



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103289922 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201310188883. 9

(22) 申请日 2013. 05. 17

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :M 2013099 2013. 03. 22

(73) 专利权人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市下城区潮王路
18 号

(72) 发明人 应向贤 汪钊 熊斌

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

代理人 黄美娟 冷红梅

(56) 对比文件

EP 1106700 A2, 2001. 06. 13,

CA 2715569 A1, 2009. 08. 27,

CN 101528937 A, 2009. 09. 09,

何湘琼等. 不饱和烯酸酰基硫脲化合物的合成与抑菌活性测定. 《有机化学》. 2004, (第 10 期),

刘玉升等. 中华真地鳖若虫肠道细菌的研究. 《中国微生态学杂志》. 2007, (第 02 期),

审查员 李美宣

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12P 7/22(2006. 01)

C12P 7/04(2006. 01)

C12R 1/01(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

约克氏菌及其在制备 α , β - 不饱和烯醇和芳香醇中的应用

(57) 摘要

本发明提供了一株新菌株——约克氏菌 (Yokenella sp.) WZY002, 及其在区域选择性还原 α , β - 不饱和烯醛(酮) 制备 α , β - 不饱和烯醇和还原芳香醛(酮) 制备芳香醇中的应用。该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 430072, 保藏编号: CCTCC No: M2013099, 保藏日期: 2013 年 3 月 22 日。本发明的有益效果主要体现在: 提供了一株具有高区域选择性、高立体选择性及高酶活力的新菌株, 该菌株催化 α , β - 不饱和烯醛(酮) 的区域选择性还原可得到多种 α , β - 不饱和烯醇, 同时该菌株也能催化芳香醛(酮) 的还原得到芳香醇。本发明菌株作为生物催化剂, 区域选择性和立体选择性高, 催化活性强, 所催化的反应不需要添加辅酶, 反应条件温和, 在工业化生产上具有较高的应用价值。

CN 103289922 B

1. 一种约克氏菌 WZY002 在区域选择性还原 α , β - 不饱和烯醛或 α , β - 不饱和烯酮制备 α , β - 不饱和烯醇中的应用, 所述的约克氏菌 (*Yokenella* sp.) WZY002, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 430072, 保藏编号: CCTCC No: M 2013099, 保藏日期: 2013 年 3 月 22 日。

2. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于所述的 α , β - 不饱和烯醛或 α , β - 不饱和烯酮为下列之一: 2- 丁烯醛、2- 己烯醛、2- 甲基-2- 戊烯醛、2- 辛烯醛、2- 癸烯醛、柠檬醛、肉桂醛、异丙叉丙酮、紫罗兰酮、3- 辛烯-2- 酮和 4- 甲氧基-3- 丁烯-2- 酮。

3. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于所述应用方法如下: 以 α , β - 不饱和烯醛或 α , β - 不饱和烯酮为底物, 以约克氏菌 WZY002 湿菌体为生物催化剂, 在 pH6 ~ 9 的缓冲液中, 底物浓度为 5 ~ 200mM, 于 4 ~ 60°C 及摇床转速 0 ~ 200rpm 下反应 2 ~ 72 小时, 反应结束后经乙酸乙酯萃取, 离心得到有机相为反应产物。

4. 如权利要求 3 所述的应用, 其具体特征在于所述约克氏菌 WZY002 湿菌体按如下方法制备: 发酵培养基组成: 蛋白胨 10g/L、酵母浸膏 5g/L、NaCl 5g/L, 溶剂为水, pH7.0 ~ 7.2, 将约克氏菌 WZY002 接种于发酵培养基中, 于 30°C、摇床转速 200rpm 的条件下培养 12 ~ 48 小时, 所得发酵液在 10000rpm 离心 10min, 弃上清液, 菌体用 pH6 ~ 9 的缓冲液洗涤一次, 所得湿菌体即为生物催化剂。

5. 一种约克氏菌 WZY002 在不对称还原芳香酮制备手性芳香醇中的应用, 所述的约克氏菌 WZY002, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 430072, 保藏编号: CCTCC No: M 2013099, 保藏日期: 2013 年 3 月 22 日。

6. 如权利要求 5 所述的应用, 其特征在于所述的芳香酮为下列之一: 苯乙酮、2- 溴代苯乙酮、4- 溴苯乙酮、2- 羟基苯乙酮、苄叉丙酮。

7. 如权利要求 5 所述的应用, 其特征在于所述应用方法如下: 以芳香酮为底物, 以约克氏菌 WZY002 湿菌体为生物催化剂, 在 pH6 ~ 9 的缓冲液中, 底物浓度为 5 ~ 200mM, 于 4 ~ 60°C 及摇床转速 0 ~ 200rpm 下反应 2 ~ 72 小时, 反应结束后经乙酸乙酯萃取, 离心得到有机相为反应产物。

8. 一种约克氏菌 WZY002 在还原芳香醛制备芳香醇中的应用, 所述的约克氏菌 WZY002, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 430072, 保藏编号: CCTCC No: M 2013099, 保藏日期: 2013 年 3 月 22 日。

9. 如权利要求 8 所述的应用, 其特征在于所述的芳香醛为苯甲醛或香草醛。

10. 如权利要求 8 所述的应用, 其特征在于所述应用方法如下: 以芳香醛为底物, 以约克氏菌 WZY002 湿菌体为生物催化剂, 在 pH6 ~ 9 的缓冲液中, 底物浓度为 5 ~ 200mM, 于 4 ~ 60°C 及摇床转速 0 ~ 200rpm 下反应 2 ~ 72 小时, 反应结束后经乙酸乙酯萃取, 离心得到有机相为反应产物。

约克氏菌及其在制备 α , β -不饱和烯醇和芳香醇中的应用

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一株新菌株——约克氏菌(*Yokenella* sp.) WZY002, 及其在区域选择性还原 α , β -不饱和烯醛或 α , β -不饱和烯酮制备 α , β -不饱和烯醇中的应用, 不对称还原芳香酮制备手性芳香醇, 以及还原芳香醛制备芳香醇中的应用。

(二) 背景技术

[0002] α , β -不饱和烯醇是非常重要的有机合成(含药物合成)中间体, 如肉桂醇、柠檬醇、巴豆醇等在香料、药物以及其它精细化学品生产中有广泛的应用, 常被用作食品香味添加剂、香气调和剂以及医药中间体等, 具有较高经济价值。

[0003] α , β -不饱和烯醛(酮)的选择性加氢是合成香料、医药中间体等的关键步骤。由于在热力学上 C=C 键比 C=O 键的活化能低、在动力学上 C=C 键比 C=O 键更活泼, 而在一般化学催化剂作用下, α , β -不饱和烯醛(酮)的主要产物多为饱和醛(酮), 更有价值的产物 α , β -不饱和烯醇的得率较低。与化学催化剂不同的是, 生物催化剂具有更为优异的区域选择性, 能只对 α , β -不饱和烯醛(酮)的 C=O 键选择性加氢而得到相应的 α , β -不饱和烯醇。生物催化剂的反应条件温和、立体选择性高、环境友好、易于分离回收及生产成本低等优点也弥补了化学催化剂的不足。目前, 生物催化法制备 α , β -不饱和烯醇主要是通过选择性还原 α , β -不饱和烯醛(酮)来实现。但是目前尚未见利用约克氏菌微生物催化制备 α , β -不饱和烯醇的报道。

(三) 发明内容

[0004] 本发明提供了一株具有高区域选择性、高立体选择性和高活力的菌株——约克氏菌 WZY002 及其在 α , β -不饱和烯醇和芳香醇生物法制备中的应用。该菌株可还原 α , β -不饱和烯醛(酮)得到 α , β -不饱和烯醇, 也可通过不对称还原芳香酮得到手性芳香醇, 还可还原芳香醛得到芳香醇。反应专一性强, 选择性好, 活力高, 并且反应不需外加辅酶。

[0005] 本发明采用的技术方案是:

[0006] 约克氏菌(*Yokenella* sp.) WZY002, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 430072, 保藏编号: CCTCC No: M2013099, 保藏日期: 2013年3月22日。

[0007] 本发明的约克氏菌 WZY002 的 16S rDNA 序列如下:

[0008] ACATGCAAGTCAACGGTAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGTGG CGGACGGGTGAGTAA
TGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTG GAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAA
AGAGGGGGACCTTCG GGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACG GCTCAC
CTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGG AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGT TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATACGGTTAATAACCGTGTGCGATT GACGTTACCCGCAGAAGA

AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GCGCACGCAGGC GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCGA AACTGGCA
GGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTG AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGT
GGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAA AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC TTCCGGAGCTAACGCGTTAAGT
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAAAT TCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCACGGAATTTAGCAGA GATGCTTTAGT
GCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG CTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTATCCTTT GTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACAC GTGCTACAATGGCATATACAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCT CATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCC
GTGAAGTCG GAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT GTACACACCGCC
CGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTT AACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTC
ATGA

[0009] 本发明菌株筛选过程如下：

[0010] 样品采集：筛选所用的土样分别从山东、湖北、内蒙古等地采集。约克氏菌 WZY002 筛选自中国湖北省荆州市监利县的菜园土壤。

[0011] 平板初筛：称取 0.5g 土样加入 1mL 的无菌水，摇匀，静置，上清液用无菌水稀释 1000 倍，然后取其 100 μ L 涂布固体平板，放置 3 ~ 5 分钟，吸取 100 μ L 2-丁烯醇（巴豆醇）再次涂布上述平板，30 $^{\circ}$ C 倒置过夜培养。挑取长出的单菌落转接于固体试管斜面，30 $^{\circ}$ C 过夜培养。固体培养基的组分：蛋白胨 1%，酵母浸膏 0.5%，NaCl 0.5%，琼脂 2%，pH7.0 ~ 7.2，121 $^{\circ}$ C 灭菌 20min。本发明的培养基组成均以质量体积百分比（W/V）表示，如某组分浓度 1% 表示 100mL 培养基中含有 1g 该组分。

[0012] 将斜面菌株接种到发酵培养基，其组分如下：蛋白胨 1%，酵母浸膏 0.5%，NaCl 0.5%，pH7.0 ~ 7.2，121 $^{\circ}$ C 灭菌 20min。30 $^{\circ}$ C 摇床转速 200rpm 培养 24 ~ 48 小时，离心后得到菌体悬浮于缓冲液体系中。

[0013] 按照上述方法得到的湿菌体，悬浮在缓冲液体系中，加入 α ， β -不饱和醛（酮）或者芳香醛（酮）进行反应，反应 1 ~ 72 小时后，用手性气相色谱或者气相质谱联用分析底物和其转化产物。

[0014] 本发明还涉及所述的约克氏菌 WZY002 在区域选择性还原的 α ， β -不饱和烯醛（酮）制备 α ， β -不饱和烯醇中的应用。

[0015] 优选的，所述的 α ， β -不饱和烯醛（酮）为下列之一：2-丁烯醛、2-己烯醛、2-甲基-2-戊烯醛、2-辛烯醛、2-癸烯醛、柠檬醛、肉桂醛、异丙叉丙酮、紫罗兰酮、3-辛烯-2-酮和 4-甲氧基-3-丁烯-2-酮。

[0016] 本发明还涉及所述的约克氏菌 WZY002 在不对称还原芳香酮制备手性芳香醇中的应用。

[0017] 优选的，所述的芳香酮为下列之一：苯乙酮、2-溴代苯乙酮、4-溴苯乙酮、2-羟基苯乙酮、苄叉丙酮。

[0018] 本发明还涉及所述的约克氏菌 WZY002 在还原芳香醛制备芳香醇中的应用。

[0019] 优选的,所述的芳香醛为苯甲醛或香草醛。

[0020] 所述 α , β -不饱和烯醛(酮)的区域选择性还原和芳香醛(酮)的还原在 pH6 ~ 9.5 具有催化活力,优选在 pH6.0 ~ 8.0 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液或 pH8.0 ~ 9.0 Tris-HCl 缓冲液中进行。

[0021] 所述 α , β -不饱和烯醛(酮)的区域选择性还原和芳香醛(酮)的还原在葡萄糖、乙醇、甘油或异丙醇存在下进行。

[0022] 具体的,所述的反应为:以 α , β -不饱和烯醛(酮)或者芳香醛(酮)为底物,以约克氏菌 WZY002 湿菌体为催化剂,在 pH6 ~ 9 的缓冲液中,底物浓度 5 ~ 200mM,于 4 ~ 60°C 及摇床转速 0 ~ 200rpm 下反应 2 ~ 72 小时,反应结束后经乙酸乙酯萃取,离心得到有机相,经无水硫酸钠干燥后,对有机相中的底物及其转化产物进行气相质谱联用及手性气相色谱分析。湿菌体相对于所述缓冲液的添加量为 45 ~ 450g/L。

[0023] 具体的,所述约克氏菌 WZY002 湿菌体可按如下方法制得:发酵培养基组成:蛋白胨 10g/L、酵母浸膏 5g/L、NaCl 5g/L,溶剂为水, pH7.0 ~ 7.2,将约克氏菌 WZY002 接种于发酵培养基中,于 30°C、摇床转速 200rpm 的条件下培养 12 ~ 48 小时,所得发酵液在 10000rpm 离心 10min,弃上清液,菌体用 pH6 ~ 9 的缓冲液洗涤一次,所得湿菌体即为生物催化剂。

[0024] 本发明的有益效果主要体现在:提供了一株具有高区域选择性、高立体选择性和高活力的菌株——约克氏菌 WZY002,通过该菌株催化 α , β -不饱和烯醛(酮)和芳香醛(酮)的还原能得到 α , β -不饱和烯醇及芳香醇。该菌株作为生物催化剂,区域选择性和立体选择性高,催化活性强,所催化的反应不需要添加辅酶,反应条件温和,在工业化生产上具有较高的应用价值。

(四)附图说明

[0025] 图 1 为约克氏菌 WZY002 系统发育树。

(五)具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0027] 实施例 1:

[0028] 利用 Blast 数据库对约克氏菌 WZY002 (CCTCC No:M2013099) 的 16S rDNA 进行序列比对,找出其相同和邻近属种若干菌株,并用 Clustal W 软件分析,画出约克氏菌 WZY002 的系统发生树,如图 1 所示。约克氏菌 WZY002 与雷金斯堡约克氏菌(*Yokenella regensburgei* strain CIP105435) 在亲缘关系上最接近。

[0029] 实施例 2:

[0030] 约克氏菌 WZY002 (CCTCC No:M2013099) 的发酵培养基组成:蛋白胨 10g/L、酵母浸膏 5g/L、NaCl 5g/L,溶剂为水, pH7.0 ~ 7.2, 121°C 灭菌 20min。

[0031] 约克氏菌 WZY002 接种于 150ml 发酵培养基中,于 30°C、摇床转速 200rpm 的条件下培养 12 ~ 48 小时。发酵液在 10000rpm 离心 10min 后,弃上清液,菌体用反应缓冲液洗涤一次,所得湿菌体即为生物催化剂。

[0032] 实施例 3:

[0033] 约克氏菌 WZY002 区域选择性还原 2-丁烯醛(巴豆醛):在 2mL 反应体系中,分别含有 100mM pH7.2 的磷酸盐缓冲液,0.25g 约克氏菌湿菌体,50mM 的巴豆醛,500mM 的各种辅底物。对照为不添加共底物。在 30°C 和 200rpm 下反应 12 小时。

[0034] 反应结束后,向反应液中加入 2mL 的乙酸乙酯,放入摇床在 30°C 和 200rpm 下萃取 1 小时。萃取液在 10000rpm 离心 10min,取有机相 400 ~ 1000 μ L,加入过量无水 Na_2SO_4 干燥,对底物及其转化产物进行气相色谱分析,10 倍底物浓度的异丙醇、甘油、乙醇和葡萄糖能提高得率 2 ~ 22 倍。其中葡萄糖效果最显著,添加 10 倍底物浓度的葡萄糖,反应产物得率达到 85.6%,并且转化率达到 98%。

[0035] 实施例 4:

[0036] 约克氏菌 WZY002 区域选择性还原巴豆醛:在 2mL 反应体系中,分别含有 100mM pH7.2 的磷酸盐缓冲液,0.25g 约克氏菌湿菌体,50mM 的 2-丁烯醛(巴豆醛),葡萄糖浓度为 2mol/L,在 30°C 和 200rpm 下反应 12 小时。

[0037] 反应结束后,向反应液中加入 2mL 的乙酸乙酯,放入摇床在 30°C 和 200rpm 下萃取 1 小时。萃取液在 10000rpm 离心 10min,取有机相 400 ~ 1000 μ L,加入过量无水 Na_2SO_4 干燥,对底物及其转化产物进行气相色谱分析,添加葡萄糖比没添加葡萄糖时产物得率有明显的提高,而且葡萄糖添加量为底物 10 倍时效果最佳,产物得率达到 83%,转化率也提高达到 98%。

[0038] 实施例 5:

[0039] 在 2mL 反应体系中,分别含有 100mM pH7.2 的磷酸盐缓冲液,0.25g 约克氏菌湿菌体,50mM 的巴豆醛,250mM 的葡萄糖,在不同温度下静置反应 12 小时。

[0040] 反应结束后,向反应液中加入 2mL 的乙酸乙酯,放入摇床在 30°C 和 200rpm 下萃取 1 小时。萃取液在 10000rpm 离心 10min,取有机相 400 ~ 1000 μ L,加入过量无水 Na_2SO_4 干燥,对底物及其转化产物进行气相色谱分析,约克氏菌 WZY002 对巴豆醛在 4 ~ 60°C 都有催化活力,但是在 30°C 活力最高,产物得率达到 83%,转化率也提高达到 98%。

[0041] 实施例 6:

[0042] 在 2mL 反应体系中分别含有 200mM 不同 pH 的缓冲液(磷酸盐缓冲液,pH6.0 ~ 8.9; 甘氨酸-NaOH 缓冲液,pH8.9 ~ 9.6),0.25g 约克氏菌湿菌体,50mM 的巴豆醛,250mM 的葡萄糖。于 30°C 和 200rpm 下反应 4 小时。

[0043] 反应结束后,向反应液中加入 2mL 的乙酸乙酯,放入摇床在 30°C 和 200rpm 下萃取 1 小时。萃取液在 10000rpm 离心 10min,取有机相 400 ~ 1000 μ L,加入过量无水 Na_2SO_4 干燥,对底物及其转化产物进行气相色谱分析,约克氏菌 WZY002 在 pH6 ~ 9.5 都对巴豆醛具有催化活力,在 pH8.0 的磷酸盐缓冲液中活力最高,产物得率达到 83%,转化率也提高达到 98%。

[0044] 实施例 7:

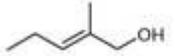
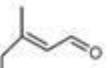
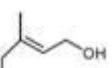
[0045] 约克氏菌 WZY002 区域选择性还原 α , β -不饱和烯醛(酮):在 2mL 反应体系中,分别含有 200mM pH8.0 的磷酸盐缓冲液,0.25g 约克氏菌湿菌体,50mM 的各种 α , β -不饱和烯醛或者 10mM 的各种烯酮,250mM 葡萄糖,于 30°C 和 200rpm 下反应。

[0046] 反应结束后,向反应液中加入 2mL 的乙酸乙酯,放入摇床在 30°C 和 200rpm 下萃取 1 ~ 2 小时。萃取液在 10000rpm 离心 10min,取有机相 400 ~ 1000 μ L,加入过量无水 Na_2SO_4

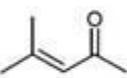
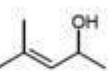
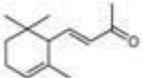
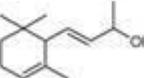
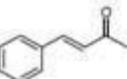
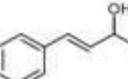
干燥,对底物及其转化产物进行气相色谱及质谱联用分析,结果如表 1 所示。

[0047] 表 1:约克氏菌 WZY002 催化还原 α , β - 不饱和烯醛(酮)

[0048]

编号	底物	产物	时间 (h)	转化率(%)	选择性(%) ^a
1			12	96.1±0.07	> 99
2			12	98.4±0.17	99
3			12	94.9±0.49	> 99
4			12	68.7±5.66	99
5			12	90.9±2.05	> 99
6			12	87.4±0.63	> 99

[0049]

7			12	9.45±3.7	> 99
8			17	3.6±0.43	99
9			24	< 3	> 99
10			17	4.8±0.11	> 99

[0050] a,选择性指反应结束后目的产物 α , β - 不饱和醇占总还原产物的百分比。

[0051] 由表 1 可以看出,约克氏菌 WZY002 对大多数烯醛都表现出较高的催化活力,而且相应的区域选择性也很高,当底物为巴豆醛、2-己烯醛、2-甲基-2-戊烯醛时,产物转化率都在 94% 以上,且基于 α , β - 不饱和烯醇生成的区域选择性也高达 99%。相比于烯醛而言,约克氏菌 WZY002 对所有的烯酮催化活力都较低,但是仍然具有优良的区域选择性。

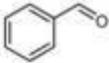
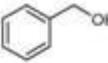
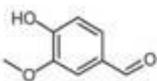
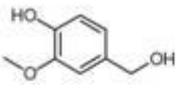
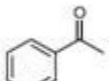
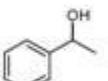
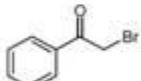
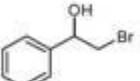
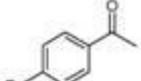
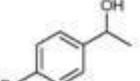
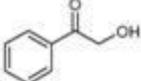
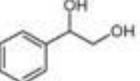
[0052] 实施例 8:

[0053] 约克氏菌 WZY002 催化还原芳香醛(酮):在 2mL 反应体系中,分别含有 200mM pH8.0 的磷酸盐缓冲液,0.25g 约克氏菌湿菌体,50mM 的各种芳香醛或者 10mM 的各种芳香酮,250mM 葡萄糖,于 30℃ 和 200rpm 下反应。

[0054] 反应结束后,向反应液中加入 2mL 的乙酸乙酯,放入摇床在 30℃ 和 200rpm 下萃取 1 小时。萃取液在 10000rpm 离心 10min,取有机相 400 ~ 1000 μ L,加入过量无水 Na_2SO_4 干燥,对底物及其转化产物进行气相色谱及质谱联用分析,结果如表 2 所示。

[0055] 表 2 :约克氏菌 WZY002 催化还原芳香醛(酮)

[0056]

编号	底物	产物	时间 (h)	转化率 (%)	<i>e.e.</i> (%) ^a
[0057]					
1			12	99.6±0.05	
2			12	88.4±1.25	
3			24	10±0.77	91.1
4			24	5±0.15	61.7
5			24	12.1±2.01	95.5
6			24	5±0.09	> 99

[0058] a, 对映体选择性为 (S)- 型。

[0059] 由表 2 可以看出,约克氏菌 WZY002 对苯加醛和香草醛都具有很高催化活力,尤其是催化苯甲醛转化率达到 99.6%。相对于芳香醛来说,约克氏菌 WZY002 对芳香酮催化活力较低,但是产物都具有很高的对映体选择性,当底物为 2- 羟基苯乙酮时,产物 *e. e.* 值达到 99%。

[0001]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 浙江工业大学

<120> 约克氏菌及其在制备 α , β -不饱和烯醇和芳香醇中的应用

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1431

<212> DNA

<213> Yokenella sp.

<400> 1

```

acatgcaagt cgaacggtag cacagaggag cttgctcctt gggtgacgag tggcggacgg      60
gtgagtaatg tctgggaaac tgcccgatgg agggggataa ctactggaaa cggtagctaa      120
taccgataa tgtcgaaga ccaaagaggg ggacctcgg gcctctgcc atcggatgtg      180
cccagatggg attagctagt aggtggggta acggctcacc taggcgacga tccctagctg      240
gtctgagagg atgaccagcc acactggaac tgagacacgg tccagactcc tacgggaggc      300
agcagtgggg aatattgcac aatgggcgca agcctgatgc agccatgccg cgtgtatgaa      360
gaaggccttc gggttgtaaa gtactttcag cggggaggaa ggcgatacgg ttaataaccg      420
tgtcgattga cgttaccgcg agaagaagca cgggctaact ccgtgccagc agccgcggtg      480
atacggaggg tgcaagcgtt aatcgaatt actgggcgta aagcgcacgc aggcggtctg      540
tcaagtcgga tgtgaaatcc cggggctcaa cctgggaact gcatccgaaa ctggcaggct      600
agagtctgt agaggggggt agaattccag gtgtagcggg gaaatcgta gagatctgga      660
ggaataccgg tggcgaaggc ggccccctgg acaaagactg acgctcaggt gcgaaagcgt      720
ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatgt cgactggag      780
glttgccct tgaggcgtgg ctccggagc taacgcgta agtcgaccgc ctggggagta      840
cggccgcaag gttaaaactc aatgaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt      900
ggtttaatic gatcaacgc gaagaacctt acctactctt gacatccacg gaatttagca      960
gagatgcttt agtccttcg ggaacctgta gacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg     1020
tgttgtaaaa tgttgggta agtcccgcaa cgagcgaac ccttaccctt tgttgccagc     1080
ggttcggccg ggaactcaaa ggagactgcc agtgataaac tggaggaagg tggggatgac     1140
gtcaagtcat catggccctt acgagtaggg ctacacacgt gctacaatgg catatacaaa     1200

```

[0002]

gagaagcgac ctcgagagag caagcggacc tcataaagta tgcgtagtc eggatcggag 1260

tctgcaactc gactccgtga agtcggaatc gctagtaatc gtggatcaga atgccacggt 1320

gaatacgttc cggggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtgg gttgcaaaag 1380

aagtaggtag cttaaccttc gggaggcgc ttaccacttt gtgattcatg a 1431

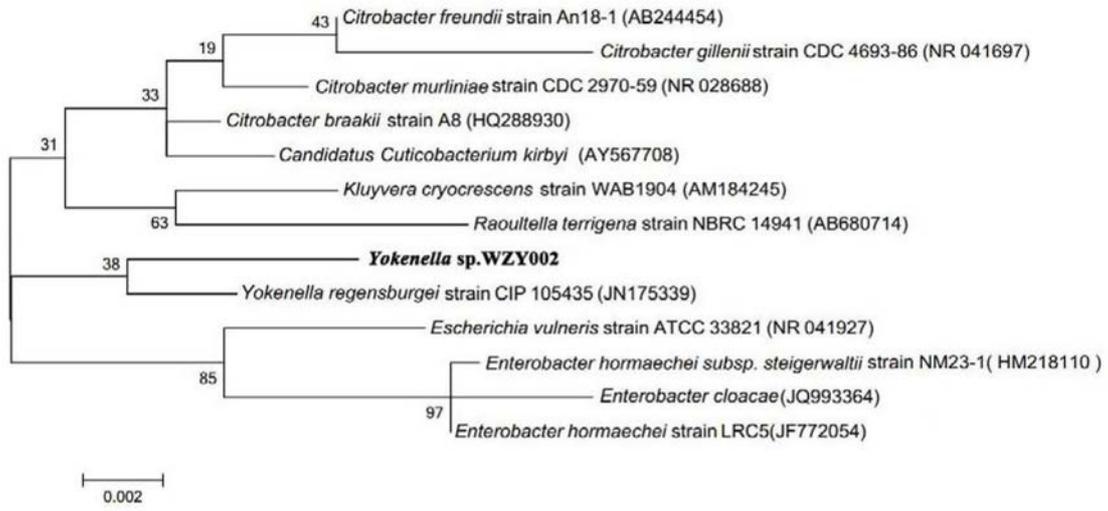


图 1