

## 一种新颖深海微生物羧酸酯酶制备(*R*)-苯乙醇的研究

黄锦龙<sup>1,2</sup>, 张云<sup>1,3</sup>, 孙爱君<sup>1,3</sup>, 胡云峰<sup>1,3,4</sup>

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. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 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;
4. 南海生物资源开发和利用协同创新中心, 广东 广州 510275

**摘要:** 深海微生物酯酶 BSE00077 能够有效地水解拆分消旋乙酸苏合香酯, 制备(*R*)-1-苯乙醇。优化的反应条件为 50mmol·L<sup>-1</sup> 底物, 10%体积分数的正庚烷作为溶剂, 在 pH 7.0 和 30°C 条件下反应 2h。经过优化后, 目标产物(*R*)-1-苯乙醇的对映体过量值超过 99%, 转化率超过 30%。我们发现酯酶 BSE00077 也能够拆分不同酰基链长的 1-苯乙醇酯, 酰基链长会影响 1-苯乙醇的对映体过量值。深海来源的酯酶 BSE00077 作为生物催化剂在工业上制备(*R*)-1-苯乙醇和其他手性化工产品具有很好的应用潜力。

**关键词:** 深海微生物酯酶; (*R*)-1-苯乙醇; 水解反应; 动力学拆分

中图分类号: P735.4 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2017)03-0055-06

## Enantioselective production of (*R*)-1-phenylethanol by a novel marine microbial carboxylesterase

HUANG Jinlong<sup>1,2</sup>, ZHANG Yun<sup>1,3</sup>, SUN Aijun<sup>1,3</sup>, HU Yunfeng<sup>1,3,4</sup>

1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China;
4. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou, Guangdong 510275, China

**Abstract:** Deep-sea microbial esterase BSE00077 can efficiently resolve ( $\pm$ )-1-phenylethyl acetate and generate (*R*)-1-phenylethanol. The optimal working conditions for the enzymatic resolution of ( $\pm$ )-1-phenylethyl acetate by marine microbial esterase BSE00077 were found to be: 50mmol/L ( $\pm$ )-1-phenylethyl acetate, 10% n-heptane (v/v), pH 7.0, 30°C for 2h. After process optimization, desired optically pure product (*R*)-1-phenylethanol was obtained with an enantiomeric excess of over 99% and a conversion of over 30%. Esterase BSE00077 can also enzymatically resolve some other racemic 1-phenylethyl esters with different chain lengths. We found that the chain lengths could greatly affect the enantiomeric excess of desired product. Esterase BSE00077 is a novel marine microbial esterase with great potential in the asymmetric synthesis of (*R*)-1-phenylethanol as well as of other chiral chemicals in industry.

收稿日期: 2016-08-31; 修订日期: 2016-09-22。殷波编辑

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404); 广州市科技计划项目(201510010012); 国家自然科学基金青年科学基金项目(21302199)

作者简介: 黄锦龙(1986—), 男, 广西壮族自治区东兴市人, 博士研究生, 研究方向为生物催化与酶工程。E-mail: jl\_huang@163.com

通信作者: 胡云峰。E-mail: yunfeng.hu@scsio.ac.cn

**Received date:** 2016-08-31; **Revised date:** 2016-09-22. Editor: YIN Bo

**Foundation items:** Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA11030404); Guangzhou Science and Technology Plan Projects (201510010012); National Natural Science Foundation of China (21302199)

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

**Key words:** deep-sea microbial esterase; (*R*)-1-phenylethanol; hydrolysis; kinetic resolution

羧酸酯酶(E.C.3.1.1.1)是一类水解酯,产生羧酸和醇的水解酶类,其被广泛用于化合物的拆分与制备有价值的手性分子(Cambou et al, 1984; Tang et al, 2011)。羧酸酯酶通过一系列的生物转化作用,如水解、酯化和转酯化反应,来生产高光学纯的手性试剂(Fernández-Álvarez et al, 2010; Bornscheuer, 2014; Fillat et al, 2015)。由于羧酸酯酶在手性化合物的拆分过程中并不需要昂贵的辅酶,因此作为生物催化剂在工业生产中具有非常高的应用潜力,吸引大量科学研究人员开发它的应用价值。

手性 1-苯乙醇及其衍生物的制备在工业生产中非常重要,因为光学纯的单体分子是合成许多药物和化学制品的关键中间体。例如,光学纯的(*R*)-1-苯乙醇是合成抗肿瘤药物噻吩并嘧啶酮衍生物和芬地林衍生物的手性砌块(Weber et al, 2014)。传统化学合成 1-苯乙醇是以金属配合物为催化剂不对称合成,然而化学催化法费时,试剂昂贵,并且在有机相中需要严格控制反应条件,由此导致一系列污染物产生(Giri et al, 2001)。与化学催化法相比,生物酶法具有特异性强、反应条件温和、对环境友好等优点。

之前有研究报道用甜菜根表皮水解拆分乙酸苏合香酯, (*R*)-1-苯乙醇的对映体过量值达到 83%。Fan 等(2011)用 *Candida antarctica* 脂肪酶 B 水解消旋的乙酸苏合香酯,制备光学纯的(*S*)-1-苯乙醇。尽管可以利用氧化还原酶催化还原反应的方法制备手性 1-苯乙醇,但是氧化还原酶需要昂贵的辅酶,如 NADH 或 NADPH (Thörn et al, 2011)。直接水解消旋酯的方式是目前比较认可的简便快速制备手性醇的方法,工业生产过程中切实可行。

在前期的工作中,本单位从南中国海海底沉积物中筛选出一株枯草芽孢杆菌 *Bacillus* sp. SCSIO 15029。本实验室并完成了该菌的全基因组测序工作,从其基因组中扩增出一个酯酶基因(*bse00077*),并在大肠杆菌中实现了酯酶 BSE00077 蛋白的可溶性异源表达。本研究用纯化的酯酶 BSE00077 水解乙酸苏合香酯,制备(*R*)-1-苯乙醇(图 1),最优反应条件下,转化率可大于 30%,产物(*R*)-1-苯乙醇纯度可大于 99%。实验探讨反应温度、反应 pH、有机溶剂、底物浓度、反应时间和不同酰基链长的底物对酯酶拆分的影响。

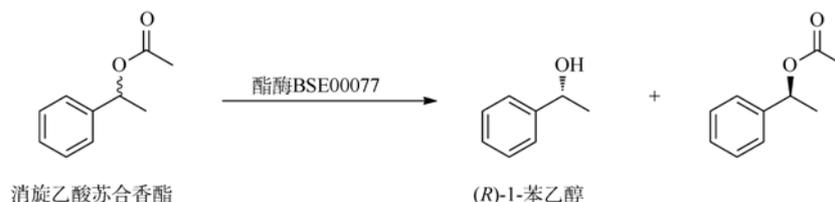


图 1 酯酶 BSE00077 拆分乙酸苏合香酯

Fig. 1 Enzymatic kinetic resolution of ( $\pm$ )-1-phenylethyl acetate by esterase BSE00077

## 1 材料方法

### 1.1 实验材料

酯酶重组菌已由本实验室构建,并完成酯酶的表达纯化,酶浓度为  $1.25\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,特异性酶活为  $217\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。消旋乙酸苏合香酯(98%),丙酸苏合香酯( $\geq 98\%$ ),丁酸苏合香酯( $\geq 98\%$ )和(*R*)-1-苯乙醇( $\geq 99\%$ )均购于阿拉丁有限公司(上海,中国),其他试剂均为分析纯,购于广州东巨有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 温度和 pH 对酯酶拆分的影响

本研究采用单因素试验,优化拆分条件。在  $0.5\text{mL}$  的反应体系中加入  $0.4\text{mL}$   $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸钠缓冲液(pH 8.0),  $0.1\text{mL}$  纯酶液,终浓度为  $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸苏合香酯。设定反应的温度范围为  $25\sim 45^\circ\text{C}$ ,置于转速为  $200\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的摇床中振荡反应 6h。所有试

验均重复 3 次,取平均值。

反应 pH 的优化。在  $0.5\text{mL}$  的反应体系中加入  $0.4\text{mL}$   $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸钠缓冲液(pH 6.0~9.0),  $0.1\text{mL}$  纯酶液,终浓度为  $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸苏合香酯。置于最适温度( $30^\circ\text{C}$ )和转速为  $200\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的摇床中振荡反应 6h。

#### 1.2.2 有机溶剂对酯酶拆分的影响

在  $0.5\text{mL}$  的反应体系中加入  $0.35\text{mL}$   $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸钠缓冲液(pH 7.0),  $0.1\text{mL}$  纯酶液,终浓度为  $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸苏合香酯,以及 10% (体积分数)有机溶剂(正己烷,正庚烷,正辛烷,甲苯,二甲苯,甲醇和二甲基亚砜)。反应混合液置于最适温度( $30^\circ\text{C}$ )和转速为  $200\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的摇床中振荡反应 6h。

#### 1.2.3 底物浓度对酯酶拆分的影响

在  $0.5\text{mL}$  的反应体系中加入  $0.35\text{mL}$   $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

磷酸钠缓冲液(pH 7.0), 0.1mL 纯酶液, 不同浓度的乙酸苏合香酯(10、20、50、80、100mmol·L<sup>-1</sup>), 以及 10%正庚烷作为溶剂。反应混合液置于最适温度(30℃)和转速为 200r·min<sup>-1</sup>的摇床中振荡反应 6h。

#### 1.2.4 反应时间的优化

在反应瓶中加入 3.5mL 50mmol·L<sup>-1</sup>磷酸钠缓冲液(pH 7.0), 1mL 纯酶液, 终浓度为 50mmol·L<sup>-1</sup>乙酸苏合香酯, 以及 10% (体积分数)正庚烷。反应混合液置于最适温度(30℃)和转速为 200r·min<sup>-1</sup>的摇床中振荡反应, 在一定时间内取出 0.5mL 反应液用于气相色谱分析。

#### 1.2.5 不同酰基链长的底物拆分

在 0.5mL 的反应体系中加入 0.35mL 50mmol·L<sup>-1</sup>磷酸钠缓冲液(pH 7.0), 0.1mL 纯酶液, 终浓度为 50mmol·L<sup>-1</sup>乙酸苏合香酯、丙酸苏合香酯或丁酸苏合香酯, 以及 10% (体积分数)正庚烷。反应混合液置于最适温度(30℃)和转速为 200r·min<sup>-1</sup>的摇床中振荡反应 0.5h, 比较不同底物的拆分速率。

#### 1.2.6 气相色谱分析

以上所有拆分反应均用等体积的乙酸乙酯终止反应, 振荡混匀 5min, 并萃取 3 次, 将有机相合并后加入终浓度为 22mmol·L<sup>-1</sup>的十二烷作为内标, 再加入适量的无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 即可用于气相分析。

有机相中的底物和产物分析用 FULI 9790 气相色谱仪, 手性毛细管柱为 112-6632 CYCLOSIL-B

(长 30m×内径 0.25mm, 膜厚 0.25μm, 安捷伦公司), 载气为氮气, 流速为 1.2mL·min<sup>-1</sup>。色谱柱的升温程序为 80℃保持 1min, 以 15℃·min<sup>-1</sup>的速度升温至 120℃, 保持 1min, 再以 10℃·min<sup>-1</sup>的速度升温至 200℃。进样器和检测器的温度分别设置为 220℃和 250℃。产物(R)-1-苯乙醇的对映体过量值(ee<sub>p</sub>)、底物的转化率(c)和对映体比值(E)根据以下公式进行计算(Chen et al, 1982)。

$$ee_p = (S_R - S_S) / (S_R + S_S) \quad (1)$$

$$c = (\omega_{R,0} + \omega_{S,0} - \omega_R - \omega_S) / (\omega_{R,0} + \omega_{S,0}) \quad (2)$$

$$E = \ln[1 - c(1 + ee_p)] / \ln[1 - c(1 - ee_p)] \quad (3)$$

式中: S<sub>R</sub> 和 S<sub>S</sub> 分别代表(R)-1-苯乙醇和(S)-1-苯乙醇的峰面积(单位: μV·s); ω<sub>R,0</sub> 和 ω<sub>S,0</sub> 分别代表反应前对应构型的底物浓度(单位: mmol·L<sup>-1</sup>); ω<sub>R</sub> 和 ω<sub>S</sub> 分别代表反应后对应构型的底物浓度(单位: mmol·L<sup>-1</sup>)。

## 2 结果

### 2.1 温度和 pH 对酯酶 BSE00077 拆分的影响

温度和 pH 是影响酶拆分的两个重要因素。由表 1 可看出, 当温度超过 30℃时, 产物对映体过量值逐渐下降。尽管在 25℃和 30℃时, 产物对映体过量值相差不大, 但在 30℃时底物的转化率比 20℃的高。因此, 以 30℃作为优化的反应温度。

表 1 温度和 pH 对酯酶 BSE00077 拆分的影响

Tab. 1 Effects of temperature and pH on kinetic resolution by esterase BSE00077

温度/℃	产物对映体过量值/%	底物转化率/%	pH	产物对映体过量值/%	底物转化率/%
25	96.17 ± 0.47	37.12 ± 1.32	6	99.50 ± 0	9.20 ± 1.72
30	96.21 ± 0.88	42.51 ± 1.45	7	93.27 ± 1.08	41.64 ± 2.44
35	95.53 ± 0.35	44.54 ± 1.74	8	91.94 ± 0.64	45.32 ± 1.69
40	95.25 ± 0.95	37.28 ± 0.77	9	91.23 ± 0.52	47.10 ± 3.07
45	85.30 ± 0.81	9.96 ± 1.31			

与温度的影响不同, 随着 pH 的升高, 产物对映体过量值也呈逐渐下降的趋势, 而底物转化率却升高(表 1)。由于在 pH 6.0 时底物转化率较低, 仅为 9.2%, 因此以 pH 7.0 作为优化的反应 pH。

### 2.2 有机溶剂对酯酶 BSE00077 拆分的影响

本研究以极性和非极性溶剂作为反应添加剂, 考察溶剂对酯酶的拆分选择性。由表 2 可看出, 除了添加甲苯的反应, 产物对映体过量值明显高于对照外, 添加其他溶剂的反应, 产物对映体过量值与对照均无太大差异。而正己烷、正庚烷和正辛烷均

有助于提高底物转化率。因此, 以 10%正庚烷作用溶剂用于后续的实验优化。

### 2.3 底物浓度对酯酶 BSE00077 拆分的影响

底物浓度是影响酶催化进程的另一重要因素, 过高的浓度反过来会抑制酶的反应。为了优化最佳的底物浓度, 分别设置不同的浓度梯度。由图 2 可看出, 伴随底物浓度升高, 产物对映体过量值由 90%缓慢增加到 94%, 而底物转化率却呈现下降趋势。当底物浓度超过 50mmol·L<sup>-1</sup>时, 转化率出现急剧下降。

表 2 有机溶剂对酯酶 BSE00077 拆分的影响

Tab. 2 Effects of organic solvents on kinetic resolution by esterase BSE00077

有机溶剂	lg P*	产物对映体过量值/%	底物转化率/%	对映体比值 E
对照		94.35 ± 1.05	27.90 ± 0.79	49.38 ± 4.27
二甲基亚砜	-1.35	93.75 ± 0.67	31.76 ± 1.44	47.97 ± 4.38
甲醇	-0.72	93.63 ± 0.45	7.33 ± 1.38	32.80 ± 1.95
甲苯	2.68	>99.00	5.04 ± 0.69	209.65 ± 1.56
二甲苯	3.14	94.14 ± 0.88	14.37 ± 1.05	39.24 ± 3.68
正己烷	3.94	94.49 ± 0.95	31.73 ± 3.41	55.36 ± 6.25
正庚烷	4.47	94.81 ± 0.68	31.72 ± 2.44	58.53 ± 5.12
正辛烷	5.01	94.23 ± 0.79	32.03 ± 1.75	52.77 ± 5.76

注: \*: 有机化合物脂水分分配系数, 数值参考自 www.chemspider.com

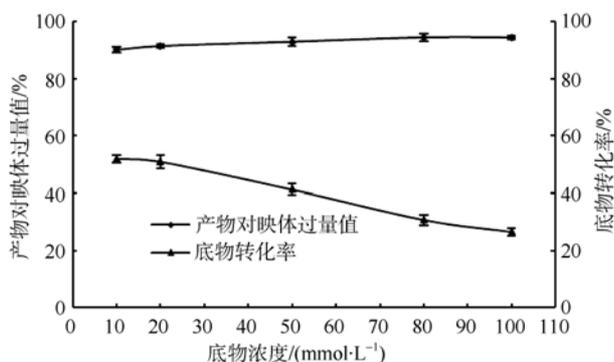


图 2 底物浓度对酯酶 BSE00077 拆分的影响

Fig. 2 Effects of substrate concentration on kinetic resolution

#### 2.4 拆分反应时间的优化

经过以上条件优化之后, 接着进行反应时间的优化, 以确保产物对映体过量值  $\geq 99\%$  时的最佳反应时间。从表 3 可看出, 产物对映体过量值随着反应时间的延长而出现下降的趋势, 在 6h 之后保持平衡(94%)。而底物转化率先升高后保持平衡(43%)。反应 2h 时, 产物对映体过量值  $\geq 99\%$ , 转化率约为 30%。

表 3 酯酶 BSE00077 拆分(R, S)-1-苯乙醇的反应时间进程

Tab. 3 Time proceeding of kinetic resolution of (R, S)-1-phenylethanol catalyzed by esterase BSE00077

时间/h	产物对映体过量值/%	底物转化率/%
0.5	99.19 ± 0.14	23.79 ± 1.03
1	99.12 ± 0.12	25.68 ± 0.92
2	99.03 ± 0.09	30.71 ± 0.67
3	98.14 ± 0.48	36.22 ± 2.31
4	97.00 ± 0.47	40.60 ± 1.94
5	96.45 ± 1.01	42.33 ± 2.04
6	94.48 ± 0.89	43.57 ± 1.87
7	94.53 ± 0.36	43.53 ± 1.44
8	94.43 ± 0.42	43.61 ± 1.37

#### 2.5 酯酶 BSE00077 拆分不同酰基链长的底物

酯酶 BSE00077 对不同酰基链长的 1-苯乙醇酯都有拆分能力, 对乙酸苏合香酯和丙酸苏合香酯的水解速率几乎一样, 而对丁酸苏合香酯的水解速率最低(表 4)。以短链的乙酸苏合香酯为底物时, 产物对映体过量值  $\geq 99\%$ , 比另外 2 个值都高。由此说明酯酶 BSE00077 对短链的乙酸苏合香酯偏好性高于丙酸苏合香酯和丁酸苏合香酯。

表 4 酯酶 BSE00077 拆分不同酰基链长的 1-苯乙醇酯

Tab. 4 Enzymatic kinetic resolution of 1-phenylethyl esters with different chain lengths by esterase BSE00077

底物	反应时间/h	起始反应速率/(mmol·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	产物对映体过量值/%	底物转化率/%
乙酸苏合香酯	0.5	23.79	99.19 ± 0.14	23.79 ± 1.03
丙酸苏合香酯	0.5	23.84	90.22 ± 0.51	23.84 ± 1.55
丁酸苏合香酯	0.5	10.40	91.67 ± 0.73	10.40 ± 0.28

### 3 讨论

酯酶由于具有工业应用的价值, 如在洗涤业、医疗诊断和生物转化等方面都应用广泛, 因而备受关注(Panda et al, 2005; Salameh et al, 2007)。用于工业的酯酶多数来源于微生物, 如真菌和细菌。本研究从一株南海深海枯草芽孢杆菌 *Bacillus* sp. SCSIO 15029 中克隆到一个羧酸酯酶基因, 并实现在大肠杆菌中异源表达, 该酯酶能够水解 1-苯乙醇酯, 制备高光学纯的(R)-苯乙醇。

通过优化拆分条件发现, 温度和 pH 都影响酯酶 BSE00077 的拆分。通常, 适当的升高温度有利于提高酶活, 加快酶促反应(Chang et al, 2010)。酯酶 BSE00077 在 35°C 条件下的转化率最高。然而, 在较高温度下, 酯酶 BSE00077 对异构体的识别却下降, 这可能与酶在较高温度下结构发生轻微的变化有关, 类似的现象也得到了其他研究的实证。Zheng 等(2015)研究发现来源于 *B. amyloliquefaciens* WZZ002

的酯酶在高于 45℃ 时, 对 Boc-L-丙氨酸甲酯的选择性逐渐下降。pH 的变化会改变酶活性中心附近的构象, 反过来会影响酶的活性和选择性(Tian et al, 2011)。酯酶在 pH 8.0 和 9.0 活性较高, 但在这个 pH 范围内的产物对映体过量值不太理想。而在 pH 6.0 下, 活性却受到抑制, 转化率较低。

研究表明, 有机溶剂可增加底物的可溶性, 改变酶促反应平衡, 提高酶的选择性(Kitaguchi et al, 1989; Smith et al, 2012)。除了二甲基亚砜、甲醇、甲苯和二甲苯对酶促反应有抑制外, 其他有机溶剂均促进反应, 可能这些有机溶剂直接影响酶的构象, 改变酶反应活性通道, 利于底物与酶的结合。因此, 两相体系成为许多研究酶催化拆分手性分子所考虑的反应体系。以重组全细胞作为催化剂, 在混合正庚烷与水(2:8)的两相体系中, 更容易获得高产率和高对映体过量值的(S)-2,3-二氢-1-丙醇(Zou et al, 2014)。Zheng 等(2014)发现 50%体积分数的二甲基亚砜对全细胞催化拆分 3-氰基-5-甲基己酸乙酯的促进作用最强, 立体选择性 *E* 由 30 增加到 80。也有研究者提出, 具有较高脂水分配系数( $\lg P \geq 4$ )的有机溶剂可改善酶促反应(Laane et al, 1987)。正己烷、正庚烷和正辛烷的  $\lg P \geq 3.94$ , 在本研究中对酶促反应有轻微的促进作用, 与 Laane 等(1987)的研究基本相符。

酶的立体选择性与底物的在活性口袋中的空间结构密切相关。通常认为手性分子中的立体中心在  $\alpha$  或  $\beta$  位上, 与功能基团相近, 有利于进行酶的生物转化(Blasco et al, 2014)。1-苯乙醇作为立体中心部分, 脂肪酸链作为功能基团, 这些底物的立体中心部分与功能基团间的碳键数一样, 但随着脂肪酸链

的延长, 酯酶的立体选择性下降。这可能是因为酯酶 BSE00077 的活性口袋较小, 增延长脂肪酸链增加了底物的空间位阻效应, 从而影响与酶有效结合。这与 Nojiri 等(2014)研究酰胺酶拆分 3-吡啶甲酰胺及其衍生物的结果一致。

目前, 生物酶法制备 1-苯乙醇的研究主要通过水解和转酯化反应, 催化剂均来源于商业化的脂肪酶, 制备(S)-苯乙醇(表 5)。本研究开发了一种来源于深海枯草芽孢杆菌酯酶 BSE00077, 能够制备(R)-苯乙醇, 对映体过量值达到 99%。

表 5 比较不同来源的酯酶和脂肪酶拆分 1-苯乙醇

Tab. 5 Comparison of resolution of 1-phenylethanol by different esterase/lipases

酶(来源)	反应方式	R/S-苯乙醇	对映体过量值/%	参考文献
脂肪酶 Novozym 435(商业酶)	转酯化	S	87.5	(严祥辉 等, 2009)
<i>C. antarctica</i> 脂肪酶(商业酶)	水解	S	99.5	(Fan et al, 2011)
<i>C. lipolytica</i> 脂肪酶(商业酶)	转酯化	S	99.5	(范卫东 等, 2012)
酯酶 BSE00077 (本研究)	水解	R	99.0	

## 4 结论

本研究从我国南海深海微生物中克隆并异源表达了酯酶 BSE00077, 作为高效生物催化剂通过水解拆分反应制备了(R)-苯乙醇。通过对酯酶 BSE00077 拆分 1-苯乙醇反应条件的优化, 发现该酯酶在 pH 7.0 和 30℃ 条件下拆分 2h 时, 制备的(R)-苯乙醇对映体过量值达到 99%, 转化率超过 30%。同时比较了酯酶对不同侧链长度的 1-苯乙醇酯的水解偏好性, 发现侧链长度对水解拆分有较大的影响。

## 参考文献 References

- 范卫东, 范永仙, 陈小龙, 2012. 用 *Candida lipolytica* 脂肪酶手性转酯拆分农药中间体 rac-1-苯乙醇[J]. 浙江农业科学, (12): 1689–1692.
- 严祥辉, 薛屏, 2009. 用壳聚糖修饰的 MCM-48 固定化脂肪酶拆分(R, S)-1-苯乙醇[J]. 宁夏大学学报(自然科学版), 30(1): 50–54. YAN XIANHUI, XUE PING, 2009. Chiral resolution of (R, S)-1-phenylethanol catalyzed by lipase immobilized on MCM-48 coated chitosan[J]. Journal of Ningxia University (Natural Science Edition), 30(1): 50–54 (in Chinses).
- BLASCO M A, GRÖGER H, 2014. Enzymatic resolution of racemates with a 'remote' stereogenic center as an efficient tool in drug, flavor and vitamin synthesis[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 22(20): 5539–5546.
- BORNSCHEUER U T, 2014. Enzymes in lipid modification: past achievements and current trends[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 116(10): 1322–1331.
- CAMBOU B, KLIBANOV A M, 1984. Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalyzed stereospecific transesterification in organic media[J]. Journal of the American Chemical Society, 106(9): 2687–2692.
- CHANG LEI, OUYANG LIMING, XU YI, et al, 2010. Highly enantioselective hydrolysis of phenyl-1,2-ethanediol cyclic carbonates by newly isolated *Bacillus* sp. ECU0015[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 66(1/2): 95–100.
- CHEN C S, FUJIMOTO Y, GIRDAUKAS G, et al, 1982. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers[J]. Journal of the American Chemical Society, 104(25): 7294–7299.

- FAN YONGXIAN, XIE ZHANGMING, ZHANG HUAWEI, et al, 2011. Kinetic resolution of both 1-phenylethanol enantiomers produced by hydrolysis of 1-phenylethyl acetate with *Candida antarctica* lipase B in different solvent systems[J]. *Kinetics and Catalysis*, 52(5): 686–690.
- FERNÁNDEZ-ÁLVARO E, KOURIST R, WINTER J, et al, 2010. Enantioselective kinetic resolution of phenylalkyl carboxylic acids using metagenome-derived esterases[J]. *Microbial Biotechnology*, 3(1): 59–64.
- FILLAT A, ROMEA P, PASTOR F I J, et al, 2015. Kinetic resolution of esters from secondary and tertiary benzylic propargylic alcohols by an improved esterase-variant from *Bacillus* sp. BP-7[J]. *Catalysis Today*, 255: 16–20.
- GIRI A, DHINGRA V, GIRI C C, et al, 2001. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects[J]. *Biotechnology Advances*, 19(3): 175–199.
- KITAGUCHI H, FITZPATRICK P A, HUBER J E, et al, 1989. Enzymic resolution of racemic amines: crucial role of the solvent[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 111(8): 3094–3095.
- LAANE C, BOEREN S, VOS K, et al, 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents[J]. *Biotechnology Bioengineering*, 30(1): 81–87.
- NOJIRI M, TAOKA N, YASOHARA Y, 2014. Characterization of an enantioselective amidase from *Cupriavidus* sp. KNK-J915 (FERM BP-10739) useful for enzymatic resolution of racemic 3-piperidinecarboxamide[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 109: 136–142.
- PANDA T, GOWRISHANKAR B S, 2005. Production and applications of esterases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2): 160–169.
- SALAMEH M, WIEGEL J, 2007. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 61: 253–283.
- SMITH M E, BANERJEE S, SHI YONGLIANG, et al, 2012. Investigation of the cosolvent effect on six isoenzymes of PLE in the enantioselective hydrolysis of selected  $\alpha,\alpha$ -disubstituted malonate esters[J]. *Chemcatcher*, 4(4): 472–475.
- TANG XIAOLING, LIU JI, WANG BO, et al, 2011. Cloning, screening and characterization of enantioselective ester hydrolases from *Escherichia coli* K-12[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27(1): 129–136.
- THÖRN C, GUSTAFSSON H, OLSSON L, 2011. Immobilization of feruloyl esterases in mesoporous materials leads to improved transesterification yield[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(1/2): 57–64.
- TIAN XIN, ZHENG GAOWEI, LI CHUNXIU, et al, 2011. Enantioselective production of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol from dicarboxyesters by recombinant *Bacillus subtilis* esterase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73(1/2/3/4): 80–84.
- WEBER N, GORWA-GRAUSLUND M, CARLQUIST M, 2014. Engineered baker's yeast as whole-cell biocatalyst for one-pot stereo-selective conversion of amines to alcohols[J]. *Microbial Cell Factories*, 13(1): 118–127.
- ZHENG JIANYONG, WANG YUQIANG, LUO WEIFENG, et al, 2015. Biocatalytic resolution of Boc-DL-alanine methyl ester by a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* WZZ002[J]. *Catalysis Communications*, 60: 134–137.
- ZHENG RENCHAO, ZHENG YUGUO, LI AIPENG, et al, 2014. Enantioselective synthesis of (S)-3-cyano-5-methylhexanoic acid by a high DMSO concentration tolerable *Arthrobacter* sp. ZJB-09277[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 83: 97–103.
- ZOU SHUPING, ZHENG YUGAO, DU ERHONG, et al, 2014. Enhancement of (S)-2,3-dichloro-1-propanol production by recombinant whole-cell biocatalyst in *n*-heptane–aqueous biphasic system[J]. *Journal of Biotechnology*, 188: 42–47.