影响

Fig. 5 Effect of temperature (A) and pH (B) on the reaction. (A) The reaction was carried out in sodium phosphate buffer (pH 7.2). (B) The reaction was carried out at 30 °C and different pH (pH=6.0–9.0: Sodium phosphate buffer solution; pH=9.0–10.0: Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer).

2.3.2 转化实验进程

按上述转化体系在最适温度和 pH 值条件下进行催化转化反应,测定反应进程,结果如图 6 所示。可知:转化时间为 24 h 时产率达最大值 90%。

2.3.3 底物特异性

分别以不同的芳香腈、脂肪腈和杂环腈为底物,测定 WX12 的催化活性,结果如表 1 所示。

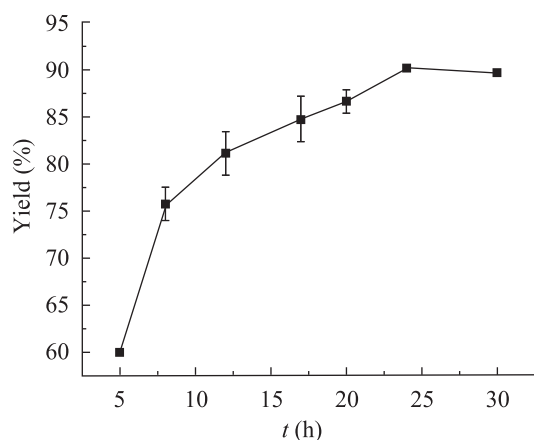


图 6 腈水解酶的催化转化进程

Fig. 6 Catalytic conversion process of WX12 nitrilase.

结果表明, WX12 腈水解酶对脂肪腈类和杂环腈类具有较高的酶活, 其中对丁二腈具有最高活性。而对芳香腈类物质如苯甲腈也具有一定的水解效果, 但当氰基附近带有较大的取代基团时, 由于受到立体阻遏效应的影响, 酶活性则显著减小, 如 2-苯基丁腈、扁桃腈、苄烯丙二腈等不能被水解。

2.4 水解产物立体构型的确定

WX12 催化 3-(4-氯苯基)-戊二腈水解得到的产物 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸没有光学纯的标准品, 不能直接检测水解产物的构型, 但因后续化学合成反应不改变产物的构型, 故可通过合成最终产物巴氯芬来进行检测。

WX12 生物转化后的产物按 1.5 中方法进行终产物巴氯芬的合成, 按 1.6.2 中方法进行 HPLC 检测 (图 7), 可知, 生成的终产物为 (S)-巴氯芬, 且 $ee > 99\%$ 。

表 1 菌株对各种腈类化合物的酶活性

Table 1 Nitrilase activity towards various aliphatic, aromatic and heterocyclic nitriles

Substrate	Relative activity (%)	Substrate	Relative activity (%)
Aromatic nitriles		Aromatic dinitriles	
Benzonitrile	91	3-(4-chlorophenyl)-glutaronitrile	76
Diphenylacetoneitrile	10	Benzylidenemalononitrile	0
3-phenylpropionitrile	41	Phthalates acetoneitrile	80
2-phenylbutyronitrile	0	1,3-benzene acetoneitrile	90
3-(1-cyanoethyl)-benzoic acid	10	1,4-benzene acetoneitrile	25
Mandelonitrile	0	4-amino-phthalates acetoneitrile	11
Aliphatic mononitriles		Aliphatic dinitriles	
Valeronitrile	64	Butanedinitrile	100
Isovaleronitrile	72	Glutaronitrile	89
Heterocyc nitriles			
2-cyano pyridines	72		
3-cyano pyridines	81		

The activity with butanedinitrile was set to 100%.

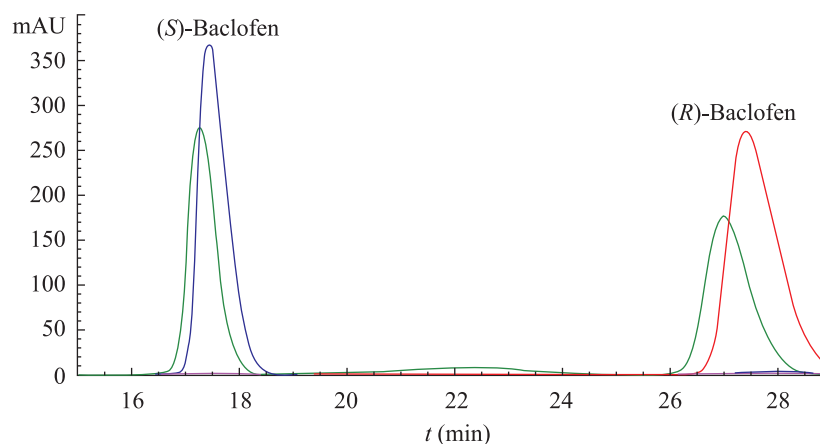


图 7 WX12 催化反应产物巴氯芬的 HPLC 谱图

Fig. 7 The HPLC spectrum of product catalyzed by WX12. Green for the standard sample of racemic baclofen. Red for the standard sample of (*R*)-baclofen. Blue for the product catalyzed by WX12.

3 讨论

化学-酶共催化有机合成法可以克服化学法与酶法单一催化有机合成反应时存在的缺点,是有机合成反应的新途径^[21],然而利用化学-酶共催化法来催化潜手性的 3-(4-氯苯基)-戊二腈转化成为合成巴氯芬关键中间体 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸的研究却鲜有报道。

本研究筛选得到腈水解酶菌株 *G. intermedia* WX 12, 最优催化转化条件为: 30 °C, 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 8.0), 转化 24 h, 经 HPLC 检测产率达 90.2%。产物 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸经氰基不完全水解和霍夫曼重排反应后所得的巴氯芬, HPLC 鉴定为绝对构型的 (*S*)-巴氯芬, *ee* > 99%。据文献^[17,20]报道, *ee* 值为 77% 的 (*S*)-3-(4-氯苯基)-4-氰基丁酸, 经霍夫曼重排 (Hoffman rearrangement) 可得到 *ee* 值为 86% 的 (*S*)-巴氯芬; 经库尔提斯重排 (Curtius rearrangement) 则可得到 *ee* 值为 85% 的 (*R*)-巴氯芬。因此, (*S*)-4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸是合成光学纯巴氯芬的重要前体, 不但可以经腈基水解至酰胺再通过霍夫曼重排可得到 *S* 构型的巴氯芬, 还可在羧基衍生后经库尔提斯重排得到氨基, 继而将剩余的氰基水解得到 *R* 构型的巴氯芬。

具有腈基水解酶活性的菌株 *G. intermedia* WX 12 可高效、高区域选择性、高立体选择性水解对称二腈化合物, 得到光学纯的单腈单酸中间体; 而后续可通过不同的化学转化可以合成光学纯的 (*R*)或(*S*)- γ -氨基酸^[20], 为光学纯的 γ -氨基酸的合成研究打下了基础。

REFERENCES

- [1] Fleming FF, Yao LH, Ravikumar PC, et al. Nitrile-containing pharmaceuticals: efficacious roles of the nitrile pharmacophore. *J Med Chem*, 2010, 53: 7902–7917.
- [2] Tao JH, Lin GQ, Liese A. *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry*. Singapore: John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd., 2009: 163–178.
- [3] Zheng YG, Xue YP, Liu ZQ, et al. Applications of nitrile converting enzymes in the production of fine chemicals. *Chin J Biotech*, 2009, 25(12): 1795–1807 (in Chinese).
郑裕国, 薛亚平, 柳志强, 等. 腈转化酶在精细化学品生产中的应用. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1795–1807.
- [4] Lou WY, Zong MH, Liu SL. Research progress on microbial nitrile hydrolysis reactions catalyzed by enzymes. *Microbiol China*, 2001, 28(6): 76–81 (in Chinese).
娄文勇, 宗敏华, 刘森林. 微生物酶催化腈水解反应的研究进展. *微生物学通报*, 2001, 28(6): 76–81.
- [5] Kobayashi M, Nagasawa N, Yamada H. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over. *Trends Biotechnol*, 1992, 10(11): 402–408.
- [6] He YC. *Studies on the screen for new nitrilase strains and its application*[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2008.
何玉财. 腈水解酶新菌株的筛选及其应用研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2008.
- [7] A de Raddt, Klempier N, Farber K, et al. Chemoselective enzymatic hydrolysis of aliphatic and alicyclic nitriles. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 1992: 137–140.
- [8] Otto MC, Wang MX. Regioselective biotransformations of dinitriles using *Rhodococcus* sp. AJ270. *J Chem Soc, Perkin Trans I*, 1997: 3197–3204.
- [9] Banerjee A, Dubey S, Kaul P, et al. Enantioselective nitrilase from *Pseudomonas putida*: cloning, heterologous expression, and bioreactor studies.

- Mol Biotechnol, 2009, 41: 35–41.
- [10] Xie RM. Research progress on clinical application of baclofen. World Clincl Drug, 2006, 27(3): 148–153 (in Chinese).
谢瑞满. 巴氯芬临床应用研究进展. 世界临床药物, 2006, 27(3): 148–153.
- [11] Chen YH, Mao ZJ, Yang WQ, et al. New technical synthesis of (*R*)-baclofen. Zhejiang Chem Ind, 2008, 39(12): 1–8 (in Chinese).
陈云华, 毛侦军, 杨伟强, 等. (*R*)-巴氯芬的合成研究. 浙江化工, 2008, 39(12): 1–8.
- [12] Yu XH, Jiang M, Shen ZH, et al. Synthesis of baclofen hydrochloride. Chin J Pharm, 2010, 41(6): 407–409 (in Chinese).
虞心红, 江淼, 湛志华, 等. 盐酸巴氯芬的合成. 中国医药工业杂志, 2010, 41(6): 407–409.
- [13] Rolf HP, Karl Schafer, David PG, et al. The synthesis of (*R*)-(-) and (*S*)-(+)-hydroxysaclofen. Tetrahedron, 1995, 51(42): 1465–1472.
- [14] Patricia R, Wanda PA, Fernando C. An efficient synthesis of (*R*)-(-)-baclofen. Tetrahedron: asymmetr, 1999, 10: 2113–2118.
- [15] Claudio M, Jacques L, Veronique A, et al. A chemoenzymatic strategy for the synthesis of enantiopure (*R*)-(-)-baclofen. Tetrahedron Lett, 1997, 38, (7): 1195–1196.
- [16] Elisabetta B, Nicola C, Claudio F, et al. Enantioselective synthesis of β -substituted butyric acid derivatives via orthoester Claisen rearrangement of enzymatically resolved allylic alcohols: application to the synthesis of (*R*)-(-)-baclofen. Tetrahedron: asymmetr, 1997, 8(22): 3801–3805.
- [17] Li J, Ji L. Method for preparing chiral baclofen: Chinese Patent, CN101514167A. 2009-08-26.
李靖, 冀蕾. 手性巴氯芬的制备方法: 中国专利, CN101514167A. 2009-08-26.
- [18] Karla R, Ebert B, Thorkildsen C. et al. Synthesis and pharmacology of the baclofen homologues 5-amino-4-(4-chlorophenyl)pentanoic acid and the *R*- and *S*-enantiomers of 5-amino-3-(4-chlorophenyl)pentanoic acid. J Med Chem, 1999, 42: 2053–2059.
- [19] Wang MX, Zhao SM. Highly enantioselective biotransformations of 2-aryl-4-pentenitriles, a novel chemoenzymatic approach to (*R*)-(-)-baclofen. Tetrahedron Lett, 2002, 43: 6617–6620.
- [20] Wang MX, Liu CS, Li JS, et al. Microbial desymmetrization of 3-arylglutaronitriles, an unusual enhancement of enantioselectivity in the presence of additives. Tetrahedron Lett, 2000, 41: 8549–8552.
- [21] Jin LE, Yin HY, Bao WR, et al. Features and applications of chemoenzymatic synthesis. Ind Catal, 2009, 7(4): 6–9 (in Chinese).
靳利娥, 殷红颜, 鲍卫仁, 等. 化学-酶共催化合成反应的特点及应用. 工业催化, 2009, 7(4): 6–9.
- [22] Gong JS, Lu ZM, Shi JS, et al. Isolation, identification, and culture optimization of a novel glycinonitrile-hydrolyzing fungus—*Fusarium oxysporum* H3. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 165: 963–977.
- [23] Chen JS, Zheng FC. Application of ITS sequences in fungi classification and identification. Anhui Agri Sci, 2007, 35(13): 3785–3786, 3792 (in Chinese).
陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3785–3786, 3792.
- [24] Goda R, Murayama N, Fujimaki Y, et al. Simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of the (*S*)-(+)- and (*R*)-(-)-enantiomers of baclofen in human plasma and cerebrospinal fluid. J Chromatography B, 2004, 801: 257–264.

(本文责编 郝丽芳)