

不对称还原苯乙酮的酵母菌株筛选与分子鉴定

朱冬眉¹ 陈丹^{1,3} 郑黎鹂¹ 陈华² 杨志荣¹ 孙群^{1*}

(1. 四川大学生命科学学院 成都 610064)

(2. 四川大学化学学院 成都 610064)

(3. 四川省迈克科技有限责任公司 成都 611731)

摘要: 利用苯乙酮作为模式底物, 对 145 株菌株进行初筛和复筛, 获得一株具有高效立体选择性的酵母菌株 YS6-2, 能够不对称还原苯乙酮生成(S)-1-苯基乙醇。在苯乙酮浓度为 70 mmol/L 时, 底物的初始转化率达 26.8%, 产物(S)-1-苯基乙醇的对映体过量值为 98.8%。基于形态学、生理生化特征、18S rDNA 和 26S rDNA D1/D2 区域的分析表明, YS6-2 为胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)。

关键词: 不对称还原, 苯乙酮, 酵母菌, 18S rDNA, 26S rDNA D1/D2, 系统发育

Screening and Molecular Identification of Yeast Strain for Asymmetric Reduction of Acetophenone

ZHU Dong-Mei¹ CHEN Dan^{1,3} ZHENG Li-Li¹ CHEN Hua²
YANG Zhi-Rong¹ SUN Qun^{1*}

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

(2. College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064)

(3. Sichuan Maker Science & Technology Co., Ltd, Chengdu 611731)

Abstract: Yeast strain YS6-2 with high stereoselectivity was screened from 145 strains when the asymmetric reduction of acetophenone to (S)-1-phenethylalcohol was chosen as the model reaction. With the concentration of acetophenone at 70 mmol/L, YS6-2 yielded (S)-alcohol at 26.8% conversion and enantiomeric excess reached up to 98.8%. Based on the analysis of 18S rDNA and 26S rDNA D1/D2 domain sequence, along with its general morphology, physiological and biochemical characteristics, YS6-2 was identified as *Rhodotorula mucilaginosa*.

Keywords: Asymmetric reduction, Acetophenone, Yeast, 18S rDNA, 26S rDNA D1/D2, Phylogenetic analysis

不同对映体的药物可能具有完全不同的药理活性, 因此单一对映体药物对治疗具有重要意义。美国FDA于 1992 年规定所有具有手性的新药均需以

单一对映体形式申报生产和上市^[1], 目前全球手性药物的销售额约占药物总销售额的 1/3。含有芳香基的手性醇是合成多种手性药物, 如R-托莫西汀^[2]、

R-沙丁胺醇^[3]、S-氟西汀等的关键手性砌块^[4], 不对称还原前手性芳香酮是生成该类手性醇的重要方法。其中, 以酶作为催化剂的生物催化, 具有立体选择性强、催化效率高、反应条件温和、环境污染少、成本低等显著优势^[5]。微生物一般具有完整的酶系统和良好的手性选择性, 且生长快, 营养物质要求低, 因此利用微生物进行手性药物中间的合成成为研究热点。目前, 国内外报道的具有不对称还原前手性芳香酮能力的微生物以酵母菌为主, 多数集中于面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[6,7], 而利用胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)进行不对称还原的研究尚不多见。

准确地鉴定筛选菌株可为进一步研究菌株特性提供指导意义。传统的酵母菌鉴定方法依赖于形态学和生理生化特征, 通常需要进行 60~90 次生理生化反应, 不仅繁琐、费时, 而且可能因实验条件的不同重现性不佳^[8,9]。近年来, 随着生物化学和分子生物学的发展, 许多分子鉴定方法被广泛用于酵母菌分类学研究。如酵母菌 18S rDNA 区域含有不同变异率的区段, 可用于种、属或更高等级分类群之间的系统关系研究; 而 26S rDNA D1/D2 区域中较高的变异率可用于亲缘关系较近的菌株间的分类研究^[10]。因此, 进行酵母菌种的鉴定时, 通常在形态学和生理生化特征鉴定的基础上, 结合分子鉴定来获得准确和满意的结果。

本工作以前手性芳香酮中最具代表性的模式底物苯乙酮作为选择压, 筛选到一株高效不对称还原苯乙酮生成(S)-1-苯基乙醇的酵母 YS6-2, 并对其形态学、生理生化特征及核糖体 18S rDNA 和 26S rDNA D1/D2 区域的基因序列进行研究。

1 材料与方法

1.1 土样来源

采自成都东郊某手性药物生产企业污水排污口附近的土壤。

1.2 试剂和材料

苯乙酮(Acetophenone, ACP)购自成都科龙化工试剂厂, 分析纯; (S)-1-苯基乙醇、(R)-1-苯基乙醇购自 Sigma-Aldrich, ChiraSelect, $\geq 99.0\%$ (sum of enantiomers, GC); 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 培养基

YPD 培养基: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 酵母

膏 5 g, 琼脂 15 g, 用蒸馏水定容至 1000 mL, pH 自然, 75 kPa 灭菌 20 min。

1.4 菌种的筛选

将采集的土壤样品配制成悬液, 取上清均匀涂布在 YPD 培养基平板上, 30°C 培养 2 d, 分离菌株后斜面保藏作初筛备用。

1.5 菌体培养

1.5.1 种子培养: 将 30°C 培养 3 d~5 d 的斜面菌体, 转接至含 20 mL YPD 液体培养基的锥形瓶中, 于 30°C、170 r/min 的摇床中培养 24 h。

1.5.2 发酵培养: 将培养 24 h 后的种子液, 以 2% 的接种量转接到 50 mL YPD 液体培养基中, 30°C 下 170 r/min 培养 48 h 后, 菌液于 4°C、6000 r/min 下离心 10 min, 收集菌体用于生物转化。

1.6 还原反应

将获得的菌体沉淀用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.6)洗涤 2 次后重悬于 25 mL 同一缓冲液中, 加入底物 ACP 至终浓度 70 mmol/L, 同时加入 2% (W/V) 葡萄糖, 于 30°C、170 r/min 下反应 24 h。

1.7 产物分析方法

反应结束后, 反应液用乙酸乙酯萃取(1:1, V/V), 无水MgSO₄干燥后采用GC分析。使用GC-960 气相色谱仪, HP Chiral 10% β -Cyclodextrin手性色谱柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m); 检测条件: 载气为氮气, 进样器、色谱柱和FID检测器温度分别为 220°C、120°C和 220°C; 分流比为 1:100; 进样量为 0.1 μ L。分别以底物的转化率(Conversion)和产物的对映体过量值(e.e. value)表示反应的转化程度和立体选择性, 其表达式如下:

$$\text{Conversion (\%)} = C_{\text{PEA}} / C_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{e.e. value (\%)} = (C_S - C_R) / (C_S + C_R) \times 100\% \quad (2)$$

其中, C_0 为底物的初始浓度, C_{PEA} 为反应终止时的产物浓度, C_S 和 C_R 分别为(S)型和(R)型产物的浓度。

1.8 菌种鉴定

1.8.1 形态学和生理生化特征: 根据《酵母菌的特征与鉴定手册》^[11]所列的酵母菌种鉴定方法进行鉴定。

1.8.2 酵母基因组DNA提取: 参考《酵母遗传学方法实验指南》^[12]的方法提取酵母基因组DNA。

1.8.3 18S rDNA和26S rDNA D1/D2 区域的PCR扩增: 18S rDNA的PCR扩增采用通用引物对^[13]: NS1

(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')和NS8 (5'-TCCG CAGGTTACCTACGGA-3')。PCR反应体系(50 μ L) : 10 \times PCR缓冲液, 5.0 μ L; Mg^{2+} (5 mmol/L), 3.0 μ L; dNTP(各 2.5 mmol/L), 4.0 μ L; 引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L; Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L; 模板 DNA 2.0 μ L; 去离子水 33.5 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 1.0 min, 55 $^{\circ}$ C 1.0 min, 72 $^{\circ}$ C 2.0 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取 PCR 产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳。

26S rDNA D1/D2 区域的PCR扩增采用通用引物对^[14]: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAA AG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')。除 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.0 min的 35 个循环外, 其他扩增条件与 18S rDNA序列的PCR扩增条件基本相同。

1.8.4 产物克隆与序列测定: 扩增的 PCR 产物用 Tiangen 公司的凝胶回收试剂盒纯化。回收片段连接到 pMD18-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α , 经蓝白斑筛选, 质粒双酶切验证获得阳性克隆。重组质粒送宝生物工程公司测序。

1.8.5 序列分析和系统树的构建: 根据供试菌株的 18S rDNA 和 26S rDNA D1/D2 区域序列, 运用 Blast 程序在 GenBank 数据库中分别进行同源序列搜索。根据同源序列搜索的结果, 下载相关菌种的 18S rDNA 和 26S rDNA D1/D2 区域序列, 与供试菌株的序列一同用 Clustal X1.83 软件进行多序列比对, 结果采用 MEGA3.1 中的邻接法(Neighbor-Joining)进行系统树的构建, 并用 Bootstrap 对进化树进行 1000 次可信度分析。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

以 ACP (70 mmol/L)为选择压, 从手性药物生产企业排污口附近的土壤及本实验室分离和保存的 145 株菌种出发, 经初筛、复筛获得 12 株具有不对称还原苯乙酮生成 1-苯基乙醇能力的菌株。其中, 11 株生成(S)-1-苯基乙醇, 1 株生成(R)-1-苯基乙醇(见表 1)。而菌株 YS6-2 的不对称还原能力最高, 底物的转化率达 26.8%, 产物(S)-1-苯基乙醇的对映体过量值为 98.8%。因此, 选择菌株 YS6-2 作为供试菌株进行下一步研究。

2.2 形态学和生理生化特征

菌株 YS6-2 在 YPD 培养基平板上培养 1 d~2 d

(30 $^{\circ}$ C)后, 菌落为粉红色圆形、球形突起、边缘整齐、不透明表面光滑、质地均匀、粘稠(见图 1), 镜检细胞呈椭圆至长椭圆形、芽殖、单边出芽。在麦芽汁液体培养基中培养 3 d~7 d (30 $^{\circ}$ C)后, 不形成醭、菌液浑浊、不发酵、有沉淀。

表 1 不对称还原苯乙酮菌株的复筛结果
Table 1 Strains screened for asymmetric reduction of acetophenone

菌株 Strains	转化率 Conversion (%)	对映体过量值 e.e. value (%)	构型 Conformation
YM6-2	8.4	94.6	S
YM6-3	21.3	98.5	S
YM6-4	19.0	98.7	S
YM6-7	21.4	98.7	S
YM6-8	16.9	98.7	S
YM8-2	21.5	98.6	S
YS5-1	22.0	98.9	S
YS6-2	26.8	98.8	S
YN4-1	11.5	98.2	S
YQ2-1	6.6	99.6	S
YL1-3	3.2	99.6	S
Y11-3	2.5	94.5	R

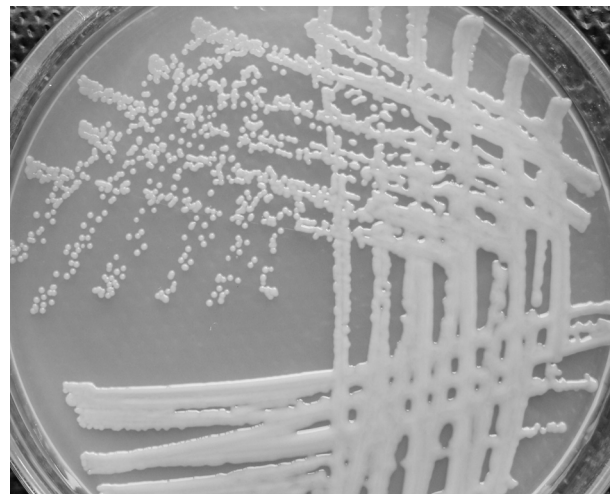


图 1 YPD 培养基上 YS6-2 的菌落形态
Fig. 1 Colonies of YS6-2 on the YPD medium

参照《酵母菌的特征与鉴定手册》进行形态学和生理生化特征检测, 菌株 YS6-2 的形态和生理生化特征(见表 2)与胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)完全相同。

表 2 菌株 YS6-2 的生理生化特征
Table 2 The physiological characteristic of strain YS6-2

特性 Characteristics	结果 Results
D-木糖生长(D-xylose)	+
麦芽糖生长(Maltose)	+
乳糖生长(Lactose)	-
松三糖生长(Melezitose)	+
D-甘露醇生长(D-Mannitol)	-
硝酸盐生长(Nitrate)	-
乙胺生长(Ethylamine)	+
尸胺生长(Cadaverine)	-
无生物素生长(w/o Biotin)	-
无对氨基苯甲酸盐生长(w/o PABA)	+
0.1%放线菌酮生长(0.1% Cycloheximide)	-
淀粉形成(Starch formation)	-
于 25°C 生长(25°C Growth)	+
于 30°C 生长(30°C Growth)	+
于 37°C 生长(37°C Growth)	-
细胞丝状(Filamentous Growth)	-
假菌丝(Pseudomycelium)	-
掷孢子(Ballistospores)	-

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

2.3 18S rDNA 序列分析

通过PCR扩增, 实验获得了酵母YS6-2的18S rDNA基因的部分片段。对该片段进行序列分析后, 利用Blast软件将该序列与GenBank中收录的DNA序列进行比对, 并与相关菌种构建进化树(见图2)。结果显示, YS6-2与*R. mucilaginosa* NCYC 63^T (X84326)聚成一支, 序列同源性为99.44% (1767/1777), 表明两者亲缘关系最近。菌株YS6-2的18S rDNA序列长度为1775 bp, 其在GenBank数据库中的登陆号为EU380239。

2.4 26S rDNA D1/D2 区域序列分析

通过PCR扩增, 获得了酵母YS6-2的26S rDNA D1/D2区域基因的部分片段, 利用Blast软件将该片段序列与GenBank中收录的DNA序列进行比对, 并与相关菌种构建进化树(见图3)。结果表明, YS6-2与*R. mucilaginosa* CBS 8383 (AF189959)聚成一支, 序列同源性达100.00% (600/600), 表明两者亲缘关系最近。菌株YS6-2的26S rDNA D1/D2区域序列长度为613 bp, 其在GenBank数据库中的登陆号为EU380240。

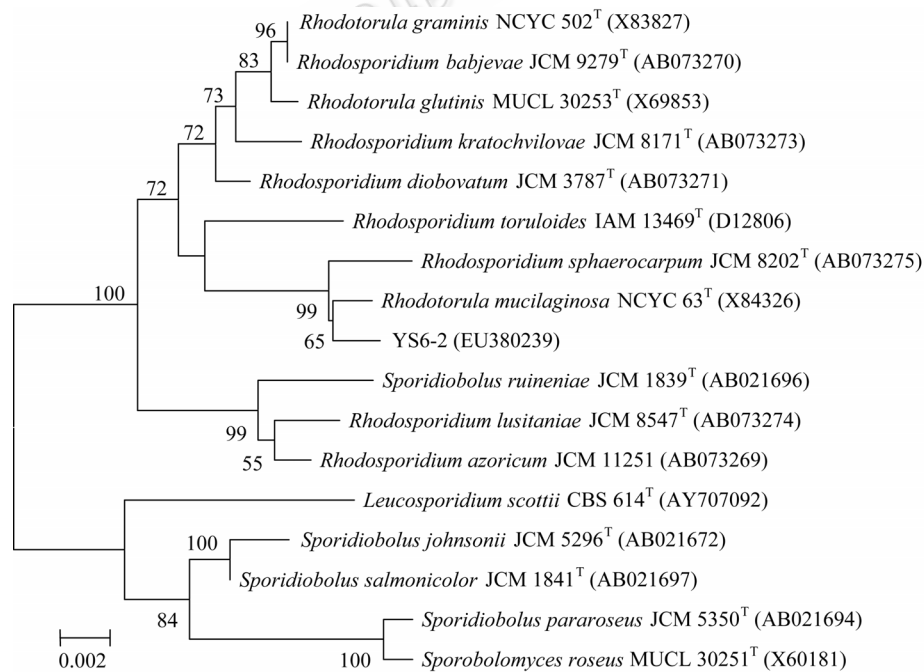


图 2 基于 18S rDNA 序列和 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree drawn from Neighbor-Joining analysis based on 18S rDNA sequence alignment

注: 分枝上的数值: Bootstrap 检验的支持百分率(>50%); T: 模式菌株

Note: The numbers on the tree: Bootstrap values greater than 50%; T: The type strain

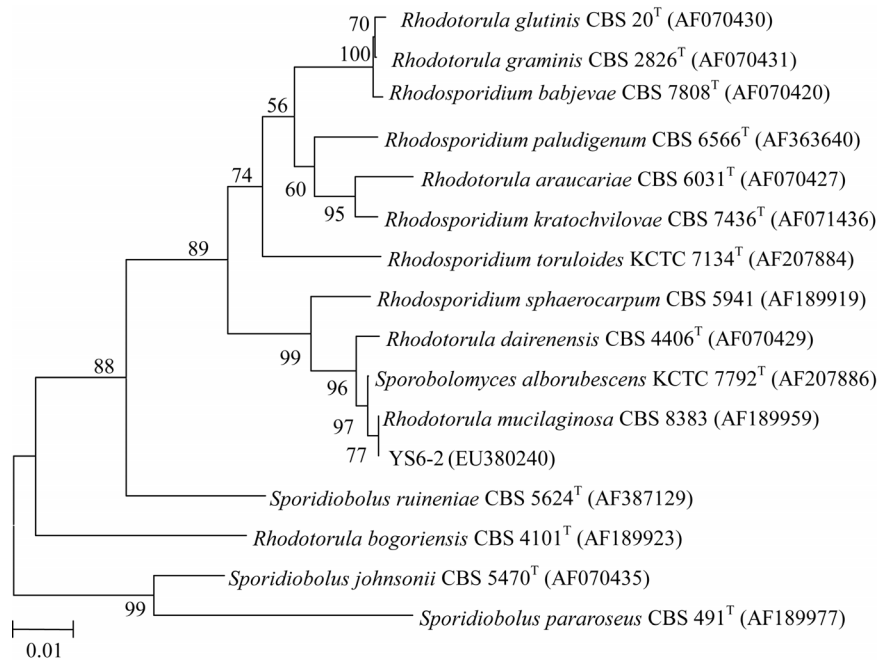


图3 基于26S rDNA D1/D2区域序列和Neighbor-Joining法构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree drawn from Neighbor-Joining analysis based on 26S rDNA D1/D2 domain sequence alignment

注：分枝上的数值：Bootstrap 检验的支持百分率(>50%); T: 模式菌株

Note: The numbers on the tree: Bootstrap values greater than 50%; T: The type strain

在形态学和生理生化鉴定基础上, 结合核糖体18S rDNA和26S rDNA D1/D2区域的序列分析显示, 菌株YS6-2与红酵母属中的胶红酵母(*R. mucilaginosa*)的形态和生理生化特征完全相同, 两者的18S rDNA和26S rDNA D1/D2区域序列的同源性分别高达99.66%和100.00%。Fell等^[15]研究者认为一般酵母菌菌株间26S rDNA D1/D2区域的碱基差异小于1%时, 可以将其归为同一种内。因此, 分子鉴定结果与常规形态学和生理生化鉴定结果相吻合, 我们将YS6-2鉴定为胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)。

3 讨论

利用微生物细胞不对称还原前手性芳香酮的研究已受到广泛的关注, 从自然界中寻找和筛选新的微生物菌株合成手性药物中间体具有重大意义。Nakamura等^[16]在上世纪九十年代从自然环境中筛选出一株能够立体选择性生成(S)-1-苯基乙醇的白地霉, 其转化能力达0.38 mmol/g (转化产物的物质的量/菌体湿重), 产物的e.e.值达85%。杨忠华等^[17]利用面包酵母不对称还原生成(S)-1-苯基乙醇, 优化转化条件后菌株的转化能力为0.33 mmol/g (99% e.e.值)。Ni等^[18]以筛选的红酵母为生物催化剂生成

(S)-1-苯基乙醇, 其优化后的转化能力为0.13 mmol/g (99.5% e.e.值)。据我们所知, 本研究中筛选到的YS6-2菌株为首次发现的具有高效定向生成(S)-1-苯基乙醇的胶红酵母, 转化条件优化后, 其转化能力可达0.41 mmol/g (99.9% e.e.值) (结果另文发表)。因此, 胶红酵母在全细胞催化剂改造药物结构和微生物转化研究方面具有重要价值。

由于酵母菌分类鉴定方法的局限性, 分子生物学方法的鉴定结果与传统方法可能存在一定差异, 因此在进行菌种鉴定时, 有必要采用多种方法相互印证和补充。对可培养微生物, 在形态学和生理生化鉴定的基础上, 对其DNA进行分子生物学鉴定, 可获得更直接和准确的鉴定结果。本实验在多种方法相互验证的基础上, 获得一致的鉴定结果。胶红酵母YS6-2是在特殊环境中定向筛选获得的, 对YS6-2形态、生理生化和分子水平上的研究为其功能基因的克隆和表达奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Food & Drug Administration. FDA's statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality*, 1992, 4: 338-340.

- [2] Srebnik M, Ramachandran PV, Brown HC. A highly enantioselective synthesis of both optical isomers of tomoxetine, fluoxetine and nisoxetine. *Journal of Organic Chemistry*, 1988, **53**(13): 2916–2920.
- [3] 张毅立, 廖建, 陈代谟, 等. 苯乙醇胺类药物的不对称合成. *化学研究与应用*, 1999, **11**(5): 480–483.
- [4] Shimizu S, Kataoka M, Kita K. Chiral alcohol synthesis with yeast carbonyl reductases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998, **5**(1-4): 321–325.
- [5] 张玉彬. 生物催化的手性合成. 北京: 化学工业出版社, 2002, pp.2–6.
- [6] Sih C, Chen C. Microbial asymmetric catalysts. Enantioselective reduction of ketones. *Angewandte Chemie-international Edition*, 1989, **23**: 570–578.
- [7] 刘湘, 方志杰, 许建和. 酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应. *催化学报*, 2006, **27**(1): 20–24.
- [8] Martini AV. Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology, and medicine. *International Microbiology*, 2003, **6**(3): 175–182.
- [9] Deak T, Beuchat LR. Handbook of Food Spoilage Yeasts. USA: CRC Press, 1996, p.199.
- [10] Gutell RR, Fox GE. A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucleic Acids Research*, 1998, **16**: 17–269.
- [11] 巴尼特 JA, 佩恩 RW, 亚罗 D 著. 胡瑞卿译. 酵母菌的特征与鉴定手册. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991, pp.364–367.
- [12] 亚当斯 A, 戈特施林 DE, 凯泽 CA 著. 刘子铎译. 酵母遗传学方法实验指南. 北京: 科学出版社, 2000, pp.84–88.
- [13] Anderson IC, Campbell CD, Prosser JI. Diversity of fungi in organic soils under a moorland-Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(11): 1121–1132.
- [14] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Protocolss PCR: A guide to methods and application*. San Diego: New York Academic Press, 1990, pp.315–322.
- [15] Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 1351–1371.
- [16] Nakamura K, Matsuda T, Ohno A. Asymmetric synthesis of (S)-arylalkanols by microbial reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, **7**(10): 3021–3024.
- [17] 杨忠华, 曾嵘, 颜晓潮, 等. 酵母细胞不对称还原 4-氯苯乙酮合成相应手性醇. *精细化工*, 2007, **24**(1): 63–66.
- [18] Ni Y, Xu JH. Asymmetric reduction of aryl ketones with a new isolate *Rhodotorula* sp. AS2.2241. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **18**(4-6): 233–241.

征订启事**欢迎订阅 2009 年《植物保护》杂志**

《植物保护》创刊于 1963 年, 由中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办, 为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、“中国期刊方阵”双百期刊, 曾荣获中国科协优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖, 北京市全优期刊奖、国家期刊奖提名奖等多个奖项。收录的数据库有英国《CABI 文献数据库》、《Agrindex (FAO)》、美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中文科技期刊数据库》、《生物学文摘》、《万方数据—数字化期刊群》、《中国农业文摘数据库》、《中国科技论文与引文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》。本刊主要刊登有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护学科各领域原始研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。设有专论与综述、研究报告、调查研究、基础知识、实验技术、国外植保、争鸣、应用与交流、病虫新动态、学会动态与信息、新书新产品介绍等栏目。

竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校教师及研究生、各级植保科技工作者等踊跃订阅。欢迎广大作者踊跃投稿! 并欢迎咨询洽谈广告业务!

本刊为双月刊, 大 16 开, 160 页, 铜版纸印刷。每期定价 25.00 元, 全年 150.00 元。邮发代号: 2-483, 全国各地邮局均可订阅。直接在本刊编辑部订阅, 可享受 9 折优惠价, 全年 135 元, 若需挂号, 每期另加 3 元。联系地址: 北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部 邮编: 100193

电话: 010-62819059, 62815914 传真: 010-62815914

E-mail: zwbh1963@263.net 网址: www.plantprotection.ac.cn

联系人: 王音 高洪荣