

研究报告

新颖深海微生物酯酶 EstC11 的酶学性质及其在手性拆分乙酸苏合香酯中的应用

公颜慧^{3Δ} 马三梅^{3Δ} 王永飞³ 张继福⁴ 张云^{1,2} 孙爱君^{1,2} 胡云峰^{1,2*}

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东 广州 510301)

(2. 中国科学院南海海洋研究所 广东省海洋药物重点实验室 广东 广州 510301)

(3. 暨南大学生物工程学系 广东 广州 510632)

(4. 广东省中医院 广东 广州 510120)

摘要:【背景】手性乙酸苏合香酯是重要的手性香料产品,在食品及精细化工等领域都有重要的应用。酶催化不对称合成手性乙酸苏合香酯产品具有极好的工业应用前景。【目的】研究酯酶 EstC11 的基本酶学性质及其在制备手性乙酸苏合香酯中的应用。【方法】对来自西太平洋深海热液口芽孢杆菌 *Bacillus* sp. CX01 中的新颖微生物酯酶基因 *EstC11* 进行克隆、表达及酶学性质鉴定。通过对 pH、温度、有机溶剂等反应条件的优化提高酯酶手性拆分乙酸苏合香酯的光学纯度。【结果】酯酶 EstC11 的最适反应 pH 为 8.5, 最适温度为 25 °C, 一些金属离子和有机溶剂对酯酶 EstC11 的水解活性具有不同程度的抑制作用。通过对反应条件的优化,在最适反应条件下(pH 9.0 50 mmol/L Tris-HCl, 20 °C, 50 mmol/L 底物浓度)反应 3 h 后, (R)-乙酸苏合香酯的光学纯度达 98%, 得率为 39%。【结论】通过对酯酶拆分条件的优化,手性拆分乙酸苏合香酯生成(R)-乙酸苏合香酯的光学纯度明显提高,为酯酶 EstC11 在工业化上的应用奠定了基础。

关键词: 深海微生物, 酯酶, 动力学拆分, (R)-乙酸苏合香酯

Foundation items: Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA11030404); Scientific and Technological Project of Ocean and Fishery from Guangdong Province (A201701C12); The Senior User Project of RV KEXUE (KEXUE2018G05); Science and Technology Program of Guangzhou (201510010012)

*Corresponding author: E-mail: yunfeng.hu@scsio.ac.cn

ΔThese authors equally contributed to this work

Received: October 19, 2017; **Accepted:** February 05, 2018; **Published online** (www.cnki.net): March 16, 2018

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404); 广东省海洋渔业科技攻关与研发方向项目(A201701C12); “科学”号高端用户项目(KEXUE2018G05); 广州市科技计划项目(201510010012)

*通信作者: E-mail: yunfeng.hu@scsio.ac.cn

Δ对本文贡献相同

收稿日期: 2017-10-19; **接受日期:** 2018-02-05; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-03-16

Characterization of a novel deep-sea microbial esterase EstC11 for enantioselective resolution of (\pm)-1-phenylethyl acetate

GONG Yan-Hui^{3Δ} MA San-Mei^{3Δ} WANG Yong-Fei³ ZHANG Ji-Fu⁴
ZHANG Yun^{1,2} SUN Ai-Jun^{1,2} HU Yun-Feng^{1,2*}

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(2. Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(3. Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

(4. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: [Background] Chiral phenylethyl acetate is a crucial chiral flavor compound and possesses important applications in the fields of food and fine chemicals. The enzymatic synthesis of chiral phenylethyl acetate is of great industrial application prospect. [Objective] To characterize a novel microbial esterase EstC11 for enantioselective resolution of (\pm)-1-phenylethyl acetate. [Methods] A microbial esterase EstC11 identified from the deep sea of Western Pacific Ocean was cloned, expressed, and characterized. The optical purity of chiral product (*R*)-1-phenylethyl acetate generated through enzymatic kinetic resolution was increased by optimizing the conditions of enzymatic reactions, such as pH, temperature and organic solvents. [Results] The optimum pH and temperature of EstC11 were 8.5 and 25 °C, respectively. Some metal ions and organic solvents could inhibit the hydrolytic activity of EstC11. Under the optimum reaction conditions (pH 9.0, 50 mmol/L Tris-HCl, 20 °C, 50 mmol/L substrate concentration), the optical purity of (*R*)-1-phenylethyl acetate reached 98% with the yield of 39% after 3 h. [Conclusion] The optical purity and yield of (*R*)-1-phenylethyl acetate were dramatically improved after the optimization of enzymatic reaction conditions. Thus, our study laid the foundation for the application of esterase EstC11 in industry.

Keywords: Deep-sea microorganism, Esterase, Kinetic resolution, (*R*)-1-phenylethyl acetate

手性化合物在精细化工、食品及医药等领域都具有重要的应用^[1]。通常,手性化合物的合成可以通过传统的化学方法合成,但是化学合成需要有毒有机溶剂及重金属的参与,对环境及人类产生严重的危害,破坏产品的品质,并且通过化学合成得到的手性化合物光学纯度较低^[2]。例如,在 300 °C 下利用 PbZn/Al₂O₃ 作为催化剂制备(*R*)-乙酸苏合香酯的光学纯度仅为 32%^[3]。另一种手性化合物的合成是通过生物催化剂的方法,与传统的化学合成相比,酶法选择性拆分消旋体化合物,具有高立体专一性和区域选择性、副反应少、产率高、产物光学纯度好以及反应条件温和的优点,所以是一种被广泛认可的拆分方法^[4-5]。现代蛋白质工程技术也可以提高酶催化的活性、稳定性和立体选择性^[6-7]。

手性香料是一类重要的化合物,其不同对映体

可显示出不同的香气特征、香气强度以及不同的生物活性^[8-10]。例如, (*S*)-(+)-香芹酮具有芫荽的香味,而(*R*)-(-)-香芹酮则具有留兰香的香味^[8-9]。乙酸苏合香酯的香味与所含对映体比例有密切关系^[11],不同对映体过量值(*e.e.*)的手性乙酸苏合香酯具有不同的香味,因此在香精等行业具有重要的应用。例如,对 *e.e.*为 81%的(*R*)-乙酸苏合香酯具有杏香和苹果香,而 *e.e.*为 78%的(*S*)-乙酸苏合香酯则具有鳄梨的青香和草莓酱香。这两种香料的来源除了天然精油,也可采用生物合成或不对称合成技术获取^[12-15]。

酯酶(EC 3.1.1.1)是一类广泛应用于清洁剂和食品加工行业的水解酶。由于很多酯酶催化的酯化、转酯或水解反应在消旋体的动力学拆分中具有高对映选择性,而在制药工业和化学工业中也具有

重要的应用^[7,16]。酯酶催化的酶反应之所以会表现出高对映选择性是由于对两种相反对映体的水解速率不同。应用酯酶合成手性化合物的另一个优点是在酶催化反应过程中不需要辅酶的参与^[17]。

本研究对来自西太平洋深海热液口的一株芽孢杆菌的酯酶 EstC11 基因进行了克隆、表达,对其酶学性质及在拆分制备手性乙酸苏合香酯的应用进行了研究,为酯酶 EstC11 在工业化上的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)和载体 pET28a(+)均为本实验室保存;芽孢杆菌 *Bacillus sp.* CX01 从西太平洋深海热液口样品中筛选获得。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 凝胶回收试剂盒, Omega 公司;限制性内切酶, Thermo Fisher Scientific 公司; T4 DNA 连接酶和 *Taq* DNA 聚合酶, 北京全式金生物科技有限公司;对硝基苯酚乙酸酯(pNPC2)、对硝基苯酚丁酸酯(pNPC4)、对硝基苯酚己酸酯(pNPC6)、对硝基苯酚辛酸酯(pNPC8)、对硝基苯酚癸酸酯(pNPC10)、对硝基苯酚十二酸酯(pNPC12), 生工生物工程(上海)股份有限公司;乙酸苏合香酯, 上海阿达玛斯试剂有限公司;其他试剂均为分析纯。

PCR 仪, 美国伯乐生命医学产品公司;摇床, 上海世平实验设备有限公司;高压灭菌锅, 日本松下电器有限公司;冷冻离心机, 德国贝克曼有限公司;超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司;酶标仪, 瑞士 Tecan 公司;冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司;气相色谱仪, 浙江福立分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酯酶 EstC11 基因序列分析

通过生物信息学手段对基因组进行注释,确定酯酶 EstC11 的开放阅读框。氨基酸一致性分析通

过 PSI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)进行分析。利用 ClustalW 1.81c 对测序后的基因进行拼接,软件 DNAMAN 进行同源性分析。酯酶基因的理论蛋白质分子量及等电点采用 Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/)来预测。

1.2.2 酯酶基因的克隆及表达载体的构建

根据酯酶基因序列,利用 Primer Preimer 5 软件设计引物如下:上游引物:5'-CACGGATCCATGAAACGAACAGACAAAAAGCC-3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点);下游引物:5'-CATCTCGAGTTACACGCCGGCACGGAA-3' (下划线 *Xho* I 酶切位点)。以 *Bacillus sp.* CX01 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:模板 2 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, T4 连接酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 2.5 μ L, Buffer 2.5 μ L, 双蒸水补足至 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 冷却到 18 $^{\circ}$ C。0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并切胶回收。经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切后与载体连接,将重组质粒转入感受态 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性克隆送至上海美吉生物医药有限公司进行测序。

1.2.3 酯酶 EstC11 的表达、纯化

将重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3)中,涂布于 50 μ g/mL 的卡那霉素 LB 平板^[18],培养 20 h 后挑选单菌接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中,培养至 OD_{600} 为 0.85 左右,加 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L, 22 $^{\circ}$ C 培养 16 h。4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,用 30 mL (50 mmol/L, pH 7.4) Tris-HCl 缓冲液重悬菌体,超声破碎(超声 4 s 停 6 s), 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 15 min, 收集上清。将上清液转移至预先用 50 mmol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液平衡的镍柱中,用 40 mmol/L 的咪唑洗脱杂蛋白, 300 mmol/L 的咪唑洗脱目的蛋白。脱盐 Sephadex G25 柱脱盐。纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

1.2.4 酯酶酶学性质鉴定

采用对硝基苯酚法测定酯酶 EstC11 活力, 500 μ L

的反应体系: 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 485 μ L, 酶液(稀释 10 倍) 5 μ L, 对硝基苯酚酯 5 μ L, 以不加酶液的反应为空白对照, 反应 5 min 后测定酶活力。酶活力单位定义: 1 min 内水解对硝基苯酚酯释放 1 μ mol/L 对硝基苯酚所需的酶量定义为一个酶活力单位。通过比较酯酶对不同长度酰基对硝基苯酚酯(C2-C12)的水解活性确定酯酶最适作用底物。通过测定酯酶 EstC11 在不同 pH (pH 6.0-8.0 为 50 mmol/L PBS; pH 8.0-9.5 为 50 mmol/L Tris-HCl; pH 梯度为 0.5)缓冲液中酶活力确定酯酶的最适 pH, 以酶活力最高点的相对酶活力为 100%, 其 pH 稳定性则是通过将酯酶置于不同 pH (6.0-10.0, pH 梯度为 1.0)缓冲液中处理一定时间后测定其残余酶活力来确定的。在不同温度下 (10-45 $^{\circ}$ C, 温度梯度为 5 $^{\circ}$ C)测定酯酶 EstC11 的酶活力来研究酯酶的最适反应温度, 将酯酶 EstC11 在不同温度(30-50 $^{\circ}$ C)下处理, 每隔 15 min 测一次酶活力以检测酯酶的温度稳定性。将酯酶与终浓度为 2 mmol/L 和 10 mmol/L 的不同金属离子 (Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Li^+ 、 Cu^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+})混合, 处理 3 h 后测定残余酶活力确定金属离子对酯酶活力的影响。为研究表面活性剂和有机溶剂对酯酶活力的影响, 将酯酶置于浓度为 0.1%、0.5% 的表面活性剂[十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS)、吐温-20、吐温-80、三聚磷酸钠]或 30% 和 50% 有机溶剂[丙酮、乙腈、二甲基亚砜(DMSO)、甲苯、庚烷、异辛烷、己烷、乙醇、正癸醇]中处理 3 h, 对硝基苯酚测定其残余酶活力, 以未加入表面活性剂或有机溶剂的反应体系中的酯酶活力为 100% 作为对照。

1.2.5 酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯条件的优化

为研究 pH 对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响, 在不同 pH (6.0-9.5)的反应体系中加入 10 mg 粗酶粉和 50 mmol/L (±)-乙酸苏合香酯, 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 2 h 后乙酸乙酯萃取, 手性气相色谱检测有机相。反应体系在不同温度下反应 2 h 后, 手

性气相色谱检测以确定温度对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响。有机溶剂对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响是通过在反应体系加入 10% (体积比)有机溶剂, 在 20 $^{\circ}$ C 下反应 2 h 后气相色谱手性柱检测来确定的。表面活性剂对酯酶 EstC11 拆分乙酸苏合香酯的影响则是通过向反应体系中加入 0.1% 的表面活性剂, 在优化条件下 (20 $^{\circ}$ C, pH 9.0 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液)反应 2 h 后, 样品进行气相色谱检测。在优化条件下 (20 $^{\circ}$ C, pH 9.0 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液), 向反应体系中加入 10 mg 酯酶 EstC11 粗酶粉, 20-100 mmol/L 底物(±)-乙酸苏合香酯, 反应 2 h 后样品用于 GC 检测, 确定酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的最适底物浓度。为研究反应时间对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响, 在优化条件下 (20 $^{\circ}$ C, pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液), 每隔一段时间取出 500 μ L 用乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠除水, 气相色谱手性柱检测。气相色谱仪 9790 II 配置有 112-6636 CYCLOSIL-B 手性毛细管柱[30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m 膜厚(df)]和 H_2 flame 离子检测器。手性气相色谱条件: 载气氮气的流速为 1.2 mL/min, 进样口、检测口温度为 250 $^{\circ}$ C (初温 100 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C/min 的速度升温至 250 $^{\circ}$ C 并保留 10 min)。以十二烷作为内标, 计算得率(Y)和对映体过量值(e.e.)。

$$e.e. = \frac{[S\text{-乙酸苏合香酯}] - [R\text{-乙酸苏合香酯}]}{[S\text{-乙酸苏合香酯}] + [R\text{-乙酸苏合香酯}]}$$

$$Y = A/A_0$$

e.e. 和 Y 分别表示乙酸苏合香酯的对映体过量值和 S-乙酸苏合香酯的得率。A 和 A_0 表示反应前后 S-乙酸苏合香酯的量。

2 结果与分析

2.1 酯酶的基因序列分析

酯酶基因 *EstC11* 全长 717 bp, 编码 239 个氨基酸残基, EstC11 的理论蛋白分子量为 29.3 kD, 等电点为 5.62。NCBI 比对结果显示: EstC11 基因序列与来自 *Bacillus* 的 Rhamnagalacturonan acetyltransferase 基因具有 96% 的相似性, 与来自

Bacillus paralicheniformis 的 Rhamnogalacturonan acetyltransferase 基因有 95% 的相似性, 与来自 *Bacillus licheniformis* 的 Rhamnogalacturonan acetyltransferase、*Bacillus swiezeyi* 的 Rhamnogalacturonan acetyltransferase、*Bacillus subtilis* 的 Hypothetical protein B4069_0705 序列相似性分别为 94%、75% 和 64%。

2.2 酯酶表达纯化

构建的表达载体 pET28a(+)-EstC11 转入感受态 *E. coli* BL21(DE3), 并实现了高效表达。纯化后, SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示单一目的条带大约为 29 kD, 说明 EstC11 与理论值大小一致(图 1A)。

2.3 酯酶酶学性质

2.3.1 最适底物

比较酯酶 EstC11 水解不同长度酰基的对硝基苯酚酯 pNPC2-C12, 结果如图 1B 所示。说明酯酶 EstC11 对长链对硝基苯酚酯特异性差, 而对短链对硝基苯酚酯的作用效果较好, 最佳底物是 pNPC2, 即对硝基苯酚乙酸酯, 其酶活力值为 124.5 U/mg。

2.3.2 最适 pH 和 pH 稳定性

pH 对重组酯酶 EstC11 活力的影响结果见图 2A。在 50 mmol/L 的 Tris-HCl pH 8.5 时, 酯酶 EstC11

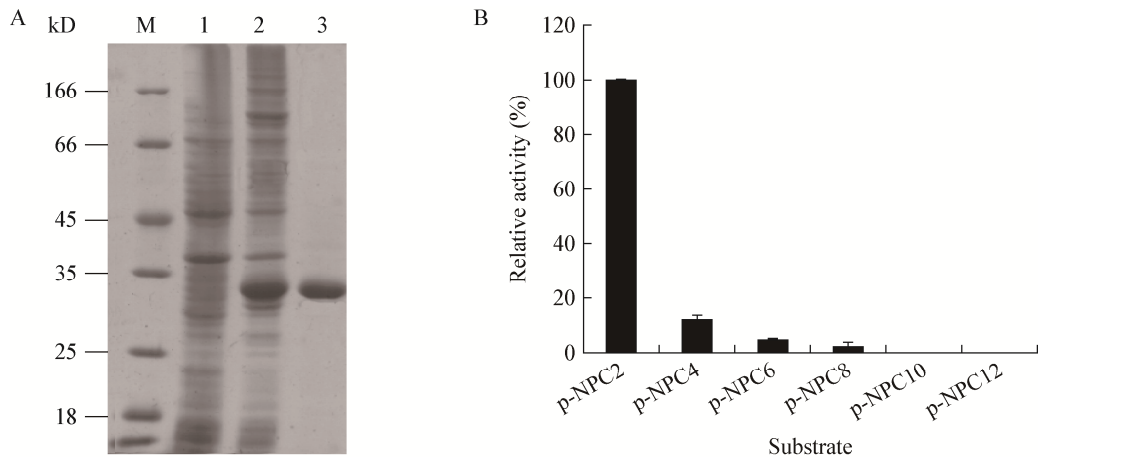


图 1 酯酶 EstC11 的蛋白表达(A)和底物特异性(B)

Figure 1 Expression (A) and substrate specificity (B) of EstC11

注: 1: IPTG 诱导后的 *E. coli* BL21(DE3) pET28-EstC11 蛋白上清; 2: IPTG 诱导后的 *E. coli* BL21(DE3) pET28-EstC11 总蛋白; 3: 纯化的 EstC11。

Note: 1: Protein supernatants of EstC11 after IPTG induction; 2: Total proteins after IPTG induction; 3: Purified EstC11.

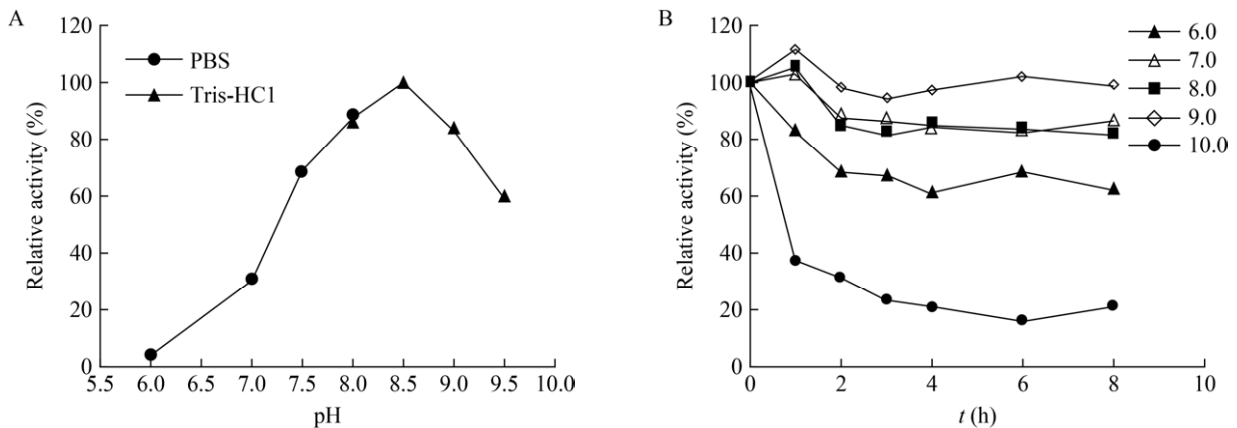


图 2 pH 对酯酶 EstC11 活力(A)和稳定性(B)的影响

Figure 2 Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of EstC11

的酶活力最高, pH 值在 7.5–8.5 之间有较高的酶活力。当 pH 低于 7.5 时, 其酶活力迅速降低。酯酶 EstC11 在不同 pH 缓冲液中的稳定性见图 2B。pH 在 7.0–9.0 时酶活力较稳定, 处理 8 h 后残余活力在 80% 以上。在 pH>9.0 时, 酶活力丧失较为明显。

2.3.3 最适温度和温度稳定性

酯酶 EstC11 在低于 40 °C 时酶活力保持较高, 处理 90 min 后残余酶活力仍保持 85% 以上。随着处理温度的升高, 酯酶残余酶活力逐渐下降, 当温度高于 45 °C 时酶活力急剧降低(图 3A), 在 50 °C 处理 90 min 后残余酶活力为 20% (图 3B), 说明酯酶在低于 40 °C 时稳定性较好。

2.3.4 金属离子、表面活性剂、有机溶剂对酯酶 EstC11 活力的影响

金属离子对酶活力的影响见图 4A。与对照相比, Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 等金属离子对酯酶催化对硝基苯酚乙酸酯的活力有强烈的抑制作用; Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Li^+ 、 K^+ 等对酯酶 EstC11 酶活力的影响很小。不同的表面活性剂处理酯酶 EstC11, 以未添加任何离子或表面活性剂的反应体系中的酶活力为 100% 作为对照。在室温下孵育 3 h 后测定残余酶活力, 结果见图 4B。三聚磷酸钠对酶活力具有明显的激活作用, 而 Tween-20 和 Tween-80 对酶活力具有不同程度的抑制作用, 并且随着浓度增加抑制作用增强。SDS

和 SDBS 对 CX-11 的酶活力具有强抑制性。如图 4C 所示, 在 10% (体积比) 的浓度下, 绝大多数有机溶剂对酯酶 EstC11 都有不同程度的抑制作用。在高浓度[50% (体积比)]下, 酯酶 EstC11 在正己烷中保持较高的酶活力, 残余酶活力为 50% 以上。以上结果说明该酯酶能够耐有机溶剂。

2.4 酯酶 EstC11 拆分乙酸苏合香酯条件优化

2.4.1 pH 对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响

如图 5A 所示, 在 pH 6.0–9.0 之间随 pH 升高 *e.e.* 不断增大, 酯酶 EstC11 在 pH 9.0 时 *e.e.* 最高, 达 90%, 此时得率为 45%。pH 继续升高, *e.e.* 变化不大。因此, EstC11 拆分乙酸苏合香酯的最适 pH 为 9.0。

2.4.2 反应温度对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响

从图 5B 可以看出, 在 20 °C 时 *e.e.* 最高为 89%, 随着温度的升高 *e.e.* 不断降低, 因此酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的最适温度为 20 °C。

2.4.3 有机溶剂对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响

从表 1 可以看出, 在 10% (体积比) DMSO 存在的情况下, *e.e.* 明显提高 ($P < 0.05$), 而其他绝大多数有机溶剂的存在都降低了酯酶 EstC11 的立体选择性。

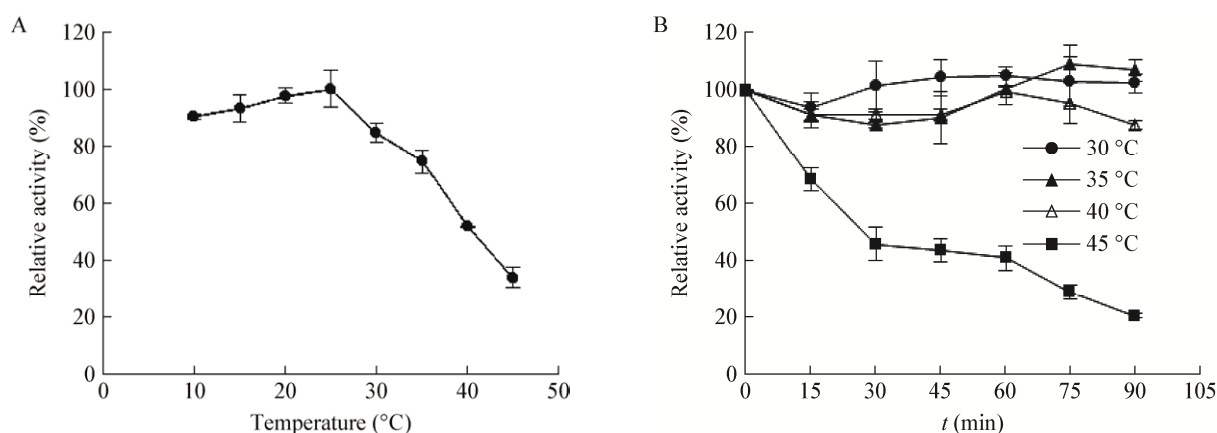


图 3 温度对酯酶 EstC11 活力(A)和稳定性(B)的影响

Figure 3 Effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of EstC11

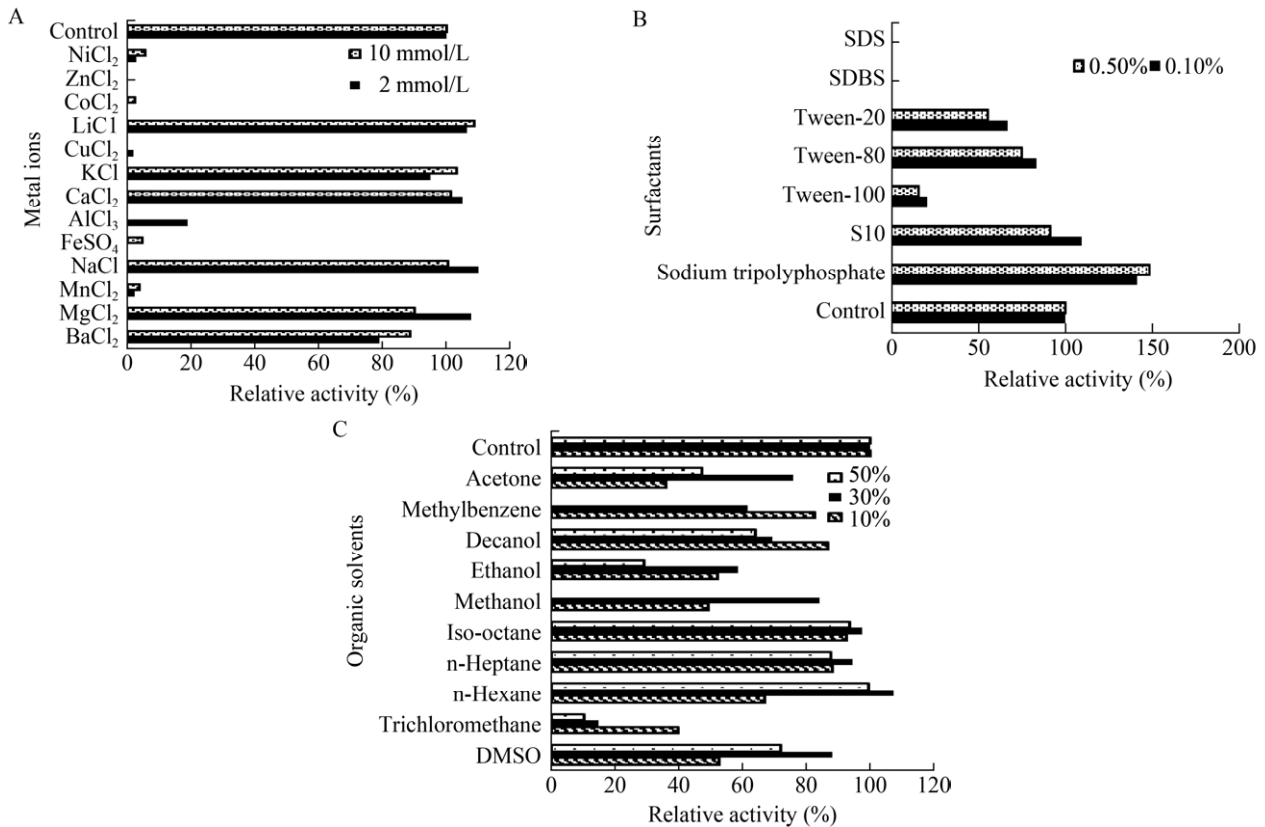


图4 金属离子(A)、表面活性剂(B)和有机溶剂(C)对酯酶 EstC11 活力的影响

Figure 4 Effect of metal ions (A), surfactants (B) and organic solvents (C) on the hydrolysis activity of esterase EstC11

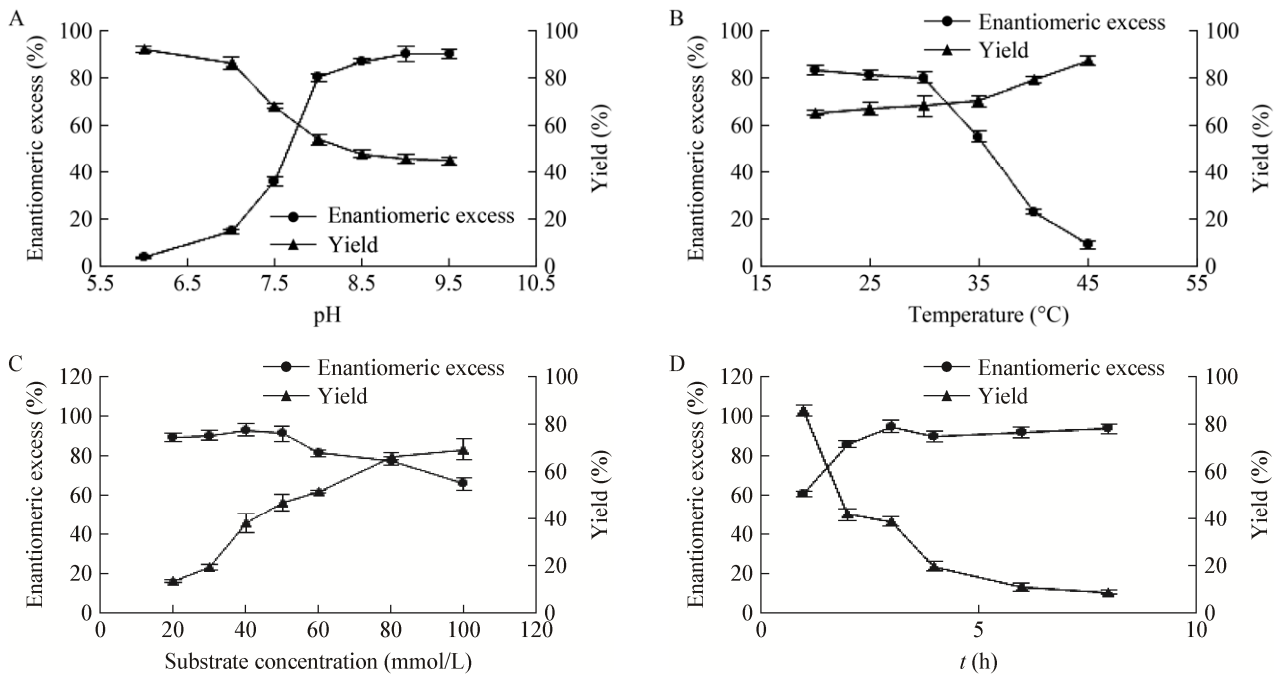


图5 pH (A)、温度(B)、底物浓度(C)和反应时间(D)对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响

Figure 5 Effect of pH (A), temperature (B), substrate concentration (C) and reaction time (D) on the kinetic resolution of (±)-1-phenylethyl acetate

表 1 有机溶剂对酯酶 EstC11 水解拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响

Table 1 Effect of organic solvents on the kinetic resolution of (±)-1-phenylethyl acetate by esterase EstC11

Organic solvents	<i>e.e.</i> (%)	<i>Y</i> (%)
Control	86.0±1.1	46.0±1.9
DMSO	91.0±1.8	40.0±1.3
Acetone	46.0±0.4	68.0±0.6
Acetonitrile	29.0±0.5	62.0±0.9
Isooctane	47.0±1.2	79.0±2.1
n-Hexane	51.0±2.1	85.0±3.2
n-Heptane	45.0±1.6	84.0±2.4
Methylbenzene	9.0±0.3	80.0±0.7
Decanol	39.0±0.8	77.0±1.3
Ethanol	47.0±1.1	63.0±2.1

2.4.4 表面活性剂对酯酶 EstC11 拆分乙酸苏合香酯的影响

在优化条件下(20 °C, pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液)向反应体系中加入终浓度为 50 mmol/L 的底物(±)-乙酸苏合香酯, 0.1% (质量体积比)的表面活性剂(Tween-20、Tween-80、TritonX-100、三聚磷酸钠), 加入 10 mg 酯酶 EstC11 粗酶粉反应 2 h 后, 样品用于气相色谱检测, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 与对照相比, 在表面活性剂存在的情况下, *e.e.* (94%±3%)和 *Y* (47%±2%)基本没有变化($P>0.05$)。

表 2 表面活性剂对酯酶 EstC11 水解拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响

Table 2 Effects of surfactants on the kinetic resolution of (±)-1-phenylethyl acetate

Surfactants	<i>e.e.</i> (%)	<i>Y</i> (%)
Control	93±1.5	47±2.1
0.1% Tween-20	94±0.8	45±1.2
0.1% Tween-80	94±0.4	47±0.9
0.1% TritonX-100	94±1.3	47±2.4
0.1% Sodium tripolyphosphate	91±2.1	49±3.4
0.5% Sodium tripolyphosphate	94±1.6	46±2.1
1% Sodium tripolyphosphate	93±2.4	46±3.3

2.4.5 底物浓度对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响

从图 5C 中可以看出, 底物浓度为 40 mmol/L 时 *e.e.* 达到 95%, 得率为 37%, 而底物浓度为 50 mmol/L 时 *e.e.* 为 94%, 得率却达到 46%。综合考虑, 50 mmol/L 为酯酶 EstC11 选择性水解(±)-乙酸苏合香酯的最适底物浓度。

2.4.6 反应时间对酯酶 EstC11 拆分(±)-乙酸苏合香酯的影响

从图 5D 中可以看出, 随着反应时间的延长 *e.e.* 逐渐升高。反应 3 h 后 *e.e.* 变化不明显, 因此酯酶 EstC11 催化(±)-乙酸苏合香酯的最适反应时间是 3 h, 最适反应条件下酯酶 EstC11 催化拆分(±)-乙酸苏合香酯制备的(*R*)-乙酸苏合香酯的 *e.e.* 为 98%, 得率为 39%。

3 讨论与结论

乙酸苏合香酯是一种重要的食品用手性香料, 它们的香味特征与其对映体构型及对映体含量有关。因此, 对这类手性香料进行拆分不仅对香料的鉴定、食品分析和食用香精的开发奠定重要的基础, 而且对香料科学的基础研究也具有重要的意义。乙酸苏合香酯具有强烈的青香香味, 其香味与所含对映体比例有关。如(*S*)-(-)-乙酸苏合香酯带有鳄梨的青味和草莓酱的香味; 而(*R*)-(+)-乙酸苏合香酯带有杏香、苹果香和草莓酱香味^[1,6]。利用微生物酯酶/脂肪酶通过拆分反应高效地制备高光学纯度的手性产品, 与传统的有机合成相比具有产物光学纯度高、对环境污染小和无重金属残留等巨大技术优势。海洋环境是挖掘新颖微生物和微生物工业酶的重要来源。公颜慧等从海洋假单胞菌 *Pseudomonas antitumoralis* HUP007 中分离鉴定得到的酯酶 EstP8 可以选择性地水解乙酸苏合香酯, 在共溶剂 DMSO 的存在下, 所制备的(*R*)-乙酸苏合香酯的 *e.e.* 可达 98%^[19]。在本研究中, 从西太平洋深海芽杆菌属 *Bacillus* sp. CX01 中分离鉴定得到的新颖酯酶 EstC11 同样可以选择性地水解乙酸苏合香酯, 经系统地优化后制备的(*R*)-乙酸苏合香酯的

光学纯度可达 98%；酯酶 EstC11 选择性水解拆分(±)-乙酸苏合香酯的最适底物浓度可达 50 mmol/L。

Liang 等分离鉴定的酯酶 BSE01281 可以通过转酯反应产生(R)-乙酸苏合香酯，其 *e.e.*达到 99%，转化率 42%^[20]。但所需反应时间较长(需 96 h)，而本研究中反应 2 h 后 *e.e.*就可达 98%。因此，新型深海微生物酯酶 EstC11 为我们开发的又一高效的生物催化剂，在催化制备手性乙酸苏合香酯以及其它手性药物中间体/手性化工产品方面具有较好的产业化前景。

在拆分优化过程中，发现得率和(R)-乙酸苏合香酯的光学纯度不能同时达到较高的水平，可能是由于温度、pH 等对 R、S 两种构型的水解速率影响是一样的，可以同时加快或减慢两种构型的水解速率。在后续研究中，可以对酯酶进行空间结构分析，再结合定点突变技术挖掘鉴定与酯酶某些特性相关的功能氨基酸残基，获得满足人类需要的工业酶。

REFERENCES

- [1] Patel RN. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(6): 804-826
- [2] Noyori R, Kitamura M. Enantioselective addition of organometallic reagents to carbonyl compounds: chirality transfer, multiplication, and amplification[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1991, 30(1): 49-69
- [3] Kirilin A, Mäki-Arvela P, Kordas K, et al. Chemo-bio catalyzed synthesis of R-1-phenylethyl acetate over bimetallic PdZn catalysts, lipase, and Ru/Al₂O₃. Part II[J]. *Kinetics and Catalysis*, 2011, 52(1): 77-81
- [4] Habulin M, Knez Ž. Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 58(1/4): 24-28
- [5] Cheng C, Ma JH. Enantioselective synthesis of S-(-)-1-phenylethanol in *Candida utilis* semi-fed-batch cultures[J]. *Process Biochemistry*, 1996, 31(2): 119-124
- [6] Schöfer SH, Kaftzik N, Wasserscheid P, et al. Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity[J]. *Chemical Communications*, 2001, 5(5): 425-426
- [7] Ma JB, Wu L, Guo F, et al. Enhanced enantioselectivity of a carboxyl esterase from *Rhodobacter sphaeroides* by directed evolution[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(11): 4897-4906
- [8] Tian HY. Chiral Flavors and Fragrances and Asymmetric Synthesis[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 252-267 (in Chinese)
田红玉. 手性香料及其不对称合成[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 252-267
- [9] Liu SW. Technical Handbook of Synthetic Perfume Materials[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009: 56 (in Chinese)
刘树文. 合成香料技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 56
- [10] Werkhoff P, Krammer G, Brennecke S, et al. Methyl dihydrojasmonate and its stereoisomers: sensory properties and enantioselective analysis[J]. *Food Reviews International*, 2002, 18(2/3): 103-122
- [11] Farbood MI, Blocker RW, Arvizzigno J, et al. Mixtures of optical isomers of styralyl alcohol or styralyl acetate, processes for preparing same and organoleptic uses thereof: US, 6511686[P]. 2003-02-28
- [12] Jin QZ. Natural food flavor and the resources of raw materials[J]. *China Food Additives*, 1997(3): 23-28 (in Chinese)
金其璋. 天然食品香精及其原料来源[J]. *中国食品添加剂*, 1997(3): 23-28
- [13] Macaev F, Vlad L, Gudima A. Selective synthesis of carvone and cryptomerlone from α -pinene[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2006, 42(3): 301-303
- [14] Luo H, Zhu CL. The synthesis of L-carvone[J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2003, 17(2): 38-39,54 (in Chinese)
罗虹, 祝春兰. L-香芹酮的合成[J]. *天津化工*, 2003, 17(2): 38-39,54
- [15] Chen X, Jin QR, Guan ZC. Synthesis of styrallyl acetate[J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2003, 17(4): 13-15 (in Chinese)
陈煦, 金秋茹, 关志才. 乙酸苏合香酯的合成[J]. *天津化工*, 2003, 17(4): 13-15
- [16] Monteiro J, Braun J, Le Goffic F. A practical synthesis of (R) and (S) 3-hydroxyglutaric acid monoesters by enzymatic hydrolysis with a bacterial esterase[J]. *Synthetic Communications*, 1990, 20(3): 315-319
- [17] Huang HR, Xu JH, Xu Y, et al. Preparation of (S)-mandelic acids by enantioselective degradation of racemates with a new isolate *Pseudomonas putida* ECU1009[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16(12): 2113-2117
- [18] Sambrook J, Russell DW. The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006: 1595
- [19] Gong YH, Ma SM, Zhang Y, et al. Functional characterization of a novel microbial psychrophilic lipase and its utilization in stereo-selective biocatalysis[J]. *China Biotechnology*, 2016, 36(10): 35-44 (in Chinese)
公颜慧, 马三梅, 张云, 等. 新颖微生物低温酯酶 EstP8 的酶学性质研究与在手性催化中的应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(10): 35-44
- [20] Liang JY, Zhang Y, Sun AJ, et al. Enantioselective resolution of (±)-1-phenylethanol and (±)-1-phenylethyl acetate by a novel esterase from *Bacillus* sp. SCSIO 15121[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(3): 558-575