

## 高对映选择性环氧化物水解酶产生菌的筛选及特性研究\*

唐燕发<sup>1</sup> 许建和<sup>1\*\*</sup> 武慧渊<sup>1</sup> 叶勤<sup>1</sup> Schulze Birgit<sup>2</sup>(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室生物催化研究室 上海 200237)<sup>1</sup>(DSM Research, P. O. Box 18, 6160 MD Geleen, the Netherlands)<sup>2</sup>

**摘要:** 从土壤中分离的芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* ECU1001 所产环氧化物水解酶能高对映选择性水解缩水甘油苯基醚(对映选择性 E 值可达 47.8), 当转化率为 55.9% 时, 剩余的 (S)-缩水甘油苯基醚的光学纯度(对映体过量值, ee) 可达 99.5%; 当底物浓度提高到 60 mmol/L 时, 光学纯 (S)-缩水甘油苯基醚的收率达到 25.6%。

**关键词:** 缩水甘油苯基醚, 手性环氧化物, 巨大芽孢杆菌, 环氧化物水解酶, 对映选择性水解

**中图分类号:** Q93.9, O643.3, O625.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-014-04

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN EPOXIDE HYDROLASE PRODUCER FOR ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF (R, S)-PHENYL GLYCIDYL ETHER

TANG Yan-Fa<sup>1</sup> XU Jian-He<sup>1</sup> WU Hui-Yuan<sup>1</sup> YE Qin<sup>1</sup> Schulze Birgit<sup>2</sup>

(Laboratory of Applied Biocatalysis, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering,

East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)<sup>1</sup>(DSM Research, P. O. Box 18, 6160 MD Geleen, the Netherlands)<sup>2</sup>

**Abstract:** A bacterial strain (ECU1001) was isolated from soil and identified to be *Bacillus megaterium*. The strain shows an activity of epoxide hydrolase that catalyzes the asymmetric hydrolysis of phenyl glycidyl ether, yielding (S)-epoxide and (R)-diol with high enantioselectivity ( $E = 47.8$ ). When the racemic substrate was enzymatically hydrolyzed to 55.9% conversion, the enantiomeric excess (ee) of recovered (S)-epoxide was 99.5%. The yield of (S)-phenyl glycidyl ether could reach 25.6% when concentration of the substrate was increased to 60 mmol/L.

**Key words:** Phenyl glycidyl ether, Chiral epoxide, *Bacillus megaterium*, Epoxide hydrolase, Enantioselective hydrolysis

手性环氧化物及其开环产物邻位二醇易于与各种亲核试剂反应, 因而在医药品和农业化学品工业中得到广泛应用。我室曾利用一株根霉所产脂肪酶制备了 (R)-环氧丙醇丁酸酯<sup>[1]</sup>。利用不依赖于辅因子的环氧化物水解酶 (EC 3.3. 2.3) 不对称水解外消旋环氧化物是制备手性环氧化物及邻位二醇的另一种有价值的方法。酶的来源除哺乳动物外, 近年来发现在一些微生物如细菌、真菌中也存在环氧化物水解酶<sup>[2]</sup>。这些产酶菌株大部分是从菌种库中筛选的<sup>[3,4]</sup>, 只有几株菌由土壤中直接分离而得<sup>[5-6]</sup>, 且分离时只用过脂环族和脂肪族环氧化物作为唯一碳源, 还未用过芳香族环氧化物。芳香族环氧化物 (S)-缩水甘油苯基醚是手性氨基醇和生物活性物质如  $\beta$ -受体阻断剂合成的

\* 荷兰 DSM 公司资助项目 (No. ACER 9608-0126)

\*\* 通讯联系人

收稿日期: 2000-08-07, 修回日期: 2000-10-26

中间体。以前在细菌和真菌中都没有发现对缩水甘油苯基醚具有足够高对映选择性 ( $E > 20$ ) 的环氧化物水解酶。本文描述了两步筛选法 (初筛环氧化物水解酶活性; 复筛酶的对映选择性) 从土壤中分离对该物质具有更高对映选择性的环氧化物水解酶产生菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和培养基

缩水甘油苯基醚 (纯度 97.6%, 含 2.4% 相应二醇) 购于 ACROS。

无机盐培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  6.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0g,  $\text{NaCl}$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.05g, 定容于 1 L 水中。

平板培养基: 无机盐培养基另加琼脂 20g。

摇管培养基: 无机盐培养基另加葡萄糖 10g, 酵母膏 1g, 蛋白胨 10g。

发酵培养基: 葡萄糖 20g, 酵母膏 4g, 蛋白胨 4g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  6g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g,  $\text{NaCl}$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g, 定容于 1 L 水中。

### 1.2 筛选程序

将 1g 土样加入 50mL 无机盐培养基中以缩水甘油苯基醚为唯一碳源经过两轮富集培养后, 涂布于琼脂平板, 再以缩水甘油苯基醚蒸气为唯一碳源培养 3~4d 后挑出生长的菌落, 分别于 4mL 摇管培养基中培养 2d 后, 加入 40 $\mu$ L 缩水甘油苯基醚, 转化 1d 后, 用 HPLC 分析剩余环氧化物和产物二醇的浓度。将 1~2g 有明显活力的湿菌体悬浮于 19mL 磷酸钾缓冲液 (KPB, 100mmol/L, pH8.0) 中, 再加入 1mL 缩水甘油苯基醚的 DMSO 溶液 (200mmol/L)。30 $^\circ\text{C}$  反应 12h 后, 取 2mL 样品供分析底物和产物的对映体过量值 ( $ee_s$  和  $ee_p$ )。

### 1.3 培养条件

在含有 3L 发酵培养基的 5L 发酵罐中接种预培养了 11.5h 的 200mL 种子液, 于 30 $^\circ\text{C}$  和 500r/min 条件下培养, 通气速率为 0.33vvm, 间隔取样 20mL, 其中 10mL 用于测定酶活, 另 10mL 用于测干重, 葡萄糖浓度用商品试剂盒测量。

### 1.4 酶活测定

将 10mL 发酵液离心所得菌体加入到 1.8mL KPB (pH8.0) 中, 振匀后于 30 $^\circ\text{C}$  预热 5min, 再加入 0.2mL 缩水甘油苯基醚的乙醇溶液 (200mmol/L), 反应 10min 后立即加入 6mL 对甲酚 (作内标, 2.8mmol/L) 的甲醇溶液中止反应。取样 1mL 离心除去菌体, 上清液作 HPLC 分析。定义一个国际单位的酶活为上述条件下 1min 内催化生成 1 $\mu$ mol 3-苯氧基-1, 2-丙二醇所需要的酶量。

### 1.5 缩水甘油苯基醚的不对称水解及 (S)-缩水甘油苯基醚的制备

称取 0.3g 冻干细胞悬于 38mL KPB (pH8.0) 中, 振匀后于 30 $^\circ\text{C}$  温 30min, 再加入 2mL 缩水甘油苯基醚的 DMSO 溶液 (200mmol/L), 于 30 $^\circ\text{C}$  水浴摇床上反应, 定时取样 3mL, 其中 2mL 用于测  $ee_s$  和  $ee_p$ , 另外 1mL 用于测量产物和剩余底物浓度。

制备实验时, 在 190mL KPB (pH8.0) 中加入 6g 冻干细胞, 搅匀后再加入 10mL 底物的 DMSO 溶液 (1.2mol/L), 于 120r/min 和 35 $^\circ\text{C}$  条件下保温反应 16h 后离心, 菌体用乙酸乙酯洗涤 3 次, 水相用氯化钠饱和后再用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥过夜, 蒸去溶剂, 粗产品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/正己烷, 3/2, v/v)

纯化。

### 1.6 分析方法

将 1mL 样品离心后，取上清液 0.25mL，与 0.75mL 对甲酚的甲醇溶液混合，再次离心后，取上清液用 HPLC 分析底物和产物浓度。色谱柱为 Lichrosorb RP-18 (Merck, Germany, 200 × Φ5.0mm, 10μm)，流动相为甲醇/水 (60/40, v/v; 1.0mL/min)，用紫外 254nm 检测。

另将 2mL 样品离心所得上清液用氯化钠饱和后加 2mL 乙酸乙酯萃取，有机相经无水硫酸钠干燥后用 0.45μm 微孔滤膜过滤，用手性 HPLC 分析底物和产物的对映体过量值 (ee<sub>s</sub> 和 ee<sub>p</sub>)。色谱柱为 Chiralcel OD (Daicel, Japan, 250 × Φ 4.6mm)，流动相为正己烷/异丙醇 (90/10, v/v; 1.0mL/min)，用紫外 254nm 检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高对映选择性环氧化物水解酶产生菌的筛选和鉴定

初筛时 400 株菌中有 97 株菌具有明显的环氧化物水解酶活性，其中 20 株菌的 ee<sub>s</sub> 或 ee<sub>p</sub> 超过 50%，ee<sub>s</sub> 和 ee<sub>p</sub> 的最大值为 94.9% (菌 J) 和 91.3% (菌 142) (如图 1 所示)，其中只有菌 I 和 J 具有相对稳定的对映选择性 (E > 10)。根据对映选择性大小，最终选定菌 J 作进一步研究。据我们所知，这是到目前为止第一株能够以芳香族环氧化物为唯一碳源和能源进行生长的分离菌。该菌经鉴定为巨大芽孢杆菌并被命名为 *Bacillus megaterium* ECU1001。

### 2.2 *Bacillus megaterium* ECU1001 的生长和产酶研究

从图 2 可看出，2h 到 10h 为 *Bacillus megaterium* ECU1001 的对数生长期，比生长速率为 0.33/h。环氧化物水解酶的生物合成几乎与细胞的生长同步，在对数生长期晚期产酶可达 21.3U/L，并在 30h 时达到最大值 31.0U/L，此时细胞干重为 9.1g/L。葡萄糖在 24h 时已几乎消耗完。当在培养基中添加缩水甘油苯基醚 (11.8mmol/L) 时，能诱导该菌产生更高的酶量 (60.0U/L, 未发表数据)，但目前还不能确认这是对组成型酶的进一步诱导还是产生了第二种环氧化物水解酶。

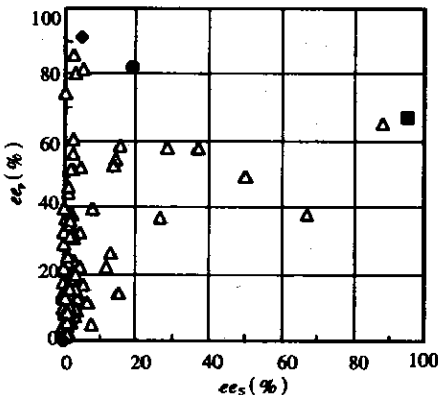


图 1 一些分离菌 (97 株) 所产环氧化物水解酶的对映选择性  
—■— 菌 J, —●— 菌 142, —●— 菌 I, —△— 其它菌

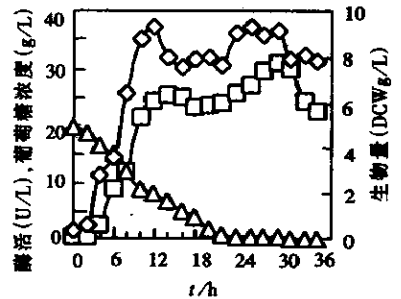


图 2 *Bacillus megaterium* ECU1001 的生长和产酶曲线  
—◇— 细胞干重, —□— 产酶水平, —△— 残余葡萄糖浓度

### 2.3 缩水甘油苯基醚的不对称水解及 (S)-缩水甘油苯基醚的制备

如图 3 所示, 用 *Bacillus megaterium* ECU1001 冻干细胞不对称水解缩水甘油苯基醚时, 反应 4h 后, 转化率 (c) 即达为 55.9%, 环氧化物的浓度从 10.8mmol/L 降到 4.5mmol/L,  $ee_p$  达到 99.5%; 同时二醇浓度从 0 增大到 6.3mmol/L,  $ee_p$  为 80.6%。由公式<sup>[7]</sup>  $\{E = \ln [(1-c)(1-ee_p)] / \ln [(1-c)(1+ee_p)]\}$  可计算得到对映选择率 E 值为 47.8。该酶优先水解 R 型底物产生 R 型二醇, 而剩余 S 型环氧化物, 其理论收率可达 44.1%。文献报道<sup>[8,9]</sup> 中不能得到 (S)-缩水甘油苯基醚, 只能得到并不需要的 (R)-缩水甘油苯基醚。目前我们正利用该菌拆分其它类型的环氧化物。

以 *Bacillus megaterium* ECU1001 冻干细胞为催化剂, 在最佳温度 35℃、最佳 pH8.0 和底物浓度 60mmol/L 条件下制备 (S)-缩水甘油苯基醚, 如图 4 所示, 经过硅胶柱层析可得到 0.46g (S)-缩水甘油苯基醚 1 (无色液体, 收率 25.6%,  $ee > 99.5\%$ )  $[\alpha]_D^{25} + 9.8$  (c

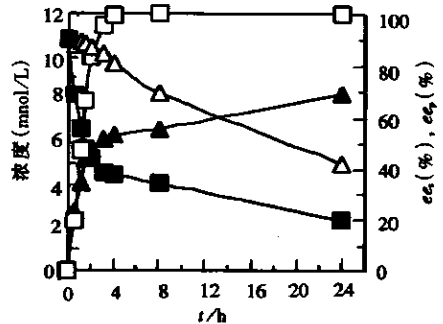


图 3 *Bacillus megaterium* ECU1001 冻干细胞 (7.5g/L) 不对称水解外消旋缩水甘油苯基醚的时间进程曲线

—■— 环氧物浓度, —▲— 二醇浓度, —□—  $ee_p$ , —△—  $ee_s$

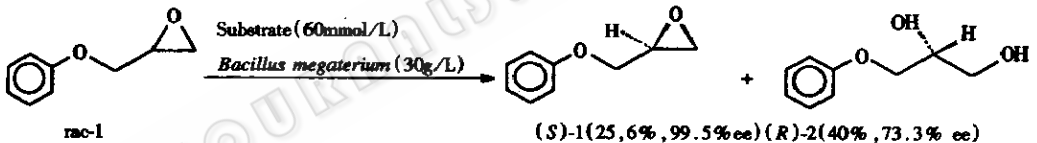


图 4 用 *Bacillus megaterium* ECU1001 冻干细胞 (30g/L) 制备 (S)-缩水甘油苯基醚

1.00, EtOH) 和 0.80g (R)-3-苯氧基-1,2-丙二醇 2 (白色固体, 收率 40%, 73.3% ee), m. p. 60℃ ~ 62℃;  $[\alpha]_D^{25} - 8.6$  (c 1.00, EtOH)。由此可见, 利用微生物环氧化物水解酶制备光学纯手性环氧化物是完全可行的, 具有潜在的工业应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] 贾师英, 李青山, 许建和, 等. 微生物学通报, 1999, 26 (2): 98 ~ 101.
- [2] Archer I V J. Tetrahedron, 1997, 53: 15617 ~ 15662.
- [3] Faber K, Miachitz M, Kroutil W. Acta Chem Scand, 1996, 50: 249 ~ 258.
- [4] Zhang J Y, Reddy J, Robege Csananyake C, et al. J Ferment Bioeng, 1995, 80 (3): 244 ~ 246.
- [5] van den Wijngaard A J, Janssen D B, Witholt B. J Gen Microbiol, 1989, 135: 2199 ~ 2208.
- [6] Carter S F, Leak D J. Biocatal Biotransform, 1995, 13: 111 ~ 129.
- [7] Chen C S, Fujimoto Y, Girdaukas G, et al. J Am Chem Soc, 1980, 104: 7294 ~ 7299.
- [8] Choi W J, Huh E C, Park H J, et al. Biotechnol Techniques, 1998, 12 (3): 225 ~ 228.
- [9] Lutje Spelberg J H, Rink R, Kellogg R M, et al. Tetrahedron: Asymmetry, 1998, 9: 459 ~ 466.