# 海洋真菌 *Rhodotorula mucilageinosa* GIM 2.157 介导邻-、间-、对-溴苯乙酮的不对称还原反应

刘　慧[1], 杨振男[1], 刘　岚[1, 2], 陈碧双[1, 2]

(1. 中山大学 海洋科学学院, 广东 广州 510275; 2. 中山大学 南海资源开发与保护协同创新中心, 广东 广州 510275)

**摘要**: 研究了海洋真菌介导邻-、间-、对- 溴苯乙酮的不对称还原反应。具体考察了 *Rhodotorula-mucilageinosa* GIM 2.157 对邻-、间-、对- 溴苯乙酮的催化活性和对映选择性, 并综合考察了反应温度、pH、反应时间和底物浓度等因素对还原产物的产率及立体选择性的影响。确定最佳反应条件: 反应温度为 25℃, 反应体系的 pH 为 7, 反应时间为 24 h, 底物浓度为 10 mmol/L。在最佳条件下, 产率以及立体选择性均>99%。

**关键词**: 海洋真菌; 邻-、间-、对- 溴苯乙酮; 不对称还原; 生物催化

**中图分类号**: P745　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3096(2018)03-0106-07

DOI: 10.11759/hykx20170711002

苯环上含卤素的手性芳香醇是合成手性药物、精细化学品、农药及液晶材料等的重要中间体[1]。随着环境污染的日益加剧和石油资源的日益枯竭, 以可再生的物质资源为原料, 以高效专一、绿色节能为特征的生物催化过程越来越受到关注。以海洋来源微生物作为生物催化剂应用于有机合成的研究在世界范围内都属于新兴领域。与常规来源的酶相比, 海洋微生物在极端条件(例如极端温度、压力、pH 或有机溶剂)下产生的新型酶具有更高的稳定性和活性, 更值得广泛应用于生物催化生产精细化学品。意大利 Romano D.教授课题组从地中海东部的深海超咸水缺氧盆地来源的细菌中, 筛选到一系列具有高效拆分芳基酯生产手性芳基羧酸的催化活性的菌株[2]; 巴西 Porto A. L. M.教授课题组从圣保罗州的北部海岸(巴西)来源的真菌中, 筛选到一系列具有高效不对称还原叠氮基酮的催化活性的菌株[3-6]; 韩国 Lee E. Y.教授课题组从海洋来源真菌中, 筛选到一系列具有高效水解苯乙烯氧化物生产手性邻二醇的催化性能的菌株[7-9]。而采集自广东省各地的海洋来源微生物作为催化剂的研究则是甚少。不同采集地点的微生物的组成是存在显著差异的, 体内形成的代谢途径和酶系也是极其不同的, 因此, 利用不同来源的海洋真菌催化芳基酮的不对称还原反应具有重要的研究价值。

本文以研究海洋真菌 *R.mucilageinosa* GIM 2.157 催化邻-、间-、对-溴苯乙酮的不对称还原反应为模型(图 1), 考察底物取代基位置的差异性对产物产率和立体选择性的影响。同时考察了温度、pH、反应时间和底物浓度等多个因素对还原产物(*S*)-1-(4-溴苯基)乙醇产率和对映选择性的影响。

## 1　实验部分

### 1.1　仪器与试剂

LC1620 高效液相色谱[正相手性柱: Ultimate Cellu-D, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm](购买于上海舜宇恒平科技有限公司); MS-100 恒温混匀仪(购买于北京奥创兴业科技发展有限公司); Anton Paar 型旋光仪 MCP200(购买于安东帕中国有限公司); PHS-3C 型 pH 计(购买于上海嘉鹏科技有限公司); Bruker-400 核磁共振仪(购买于瑞士 Bruker 有限公司); 湘仪 L530

收稿日期: 2017-07-11; 修回日期: 2017-12-10

基金项目: 高校基本科研业务费中山大学青年教师培育项目(17lgpy58); 国家自然科学基金(41706148); 广东省自然科学基金(2017A030310232); 海洋经济创新发展区域示范专项(2018ZX09735010)

[Foundation: the Basic Research Program of Sun Yat-Sen University, No. 17lgpy58; the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2017A030310232; the National Natural Science Foundation of China, No. 41706148; the National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China, No. 2018ZX09735010]

作者简介: 刘慧(1993-), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物催化与转化研究, 电话: 15521174868, E-mail: liuh229@mail2.sysu.edu.cn; 陈碧双(1985-), 通信作者, 女, 福建莆田人, 副研究员, 主要从事海洋微生物催化与转化研究, 电话: 020-84725459, E-mail: chenbsh23@mail.sysu.edu.cn; 刘岚(1971-), 通信作者, 女, 湖南宁乡人, 教授, 博士, 主要研究海洋天然产物的发现及应用, 电话: 020-84725459, E-mail: cesllan@mail.sysu.edu.cn.

离心机(购买于上海沪粤明科学仪器有限公司); 柱层析硅胶 200~300 目(购买于青岛鼎康硅胶有限公司); 50 mL 离心管(购买于广州豪凯生物科技有限公司)。

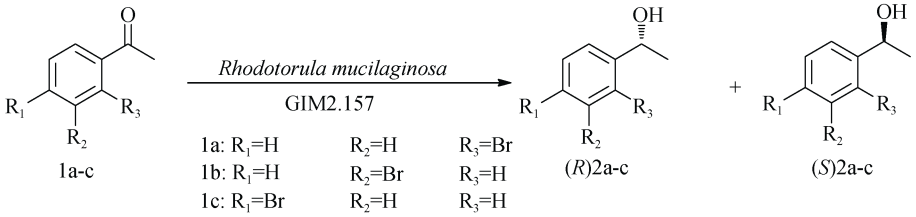



图 1 芳香酮的不对称还原

Fig. 1 Asymmetric reduction of aromatic ketones

邻-, 间-, 对- 溴苯乙酮购自上海麦克林科技有限公司, (±) 1-(2-溴苯基)乙醇, (±) 1-(, 3-溴苯基)乙醇, (±) 1-(4-溴苯基)乙醇通过硼氢化钠还原相应的酮制得; 其他试剂均为市售分析纯; *R. mucilaginosa* GIM 2.157 购买于广东省微生物菌种保藏中心。

## 1.2 菌的活化及培养

用无菌吸管吸取 0.3~0.5 mL 适宜的液体培养基(葡萄糖 1%、蛋白胨 1%、酵母提取物 0.5%、琼脂 2%)滴入安瓿瓶内, 轻轻震荡, 使冻干菌体溶解呈悬浮状。吸取全部菌悬液, 移植于培养基平板上, 28℃下培养 48 h。然后挑菌落于装有液体培养基的 1L 的锥形瓶中(培养基配方为: 蒸馏水 500 mL、葡萄糖 7.5 g、蛋白胨 2.5 g、酵母膏 2.5 g、$Na_2HPO_4$ 0.25 g、$NaH_2PO_4$ 0.25 g、$MgSO_4$ 0.25 g、NaCl 0.5 g), 在摇床中恒温 28℃, 转速 180 r/min 将该培养物振荡约 48 h。然后在 4000 r/min 和 4℃的条件下离心 20 min 收集细胞。除去上清液, 并用 $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH=7.0)冲洗细胞并再次离心, 弃去上清液, 将颗粒物(真菌全细胞)于–20℃条件下保存。

## 1.3 海洋真菌催化对溴苯乙酮的条件优化

### 1.3.1 温度的优化

反应液含有 0.5 g 葡萄糖, 10 mmol/L 对溴苯乙酮, 10 mL $Na_2HPO_4$ -$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞, 反应在 20~50℃条件下分别进行。反应 24 h 后, 样品经过适当的后处理, 在手性 HPLC 上进行产物产率和立体选择性的分析。后处理程序如下: 离心除去细胞, 添加 NaCl 以饱和 2 mL 上清液, 然后用 2 × 1 mL 的正己烷/异丙醇= 95/5 溶剂萃取。将合并的有机层用无水 $Na_2SO_4$ 干燥并通过高效液相测定产率和 *ee* 值。

### 1.3.2 pH 的优化

使用柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH 3.0~6.0)和磷酸钾缓冲液(pH 7.0~9.0)来控制反应介质的 pH。反应液含有 0.5 g 葡萄糖, 10 mmol/L 对溴苯乙酮, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH 3~9)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞。反应在 25℃的条件下进行, 反应 24 h 后, 样品经过适当的后处理(详见 1.3.1 **温度的优化**), 在手性 HPLC 上进行产物产率和立体选择性的分析。

### 1.3.3 反应时间的优化

反应液含有 0.5 g 葡萄糖, 10 mmol/L 对溴苯乙酮, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH=7)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞, 反应在 25℃的条件下进行。根据反应时间(0.15~48 h)按时取出样品。样品经过适当的后处理后(详见 1.3.1 **温度的优化**), 在手性 HPLC 上进行产物产率和立体选择性的分析。

### 1.3.4 底物浓度的优化

反应液含有 0.5 g 葡萄糖, 不同浓度(3.33~20 mmol/L)的对溴苯乙酮, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$Na 缓冲液(100 mmol/L, pH=7)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞。反应在 25℃条件下进行, 反应 24 h 后, 样品经过适当的后处理(详见 1.3.1 **温度的优化**), 在手性 HPLC 上进行产物产率和立体选择性的分析。

### 1.3.5 共底物的优化

反应液含有 10 mmol/L 对溴苯乙酮, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH 7)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞以及添加不同共底物, 在 25℃的条件下进行, 反应 24 h 后, 样品经过适当的后处理(详见 1.3.1 **温度的优化**), 在手性 HPLC 上进行产物产率和立体选择性的分析。

## 1.4 海洋真菌催化邻-、间-、对-溴苯乙酮的不对称还原

取 2~3 g 全细胞于 50 mL 的离心管中, 加入 0.5 g

葡萄糖, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲溶液(100 mmol/L, pH 7)和 10 mmol/L 的底物(邻-、间-、对- 溴苯乙酮), 在 25℃, 220 r/min 的条件下反应 24 h 后取出。离心, 取 2 mL 上清液用 2 mL 正己烷∶异丙醇=95∶5 的溶剂萃取。有机相合并后用无水 $Na_2SO_4$ 干燥。以未添加细胞在相同条件下进行空白实验。反应在给定温度下进行 24 h。后处理程序如下: 离心除去细胞, 添加 NaCl 以饱和 2 mL 上清液, 然后用 2 × 1 mL 的正己烷/异丙醇=95/5 溶剂萃取。将合并的有机层用无水 $Na_2SO_4$ 干燥并通过高效液相测定产率和 *ee* 值。

### 1.5 分析与检测

通过使用 Shimadzu LC-10AT VP 系列和 Shimadzu SPD-M10Avp 光电二极管阵列检测器(190~370 nm)的手性 AD-H 柱(洗脱液∶正己烷/异丙醇=95∶5, *V*/*V*), 流速: 0.5 mL/min, 柱温 25℃)。根据以下保留时间数据(如表 1 所示), 通过手性 HPLC 分析测定分析物的(yield)及对映体过量(*ee*)值。

表 1 底物及产物的保留时间数据

**Tab. 1 Retention times of substrates and products**

| 序号 | 化合物 | 底物保留时间/min | 产物保留时间/ min |
|---|---|---|---|
| 1 | 邻溴苯乙酮 | 11.85 | *t*R(*R*)=12.71; *t*R(*S*)=13.23 |
| 2 | 间溴苯乙酮 | 10.66 | *t*R(*R*)=16.45; *t*R(*S*)=17.39 |
| 3 | 对溴苯乙酮 | 11.21 | *t*R(*R*)=16.83; *t*R(*S*)=17.99 |

$$Yield = (C_S + C_R)/C_0 \times 100\%$$

$$ee = (C_S - C_R)/(C_S + C_R) \times 100\%$$

式中, $C_S$ 表示反应一定时间实际增加的 *S* 异构体产物的摩尔浓度; $C_R$ 表示反应一定时间实际增加的 *R* 异构体产物的摩尔浓度; $C_0$ 表示反应前底物摩尔浓度。

### 1.6 外消旋醇的化学合成

在 0℃的冷却条件下, 将 2.5 mmol 底物(邻-、间-、对-溴苯乙酮)溶于 50 mL 甲醇, 然后加入 10 mmol $NaBH_4$, 搅拌 10 min 后, 温热至室温, 搅拌 3~4 h。再用 2 mmol/L 的 HCl 调节 pH 至 7.0 猝灭反应。所得的混合物用 EtOAc(50 mL×3)进行萃取, 在萃取过程中可以加 NaCl 以促进有机相和水相分层。合并的有机相用 $Na_2SO_4$ 干燥, 过滤并真空浓缩。残余物通过硅胶快速色谱纯化(洗脱液∶EtOAc∶PE=1∶20), 得到外消旋醇。

### 1.7 手性醇的生物制备

为了获得足够量的产物来确定生物还原产物的构型, 反应按制备规模进行。将 30 g *R. mucilaginosa* GIM 2.157 的静息细胞重新悬浮于 100 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0)中, 随后加入 5 g 葡萄糖和 100 mmol/L 的底物, 将反应混合物在 25℃下孵育并在 220 r/min 下摇动 24 h。然后离心除去细胞, 上清液用 NaCl 饱和, 然后用 EtOAc (100 mL×3)萃取上清液。有机相用生理盐水洗涤, 用无水 $Na_2SO_4$ 干燥, 过滤并真空浓缩。残余物通过硅胶快速色谱纯化(洗脱液∶EtOAc∶PE=1∶20), 得到对映体醇 **2a**, **2b**, **2c**。制备规模的产量和 *ee* 与从筛选生物转化获得的产量和 *ee* 相当, 对映体醇 **2a**, **2b**, **2c** 用甲醇稀释, 在 Anton Paar 型旋光仪测出产物的旋光方向为左旋, 与 *S* 型产物的文献值[10]一致, 可知反应主产物为 *S* 构型。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的选择

本课题组承担了海洋经济创新发展区域示范专项项目“海洋生物天然产物化合物库”。因为项目需求, 本实验室建有小型海洋微生物菌种保藏库: 包括真菌、细菌和放线菌在内的海洋来源微生物 7500 多种。我们的目标是寻找一株或多株具有高效催化芳香酮不对称还原活性的菌株。利用 96 微孔板对 300 株常用菌株进行催化活性筛选, 我们获得了 15 株具有明显活性的菌株, 并以此 15 株菌株作为我们进一步研究的目标菌株。在经过更为深入的活性分析后, 我们发现采集自深圳大鹏湾的白百合的真菌 *R. mucilageinosa* GIM 2.157 具有最好的催化活性, 包括最优活性和单一立体选择性。因此, 本文将 *R. mucilageinosa* GIM 2.157 选为目标菌株, 系统地研究其介导芳香酮的不对称还原的影响因素和反应中底物结构与产物产率及对映选择性之间的构效关系。

### 2.2 温度的影响

温度是影响细胞生长和发酵产酶的一个重要因素。我们考察了不同温度(20~50℃)下, *R. mucilage-*

*inosa* GIM 2.157 催化对溴苯乙酮的活性。反应液包含有 0.5 g 葡萄糖, 10 mmol/L**1c**, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞。反应在(20~50℃)条件下分别进行 24 h 后, 经过适当的处理, 所得样品在手性 HPLC 上分析观察还原产物(*S*)-**2c** 的产率及 *ee* 值的变化。其产率和 *ee* 值如图 2 所示。

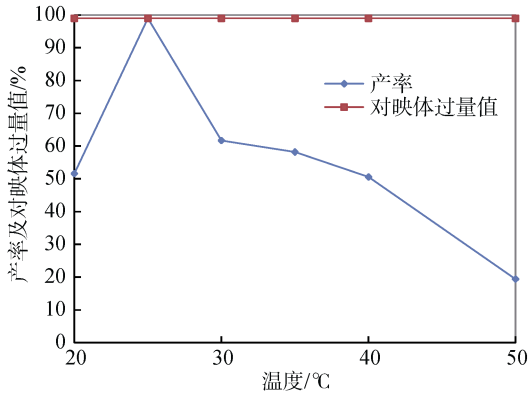



图 2　温度对产率及对映体过量值的影响

Fig. 2　Effects of temperature on the yield and enantioselectivity

由图 2 可以看出, 随着温度的升高, 其反应速率加快, 且伴随着产率的增加。这可能是因为反应温度升高, *R. mucilaginosa* GIM 2.157 细胞内生成产物的速度也得以提高。但随着温度的继续增长(由 25℃升至 50℃), 产率迅速下降。导致这种趋势的形成原因可能有两种: 一是在较高的温度下, 反应过程中其他酶催化的副反应得以加剧, 从而使还原反应速率降低; 二是长时间处于较高的温度下, 催化还原反应的酶渐渐失活, 从而降低了反应速率。Nakamura 等[11]对酵母细胞催化 β-羰基酯中的不对称还原酶进行研究发现这些酶在 40℃以上不稳定, 会部分失活; 即使反应速度会随温度的升高而加快, 但由于还原酶部分失活, 导致反应速度降低。在这两个因素的共同影响下, 产率在 25℃左右达到最高 99%。而 *ee* 值在不同温度下均不变, 据多点依附理论所知[12], 前手性碳周围的 3 个基团(或原子)必须与酶互相作用, 并在辅酶 NAD(P)H 的作用下, 使底物被牢牢地控制在一个不对称活性部位上, 只有一个面对着攻击基团, 从而得到某一对映体产物, 即高 *ee* 值的产物。*R. mucilaginosa* GIM 2.157 中酶与对溴苯乙酮结合紧密, *ee* 值为 99%, 不受温度影响, 因此对 *ee* 值而言, 温度不是影响条件。为了得到较高产率, 实验选定在 25℃左右进行。

## 2.3　pH 的影响

pH 是影响细胞生长的一个重要因素而且对菌体各种酶的活性有调节作用。为较好控制反应体系的 pH, 我们考察了不同 pH(3.0~9.0)对反应产率和立体选择性的影响。本实验使用磷酸钾缓冲液(pH 7.0~9.0)和柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH 3.0~6.0)来控制反应介质的 pH。反应液含有 0.5 g 葡萄糖, 10 mmol/L 对 **1c**, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH 3.5~9.0)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞。反应在 25℃ 的条件下进行 24 h 后, 经过适当的处理, 所得样品在手性 HPLC 上分析观察还原产物(*S*)-**2c** 的产率及 *ee* 值的变化。其产率和 *ee* 值如图 3 所示:

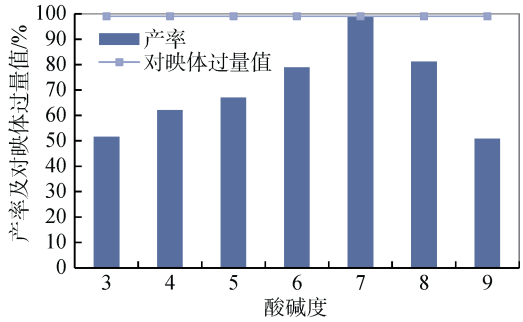



图 3　酸碱度对产率及对映体过量值的影响

Fig. 3　Effects of pH on the yield and enantioselectivity

由图 3 可以看出, 还原产物的产率受 pH 变化的影响。在微生物细胞立体选择性转化的反应过程中, 反应体系的 pH 不仅影响酶蛋白结构稳定性, 还影响酶活性中心底物的解离状态和必需基团的解离状态, 以及氢的传递及电子的转移情况。*R. mucilaginosa* GIM 2.157 催化还原 **1c** 有一个最优的 pH 范围, 即在中性条件附近。过酸或过碱对还原反应都有抑制作用。与碱性条件相比, 酸性条件下的产率更好, 暗示了 *R. mucilaginosa* GIM 2.157 可能是一种好微酸性条件的微生物[13]。但反应体系 pH 的变化对产物 *ee* 值影响不大, *ee* 值基本上都保持在 99%左右。所以实验以反应体系的 pH=7 为最佳条件。

## 2.4　反应时间的影响

反应时间对菌体产量及产酶都有一定的影响, 为较好的控制反应时间, 我们考察了不同反应时间(0.15~48 h)对还原产物产率及立体选择性的影响。反

应液含有 0.5 g 葡萄糖, 10 mmol/L **1c**, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH=7)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞。反应在 25℃ 条件下进行。根据反应时间(0.15 ~48 h)按时取出样品, 经过适当的处理, 所得样品在手性 HPLC 上进行分析观察还原产物(*S*)-**2c** 的产率及 *ee* 值的变化。其产率和 *ee* 值如图 4 所示。

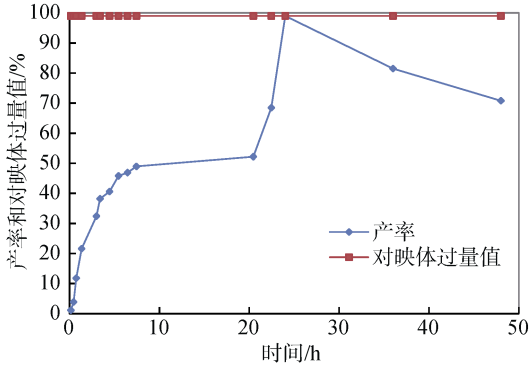



图 4 反应时间对产率及对映体过量值的影响

Fig. 4 Effects of reaction time on the yield and enantioselectivity

由图 4 可以看出, 芳香酮 **1c** 在氧化还原酶的作用下得到了手性醇, 随着反应时间的增加, 产率逐渐升高: 反应 0.1 h 产率仅为 1.53%, 在反应 24 h 的时候产率达到最大值 99%。在反应的前 7.45 h, 随反应时间的增加, 产率快速提高; 而在 7.45~20.45 h, 随反应时间的增加, 产率增加较平缓; 反应时间在 20.45~24 h, 随反应时间的增加, 产率提高; 反应时间超过 24 h 后, 随反应时间的增加, 产率开始下降, *ee* 值随时间变化没有明显变化。综合考虑反应时间对产率和 *ee* 值的影响, 实验选定反应时间为 24 h。

## 2.5 底物浓度的影响

酶促反应速度随底物浓度的增加而迅速增加, 若继续增加底物浓度, 酶活性中心分子逐渐被饱和, 反应速度的增加率将减少, 当底物浓度增加到某种程度时, 反应速度会达到一个极限值。因此我们考察了不同底物浓度(3.33~20 mmol/L)对还原产物产率及立体选择性的影响。反应液含有 0.5 g 葡萄糖, 不同浓度的 **1c**, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$Na 缓冲液(100 mmol/L, pH=7)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞。反应在 25℃条件下进行 24 h 后, 经过适当的处理, 所得样品在手性 HPLC 上进行分析观察还原产物(*S*)-**2c** 的产率及 *ee* 值的变化。其产率和 *ee* 值如图 5 所示。

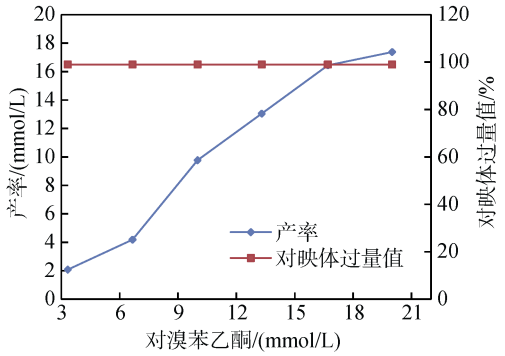



图 5 底物浓度对产率及对映体过量值的影响

Fig. 5 Effects of substrate concentration on the yield and enantioselectivity

由图 5 可知, 产率随底物浓度的增加而增加。这说明: (1)实验所用的底物的浓度没有达到 3 g *R. mucilaginosa* GIM 2.157 所含有酶的饱和值(即红球菌 GIM2.157 的活性部位相应可接纳一定量的底物), 因而产率随底物浓度的增加而提高; (2)底物浓度在 6.67~13.3 mmol/L 之间时, 产率随着底物浓度的增加而提高, 并且当底物浓度是 10 mmol/L 时, 其提高速度最大, 底物利用率最高。产物的 *ee* 值随着底物浓度的升高一直为不变趋势。虽然在 *R. mucilaginosa* GIM 2.157 中存在有多种类型的还原酶, 但是其中产生 *S* 型产物的酶在竞争中占绝对优势。实验所用的底物浓度并没有达到 *S* 型酶的结合的极限值, 酶活性部位数目就显得较充足, 对底物的诱导契合好, 即只能得到一种对映体(*S* 构型)的产物。综合产率和 *ee* 值情况, 实验选定底物浓度为 10 mmol/L。

## 2.6 共底物的影响

还原反应的完成需要辅酶提供电子, 因此海洋真菌催化芳香酮的不对称还原需要辅酶的参与。本实验研究了几种常用的辅助底物(如甘油, 甲醇, 乙醇, 异丙醇, 葡萄糖, 乳酸钠, 果糖)对菌株自身含有的辅酶不断循环的影响。反应液含有 10mmol/L**1c**, 10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH7)和 3 g *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞以及不同的共底物。反应在 25℃的条件下进行 24 h, 经过适当的处理, 所得样品在手性 HPLC 上进行分析观察还原产物(*S*)-**2c** 的产率及 *ee* 值的变化。其产率和 *ee* 值如表 2 所示。

结果表明, *R. mucilaginosa* GIM 2.157 在没有添加辅助底物的条件下也能还原对溴苯乙酮 **1c**, 但产率较低, 仅为 56.7%。而加入共底物葡萄糖促进产率

的最大增加。在反应过程中细胞需要消耗一定的能源物质；当这些能源物质被消耗完后，此时细胞可以利用葡萄糖所产生的辅酶进行能源补充，从而促进产率增加到 99%。而甘油却抑制产率的增加，这可能是因为甘油的加入使细胞活性得到了抑制；还可能是因为副反应的加剧引起的。但是共底物的加入对 *ee* 值的影响不大。综合考虑产率和 *ee* 值的影响，实验采用葡萄糖作为辅助底物。

表 2　辅助底物对产率和 *ee* 值的影响

**Tab. 2　Effects of cosubstrates on the yield and enantioselectivity**

| 共底物 | 时间/h | 产率/% | *ee*./% | Conf. |
|---|---|---|---|---|
| 无 | 24 | 56.7 | >99 | *S* |
| 甘油 | 24 | 32.0 | >99 | *S* |
| 甲醇 | 24 | 78.4 | >99 | *S* |
| 乙醇 | 24 | 62.8 | >99 | *S* |
| 异丙醇 | 24 | 60.6 | >99 | *S* |
| 葡萄糖 | 24 | 99 | >99 | *S* |
| 乳酸钠 | 24 | 86.6 | >99 | *S* |
| D-果糖 | 24 | 64.8 | >99 | *S* |

## 2.7　细胞完整性的影响

本实验的后处理采用离心去除细胞，但不代表细胞在整个反应过程中没有破裂，细胞破裂(或失活)可能是整个实验过程最难以克服的障碍。所以，反应体系需要温和到不破坏细胞，使细胞一直处于活的状态(或者，即使死亡，蛋白也应该具有活性)，才能证明需要酶催化。因此，我们考查了细胞完整性对反应的影响。反应液含有 0.5 g 葡萄糖, 10 mmol/L 对溴苯乙酮，10 mL $Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$ 缓冲液(100 mmol/L, pH 7)和 3 g 高温失活的 *R. mucilageinosa* GIM 2.157 静息细胞。反应在 25℃条件下进行 24 h，经过适当的处理，所得的样品在手性 HPLC 上进行分析观察还原产物(*S*)-**2c** 的产率及 *ee* 值的变化。其产率和 *ee* 值如图 3 所示。

由表 3 可以看出，当使用高温失活的细胞作为催化剂时，没有任何底物被还原；但当我们使用新鲜收集的静息细胞作为催化剂时，底物可以完全被还原成相应的产物，产率达到 99%，立体选择性达到 99%。这说明本研究所选择的反应体系是比较温和的，能维持大部分细胞的活性，使细胞(或酶)在活的状态下对芳香酮进行不对称催化还原。也说明该反应是酶催化反应，而不是背景的化学反应导致的，从而证明了细胞完整性对该反应体系的必要性。

表 3　失活后的 ***R. mucilageinosa*** **GIM 2.157** 催化对溴苯乙酮的结果

**Tab. 3　Denatured cells of *R. mucilageinosa* GIM 2.157 for *p*-Bromoacetophenones reduction**

| 实验 | 催化剂 | 产率/% | *ee*/% | Conf. |
|---|---|---|---|---|
| 本实验 | 静息细胞 | 99 | 99 | *S* |
| 对照实验 | 高温失活细胞 | 0 | n.d. | n.d. |

n.d. = not determined

## 2.8　以最优条件考察 *R. mucilageinosa* GIM 2.157 的底物特异性

接下来，我们研究了 *R. mucilageinosa* GIM 2.157 催化芳香酮不对称还原的底物特异性。主要选择邻-，间-，对-溴苯乙酮这 3 个化合物为代表性底物，对应的还原产物的产率及对映体过量值如表 4 所示。

表 4　***R. mucilageinosa*** **GIM 2.157** 催化邻-、间-、对- 溴苯乙酮的结果

**Tab. 4　Results of *R. mucilageinosa* GIM 2.157 catalysis of *o*-, *m*-, and *p*-bromoacetophenone bioreduction**

| 底物 | 时间/ h | 产率/% | *ee*/% | Conf. |
|---|---|---|---|---|
| **1a** | 24 | 99 | 99 | *S* |
| **1b** | 24 | 99 | 99 | *S* |
| **1c** | 24 | 99 | 99 | *S* |

由表 4 可以看出，*R. mucilageinosa* GIM 2.157 可以催化邻-，间-，对-溴苯乙酮，并且都表现出 *S*-立体选择性，得到相应的 S-构型还原产物，产率高达 99%, *ee* 值也达到 99%。这说明官能团位置改变对产物产率和立体选择性的影响不大，预示着该菌有宽泛的底物谱宽度，工业应用价值高。

# 3　结论

本文的目标是海洋真菌介导芳香酮的不对称反应，详细考察了 pH、反应温度、底物浓度和反应时间等因素对还原反应的影响。发现当温度为 25℃、反应时间 24 h、底物浓度 10 mmol/L、pH 7 时，还原产物的产率达到 99%, *ee* 值也达到 99%。关于底物特异性，我们发现 *R. mucilageinosa* GIM 2.157 对邻-、间-、对-溴苯乙酮这三个底物均有催化作用，且产率和对映选择性均>99%；暗示了官能团位置的改变对产物产率和 *ee* 值的影响不大。通过对底物结构与产物产率及立体选择性之间的构效关系的研究，有助

于我们扩展对底物谱的研究，有助于我们挖掘该工艺的工业应用潜力。

参考文献:


[1] Gamenara D, Domínguez D M P. Candida spp. redox machineries: An ample biocatalytic platform for practical applications and academic insights[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27: 278-285.

[2] Vitis D V, Guidi B, Contente M L, et al. Marine microorganisms as source of stereoselective esterases and ketoreductases: kinetic resolution of a prostaglandin intermediate[J]. Marine Biotechnology, 2015, 17: 144-152.

[3] Rocha L C, Ferreira H V, Pimenta E F, et al. Biotransformation of α-bromoacetophenones by the marine fungus *Aspergillus sydowii*[J]. Marine Biotechnology, 2010, 12: 552-557.

[4] Rocha L C, Seleghim M H R, Comasseto J V, et al. Stereoselectivebioreduction of α-azido ketones by whole cells of marine-derived fungi[J]. Marine Biotechnology, 2015, 17: 736-742.

[5] Oliveira J R D, Seleghim M H R, Porto A L M. Biotransformation of methylphenylacetonitriles by Brazilian marine fungal strain *Aspergillus sydowii* CBMAI 934: Eco-friendly reactions[J].Marine Biotechnology, 2014, 16: 156-160.

[6] Rocha L C, Ferreira H V, Luiz R F, etal. Stereoselectivebioreduction of 1-(4-methoxyphenyl) ethanone by whole cells of marine-derived fungi[J]. Marine Biotechnology, 2012, 14: 358-362.

[7] Kim H S, Lee O K, Hwang S, et al. Biosynthesis of (*R*)-phenyl-1, 2-ethanediol from racemic styrene oxide by using bacterial and marine fish epoxide hydrolases[J]. Biotechnology Letter, 2008, 30: 127-133.

[8] Kim H S, Lee S J, Lee E J, et al.Cloning and characterization of a fish microsomal epoxide hydrolase and application to kinetic resolution of racemic styrene oxide[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005, 37: 30-35.

[9] Kim H S, Lee O K, Lee S J, et al. Enantioselective epoxide hydrolase activity of a newly isolated microorganism, *Sphingomonasechinoides* EH-983, from seawater[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 41, 130-135.

[10] Neeta A. Salvi, Subrata Chattopadhyay. Asymmetric reduction of halo-substituted arylalkanones with *Rhizopusarrhizus*[J]. Tetrahedron Asymmetry, 2008, 19: 1992-1997.

[11] Nakamura K, Kawai Y, Nakajima N, et al. Stereochemicalcontrol of microbial reduction, a method for controlling the enantioselectivityof reductions with bakers' Yeast[J].Journal of Organic Chemistry, 1991, 56(15): 4778-4783.

[12] 弗斯特著. 杜锦珠, 茹炳根. 酶的结构和作用机制[M]. 卫新成, 译. 北京: 北京大学出版社, 1991: 240.
Foster (written), Du Jinzhu, Ru Binggen. The structure and mechanism of enzyme[M]. Wei Xincheng (translated). Beijin: Beijin University Press, 1991: 240.

[13] Griffin D R, Yang F, Gainer J L. Asymmetricreduction ofacetophenonewithcalcium-alginate-entrapped Baker's-yeastin organic solvents[J]., Biotechnology Progress, 1998, 14(4): 588-593.


# Asymmetric bioreduction of *o*-, *m*-, and *p*-bromo acetophenone by whole cells of marine-derived fungi


LIU Hui[1], YANG Zhen-nan[1], LIU Lan[1, 2], CHEN Bi-Shuang[1, 2]

(1. School of Marine Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 2. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Sun Yat-Sen University Guangzhou 510275, China)



**Received:** Jul. 11, 2017
**Key words:** marine fungi; *o*-; *m*-; *p*-bromo acetophenone; asymmetric bioreduction; biocatalysis



**Abstract:** In this study, the catalytic activity and enantioselectivity of *Rhodotorula mucilageinosa* GIM 2.157 toward the bioreduction of *o*-, *m*-, and *p*-bromoacetophenone to chiral alcohols were investigated. The effects of reaction temperature, pH, reaction time, and substrate concentration on the yield and enantioselectivity of the product, (*S*)-1-(4-bromophenyl)ethanol, were evaluated. The determined optimum reaction conditions are as follows: 25℃ reaction temperature, reaction system pH of 7, 24 h reaction time, and 10 mmol/L substrate concentration. Under the optimum conditions, the desired chiral alcohols were achieved with yield and ee up to > 99%.


(本文编辑: 康亦兼)