

离子束注入提高 *Trichosporon lactis* T 立体拆分布洛芬水平的研究

谈重芳 陈林海 王雁萍 李宗伟 秦广雍*

(郑州大学物理工程学院 河南省离子束生物工程重点实验室 郑州 450052)

摘 要 :以从土壤中分离筛选到的可立体选择性水解布洛芬乙酯生成 S-布洛芬的菌株 *Trichosporon lactis* T 为出发菌株 ,对其进行能量 30KeV ,剂量 $1 \times 10^{15} \sim 5 \times 10^{15}$ ions/cm² 的低能 N⁺ 注入 ,筛选立体选择性水解布洛芬乙酯活性高的诱变株。菌株 *T. lactis* T 在 4×10^{15} ions/cm² 的诱变剂量下突变率最高 ,正向和负向突变率分别达 32.9% 和 37.1% ,因此选定该剂量为 *T. lactis* T 的最佳 N⁺ 离子注入剂量。经离子束诱变 ,通过初筛和复筛 ,共筛选到 7 株水解布洛芬乙酯的高产菌株 ,其中诱变株 K₁ 培养 24h 时酶活力比出发菌株 T 高 50% ,且具有较好的遗传稳定性。将菌株 K₁ 和出发菌株 T 培养 24h ,分别加入布洛芬乙酯水解 24h ,二者水解布洛芬乙酯生成 S-布洛芬旋光度均为 +54.1° ,对映体过量值 ee% 均为 98% ,K₁ 菌株水解的产量达 6.96g/L ,而出发株仅为 4.24g/L。

关键词 :低能离子注入 ;S-布洛芬 ;立体选择性 ;*Trichosporon lactis*

中图分类号 :Q937 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2006)02-0306-04

低能离子注入是一种比较有效的物理诱变手段 ,注入过程涉及能量交换、质量沉积、动量及电荷交换等因素^[1,2]。自上世纪 80 年代初 ,余增亮等将其应用于生物育种以来 ,至今已取得一系列显著成果。虞龙等^[3]将低能离子注入应用于 Vc 生产菌氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydan*)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的诱变 ,筛选到糖酸克分子转化率高达 94% 的高产菌株。袁成凌等^[4]经离子束连续诱变 ,获得一株花生四烯酸产量较出发株高 126.2% 的高产菌。布洛芬(Ibuprofen)有 S-和 R-布洛芬两种立体异构体。体外实验证明 S-布洛芬的药理活性为 R-布洛芬的 160 倍^[5,6]。Singer 等^[7]的研究表明 S-布洛芬在治疗骨关节炎时存在剂量-效应关系。游运辉等^[8]对 S-布洛芬栓剂进行了 II 期临床验证 ,证明一半剂量的 S-布洛芬 ,就可得到与布洛芬相同甚至更好的临床疗效以及更低的副反应发生率。因此 ,布洛芬的立体拆分是目前研究的一个热点。

生物拆分具有产物单一、杂质少和成本较低等特点 ,近年来一直受到药物学家的关注。Snell 等^[9]筛选到一株立体选择性水解消旋布洛芬酰胺生成 S-布洛芬的酵母菌 ,产物的对映体过量值 ee% 达 90% 以上。徐诗伟等^[10]筛选到了一株皮状丝胞酵

母(*Trichosporon cutaneum*) ,水解产量达到 5g/L。Bauer 等^[11]筛选到一株立体选择性水解消旋布洛芬酰胺生成 S-布洛芬的细菌 ,产物的 ee% 值也达 90% 以上。目前国内外生物法拆分布洛芬的水平尚不能达到工业化生产的要求。本研究利用离子束诱变提高 *T. lactis* T 立体选择性水解布洛芬乙酯能力 ,以期作为生物拆分法工业生产 S-布洛芬提供高产菌株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基 :① *Trichosporon lactis* T ,本实验室从土壤中分离。由本实验室和中科院微生物研究所共同鉴定 ,目前保藏于本实验室。② 筛选培养基 :每升含酵母抽提物 10g ,蛋白胨 8g ,葡萄糖 10g , K₂HPO₄ 3g ,布洛芬乙酯 20mL ,维多利亚蓝 5mL (n = 0.5%) ,琼脂粉 15g ,pH 7.0。③ 发酵培养基 :每升含酵母抽提物 10g ,蛋白胨 8g ,葡萄糖 10g , K₂HPO₄ 3g , pH 7.0。

1.1.2 主要试剂和仪器 :布洛芬乙酯由本实验室和河南省博凯生物医药科技中心合成 ,经检测无布洛芬残留。S-布洛芬购自 SIGMA 公司。甲醇为分析纯 ,由天津化学试剂厂生产。环己烷、正己烷及异丙

基金项目 :国家 973 项目 (2004CB719604)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-371-67767798 ;E-mail :Qinguangyong@zzu.edu.cn

作者简介 :谈重芳 (1973-) ,女 ,青海西宁市人 ,博士 ,副教授 ,主要从事离子束诱变工业微生物菌种选育和药物的生物酶立体拆分研究。

E-mail :tzhongfang@sohu.com

其他作者 :李宗义 ,苏明杰 ,杨天佑 ,段宇珩 ,霍裕平

收稿日期 :2005-08-30 ;接受日期 :2005-09-16 ;修回日期 :2005-12-19

醇均为分析纯,由上海试剂四赫维化工有限公司生产。其他化学试剂均为分析纯。752 紫外分光光度计由上海光学仪器厂制造。Titan 离子注入装置由俄罗斯制造。高效液相色谱仪为日本岛津制造,手性柱 Chiralcel OD column 为 DAICEL chemical industries 制造。

1.2 离子注入及剂量选择

活化的 *T. lactis* T 液体培养 24h 后,取 10mL 菌液 5000r/min 离心,弃上清,用无菌生理盐水制成菌悬液($OD_{600} = 1.5$),无菌过滤除去菌团及杂质,加入 15% 的甘油做保护剂,取 0.5mL 的菌悬液,均匀涂布于培养皿中,超净工作台干燥 15min,进行能量 30KeV、剂量为 $1 \sim 5 \times 10^{15}$ ions/cm² 的 N⁺ 离子注入。注入后用生理盐水洗脱菌体,制成菌悬液。将菌悬液适当稀释后,涂布于筛选培养基平板上,28℃ 培养 48h,以单菌落蓝色水解圈与菌落直径的比值为指标统计诱变结果。

1.3 高产菌株的筛选

能量 30KeV、剂量为 4×10^{15} ions/cm² 的 N⁺ 离子注入后,制成菌悬液,将菌悬液适当稀释后,涂布于筛选培养基平板上,28℃ 培养 48h,挑取菌落周围蓝色水解圈与菌落直径的比值大于出发株 15% 的单菌落,斜面保存。将初筛菌株分别接入已装 30mL 发酵培养基的 250mL 角瓶中进行复筛,28℃ 200r/min 培养 24h,测定菌株水解布洛芬乙酯的酶活。与原始出发株相比筛选出高产菌株。

1.4 遗传稳定性试验

将每个菌株连续传 5 代,同时接种于装有 30mL 液体培养基的 250mL 三角瓶中进行液体发酵(28℃, 200r/min),每个菌株的每一代均为 3 个平行,发酵进行至 24h,分别测定 5 代菌株的酶活力。

1.5 布洛芬乙酯的水解及水解产物 S-布洛芬的提取

活化实验菌株→接入已装 30mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中→28℃, 200r/min 培养 24h→加入 4% 布洛芬乙酯水解 24h→1mol/L 的 HCl 调整 pH < 3→加入 30mL 的环己烷 200r/min 摇床震荡 2h→静置分层,取有机相→加入 30mL 0.1mol/L 的 K₂HPO₄ 后 200r/min 震荡 2h→静置分层,取水相→1mol/L 的 HCl 调整 pH < 3→白色晶体为 S-布洛芬。

1.6 生长曲线和产酶曲线的绘制

实验菌株经活化后接入已装 80mL 发酵培养基的 500mL 三角瓶中,每 6h 取 5mL 菌液 600nm 下测定菌体浓度,同时测定酶活。连续取样至 48h,绘制

生长曲线和酶活曲线。

1.7 酶活的测定

参考文献 [12] 测定酶活。酶活定义:按资料方法 28℃, pH 为 8.0 时,每分钟水解布洛芬乙酯生成 1μmol 布洛芬所需的酶量。

1.8 产品旋光度的测定

样品布洛芬溶于甲醇(浓度 > 0.1%, 100% 的甲醇),以甲醇为空白,用旋光仪测定并计算比旋光度。

1.9 产品 ee% 值的测定

ee% 值的测定按文献 [11] 的方法进行,首先将水解液中的产品 S-布洛芬提取出来,经纯化后将其转化成 S-布洛芬乙酯,再通过高效液相色谱的手性柱测定 ee%。流动相为正己烷:异丙醇 180:1,流动相流速为 0.4mL/min。

2 结果和分析

2.1 离子注入诱变剂量的选择

能量 30KeV, 剂量 $1 \sim 5 \times 10^{15}$ ions/cm² 的 N⁺ 注入后,在各个剂量的筛选平板上随机挑 70 个单菌落,以单菌落蓝色水解圈与菌落直径的比值大于出发株 5% 为正突变,小于 5% 为负突变,介于二者之间的为不突变,图 1 为诱变统计结果。

从图 1 可以看出,在 $1 \sim 5 \times 10^{15}$ ions/cm² 的剂量范围内,*T. lactis* T 的正向突变率呈现先增加后下降的趋势,在 4×10^{15} ions/cm² 的诱变剂量下,突变率最高,正向和负向突变分别达 32.9% 和 37.1%,说明在该剂量下容易得到更多的突变株,因此选定 4×10^{15} ions/cm² 为 *T. lactis* T 的 N⁺ 离子注入诱变剂量。

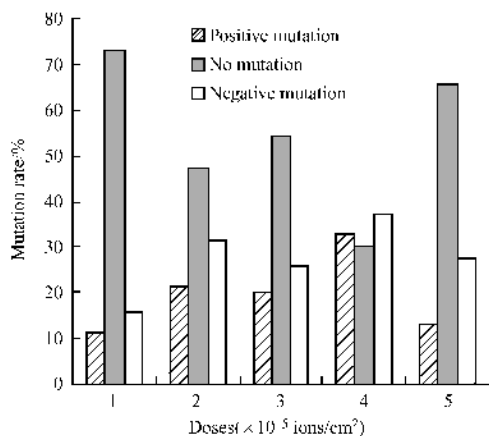


图 1 不同剂量 N⁺ 离子注入诱变后初筛结果

Fig.1 The pre-screening result of different dose N⁺ implanting.

2.2 高产菌株的筛选

2.2.1 初筛和复筛:原始出发株 T 经离子束诱变,以

单菌落在培养基上形成蓝色水解圈与菌落直径的比值大于出发株 15% 为指标,经过大量的初筛,共得到了 69 株正变菌株。将 69 株初筛菌落分别编号为 $K_1 \sim K_{69}$,以摇瓶发酵产量比出发株酶活(24h 的平均

酶活 4.11U)高 20% 以上为指标,进行复筛。经过复筛,共筛选到 7 株水解布洛芬乙酯的高产菌株(表 1)。其中 K_1 、 K_2 和 K_{42} 表现十分突出,酶活平均分别达到 6.48 U、7.83 U 和 6.28 U。

表 1 复筛结果

Table 1 The high yield strains of re-screening

Strains	K_1	K_2	K_6	K_{17}	K_{28}	K_{42}	K_{54}
Enzyme activity ($\bar{X} \pm S, U$)	6.48 ± 0.092	7.83 ± 0.052	5.73 ± 0.026	5.07 ± 0.060	5.55 ± 0.060	6.28 ± 0.090	6.02 ± 0.030

2.2.2 遗传稳定性实验:7 株高产菌株的遗传稳定性考察结果如表 2,从表 2 可以看出, K_1 菌株在传代实验中表现最为稳定,与第一代水解布洛芬乙酯能力相比,菌株传 5 代 24h 发酵相对水解能力基本保持稳定。而 K_2 菌株在第一代表现出了比较突出的水

解活性,但随着传代次数增加水解活性逐渐下降,到第四代已经和出发株持平。 K_{17} 、 K_{28} 、 K_{54} 菌株在前 3 代都表现出比较突出的水解活性,到第四代活性则大幅度下降。因此,选定 K_1 菌株为进一步研究的试验菌株。

表 2 诱变株的遗传稳定性考察结果

Table 2 The result of genetic stability of mutagenizing strain

Strains	Enzyme activity($\bar{X} \pm S, U$)				
	F1	F2	F3	F4	F5
K_1	6.48 ± 0.092	6.28 ± 0.084	6.64 ± 0.076	6.18 ± 0.095	6.43 ± 0.053
K_2	7.83 ± 0.052	5.21 ± 0.085	5.77 ± 0.046	4.37 ± 0.086	4.74 ± 0.031
K_6	5.73 ± 0.026	4.16 ± 0.038	4.09 ± 0.040	3.86 ± 0.120	4.03 ± 0.095
K_{17}	5.07 ± 0.060	5.55 ± 0.048	5.21 ± 0.106	4.70 ± 0.093	4.45 ± 0.210
K_{28}	5.55 ± 0.060	5.88 ± 0.098	5.10 ± 0.022	4.45 ± 0.038	4.03 ± 0.086
K_{42}	6.28 ± 0.090	4.28 ± 0.097	4.16 ± 0.081	3.94 ± 0.081	4.04 ± 0.076
K_{54}	6.02 ± 0.030	5.55 ± 0.085	6.15 ± 0.103	4.33 ± 0.056	4.42 ± 0.098
The initial strain	4.02 ± 0.120	4.12 ± 0.045	4.18 ± 0.089	4.10 ± 0.034	4.12 ± 0.067

2.3 诱变株 K_1 产酶特性的初步研究

图 2 为出发菌株 T 与诱变菌株 K_1 的生长曲线和产酶曲线。从图中可以看出,在开始发酵的 24h 内, T 菌株和 K_1 菌株的布洛芬乙酯的水解活性均随着生物量的增加而增加, K_1 菌株的酶活在 24h 达

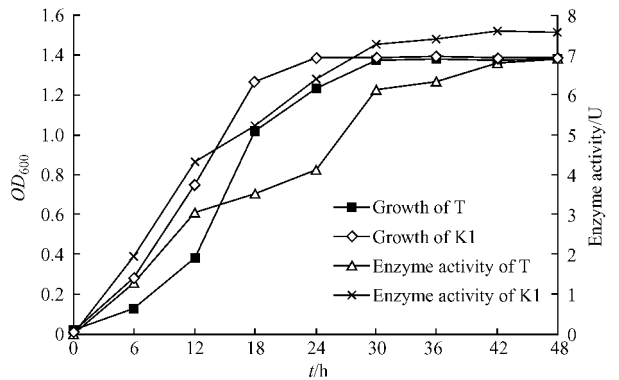


图 2 出发菌株 *T. lactis* T 与诱变菌株 K_1 的生长曲线和产酶曲线

Fig.2 The curve of growth and enzyme activity of *T. lactis* T and K_1 .

6.40U,这比出发株 T 同期酶活 4.11U 高 50% 以上。24h 后二者生物量的增加均不显著, K_1 的酶活虽有增加,但增加速度已很缓慢,而出发株 T 的酶活在 24-30h 内升高的很快,30h 后也进入较为缓慢的增加阶段。42h 后二者的酶活均不再增加,此时 K_1 的酶活为 7.60U,略高于 T 的酶活(6.80U)。诱变株 K_1 的酶活高于出发株 T,并且产酶高峰期比出发株 T 提前 6h,这能大大降低发酵成本,从而有利于工业生产。

2.4 诱变株 K_1 水解布洛芬乙酯的水平及产物特性

将 K_1 菌株和 T 菌株培养 24h,分别加入布洛芬乙酯水解 24h。由表 3 可知, K_1 菌株的水解产量为 6.96g/L,而 T 菌株在同样条件下的水解产量为 4.24g/L。将二者的水解产物 S-布洛芬与 SIGMA 公司的标准 S-布洛芬的旋光度相比, K_1 菌株的水解产物 S-布洛芬的旋光度为 $+54.1^\circ$,ee% 值达到 98%,保留了出发株 T 水解产物 S-布洛芬旋光度和 ee% 高的优点。

表 3 K_1 和 T 菌株水解产物性质的比较

Table 3 The property comparison of the products of *T. lactis* K_1 and T

Item	The products of K_1	The products of T	Standard S-ibuprofen
The yield (g/L)	6.96	4.24	-
The rotation	54.1	54.1	54.6
The ee%	98%	98%	100%

3 结论

通过实验,得出如下结论。①通过离子束诱变 *Trichosporon lactis* T 得到一株立体选择性水解布洛芬乙酯生成 S-布洛芬的高产菌株 *Trichosporon lactis* K_1 。② K_1 菌株的水解产物 S-布洛芬产量为 6.96g/L,其旋光度为 +54.1°,ee% 值达到 98%,保留了出发株 T 水解产物 S-布洛芬旋光度和 ee% 高的优点。

参 考 文 献

[1] 余增亮,霍裕平. 离子注入生物效应评述. 安徽农业大学学报,1994,21(3):221-225.

[2] 余增亮主编.离子束生物技术导论.合肥:安徽科学技术出版社,1998,165-182.

[3] 虞龙,许安,王纪,等.低能离子注入在 V_c 高产菌株选育中的应用.激光生物学报,1999,18(3):217-220.

[4] 袁成凌,王纪,姚建铭,等.低能离子注入花生四烯酸产生菌诱变选育及其产业化研究.高技术通讯,2003,13(6):22-25.

[5] Danuta ZD, Marek N. A pleiotropic antiatherogenic action of ibuprofen. *Med Sci Monit*, 2001, 7(4):837-841.

[6] Iton T, Maruyama J, Tsude Y, et al. Stereoselective pharmacokinetics of ibuprofen in rat: effects of enantiomer-enantiomer interaction in plasma protein binding. *Chirality*, 1997, 9(4):354.

[7] Singer F, Maythofer F. Evaluation of the efficacy and dose-response relationship of dexibuprofen (S(+)-ibuprofen) in patients with osteoarthritis of the hip and comparison with racemic ibuprofen using the WOMAC osteoarthritis index. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2000, 38(1):15-24.

[8] 游运辉,吴彩玲,高洁生,等.右旋布洛芬栓剂的 II 期临床研究.中南大学学报(医学版),2004,29(4):457-459.

[9] Snell D, Colby J. Enantioselective hydrolysis of racemic ibuprofen amide to S(+)-ibuprofen by *Rhodococcus* AJ270. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 24(15):160-163.

[10] 徐诗伟,徐清.微生物酶不对称水解合成 S-布洛芬的研究 I. 高度立体选择性菌株的筛选.微生物学报,1995,35(3):190-196.

[11] Bauer R, Hirdlinger B, Layh N, et al. Enantioselective hydrolysis of racemic 2-phenylpropionitrile and other (R, S)-2-arylpropionitriles by a new bacterial isolate, tumefaciens strain d3. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 42:1-7.

[12] 沈端,许建和,宫鹏飞,等.酮基布洛芬拆分用酯酶产生菌的筛选及其催化特性.微生物学通报,2002,29(1):45-49.

Study on ion beam mutagenizing of the *Trichosporon lactis* T for enantioselective separation of ibuprofen

TAN Zhong-fang ,CHEN Lin-hai ,WANG Yan-ping ,LI Zong-wei ,QIN Guang-yong*

(Key Lab of Ion Beam Bio-engineering of Henan Province , Physical Science & Technology College , Zhengzhou University , Zhengzhou 450052 , China)

Abstract :The initial strain , *Trichosporon Lactis* T , isolated from soil sample , having the capability of enantioselectively hydrolyzing S-isomer of racemic ibuprofen ethyl-ester into the corresponding S-ibuprofen , was implanted by 30KeV , 1×10^{15} ions/cm² ~ 5×10^{15} ions/cm² low-energy N⁺ for the purpose of obtaining mutants with high-efficiency hydrolyzing enzyme to produce active S-ibuprofen. Under the dosage of 30KeV , 4×10^{15} ions/cm² , the mutation rate is the highest , with 32.9 % positive and 37.1 % negative mutant , respectively. Therefore , 30KeV , 4×10^{15} ions/cm² is chosen as the optimal implantation dosage. Under optimal implantation dosage , seven mutants with high-efficiency hydrolyzing enzyme are selected after N⁺ implantation. The genetic stability test shows that T. lactis K_1 , one of the seven mutants , has a stable hydrolyzing ability during consecutive five-generation. The enzyme activity of T. lactis K_1 is higher with 50 % than that of the initial strain after 24h cultivation , and the highest enzyme activity of T. lactis K_1 appears 6h earlier than that of the initial strain. After 24h cultivation and succeeding 24h incubation with ibuprofen ethyl ester , the S-ibuprofen production of T. lactis K_1 is 6.96g/L , 64.2 % higher than that of T. lactis T , which only produces 4.24g/L S-ibuprofen at the same time , the specific rotation and enantiomeric excess (ee %) of the S-ibuprofen produced by two stains , however , are the same , + 54.1° and 98 % , respectively.

Keywords : Implanting of low energy N⁺ ion ; S-ibuprofen ; Enantioselectivity ; *Trichosporon lactis*

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719604)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-371-67767798 ; E-mail :Qinguangyong@zzu.edu.cn

Other authors :LI Zong-yi ,SHU Ming-jie ,YANG Tian-you ,DUAN Yu-heng ,HUO Yu-ping

Received : 30 August 2005/Accepted : 16 September 2005/Revised : 19 December 2005