

文章编号:1009-038X(2004)02-0005-03

微生物转化法生产 *d*-伪麻黄碱

董世建¹, 石贵阳², 卢燕¹, 张梁¹, 蔡宇杰¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 初步探讨了一种微生物转化生产 *d*-伪麻黄碱的新方法. 通过 TLC 和 HPLC 分析, 对实验室保藏菌株进行筛选, 得到可专一性转化前体物质 1-苯基-2-甲氨基丙酮(1-phenyl-2-methylamino-propanone, 简称 MAK) 生成 *d*-伪麻黄碱的菌株 *Morganella morganii* J-8. 通过对转化条件的研究, 发现最适起始转化 pH 为 7.5, 最适转化温度为 40 °C. 在合适的转化条件下, 经过 24 h 能将 1 000 mg/L 的 MAK 转化为 852.4 mg/L 的 *d*-伪麻黄碱, 相应的摩尔转化率为 84.4%.

关键词: *Morganella morganii*; 微生物转化; *d*-伪麻黄碱

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Microbial Transformation for *d*-pseudo-Ephedrine by *Morganella morganii*

DONG Shi-jian¹, SHI Gui-yang², LU Yan¹, ZHANG Liang¹, CAI Yu-jie¹

(1. The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A new technique of ephedrine production by microbial transformation was studied. TLC and HPLC methods were used and *Morganella morganii* J-8 was isolated from microorganisms preserved by the laboratory. The optimal conditions of the transformation were established: initial pH 7.5 and temperature 40 °C. The strain could transform 1 000 mg/L 1-phenyl-2-methylamine-acetone (MAK) to 852.4 g/L *d*-pseudoephedrine with a molar yield of 84.4% in 24 h.

Key words: *Morganella morganii*; microbial transformation; *d*-pseudoephedrine

麻黄碱又称麻黄素, 其差向异构体 *l*-麻黄碱和 *d*-伪麻黄碱是著名中药麻黄的主要活性成分, 都是多功能多用途药物, 在临床上有广泛的应用. *l*-麻黄碱属拟肾上腺素激动药, 主要用于治疗支气管哮喘、各种咳嗽、过敏反应、低血压等症, 还具有松弛平滑肌, 收缩血管, 加速心率, 升高血压及中枢神经兴奋

作用. *d*-伪麻黄碱为拟交感神经药, 其收缩上呼吸道粘膜血管作用与 *l*-麻黄碱相当, 升压作用只及 *l*-麻黄碱一半, 它对心血管和中枢神经系统兴奋作用明显弱于麻黄碱, 但是其加快心率、升高血压、中枢兴奋等不良反应较轻, 并具有显著的利尿作用, 快速耐受性也较 *l*-麻黄碱大, 因此 *d*-伪麻黄碱药用价

收稿日期: 2003-09-16; 修回日期: 2003-10-30.

基金项目: 教育部青年骨干教师重点项目(教技司[2000]143)资助课题.

作者简介: 董世建(1979-), 男, 山东青州人, 发酵工程硕士研究生.

值日益受到人们的重视. 临床上含麻黄碱和伪麻黄碱治疗感冒的复方药物很多, 如白加黑、新康泰克、银得菲、泰诺感冒片等. 治疗咳嗽的中成药有定喘宁胶囊、小儿止咳糖浆等.

对麻黄碱的生产, 国内主要采用植物提取法, 直接从麻黄草中提取麻黄碱. 这种传统工艺工序繁琐, 劳动强度大, 生产成本低, 直接依赖麻黄草资源, 产量小且不稳定. 此外, 麻黄碱的生产也有直接化学合成的报道^[1], 但是产生的是 *dl*-麻黄碱和 *dl*-伪麻黄碱的外消旋体, 需要进一步拆分, 成本较高. 印度、美国、澳大利亚、捷克等国家生产的麻黄碱大都是利用化学方法生产的合成品^[2].

利用生物转化法生产麻黄碱有许多优势, 国内外报道一种半生物转化生产麻黄碱的方法是: 先用丙酮酸脱羧酶将苯甲醛转化为苯基乙酰基甲醇(R-PAC), 再进一步合成麻黄碱^[3~7]. 而利用微生物直接生物转化法生产麻黄碱国内外还未见公开报道. 作者通过筛选得到可转化前体物质生成 *d*-伪麻黄碱的菌株, 并对转化条件做了研究, 旨在探索出一条利用生物技术, 直接微生物转化法生产天然麻黄碱的新途径.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 *Morganella morgani*, 由江南大学生物资源研究室选育并保存.

1.1.2 发酵培养基 组分(g/dL): 葡萄糖 3.0, 酵母膏 0.5, 蛋白胨 2.5, K_2HPO_4 0.3, NaCl 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, 酵母营养盐 0.002. 去离子水配制, NaOH 溶液调 pH 值为 7.0, 0.1 MPa 灭菌 15 min.

1.1.3 转化前体 1-苯基-2-甲氨基丙酮(1-phenyl-2-methylamino-propanone, 简称 MAK), 由江南大学生物资源研究室合成.

1.1.4 薄板扫描仪 岛津 CS-9301 型薄板扫描仪.

1.1.5 高效液相色谱系统 全自动 HPLC, 美国 Agilent 公司制造; 色谱柱为 ZORBAX SB C_{18} (250 mm \times 4.0 mm); 紫外检测器.

1.2 实验方法

1.2.1 转化液制备 斜面菌种接入发酵培养基, 于 30 $^{\circ}C$, 150 r/min 培养活化 24 h, 再按 10% 接种量转接, 同样条件下培养 48 h. 培养结束后, 培养液于 3 000 r/min 离心 30 min, 湿菌泥用缓冲液浸洗 2~3 次, 离心去除表面物质, 冷冻干燥得到干菌体.

取 0.1 g 干菌体, 加 MAK、葡萄糖和磷酸缓冲液配成 5 mL 反应溶液. 反应溶液在 150 r/min 和 30 $^{\circ}C$ 条件下反应, 反应结束后于 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液.

1.2.2 比转化活力的测定 转化开始后 3 h 取样, 用 HPLC 分析. 一个转化活力为: 在 1 min 内, 1 μ mol/L 的伪麻黄碱生成 1 个单位(1 U).

1.2.3 标准溶液配制 按计算量准确称取 *l*-麻黄碱、*d*-伪麻黄碱对照品和 MAK, 溶于磷酸缓冲液, 准确定容备用.

1.2.4 薄层条件及扫描条件 见文献[8].

1.2.5 HPLC 条件 流动相: 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液: 甲醇: 三乙胺的体积比为 96:4:0.013, 用醋酸调 pH 值至 5.0, 体积流量 1.0 mL/min. 柱温 40 $^{\circ}C$, 进样量 10 μ L, 检测波长 210 nm.

2 结果与讨论

2.1 薄层层析扫描法初筛

据张梁^[8]等人的研究, 从实验室保藏的菌种中, 用 TLC 扫描, 初步得到一株菌(编号为 J-8), 该菌有较好的底物转化能力, 可以将 MAK 转化为麻黄碱, 转化得麻黄碱的质量浓度为 73.17 mg/L. 但 TLC 无法确定所产麻黄碱的构型, 也无法确定转化产物是一种构型还是两种构型的混合物, 因而有必要对转化产物作进一步分析.

2.2 HPLC 分析产物构型

图 1 为转化前体 MAK 与 *l*-麻黄碱、*d*-伪麻黄碱标准品的 HPLC 图谱, 从左到右依次为 *l*-麻黄碱、MAK 和 *d*-伪麻黄碱. 用 HPLC 分析 J-8 菌的生物转化液的图谱见图 2. 如果 MAK 不被转化, 在转化液的图谱中应该只有保留时间为 25 min 左右的峰, 而在其前后不会有面积较大的峰出现. 对照图 1, 2, 可以清楚地看出, 在 MAK 峰的后面有保留时间为 26.499 min 的峰, 与标样中 *d*-伪麻黄碱的保留时间十分接近, 因为薄板层析的结果已经证明转化产物为麻黄碱, 因此可以确定此峰即是 *d*-伪麻黄碱. 而且在转化液图谱中没有出现与 *l*-麻黄碱保留时间相近的峰, 可以判断转化液中无 *l*-麻黄碱构型. 因此可以得出结论: J-8 菌可以将前体 MAK 专一性地转化为 *d*-伪麻黄碱.

2.3 转化条件的确定

2.3.1 初始 pH 值对转化的影响 配制 0.2 mol/L 的不同 pH 值的磷酸缓冲液作为转化基质, 转化实验结果见图 3. 从图 3 可以看出, 转化体系的初始

pH 值对转化活力影响较大. 在酸性条件下, 菌体转化活性较低, pH 值低于 6.0 时的转化活力几乎为零; 在微碱性条件下, 菌体转化活力较高. 当初始转化 pH 值为 7.5 时, 转化活力达到最高, 为 4.36.

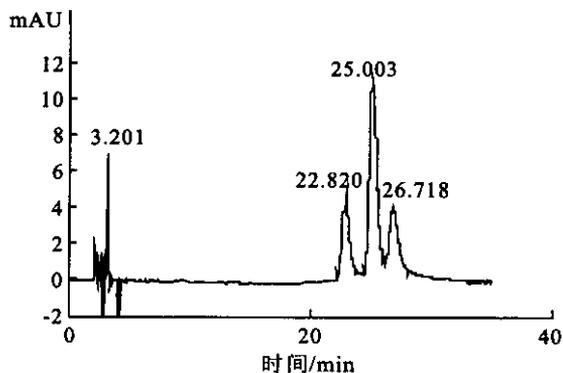


图 1 标样的 HPLC 图谱

Fig. 1 Chromatograms of standards

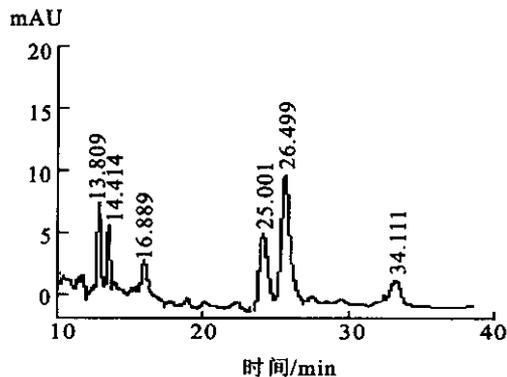


图 2 J-8 转化液图谱

Fig. 2 Chromatograms of bioconversion

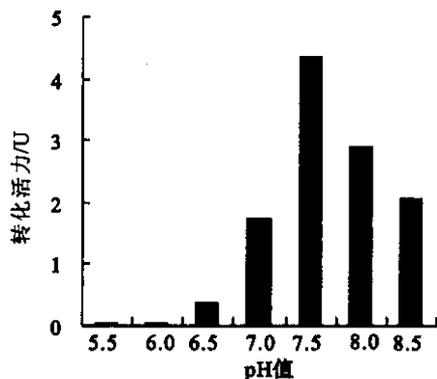


图 3 起始 pH 对转化的影响

Fig. 3 The effect of initial pH on transformation

2.3.2 转化温度的确定 在初始 pH 值为 7.5 时, 考察了不同温度下的转化情况, 结果见图 4. 从图 4 可以看出, 菌体在较宽的温度范围内都表现出活性, 转化温度在 40 °C 时, 转化活力最大.

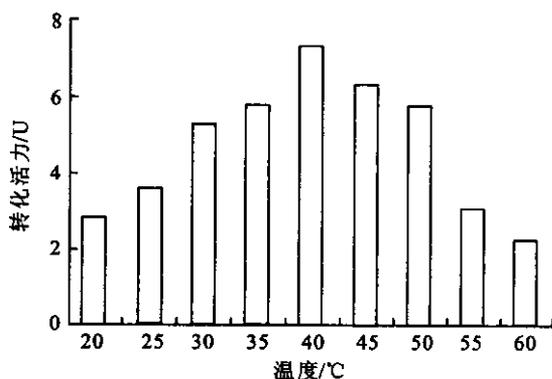


图 4 温度对转化的影响

Fig. 4 The effect of temperature on transformation

2.4 转化过程曲线

在初始 pH 值为 7.5、转化温度为 40 °C 时, 一次添加前体质量浓度为 1 000 mg/L 的条件下, 对 J-8 菌的转化过程进行研究, 结果见图 5. 从图 5 可以看出, 在转化开始的 6 h 内, *d*-伪麻黄碱的浓度基本呈线性增长, 因此反应活性的测定时间可选择 3 h. 在 12 h 后, *d*-麻黄碱的产生速度明显下降. 在 24h 时, *d*-伪麻黄碱浓度达到最大, 为 852.4 mg/L, 此时的摩尔转化率为 84.4%.

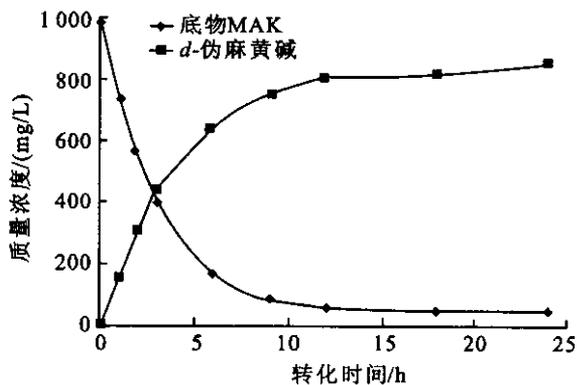


图 5 转化过程曲线

Fig. 5 The curve of transformation course

3 结 论

通过菌种筛选, 得到一株可专一性转化生产 *d*-伪麻黄碱的菌株. 初步研究了生物转化条件, 转化的最适起始 pH 值为 7.5, 最适转化温度为 40 °C. 在一次性添加 1 000 mg/L 的底物条件下, 经过 24 h, *d*-伪麻黄碱质量浓度达到 852.4 mg/L, 摩尔转化率为 84.4%. 初步研究结果显示, 利用前体 MAK, 经过 J-8 菌一步生物转化生产 *d*-伪麻黄碱的方法具有可行性.

(下转第 16 页)

下,可以获得最佳酶解效果.在此条件下产品经结构分析,确定所获得的多糖产品为纯一的 β -1,3 葡聚糖,且有效地去除了蛋白质等杂质.

参考文献:

- [1] Tokuya Harada, Akira Misaki, Hirose Saito. Curdlan; a bacterial gel-forming β -1,3-Glucan[J]. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, 1968,124:292-298.
- [2] TAKEDA Chemical industry Ltd, Japan. Preparation of segregation-reducing agent for hydraulic compositio[P]. EP: 588665,1994.
- [3] 刘如林,赵大健. 微生物多糖的产品回收[J]. **食品与发酵工业**,1990,5:58-63.
- [4] Donald E Renn. Purified curdlan and its hydroxyalkyl derivatives;preparation, properties and applications[J]. **Carbohydrate polymers**, 1997,33:219-225.
- [5] Toshio Tada, Takayoshi Matsumoto, Toshiro Masuda. Structure of molecular association of curdlan at dilute regime in alkaline aqueous systems[J]. **Chemical Physics**,1998,228:157-166.
- [6] 王霜,吴振强,余若黔,等. 谷氨酸菌体破碎条件的优化研究[J]. **生物技术**,1997,7(5):26-30.
- [7] 徐建祥,晏志云,赵谋明,等. 酶法脱蛋白技术用于螺旋藻多糖提取工艺的研究[J]. **食品与发酵工业**,24(3):2002,24-27.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 7 页)

参考文献:

- [1] 孙同庆,石鸿昌. *dl*-麻黄碱和 *dl*-伪麻黄碱的合成[J]. **中国医药工业杂志**, 2000, 31(12):534-535.
- [2] 梁卯生. 伪麻黄碱的发展概况及建议[J]. **化学医药工业信息**, 1993,(4):14-16.
- [3] 胥秀英,郑一敏,温寿祯,等. 左旋麻黄素半生物合成的研究(I)L-苯基乙酰基甲醇生物合成条件研究[J]. **生物学杂志**,2001, 18(1):18-21.
- [4] 李继珩,尚广东. 高产苯基乙酰基甲醇菌株选育[J]. **氨基酸和生物资源**, 2001, 23(1):16-21.
- [5] Bettina R, Vanessa S, Michael B, *et al.* Enzymatic (R)-phenylacetylcarbinol production in benzaldehyde emulsions[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 60(1-2):94-100.
- [6] Rosche B, Sandford V, Breuer M, *et al.* Enhanced production of R-phenylacetylcarbinol (R-PAC) through enzymatic biotransformation[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2002,(19-20): 109-115.
- [7] Shin H S, Rogers P L. Biotransformation of benzaldehyde to *l*-phenylacetylcarbinol, an intermediate in *l*-ephedrine production by immobilized *Candida utilis*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1995,44 : 7-14.
- [8] 张梁,石贵阳,董世建. 薄层扫描法检测生物转化液中麻黄碱的含量[J]. **无锡轻工大学学报**, 2002,23 (2):179-182.

(责任编辑:李春丽)