农药学学报, 2005, 7(2): 140-143
Chinese Journal of Pesticide Science

·研究论文·

α氰基-3苯氧基苄醇乙酸酯立体选择性水解酯酶产生菌的筛选及酶学特性初探

杨淑莲, 徐汉虹, 廖美德, 侯学文*

(农药与化学生物学教育部重点实验室,华南农业大学 昆虫毒理研究室,广东 广州 510642)

摘 要:经过酵母菌富集培养,以α氰基-3苯氧基苄醇乙酸酯为唯一碳源培养和分离,并进一步用手性HPLC法复筛,得到了两株优先立体选择性水解(S)-α氰基-3苯氧基苄醇乙酸酯的酵母菌菌株S11和S25。两株酵母菌均能产生耐酸酯酶,在pH 3.0时对α氰基-3苯氧基苄醇乙酸酯进行立体选择性水解,产物对映体过量值(ee_p)均在95%以上,转化率(C)分别达50%和46%。测定了菌株S11的生长曲线,并对其产酶特性进行了初探,发现其所产酶为生长偶联型的胞内酶。

关键词: α氰基-3苯氧基苄醇乙酸酯;立体选择性水解;酯酶

中图分类号: Q936 **文献标识码**: A **文章编号**: 1008-7303(2005)02-0140-04

Study and Screening of Esterase Producer for Hydrolyzing α-Cyano-3-phenoxybenzyl Acetate with High Enantioselectivity

YANG Shu-lian, XU Han-hong, LIAO Mei-de, HOU Xue-wen*

(Key Lab. of Pesticide and Chemicial Biology, Ministry of Education,
Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Culture and separation was made by using α-cyano-3-phenoxybenzyl acetate as the only carbon source after yeast enrichment. Further screening was performed by chiral HPLC analysis. Two yeast strains (S11 and S25) producing esterase with high enantioselectivity and conversion were isolated. Esterases were stable and remained activity at pH 3.0. Enantiomeric excess of (S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl alcohol both reached 95%, the conversion of substrate reached 50% and 46%, respectively. The process of growth and partial enzymatic properties of S11 was investigated. Experiments demonstrated that it was a membrane-associated enzyme found in the cell debris.

Key words: α-cyano-3-phenoxybenzyl acetate; enantioselective hydrolysis; esterase

α氰基-3苯氧基苄醇(以下简称CPBA,其乙酸酯简称CPBAc)是一个非常重要的拟除虫菊酯中间体。CPBA有两种光学异构体,由(S)-CPBA合成的拟除虫菊酯为高效体,而由(R)-CPBA合成的拟除虫菊酯则为无效体,目前以单一(S)-CPBA合成的已商品化的拟除虫菊酯农药有溴氰菊酯、顺式氰戊菊酯。(S)-CPBA的合成有多种方法,非水相中酶催化立体选择性水解CPBAc获得(S)-CPBA即为一个非常有效的手段。但目前多数研究者尚局限于非水相中有什么酶用什么酶的状况。购买商品酶价格昂贵,而利用现代生物技术手段现已能大量表达有用的酶,因此发掘新的、立体选择性强的酶源菌株对我国酶法合成(S)-CPBA具有重要的现实意义[1,2],这在手性医药的

收稿日期: 2004-10-25; **修回日期**: 2005-02-02.

作者简介: 杨淑莲(1973-),女,湖南津市人,硕士研究生,主要从事手性农药化学合成与酶法合成研究; *通讯作者:侯学文(1969-),男,四川成都人,副教授,主要从事生物技术研究. **联系电话**: 020-85285127; E-mail: houxuewen01@yahoo.com

基金项目:教育部科学技术研究重点项目(01092)资助.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酶法合成上已有范例[3,4]。但许多酶因为耐热、耐酸碱性差而难以满足生产需要,章文贤等[5]曾筛选到一株可产耐酸脂肪酶的酵母菌。本研究针对CPBA在水溶液中只有当 pH < 4.5才能存在且 24 h内 CPBAc不会自动水解[6],以及多数酵母菌适宜在偏酸性条件下生长的特性,在采样和培养微生物时有目的地筛选酵母菌,取得了较好的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

Rac-CPBAc由华南农业大学农药与化学生物学教育部重点实验室在广东中山凯达精细化工股份有限公司合成,纯度在 95%以上; Rac-CPBA 由大连物理化学研究所惠赠。所有溶剂和试剂均为分析纯,苯醚醛 (简称 m-PBA)、正己烷和异丙醇使用前经重蒸。

筛选用样品分别采自华南农业大学豆奶厂废水长期流经的含豆制品丰富的土壤、广州市肉联厂处理前的富含脂肪的废水、广东省农科院作物研究所花生综合实验厂富含植物油的土壤、广州浪奇油脂化工实业有限公司含油脂丰富的污泥、广东中山凯达精细化工股份有限公司内被拟除虫菊酯类农药污染的土壤和废水、湖南津市监狱农场果园富含果汁的土壤、广州市天河区五山镇菜市场肉案及发霉的腊肉中。富集培养基参照文献[7]、初筛培养基和复筛培养基参照文献[8]配制并改进。初筛培养基: CPBAc 10 mmol/L,吐温-80 0.5 g/L,无水乙醇 4 mL/L,平板中加琼脂粉 20 g/L;斜面培养基为麦芽汁琼脂;复筛培养基:葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g,酵母浸出汁 5 g, pH = 4.5,自来水 1 000 mL。

1.2 主要仪器

HP-1100液相色谱仪 (美国惠普公司); THZ-C台式恒温振荡器 (太仓市华美生化仪器厂); WZZ-2A型旋光仪及 7230G可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司)。

1.3 菌种的筛选和分离

1.3.1 初筛　先对所采样品进行酵母菌富集培养,然后分别以 Rac-CPBAc的吐温溶液和乙醇溶液为唯一碳源制作培养基进行筛选,培养条件为 28℃、140 r/min培养 3 d。250 mL 锥形瓶装培养液 20 mL,依次将上一轮培养的菌液移取 1 mL 接入下一轮培养基中。平板筛选:将三轮富集与筛选后的菌液稀释后涂抹于平板上,于 28℃培养,挑出平板上的单菌落转接到麦芽汁琼脂斜面上,编号,于 4℃冰箱中保存。

1.3.2 复筛　将初筛菌株接入 20 mL 复筛培养基中,对照不接菌, 28℃、140 r/min培养 60 h后测发酵液的 pH值。调节 pH值至 2.5、3.0、3.5、4.0,每处理加一滴 Rac-CPBAc (23 mg), 30℃、200 r/min下转化 22 h。手性 HPLC分析,以转化率 (C)、产物对映体过量值 (ee_p)、底物对映体过量值 (ee_s)均较高的菌株 S11和 S25为目标菌株。

1.3.3 目标菌株对底物的转化　将菌株 S11和 S25接入 20 mL 复筛培养基中,对照不接菌。28℃、140 r/min培养 60 h后测发酵液的 pH值,调节 pH值至 3.0,其余操作同 1.3.2复筛。

1.3.4 菌株 S11的酶学特性初探　以下实验先做液体种子培养,接种量 (质量分数)均为 5%,培养条件均为 300 r/min摇床速率,其他同复筛。生长曲线测定:接种后每 5 h取样一次测其 OD_{600}值,25 h后每 2.5 h测一次。产酶过程测定:接种后分别培养 10、15、20、25、30、35、40 h后测其 pH值,调节 pH值至 3.0,加一滴 CPBAc, 30℃、200 r/min转化 3 h后用甲苯萃取,手性 HPLC分析,比较各个处理中 (S)-CPBAc与 (R)-CPBAc的比值。

胞内酶的确定:取培养 28 h的发酵液,于 4 000 ×g、4℃离心 30 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤去上清液中的残留菌,调节 pH值至 3.6,将菌体溶解在 20 mL 浓度为 0.1 mol/L、pH = 3.6的醋酸缓冲液中,其他转化条件不变, 3 h后做手性 HPLC分析。

1.4 计算方法

按公式 (1)～(3)分别计算 ee值和转化率:

$$ee_p = \frac{A_{S-OH} - A_{R-OH}}{A_{S-OH} + A_{R-OH}} \times 100\% \quad (1)$$

$$ee_s = \frac{A_{R-EST} - A_{S-EST}}{A_{R-EST} + A_{S-EST}} \times 100\% \quad (2)$$

$$C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \times 100\% \quad (3)$$

ee_p 为产物 CPBA 的对映体过量值; ee_s 为底物 CPBAc的对映体过量值; A_S、A_R 分别为手性 HPLC所测样品中 S体和 R体的峰面积; -OH代表醇; -EST代表酯; C为转化率。

1.5 分析方法

样品前处理:在发酵液转化底物后,用 20 mL 甲苯萃取, 25℃、4 000 ×g离心 30 min,甲苯层用无水 Na_2SO_4 干燥过夜, 0.45 μm (有机系)针头式过滤器过滤后做手性 HPLC分析。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

旋光性样品的制备:因甲苯沸点高,因此在菌株 S11和 S25发酵液转化 CPBAc 22 h后用异丙醚萃取[9]。离心,手性 HPLC分析上层物质,合并转化率近 50%的样品,旋转蒸发脱去异丙醚,100～200目硅胶柱层析[10],手性 HPLC测各馏份,合并CPBAc的馏份,脱去溶剂。

HPLC分析[11,12]: Daicel公司 Chiralcel OB-H柱 (150 mm ×4. 6 mm, 5 μm);流动相:正己烷 异丙醇 = 97 3(体积比);流速: 0. 8 mL /min;柱温:室温;紫外检测波长: 225 nm。

旋光性检测:用三氯甲烷溶解样品,测定其旋光度,计算比旋光度,确定各异构体的绝对构型[9,13]。

2 结果与分析

2. 1 菌株筛选

初筛:挑选到了 61株在平板上生长的单菌落,除 2株霉菌外,其余均为酵母菌。

复筛:结果见表 1。在本实验条件下,初筛所得绝大多数菌株的发酵液对 CPBAc无催化水解作用, C和 ee_p均为 0(表中省略),其手性 HPLC谱图与对照一致。仅有 7株菌所产酶能催化水解底物。其中菌株 S10、霉菌 S27完全水解底物但无选择性;菌株 S40优先水解 (R)-CPBAc;有 4株酵母菌能优先水解 (S)-CPBAc,其中菌株 S11和 S25所产酶在 pH值 3. 0时对 CPBAc对映体选择性水解,产物的 ee值均达 95%以上,转化率分别达 50% (最大值)和 46%以上。由 $[\alpha]_D^{25}$ = - 7. 97, (c = 0. 1)可知,转化 22 h后剩余底物的绝对构型为 (R)-CPBAc,进一步确定了被立体选择性水解的酯为 (S)-CPBAc。

Table 1 CPBAc hydrolyzing properties of various microorganisms screened from natural sources

Strain no.	C (%)	ee_p (%)	ee_s (%)
S10	50. 00	0. 00	0. 00
S11	50. 00	97. 00	100. 00
S14	11. 08	100. 00	12. 46
S25	46. 21	95. 01	81. 61
S27	50. 00	0. 00	0. 00
S38	5. 79	100. 00	7. 27
S40	50. 00	- 100. 00	- 100. 00

Notes: 1. ee_p is underestimated for the nature of CPBA unstability, therefor C value calculated by the formula is higher than actual. 2. C = 50. 00% means the enantiomer was fully transformed, and reached the highest transforming ratio.

手性 HPLC分析图谱见图 1～3。图 2中各峰依次代表 m-PBA、(R)-CPBA、(S)-CPBA、(S)-CPBAc、(R)-CPBAc。从对照与酶水解底物后体系中底物 CPBAc与产物 CPBA的 S体与 R体峰面积消长情况可以明显看出,酶对 CPBAc两个异构体的水解作用具有立体选择性。

2. 2 菌株 S11的部分产酶特性

在本实验条件下,菌株 S11接种后 10 h进入对数生长期, 28 h进入稳定生长期,见图 4。随着生长时间的延长, (S)-CPBAc/(R)-CPBAc的值逐渐下降, 28 h后处于稳定状态,可知其产酶过程为生长偶联型,见图 5。胞外液对底物基本无催化水解作用,醋酸缓冲液中的菌体转化底物 3 h后 ee_s值为 35. 99%,可知其所产酶为胞内酶。

3 小结与讨论

本实验的难点在于 CPBA的不稳定性,即使在色谱分析的过程中,也会有部分分解[13]。将筛选控制在低 pH值下进行,在一定程度上控制了 CPBA的外消旋化,其局限是降低了筛选有用酶的几率。复筛后绝大部分菌株无水解活性,而菌株 S10、S27和 S40不能优先水解 (S)-CPBAc,对于 S11、S14、S25、S38, ee值和 C值都较高的只有菌

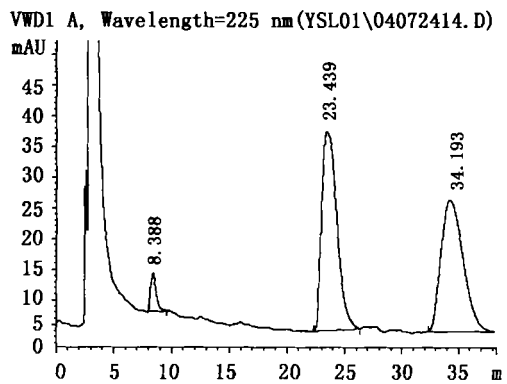

Fig 1 Chiral HPLC spectrum of *Rac*-CPBAc in CK

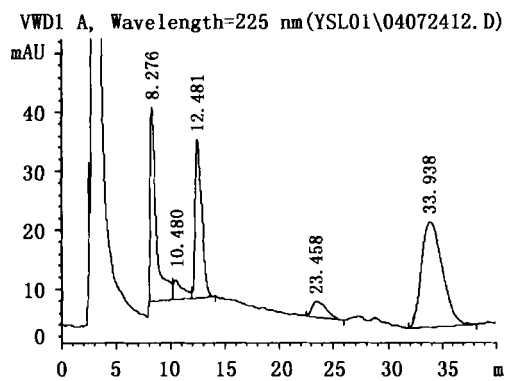

Fig 2 Changes in (*S*)-CPBAc and (*R*)-CPBAc concentrations in the enzymatic hydrolysis by S25

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

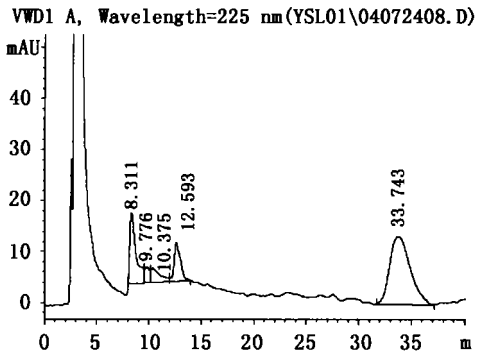

Fig 3　Changes in (*S*)-CPBAc and (*R*)-CPBAc concentrations in the enzymatic hydrolysis by S11

Note for Fig 1～Fig 3: Chromatogram separation figure of different optical isomers by chiral HPLC. The retention times were: *m*-PBA 8.3 min; (*R*)-CPBA 10.3 min; (*S*)-CPBA 12.5 min; (*S*)-CPBAc 23.4 min; (*R*)-CPBAc 33.9 min.

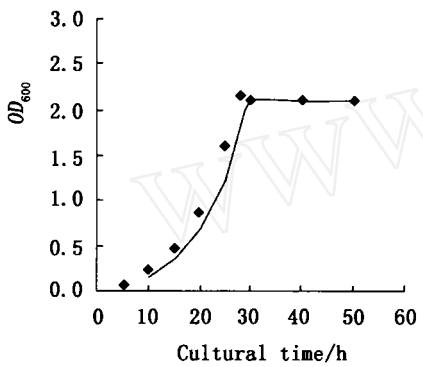

Fig 4　The growth curve of S11

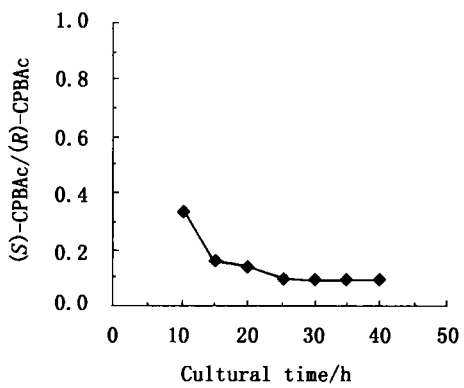

Fig 5　The relationship between cultural time of S11 and ratio of (*S*)-CPBAc to (*R*)-CPBAc

株 S11和 S25,有一定应用潜质。

本实验以 CPBAc不同异构体含量的减少来监测 S11的产酶特性、以未被水解的 CPBAc异构体样品来做旋光性检测,为实验提供了捷径。CPBAc及其不同异构体在一般条件下不会外消旋化,而 CPBA及其不同异构体受多方面因素影响会部分外消旋化成 m-PBA[6],因此应尽可能控制有机溶剂及流动相干燥,样品应及时分析,并控制整个过程中的温度。

菌株 S11、S25所产酶的酶学特性、分离纯化及其非水相酶催化工艺等尚待进一步研究。目前我国绝大部分商品酶依赖于进口,因此研究如何利用现代基因工程技术大量表达立体选择性水解 CPBAc的酶,有望大幅度降低工业化生产 (S)-α氰基-3苯氧基苄醇的成本。

参考文献:

[1] HUANG Liang (黄量), DAI Li-xin (戴立信). Chemistry and Biology of Chiral Drugs (手性药物的化学与生物学) [M]. Beijing (北京): Chemistry Industry Press (化学工业出版社), 2002. 252.

[2] LUO Ji-xing (罗积杏). Resolution of α-Cyano-3-phenoxybenzyl Acetate via Lipase-catalyzed Asymmetric Transesterification in Organic Media (有机相酶催化非对称转酯化拆分 α-氰基-3苯氧基苄醇乙酯) [D]. Hangzhou (杭州): Zhejiang University (浙江大学), 2003.

[3] Kim G J, Choi G S, Kim J Y, et al. Screening, production and properties of stereospecific esterase from Pseudomonas sp. S34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester [J]. J Mol Catal B-Enzym, 2002, 17 (1): 29-38.

[4] Choi G S, Kim J Y, Kim J H, et al. Construction and characterization of a recombinant esterase with high activity and enantioselectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester [J]. Protein Expression and Purification, 2003, 29 (1): 85-93.

[5] ZHANG Wen-xian (章文贤), JANG Yong-mei (蒋咏梅), SHI Qiao-qin (施巧琴), et al. 异常毕赤酵母产生耐温酸性脂肪酶的研究 [J]. J Fujian Teachers Univ (福建师范大学学报), 2000, 16 (3): 72-82.

[6] Mitsuda S, Yamamoto H, Umemura T, et al. Enantioselective hydrolysis of α-cyano-3-phenoxybenzyl acetate with Arthrobacter Lipase [J]. Agric Biol Chem, 1990, 54 (11): 2907-2912.

[7] ZHOU De-qing (周德庆). Microbiology Tutorial (微生物学教程) [M]. Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社). 1993. 120-121.

[8] SHENG Duan (沈端), XU Jian-he (许建和), GONG Peng-fei (宫鹏飞), et al. 酮基布洛芬拆分用酯酶产生菌的筛选及其催化特性 [J]. Acta Microbiologica Sinica (微生物学报), 2002, 29 (1): 45-49.

[9] Fishman A, Zviely M. Chemo-enzymatic synthesis of (S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl alcohol [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1998, 9 (1): 107-118.

[10] ZHANG Ting-zhou (章亭洲), YANG Li-rong (杨立荣). 有机相中乙酸-α氰基-3苯氧基苄酯的含量与对映体过量值的测定 [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2004, 32 (5): 696.

[11] Hanefeld U, Li Y X, Sheldon R A, et al. CAL-B catalyzed enantioselective synthesis of cyanohydrins——A facile route to versatile building blocks [J]. Synlett, 2000, (12): 1775-1776.

[12] Li Y X, Straathof A J, Hanefeld U. Enantioselective formation of mandelonitrile acetate-investigation of a dynamic kinetic resolution [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2002, 13 (7): 739-743.

[13] Csaba P, Petri T, Katri L, et al. Preparation of novel phenylfuran-based cyanohydrin esters: lipase-catalysed kinetic and dynamic resolution [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2003, 14 (13): 1895-1904.

(Ed. TANG J)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net