

手性苯基环氧乙烷的生物不对称合成

吴 襟 程树华 沙 倩 杨 柳 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)

摘 要 以苯乙烯为唯一碳源和能源,从不同来源的土壤样品中初筛分离出 12 株好氧细菌和 2 株真菌,经复筛,对液体培养物进行手性气相色谱分析,得到一株产生手性苯基环氧乙烷活力较高的菌种 PS-1206,并对其发酵、产酶及苯乙烯的全细胞转化进行了研究,利用微生物细胞在 30℃,pH 7.0,10mmol/L 磷酸缓冲液中转化 0.5% 苯乙烯 10h,获得(R)-苯基环氧乙烷 e.e.% 值为 80%,转化产率为 35%。

关键词 环氧化酶 苯乙烯 手性苯基环氧乙烷 不对称生物合成

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0627-04

手性环氧化合物作为手性化学合成原料,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,利用普通化学环氧化法得到的是外消旋产物,而手性环氧化法需要手性催化剂,成本高。相比之下,生物不对称环氧化具有明显优点,符合“绿色化学”的发展潮流^[1],已越来越为人们所重视。如利用微生物转化苯乙烯,合成重要的药物手性中间苯基环氧乙烷,工艺简单,成本低廉,产物光学纯度高,具有很好的应用前景;一些具有环氧能力的微生物菌种,如假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)^[2]、黄原杆菌(*Xanthobacter sp.*)^[3]、诺卡氏菌(*Nocardia sp.*)^[4]等已先后被研究报道。经研究表明,这主要是由于微生物细胞里的单加氧酶类对苯乙烯的环氧化所至^[5]。近来, Panke 等将假单胞菌的单加氧酶基因转入大肠杆菌中进行表达并获得成功,该酶合成的(S)-苯基环氧乙烷的 e.e.% 达到了 99%^[6]。

本文以苯乙烯为底物筛选了产生环氧化能力的微生物,并对其发酵条件和转化反应进行了研究。

1 材料与方法

1.1 土样及菌种

采集自树林、菜园、化工厂及污水处理厂等地的土样共计 150 份用于菌种分离;另有本实验室保存的假单胞菌、曲霉、青霉等菌种共计 42 株。

1.2 试剂

苯乙烯(纯度 98%):北京福星化工厂;环氧苯

乙烷、吡啶(纯度 97%):Fluka 公司;吡啶(分析纯):北京旭东化工厂;其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 培养基

1.3.1 富集培养基 1L 溶液中含有 NH_4NO_3 2.0g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.5g, KH_2PO_4 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg, ZnSO_4 0.1mg 和酵母膏 0.1g,用 NaOH 调 pH 7.0。制备固体培养基时另加 15g 琼脂。120℃ 灭菌 30min。使用前加入经无菌过滤的 2mL 苯乙烯。

1.3.2 真菌发酵培养基 蛋白胨 15g,葡萄糖 10g, KH_2PO_4 6.8g 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g 配成 1L 溶液, pH 调到 7.0。120℃ 灭菌 30min。使用前加入经无菌过滤的 5mL 苯乙烯。

1.3.3 细菌发酵培养基 蛋白胨 1.0g, NH_4NO_3 0.1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.5g, KH_2PO_4 1.5g, 酵母膏 0.1g, 葡萄糖 2.0g 和玉米浆 0.1g 配成 1L 溶液, 调 pH 7.0。120℃ 灭菌 30min。使用前加入经无菌过滤的含有 0.05% PEG₈₀ 的 5.0mL 苯乙烯。

1.4 初筛

将 1.0g 土样加入装有经灭菌的 50mL 富集液体培养基的三角瓶中,置旋转速度为 220r/min 的摇床上,在 30℃ 下富集培养 2~3d。培养过程中需补加 2 次苯乙烯,每次 0.1mL。挑选生长优者,进行 2 次富集培养,培养液稀释后涂皿,平板分离纯化菌种,分别将菌株接入含 0.5% 苯乙烯的 5mL 发酵培

收稿日期 2000-01-19,修回日期 2000-06-22。

基金项目:国家自然科学基金支持的重大项目(29790128)。

* 联系人。

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

培养基的摇管中。培养 1d 后,再加入 0.2% 苯乙烯,转化 6~8h,发酵液离心,用紫外法和高碘酸法测定上清中产物含量。

1.5 复筛和全细胞转化

将初筛获得的菌株分别接入到含 0.5% 苯乙烯的 100mL 发酵培养基中,摇床转速 220r/min,于 30℃ 培养 2d,培养过程中需补加 0.2% 苯乙烯 2 次,离心获得菌体,用磷酸缓冲液充分洗涤后离心,将菌体配成 5mL 的菌悬液,加入含 0.5% 苯乙烯的 50mL 转化液中,转化液为含有 1mmol/L 吡唑和 0.005% 的 PEG₈₀ 的 pH 7.0,50mmol/L 磷酸缓冲液。密闭,在 30℃ 下置转速为 220r/min 的摇床上转化 10h,离心去菌体,上清液用二氯甲烷抽提浓缩,浓缩液分别用高压液相和气相色谱进行测定。

1.6 手性气相色谱测定

使用 10m 的 chiralDEX G-PN 毛细管柱,FID 检测器,N₂ 为载气,炉温 90℃,分流比 116:1。

1.7 HPLC 测定

使用 Waters 的 C₁₈ 反相分析柱,DAD 检测器,流动相 75% 甲醇,温度 30℃,流速 1mL/min。同时测定苯乙烯和苯基环氧乙烷。

1.8 高碘酸法

在 1mL 0.3% 高碘酸溶液中加入含 1mL 转化反应上清液,振荡混匀避光保存 10min 后加入 0.5mL 75% 硝酸,混匀后再加入 0.5mL 2mol/L AgNO₃。反应 2~5min,观察溶液中白色沉淀生成的量。

1.9 紫外分光光度法

将转化反应上清液配成 75% 的甲醇溶液,在波长 254nm 下测定光吸收值的降低,与对照比较,可对底物进行半定量分析。

1.10 酶活力测定

一般使用吲哚氧化法。

1.10.1 吲哚氧化法^[7]:在含有 0.1mmol/L FeSO₄·7H₂O,0.83mmol/L NADH 和 0.2mmol/L 吲哚的 3.0 mL pH7.0 磷酸缓冲液中加入 0.2mL 细胞超声破碎离心上清液(蛋白含量在 10mg/mL 左右),于 30℃ 反应 30min,测 A₄₀₀ 的变化。在该条件下,每分钟氧化 1μmol 吲哚所需酶量定义为 1 个活力单位。

1.10.2 苯乙烯消耗法^[8]:在含有 0.1mmol/L FeSO₄·7H₂O,0.83 mmol/L NADH 和 1mmol/L 苯乙烯的 3.0mL pH7.0 磷酸缓冲液中加入 0.2mL 细胞超声破碎离心上清液(蛋白含量在 10mg/mL 左右),于 30℃ 反应 30min。用高压液相法测定反应液

中苯乙烯的含量。该条件下,每分钟氧化消耗 1 μmol 苯乙烯所需的酶量定义为 1 个活力单位。

1.11 生物量测定

以发酵培养基为空白,在 600nm 下测定光吸收。

1.12 蛋白质测定

按 Bradford 方法^[9],以牛血清白蛋白绘制标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 初筛

在富集培养和筛选过程中,发现较高浓度的苯乙烯能明显抑制微生物生长。由于苯乙烯较易挥发,需采用低浓度多次添加底物的方法来解决这个问题。高碘酸法能特异性检测出溶液中较低浓度环氧化物的存在,而苯乙烯在紫外 254nm 处有明显的强吸收峰。通过测定底物和产物两个指标的变化来筛选能氧化苯乙烯产生环氧化物的微生物,增强了初筛结果的可靠性。通过初筛,共获得能利用苯乙烯为唯一碳源和能源生长,产生苯基环氧乙烷的细菌 32 株,真菌 14 株。

2.2 复筛

为获得产生较高光学纯度苯基环氧乙烷的菌株,对产物的光学纯度进行检测十分必要。通过 HPLC 液相色谱和手性气相色谱两种方法的结合,能十分准确地了解转化液中底物和产物量及光学纯度的变化。通过复筛,获得能产生较高光学活性环氧化物的细菌 12 株,真菌 2 株,结果如下表 1。从中挑选活力较高的 PS-1206 号菌做进一步的发酵和产酶研究。该菌种为本实验室保存的假单胞菌。

2.3 培养基 pH 对生物量生长的影响

利用具有不同初始 pH 的发酵培养基进行培养 48h 后测定生物量,结果如图 1 所示。

表 1 复筛菌株转化合成产物的光学活性

| Table 1 The results of repeated screening and e.e value of the products | | | |
|---|-------|----------|-------|
| Strain | e.e/% | Strain | e.e/% |
| PS-501 | 18 | FS-4208 | 18 |
| PS-5202 | 30 | PS-5109 | 39 |
| PS-6803 | 20 | PS-9810 | 26 |
| PS-7204 | 43 | PS-14311 | 71 |
| PS-9405 | 65 | PS-15612 | 52 |
| PS-1206 | 80 | PS-50 | 27 |
| PS-12107 | 11 | PS-51 | 22 |

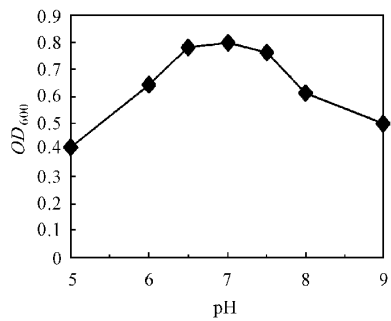


图 1 培养基初始 pH 对发酵生物量的影响
Fig.1 Effect of initial pH of the medium on biomass in fermentation

由结果表明最适培养基初始 pH 范围为 6.5~7.5。

2.4 发酵温度对生物量的影响

分别在不同温度下进行发酵 48h 后测定生物量 结果如图 2。表明最适发酵温度为 30℃。

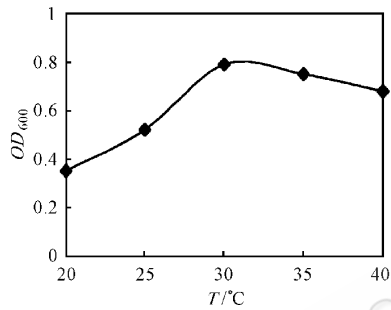


图 2 发酵温度对发酵生物量的影响
Fig.2 Effect of temperature on biomass in fermentation

2.5 发酵过程中生物量与酶活力的变化

在最适发酵条件下 定时取样 进行生物量及酶活力的测定 结果如图 3 所示。

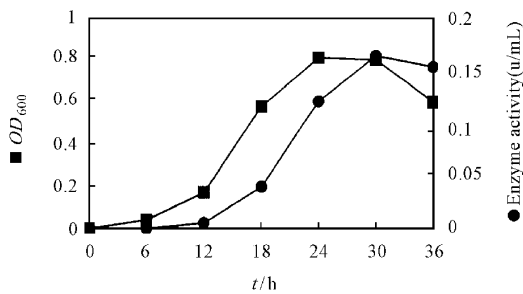


图 3 发酵过程的生物量和酶活性
Fig.3 Biomass and epoxidase activity in the fermentation

发酵 24h 生物量达到高峰 ,而环氧化酶活力在发酵 30h 时最高 ,两者相差 6h。这种非偶联发酵表明酶的产生是一个诱导过程 ,因此选择 30h 为产酶发酵结束时间。

2.6 转化时间对产物合成的影响

按细胞转化底物的方法进行反应 定时取样 结果列于图 4。

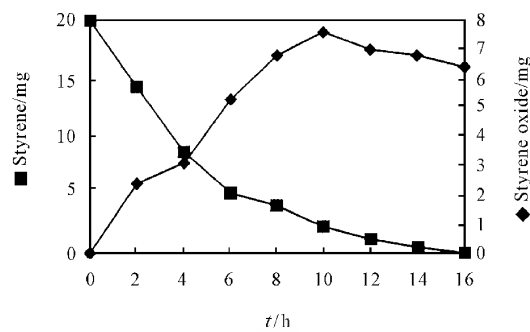


图 4 利用细胞转化苯乙烯生成苯基环氧乙烷的反应曲线
Fig.4 Reaction program of coversion of styrene to styrene oxide by the cells

结果表明转化 10h 能获得最大的产量 ,超过 10h 积累的产物苯基环氧乙烷会逐渐减少 ,说明使用的细胞不仅具有环氧化酶 ,也存在将产生的环氧化物进一步代谢的其他酶。

2.7 酶活力测定方法的比较

微生物细胞是通过胞内苯乙烯单加氧酶氧化苯乙烯生成苯基环氧乙烷。但由于苯乙烯易挥发 ,水溶性差 ,产物苯基环氧乙烷又容易在下游代谢途径中被进一步降解 ,所以苯乙烯单加氧酶的酶活测定一直是个比较困难的问题。苯乙烯消耗法虽能直接测定反应体系中苯乙烯量的变化 ,真实反映出苯乙烯单加氧酶活力的大小。但方法较为繁杂 ,操作、设备条件要求高。而吡啶氧化法则是通过苯乙烯单加氧酶氧化苯乙烯类似物吡啶 ,生成氧化吡啶并最终转化成蓝色靛蓝能力的强弱 ,间接地反映活力的高低。此方法较为简单 ,操作、设备条件要求也低 ,有很好的重复性。两者的测定结果有较好的相似性。因此在一定范围内 ,吡啶氧化法可以替代苯乙烯消耗法测酶活。

参 考 文 献

[1] Warhurst A M , Fewson C A. *Journal of Applied Bacteriology* , 1994 , 77 : 597~605
[2] Shiral K , Hisatsuka K. *Agric biol Chem* , 1979 , 43 (7) : 1399~1406
[3] W J J van den Tweel , R J J Janssens J A M de Bont. *Antoine van Leeuwenhoek* , 1986 , 52 : 309~318
[4] Takahashi O , Umerzawa J , Takagi M. *Trerahedron Lett* , 1989 , 30 : 15

© 2008 中国微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [5] Hartmans S , Smits J P , van den Werf F , Volkering *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* ,1989 **55** (11) 2850~2855
- [6] Panke S , Witholt B , Schmid A *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* ,1998 **64** (6) 2032~2043
- [7] Jenkin R O , Dalton H. *FEMS Microbiology letters* ,1985 **30** 227~231
- [8] Tmans S Har , Werf M J , Bont A M. *Applied and Environmental Microbiology* ,1990 **56** :1347~1351
- [9] Marion M B. *Analytical Biochem* ,1976 **72** 248~254

Asymmetric Biosynthesis of Chiral Styrene Oxide

WU Jin CHENG Shu-Hua SHA Qian YANG Liu SUN Wan-Ru

(State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology ,

The Chinese Academy of Science , Beijing 100080)

Abstract Used styrene as the sole carbon and energy source ,12 strains of aerobic bacterial and two strains of fungi were screened from a series soil samples. These strains were able to convert styrene to styrene oxide. HPLC and chiral GC method were used for determination the substrate , product and e. e value of culture broth. There were obvious effect on the biomass and epoxidase activity under various conditions in the fermentation. Styrene epoxidation of the strain PS-1206 was studied in different reaction time. 35 % of conversion yield and 80 % e. e value of (R)-styrene oxide could be obtained at the optimum conditions.

Key words Epoxidase , styrene , chiral styrene oxide , asymmetric biosynthesis