

文章编号:1671-6833(2013)05-0113-04

里斯的明立体拆分菌株季也蒙毕赤酵母(*Meyerozyma guilliermondii*)培养条件对手性纯度和转化率的影响

李永红^{1,2}, 侯立芬³, 赵俊杰², 齐 辉², 赵常秋⁴, 刘宏民^{1,2}

(1. 郑州大学 新药研究开发中心, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学 药学院, 河南 郑州 450001; 3. 郑州大学 化学与分子工程学院, 河南 郑州 450001; 4. 翰仁医药科技开发有限公司, 河南 郑州 450001)

摘 要: 前期研究发现培养条件对里斯的明立体拆分的手性纯度和转化率影响很大, 笔者就里斯的明立体拆分菌株季也蒙毕赤酵母(*Meyerozyma guilliermondii*) HM988686.1 的培养基组成(碳源、氮源)和其他工艺条件(培养温度、初始 pH、装液量)进行了研究. 通过单因素试验和正交试验, 确定了该菌株的最适培养条件为蔗糖 2%, 蛋白胨 1%, 玉米浆 0.5%, pH 8.0, Tris-HCl 缓冲体系, 培养温度 28 ℃, 装液量为 100 mL/500 mL 三角瓶. 在最优的条件下, 转化率为 42%, 产物 ee 值达 95.1%.

关键词: 培养基; 培养条件; 优化; 季也蒙毕赤酵母; 里斯的明

中图分类号: Q939.97 **文献标志码:** A **doi:**10.3969/j.issn.1671-6833.2013.05.025

0 引言

里斯的明(Rivastigmine), 又称卡巴拉汀, 化学名(S)-N-乙基-[3-(1-二甲基氨基)乙基]-N-甲基-氨基甲酸苯酯, 是氨基甲酸酯类脑选择性乙酰胆碱酯酶抑制剂. 里斯的明对轻中度阿尔茨海默症(AD)有温和节制作用, 对帕金森症^[1]引起的痴呆症以及血管性痴呆^[2]临床证明其安全性和耐受性较好, 没有肝脏毒性. 微生物来源的酶价格低廉、拆分效率高、立体选择性强. 酶催化与化学合成法相结合已成为手性化合物合成的新途径. 虽然 Kiwon Han^[3]等人于 2009 年报道了化学-酶法制备 S-型里斯的明的方法, 但他们的工艺中催化剂成本还很高.

脂肪酶具有良好的立体选择性, 可用于手性碳原子上连有羟基或酯基的化合物的立体拆分, 作者利用一株粘红酵母中的脂肪酶来拆分倍他洛

尔中间体, 并取得了良好的结果^[4-8].

本研究对从土壤中筛选到的一株具有立体选择性脂肪酶活性的酵母菌的培养条件进行优化, 为建立化学-酶法制备里斯的明的工艺奠定基础.

1 材料与方法

1.1 仪器

HYG-IIa 型自动摇瓶柜(上海欣蕊自动化设备有限公司), SW-CJ-2D 型净化工作台(苏州净化设备有限公司), Waters 1525 高效液相色谱仪, Lux 3u cellulose-1 色谱柱(phenomenex 公司).

1.2 材料与试剂

1.2.1 试验材料

外消旋底物自己合成, 在微生物脂肪酶的作用下进行立体拆分, 拆分原理如图 1.



图 1 手性拆分原理示意图

Fig.1 Scheme of chiral resolution

收稿日期:2013-02-20; 修订日期:2013-05-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172937)

作者简介:李永红(1970-), 女, 河南延津人, 郑州大学副教授, 博士, 主要从事生物催化方面的研究, E-mail: lyh22@163.com.

1.2.2 菌种

季也蒙毕赤酵母(*Meyerozyma guilliermondii*) HM988686.1,本实验室筛选并保藏.

1.2.3 培养基

麦芽汁液体培养基、豆汁培养基、豆芽汁培养基、马铃薯葡萄糖培养基(PDA)和 YEPD(一)和 YEPD(二)培养基的配制均参考文献[9-11]配制.

1.3 初始培养条件及产物分析方法

1.3.1 初始培养条件

接种量 2 环/瓶、装液量 100 mL/500 mL 三角瓶、pH8.0、温度 28 ℃,转速 220 r/min,菌体培养 48 h 后加入 1 g/L 底物(溶于乙腈加入),再转化 16 h 后取样测定转化率.

1.3.2 转化率及 ee 值测定方法

用等体积乙酸乙酯萃取转化液 3 次,合并有机相;依次用饱和 NaHCO₃ 溶液和饱和 NaCl 溶液洗涤 3 次,用无水 Na₂SO₄ 干燥,旋转蒸发仪蒸干,再用适合的溶剂溶解后用 HPLC 法进行定量测定.

HPLC 方法中以手性 Lux 3u cellulose-1 柱为固定相,正己烷-异丙醇(92.5:7.5)为流动相,检测波长 217 nm.

转化率以目的产物的量占加入底物量的百分率来表示.

转化产物的 ee 值通过样品 HPLC 图谱上两个异构体的峰面积来计算,公式为:ee_s(%)=(峰面积_S-峰面积_R)/(峰面积_S+峰面积_R)×100%.

1.4 培养基的优化

1.4.1 培养基的选择

将菌种由斜面分别转接于豆汁、豆芽汁、PDA、麦芽汁、YEPD(一)、YEPD(二)培养基中.按前述方法转化并测定转化率.

1.4.2 单因素试验

在选定培养基种类的基础上进行培养基组分的优化,每次只优化一个因素,其他因素保持不变.

1.4.3 正交试验

在单因素试验的基础上进行四因素三水平的正交试验.

2 结果

2.1 培养基的选择

将菌株接种至 YEPD(一)、PDA、YEPD(二)、

豆芽汁、豆汁、麦芽汁等 6 种已经灭菌的培养基中进行转化,结果如表 1 所示:

表 1 不同培养基的转化结果
Tab.1 Conversion result of different medium %

培养基	ee 值	转化率
YEPD(一)	86.7	49.03
YEPD(二)	93.4	41.63
豆芽汁	94.3	35.86
PDA	85.1	42.00
豆汁	85.5	43.12
麦芽汁	71.9	51.26

由表 1 可以看出麦芽汁、YEPD(一)培养基转化较快,但产物 ee 值较低.豆芽汁、YEPD(二)培养基 ee 值较高,其中豆芽汁培养基转化较慢,并且转化产物中有杂质,增加产物分离难度,因此,初步选择 YEPD(二)培养基,在此基础上进行进一步的优化.

2.2 单因素试验

2.2.1 碳源的优化

固定 YEPD(二)培养基的其他成分(酵母膏 0.2%,蛋白胨 1%),只改变碳源种类,进行转化,考察碳源对转化的影响,结果如表 2 所示:

表 2 碳源的优化
Tab.2 Optimization of carbon source %

碳源	转化率	ee 值
淀粉	56.7	0
蔗糖	42.2	92.23
甘油	26.7	85.85
橄榄油	0	0
糊精	0	0
麦芽糖	22.8	78.57
油酸	41.8	87.96
葡萄糖	38.4	81.88

研究表明,用蔗糖作为碳源时,转化率和光学纯度最高,因此,蔗糖是该菌株产酶的最佳碳源.蔗糖廉价易得,而且是微生物培养最常用的碳源之一,符合大规模生产的条件.

固定氮源(蛋白胨 1%,酵母膏 0.2%),只改变蔗糖的浓度(0.5%~4%),进行转化,结果如表 3 所示.蔗糖浓度在 2%~3% 之间时为最佳.

2.2.2 氮源的优化

固定 YEPD(二)培养基的其他成分(葡萄糖 2%),只改变氮源种类,进行转化,结果如表 4 所示.

表 3 蔗糖浓度的选择

Tab.3 Choice of surcose conlentvation %

蔗糖浓度	转化率	ee 值
0.5	47.3	72.90
1	43.1	88.44
2	43.4	88.55
3	45.6	88.68
4	42.4	86.40

表 4 复合氮源的选择

Tab.4 Choice of mixed nitrogen source %

氮源	转化率	ee 值
酵母膏 + 牛肉膏	49.2	86.37
酵母膏 + 硫酸铵	38.5	87.81
酵母膏 + 硝酸铵	41.8	85.51
酵母膏 + 尿素	0	0
酵母膏 + 玉米浆	37.2	87.50
酵母膏 + 豆饼粉	15.3	62.49
蛋白胨 + 硝酸铵	30.4	91.69
蛋白胨 + 牛肉膏	41.8	90.63
蛋白胨 + 豆饼粉	40.9	90.14
蛋白胨 + 硫酸铵	31.9	83.63
蛋白胨 + 尿素	32.5	80.43
蛋白胨 + 玉米浆	47.8	90.66

综合表中转换率和 ee 值的结果,选出蛋白胨和玉米浆为最佳氮源。

2.2.2.1 蛋白胨浓度的选择

选择蔗糖 2%、玉米浆 0.2% 浓度不变,改变蛋白胨的浓度(0.5% ~ 4%),进行转化,结果如表 5 所示。

表 5 蛋白胨浓度的选择

Tab.5 Choice of peptone concentration %

蛋白胨浓度	转化率	ee 值
0.5	43.1	90.33
1	47.1	89.33
2	48.9	86.70
3	50.2	86.00
4	50.7	85.32

综合转化率及 ee 值考虑,蛋白胨的最佳浓度在 0.5% ~ 1% 之间。

2.2.2.2 玉米浆浓度的选择

选择蔗糖 2%,蛋白胨 1% 浓度不变,只改变玉米浆的浓度(0.5% ~ 4%),进行转化,结果如表 6 所示。

综合转化率及 ee 值考虑,玉米浆的最佳浓度在 0.5% ~ 1% 之间。

表 6 玉米浆浓度的选择

Tab.6 Choice of corn steep liquor concentration %

玉米浆浓度	转化率	ee 值
0.5	50.0	86.40
1	51.4	84.90
2	52.5	81.70
3	51.9	78.80
4	52.1	82.756

2.2.3 培养 pH 的选择

在选定的培养基基础上(蔗糖 2%,蛋白胨 1%,玉米浆 0.5%),调 pH4.0 ~ 11.0,进行转化,结果如表 7 所示。

表 7 培养 pH 的选择

Tab.7 Choice of pH

pH	转化率/%	ee 值/%
4.0	34.3	93.51
5.0	42.8	91.93
6.0	45.1	91.27
7.0	45.9	91.17
8.0	46.9	91.63
9.0	46.8	93.19
10.0	30.3	86.09
11.0	19.6	20.74

由表中结果可知,pH 值为 7 ~ 9 是转化效果较好,该菌株的最佳生长条件为偏碱性条件。

2.2.4 缓冲体系的选择

在选定的培养基基础上(蔗糖 2%,蛋白胨 1%,玉米浆 0.5%),用不同的缓冲体系(Na_2HPO_4 -柠檬酸、Tris-HCl、 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4 -NaOH) 将培养基 pH 调至 8.0,28 ℃ 培养 48 h 后,加入 0.1% 底物于同样条件下转化 16 h,考察不同缓冲体系对转化的影响,结果如表 8 所示。

表 8 缓冲体系的选择

Tab.8 Choice of buffer system %

缓冲体系	转化率	ee 值
Na_2HPO_4 -柠檬酸	50.0	89.55
Tris-HCl	50.8	92.18
NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4	25.7	80.09
K_2HPO_4 -NaOH	51.6	85.88

如表所示结果表明,Tris-HCl 为最佳缓冲体系。

2.3 正交试验

为了保证菌种培养条件筛选的合理性,进行了一组在单因素基础上的正交试验,单因素条件

为:蔗糖 2% ,蛋白胨 1% ,玉米浆 0.5% ,pH 8.0,装液量 100 mL,培养 48 h 后加 0.1% 底物,转化 16 h.

K1、K2、K3 分别代表该列中水平号为 1、2、3 的转化率的总和;K1'、K2'、K3' 分别代表该列中水平号为 1、2、3 的 ee 值的总和;Rj:代表该列中 K1、K2、K3 的极差;Rj':代表该列中 K1'、K2'、

表 9 因素水平表

Tab.9 Factor and level table

种类	A. 蔗糖 /%	B. 蛋白 胨/%	C. 玉米 浆/%	D. pH
1	2	0.5	0.5	7.0
2	2.5	0.8	0.35	8.0
3	3	1	0.2	9.0

表 10 正交试验表

Tab.10 Orthogonal experiments table

试验号	A	B	C	D	转化率/%	ee 值/%
1	1	1	3	2	40.7	93.70
2	2	1	1	1	43.8	93.55
3	3	1	2	3	9.18	60.16
4	1	2	1	1	48.4	87.01
5	2	2	3	3	8.3	75.50
6	3	2	2	2	40.5	92.66
7	1	3	1	3	32.4	92.70
8	2	3	2	2	47.0	94.22
9	3	3	3	1	42.0	94.86
K1	273.4	247.4	278.9	275.4		
K2	263.3	255.2	241.4	280.6		
K3	247.7	281.8	264.1	228.4		
Rj	25.72	34.38	37.53	52.23		
K1'	121.5	93.68	116.7	134.2		
K2'	99.1	97.2	104.6	128.2		
K3'	91.68	121.4	91	49.88		
Rj'	29.82	27.72	25.7	84.32		

K3' 的极差;Rj、Rj' 数值越大表明该列因素对转化的影响越大.

在选择最优条件时,应当优先考虑对映纯度,同时兼顾转化率. 根据正交试验表的数据,按极差分析, A1B3C1D2 结果最好,其中 pH 对转化的影响最大,蔗糖和蛋白胨次之,玉米浆的影响最小. 直接看是 9 号即 A3B3C3D1 结果最好,对这两种条件进行验证,结果明按极差分析的结果比较可靠,最后确定培养基的组成为:蔗糖 2%、蛋白胨 1%、玉米浆 0.5%、pH8.0. 用最优的的条件转化,转化率 42%,产物 ee 值为 95.1%.

3 结论

利斯的明中间体拆分是由菌体中的酯酶催化完成的,不仅酶的产量受多种培养条件影响,酶反应和手性纯度也受多种因素影响. 本研究中发现转化产物的手性纯度受培养条件影响极大,一方面可能转化产物的 ee 值受酶所处条件影响,另一方面更可能存在多种酯酶,相关问题还待进一步证实. 这些结果显示,通过菌种选育还可进一步提高手性纯度和转化率.

参考文献:

[1] PAUL J, ANNA K , IAN G, et al. Rivastigmine in the treatment of parkinsonian psychosis and cognitive impairment: Preliminary findings from an open trial [J]. Movement Disord, 2001,16(6):1171-1174.

[2] 陈霞,张振馨,钱彩颖,等. 卡巴拉汀治疗血管性痴呆的开放性多中心随机对照研究[J]. 中华神经科杂志,2005,38(8):483~487.

[3] HAN K, KIM C, PARK J, et al. Chemoenzymatic synthesis of rivastigmine via dynamic kinetic resolution as a key step[J]. J. Org. Chem, 2010(75):3105-3108.

[4] LI Yong-hong, HUANG Li-hua, LIU Hong-min. Chemoenzymatic route to S-betaxolol[J]. Synthetic Communications, 2011,41(16):2468-247.

[5] 李永红,黄利华,刘宏民. 黄科学倍他洛尔立体拆分菌株的筛选与鉴定[J]. 工业微生物, 2009,39(3):17-20.

[6] 李永红,王瑞,刘宏民. 倍他洛尔立体拆分菌株培养条件优化[J]. 工业微生物, 2010,40(2):1-4.

[7] 李永红,王瑞,刘宏民. 微生物法拆分制备 S-倍他洛尔中间体[J]. 郑州大学学报:理学版, 2010,42(2):110-114.

(下转第 128 页)

- [J]. 中外能源, 2008, 13(9): 110 - 115.
- [8] 章许云. 管式加热炉炉管结焦分析[J]. 石油和化工设备, 2010, 31(5): 51 - 53.
- [9] 吕运容, 陈文红. 提高加热炉热效率的有效途径[J]. 中国设备工程. 2008(7): 22 - 23.

Analysis of the Heating Efficiency of Furnace and Energy-saving Measures

WANG Hai-feng¹, LI Ming², HAN Yong-qing², ZHOU Cai-rong¹

(1. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Luoyang Petrochemical Company, Luoyang 471000, China)

Abstract: Thermal efficiency, as an important indicator to measure the heating furnace advanced and the operation, is directly related to a level of energy consumption of the workshop production. Based on a combustion status of the wax oil hydrogenation unit heating furnace for Luoyang petrochemical company, some factors of influence on the thermal efficiency of heating furnace were analyzed, and some improvement measures were put forward to achieve the goal of energy saving. Furnace thermal efficiency is mainly affected by the excess air ratio, exhaust gas temperature, carbon monoxide content of factors. the results show that the excess air coefficient increased about 6.3%, thermal efficiency reduced about 0.4% when the oxygen content is increased by 1%; amount of carbon monoxide is increased by 100 mg/L, thermal efficiency is reduced by about 0.05%; and the exhaust gas temperature is increased by 5 °C, the thermal efficiency of about 0.25% is lower. In order to improve the efficiency of the heating furnace, it is necessary that oxygen content is with in 2% ~ 4%, exhaust temperature is with in 125 ~ 135 °C and as low as possible for the content of carbon monoxide.

Key words: thermal efficiency; excess air ratio; carbon monoxide; exhaust gas temperature; thermal radiation loss

(上接第 116 页)

- [8] 刘宏民, 李永红, 王瑞, 等. 具有立体选择性脂肪酶活性的酵母菌及其在生物拆分法制备 S-型盐酸倍他洛尔中的应用[P]. ZL200710300064.3, 2011.
- [9] 杜连祥, 路福平. 微生物学试验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 52 - 354.
- [10] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物试验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 39 - 42.
- [11] 叶选怡. 高转化率酵母的筛选鉴定及培养条件的优化研究[D]. 江南大学生物工程学院, 2001, 8 - 38.

The Influence of Rivastigmine Stereo-resolving Strain Culturing Conditions on the ee Value and Conversion Ratio

LI Yong-hong^{1,2}, HOU Li-fen³, ZHAO Jun-jie², QI Hui², ZHAO Chang-qiu⁴, LIU Hong-min^{1,2}

(1. New Drug Research & Development Center, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 3. College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 4. Furen Pharmaceutical R & Co. Ltd, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: An isolated stain *Meyerozyma guilliermondii* HM988686.1 was found to be able to stereo-resolve rivastigmine intermediates. The compositions of its culture medium (both carbon and nitrogen sources) and other technological conditions (temperature, pH and capacity in shaking flask) were investigated. Through single factor and orthogonal experiments, the optimum culturing conditions of this strain were determined as follows: sucrose 2%, peptone 1%, corn steep liquor 0.5%, pH 8.0, temperature 28 °C, and 100mL medium in a 500 mL shaking-flask. Under the optimum conditions, the conversion ratio was 42% and the ee value reaches 95.1%.

Key words: medium; culturing condition; optimization; *Meyerozyma guilliermondii*; rivastigmine