

一株吡虫啉羟基化菌株及其转化产物的鉴定

葛 峰,戴亦军,陈 婷,袁 生*

(南京师范大学生命科学学院 江苏省资源生物技术重点实验室 南京师范大学微生物工程重点实验室 南京 210097)

摘 要:从南京地区的土壤中筛选出一株命名为 NJ2 的菌株,该菌株的静息细胞可催化杀虫剂吡虫啉为一种极性更大的化合物。经 BioMerieux Vitek 自动微生物分析系统仪和 16S rDNA 序列分析,NJ2 菌株鉴定为嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)。采用有机溶剂萃取和重结晶可得到转化产物晶体,质谱分析结果显示转化产物分子离子峰为 272,而底物分子离子峰为 256,表明转化产物为吡虫啉的羟基化产物。核磁共振分析进一步表明羟基位于吡虫啉咪唑烷环上的 5' 碳原子上。转化动力学测试结果表明,转化 10d 后,吡虫啉的含量减少了 1.15mmol/L,转化产物的含量达到 1.10mmol/L,摩尔转化系数为 95.9%。*S. maltophilia* NJ2 持续转化能力强和高摩尔转换系数的特点,可用于工业生产羟基吡虫啉并进一步合成更高杀虫活性的烯式吡虫啉。

关键词:吡虫啉;5-羟基吡虫啉;生物转化;嗜麦芽寡养单胞菌;羟基化

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)04-0557-04

吡虫啉(Imidacloprid,IMI)是拜尔公司开发的一种新型高效内吸烟碱类杀虫剂,其化学名称为 1-(6-氯-3-吡啶甲基)-N-硝基-咪唑啉-2-亚胺^[1,2]。IMI 具有显著的生物活性,广谱杀虫活性,对温血动物低毒和较好的植物相容性等特点。IMI 的杀虫机制是以昆虫烟碱乙酰胆碱受体为靶标,干扰昆虫神经系统的刺激传导,造成神经传导物质乙酰胆碱的积累,从而导致昆虫麻痹死亡^[3]。目前,IMI 已经在全球 120 多个国家登记并在 140 多种作物上使用^[4]。

IMI 用于控制植物害虫时,常采用叶面喷洒、土壤浸透、种子包衣和茎干处理等方式。其中土壤浸透法持续作用时间更长,控制害虫效果更好,其原因在于 IMI 可在土壤中代谢为 5-hydroxy IMI。5-hydroxy IMI 进一步脱水生成 olefin IMI(图 1)。olefin IMI 对白飞虱的生物活性是 IMI 的 10 倍^[5],对桃蚜与棉蚜的生物活性是 IMI 的 16 倍^[6]。

生物转化技术因其高效性、多样性、底物专一性、区域选择性、化学选择性、对映选择性以及温和的反应条件等特点,被誉为继医药生物技术和农业生物技术之后的“第三次生物技术浪潮”^[7]。由于化学合成法实行羟基化难于进行,目前国内外未见有化学法合成 5-hydroxy IMI 公开报道;Olefin IMI 虽然可由 2-硝基氨基咪唑啉和 2-氯-5-氯甲基吡啶^[8],氨基乙醛二乙基乙醛或乙二胺合成^[9],但合成过程复杂,得率低。因此在国家“十五”科技攻关项目“新农药化学工程与生物技术相结合的创新方法的研究”的资助下,本实验室从土壤中筛选可转化 IMI 的菌株,

采用微生物转化法制备 5-hydroxy IMI,并用酸处理法由 5-hydroxy IMI 较容易地生成 olefin IMI,经生物活性测试,olefin IMI 对蚕豆蚜的生物活性是 IMI 的 19 倍。本文报道了从南京地区的土壤中筛选到一株具有较强转化 IMI 能力和较高摩尔转换系数的菌株,对其进行了菌种鉴定并对转化产物进行结构表征,确定转化产物为 5-hydroxy IMI。

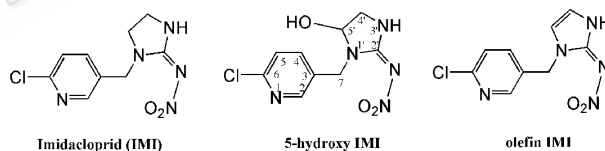


图 1 IMI 及其代谢物的化学结构式

Fig.1 Chemical structures of IMI and its metabolites.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:NJ2 菌株是由本实验室从南京紫金山、南京农药厂污水池等地采集的土壤中分离得到。

1.1.2 培养基和培养条件:富集培养基 A:每升含葡萄糖 10g, KH_2PO_4 1.36g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.34g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005g, pH 7.5。种子和发酵培养基 B:LB 培养基。培养条件 30℃ 220r/min 转速下振荡培养。

1.1.3 主要试剂和仪器:所有试剂均为分析纯,购于上海生工生物工程技术有限公司。3K30 高速冷冻离心机购自 Sigma 公司;HD-930 型全温摇床

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2004BA308A22-12);江苏省高校自然科学基金(04KJB180071)

* 通讯作者。Tel:86-25-83598790;Fax:86-25-83598723;E-mail:shengyuan@email.njnu.edu.cn

作者简介:葛 峰(1981-)男,江苏人,硕士研究生,主要从事药物中间体及农药的微生物转化研究。E-mail:fengge420@126.com

收稿日期:2005-09-19;接受日期:2005-11-12;修回日期:2006-03-24

购自太仓博莱特仪器厂;LC-MSD-Trip-SL-01100 液质联用仪购自 Agilent 公司;Avance400 核磁共振仪购自 Bruker 公司;PTC-100 型 PCR 仪购自 MJ Research 公司;H600-11 投射电镜购于日立公司;GBCS-5B-1 型发酵罐购于镇江东方生物工程设备技术有限公司。

1.2 菌种筛选

取 1g 土壤加入到内有 200mL 培养基 A 的 500mL 三角瓶中,培养 5d 后,取培养液稀释适当倍数,涂布 LB 固体培养基。待平板上长出菌落后,挑取单菌落接种 LB 斜面。30℃ 培养 1~2d 后,斜面置于 4℃ 冰箱中保藏。

1.3 转化

斜面菌种在 LB 活化培养后,取 25mL 菌液离心收集细胞,并用 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 8.0)洗涤一次后,悬浮于含 5mg IMI,500mg 蔗糖的 10mL 上述磷酸盐缓冲液中,菌悬液于 100mL 三角瓶中进行转化。实验过程中分别设置底物和菌体对照,以排除非微生物因素引起的底物结构的改变和菌体代谢物的干扰。转化停止后,补足蒸发的水分后取样,样品于 8000r/min 离心 5min,收集上清液。根据产物的含量稀释相应倍数后进行 HPLC 分析。HPLC 色谱柱为 Agilent Zorbax OSD 柱(250 μ m \times 4.6 μ m),进样体积为 20 μ L,柱温为室温,检测器为 Agilent G1314A 紫外检测器,波长为 269nm,流动相:A 经 0.22 μ m 微孔过滤膜过滤的双蒸水,加入 0.1%(V/V)色谱级乙酸,B 色谱级乙腈,加入 0.1%(V/V)色谱级乙酸,A:B=75:25,流速为 1mL/min^[10]。

1.4 形态特征的观察

用磷钨酸钠染色后在投射电子显微镜下观察 NJ2 菌的鞭毛和细胞形态,在 LB 培养基的固体平板上观察 24h 菌龄的菌落形态,穿刺接种 LB 半固体培养基观察菌体对氧的需求。

1.5 生理生化特征测定

生理生化反应测定均在 BioMerieux Vitek 自动微生物分析系统仪进行,鉴定系统为 ATB Expression system(ID32 STREP)^[11]。

1.6 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析

基因组 DNA 的提取按照《精编分子生物学实验指南》一书,并参照 Frederick 等的方法进行^[12]。16S rDNA 片段的扩增按照 Hurex 等方法^[13],采用一对通用引物 K1(5'-AACTGAAGAGTTTGATCCTGGCTC-3')和 K2(5'-TACGGTTACCTGTTACGACTT-3'),分别对应于大肠杆菌 16S rDNA 的 2~25nt 和 1479~1500nt。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证后,送由上海博亚生物科技有限公司测序。测得 16S rDNA

序列通过 Internet 在美国生物技术信息中心(NCBI)核酸数据库中进行 Blastn 搜索。

1.7 转化产物提取

接种平板培养菌落一环于含 300mL 培养液 B 的 1000mL 三角瓶中,振荡培养 13h 后接种到内含 LB 培养液 3.2L 的 5L 发酵罐,发酵液加入 0.1% XPJ-SP58 型消泡剂(淮安塞欧消泡剂厂)。发酵条件为转速 500r/min,温度 30℃,通气量 3L/min,罐压维持在 0.1MPa。发酵 12h 后,发酵液于 4500r/min 离心 20min,菌体沉淀转入到含 3.0L 含 3g IMI 的转化液中进行转化 72h,转化条件同发酵条件。

转化液于 4500r/min 离心 20min,上清液加入 20% 体积的二氯甲烷,振荡萃取去除未转化的底物,重复上述步骤一次。萃取后的水相加入等体积的乙酸乙酯萃取,在乙酸乙酯萃取液中加入少量无水乙酸钠吸除水分,然后于旋转蒸发器中 50℃ 减压蒸馏浓缩。待浓缩至原体积的 1/20 后,用 0.22 μ m 的有机相滤膜(ANPEL,上海安谱)抽滤。滤液继续减压蒸馏至有白色的针状晶体析出。晶体用适量热乙腈重新溶解,4℃ 冷却重结晶,晶体于室温下真空干燥至恒重,-20℃ 保存。

1.8 转化产物结构鉴定

LC-MS/MS 分析采用电离喷雾阳离子法测定。根据样品的保留时间和质荷比(m/z)推导产物可能的结构,其中 m 表示质量, z 表示电荷。

核磁共振分析仪采用 Bruker AV-400,DMSO- d_6 为溶剂。¹H 和 ¹³C 核磁共振光谱工作频率分别为 400 MHz 和 100 MHz。化学位移采用 TMS 为内标测定。采用 DEPT 谱测定碳原子的级数;2D-NMR 技术如 ¹H-¹H COSY 等来确定碳原子和氢原子化学位移。

2 结果和分析

2.1 转化 IMI 菌株的筛选与鉴定

以 IMI 为唯一氮源进行定向富集培养,从土壤中筛选到几株可转化 IMI 为一种极性更大的化合物的菌株,其中 NJ2 的菌株具有比其他菌株高很多的转化能力,因此以 NJ2 菌株作为后续研究对象。

2.1.1 形态与培养特征 :NJ2 菌株的形态为短杆状,长 1.2 μ m~1.5 μ m,宽 0.8 μ m~1 μ m,革兰氏阴性,无芽胞,有亚极生鞭毛,好氧,在 LB 平板上 30℃ 培养 24h 后,菌落呈圆形光滑状、湿润、不透明、边缘整齐、淡黄色、易挑取。在 LB 培养液中呈混浊,不形成菌膜。

2.1.2 生理生化特征和 16S rDNA 的分析 :NJ2 菌株氧化酶呈阳性,生理生化反应 8h 的检测结果显示 1, NJ2 菌株鉴定为嗜麦芽寡养单胞菌

(*Stenotrophomonas maltophilia*) 的概率为 98%。NJ2 菌株的 16S rDNA (1395bp) 在 GenBank 中的登录号为 DQ060530, 与模式菌株 *S. maltophilia* 菌株 (AB008509) 的相似性为 99%。

表 1 NJ2 菌株的 BioMerieux Vitek 自动微生物分析系统仪鉴定结果

Table 1 Results of identification of NJ2 strains by BioMerieux Vitek auto microbial system

Substrates	Result	Substrates	Result
2- <i>A</i> 4'-Trichloro-2'-Hydroxydiphenylether	+	Mannitol	-
Glucose oxidase	+	Xylose	+
Peptone	+	Raffinose	-
Acetamide	-	Sorbitol	+
Esculin	+	Sucrose	-
Indoxyl- β -D-Glucoside	-	Inositol	-
Urea	-	Adonitol	-
Citrate	-	p-Coumaric	-
Malonate	-	H ₂ S	-
Tryptophan	-	ONPG	-
Polymyxin B	-	Rhamnose	-
Lactose	-	L-arabinose	-
Maltose	-	Glucose	-

2.2 转化产物的结构鉴定

一级质谱结果(图 2-A)显示转化产物分子离子峰值 m/z 272(M+H), 与 IMI 分子离子峰值 m/z 256 相比分子量增加了 16, 因而推测转化产物为 IMI 的羟基化衍生物或者羟基化 IMI。图 2-B 为转化产物的二级质谱图, 主要碎片离子峰解析如下: 228.0 (M-CH₂-CH-OH + H⁺), 225.0 (M-NO₂), 190.0 (M-NO₂-Cl)。这一结果与 Francois 等^[14]报道的 5-hydroxy IMI 的二级质谱图基本一致, 但仅有质谱分析仍不能确认转化产物是 5-hydroxy IMI。

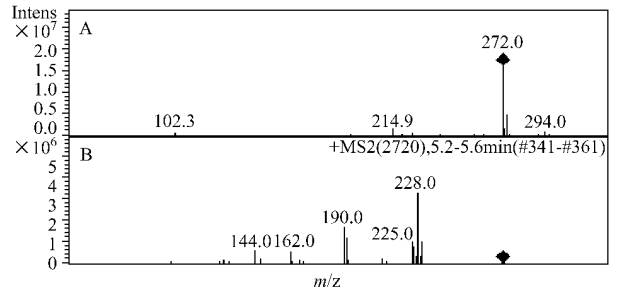


图 2 转化产物质谱图
Fig.2 Mass spectrum for biotransformation product.

为了进一步确证产物羟基的位置, 对转化产物进行了核磁共振光谱分析, ¹³C 和 ¹H NMR 数据的解析结果见表 2。NMR 解析参考了文献 [15] 中列出的吡啶环和咪唑烷环等含氮杂环化合物的 ¹H 和 ¹³C 的化学位移参考值以及 Chemoffice 9.0 软件的 ¹H 和 ¹³C 预测软件包。¹³C 和 ¹H NMR 的解析结果确认 *S.*

maltophilia NJ2 的羟基化 IMI 的位置发生于咪唑烷环上的 C5'位上, 该化合物通常被称之为 5-hydroxy IMI。

表 2 转化产物的 ¹³C-NMR 和 ¹H-NMR 化学位移解析

Table 2 ¹³C-NMR and ¹H-NMR chemical shift assignments for biotransformation product in dimethyl sulfoxide

Position	¹³ C data		¹ H data			
	δ	mult.	δ	mult.	int.	J in Hz
2	149.7	d	8.39	d	1H	2.1
3	132.9	s			1H	
4	139.7	d	7.82	dd	1H	8.2, 2.3
5	124.5	d	7.50	d	1H	8.2
6	149.6	s				
7	41.8	t	4.424.58	d	1H	16.1
				d	1H	16.1
2'	158.9	s				
3'			9.15	s	1H	
4'	50.6	t	3.37	dd	1H	12.3, 2.5
			3.84	dd	1H	12.0, 7.6
5'	80.3	d	5.26	ddd	1H	7.5, 7.6, 2.5
5'-OH			6.81	d	1H	7.5

2.3 NJ2 菌株的 IMI 转化曲线

NJ2 菌株的静息细胞羟基化 IMI 的动力学分析结果见图 3。随着产物 5-hydroxy IMI 的不断积累, 底物 IMI 的含量逐渐减少。转化 10d 后, IMI 减少了 1.15mmol/L, 而 5-hydroxy IMI 增加到 1.10mmol/L, 底物转变为产物的摩尔转换系数可达 95.9%。由于 IMI 在水中的溶解度为 0.61g/L, 属于低溶解度化合物, 而在生物催化工业生产中, 常采用间隙加料工艺来解决底物溶解度低的问题^[7], 因而 NJ2 菌株与本实验室现有的其他转化菌株相比, 显著的特点是转化活性持久, 10d 后仍具有持续转化的能力以及摩尔转换系数高。这一特点也为今后采用间隙加料工艺生产 5-hydroxy IMI 奠定了较好的基础。

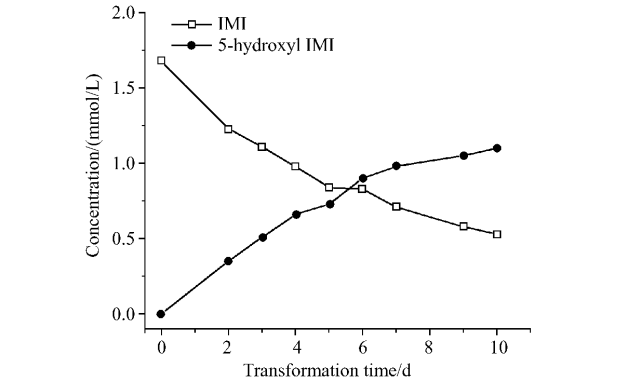


图 3 NJ2 菌株转化曲线
Fig.3 Time courses of transformation of IMI by strain NJ2. The transformation was conducted in 250mL flask containing 25mL transformation broth. Other cultivation and reaction conditions were the standard conditions as described in Materials and methods.

3 讨论

IMI 因其药效显著、强内吸性、持效期长的特点已用于水稻、棉花、小麦、蔬菜、果树和烟草等作物防治飞虱、蚜虫等多种害虫。我国自上世纪 90 年代初开始生产并已成为我国的主要农药品种^[16]。IMI 用于土壤处理的效果要明显优于叶面喷洒并且药效持续时间长,其原因在于在土壤存在着羟基化 IMI 生成 5-hydroxy IMI,继而 5-hydroxy IMI 脱水生成生物活性更高的 olefin IMI 的代谢途径^[4]。但至今仍未有纯培养微生物转化 IMI 的报道。本实验筛选到了一株能高产转化 IMI 为 5-hydroxy IMI 的 NJ2 菌株,从而证明了微生物中存在代谢 IMI 为 5-hydroxy IMI 的途径,该菌株也为今后利用微生物转化法与酸催化法生产生物活性更高的 olefin IMI 奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- [1] Cox C. Imidacloprid. *Journal of Pesticide Reform*, 2001, **21**(1): 15 – 21.
- [2] 谢心宏. 新型杀虫剂吡虫啉. *Pesticides*, 1998, **37**(6): 40 – 42.
- [3] Schulz-Jander D, Casida J. Imidacloprid insecticide metabolism: humol/Lan cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicology Letters*, 2002, **132**: 65 – 70.
- [4] Krohn J, Hellpointner E. Environmental fate of imidacloprid. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 2002, **55**(special edition): 3 – 26.
- [5] Nauen R, Rechmann U, Elbert A, *et al.* White fly-active metabolites of imidacloprid: biological efficacy and translocation in cotton plants. *Pestic Sci*, 1999, **55**: 265 – 271.
- [6] Nauen R, Tietjen K, Wagner K, *et al.* Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pestic Sci*, 1998, **52**: 53 – 57.
- [7] 褚志义. 生物合成药物学. 北京: 化工工业出版社, 2000.
- [8] Westwood F, Bean KM, Dewar AM, *et al.* Movement and persistence of [¹⁴C] imidacloprid in sugar-beet plants following application to pelleted sugar-beet seed. *Pestic Sci*, 1998, **52**: 97 – 103.
- [9] Novak L, Hornyanszky G, Kiraly I, *et al.* Preparation of new imidacloprid analogues. *Heterocycles*, 2001, **55**(1): 45 – 58.
- [10] Schoning R. Analytical method for the determination of residues of imidacloprid, NTN 33893-5-hydroxy, and NTN 33893-olefin by HPLC with electrospray MS/MS-detection in plant- and other materials: Honey, nectar, bees, wax, corn (pollen, leaves), rape (pollen, flowers, leaves), sunflowers (pollen, flowers, leaves), tree (leaves, flowers), horse chestnuts. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 2000, **54**: 413 – 452.
- [11] Sabate J, Grifoll M, Vinas M. Isolation and characterization of a 2-methylphenanthrene utilizing bacterium/L: identification of ring cleavage metabolites. *Appl Microbiol Biotech*, 1999, **52**(5): 704 – 712.
- [12] Frederick MA. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 第三版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [13] Hurex T, Wagner B. Identification of N₂-fixing plant- and fungus associated *Azoarcus* species by PCR genomic fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(11): 4331 – 4339.
- [14] Francois M, Estelle R. Distribution of [¹⁴C] Imidacloprid in sunflowers (*Helianthus annuus L.*) following seed treatment. *J Agric Food Chem*, 2003, **51**: 8005 – 8010.
- [15] 于德泉, 杨峻山. 核磁共振波谱分析. 第二版. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [16] 周 琴, 吴永凤. 吡虫啉林的高效液相色谱法分析. 广东化工, 2004, **1**: 28 – 29.

Identification of a strain NJ2 hydroxylating imidacloprid and the transformed product

GE Feng, DAI Yi-jun, CHEN Ting, YUAN Sheng*

(Jiangsu Key Laboratory for Bioresource Technology, NNU Laboratory of Microbiology and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract : A strain named NJ2 was isolated from the soils in Nanjing area, and its resting cells transformed IMI into a polar product. The strain was identified as *Stenotrophomonas maltophilia* based on BioMerieux Vitek system and the analysis of 16S rDNA sequence. Mass spectrometry of the product extracted with an organic solvent and re-crystallization gave m/z value of 272 for the molecular ion while 256 for substrate IMI. It demonstrated that the transformed product was the hydroxylated derivate of IMI or hydroxy IMI. NMR analysis further indicated that the hydroxyl moiety located at the ring of imidazolidine and the transformed product was 5-hydroxy IMI. Kinetics of transformation IMI showed that the content of IMI decreased 1.15mmol/L and the content of transformed product 5-hydroxy IMI increased 1.10mmol/L after transformation for 10 days. The molar conversion yield was 95.9%. The S. maltophilia NJ2 strain, with the characterization of strong transformation ability and high molar conversion yield, can be used in industrial production of 5-hydroxy IMI for synthesis of highly insecticidal olefin IMI.

Keywords : Imidacloprid; 5-hydroxy IMI; Biotransformation; *Stenotrophomonas maltophilia*; Hydroxylation

Foundation item : The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2004BA308A22-12); Natural Science Foundation of Jiangsu High Education (04KJB180071)

* Corresponding author. Tel 86-25-83598790; Fax 86-25-83598723; E-mail: shengyuan@email.njnu.edu.cn

Received : 19 September 2005 / Accepted : 12 November 2005 / Revised : 24 March 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>