

转化奎宁酮为(R)-3-奎宁醇菌株的筛选及 转化条件优化

邱健¹ 张霞¹ 马宏¹ 张铎² 宋水山^{1*}

(1. 河北省科学院生物研究所 河北 石家庄 050051)
(2. 河北化工医药职业技术学院 河北 石家庄 050051)

摘要: (R)-3-奎宁醇是一种用于合成各类药物的重要手性砌块,以奎宁酮盐酸盐为唯一碳源,筛选得到一株能够将奎宁酮不对称还原为(R)-3-奎宁醇的菌株 X15。常规生理生化鉴定和 18S rDNA 序列分析表明,菌株 X15 属于粘红酵母菌 *Rhodotorula mucilaginosa*,定名为 *R. mucilaginosa* X15。结果显示,菌株 X15 具有酮基还原能力和辅酶再生能力,在 100 mL 反应体系中可将奎宁酮还原为 (R)-3-奎宁醇,转化率为 90%,*ee* 值为 88%。

关键词: 奎宁酮酮基还原酶,粘红酵母,对称还原,(R)-3-奎宁醇

Isolation of a *Rhodotourula mucilaginosa* strain capable of transforming quinuclidinone into (R)-3-quinuclidinol and optimization of the transforming reaction conditions

QIU Jian¹ ZHANG Xia¹ MA Hong¹ ZHANG Duo² SONG Shui-Shan^{1*}

(1. Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)
(2. Hebei Chemical & Pharmaceutical Vocational Technology College, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

Abstract: (R)-3-Quinuclidinol is an important chiral building block for the synthesis of a variety of pharmaceutical. A strain which is able to transforming quinuclidinone into reductase (R)-3-Quinuclidinol was isolated from soil by using quinuclidinone as sole carbon source in the screening medium. The physiological and bio-chemical identification and 18S DNA sequense analysis revealed that this strain belongs to *Rhodotorula mucilaginosa* and was named as *R. mucilaginosa* X15. The present results indicated that the optimal conditions for the transforming reaction with resting cells of *R. mucilaginosa* X15 were 3-quinuclidinone 10 g/L, pH 7.5, 30 °C and 72 h reaction time. (R)-3-Quinuclidinol is obtained with an yeild of 90% and with an optical purity of 88% enantiometric excess (*ee*) from a 100 mL

基金项目: 河北省科学院青年创新基金项目(No. 10324); 河北省科技支撑计划项目(No. 09205519D)

* 通讯作者: Tel: 86-311-83999012; ✉ shuishans@hotmail.com

收稿日期: 2010-09-12; 接受日期: 2011-01-31

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

reaction mixture.

Keywords: 3-Quinuclidinone reductase, *Rhodotorula mucilaginosa*, Asymmetric reduction, (R)-3-Quinuclidinol

抗胆碱药物是一类重要的神经系统药物, 具有抗乙酰胆碱生理活性作用, 在基础医学和防化医学领域具有重要的作用。在军用方面, 用来对付化学武器的袭击; 在民用方面, 这类药物对治疗帕金森病、运动病(航天晕运病及晕机晕船晕车等)、胃绞痛、胃溃疡、肠功能性疾病等也有一定的效果。抗胆碱药物主要是和乙酰胆碱竞争胆碱受体, 对抗乙酰胆碱表现出胆碱神经功能被抑制等作用。由于胆碱受体在体内分布广泛, 抗胆碱药物的研究一直受到人们的重视。

(R)-3-奎宁醇是很多新型抗胆碱类药物的重要中间体, 如用于治疗尿失禁药物索利那辛、用于治疗老年痴呆症的他沙立定和用于治疗慢性肺栓塞的瑞伐托酯等。因此, (R)-3-奎宁醇作为合成新型抗胆碱药物的重要中间体具有很好的市场应用前景。目前国内外主要采用化学法合成对(R)-3-奎宁醇, 化学法合成通常存在周期长, 处理步骤繁复, 原材料消耗大, 污染严重等问题。研制和开发用生物催化法合成(R)-3-奎宁醇, 是目前亟待解决的课题, 不仅可以给医药行业带来可观的经济效益, 同时也符合现代绿色经济发展的需求, 减少环境污染, 保护生态平衡。

1999年 Nomoto 报道一种酶类物质的还原, 将底物与磷酸酯酶一起在红酵母细胞中培养, 经过处理可得到 *ee* 值达到 100% 的(R)-3-奎宁醇^[1]。2003年 Ikunaka 报道了一种用蛋白酶和曲霉菌来拆分 3-奎宁醇衍生物的方法。转化率为 42%, *ee* 值 96%^[2]。2009年 Uzura 报道采用重组表达来自深红酵母的酮还原酶基因的工程菌不对称还原奎宁酮, 得到(R)-3-奎宁醇, 转化率达 98.6%, *ee* 值为 99.9%^[3]。目前国内还未见以奎宁酮为底物, 采用生物不对称合成(R)-3-奎宁醇的相关报道。本文报道一株具有奎宁酮还原能力的酵母菌株, 经鉴定为粘红酵母, 并对其转化条件进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 菌种富集、分离纯化

试验土样取自河北省石家庄、邢台、沧州等地的菜园土、果园土和耕地土共 100 个。将土壤样品研磨成细小粉末状, 以 3% 的接入量接种于富集培养基中(以奎宁酮盐酸盐为唯一碳源和能源), 加少许玻璃珠, 于 28 °C、150 r/min 摇床上振荡培养 1 周, 培养基变浑浊后, 再按 1% 的接种量转接到新的富集培养基中培养 1 周, 如此重复 3-5 次, 然后在富集琼脂平板上涂布, 选择不同形态特征的菌落, 重新转接至富集培养基中, 相同条件下培养。将通过富集筛选得到的菌株分离后, 得到的斜面培养基内的菌株接入 YEP 培养基中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 72 h, 用接种环取少量菌株样品接入平板固体培养基, 采用平板划线分离法对菌株进行纯化, 将 28 °C 培养 72 h 后得到的单菌落接入斜面培养基。

1.2 培养基

富集培养基(g/L): NaCl 1, KCl 0.5, MgCl₂·6H₂O 0.4, NH₄Cl 0.3, CaCl₂·2H₂O 0.1, KH₂PO₄ 0.2, Na₂SO₄ 0.15, 奎宁酮盐酸盐 1, pH 5.5, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 固体培养基中加入 18 g/L 的琼脂粉。

产酶培养基(g/L): 麦芽糖 20, 酵母膏 5, 尿素 7.5, K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, CoCl₂ 0.01, pH 7.0, 1.0×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

种子培养基(g/L): 麦芽糖 20, 酵母膏 5, K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄ 0.2, NaCl 1.0, pH 7.0, 1.0×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.3 菌种复筛

将初筛菌接种于液体发酵培养基中, 振荡培养 48 h, 加入 0.03% 的奎宁酮盐酸盐诱导培养 48 h, 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 菌体重悬于 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中, 加入 1% 的底物, 辅助底物葡萄糖为 1%, 30 °C 反应 72 h, 离心收集上清液, 通过薄层层析检测, 筛选能将奎宁酮转化为奎宁醇

的目的菌株^[4]。

薄层层析(TLC)检测: 转化液通过离心, 用毛细管点样于硅胶板, 在甲醇:水=95:5 (V/V)的展开剂中展开后, 放入到碘缸中显色。通过显色的斑点位置和大小来初步确定转化情况^[5]。

光学纯度值的检测: 将反应液过硅胶柱, 通过薄层层析检测产物, 利用旋光仪测量反应产物的旋光性, 计算光学纯度。

高效液相检测: 检测条件为 Chiralpak OD-H 手性柱, 柱温 30 °C, 流动相(正己烷:异丙醇)=95:5 (V/V), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 254 nm。

1.4 菌种的鉴定

1.4.1 形态学观察及生理生化特征: 取 48 h 培养物, 离心弃去上清, 1.5%戊二醛固定过夜, 锇酸固定 30 min, 30%、50%、70%、80%、100%乙醇梯度脱水, 液氮冷冻干燥, 进行电镜观察。常规生理生化鉴定参照酵母菌的特征与鉴定手册^[6]。

1.4.2 18S rDNA PCR 扩增和序列测定、比对: 以细胞裂解液为扩增模板, 用于酵母 18S rDNA 扩增引物为一对真菌通用引物, 正向引物 NS1: 5'-GTA GTCATATGCTTGTGTC-3', 反向引物 NS8: 5'-T CCGCAGGTTACCTACGGA-3'。PCR 反应体系为 (20 μ L): 10 \times 菌落 PCR 缓冲液 2 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ L、10 mmol/L dNTPs 1 μ L、引物各 1 μ L、Taq DNA 酶 0.2 μ L、dd H₂O 13.6 μ L。先用牙签挑取少量菌落于体系中, 99 °C 消化 15 min; 再加入 0.2 μ L Taq DNA 酶。PCR 反应条件为: 95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物在含溴化乙锭的 1.25%琼脂糖上电泳, 检测其纯度与大小。PCR 产物的回收、连接、转化和阳性克隆参见分子克隆实验指南^[7]。测序由上海生工生物公司完成。

1.4.3 系统发育分析: 将菌株 X15 的 18S rDNA 序列与 GenBank 核酸序列数据库中的序列进行比对, 采用 ClustalX 软件进行同源性分析, 并构建系统发育树。

1.5 奎宁醇转化条件的优化

1.5.1 底物浓度优化: 以 0.3 g 酵母湿菌体为反应

细胞, 奎宁酮盐酸盐浓度为 0、0.01、0.02、0.04、0.05、0.07、0.08、0.10 mol/L, 反应体系 1 mL, 葡萄糖 1%, 30 °C、150 r/min 培养 72 h 后检测奎宁酮转化率。

1.5.2 葡萄糖浓度优化: 以 0.3 g 酵母湿菌体为反应细胞, 奎宁酮盐酸盐浓度为 0.05 mol/L, 反应体系 1 mL, 葡萄糖为 0.1%、0.3%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%。30 °C、150 r/min 培养 72 h 后检测奎宁酮转化率。

1.5.3 反应初始 pH 值优化: 以 0.3 g 酵母湿菌体为反应细胞, 奎宁酮盐酸盐浓度为 0.05 mol/L, 反应体系 1 mL, 葡萄糖为 1.0%。反应体系的 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 30 °C、150 r/min 培养 72 h 后检测奎宁酮转化率。

1.5.4 反应温度优化: 以 0.3 g 酵母湿菌体为反应细胞, 奎宁酮盐酸盐浓度为 0.05 mol/L, 反应体系 1 mL, 葡萄糖为 1.0%。反应温度 25 °C、28 °C、30 °C、37 °C、42 °C, 150 r/min 培养 72 h 后检测奎宁酮转化率。

2 结果与讨论

2.1 样品的富集培养和菌种分离纯化

土样经 4 次富集培养后, 得到的混合微生物的培养物, 可以在含 1 g/L 的奎宁酮盐酸盐合成培养基中生长。上述混合培养物在奎宁酮盐酸盐的平板上进行涂布, 挑取单菌落, 进行斜面划线保存。

2.2 菌种的复筛

进一步对初筛菌株进行奎宁酮转化实验, 经过复筛、纯化后得到一株能以奎宁酮盐酸盐为底物转化为(R)-3-奎宁醇的酵母菌株 X15。反应物的薄层层析结果表明(图 1), 菌株 X15 能将底物奎宁酮盐酸盐转化为奎宁醇, 而其他初筛菌株无酮基还原能力。转化反应 72 h 后, 回收薄层层析目的产物, 溶于二氯化碳, 测量旋光度为 -39.16° , 光学纯度为 88%。

2.3 菌种的鉴定

2.3.1 形态学观察及生理生化特征: 观察在 YEP 平板固体培养基上培养 24 h 的菌株 X15 菌落, 其特征为红色, 圆形, 隆起, 不透明, 表面光滑,

湿润, 边缘整齐, 细胞为圆形或椭圆形, 大小为 $1.7 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$ (图 2), 通过革兰氏染色鉴定为阳性菌, 出芽生殖, 无假菌丝生成。能利用葡萄糖和蔗糖进行发酵, 可以利用蔗糖、棉籽糖、柠檬酸等作为碳源。在无维生素培养基中生长。

根据菌株 X15 的形态特征和生理生化特征, 参考《酵母菌的特征与鉴定手册》初步判断菌株 X15 属于红酵母属。

2.3.2 18S rDNA PCR 扩增和序列测定、比对: 扩增菌株 X15 的 18S rDNA 基因, 长度为 1 804 bp, GenBank 登录号为 HQ166038。将菌株 X15 的 18S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比较, 发现菌株 X15 与粘红酵母菌属的 18S rDNA 自然类聚, 相似性达 99%。

2.3.3 系统发育分析: 从 20 个序列中挑选亲缘关系

远近不同的 10 个菌株的 18S rDNA 序列与菌株 X15 构建的系统发育树, 如图 3 所示, 图中进化距离的计算采用 Kimura 双参数计算模型, 树的拓扑形状采用 Neighbor-Joining 方法构建, 分支上的数字为 1 000 次 Bootstrap 分析所得值, 线段 0.001 代表 0.001 进化距离单位。从图中可以看出菌株 X15 与 *Rhodotorula mucilaginosa* 聚为一群, 相似性高达 99%, 表明菌株 X15 与 *Rhodotorula mucilaginosa* 的亲缘关系最近。

2.4 奎宁醇转化条件的研究

2.4.1 底物浓度优化: 在反应体系中, 底物浓度和菌体质量对催化反应进程及最后产物产量起着决定作用。由于高底物浓度对菌体及其胞内酶具有毒害作用, 所以底物浓度过高会抑制反应的进行^[8]。底物浓度过低又会使最终产物产率过低, 不利于经济

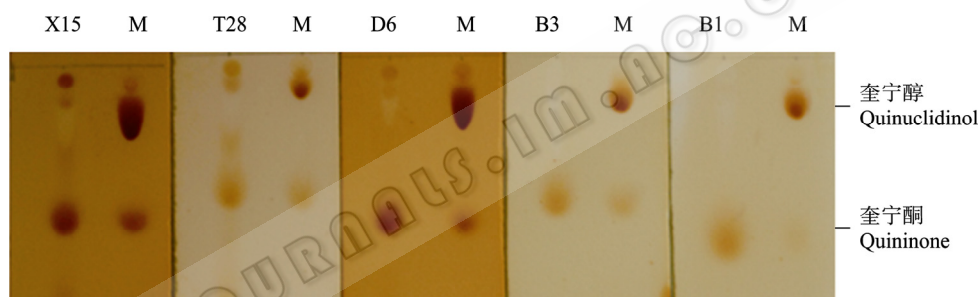


图 1 具有转化奎宁酮为(R)-3-奎宁醇能力菌株复筛

Fig. 1 Isolation of strains capable of transforming quinone to quinuclidinol

注: M: 奎宁醇标准品; B1、B3、D6、T28、X15: 不同筛选菌株转化反应产物。

Note: M: Standard; B1,B3,D6,T28,X15: Production transformed by different isolations.

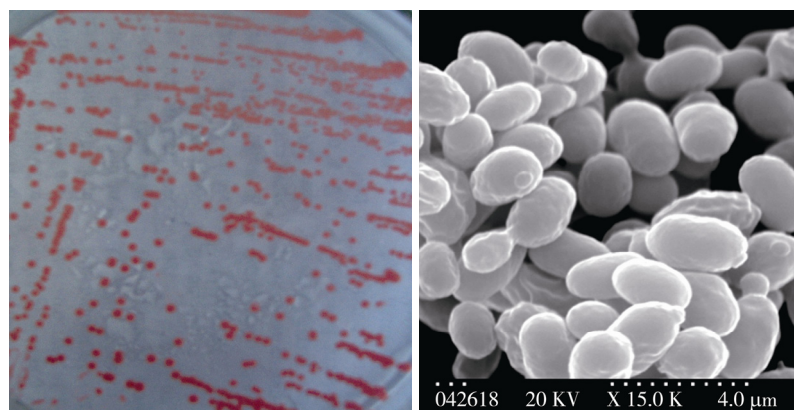


图 2 菌株 X15 的菌落及细胞形态

Fig. 2 Cellular morphology of strain X15

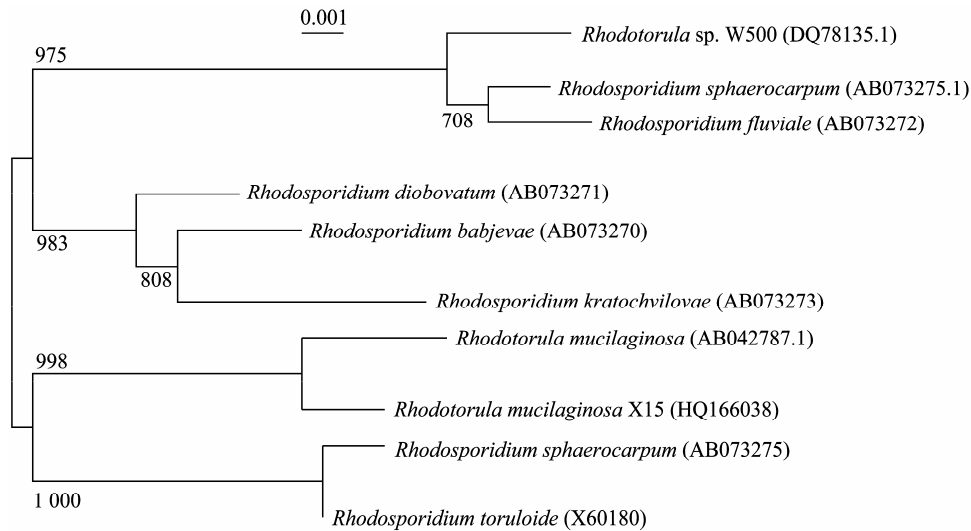


图3 以18S rDNA为基础的酵母菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of yeast based on 18S rDNA sequences

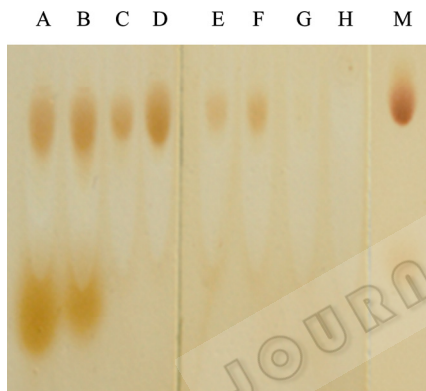


图4 底物浓度优化

Fig. 4 Optimization of substrate concentration for transformation

注: M: 奎宁醇标准品; A-H: 0.10、0.08、0.07、0.05、0.04、0.02、0.01、0 mol/L.

Note: M: Standard; A-H: 0.10, 0.08, 0.07, 0.05, 0.04, 0.02, 0.01, 0 mol/L.

生产。实验选取一定质量的反应细胞, 对不同浓度的物进行转化(图4), 结果显示随着底物浓度的增大, 产物(R)-3-奎宁醇的量也随之增加, 在奎宁酮盐酸盐浓度达到0.05 mol/L时, 经过72 h的反应, 奎宁酮全部转化为奎宁醇, 此时转化率最高。底物浓度大于0.05 mol/L时, 底物明显抑制酮基还原酶的活性, 使底物不能完全转化。

2.4.2 葡萄糖浓度优化: 细胞中酮基还原酶催化奎宁酮还原要不断消耗作为电子供体的还原型辅酶

NAD(P)H, 活性细胞为了保持正常的生理氧化还原状态, 就会不断地进行还原型辅酶的再生, 但辅酶再生需要能量^[9]。常用的辅助底物包括葡萄糖、甲酸和乙醇, 但考虑甲酸和乙醇对细胞的毒性, 因此选取葡萄糖作为氧化还原反应的辅助底物^[10], 考察不同浓度的葡萄糖对不对称还原的影响, 结果如图5所示。低葡萄糖浓度时(0.1%、0.3%、0.5%), 底物奎宁酮不能完全转化为奎宁醇, 而1%以上葡萄糖作为辅助底物, 可以是底物完全转化。

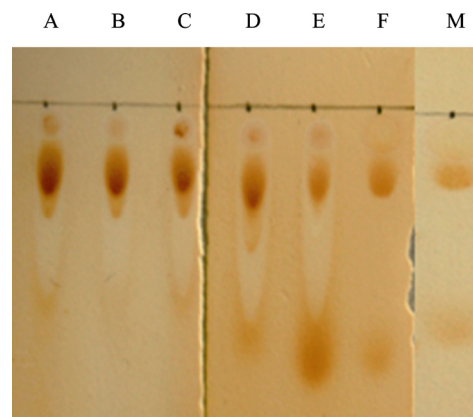


图5 葡萄糖浓度优化

Fig. 5 Optimization of glucose concentration for transformation

注: M: 奎宁酮, 奎宁醇标准品; A-F: 2.0%、1.5%、1.0%、0.5%、0.3%、0.1%.

Note: M: Standard; A-F: 2.0%, 1.5%, 1.0%, 0.5%, 0.3%, 0.1%.

2.4.3 反应温度优化: 酶催化反应都有适合的反应温度, 不同的温度对酶的影响也不同, 将反应体系置于不同的反应温度 25 °C、28 °C、30 °C、37 °C、42 °C 下进行转化反应, 结果如图 6 所示, 该转化反应在所设定的温度下都能使酮基还原酶保持活性, 其中 30 °C、37 °C 反应温度下奎宁酮转化率最高。

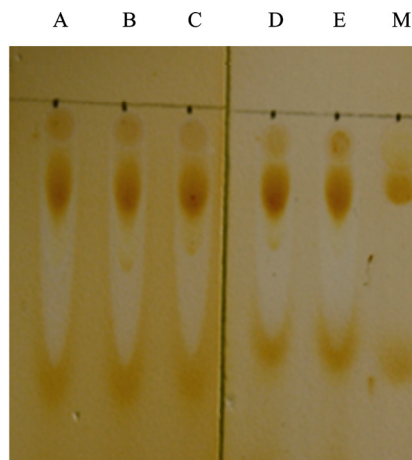


图 6 反应温度优化

Fig. 6 Optimization of temperature for transformation

注: M: 奎宁酮, 奎宁醇标准品; A-E: 42 °C、37 °C、30 °C、28 °C、25 °C.

Note: M: Standard; A-E: 42 °C, 37 °C, 30 °C, 28 °C, 25 °C.

2.4.4 反应初始 pH 值优化: 酶都有其适合的反应酸碱环境, pH 不同对酶活的影响较大。在还原反应中有多种酶参与了反应, pH 对反应的影响也是非常复杂的^[11]。图 7 是 pH 对反应影响的变化图, 由图 7 可知, 在 pH 7.5 的范围内转化率最高, 但 pH 低于或高于 7.5 时, 反应转化率都出现明显的下降, 这说明较低或较高的 pH 值环境会影响转化反应中涉及到的各种酶的酶活, 但并不一定是酮基还原酶。因此转化反应较适合的 pH 值为 7.5。

2.4.5 100 mL 体系放大试验: 将转化条件放大为静息细胞 30 g, 葡萄糖浓度 1%, 反应初始 pH 值为 7.5, 反应温度为 30 °C, 在 100 mL 体系中经 72 h 反应, 反应产物经减压蒸馏, 溶于正己烷进行 HPLC 检测(图 8), 检测条件为: Chiralpak OD-H 手性柱, 柱温 30 °C, 流动相为正己烷:异丙醇=95:5, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 254 nm。通过计算, 90% 的奎宁酮转化为(R)-3-奎宁醇, 光学纯度为 88%。

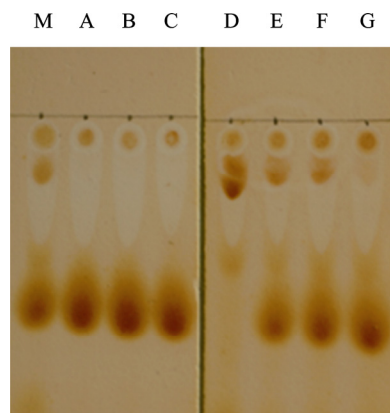


图 7 反应初始 pH 值优化

Fig. 7 Optimization of pH for transformation

注: M: 奎宁醇标准品; A-G: pH 9.0、8.5、8.0、7.5、7.0、6.5、6.0.

Note: M: Standard; A-G: pH 9.0, 8.5, 8.0, 7.5, 7.0, 6.5, 6.0.

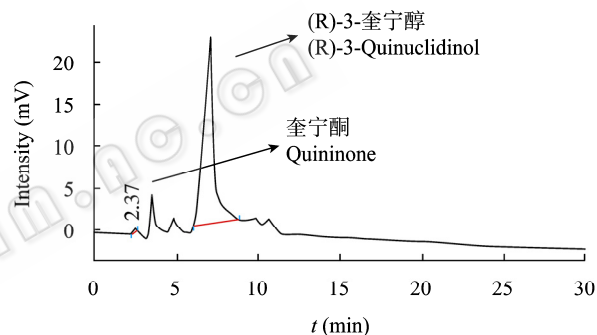


图 8 (R)-3-奎宁醇的 HPLC 结果

Fig. 8 The (R)-3-Quinuclidinol was detected by HPLC

3 结论

利用奎宁酮作为菌株生长的唯一碳源和能源, 从不同采集地的近百份土样中筛选得到一株具有还原奎宁酮为(R)-3-奎宁醇的菌株, 通过常规生理生化鉴定和分子水平 18S rDNA 序列分析鉴定, 该菌株为粘红酵母, 命名为 *Rhodotorula mucilaginosa* X15。对转化条件进行初步优化: 静息细胞 30 g, 底物浓度为 0.05 mol/L, 葡萄糖浓度为 1%, 反应初始 pH 值为 7.5, 反应温度为 30 °C, 在 100 mL 体系中经过 72 h 反应, 奎宁酮还原为(R)-3-奎宁醇, 转化率为 90%, 光学纯度为 88%。

参考文献

[1] Nomoto F, Otsuka K. Enzymic manufacture of optically

- active 3-quinuclidinol from esters[P]. Japan: 10210997A19980811.
- [2] Nomoto F, Hirayama Y, Ikunaka M, et al. A practical chemoenzymatic process to access (*R*)-quinuclidin-3-ol on scale[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, 14(13): 1871-1877.
- [3] Uzura A, Nomoto F, Sakoda A, et al. Stereoselective synthesis of (*R*)-3-quinuclidinol through asymmetric reduction of 3-quinuclidinone with 3-quinuclidinone reductase of *Rhodotorula rubra*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83(4): 617-626.
- [4] 胡健, 徐岩. 不对称还原 2-辛酮的菌株筛选和反应条件的研究[J]. *生物加工过程*, 2005, 3(3): 42-46.
- [5] 李书彬. (*R*)-3-奎宁醇的合成研究[D]. 武汉: 武汉理工大学硕士学位论文, 2008.
- [6] 巴尼特 JA, 佩恩 RW, 亚罗 D. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿, 译. 青岛: 青岛海洋出版社, 1991: 448.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1859.
- [8] 徐莉, 袁生, 陈婷, 等. 恶臭假单胞菌 NA-1 菌体培养转化和静息细胞转化联合工艺生产 6-羟基烟酸研究[J]. *微生物学报*, 2006, 46(1): 63-67.
- [9] Nakamura K, Yamanaka R, Matsuda T, et al. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, 14(18): 2659-2681.
- [10] 孙莹. (*R*)-羟基苯乙酮还原酶与甲酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的共表达[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2008.
- [11] 蒋南, 胡学铮, 夏咏梅, 等. 酶催化手性拆分旋光异构体[J]. *现代化工*, 2004, 24(1): 24-27.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2011 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413