

环氧化物水解酶产生菌的筛选及产酶条件研究

李从发^{1 2} 崔宏杰³ 田秀云¹ 吉爱国³ 曲音波^{1*}

(¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(² 华南热带农业大学工学院 海南 571737)

(³ 山东大学药学院 济南 250012)

关键词 环氧化物水解酶, 对映体选择性, 筛选, 产酶条件, 缩水甘油酸酯类

中图分类号: Q556 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)03-0422-05

手性环氧化物至少含有一个手性碳, 通过选择性开环和官能团转换, 可以方便地合成许多有价值的手性化合物, 在制药、农药、香料、精细化学品工业上有着极其重要的应用价值^[1]。因此, 手性环氧化物的合成一直是一个重要的研究课题。

由于外消旋环氧化物廉价易得, 通过动力学拆分获得手性环氧化物一直是一个很有吸引力的方法^[2]。其中, 环氧化物水解酶可将端基环氧化物和结构复杂的、多取代的非官能团的多种环氧化物有效地拆分, 并且不需使用钴等重金属, 符合绿色化学的潮流。此外, 环氧化物水解酶还具有如下特点^[3]: 来源广泛, 不需辅酶, 在非水溶剂中仍具有活力, 催化的反应常常显示出高度的对映体选择性。因此, 环氧化物水解酶受到了合成化学家和生物学家的广泛关注。

筛选新酶和寻找新底物是近年来环氧化物水解酶研究的热点^[3]。手性缩水甘油酸酯类化合物是许多昂贵药物合成的原料或关键中间体, 如(2S, 3R)-4-苯基-2, 3-环氧丁酸酯是合成抗癌药物氨基肽酶 N 抑制剂 Bestatin(乌苯美司), Phebestin(无中译名), Probestin(无中译名), MR-38X(无中译名) 等一系列药物的重要中间体; (2R, 3S)-3-苯基缩水甘油酸酯是合成紫杉醇侧链的关键中间体^[4]; (2R, 3S)-3-(4-甲氧基苯基) 缩水甘油酸酯是合成降血压药物 Diltiazem(地而硫卓) 的关键中间体^[4, 5]。但目前尚未见环氧化物水解酶用于缩水甘油酸酯类化合物拆分的研究报道。

本研究以苯基环氧乙烷为模型底物筛选产酶菌株, 并对其产酶条件进行了初步探讨, 为研究其在手性缩水甘油酸酯合成中的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Spectra MAX 190 微板光谱仪, 美国 Molecular Devices 公司产; P/ACE System-MDQ 高效毛细管电泳仪, 美国 Beckman 公司产; 配二极管阵列在线检测器(190 ~ 280nm); 石英毛细管(50 μ m \times 375 μ m); 河北永年锐峰色谱器件有限公司产; ORP-431 型 pH 数字酸度计, 上海大普仪器有限公司产。

外消旋苯基环氧乙烷 (R)-苯基环氧乙烷, 磺酰化 β -环糊精(取代度为 7-11) 购自 Fluka 公司; 三甘醇二甲醚购自 EMK 公司; 4-(对-硝基苯基)吡啶 (R)-苯基乙二醇和 (S)-苯基乙二醇购自 Aldrich 公司, 其它试剂为国产分析纯或生化试剂。

1.2 样品

石油、动物油或植物油, 或被它们长期污染的土壤或水样, 共 60 个, 采自海南、济南、滨州、威海、烟

基金项目: 山东省自然科学基金(Y2000C21), 国家自然科学基金(30270047)

* 通讯作者。Tel 86-531-8364429; Fax 86-531-8565234; E-mail: qinyinbo@sdu.edu.cn

作者简介: 李从发(1967-), 男, 湖北省汉川人, 副教授, 博士研究生, 现主要从事手性化合物的生物转化研究。

收稿日期: 2002-09-11, 修回日期: 2002-11-29

台、潍坊、淄博等地。

1.3 培养基

1.3.1 初筛培养基 :NH₄Cl 2.0g ,K₂HPO₄ 1.55g ,NaH₂PO₄ 0.85g ,MgSO₄ · 7H₂O 0.2g ,CaCl₂ · 2H₂O 10mg ,FeSO₄ · 7H₂O 1.0mg ZnSO₄ 0.1mg 酵母膏 0.1g pH7.0 ,定容至 1L ,用前加入 0.2% 苯基环氧乙烷。

1.3.2 发酵培养基 :牛肉膏 10g ,蛋白胨 10g ,NaCl 5g pH7.0 ,定容至 1L。

1.3.3 斜面培养基 :牛肉膏 10g ,蛋白胨 10g ,NaCl 5g ,琼脂 18g pH7.0 ,定容至 1L。

1.4 菌种分离

取样品 1.0g 或 1.0mL ,加至 100mL 无菌水中制成悬浮液 ,充分振荡后取 30μL 上层清液 ,加至 3mL 初筛培养基中 ,于 30℃ ,130r/min 振荡培养 48h ,中间补加一次苯基环氧乙烷 ,然后按上法再次富集培养 48h。然后在平板培养基上划线分离 ,于 30℃温箱中培养 3 ~ 5d ,长出菌落后 ,挑单一菌落转接到斜面培养基上。

1.5 菌株初筛和复筛

将斜面菌种转接入 6mL 发酵培养基 ,于 30℃ ,130r/min 摇床上振荡培养 30h ,以 5 000r/min 离心 20min 后 ,收集菌体 ,加入 300μL 磷酸缓冲液(pH8.0)制成菌悬液 ,振荡均匀后取 150μL 加入微板中 ,再加入 50μL 0.17mol/L 苯基环氧乙烷的丙酮溶液 ,于 37℃ ~ 39℃ 保温 3h 后 ,加入三甘醇二甲醚、三乙胺及 0.23mol/L 4(对-硝基)苄基吡啶(甲氧基乙醇溶解)各 50μL ,于 39℃ 保温 45min 后 ,以 650nm 为参比波长 ,测定其在 580nm 处的吸光度 ,并与对照相比较^[6]。

将初筛所得菌株按上法培养并制成菌悬液 ,取 1mL 加入 0.2% 苯基环氧乙烷 ,于 30℃ ,130r/min 摇床上转化 8h 或 24h 后 ,10 000r/min 离心 5min ,上清液用 1mL 石油醚萃取 ,充分振荡 ,分液 ,取水层用毛细管电泳检测^[7]。

1.6 毛细管电泳

使用 P/ACE System-MDQ 高效毛细管电泳仪 ,石英毛细管柱总长度 37cm ,有效长度 27cm ;运行缓冲液 :含有 5%(W/V)磺酰化 β-环糊精的 25mmol/L 磷酸-三乙胺溶液(pH2.5) ;压力进样 0.5psi × 4s ;分离电压为 -20kV ,毛细管柱温度为 22℃ ,检测波长为 200nm ,采用反极性模式 ,阴极进样 ,阳极检测。

1.7 环氧化物水解酶活力的测定

环氧化物水解酶活力测定参照文献 [8] 进行。定义在上述条件下 ,每分钟水解 1μmol 苯基环氧乙烷所需的酶量为一个酶活力单位。

1.8 生物量的测定

取 10mL 发酵液经 10 000r/min 离心 5min ,水洗一次后 ,再次离心 ,于 90℃ 烘干至恒重 ,称重。

2 结果和讨论

2.1 初筛

以苯基环氧乙烷为唯一碳源 ,筛选到 500 多个能利用苯基环氧乙烷的菌株 ,其中绝大部分为细菌 ,其次为放线菌和少量丝状真菌。经初步检测 ,得到约 400 个具有环氧化物水解酶活力的菌株 ,这与环氧化物水解酶广泛存在于生物体内的报道相一致^[9]。

2.2 复筛

选择环氧化物水解酶活力较高的 110 株进行对映体选择性检测 ,得到一株编号为 463[#] 的细菌 ,水解苯基环氧乙烷时产生 (R)-苯基乙二醇 ,其 ee (Enantiomeric excess ,对映体过量)值为 100% ,转化率为 29%。

随后的研究还表明 ,该菌在水解缩水甘油酸酯类时 ,也表现出良好的对映体选择性 ,如水解反式-3-苯基缩水甘油酸乙酯时 ,保留的环氧化物为 (2R,3S)-3-苯基缩水甘油酸乙酯 ,其 ee 值达 100% ,转化率为 17% ;水解 4-苯基-2,3-环氧丁酸乙酯时 ,保留的环氧化物 (构型未鉴定) ee 值为 72.6% ,转化率为 45%。这一方面 ,迄今未见相关研究报道。因此选择 463[#] 菌株进行以下试验。

2.3 菌种鉴定

该菌在平板上培养 24h 后 ,菌落呈圆形 ,凸起 ,灰白色 ,半透明 ,表面光滑 ,湿润 ,边缘不规则。细胞杆状 ,革兰氏染色呈阳性 ,有鞭毛 ,能运动。芽孢圆形或椭圆形。兼性厌氧 ,接触酶阳性。根据文献 [10] ,该菌初步鉴定为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。

2.4 碳源对生长与产酶的影响

在初筛培养基中加入 0.2% 酵母膏和 1% 不同碳源 ,接种发酵 30h 后 ,分离菌体 ,测定酶活和生物量 ,结果如表 1。碳源对细胞生长和产酶影响较大 ,以甘油为碳源时细胞生长最好 ,但以葡萄糖为碳源时酶活最高 ,故以下试验中采用葡萄糖为碳源。

2.5 氮源对生长与产酶的影响

在初筛培养基(不加 NH_4Cl)中加入 1% 葡萄糖和 1% 不同氮源 ,接种发酵 30h 后 ,分离菌体 ,测定酶活和生物量 ,结果如表 2。

表 1 碳源对 <i>Bacillus</i> sp.463 生长与产酶的影响		
碳源/1%	生物量/(g/L)	EH 活性/(U/L)
葡萄糖	1.056	105.5
果糖	1.013	44.6
木糖	0.818	12.1
麦芽糖	0.925	22.6
乳糖	1.125	57.7
可溶性淀粉	0.813	44.9
甘油	1.475	54.0
蔗糖	0.875	75.9

表 2 氮源对 <i>Bacillus</i> sp.463 生长与产酶的影响		
氮源/1%	生物量/(g/L)	EH 活性/(U/L)
玉米浆	0.363	117.2
NH_4Cl	0.025	96.7
NH_4NO_3	0.044	135.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.025	157.0
牛肉膏	1.212	135.9
酵母膏	0.950	106.6
蛋白胨	0.588	97.8
脲	0.106	118.3

由表 2 可见 ,牛肉膏、酵母膏、蛋白胨等有机氮源可显著促进细胞生长 ,但其环氧化物水解酶比活力较低 , NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等无机氮源则对细胞生长的促进作用较小 ,所产酶活力却较高 ,比活力则更高 ,这种情形是比较特殊的。这也提示 ,氮源对 *Bacillus* sp. 463 菌株的生长和产酶具有重要的影响。唐燕发等^[11]报道 ,巨大芽孢杆菌合成环氧化物水解酶的能力几乎与细胞生长同步。产生这种差别的原因正在进一步研究中。

2.6 复合氮源对生长与产酶的影响

由于牛肉膏可显著促进细胞生长 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可显著促进产酶 ,将二者按一定比例混合之后 ,考察复合氮源对细胞生长和产酶的影响 ,结果如表 3。

表 3 复合氮源对 <i>Bacillus</i> sp.463 生长与产酶的影响		
复合氮源	生物量/(g/L)	EH 活性/(U/L)
1% 牛肉膏 + 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.738	68.7
1% 牛肉膏 + 0.6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.863	108.6
1% 牛肉膏 + 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.063	71.8
0.2% 牛肉膏 + 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.363	81.9
0.5% 牛肉膏 + 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.688	160.3
0.8% 牛肉膏 + 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.725	99.2
0.5% 牛肉膏 + 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.631	89.0

由表 3 可见 ,添加 0.5% 牛肉膏与 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 组成的复合氮源时 ,细胞生长较好 ,酶活力最高。

2.7 初始 pH 值对生长与产酶的影响

在初筛培养基(不加 NH₄Cl)中加入 1% 葡萄糖、0.5% 牛肉膏和 1%(NH₄)₂SO₄,调整至不同 pH 值,接种发酵 30h 后,分离菌体,测定酶活和生物量,结果如表 4。在中性或接近中性 pH 值时有利于 *Bacillus* sp.463 的产酶,这一范围也正是大多数微生物环氧化物水解酶作用的最适 pH 值范围。

2.8 底物的诱导作用

微生物环氧化物水解酶有些是可诱导的,有些则是组成型的。在初筛培养基(不加 NH₄Cl)中加入 1% 葡萄糖、0.5% 牛肉膏和 1%(NH₄)₂SO₄,调整 pH 值为 7.0,分别加入不同浓度的苯基环氧乙烷,接种发酵 30h 后,分离菌体,测定酶活和生物量,结果如表 5。

表 4 初始 pH 值对 *Bacillus* sp.463 生长与产酶的影响

初始 pH	生物量(g/L)	EH 活性(U/L)
6.0	0.468	114.9
6.5	0.462	122.3
7.0	0.462	134.5
7.5	0.469	114.2
8.0	0.475	124.8
8.5	0.500	111.7

表 5 底物对 *Bacillus* sp.463 生长与产酶的影响

底物浓度(mmol/L)	生物量(g/L)	EH 活性(U/L)
0	0.506	138.2
2(直接添加)	0.613	169.9
5(直接添加)	0.550	199.7
10(直接添加)	0.550	197.0
5(溶于丙酮)	0.475	174.0
10(溶于丙酮)	0.525	186.9
20(溶于丙酮)	0.500	120.6

由表 5 可见,低浓度(2 ~ 10 mmol/L)的苯基环氧乙烷直接添加至初筛培养基中,可明显促进产酶,这提示其环氧化物水解酶可能是一种诱导酶。将苯基环氧乙烷以丙酮溶解(400mmol/L)后加入,则在低浓度时对酶活力提高有明显的促进作用,但进一步提高其浓度至 20mmol/L,则对细胞生长和产酶均呈现明显的抑制作用。

参 考 文 献

[1] Cho B T , Choi O K. Facile synthesis of optically active styrene oxide derivatives by asymmetric reduction of substituted 2-sulfonyloxyacetophenones with (-)-3-Chlorodiisopinocampheylborane(dIpc2BCl). *Bull Korean Chem Soc* , 2001 , **22**(5) : 443 ~ 444.

[2] Finney N S. Enantioselective epoxide hydrolysis : catalysis involving microbes , mammals and metals. *Chemistry & Biology* , 1998 , **5** : 73 ~ 79.

[3] Archelas A , Furstoss R. Synthetic applications of epoxide hydrolase. *Current Opinion in Chemical Biology* , 2001 , **5** : 112 ~ 119.

[4] Genet J-P , de Andrade M C C , Ratovelomanana-Vidal V. A new enantioselective synthesis of glycidates via dynamic kinetic resolution of racemic 2-chloro-3-keto esters using chiral Ru(II) complexes. *Tetrahedron Lett* , 1995 , **36** : 2063 ~ 2066.

[5] Imashiro R , Kuroda T. Asymmetric synthesis of methyl(2R , 3S)-3-(4-methoxyphenyl) glycidate , a key intermediate of diltiazem , via Mukaiyama aldol reaction. *Tetrahedron Lett* , 2001 , **42** : 1313 ~ 1315.

[6] Zocher F , Enzelberger M M , Bornscheuer U T , et al. Epoxide hydrolase activity of *Streptomyces* strains. *J Biotechnol* , 2000 , **77** : 287 ~ 292.

[7] 沙 倩 , 杨 柳 , 王建军 , 等. 产环氧化物水解酶的黑曲霉菌种分离和发酵条件研究. *菌物系统* , 2001 , **20**(4) : 494 ~ 502.

[8] 唐燕发 , 许建和 , 叶 勤. 分光光度法测定环氧化物浓度与环氧化物水解酶活性. *分析科学学报* , 2002 , **18**(2) : 155 ~ 158.

142 ~ 444.

- [9] 唐燕发, 许建和, 叶 勤. 微生物环氧化物水解酶的研究与应用新进展. 化学通报(网络版) 2000, 13 00106.
- [10] Holt J G, Krig N R, Sneath P H A, *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore :Williams and Wilkins Company, 1994.
- [11] 唐燕发, 许建和, 武慧渊, 等. 高对映选择性环氧化物水解酶产生菌的筛选及特性研究. 微生物学通报, 2001, 28 (5): 14 ~ 17.

Isolation of a Bacterium Producing Epoxide Hydrolase with High Enantioselectivity and Optimization of Fermentation Conditions

Li Congfa^{1 2} Cui Hongjie³ Tian Xiuyun¹ Ji Aiguo³ Qu Yinbo^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

(² School of Engineering, South China University of Tropical Agriculture, Hainan 571737, China)

(³ School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract : A bacterial strain 463[#] producing epoxide hydrolase was isolated from oil-contaminated soils. It showed high enantioselectivity towards styrene oxide, and also towards glycidates, such as ethyl phenyl glycidate and ethyl benzyl glycidate. The strain was identified as *Bacillus* sp. The fermentation conditions for this strain were optimized. With 1% glucose as carbon source, 1% (NH₄)₂SO₄ and 0.5% beef extract as nitrogen source, *Bacillus* sp. 463 grew well and showed high epoxide hydrolase activity. In addition, 2 ~ 10 mmol/L styrene oxide could promote the production of epoxide hydrolase.

Key words : Epoxide hydrolase, Isolation, Enantioselectivity, Glycidates, Fermentation conditions