



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103849574 A

(43) 申请公布日 2014.06.11

(21) 申请号 201410040143.5

(22) 申请日 2014.01.27

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO: M2013559 2013.11.08

(71) 申请人 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 王普 金保军 黄金 孙婧
何军邀

(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 王兵

(51) Int. Cl.

C12N 1/16(2006.01)

C12P 7/42(2006.01)

C12R 1/72(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

近平滑假丝酵母 ZJPH1305 及在手性醇制备
中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一株新菌种——近平滑假丝酵母(Candida parapsilosis)ZJPH1305 及在微生物催化不对称还原 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸制备高光学纯度 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸中的应用,本发明通过采用近平滑假丝酵母(Candida parapsilosis)ZJPH1305 细胞为催化剂的手性生物催化,当底物浓度为 47.62mmol/L,辅助底物葡萄糖终浓度为 100g/L 时,目的产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的 e. e 值达到 99.9%,产率达到 95.37%。

1. 近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏日期为 2013 年 11 月 8 日, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 保藏编号: CCTCC NO: M2013559。

2. 一种权利要求 1 所述近平滑假丝酵母 ZJPH1305 在制备 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸中的应用, 其特征在于所述的应用为: 以 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸为底物, 以近平滑假丝酵母 ZJPH1305 经发酵培养获得的湿菌体为酶源, 在 25℃~35℃条件下, 于 pH 为 6.0~8.5 的缓冲液构成的反应体系中进行转化反应, 反应结束后, 将反应液离心, 取上清液, 加入等体积的乙酸乙酯萃取两次, 合并萃取层, 得到含 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的乙酸乙酯溶液。

3. 如权利要求 2 所述应用, 其特征在于所述反应体系中, 底物的初始浓度为 4.76~119.05mmol/L, 近平滑假丝酵母 ZJPH1305 湿菌体的添加量以菌体干重计为 30.4~91.2g/L。

4. 如权利要求 2 所述应用, 其特征在于所述反应是在 25℃~35℃条件下反应 12~60 小时。

5. 如权利要求 2 所述应用, 其特征在于所述反应体系中还添加有辅助底物构成转化体系, 所述辅助底物为下列之一: ①葡萄糖、②蔗糖、③麦芽糖、④异丙醇、⑤甲醇或⑥乙醇。

6. 如权利要求 5 所述应用, 其特征在于所述辅助底物为葡萄糖、蔗糖或麦芽糖, 辅助底物终浓度为 20~200g/L 转化体系。

7. 如权利要求 5 所述应用, 其特征在于所述辅助底物为异丙醇、甲醇或乙醇, 辅助底物体积终浓度为 10%~30%。

8. 如权利要求 5 所述应用, 其特征在于所述辅助底物为葡萄糖, 所述葡萄糖的终浓度为 75~125g/L 反应体系。

9. 如权利要求 2 所述应用, 其特征在于所述酶源按如下步骤制备:

1) 斜面培养: 将近平滑假丝酵母 ZJPH1305 单菌落接种至斜面培养基, 30℃培养 2~3 天, 4℃冰箱保存, 获得斜面菌体; 斜面培养基终浓度组成为: 葡萄糖 15g/L, 蛋白胨 7.5g/L, 酵母膏 6g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g/L, KH_2PO_4 1.5g/L, NaCl 0.75g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75g/L, 琼脂 20g/L, 溶剂为水, pH6.5;

2) 种子培养: 从培养成熟的斜面挑一环菌体接入装有 100mL 种子培养基的 250mL 摇瓶中, 30℃, 200rpm 培养 24 小时, 获得种子液; 种子培养基终浓度组成为: 葡萄糖 15g/L, 蛋白胨 20g/L, 酵母膏 10g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, KH_2PO_4 2g/L, NaCl 1.0g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, 溶剂为水, pH6.5;

3) 发酵培养: 将种子液以体积浓度 10% 的接种量接种至发酵培养基, 30℃、200rpm 摇床培养 48h, 将发酵液离心, 所得沉淀用 pH6.0 的磷酸缓冲液洗涤, 弃去洗涤液, 收集湿菌体即为酶源; 所述发酵培养基终浓度组成同种子培养基。

10. 如权利要求 9 所述应用, 其特征在于所述应用为: 将近平滑假丝酵母 ZJPH1305 经发酵培养获得的湿菌体加入至 0.2M、pH6.0 的磷酸缓冲液中, 再加入 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸和葡萄糖构成转化体系, 30℃, 200rpm 摇床振荡反应 24~48 小时, 反应结束后将反应液离心, 取上清液, 加入等体积的乙酸乙酯萃取两次, 合并萃取层, 得到含 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的乙酸乙酯溶液; 所述湿菌体加入量以菌体干重计为 30.4~60.8g/L, 所

述底物初始浓度为 4.76 ~ 47.62mmol/L, 葡萄糖终浓度为 100g/L。

近平滑假丝酵母 ZJPH1305 及在手性醇制备中的应用

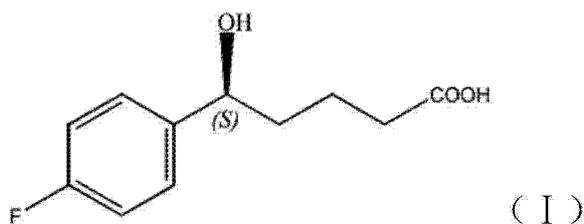
(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一株近平滑假丝酵母及应用,特别涉及一株新菌株-近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)ZJPH1305,以及在微生物催化不对称还原 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸制备高光学纯度 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸中的应用。

(二) 背景技术

[0002] 式(I)所示的 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸是合成药物依替米贝 (Ezetimibe, 商品名为 **Zetia®**) 的重要手性中间体。依替米贝化学名为 1-(4-氟苯基)-(3R)-[3-(4-氟苯基)-(3S)-羟基丙基]-(4S)-(4-羟基苯基)-2-氮杂环丁烷酮。2002 年美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准依替米贝用于治疗高脂血症。依替米贝是默克和先灵葆雅研发的一类新型的选择性胆固醇吸收抑制剂,其被吸收后在肝脏中与葡萄糖醛酸结合,经肝肠循环,几乎特异地定位于小肠黏膜细胞,然后结合小肠刷状缘膜小囊泡上膜蛋白,抑制胆固醇的吸收,从而降低胆固醇含量。2002 年 11 月在德国首先上市,同期在美国、英国、瑞士、瑞典上市。研究证实,依替米贝是有效的胆固醇吸收抑制剂,与他汀类降脂药物联用效果更好。美国 FDA 于 2004 年 8 月 23 日正式批准默克和先灵葆雅共同研发的二合一降胆固醇新药依替米贝/辛伐他汀 (**Vytorin®**) 上市。**Vytorin®** 是一种复方药,其可以通过两个途径来降低胆固醇:一种途径是阻止来源于食物的肠内胆固醇的吸收,另一种途径是抑制肝脏胆固醇的合成。2010 年依替米贝 (**Zetia®**) 的销售额为 16.66 亿美元,依替米贝/辛伐他汀复方药 (**Vytorin®**) 的销售额为 15.52 亿美元。

[0003]



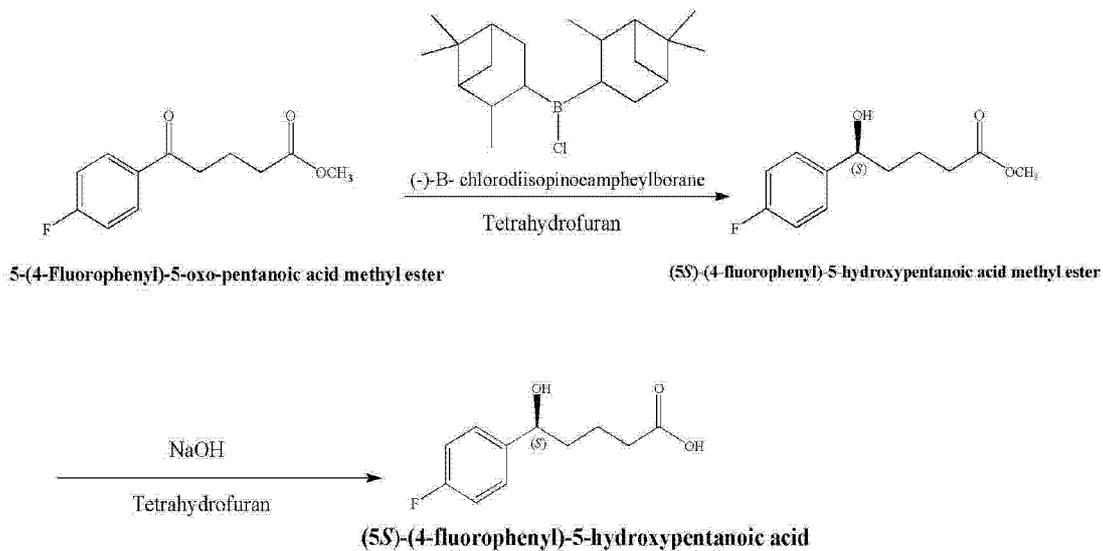
[0004] 化学法制备 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的工艺条件较为苛刻,反应步骤较多,反应过程中需使用对环境有毒害作用的溶剂;所用的手性催化剂制备较为困难,价格昂贵,反应后存在重金属残留问题,且催化剂循环使用效率不理想。采用微生物全细胞催化的生物不对称还原方法制备 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸具有反应条件温和、立体选择性高、环境友好等优点。

[0005] 目前,文献报道的 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸制备方法主要涉及以下几种:

[0006] Kunmar 等以 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸甲酯为底物,经手性催化剂 (-)-B-氯二异蒎蒾硼烷的催化还原,水解和酸化等步骤制得 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸,产率为 78.99%, e. e. 值 98.36%。该路线的反应条件苛刻,需要在 $-35^{\circ}\text{C} \sim -25^{\circ}\text{C}$ 低温下进行反应,对厂房和设备的要求较高。所用催化剂 (-)-B-氯二异蒎蒾硼烷价格昂贵,且遇水和空气极

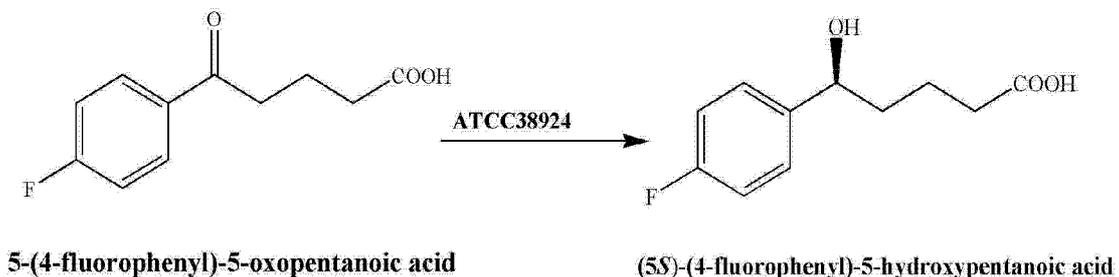
易氧化。反应介质为四氢呋喃。具体反应式如下：

[0007]



[0008] Homann 等以 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸为底物,从土壤中筛选得到可将 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸不对称还原为 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的菌株 -- 拜耳接合酵母 (*Zygosaccharomyces bailii*) ATCC NO. 38924, 该菌株在 30°C 条件下转化 24h, 产率为 15%, e. e. 值达 99.8%。反应式如下：

[0009]



(三) 发明内容

[0010] 本发明目的是提供一株可用于微生物催化不对称还原 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸制备高光学纯度 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的新菌种 -- 近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305, 以及该菌种在催化不对称还原制备 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸中的应用。

[0011] 本发明采用的技术方案是：

[0012] 本发明提供一株新菌株 -- 近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305, 该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏日期为 2013 年 11 月 8 日, 地址: 中国, 武汉, 武汉大学, 保藏编号: CCTCCNO: M2013559。

[0013] 本发明所述新菌株按如下方法筛选得到：

[0014] (1) 菌株筛选

[0015] 1) 富集培养: 将从浙江兰溪、义乌、温州、安徽安庆、湖北孝感、山西大同等地采集的土样接种到富集培养基中, 置 30°C, 200rpm 的摇床培养 5 天, 待培养液变浑浊后, 取

1mL 培养液转接至新鲜的富集培养基中,继续培养 5 天,如此重复 3 个循环。富集培养基配方如下:5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸 50mmol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, KH_2PO_4 2g/L, NaCl1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L,溶剂为水, pH6.5。

[0016] 2) 平板培养:将最后一次富集培养液稀释 1000 倍后涂布平板培养基,30℃培养 5 天。平板培养基终浓度组成为富集培养基中加入 15-20g/L 的琼脂。

[0017] 3) 近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*)ZJPH1305 菌株筛选

[0018] 菌种来源:近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*)ZJPH1305 菌株系从采自浙江兰溪的土样中分离筛选获得。具体筛选方法如下:将从浙江兰溪采集的土样加入到装有 50ml 富集培养基的 250ml 摇瓶中,30℃,200rpm,培养 4~5 天,待培养液变浑浊后,取 1ml 培养液转接至新鲜的富集培养基中,继续培养 4~5 天,如此重复富集培养 3~4 次。富集培养基中以 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸为唯一碳源,所述富集培养基终浓度组成为:5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸 50mmol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, KH_2PO_4 2g/L, NaCl1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L,溶剂为水, pH6.5。

[0019] 将最后一次富集培养液稀释 1000 倍后涂布平板培养基,30℃培养 5 天,经多次分离培养后获得单菌落菌株。平板培养基终浓度组成为富集培养基中加入 15-20g/L 的琼脂。挑取单菌落菌株接种到种子培养基,30℃培养 20 小时,再转接至产酶培养基中 30℃培养 44 小时,9000rpm,4℃,离心 10 分钟获得湿菌体。以 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸为底物,离心获得的湿菌体为催化剂,在磷酸缓冲液中 30℃转化 24 小时后,采用液相色谱法检测转化液中目的产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的对映体过量值 (e. e. 值),从中筛选得到具有高立体选择性 (e. e. 值 > 99%) 的微生物新菌株,记为菌株 ZJPH1305。

[0020] (2) 菌株 ZJPH1305 的生理生化特征

[0021] 菌落形态:30℃平板培养 48h,菌落呈圆形,表面湿润,光滑,略微隆起。菌落呈白色,不透明,有光泽。

[0022] 细胞形态:细胞呈椭圆形,可单个、成对排列或聚集成丛。

[0023] 生理生化特性:采用麦芽汁琼脂斜面培养时菌落呈白色到奶油色,无光泽或稍有光泽,软而平滑或部分有皱纹。培养 3~5 天菌落渐硬并呈菌丝状。细胞呈卵形 4~8 微米 × 5~11 微米,或球形 3 微米~6 微米。糖发酵葡萄糖阳性,D-半乳糖阳性,麦芽糖阳性,蔗糖阳性,海藻糖阳性,蜜二糖阴性,乳糖阴性,纤维二糖阴性,松三糖阳性,棉子糖阴性,菊糖阴性,淀粉阴性,D-木糖阴性;碳源同化葡萄糖阳性,半乳糖阳性,D-山梨醇阳性,D-核糖阳性,D-木糖阳性,L-阿拉伯糖阳性,L-鼠李糖阴性,蔗糖阳性,麦芽糖阳性,海藻糖阳性,蜜二糖阴性,乳糖阴性,棉子糖阴性,松三糖阳性,菊糖阴性,淀粉阴性,甘油阳性。氮源利用硝酸钾阴性,类淀粉化合物的形成阴性,分解脂肪产酸实验阴性,尿素阴性,抗放线菌酮阳性。

[0024] (3) 菌株 ZJPH1305 的 26s rDNA D1/D2 区序列特性

[0025] 用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取细胞总 DNA,并以其为模板,通过引物 NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) 和 NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) 扩增菌株的 26s rDNA D1/D2 区的基因,再将 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,所得结果见图 4 所示,其中泳道 A 和 B 均为菌株 ZJPH1305 的 26s rDNA 扩增产物,两者均在 600bp 处出现单一条带。

[0026] PCR 反应体系:

[0027]

试剂	体积(μl)
Template (基因组 DNA20-50ng/μl)	0.5
5×Buffer (with Mg ²⁺)	2.5
dNTP (各 2.5mM)	1
F (10uM)	0.5
R (10uM)	0.5
加双蒸 H ₂ O 至	25

[0028] PCR 循环条件：

温度	时间	程序
98°C	3 min	预变性
98°C	25 sec	30 cycle
55°C	25 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	修复延伸
4°C	∞	终止延伸

[0031] 经上海生工测序确认所述菌株 ZJPH1305 的 26_s rDNA D1/D2 区序列如 SEQ ID NO : 1 所示：

[0032] AAAGAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGAACAGAACGT CACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCATGAGATGTCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGG AATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTG ATGAAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAG ACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGAGCGGTAGGA TAAGTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCTTAGACTGAGGACT GCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGT

[0033] SEQ ID NO : 1 所示核苷酸序列已提交 GenBank (GenBank 登录号为 No. KF811029), 将菌株 ZJPH1305 的 26s rDNA D1/D2 区序列在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上进行同源性对比 (BLAST), 结果表明: 菌株 ZJPH1305 与假丝酵母属 (*Candida* sp.) 的部分菌株序列同源性较高。ZJPH1305 菌株与 *Candida parapsilosis* clone MROJIY04 菌株 (GenBank 登录号为 No. JX441605.1) 的序列同源性达到 100%。

[0034] 根据生理生化特性并结合分子生物学鉴定,该菌株被鉴定为近平滑假丝酵母,命名为近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305。

[0035] 采用 Box-Behnken 旋转中心组合实验设计法对葡萄糖浓度,酵母膏浓度和 KH_2PO_4 浓度三个因素对产酶影响显著的因素进行优化,得到近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305 菌株的优化培养基组成为:麦芽糖 20 ~ 50g/L,酵母膏 20 ~ 50g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 ~ 2.5g/L, KH_2PO_4 1.0 ~ 2.5g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 ~ 0.6g/L, NaCl 0.5 ~ 1.5g/L, 溶剂为水, pH6.0 ~ 7.5。

[0036] 近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305 菌株的培养条件为:初始 pH6.0 ~ 7.5, 摇瓶装液量 80 ~ 120mL/250mL 锥形瓶, 培养温度 30℃, 摇床转速 180 ~ 220rpm, 接种量 4 ~ 10% (体积浓度), 培养时间 36 ~ 48h。

[0037] 本发明还涉及所述近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305 在微生物催化不对称还原制备依替米贝中间体 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸中的应用, 所述应用为: 以 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸为底物, 以近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305 经发酵培养获得的湿菌体为酶源, 在 25℃ ~ 35℃ 下, 于 pH 为 6.0 ~ 8.5 的缓冲液 (优选磷酸盐缓冲液, 更优选 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液) 构成的反应体系 (所述反应体系是由底物、酶源和缓冲液构成) 中进行转化反应, 反应结束后, 将反应液离心, 取上清液, 加入等体积的乙酸乙酯萃取两次, 合并有机相, 获得含 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的乙酸乙酯溶液, 再用饱和氯化钠溶液洗涤、无水硫酸钠干燥, 旋转蒸发除去溶剂, 即得到依替米贝中间体 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸, (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸 ^1H NMR (DMSO , 400MHz): 11.97 (s, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.14 (m, 2H), 5.21 (s, 1H), 4.52 (t, 1H), 2.19 (t, 2H), 1.57 (m, 3H), 1.43 (m, 1H)。

[0038] 所述反应体系中, 底物 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸的初始浓度为 4.76 ~ 119.05mmol/L, 优选 23.81 ~ 71.43mmol/L, 更优选 47.62mmol/L, 近平滑假丝酵母 ZJPH1305 菌体的添加量以菌体干重计为 30.4 ~ 91.2g/L, 优选 30.4 ~ 76.0g/L, 更优选 60.8g/L。

[0039] 进一步, 优选所述反应是在 25℃ ~ 35℃ 条件下反应 12 ~ 60 小时, 更优选在 30℃、200rpm 条件下反应 24 ~ 48 小时。

[0040] 为促进辅酶再生, 提高反应效率, 所述反应体系中还添加有辅助底物构成转化体系 (所述转化体系是由底物、酶源、辅助底物和缓冲液构成), 所述辅助底物为下列之一: ①葡萄糖、②蔗糖、③麦芽糖、④异丙醇、⑤甲醇或⑥乙醇; 所述辅助底物为葡萄糖、蔗糖或麦芽糖时, 辅助底物终浓度为 20 ~ 200g/L 转化体系, 辅助底物为异丙醇、甲醇或乙醇时, 辅助底物体积终浓度为 10% ~ 30%。

[0041] 更优选的, 所述辅助底物为葡萄糖, 转化体系中, 葡萄糖终浓度为 75 ~ 125g/L, 底物初始浓度为 4.76 ~ 71.43mmol/L, 近平滑假丝酵母 ZJPH1305 菌体的添加量以菌体干重计为 30.4 ~ 76.0g/L。

[0042] 本发明所述湿菌体 (即酶源) 可按照常规方法由菌株发酵离心后获得, 优选的, 所述湿菌体由如下方法获得:

[0043] 1) 斜面培养: 将近平滑假丝酵母 ZJPH1305 单菌落接种至斜面培养基, 30℃ 培养 2 ~ 3 天, 4℃ 冰箱保存, 获得斜面菌体; 斜面培养基终浓度组成为: 葡萄糖 15g/L, 蛋白胨 7.5g/L, 酵母膏 6g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g/L, KH_2PO_4 1.5g/L, NaCl 0.75g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75g/L, 琼

脂 20g/L, 溶剂为水, pH6.5;

[0044] 2) 种子培养: 从培养成熟的斜面挑一环菌体接入装有 100mL 种子培养基的 250mL 摇瓶中, 30°C, 200rpm 培养 24 小时, 获得种子液; 种子培养基终浓度组成为: 葡萄糖 15g/L, 蛋白胨 20g/L, 酵母膏 10g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, KH_2PO_4 2g/L, NaCl 1.0g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, 溶剂为水, pH6.5;

[0045] 3) 发酵培养: 以体积浓度 10% 的接种量将种子液转接到装有 100mL 发酵培养基的 250mL 摇瓶中, 30°C, 200rpm 培养 48 小时, 获得发酵培养液, 将发酵培养液离心 (9000rpm, 4°C, 离心 10 分钟), 所得沉淀用 pH6.0 的磷酸缓冲液洗涤, 弃去洗涤液, 收集湿菌体即为酶源; 发酵培养基配方同种子培养基。

[0046] 更进一步, 本发明最优选所述近平滑假丝酵母 ZJPH1305 在制备 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸中的应用为: 将近平滑假丝酵母 ZJPH1305 经发酵培养获得的湿菌体加入至 0.2M、pH 为 6.0 的磷酸缓冲液中, 再加入 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸和葡萄糖构成转化体系, 30°C、200rpm 摇床振荡反应 24 ~ 48 小时, 反应结束后将反应液离心, 取上清液, 加入等体积的乙酸乙酯萃取两次, 合并萃取层即有机相, 得到含 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的乙酸乙酯溶液; 所述菌体加入量以菌体干重计为 30.4 ~ 60.8g/L, 所述底物初始浓度为 4.76 ~ 47.62mmol/L, 葡萄糖终浓度为 100g/L。

[0047] 液相色谱法测定目标产物的光学纯度和产率: 转化反应萃取液中的产物和残留底物的浓度采用液相色谱分析, 采用面积归一法。取 1mL 萃取液蒸干, 重溶于乙醇, 进行液相分析。液相色谱条件: 日本岛津 SPD-10A 高效液相色谱仪, 浙大 N2000 色谱工作站, 日本大赛璐 CHIRALPAK AD-H 正相多糖衍生物手性柱 (4.6mm × 250mm × 5 μm); 检测波长: 210nm; 流动相 V(正己烷)/V(乙醇) = 86/14; 流速: 0.6ml/min; 柱温: 25°C; 进样量: 5 μl。

[0048] 用面积归一化法分别计算出反应液中的底物和产物的浓度。进而求出反应的产率 (Yield)。计算式为:

[0049] 产率 = $C_i/C_0 \times 100\%$ 公式(1)

[0050] 公式(1)中 C_0 、 C_i 分别为反应起始时底物的摩尔浓度和反应结束时产物的摩尔浓度。

[0051] 产物的光学纯度由对映体过量值 (enantiomeric excess, e. e.) 来表示。

[0052] e. e. = $(C_S - C_R) / (C_S + C_R) \times 100\%$ 公式(2)

[0053] 公式(2)中 C_S 和 C_R 分别为 S 型和 R 型 5-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的摩尔浓度。

[0054] 本发明的有益效果主要体现在: 本发明提供了一株可用于微生物催化不对称还原 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸制备依替米贝药物关键手性中间体 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的微生物新菌种 -- 近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305, 采用该新菌种催化制备光学纯 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸具有底物浓度高, 立体选择性好, 产物光学纯度高优点; 本发明通过采用近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) ZJPH1305 细胞为催化剂的手性生物催化, 当底物浓度为 47.62mmol/L, 辅助底物葡萄糖终浓度为 100g/L 时, 目的产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的 e. e 值达到 99.9%, 产率达到 95.37%。

(四) 附图说明

[0055] 图 1 为底物标准品液相色谱图;

[0056] 图 2 为产物标准品液相色谱图；

[0057] 图 3 为近平滑假丝酵母 ZJPH1305 菌株生物还原反应萃取液液相色谱图；

[0058] 图 4 为菌株 ZJPH1305 的 26s rDNA 扩增产物电泳图,其中泳道 A 和 B 均为菌株 ZJPH1305 的 26s rDNA 扩增产物, M 为 Marker。

(五) 具体实施方式

[0059] 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：

[0060] 实施例 1

[0061] 1) 斜面培养：挑取近平滑假丝酵母 ZJPH1305 的单菌落接种至斜面培养基, 30℃ 培养 2 ~ 3 天, 获得斜面菌体 4℃ 冰箱保存。斜面培养基终浓度组成为：葡萄糖 15g/L, 蛋白胨 7.5g/L, 酵母膏 6g/L, (NH₄)₂SO₄3g/L, KH₂PO₄1.5g/L, NaCl10.75g/L, MgSO₄·7H₂O0.75g/L, 琼脂 20g/L, 溶剂为水, pH6.5。

[0062] 2) 种子培养：从培养成熟的斜面挑一环菌体接入装有 100mL 种子培养基的 250mL 摇瓶中, 30℃, 200rpm 培养 24 小时, 获得种子液。种子培养基终浓度组成为：葡萄糖 15g/L, 蛋白胨 20g/L, 酵母膏 10g/L, (NH₄)₂SO₄2g/L, KH₂PO₄2g/L, NaCl11.0g/L, MgSO₄·7H₂O0.5g/L, 溶剂为水, pH6.5。

[0063] 3) 发酵培养：以体积浓度 10% 的接种量将种子液转接到装有 100mL 发酵培养基的 250mL 摇瓶中, 30℃, 200rpm 培养 48 小时, 获得发酵培养液, 将发酵培养液 9000rpm, 4℃, 离心 10 分钟, 弃去上清, 收集沉淀用 pH 为 6.0 的磷酸缓冲液洗涤一次, 即获得湿菌体；发酵培养基配方同种子培养基。

[0064] 实施例 2：

[0065] 1) 转化反应

[0066] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸盐缓冲液 (0.2M, pH7.0) 中, 湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L；加入终浓度 4.76mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物, 再加入终浓度 10g/L 的蔗糖作为辅助底物, 置于 30℃, 200rpm 的摇床中反应 24h。转化结束后, 转化液用等体积乙酸乙酯萃取 2 次, 合并萃取相, 获得含有 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的乙酸乙酯溶液, 采用液相色谱法分析目的产物和残留底物的含量, 以及产物的光学纯度。

[0067] 5) 分析检测：

[0068] 转化反应萃取液中的产物和残留底物的浓度采用液相色谱分析, 采用面积归一法。取 1mL 离心后的上清液蒸干, 重溶于乙醇, 进行液相分析。液相色谱条件：日本岛津 SPD-10A 高效液相色谱仪, 浙大 N2000 色谱工作站, 日本大赛璐 CHIRALPAK AD-H 正相多糖衍生物手性柱 (4.6mm×250mm×5μm)；检测波长：210nm；流动相 V(正己烷)/V(乙醇)=86/14；流速：0.6ml/min；柱温：25℃；进样量：5μl。液相色谱图见图 1 ~ 图 3。产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 1.02mmol/L, 光学纯度 ee 值 99.9%, 产率 21.42%。

[0069] 实施例 3：

[0070] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液 (0.2M, pH7.0) 中, 湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L；加入终浓度 4.76mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,

不加辅助底物(对照),置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 24h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 0.89mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 18.70%。

[0071] 实施例 4:

[0072] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸盐缓冲液(0.2M, pH7.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入 4.76mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入 1mL 甲醇(10%,v/v)的乙醇作为辅助底物,置于 30℃,200r/min 的摇床中反应 24h。采用实施例 1 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 1.02mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 18.35%。

[0073] 实施例 5:

[0074] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸盐缓冲液(0.2M, pH7.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入 4.76mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入 1mL 异丙醇(10%,v/v)的乙醇作为辅助底物,置于 30℃,200r/min 的摇床中反应 24h。采用实施例 1 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 1.02mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 20.43%。

[0075] 实施例 6:

[0076] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH7.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入终浓度 4.76mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 10g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 24h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 1.10mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 23.10%。

[0077] 实施例 7:

[0078] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH7.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入终浓度 4.76mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 50g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 24h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 1.93mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 40.55%。

[0079] 实施例 8

[0080] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH7.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入终浓度 4.76mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 24h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 2.85mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 59.88%。

[0081] 实施例 9:

[0082] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入终浓度 4.76mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 24h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 4.68mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 98.32%。

[0083] 实施例 10:

[0084] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH8.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入终浓度 4.76mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 24h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 2.92mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 61.34%。

[0085] 实施例 11:

[0086] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入终浓度 23.81mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 24h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 19.36mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 81.31%。

[0087] 实施例 12:

[0088] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入终浓度 23.81mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 48h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 23.00mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 96.6%。

[0089] 实施例 13:

[0090] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入终浓度 47.62mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 48h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 29.82mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 62.62%。

[0091] 实施例 14:

[0092] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 30.4g/L;加入终浓度 71.43mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 48h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 30.39mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 42.55%。

[0093] 实施例 15:

[0094] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 60.8g/L;加入终浓度 47.62mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 48h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 45.41mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 95.37%。

[0095] 实施例 16:

[0096] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 76.0g/L;加入终浓度 95.24mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30℃,200rpm 的摇床中反应 48h,采用实

施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 34.84mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 36.58%。

[0097] 实施例 17:

[0098] 将实施例 1 所得的湿菌体悬浮于 10mL 磷酸缓冲液(0.2M, pH6.0)中,湿菌体以菌体干重计浓度为 91.2g/L;加入终浓度 119.05mmol/L 的 5-(4-氟苯)-5-酮基戊酸作为底物,再加入终浓度 100g/L 的葡萄糖作为辅助底物,置于 30°C,200rpm 的摇床中反应 48h,采用实施例 2 的检测方法,产物 (5S)-(4-氟苯)-5-羟基戊酸的浓度为 29.87mmol/L,光学纯度 ee 值 99.9%,产率 25.09%。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 浙江工业大学

<120> 近平滑假丝酵母 ZJPH1305 及在手性醇制备中的应用

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 577

<212> DNA

<213> Candida parapsilosis

<400> 1

```

aaagaaccaa cagggattgc cftagtagcg gegagtgaag cggcaaaage tcaaattfga      60
aatctggcac tttcagtgtc cgagttgtaa ttgaagaag gtatctttgg gtctggetct      120
tgtctatggt tcttgaaca gaacgtcaca gagggtgaga atcccgtgcg atgagatgct      180
ccagacctat gtaaagftcc ttcgaagagt cgagttggtt gggaatgcag ctctaagtgg      240
gtggtaaajt ccatctaaag cfaaatattg gcgagagacc gatagcgaac aagfacagtg      300
atggaaagat gaaaagaact ttgaaaagag agtgaaaaag tacgtgaaat fgttgaaagg      360
gaagggcttg agatcagact tggatatttg tatgttactc tctcgggggt ggcctctaca      420
gtttaccggg ccagcatcag tttgagcggg aggataagtg caaagaaatg tggcactgct      480
tcggtagtgt gttatagtct ttgtcgatac tgccagctta gactgaggac tgcggcttcg      540
gcctaggatg ttggcataat gatcttaagt cgccccgt      577

```

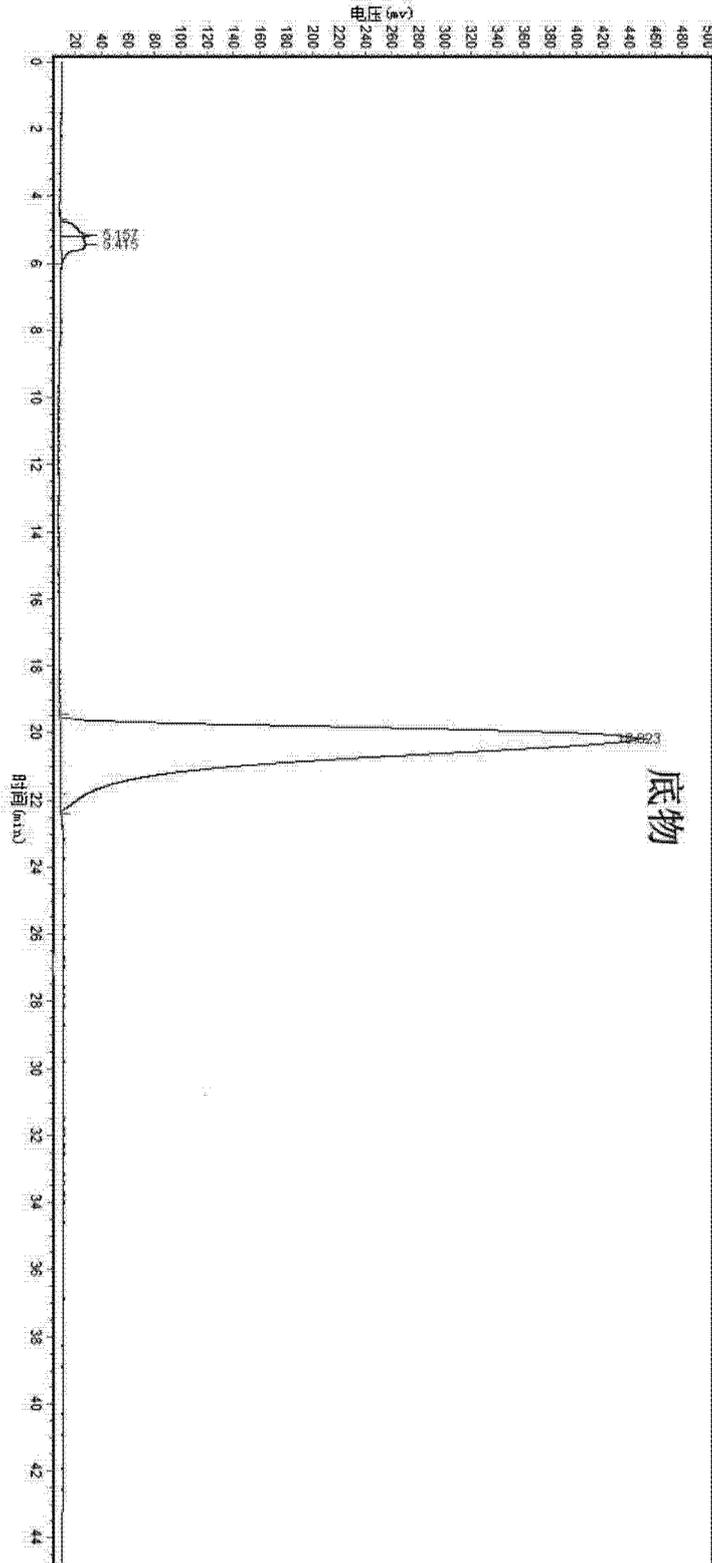


图 1

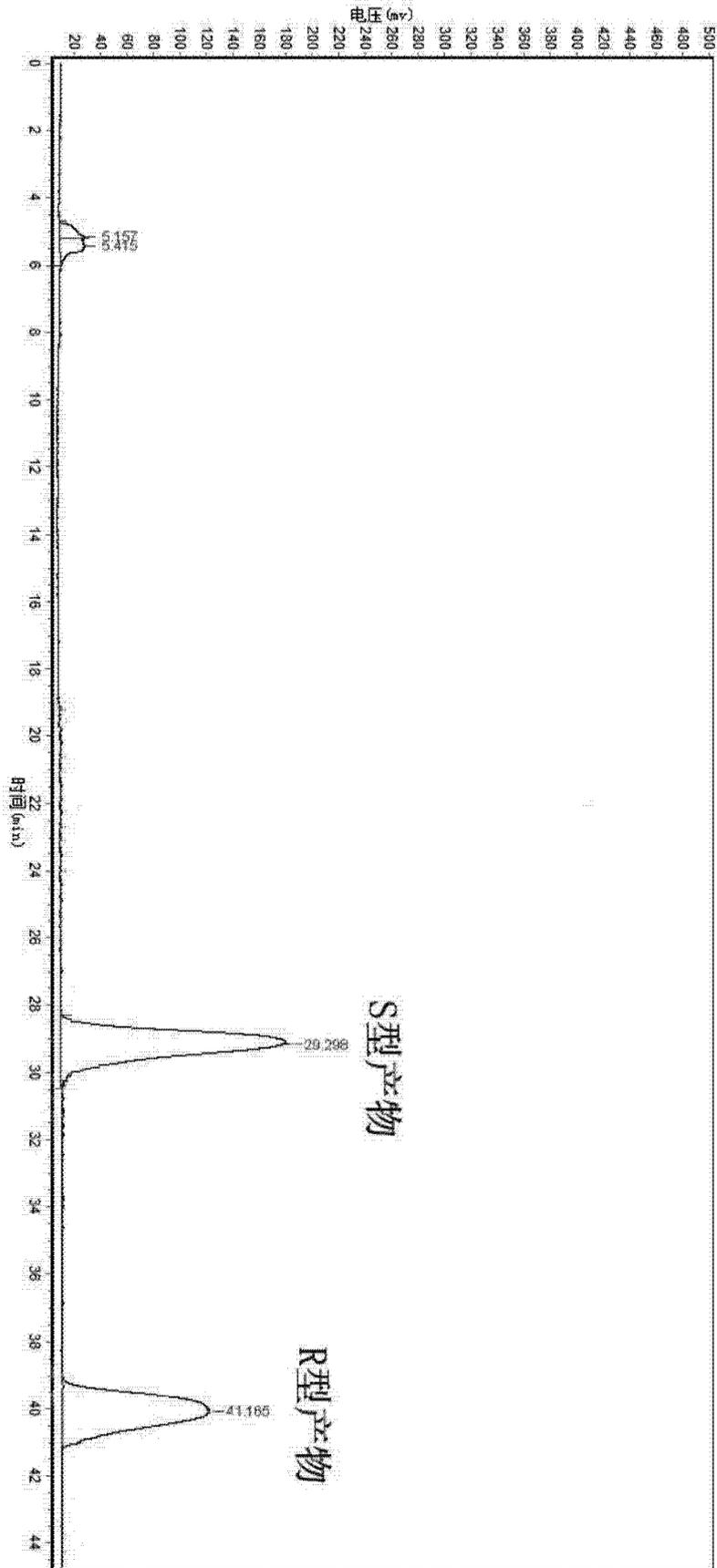


图 2

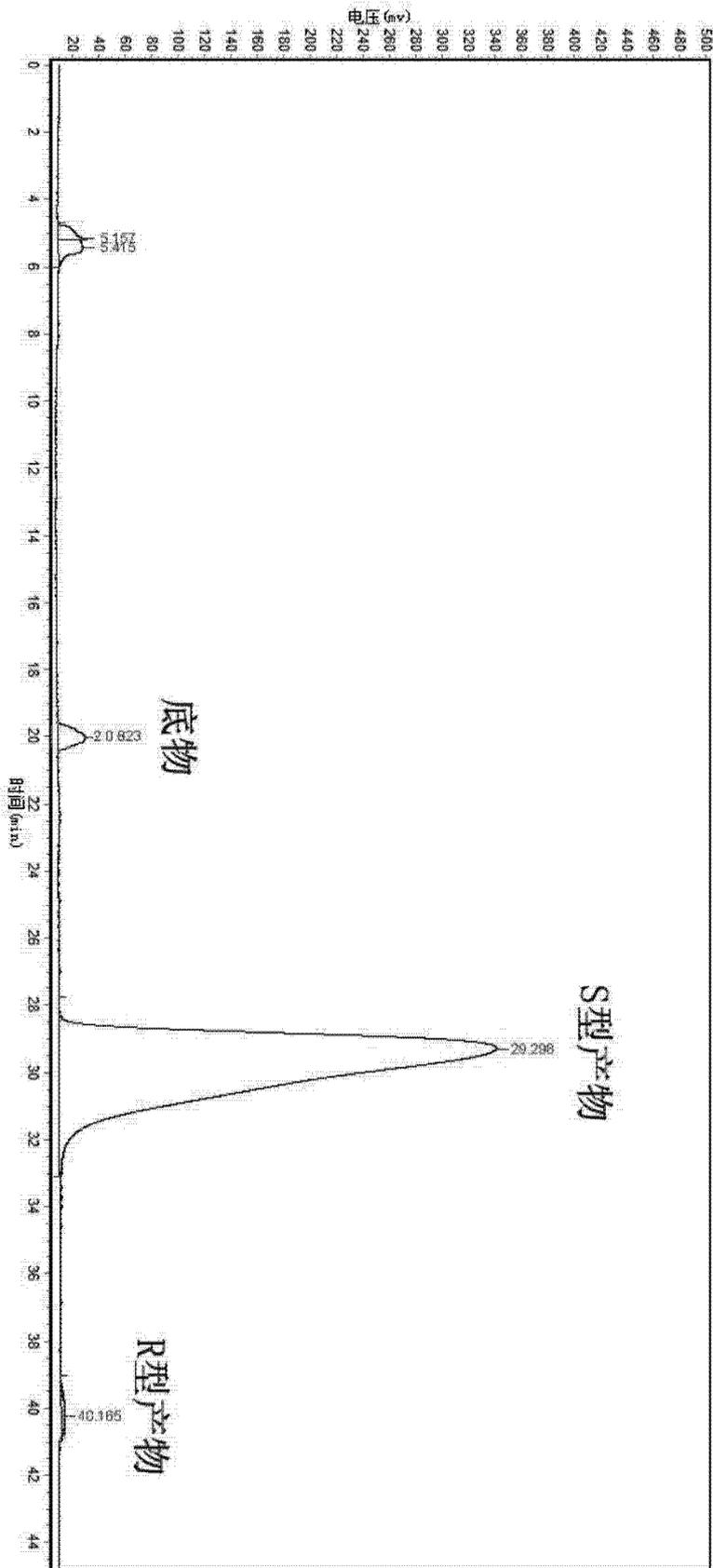


图 3

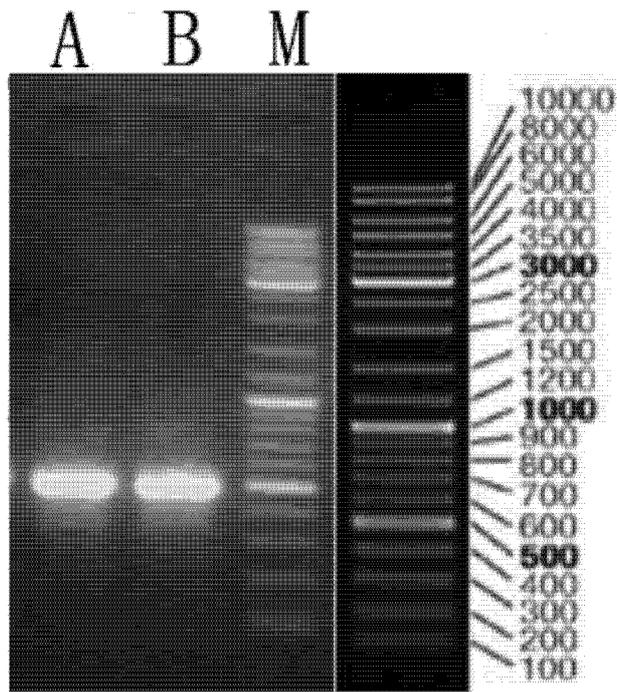


图 4