

# 微生物的环氧化作用

钱存柔

(北京大学生物系, 北京)

环氧化作用 (epoxidation) 是在化合物双键两端碳原子间加上一原子氧形成三元环的氧化作用。早在 1909 年, Prelezhnev<sup>[1]</sup> 发现烯烃化合物在过氧酸的作用下可以生成环氧化物 (epoxide)。由于环氧化物在高温、强离子或自由基的催化下生成环氧均聚物和共聚物, 是重要的工业原料。例如氧化乙烯和氧化丙烯的聚合物是合成纤维涤纶、环氧树脂和泡沫塑料等化

合物的原料, 已成为二类重要的工业环氧化物, 所以日益被人重视, 工业合成目前主要采用氯代乙醇或环氧乙烷的方法, 但这二种方法都要经过很多合成步骤, 并且很大程度受到副产物苯乙烯价格的限制。唯一用金属氧化物作催化剂的直接氧化法目前还处于实验室阶段, 尚无实用价值。工业上目前用来制备环氧化物的方法如图 1 所示<sup>[2]</sup>:

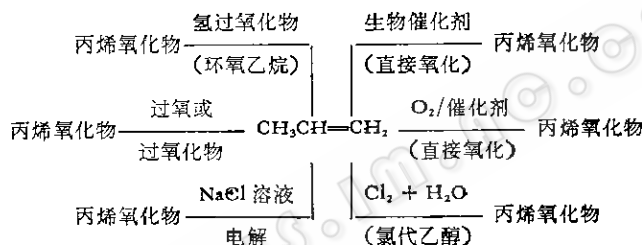


图 1 制备丙烯氧化物的方法

除此外, 最近 Ames 等<sup>[3]</sup> (1984) 设计合成了一种含三个环氧的化合物叫 teroxiron, 据说对大鼠、家兔和人都有抗肿瘤的作用。

微生物是否具有进行环氧化作用的能力? 已知各种好气性微生物能利用石蜡和一些其他碳氢化合物进行生长, 其中一些微生物并可将其烯烃转化为相应的环氧化物, 包括气态烯烃和长链烯烃、二烯或苯环侧链上的烯烃等; 对不饱和的脂肪酸乃至结构复杂的不饱和甾体化合物也均可由微生物进行环氧化反应。对于催化环氧化反应的酶系已有人进行了分离、提取以及其特性的研究。在微生物的代谢产物和抗生素发酵液中, 也发现具环氧结构的化合物存在。

能否利用微生物的环氧化反应来代替化学方法合成有价值的工业原料呢? 这正是不少科学家进行活跃研究的领域, 并且已有一些专利发表。看来微生物的环氧化作用是急待开发的一个领域, 而利用微生物的环氧化作用来合成一些重要的工业原料或有生理活性的一些化合物也是大有前途的。

## 一、微生物对不饱和甾体的环氧化作用<sup>[4-6]</sup>

甾体具有重要生理作用, 诸如维生素、性激素、肾

上腺皮质激素等, 均具有共同的环戊基菲四环体系的结构 (图 2):

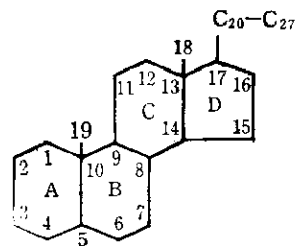
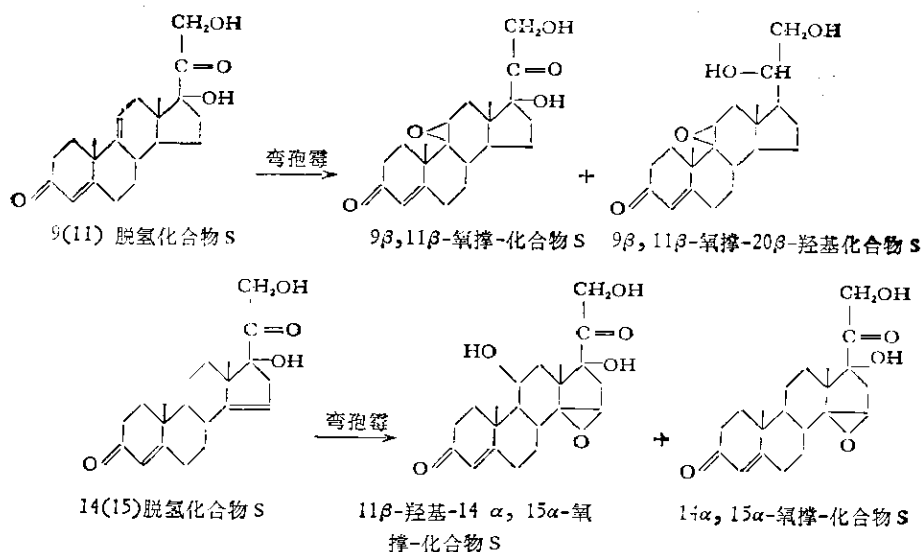


图 2 环戊基菲四环体系结构

Bloom 和 Schull (1955) 最早发现短刺小克银汉霉 (*Cunninghamella blackselecani*) 或弯孢霉 (*Curvularia lunata*) 能将 9(11) 脱氢化合物进行环氧化反应, 生成 9 $\beta$ , 11 $\beta$ -氧撑 -20  $\beta$ -羟基化合物和 9 $\beta$ , 11 $\beta$ -氧撑化合物, 以上二种微生物和梨形卷枝霉 (*Helicostylum piriforma*) 分别可在 14(15) 脱氢化合物上进行环氧化, 生成 14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -氧撑化合物:



这一结果说明,微生物能在不饱和甾体母核的某一碳原子中引入一个环氧基团,也可在此碳原子引入一个羟基,并且环氧基团的构型与羟基相同。法幼华等利用节杆菌 9-2 研究甾体的微生物转化时,也证实这一点,并认为 9 $\alpha$ -羟化酶与 9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -环氧化酶具有共同的活性部位,氯化钴可作为 9 $\alpha$  羟化酶活性有效的抑制剂。我们可以通过添加氯化钴的量控制转化过程,累积不同产物。

## 二、微生物对烯烃及不饱和脂肪酸的环氧化作用

微生物对烯烃的环氧化作用是 Linden<sup>[1]</sup> 于 1963 年报道的。他发现铜绿假单胞菌的细胞悬液在 30℃, 35 分钟内将 1-辛烯生成 1,2 环氧辛烷,推测是由酶的作用进行的,并认为此环氧化酶的作用与烷烃氧化系统的羟化作用相似。环氧化物生成后排出胞外,不再被酶氧化。Cardini 等<sup>[2]</sup> 于 1970 年证实这一推断。他们用分枝杆菌的无细胞提取物将 1-辛烯氧化成 1, 2-环氧辛烷,并将辛烷进一步羟化生成辛醇。以后 De Smet<sup>[3]</sup> 等人比较了食油假单胞菌的静止细胞和生长细胞形成环氧辛烷的产量,发现静止细胞悬于辛烯中,环氧辛烷产量很低,而生长细胞的产量要高得多,并且生成的环氧辛烷的浓度并不起限制合成的作用。如果提高辛烯浓度,分批数次加入生长细胞中,产量约比静止细胞高 4.5%。

May<sup>[10,12]</sup> 等研究 1,7-辛二烯的环氧化作用时,食油假单胞菌将其全部转化为 1, 2, 7, 8 二环氧辛烷,催化此环氧化作用的酶具高度特异的立体异构性,90% 以上的产物是 R(+) 异构体。

White 等人<sup>[12]</sup> 筛选出 20 株霉菌,其中主要是青霉,能将顺 2,3 丙烯磷酸环氧化,生成顺 2,3 丙基磷酸。即磷霉素。磷霉素系一种广谱低毒性的抗生素,对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有杀菌作用,1969 年 Hendlin<sup>[13]</sup> 从弗氏链霉菌的发酵液中发现,但因效价

低,不易提取,后改用化学合成法生产。然而合成的产品系消旋化合物,需经拆分才能获得有生理活性的(一)旋化合物。由于微生物的环氧化酶具有高度立体特异性,由霉菌转化顺 2,3 丙烯磷酸生成的磷霉素均为(一)旋性,因而引起人们的注意。

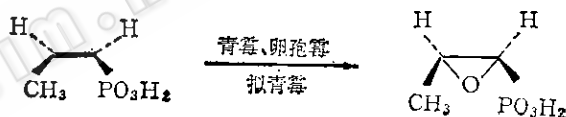
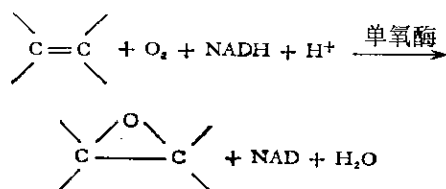


图 3 由霉菌转化顺 2,3 丙烯磷酸生成的磷霉素

Klug 和 Markovetz<sup>[4]</sup> 发现解脂假丝酵母将长链 1,-十六烯氧化成 1, 2-环氧十六烷。Buchanan<sup>[12]</sup> 等发现巨大芽孢杆菌将棕榈油酸内的不饱和双键环氧化为 9,10-环氧棕榈酸。

## 三、微生物对气态烯烃的环氧化作用

1979 年 Hou<sup>[2]</sup> 等发现甲基营养细菌可将 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 气态烯烃环氧化,对 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 气态烷烃可进行羟化。他们选用了有 I 型膜结构的 *Methylosinus trichosporium* OB3b, 具 II 型膜结构的 *Methylococcus capsulatus* (Bath) 和兼性甲基营养菌 *Methylobacterium organotrophilum*, 指出催化环氧化反应和羟化反应的单氧酶活性部分存在于无细胞制剂的 10,000—40,000g 特定部分,均需有氧及 NADH 存在:



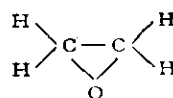
单氧酶催化气态烯烃生成相应的环氧化产物如下:

## 底 物

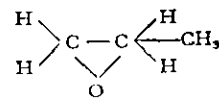
乙烯  $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ 丙烯  $\text{CH}_2=\text{CHCH}_3$ 1,丁烯  $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ 反 2,丁烯  $\begin{array}{c} \text{H} \\ \text{CH}_3-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3 \\ \text{H} \end{array}$ 顺 2 丁烯  $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \text{CH}_3-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$ 

## 产 物

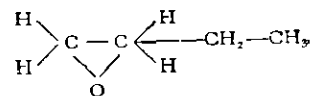
环氧乙烷



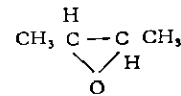
1,2 环氧丙烷



1,2 环氧丁烷



反 2,3 环氧丁烷



顺 2,3 环氧丁烷

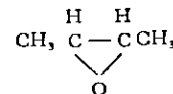


表 1 微生物发酵液中带环氧结构的代谢产物

| 微 生 物                                                                                       | 代 谢 产 物   | 功 能                                               | 报 道 者                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Monilia formosa</i> ,<br><i>Penicillium viriferum</i> ,<br><i>Aspergillus fumigatus</i>  | 反-L-环氧琥珀酸 | —                                                 | Martin <sup>[19]</sup>      |
| <i>Aspergillus terreus</i>                                                                  | 土曲霉酸      | 体外表现有抗 G <sup>+</sup> 及 G <sup>-</sup> 菌的效能       | Sheehan <sup>[20]</sup>     |
| <i>Streptomyces fradiae</i>                                                                 | 富伦菌素      | 其脱氢富伦菌素在体外表现相当大的抗真菌效果对实验动物豚鼠有抗园虫效果。               | Ellestad <sup>[21]</sup>    |
| <i>Cephalosporium cerules</i>                                                               | 浅蓝菌素      | 抗 真 菌                                             | Omura <sup>[22]</sup>       |
| <i>Streptomyces fradiae</i> ,<br><i>Str. viridochromogenes</i> ,<br><i>Str. wedmorensis</i> | 磷 霉 素     | 抗多种 G <sup>+</sup> 及 G <sup>-</sup> 细菌, 抑制细菌细胞壁合成 | Christensen <sup>[23]</sup> |
| <i>Bacillus subtilis</i>                                                                    | 芽孢菌溶素     | 能溶正在生长的葡萄球菌                                       | Walker <sup>[24]</sup>      |
| <i>Str. griseoplanus</i>                                                                    | 抗荚膜菌素     | 抗酿脓链球菌荚膜的透明质酸合成                                   | Neuss <sup>[25]</sup>       |

## 四、催化环氧化反应的酶系及其特性

许多科学家从不同角度研究微生物的环氧化作用时都有相似的结论,即催化辛烯形成环氧化物的单氧酶与催化烷烃或脂肪酸羟化的单氧酶二者非常相似,或有密切的关系,即环氧化酶/羟基化酶是同一体系的酶。例如 Coon<sup>[44]</sup> 及其同事研究食油假单胞菌的  $\omega$ -羟化系统时发现此系统能将烷烃或脂肪酸分子上的  $\text{CH}_3$ -进行羟化。以后 May 等<sup>[10]</sup> 报告,此同一酶系能催化烯烃生成环氧化物。当底物为 1,7 辛二烯时,因分子上不带  $\text{CH}_3$ -,故全部转化为 7,8-环氧-1-辛烯;此

产物又进一步氧化,形成 1,2;7,8-二环氧辛烷。Buchanan<sup>[12]</sup> 研究棕榈油酸氧化时,从巨大芽孢杆菌中分离提取出一种可溶的、依赖于细胞色素 P450 的单氧酶,在  $\text{NADPH}_2$  及氧存在时,能将棕榈油酸(十六碳不饱和脂肪酸)氧化,生成 9,10-环氧棕榈酸和 9,10-二羟基棕榈酸。Hou 等<sup>[12]</sup> 选择了三种类型的甲基营养型细菌 *Methylobacterium* sp., *Methylococcus trichosporium* 和 *Methylobacterium* sp., 制备成无细胞制剂,得 P(40) (40,000g 部分)和 P(80) 部分,在  $\text{NADH}$  及  $\text{O}_2$  存在时,将丙烯催化生成环氧丙烷,将甲烷氧化成甲醇,此活

力部分主要存在于 P(40)(85—90%)，而 P(80)部分仅占10%。并且这一系统同样可以催化乙烯、1-丁烯、1,3丁二烯氧化成相应的环氧化物，而催化烷烃成相应的醇。

Coon 等<sup>[16]</sup>从食油假单胞菌得到纯的烷烃单氧酶证明含有三个蛋白组分——rubredoxin, NADH rubredoxin 还原酶和  $\omega$ -羟化酶。有趣的是，Colby<sup>[17]</sup>从 *Methylococcus capsulatus* (Bath) 获得的甲烷单氧酶以及 Tonge 等<sup>[18]</sup>从 *Methylosinus trichosporium* 获得的甲烷单氧酶也都证实具有三个蛋白组分。Hou 等<sup>[14]</sup>用三种不同类型的甲基营养菌的细胞悬液研究对气态烯烃环氧化反应的最适条件，指明作用最适 pH 在 6.0—7.0，温度约 35℃ 左右。当温度达 40℃ 时，生成的环氧化物减少。底物丙烯浓度占反应体积 15% 时得到的环氧丙烷最多，高于或低于此浓度时，并不能提高或抑制环氧化物的生成。

### 五、带环氧结构的微生物代谢产物

已有不少报道从细菌、放线菌和真菌的发酵液里都发现过带有环氧结构的代谢产物，现列举数例如下(表1)。从以上所述情况来看，微生物可将不同底物通过单氧酶的催化生成带环氧结构的产物，其中不少是有经济价值的化合物。目前已有一些专利报道利用微生物环氧化的工艺发表<sup>[26-29]</sup>。因而，研究微生物的环氧化作用，也是开发了一种特殊结构的化合物，值得人们重视。

### 参 考 文 献

- [1] Prilezhaev, N.: *Ber.*, 42: 4811, 1909.
- [2] Hou, C. T., et al.: *Appl. Microbiol.* (Perlman, D. ed.), Vol. 26, 41—69, Academic Press, 1980.
- [3] Ames, M. M., et al.: *Cancer Res.*, 44: 4151—4156, 1984.
- [4] Bloom, B. H. and G. M. Shull: *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 5767, 1955.
- [5] Sih, C. J.: *J. Bacteriol.*, 84: 382, 1962.
- [6] 法幼华，徐诗伟：微生物学报，24 (4): 382—385, 1984.
- [7] Van der Linden, A. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, 77: 157—159, 1963.

- [8] Cardini, G. and F. Jurtshuk: *J. Bio. Chem.*, 245: 2780—2796, 1970.
- [9] De Smet, M. J., et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, 42: 811—816, 1981.
- [10] May, S. W. and R. D. Schwartz: *J. Am. Chem. Soc.*, 96: 4031—4032, 1974.
- [11] May, S. W. and M. S. Staltenkamp: *J. Am. Chem. Soc.*, 98: 7856—7858, 1976.
- [12] White, R. F. et al.: *Appl. Microbiol.*, 122: 55—60, 1971.
- [13] Hendlin, D. et al.: *Science*, 166: 122—123, 1969.
- [14] Klug, M. J. and J. Maokovez: *J. Bacteriol.*, 96: 1115—1123, 1969.
- [15] Buchanan, J. F. and A. J. Fulco: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85: 1254—1259, 1978.
- [16] Coon, M. J., et al.: *Biological Hydroxylation Mechanisms* (G. S. Boyd and R. M. S. Smellie eds.) P. 45, Academic Press, New York, 1972.
- [17] Colby, J., et al.: *Biochem. J.*, 165: 395—402, 1977.
- [18] Tonge, G. M., et al.: *Biochem. J.*, 161: 333—344, 1977.
- [19] Martin, W. R. and J. W. Foster: *J. Bacteriol.*, 70: 405—414, 1955.
- [20] Sheehan, J. C., et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 80: 5536—5538, 1958.
- [21] Ellestad, G. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, 88: 4109—4110, 1966.
- [22] Omura, S., et al.: *J. Antibiot.*, 20: 349—354, 1967.
- [23] Christensen, B. G., et al.: *Science*, 166: 123, 1969.
- [24] Walker, J. E. and E. P. Abraham: *Biochem. J.*, 118: 563—570, 1970.
- [25] Neuss, N., et al.: *Biochem. J.*, 118: 571—575, 1970.
- [26] Hou, C. T. et al.: US. Patent No. 4, 347, 319, 1982.
- [27] Hou, C. T. et al.: US. Patent No. 4, 348, 476, 1982.
- [28] Hou, C. T. et al.: US. Patent No. 4, 368, 267, 1983.
- [29] White, R. F. et al.: US. Patent No. 3, 657, 072, 1972.