

文章编号:1671-6833(2012)02-0036-05

## 两株脂肪类混合细菌拆分缩水甘油丁酸酯的工艺研究

黄 强, 孟庆意, 牛柏林, 张 蕊, 高莹玉

(郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001)

**摘 要:** 由于从土壤筛选出十几个单株细菌拆分效果不理想, 从中优选出两株脂肪类细菌混合使用, 拆分效果良好. 其选择性拆分外消旋体缩水甘油丁酸酯的工艺为: 淀粉为碳源, 牛肉膏为氮源, 初始 pH = 8.0, 温度 30 ℃, 转速 200 r/min, 摇瓶 2 d, 产酶量为 1.5 U. 在最适条件下培养两株细菌拆分反应, 并考察工艺条件对拆分反应效果的影响. 结果表明, 工艺条件在温度 28 ℃, pH = 6.0, 30 mL 脂肪类双菌液中, 加入 0.5 g 缩水甘油丁酸酯, 在 200 r/min 下振荡 12 h, 拆分效果良好, (R) - 缩水甘油丁酸酯的对映体过量值 (ee) 为 92.8%, 转化率为 83.2%.

**关键词:** 缩水甘油丁酸酯; 光学拆分; 脂肪类细菌

**中图分类号:** TQ225.24; TQ326 **文献标志码:** B **doi:**10.3969/j.issn.1671-6833.2012.02.009

### 0 引言

缩水甘油丁酸酯是重要的手性药物中间体, 在药物、液晶、农药和生物探针等领域中应用<sup>[1]</sup>. 国内的研究者对其进行了相关的研究<sup>[2-3]</sup>和报道<sup>[4-5]</sup>, 但鲜有两株脂肪类细菌拆分缩水甘油丁酸酯的研究报道. 据市场估计, 手性化合物将会带来巨大的市场价值<sup>[6]</sup>, 欧美等国把手性化合物研究作为战略研究的一部分. 手性药物的拆分和合成的方法主要有<sup>[8]</sup>: 酶法合成、萃取、膜法以及生物催化制备等. 笔者通过最适产酶条件下工艺研究, 得到 (R) - 缩水甘油丁酸酯的对映体过量值 (ee) 达到 92%, 转化率为 83.2%.

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

土样来源: 郑州大学校园内和周边餐馆土壤. 缩水甘油丁酸酯是由环氧氯丙烷和正丁酸钠合成, 并对照红外光谱图与标准图谱, 两者一致, 经气相色谱仪 (GC9800, 中国上海科创色谱仪器有限公司) 测定, 含量在 99% 以上, 为无色黏性液体; 旋光仪 (上海物理光学仪器厂, WZZ-2S 型); 配制培养基所用的试剂为化学纯, 其它的试剂为分析纯.

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 实验中使用的培养基

土壤富集培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.16 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.32 g, NaCl 0.5 g, 大豆油 5.0 mL, 蒸馏水 250 mL, pH = 9.0.

平板分离培养基: 大豆油 10 mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.16 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.32 g, 琼脂 4.0 g,  $\text{CaCO}_3$  1 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 250 mL, pH = 7.0.

细菌种子液培养基: 大豆油 5 mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.16 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.32 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 250 mL, pH = 9.0.

种子液拆分培养基: 淀粉 1.5 g, 牛肉膏 3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 400 mL, pH 自然.

##### 1.2.2 细菌富集的方法

称 5 g 土样加入有 20 mL 灭菌水 (蒸汽灭菌器灭菌) 的试管中, 摇动后取 5 mL 悬浮液加入盛有 30 mL 富集培养基的三角烧瓶中, 35 ℃, 摇瓶 120 r/min 振荡 3 d 后, 取 5 mL 培养液至另一个盛有新培养基的三角烧瓶中继续振荡培养 3 d. 富集 3 次, 然后进行平板分离.

##### 1.2.3 平板分离的方法

先将平板分离培养基灭菌后冷却至 60 ℃, 倒入平板内, 再将经富集培养的细菌液用无菌水进

收稿日期: 2011-10-15; 修订日期: 2012-01-10

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 (082300440040)

作者简介: 黄强 (1965-), 男, 山东邹县人, 郑州大学副教授, 主要从事化工工艺研究, E-mail: huangqiang@zzu.edu.cn.

行适当稀释(本实验采用  $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  两个稀释度),并取 0.5 mL 涂布于分离平板上,在  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  下,细菌培养 3 d,由于平板培养基中有  $\text{CaCO}_3$ ,微生物产生的脂肪酶与大豆油作用后会生成脂肪酸与  $\text{CaCO}_3$  发生作用,产生透明圈,生成的脂肪酸越多透明圈就越大,然后将透明圈较大的细菌菌落挑至斜面培养基上保存。

#### 1.2.4 细菌培养的方法

细菌种子培养:从斜面菌种接种一环至装液 30 mL 的 250 mL 三角瓶中,在  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,转速 200 r/min 下进行摇床振荡培养。

细菌菌液培养:待种子培养 24 h 后,取 1 mL 的接种量接种于装液有 60 mL 的 500 mL 的三角瓶中,在  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,转速 200 r/min 下进行 48 h 的摇床振荡培养。

#### 1.2.5 脂肪菌催化拆分缩水甘油丁酸酯的方法

取 30 mL 的菌液,加入标准的苯二甲酸氢钾缓冲液调节 pH,再加入 0.5 g 的底物,调节好温度,200 r/min 振荡反应,可得到拆分产物与细菌液的混合液。

#### 1.2.6 细菌酶活的测定

测定方法:取 250 mL 三角瓶,加入 5 mL 缓冲液和 6 mL 底物乳化液,在  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中预热 10 min,加入 1 mL 待测样品液,迅速摇匀并保温计时,反应 30 min 后立即加入体积分数为 95% 的乙醇 10 mL 终止酶作用,加入 2 滴 1% 酚酞指示剂,用经过标定的 0.02 mol/L 的 NaOH 溶液滴定至微红色,并记录耗碱量。对照样品先经过乙醇的灭活酶后同样处理。

脂肪酶活力<sup>[9]</sup>定义:在  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,pH = 7.0 下催化水解橄榄油,每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  的脂肪酸的酶量定义为 1 个单位(U)。本实验所测定的脂肪类细菌的酶活为 1.5 U。

#### 1.2.7 缩水甘油丁酸酯含量的测定

利用气相色谱仪(GC9800,中国上海科创色谱仪器有限公司,SE-30 为填充柱填料,填充柱:3 mm  $\times$  1.5 m. 热导检测仪和进样温度为:230  $^{\circ}\text{C}$ ,柱温:130  $^{\circ}\text{C}$ ;氢气流量:40 mL/min. 柱前后压:0.05 mPa.)测定缩水甘油丁酸酯的含量。

#### 1.2.8 (R)-缩水甘油丁酸酯的光学纯度的测定

将 30 mL 的三氯甲烷加入到混合液中,萃取并离心破乳,用分液漏斗分离。用旋光仪(上海物理光学仪器厂,WZZ-2S 型)测定液体的旋光度  $\alpha$ ,求出比旋光值  $[\alpha]$  ( $[\alpha] = \frac{\alpha}{c \cdot L}$ ,  $L = 1.5\text{ dm}$ )

对映体过量值  $ee = \frac{[\alpha]}{[\alpha]_{\text{最大}}} \times 100\%$  ( $[\alpha]_{\text{最大}}$  为  $31^{\circ}$ )。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 筛选拆分缩水甘油丁酸酯的细菌

采集校园和餐馆周边经常接触油脂类的土样 15 个,经土样富集培养和平板分离,可以得到变色圈大小不同的群落,结果如表 1 所示。

表 1 细菌培养基菌落特点

Tab. 1 feature of bacteria colony culture

土样 编号	细菌稀释度		土样 编号	细菌稀释度	
	$10^{-4}$	$10^{-5}$		$10^{-4}$	$10^{-5}$
1	+	-	9	-	-
2	-	-	10	++	++
3	+++	+	11	++	+
4	++	+	12	++	++
5	-	-	13	++	+
6	-	-	14	-	-
7	++	+	15	+++	+++
8	++	++			

表 1 中  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  分别表示细菌的两个稀释度。“+”表示培养基中存在透明圈不大的菌落,且菌落不是很多;“++”表示有较明显的透明圈,菌落个数一般;“+++”表示培养基有较多的菌落,且有较大的透明圈;“-”表示培养基中没有出现透明圈的菌落,或者几乎很少。

由表 1 可知 1,3,4,7,8,10,11,12,13,15 号土样在细菌培养基中长出了透明圈的菌落,从中说明这些菌能分解酯产生脂肪酸,从中挑选产酶能力较强的菌,保存至斜面。

### 2.2 细菌脂肪酶活力的测定

将有“+”,“++”和“+++”的单菌株重新进行培养,测定其酶活。结果如表 2 所示。

从中选择 1(2),3(3),3(4),3(5),3(8),7(5),10(2),13(3),15(1),8(2) 等 10 种菌株进行下一步的培养和细菌筛选。利用缩水甘油丁酸酯培养测量酶活,从中选择 3(3) 和 13(3) 两株进行混合培养。

### 2.3 优化考察拆分缩水甘油丁酸酯产生菌的条件

分别考察碳源、氮源、pH、温度、振荡速率、装液量等因素条件,培养 3 d,如图 1~6 和表 3 所示。从图 1~图 6 分析得出,淀粉为碳源,牛肉膏为氮源,初始 pH = 8.0,温度  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,转速 200 r/min,摇瓶 2 d,装液量 50 mL,产酶量最佳。

表 2 细菌酶活测定结果

Tab. 2 Result of enzymatic activity

细菌菌样	酶活/ (U · mL <sup>-1</sup> )	细菌菌样	酶活/ (U · mL <sup>-1</sup> )
1 细菌(1)	0.0234	8 细菌(1)	0.700
1 细菌(2)	0.634	8 细菌(2)	0.530
1 细菌(3)	0.440	8 细菌(3)	0.170
1 细菌(4)	0.460	8 细菌(4)	0.134
3 细菌(1)	0.267	8 细菌(5)	0.200
3 细菌(2)	0.167	8 细菌(6)	0.167
3 细菌(3)	0.525	8 细菌(7)	0.334
3 细菌(4)	0.640	10 细菌(1)	0.267
3 细菌(5)	0.685	10 细菌(2)	0.665
3 细菌(6)	0.367	10 细菌(3)	0.260
3 细菌(7)	0.400	11 细菌(1)	0.300
3 细菌(8)	0.900	11 细菌(1)	0.200
3 细菌(9)	0.444	11 细菌(3)	0.367
3 细菌(10)	0.233	11 细菌(4)	0.400
4 细菌(1)	0.267	11 细菌(5)	0.300
4 细菌(2)	0.274	12 细菌(1)	0.367
4 细菌(3)	0.05	12 细菌(2)	0.234
4 细菌(4)	0.134	12 细菌(3)	0.334
4 细菌(5)	0.170	13 细菌(1)	0.300
4 细菌(6)	0.500	13 细菌(2)	0.434
7 细菌(1)	0.234	13 细菌(3)	0.565
7 细菌(2)	0.190	15 细菌(1)	0.565
7 细菌(3)	0.344	15 细菌(2)	0.467
7 细菌(4)	0.167	15 细菌(3)	0.400
7 细菌(5)	0.665	15 细菌(4)	0.467
7 细菌(6)	0.167	15 细菌(5)	0.334

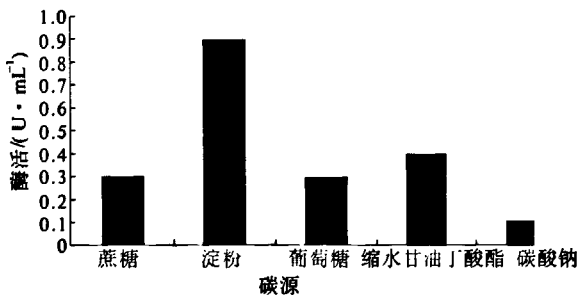


图 1 碳源对产生菌酶活的影响

Fig. 1 Effect of carbon source on enzymatic activity

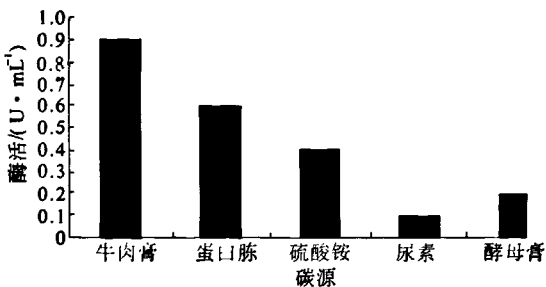


图 2 氮源对产生菌酶活的影响

Fig. 2 Effect of nitron source on enzymatic activity

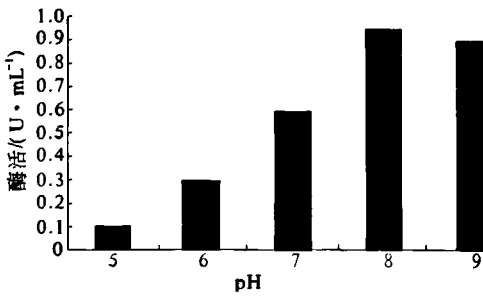


图 3 pH 对产生菌酶活的影响

Fig. 3 Effect of pH on enzymatic activity

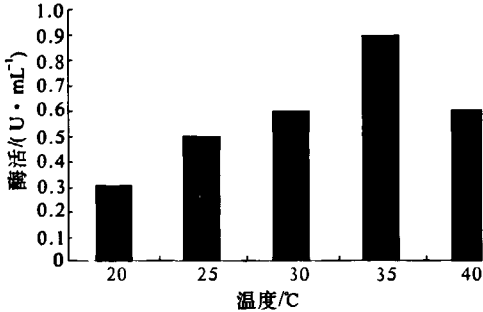


图 4 温度对产生菌酶活的影响

Fig. 4 Effect of temperature on enzymatic activity

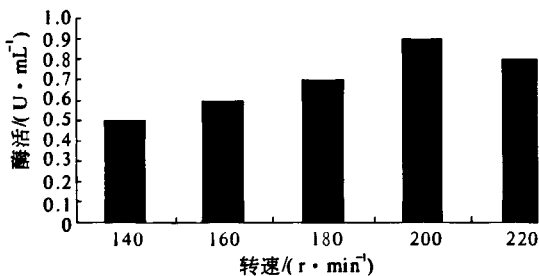


图 5 振荡速率对产生菌酶活的影响

Fig. 5 Effect of rotating rate on enzymatic activity

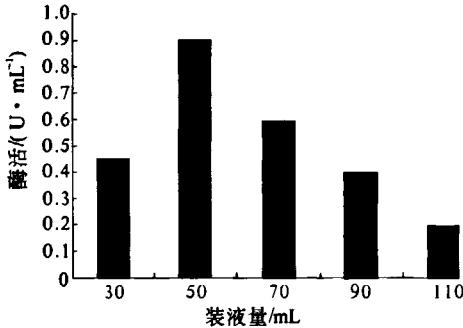


图 6 装液量对产生菌酶活的影响

Fig. 6 Effect of medium volume on enzymatic activity

2.4 混合菌拆分缩水甘油丁酸酯工艺条件的研究

2.4.1 反应过程中最佳 pH 工艺的选择

据筛选实验方法,反应温度定为 30 ℃,摇床振荡速率为 200 r/min,底物量为 0.5 g,不同 pH (5.5,6.0,6.5,7.0,7.5) 条件下细菌催化拆分缩水甘油丁酸酯,反应 12 h 后,测定缩水甘油丁酸酯的转化率及(R)-缩水甘油丁酸酯的 ee 值,其

表3 培养细菌各个因素条件

Tab. 3 Every effected factor of bacteria medium

影响因素	内容						
碳源	葡萄糖	淀粉	蔗糖	缩水甘油丁酸酯		碳酸钠	图1
氮源	蛋白胨	尿素	牛肉膏	硝酸氮		酵母膏	图2
pH	5.5	6.0	7.0	7.5	8.0	9.0	图3
温度/℃	20	25	30	35	40	—	图4
振荡速率/(r·min <sup>-1</sup> )	140	160	180	200	220	—	图5
装液量/mL	30	50	70	90	110	—	图6

结果如图7所示.当pH=6.0时,双菌的立体拆分最佳,产物ee值达到了89.8%,缩水甘油丁酸酯的转化率为84.6%;在pH范围内,转化率在65.1%~84.6%,ee值在23.8%~89.8%.

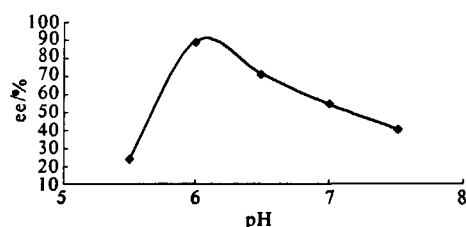


图7 pH值对于对映体过量值(ee)的影响

Fig.7 Effect of pH on ee

#### 2.4.2 反应过程中最佳温度工艺的选择

在pH=6.0,转速200 r/min下,在底物加入量为0.5 g,拆分12 h下,试验在不同温度下(26, 28, 30, 33, 35 ℃)的缩水甘油丁酸酯转化率和ee值,其结果如图8所示.当反应温度在28 ℃时,两株细菌有较好的拆分效果,ee值达到82.3%.试验温度范围内,转化率在78.2%~83.9%之间,ee值在51.7%~82.3%.

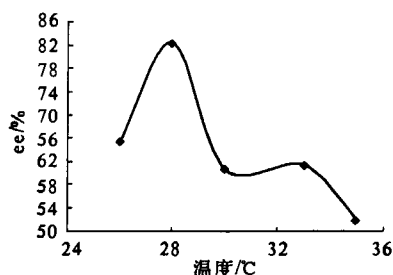


图8 温度对于对映体过量值(ee)的影响

Fig.8 Effect of temperature on ee

#### 2.4.3 反应过程中最佳底物量工艺的选择

在28 ℃,拆分12 h,200 r/min下,试验在30 mL细菌液中加入不同底物量(0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 g)对拆分反应的影响,其结果如图9所示.当底物量为0.5时,ee值为82.3%;底物0.3 g时,转化率为98.8%,ee值为75.4%,随着底物量的增加,缩水甘油丁酸酯的转化率降低,范

围为60%~83.7%,ee值范围为25.1%~82.3%.

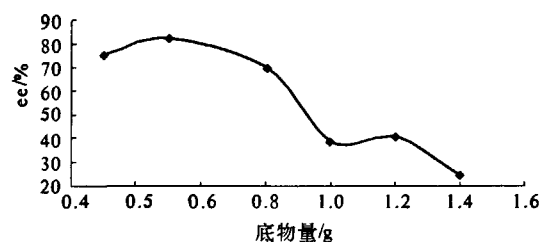


图9 底物量对于对映体过量值(ee)的影响

Fig.9 Effect of substrate amounts on ee

#### 2.4.4 最佳反应时间工艺的选择

在28 ℃,底物量0.5 g, pH=6.0,转速200 r/min下,试验不同的反应时间(5, 7, 12, 15, 20 h)对拆分反应的影响,如图10所示.当反应5 h时,缩水甘油丁酸酯转化率为65.7%,ee值为25.3%;随着反应时间的延长,ee值逐渐提高,在12 h时产物ee值最高达到92.8%,转化率为83.2%,在反应20 h时,ee值为74.3%.

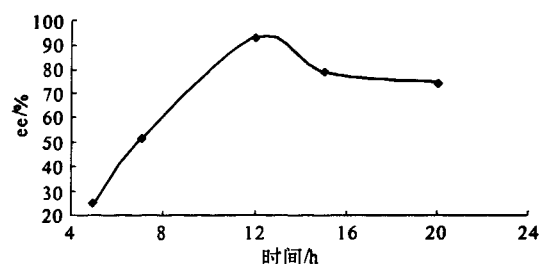


图10 反应时间对于对映体过量值(ee)的影响

Fig.10 Effect of reaction time on ee

#### 2.4.5 最佳反应振荡速率工艺的选择

在28 ℃, pH=6.0,拆分12 h,底物量0.5 g下,试验不同的振荡速率(160, 180, 200, 210, 220 r/min)对拆分反应的影响,其结果如图11所示.两株细菌拆分缩水甘油丁酸酯反应的转化率和立体选择性与反应振荡速率的相关性很小,缩水甘油丁酸酯转化率在83.1%~85.5%,ee值在80.6%~92%,以200 r/min为最佳.

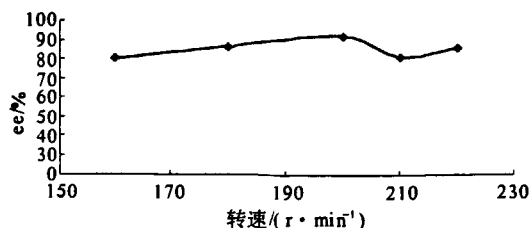


图 11 振荡速率对于对映体过量值 (ee) 的影响

Fig. 11 Effect of rotating rate on ee

#### 2.4.6 最佳反应条件的试验

在 28 ℃, pH = 6.0, 转速 200 r/min, 拆分 12 h 下, 底物量 0.5 g, 测定了缩水甘油丁酸酯的转化率和 ee 值, 其结果为 ee 值达到 92.8%, 转化率达到 83.2%。

### 3 结论

由于从土壤筛选出的十几个单株细菌拆分效果不理想, 从中优选出两株脂肪类细菌混合使用, 拆分效果良好, 经文献[10]方法鉴定为: 短杆菌属和霉菌, 筛选工艺为: 淀粉为碳源, 牛肉膏为氮源, 初始 pH = 8.0, 温度 30 ℃, 转速 200 r/min, 摇瓶 2 d, 装液量 50 mL, 产酶量最佳, 为 1.5 U, 未进行诱变。工艺条件为: 28 ℃, pH = 6.0, 30 mL 脂肪类双菌液中加入 0.5 g 缩水甘油丁酸酯, 在振荡 12 h, 转速 200 r/min 下, 拆分效果良好, (R) - 缩水甘油丁酸酯的对映体过量值 (ee) 为 92.8%, 转化率为 83.2%, 拆分效果良好, 操作工艺简单,

可以用于研究和后续的开发应用。

#### 参考文献:

- [1] HANSON R M. The synthetic methodology of non-racemic glycidol and related 2, 3-epoxy alcohol [J]. Chem Rev, 1994, 91 (4): 437 - 475.
- [2] 邹小明, 钱俊青. 酵母细胞催化拆分缩水甘油丁酸酯的工艺研究 [J]. 浙江工业大学学报, 2005, 33 (1): 106 - 108.
- [3] 王阳, 许健和. 缩水甘油丁酸酯的对应选择性酶促水解 [J]. 华东理工大学学报, 1999, 25 (2): 209 - 211.
- [4] 孟庆意, 黄强, 班春兰, 等. 缩水甘油丁酸酯拆分的研究进展 [J]. 化学工程与装备, 2011 (1): 129 - 131.
- [5] 黄强, 孟庆意, 班春兰, 等. 气相色谱法测定缩水甘油丁酸酯 [J]. 光谱实验室, 2011, 28 (5): 2448 - 2450.
- [6] 俞小鸥, 张传华. 医药中间体最新市场 [J]. 精细与专用化学品, 2006 (10): 8 - 11.
- [7] 孙万儒. 手性化合物和手性药物的酶法合成 [J]. 药物生物技术, 1996, 4 (3): 239 - 245.
- [8] 田晓强, 冀克俭. 手性化合物的萃取分离研究进展 [J]. 化学分析计量, 2005, 14 (5): 63 - 65.
- [9] VORDEW ULBECKE T. Comparison of lipase by different assays [J]. Enzyme Microb Technol, 1992, 14: 631 - 638.
- [10] 蔡谨, 岑沛霖. 工业微生物学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.

## Resolution of Glycidyl Butyrate with Two Mixed and Screened Alkaline Lipase

HUANG Qiang, MENG Qing-yi, NIU Bo-lin, ZHANG Rui, GAO Ying-yu

(School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** Two mixed strains of microorganism capable of optically resolving racemic glycidyl butyrate have been isolated from soil and identified to be alkaline lipase, which one strain of lipase has no ideal result from tens of lipase. The suitable carbon source of the condition was starch and the nitrogen source was beef extract. The proper temperature and initial pH for enzyme formation were 30 ℃ and pH = 8.0 respectively. Rotating rate was 200 r/min. Under two days fermentation, it can reach 1.5 u/mL. The technology of the two alkaline lipase in the optical resolution of glycidyl butyrate was studied. The condition was pH 6.0, 28 ℃, 200 r/min, 0.50 g substrate added in the alkaline lipase liquid, when the glycidyl butyrate was transformed by 83.2%, the optical purity of (R)-glycidyl butyrate was 92.8% ee (enantiomeric excess).

**Key words:** glycidyl butyrate; optical resolution; alkaline lipase