

微生物酯酶拆分生物素手性中间体的初步研究

皮雄娥 汪 钊*

(浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310014)

摘要: 以镰刀霉菌 (*Fusarium* sp.) ZG-23 发酵的菌丝球做酶源, 对生物素中间体内酯的溶解性做了研究, 选取最适反应介质甲苯。酶水解反应条件研究表明: 该酶的最适反应温度为 45℃, 最适反应 pH 为 7.0~7.5。在酶不对称水解生物素手性中间体内酯过程中, 对甲苯溶液加酶量 500 U, 底物浓度 2%~5% 时, 水解效果最好。

关键词: 生物素中间体内酯, 酯酶, 非水相

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0023-03

Studies on Optical Resolution of DL-Biotin Intermediate by Fungal Esterase

PI Xiong-E WANG Zhao*

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Abstract: A strain of *Fusarium* sp. for producing esterase was used, the conditions for enzyme enantioselective hydrolysis were also studied using methphenyl as a compatible medium, the optimum temperature and pH for the enzyme reaction were 45℃ and pH 7.0~7.5 respectively. With a substrate concentration of 2%~5% and enzyme concentration of 500U, the maximum hydrolysis rate was obtained.

Key words: Biotin intermediate lactone, Esterase, Nonaqueous solution

生物素是脂肪酸合成和糖代谢羧化酶的辅酶, 是整个生物界所必需的, 在糖质新生和氨基酸代谢中也相当重要^[1]。生物素用途广泛, 但异构体较多, 只有 D (+)-生物素有上述生理活性^[2]。生产 D-生物素的主要技术是中间体内酯的手性拆分技术。以前一直采用化学法拆分, 其工艺复杂, 且拆分不完全, 造成原料浪费, 成本较高。本文拟从筛选产酯酶微生物菌株, 采用酶法选择性地水解其中之一, 达到拆分的目的。相比而言, 酶法拆分专一性强, 拆分率高, 操作简单, 成本低, 环境污染小。本实验用的生物素中间体内酯, 基本以外消旋的形式存在, 结构如图 1。其中 (I) (右旋) 是合成生物素的重要中间体, 化学名称是: (3aS, 6aR) -1, 3-二苄基-四氢-4H-咪唑并 [3, 4] 咪唑-2, 4 (1H) -三酮, 要提高生物素的产量, 得到中间体右旋品是关键的步骤, 我们利用镰刀霉菌 (*Fusarium* sp.) ZG-23 发酵的菌丝球做酶源, 对该中间体内酯的溶解性, 反应介质及拆分条件做了初步的研究, 由于上述消旋体不溶于水, 我们考察在非水相中对其进行拆分。

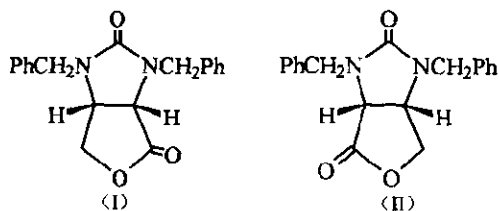


图 1 生物素中间的体内酯的结构式

* 联系人 Tel: 0571-88320615, E-mail: hzwangzhao@163.com

收稿日期: 2003-07-10 修回日期: 2003-10-08

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种：土壤中分离得到的镰刀霉菌 (*Fusarium* sp.) ZG-23。

1.1.2 马铃薯斜面培养基：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 20 g，pH 自然。

1.1.3 摇瓶发酵培养基：甘油 20 g，蛋白胨 8 g，酵母膏 5 g，玉米浆 4 g，定容至 1 L，pH 5.5~8.0。

1.1.4 仪器：恒温水浴锅，VIS-7220 分光光度计，WZZ-T 投影式自动指示旋光仪，岛津 10 A 系列液相色谱等。

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定：采用 BP63 法^[3]。一个酶活力单位定义为：30℃下 30 min 内释放出 1 μmol 醋酸所需的酶量为 1 U。

1.2.2 底物在非水相中的酶转化：250 mL 具塞三角瓶中将含 3% (g/mL，下同) 底物的 50 mL 甲苯溶液和 5 g 湿菌体混合组成反应体系。在 40℃条件下 200 r/min 摇床振荡反应，取样测定其旋光值。

1.2.3 分析方法：采用旋光仪分别对各样品测定旋光度，再用高效液相色谱法分析样品中的酯和酸的浓度，可以算出各物质的含量和水解率。具体条件为：色谱柱：YWG-C18 柱，流动相：甲醇（色谱纯）：水 = 4:6，流速 0.8 mL/min；检测器：紫外检测器，样品：用流动相配成浓度 10 g/L 左右，进样量 5 μL。

2 结果与讨论

2.1 酶拆分反应条件的初步研究

2.1.1 有机溶剂的选择及其对反应的影响：生物素中间体（以下称底物）非极性较强，几乎不溶于水。在苯和甲苯中溶解性较好，相比而言，苯沸点低易挥发，且底物在其中消旋作用较大，我们选择了甲苯作为有机相。

2.1.2 底物浓度对反应的影响：分别配制底物浓度为 2%、3%、4%、5%、6%、7% 液。均加入 5 g 湿菌体，在 30℃，200 r/min 摇床反应。40 h 后测旋光，其趋势如图 2。经实验，底物浓度越低，水解率越高，底物浓度高，产量高，但浓度较大时消旋作用较明显，反应后测旋光也较不稳定，从图 2 可以看出，2%~5% 的底物浓度较合适。

2.1.3 加酶量对酶水解的影响：用 3% (g/mL) 的底物浓度试验了加酶量对酶转化的影响，见图 3。结果表明，酶反应液中酶浓度越高，生物素中间体内酯左旋品水解率就越高，即酶水解率就高。但是随着酶浓度加大，单位酶产率就随之下降，产品的耗酶

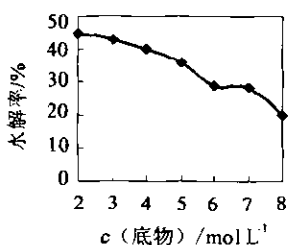


图 2 底物浓度对反应的影响

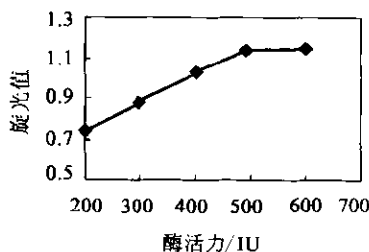


图 3 加酶量对反应的影响

成本亦即增高。因此认为,较适宜的酶浓度为 500 U 单位的酶量。

2.1.4 pH 对反应的影响: 分别配制不同 pH 底物,在 40℃ 下进行酶水解反应 40h,其结果见图 4。图 4 表明,底物 pH 对酶水解的影响显著。试验结果是 pH 7.0~7.5 时反应后旋光值最大,结合液相色谱分析,表明左旋物质水解率最大。同时,由于 pH 大于 7.5 时可能会引起内酯的化学水解,所以认为较适宜的酶水解 pH 为 7.0~7.5。

2.1.5 温度及反应时间对酶催化反应的影响: 温度对酶反应的影响较大,它影响酶的结构及催化活性。同一酶在同样水解条件下,一定时间内,温度低水解率低,温度高,水解率高。在 45℃,酶水解速率达到最高。但超过 45℃ 酶水解率急速下降(图 5)。

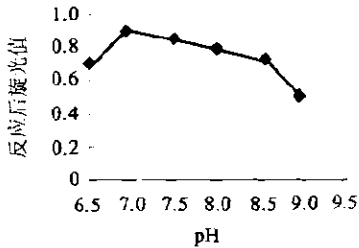


图 4 pH 对酶催化反应的影响

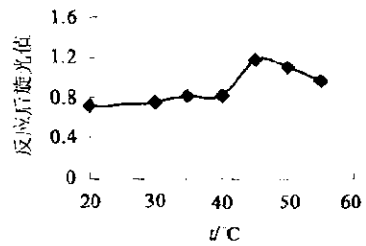


图 5 温度对酶催化反应的影响

在不同时间取样测旋光,反应 24 h 后旋光值达到最大,可知最适反应时间为 24 h。底物浓度为 3%,加入酶活力为 500 U 单位的菌体,在 45℃ 下,反应 pH 为 7.0,24 h 测得水解率为 45%,ee 值达到 90%,取得了较好的效果。

2.2 讨论

生物法生产生物素主要有微生物法和酶法,利用微生物对生物素进行生物合成研究得最多的是埃希氏菌属,芽孢杆菌属,沙雷氏菌属和短杆菌属,最近几年日本专利报道,库特氏菌属^[4]和斯芬克斯小杆菌^[5]的一些菌种也可高产生生物素。由于野生型菌株产量低,不适用于工业化生产,科学家们阐明了在大肠杆菌和球形芽孢杆菌合成生物素的基本途径和每步反应相应的关键酶及控制基因,从而可利用基因工程技术对生物素生产菌株进行根本性改造,以期获得高产菌株。目前,借助于基因工程技术,新的菌种生产水平已达到 144.8 mg/L^[6]。Birch^[7]还培养含优化了的生物素合成基因质粒的重组 *E. coli*,获得抽提液(含生物素合成酶),经处理的抽提液加入几种氨基酸和一些辅助因子,以脱硫生物素为底物,在无细胞体系中反应得到生物素,浓度达到 110 mg/L。但以生物技术方法获得基因工程菌制备生物素,现在还处于小试研究阶段,要实现工业化,很多技术问题还有待于解决。相比而言,用微生物酶法拆分与化工合成相结合来生产生物素被认为是很有前景的方法,具有实用价值,值得进一步的研究。

参考文献

- [1] United States Patent, 6, 277, 609, August 21, 2001.
- [2] 张逸伟, 曾汉雄. 华南理工大学学报(自然科学版), 2001, 29 (2): 58~61.
- [3] B. 施特马赫著, 钱嘉渊译. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 140~142.
- [4] 达雄星野, 昭文野吕, 正明田副, 等. CN 1172165A.
- [5] 熊谷和夫, 三木美沙穗, 河野惠美子, 等. CN 1084217A.
- [6] United States Patent, 5, 922, 581, July 13, 1999.
- [7] United States Patent, 6, 083, 712, July 4, 2000.