

环氧丙醇酯立体专一性水解酶产生菌的筛选*

贾师英 李青山 许建和 俞俊棠

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘要 从土壤中筛选出一株能拆分(R,S)-环氧丙醇丁酸酯的根霉(*Rhizopus* sp. Bc0-09), 该菌株所产胞外脂肪酶在水解环氧丙醇丁酸酯的反应中具有良好的立体专一性。在 pH 恒定 7.0 的条件下, 以其发酵液水解底物, 当转化率为 58% 时, 残留的(R)-环氧丙醇丁酸酯的光学纯度(对映体过量值)达 96.1%。

关键词 (R,S)-环氧丙醇丁酸酯, 光学拆分, 脂肪酶, 根霉, 筛选

分类号 Q93-936 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0098-101

SCREENING OF LIPASE PRODUCING STRAIN FOR STEREOSPECIFIC HYDROLYSIS OF (R,S)-GLYCIDYL BUTYRATE

Jia Shiying Li Qingshan Xu Jianhe Yu Juntang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract A strain of microorganism capable of optically resolving racemic glycidyl butyrate has been isolated from soil and identified to be a *Rhizopus* sp. (Bc0-09). The preliminary investigation on the optical resolution of glycidyl butyrate showed that the lipase from *Rhizopus* sp. was able to stereoselectively hydrolyze (S)-enantiomer of the racemic ester. When the racemic substrate was enzymatically hydrolyzed to 58% conversion at constant pH(7.0), the optical purity of recovered (R)-ester was 96.1% ee (enantiomeric excess).

Key words *Rhizopus* sp. lipase screening, (R,S)-glycidyl butyrate, Optical resolution

* 山东大学微生物技术国家重点实验室开放课题资助项目

1998-06-11收稿, 1998-09-21修回

(S)-环氧丙醇是一种重要的手性化合物。作为药物中间体,在多类光活性药物的合成中得到应用^[1],同时还在农药、液晶、生物探针等领域得到开发利用^[2]。(S)-环氧丙醇的制备方法有很多种^[3~5],其中烯丙醇的 Sharpless 不对称环氧化法和猪胰脂肪酶(PPL)选择性水解环氧丙醇丁酸酯法已实现工业化。近年来又有报道利用微生物如巴氏醋酸杆菌(*Acetobacter pasteurianus* ATCC 12874)通过不对称氧化法可得到高纯度的(R)-环氧丙醇^[6]。与酶法相比,直接利用微生物拆分外消旋体,不仅产物光学纯度高,同时避免了酶的提取、纯化以及固定化等繁琐步骤,可以降低工艺成本,因而微生物方法具有一定优点。作者从土壤中筛选出一株根霉(*Rhizopus* sp. Bc0-09),该菌株可以选择性地水解(R,S)-环氧丙醇丁酸酯中的(S)-对映体,而所保留的(R)-酯在进一步水解后可得(S)-环氧丙醇。

1 材料和方法

1.1 土样及菌种

筛选用土样 200 余份;另有本实验室收藏的黑曲霉(*Aspergillus niger* Bc0-11)、解脂假丝酵母(*Candida lipolytica* Bc2-01)、根霉(*Rhizopus* sp. Bc0-01)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* Bc1-01)等现有菌株。

1.2 培养基

1.2.1 细菌筛选用培养基:葡萄糖 20g,蛋白胨 0.5g,酵母粉 0.5g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05g,自来水 100mL, pH8.0;固体培养基另加琼脂 2.0g。

1.2.2 真菌筛选用培养基:葡萄糖 1.0g,蛋白胨 0.5g, KH_2PO_4 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g,微生物富集培养时添加 1% 链霉素溶液 0.3mL,自来水 100mL, pH6.5;固体培养基另加琼脂 2.0g。

1.2.3 根霉发酵培养基:葡萄糖 1.0g,蛋白胨 0.5g, 酵母膏 0.3g, 麦芽汁 0.3g, KH_2PO_4 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g, 自来水 100mL, pH7.0。

1.3 微生物的初筛

将土样加入含 0.6% 环氧丙醇丁酸酯(由本实验室合成,纯度 $\geq 96\%$)的液体培养基,置摇床(180r/min, 28℃)富集培养 3~4d,稀释后涂皿。将得到的菌株接种到盛 3mL 培养基的试管中,置摇床培养。细菌培养 2d,真菌培养 3d后,加入 0.6% 的反应底物,继续保温。24h 后加入 1mL 乙酸乙酯萃取,并在萃取液中加入脂肪酸显色剂(4% 醋酸铜水溶液,吡啶调节至 pH6.1)显色,挑出能使有机相呈蓝色的微生物进行复筛。

1.4 微生物的复筛

每株微生物接种于两个装有 30mL 培养基的 250mL 三角瓶中,置摇床培养(细菌 2d,真菌 3d)。在其中一瓶中加入 0.7% 的底物。24h 后停止培养,进行比色($\lambda 710nm$),挑选出与空白样(未加底物)吸光度有较大差别的微生物。再将每株有水解底物能力的微生物分别接种于数个装有 60mL 培养液的 500mL 三角瓶中,置摇床培养后各加入 0.8% 的底物,在不同反应时间取出,用 18mL 正己烷萃取,并对萃取液进行旋光性检验(所用旋光仪为上海物理光学仪器厂 WZZ-1S 型)。

1.5 发酵液酶活的测定

发酵液中脂肪酶酶活的测定采用经典的聚乙烯醇橄榄油乳化液方法^[7]。酶活力单位的定义:40℃, pH7.5 条件下,1mL 发酵液水解橄榄油,每分钟产生 1 μ mol 脂肪酸所需的酶量定义为 1 个单位。

2 结果与讨论

2.1 微生物的初筛

实验中发现底物一环氧丙醇丁酸酯对许多微生物的生长具有抑制作用,通过富集培养将土壤中耐底物环境的微生物分离出来。底物水解后会产生丁酸和环氧丙醇,实验中利用产酸指示剂的显色反应作为判据来进行产胞外脂肪酶的微生物的初筛,共得到 30 株细菌和 116 株真菌。

2.2 微生物的复筛

许多微生物在生长过程中会产生有机酸,

有的霉菌还产色素,势必影响初筛的结果。通过对比实验,即考察加入底物24h后的发酵液与空白发酵液的显色差别,以排除这些因素的干扰,共筛选到能分泌胞外脂肪酶的微生物25株,其中细菌6株,真菌19株。对于筛选到的25株微生物,分别检验水解反应剩余酯的旋光度。发现一株霉菌(编号My9)对底物中(S)-构型有较好的选择性水解作用;黑曲霉也具有这种作用,但选择性不如My9;一株酵母菌(Jy19)则具有相反的立体选择性,即优先水解(R)-环氧丙醇丁酸酯,不过产物旋光值较低。几株细菌则无选择性。

2.3 霉菌 My9 的初步鉴定

根据《微生物分类学》^[8]、《菌种保藏手册》^[9]等提供的方法对筛选到的微生物进行初步鉴定。

将霉菌 My9 三点式接种于 PDA 培养基上, 30℃ 培养。菌丝体生长旺盛, 棉絮状, 菌落中心比周围稍稀疏; 菌丝初期白色, 老熟后变为鼠灰色, 并有大量黑色孢子囊产生; 菌落可达 1~2cm 高, 有淡淡酒香, 菌落上无液滴或结晶。低倍显微镜下观察, 发现菌丝呈匍匐枝状, 直径 13~24μm; 匍匐枝节间有假根, 假根不发达, 手指状, 2~6 根分枝; 有 2~3 支一组的孢子梗与假根对生, 孢子梗黄色, 较直, 直径 13~15μm, 长度 150~270μm; 孢子囊球形, 黑色, 直径 80~100μm, 囊托漏斗形。高倍显微镜下观察, 孢子囊梗及匍匐枝管状, 无隔; 孢子大多为卵形, 大小 2.3~3.4μm, 有暗色花纹。

将 My9 接种于 Pfeffer 培养基中, 发现其在 18℃~45℃ 温度范围内皆可生长。

综合以上形态特征, 按照 Ainsworth 的真菌分类系统, My9 属于根霉属, 将其命名为根霉 (*Rhizopus* sp. Bc0-09)。

2.4 根霉 (*Rhizopus* sp. Bc0-09) 的发酵、产酶及对底物的水解

考察了培养基 pH 值和发酵温度对发酵液酶活的影响, 结果表明: 培养基初始 pH 值 6.5~7.0 时酶活相对较高; 在 30℃~35℃ 范围内温度影响不显著。控温 35℃, 在 5L 发酵罐中

进行间歇式发酵培养, 发现脂肪酶主要是在根霉生长稳定期(8~16h)产生的, 发酵液酶活与菌丝体量密切相关: 菌丝体量越大, 酶活越高; 反之越低。

在根霉拆分 (R, S)-环氧丙醇丁酸酯的过程中, 产物的旋光性随反应的进行而变化。利用发酵培养基对根霉进行摇瓶培养 (30℃, 160r/min), 3d 后在发酵液中分别加入 1% 的底物, 测定不同反应时间的反应转化率和萃取液旋光值, 结果如图 1 所示。

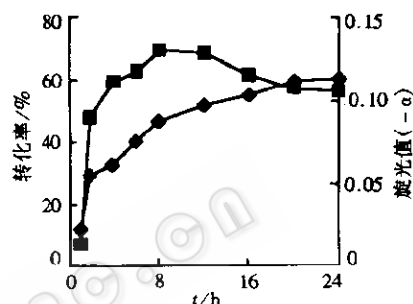


图1 底物转化率和正己烷萃取液旋光值与反应时间的关系

◆, 转化率; ■, 旋光度负值(°)

底物转化率达到 11.8% 后, 正己烷萃取液的旋光值急剧上升, 并在转化率为 46.6%~52% 之间时达到高峰(α 值为 -0.130° 左右); 此后, 转化率缓慢上升, 而萃取液旋光值随之缓慢下降, 反应进行到 24h 时, 转化率达到 60.5%, 旋光值为 -0.106 。

2.5 (R)-环氧丙醇丁酸酯的制备

在 1000mL 发酵液(酶活 2.4u/mL)中加入 (R, S) 环氧丙醇丁酸酯 20mL (约 140mmol)。控温 30℃, 磁力搅拌下用自动电位滴定仪滴加 4mol/L NaOH 溶液, 并使反应液的 pH 值恒定在 7.0。18h 后停止反应, 转化率为 58%。以 2×300mL 二氯甲烷萃取, 并用 300mL 10%NaHCO₃ 溶液和 300mL 蒸馏水洗涤, 再用无水硫酸镁干燥, 活性炭脱色, 蒸馏后得 1.88g (13.0mmol) 的 (R)-酯, 收率 16.2%。 $[\alpha]_D = -27.3^\circ$ ($c = 2.07$, CHCl₃), $ee = 96.1\%$ (文献值^[10]: 100%ee 时, $[\alpha]_D = -28.4^\circ$)。

在 (S)-环氧丙醇的制备上, Sharpless 环氧

化法的产物光学纯度只有 80%~90%^[4]; PPL 水解环氧丙醇丁酸酯可得到旋光纯度 92% 的 (R)-酯(转化率 60%)^[5], 但也存在 PPL 来源有限, 成本相对较高等缺点。直接利用微生物来拆分环氧丙醇, 可以避免提取、纯化脂肪酶的繁琐程序, 又省去了通过固定化等手段来回收或使用酶的工艺, 使操作更为简便, 同时又可获得高纯度的产品, 值得进一步研究与开发。

致谢 本文在实验和写作过程中得到山东大学微生物技术国家重点实验室曲音波教授的热心指导和帮助, 特此感谢。

参 考 文 献

[1] 戴立信, 陆熙炎, 朱光美. 化学通报, 1995, 6: 15~22.

- [2] Hanson R M. Chem. Rev., 1991, 91(4): 437~475.
- [3] Streitweiser A. J. Org. Chem., 1957, 22: 861~869.
- [4] Katsuki T, Sharpless K B. J. Am. Chem. Soc., 1980, 102: 5974~5976.
- [5] Lander W E, Whitesides G M. J. Am. Chem. Soc., 1984, 106: 7250~7251.
- [6] Geerlof A, Jongejan J A, van Dooren T M *et al.* Enzyme Microb. Technol., 1994, 16: 1059~1063.
- [7] 郭炎杰, 蔡武城编著. 微生物酶. 北京: 科学出版社, 1986, 255~258.
- [8] 张纪忠主编. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [9] 中科院微生物研究所《菌种保藏手册》编著组编著. 菌种保藏手册. 北京: 科学出版社, 1980.
- [10] Lok C M, Ward J P, van Dorp D A. Chem. Phys. Lipids, 1976, 16: 115~122.