

产苯乙醇胺醇脱氢酶菌种筛选与发酵条件研究*

王佳亮 王建军 杨 柳 吴 襟 孙万儒**

(中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

关键词: 苯乙醇胺, 苯乙酰胺, 醇脱氢酶, 手性

中图分类号: Q554 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 05-0635-07

属于 β -受体阻滞剂的心血管药物, 多巴、儿茶酚胺类神经系统药物, 抗哮喘的氨哮素以及一些抗爱滋病药物都是苯乙醇胺的衍生物(Φ -CHOH-CH₂NH₂), 羟基连接的手性碳原子构型决定着化合物的生物学功能。通常只有 R 型对映体有效, 而 S 型对映体往往低效、无效、甚至有毒副作用^[1]。因此探索合成单一对映体形式的邻羟基胺类化合物的方法十分必要。

由于不对称碳原子与羟基相连, 利用醇脱氢酶有可能使之手性化^[2-5]。但因酶的底物特异性不同, 利用一般的醇脱氢酶难以实现此目的^[6-8]。我们以简单的芳香族邻羟基胺类化合物苯乙醇胺为模型化合物, 筛选到若干能以较高立体选择性转化苯乙醇胺的菌株; 从中选择较理想的一株菌 P163 进行了产酶条件研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 从不同地区采集土样中分离菌株和本组原保存菌株, 共 432 株。

1.1.2 试剂: 2-氨基-1-苯基乙醇(苯乙醇胺) Fluka 产品, 氨基苯乙酮(苯乙酰胺) 及 R-苯乙醇胺, NAD, NADH, 标准分子量蛋白为 Sigma 产品。NADP 和 NADPH 为 B.W 产品。胰蛋白胨, 酵母粉为 Oxoid 公司产品, β -羟丙基环糊精为 Acros 产品。其他为市售分析纯试剂。

1.2 仪器设备

紫外可见分光光度计为 Shimadzu 公司 UV-2201 型, 毛细管电泳仪为 BECKMAN 公司 P/ACE System MDQ 型。

1.3 实验方法

1.3.1 LB 培养基: NaCl 10g, 酵母粉 5g, 胰蛋白胨 10g, 定容至 1L, 调 pH 至 7.0, 0.1Pa 灭菌 30min, 备用。

1.3.2 富集平板培养基: Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.5g, KH₂PO₄ 1.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, CaCl₂ 10mg, FeSO₄ · H₂O 7mg, ZnSO₄ 0.1mg, 胰蛋白胨 0.1g, 酵母粉 0.1g, 苯乙醇胺 1.0g, 琼脂粉 20g, 定容至 1L, 调 pH 至 7.0, 0.1Pa 灭菌 30min, 备用。

1.3.3 发酵培养基: 每升 LB 培养基中加入 1g 苯乙醇胺作为诱导物, 0.1Pa 灭菌 30min, 备用。

1.3.4 培养及菌体收获: 菌体培养条件如不加以特别说明, 均接种后, 于 30℃, 240r/min, 摇床培养 36h。之后 8 000r/min 离心 10min, 弃上清, 所得菌体用适量 0.05mol/L, pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗两次, 离心得

* 国家自然科学基金资助(39670846)

** 联系人

作者简介: 王佳亮(1973-), 男, 浙江绍兴人, 浙江大学生化工程系毕业, 硕士, 2000 年赴美国北卡罗来纳州立大学攻读博士学位, 主要从事生物技术研究。

收稿日期: 2001-01-02, 修回日期: 2001-05-24

菌体,于低温保存。

1.3.5 醇脱氢酶活力的测定:使用氧化反应测定时,反应体系为 pH8.0,0.02mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液;使用还原反应测定时,反应体系为 pH7.0,0.02mol/L 磷酸缓冲液。含有浓度为 3mol/L NADP 或 NADPH, 3mmol/L 苯乙醇或苯乙胺酮,保温 2.0min 后,加入适量的酶液,在 340nm 下记录光吸收变化,换算成酶活力单位。一个酶活单位(U)定义为在上述条件下反应体系中每分钟生成或消耗 1.0 μ mol NAD(P)H 所需的酶量。

1.3.6 菌体的破碎:用 pH 8.0,0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液配制 0.1% 的菌悬浮液,在盐冰浴中进行超声波破碎。在 1000r/min 下离心 10min,获得的上清液即为无细胞酶提取液。

1.3.7 氧化反应样品制备:适量的菌体悬浮于 2.0mL 含 0.01% (w/v) 苯乙醇胺的 0.02mol/L Tris-HCl (pH8.0)缓冲液中,于 30℃,240r/min 旋转摇床上通气反应 12h,然后 10000r/min 离心 10min,取 0.1mL 上清加入 0.9mL 超纯水,经 0.22 μ m 的滤膜过滤,用于毛细管电泳分析。

1.3.8 还原反应样品制备:适量的菌体悬浮于 1.0mL 含 0.1% 苯乙胺酮的 0.02mol/L 磷酸(pH7.0)缓冲液中,反应体系中还含有 10% 葡萄糖,充分混合,密封隔氧,30℃,240r/min 摇床反应 24h,然后 1 000r/min 离心 10min,取 0.1mL 上清加入 0.9mL 超纯水,经 0.22 μ m 的滤膜过滤,用于毛细管电泳分析。

1.3.9 手性毛细管电泳分离^[9]:30cm 石英毛细管。电泳缓冲液为 0.1mol/L 磷酸,用三乙醇胺调 pH 值至 3.0,每毫升中加入 45mmol/L β -羟丙基环糊精,分离电压为 16kV。每次使用前用无水甲醇或乙醇冲洗毛细管 5min,每次上样前分别用 0.1mol/L NaOH,超纯水,依次冲洗 1 分钟,再用电泳缓冲液冲洗 0.5min, 0.1psi 下进样 2 秒,然后加电压进行分离。

2 结果和讨论

2.1 产苯乙醇胺醇脱氢酶菌种筛选

2.1.1 富集与分离:将采集的 30 余份土样各取 0.5g 悬浮于 1mL 蒸馏水中,稀释一千倍涂布于富集平板,30℃ 培养 3 d,挑取形态不同的菌落分别接种于牛肉汁斜面。斜面长成后,再次进行选择平板划线分离,挑单菌落接种在牛肉汁斜面上。共获得六十余株能在选择性平板上生长的菌株。另外,将本组保存的三百余株菌也分别进行选择平板划线分离,从中得到 140 余株能在选择性平板上生长的菌株。

2.1.2 初筛:将从选择性平板上获得的二百余株菌分别接种于 10mL 产酶培养基,30℃,240r/min 摇床上培养 48h,取 5.0mL,于 8000r/min 离心 10min。菌体用 0.5mol/L 的 Tris-HCl(pH8.0)缓冲液 2mL 洗涤两次后,悬浮于 2.0mL 含 0.1% 苯乙醇胺的 0.05mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液中,氧化转化 6h。转化后的溶液于 10000r/min 离心 10min,取上清在 300nm 测定光吸收,从中选取有较强吸收的菌株 62 株菌进行下一步实验(图 1)。

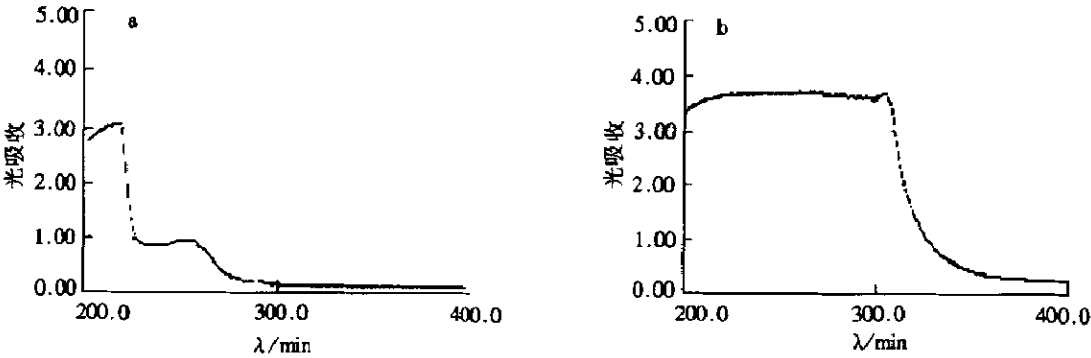


图 1 苯乙醇胺(a)和苯乙胺酮(b)的紫外吸收光谱图

由于苯乙醇胺的羟基被氧化后会形成一个与苯环共轭的碳氧双键,在 200 ~ 300nm 有强吸收;而苯乙醇胺在 300nm 处光吸收很低,因此测定 300nm 的光吸收即可判定氧化产物苯乙胺酮的产生,用于产酶菌种的筛选。

2.1.3 复筛:初筛获得的 62 株菌分别接种于 30mL 产酶培养基,培养 48h 后,测定生物量。取 5.0mL 培养物于 8000r/min 离心 10min,用 5.0mL,0.05mol/L 的 Tris-HCl(pH8.0)缓冲液洗涤两次后,悬浮于 2.0mL 含 0.1% 苯乙醇胺的同样缓冲液中,通气反应 6h。于 10000r/min 离心 10min,取 0.1mL 上清液用手性毛细管电泳检测剩余苯乙醇胺的对映体过量值(ee 值)。同时另取 5.0mL 的菌体进行还原反应,产物用手性毛细管电泳检测。从中筛选出对苯乙醇胺的立体选择性较高的菌株 18 株(表 1)。

表 1 复筛结果

菌株	生物量/OD ₆₀₀	相对活力/%	ee 值/%	构型
9	4.02	24.6	67	R
43	3.76	23.0	52	R
64	5.10	31.2	84	S
65	6.02	36.9	62	S
80	14.50	89.2	92	R
85	16.22	100	95	R
93	6.34	38.8	85	R
119	12.44	76.5	92	R
103	10.82	66.5	90	R
120	6.50	40.0	79	R
136	7.44	45.8	95	S
146	12.42	76.5	100	R
149	7.28	42.7	100	R
150	16.22	100	31	S
161	4.96	30.4	74	R
163	6.24	88.4	100	R
164	5.84	35.9	100	R
168	14.54	89.6	52	S

菌株 P163 的氧化和还原产物的毛细管电泳结果如图 2。经过多次重复实验,表明其相对转化率及立体选择性均佳,并且结果稳定,故选择它作为进一步研究对象。

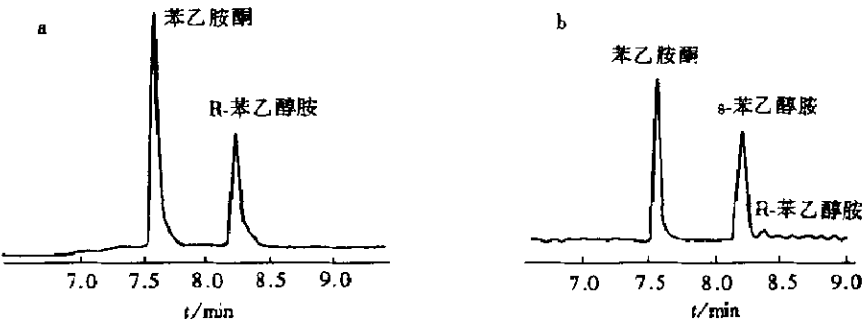


图 2 P163 菌还原苯乙胺酮(a)和氧化外消旋苯乙醇胺(b)的毛细管电泳图

2.1.4 P163 菌的菌种鉴定:P163 菌的形态为菌丝体断裂形成球状、杆状及带分枝的杆状菌体,革兰氏染色为阳性,细胞壁含有 I 型二氨基庚二酸、核糖和葡萄糖。根据分类学特点描述,P163 菌属于蛛菌属 (*Arachnia* sp.)。该属在分类上的地位并不十分明确,虽然目前将其划分在放线菌科,但不属于典型的放线菌。蛛菌属的革兰氏染色为阳性,其细胞壁最典型的特征就是含有 I 型二氨基庚二酸(L,L-DAP),这一点与其它大多数革兰氏阳性菌细胞壁中含有内消旋二氨基庚二酸不同。

2.2 产酶条件研究

2.2.1 诱导物浓度对苯乙醇胺醇脱氢酶形成的影响:在 10mL LB 培养基中分别加入一定量的苯乙醇胺,配成不同浓度的产酶培养基,接种,培养 40h 后,测定生物量,菌体破碎测定酶活,结果见表 2。

表 2 诱导物浓度对酶形成的影响

诱导物浓度/%	生物量/(g 湿细胞/L)	酶活力/(U/L)	比活力/(U/g 湿细胞)
0.2	0	0	0
0.15	7.60	1.52	0.20
0.1	15.10	2.72	0.18
0.66	18.15	2.36	0.13
0.33	20.00	1.80	0.09
0.01	21.00	0.84	0.04
0	21.18	0	0

结果表明该酶为诱导酶,随着诱导物浓度的上升,单位产酶量也相应增加。但菌体的生长受到诱导物的抑制。当苯乙醇胺的浓度超过 0.1% 后,对菌体生长的抑制作用明显增强。考虑到总产酶量,选择诱导物浓度在 0.1% 左右为宜。在 P163 菌的培养上清液中未检测到醇脱氢酶的酶活,表明该酶为非分泌型的胞内酶。

2.2.2 培养温度对苯乙醇胺醇脱氢酶形成的影响:在不同温度下培养 40h,其它条件不变,测定生物量后,破菌测定酶活,结果见表 3。

表 3 培养温度对苯乙醇胺醇脱氢酶形成的影响

培养温度/℃	生物量/(g 湿细胞/L)	酶活力/(U/L)	比活力/(U/g 湿细胞)
25	8.53	1.28	0.15
30	11.75	1.76	0.15
37	7.79	1.48	0.19
42	3.76	0.64	0.17
47	0	0	0

从以上结果可以看出,该菌是一个中温菌,不耐热。30℃ 左右是其生长和产酶的最适温度。而比活基本不受温度的影响。

2.2.3 培养基初始 pH 对产酶的影响:将产酶培养基的初始 pH 分别调至不同值,灭菌后接种,培养 40h,测定生物量及酶活,结果见表 4。

由表 4 的结果看出,初始 pH 对菌体生长和总产酶量的影响较大,但对比活的影响不是很大。初始 pH 在 6 到 7 之间时菌体的生长最佳。

表 4 初始 pH 对苯乙醇胺醇脱氢酶形成的影响

初始 pH	生物量/(g 湿细胞/L)	酶活力/(U/L)	比活力/(U/g 湿细胞)	终止 pH 值
5	9.37	2.53	0.27	8.12
6	16.42	4.60	0.28	8.08
7	16.32	4.08	0.25	8.25
8	13.38	3.48	0.26	8.33
9	9.10	2.64	0.29	8.69
10	5.90	1.24	0.21	8.81
11	0	0	0	10.89

2.2.4 碳源对酶形成的影响:含有 1.0% NaCl,1.0%胰蛋白酶及 0.1% 苯乙醇胺的培养基中加入 1.0% (w/v)的不同碳源,接种,培养 40h,测定生物量和酶活,结果见表 5。

表 5 碳源对苯乙醇胺醇脱氢酶形成的影响

碳源/1%	生物量/(g 湿细胞/L)	总活力/(U/L)	比活/(U/g 湿细胞)
葡萄糖	16.92	4.4	0.26
麦芽糖	10.00	2.5	0.25
乳糖	10.83	1.3	0.12
淀粉	15.65	3.6	0.23
甘油	12.85	1.8	0.14
异丙醇	11.00	3.3	0.30
乙酸钾	12.30	4.8	0.39
柠檬酸三钠	13.51	5.0	0.37
对照	9.54	2.1	0.22

结果表明该菌利用柠檬酸三钠和乙酸钾时,酶的总活和比活均较高,是酶的最佳碳源。可见三羧酸循环中的有机酸可能有利于产酶。

2.2.5 氮源对酶形成的影响:在含有 1.0% NaCl,1.0% 柠檬酸钠和 0.1% PEA 的基础培养基中加入 1.0% (w/v)的不同氮源,接种,培养 40h,测定生物量和酶活,结果见表 6。

表 6 氮源对苯乙醇胺醇脱氢酶形成的影响

氮源	生物量/(g 湿细胞/L)	总活力/(U/L)	比活/(U/g 湿细胞)
酵母粉	11.10	2.44	0.22
牛肉膏	13.71	3.84	0.28
胰蛋白酶	16.51	5.12	0.31
豆蛋白酶	9.75	1.95	0.20
鱼蛋白酶	9.14	1.92	0.21
尿素	6.76	2.84	0.42
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.69	3.28	0.49
NH ₄ Cl	6.36	3.12	0.49
(NH ₄) ₂ HPO ₄	7.41	3.56	0.48
NH ₄ NO ₃	5.85	2.44	0.41
对照	2.30	0	0

由表 6 结果可见,氮源对于产酶是必需的。该菌能利用有机氮源,也能较好地利用无机氮源。利用无机氮源发酵获得的生物量较低,酶比活力较高,相对来说磷酸氢二铵的效果最佳;使用有机氮源可获得高生物量,总酶活高,但比活相对较低。考虑到总产酶量的因素,选用胰蛋白胨较为适宜。

2.2.6 碳氮比对酶形成的影响:在含 1.0% NaCl,0.1% 酵母粉,0.1% 苯乙醇胺的基础培养基中,固定碳源为 1% 的柠檬酸钠,按重量百分比增加氮源胰蛋白胨的比例。接种,培养 40h 测定生物量,破菌测定酶活,结果见表 7。

表 7 碳氮源比例对苯乙醇胺醇脱氢酶形成的影响

碳氮比例	生物量/(g 湿细胞/L)	总活力/(U/L)	比活力/(U/g 湿细胞)
1:0	2.62	0	0
1:1	12.16	5.13	0.42
1:2	14.82	5.38	0.36
1:3	16.45	5.67	0.34
1:4	17.35	5.89	0.34

从这一结果中可以看到,在固定碳氮总量的条件下,氮源比例越高,总产酶量和生物量越大,对产酶是有利的,但比活随着氮源增加而减小。综合考虑以 1:1 碳氮源比较好。

2.2.7 培养基装量对酶形成的影响:在总容量为 120mL 的锥形摇瓶中分别装入不同体积的产酶培养基,接种,30℃ 培养 40h,测定生物量,破菌测定酶活,结果见表 8。

表 8 通气量对苯乙醇胺醇脱氢酶形成的影响

装量/mL	生物量/(g 湿细胞/L)	总活力/(U/L)	比活力/(U/g 湿细胞)
100	5.87	0.44	0.075
80	6.79	0.76	0.112
60	11.43	1.28	0.112
40	14.82	1.48	0.100
20	18.09	1.80	0.100
40(隔氧)	2.08	0	0

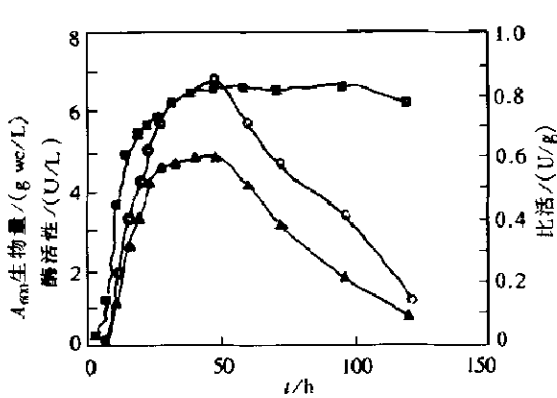


图 3 酶发酵的时间过程

■ 生物量; ◆ 酶活性; △ 比活。

氧对于产酶是必需的。通气量越大,菌体生长越好,总产酶量相应的也高。但通气量过大时,酶的比活略有下降。以 60mL/L 装量为宜。

2.2.4 时间对产酶的影响:在上述确定的条件下培养,定时取样,测定生物量和菌的酶活,结果见图 3。

从以上结果可以看到,该菌培养 20h 后就基本进入稳定期,但产酶高峰是在 50h 之后,虽然生物量变化不大,但酶活性急剧下降。说明菌体生长与产酶属地半耦联型。

参 考 文 献

[1] Ariens E J. *Eur J Clin Pharmacol*, 1984, **26**: 663 ~ 668.
[2] Jörnvall H, Höög J O, Van Bahr-Lindtröm H, et al. *Biochem Soc Trans*, 1988, **16**(3): 223 ~ 227.

- [3] Jörnvall H, Persson M, Jeffery J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(7): 4226 ~ 4230.
- [4] Kanerva L T. *Acta Chem Scandinavica*, 1996, **50**: 234 ~ 242.
- [5] Williamson V M, Paquin C E. *Mol Gen Genet*, 1987, **209**(2): 374 ~ 381.
- [6] Laned R J, Zeikus J G. *Biochem J*, 1982, **195**: 183 ~ 190.
- [7] Pham V T, Philips R S, Ijungdahl L G. *J Am Chem Soc*, 1989, **111**(5): 1935 ~ 1936.
- [8] Pham V T, Philips R S. *J Am Chem Soc*, 1990, **112**(9): 3629 ~ 3632.
- [9] 王建军, 郑国钧, 沙 倩, 等. 分析化学, 2001, (在印刷)

ISOLATION AND FERMENTATION CONDITIONS OF STRAINS PRODUCING 1-PHENYL-2-AMINO-ETHANOL ALCOHOL DEHYDROGENASE *

Wang Jialiang Wang Jianjun Yang Liu Wu Jin Sun Wanru * *

(State Key Laboratory of Microbiology Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A *Arachnia* sp. P163 producing alcohol dehydrogenase which is able to reduce aminoacetophenone to R-1-phenyl-2-aminoethanol was obtained from soil and cultures. The maximum activity of enzyme was produced by the LB medium containing 1% sodium citrate and peptone, 0.1% phenylaminoethanol as inducer at 30 °C for 48 hs.

Key words: Aminoacetophenone, Phenylaminoethanol, Alcohol dehydrogenase, Chirality

* This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation (39670846)

* * Responding author